ΟΣΤΟΥΝ

Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών (ΕΕΜΜΟ)

Τόμος 23
Τεύχος 1
Ιανουάριος-Φεβρουάριος-Μάρτιος 2012

Κωδικός 4099

ΠΛΗΡΩΜΕΝΟ ΤΕΛΟΣ
ΚΕΜΠ
ΚΡΥΟΝΕΡΙΟΥ
Αριθμός Αδείας 341

ΕΛΤΑ
Hellenic Post

ΕΝΤΥΠΟ ΚΛΕΙΣΤΟ ΑΡ. ΑΔΕΙΑΣ 941/90
Θράκης 2, 151 24 Μαρούσι

ISSN 1106-109X

www.eemmo.gr
8ο Θερινό Σχολείο ΕΕΜΜΟ
Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών
27 Ιουνίου - 1 Ιουλίου 2012
Royal Myconian Hotel
Μύκονος
Διοργάνωση
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
Θράκης 2, 151 24 Μαρούσι, T/F: 210 6128606, E-mail: eemmo@otenet.gr
ΕΕΜΜΟ
Οργάνωση - Γραμματεία
Θεσσαλονίκη
Λέοντος Σοφού 8, 54625 Θεσ/νίκη, T: 2310 527376
F: 2310 527376, E-mail: info@pco-convin.gr
Αθήνα
Κ. Βάρναλη 29, 15233 Χαλάνδρι, T: 210 6833600
F: 210 6847700, E-mail: congress@pco-convin.gr
PCO CONVIN S.A.
WWW.PCO-CONVIN.GR

Η Ενεργή Βιταμίνη D

One-Alpha®

alfacalcidol

Η νέα πρακτική μορφή του One-Alpha® έχει ως σκοπό να διευκολύνει τη μακροχρόνια αγωγή της Οστεοπόρωσης

Κυκλοφορεί και στις μορφές:

- 0.25 μg
- 1 μg
- Drops

Για πλήρεις συνταγογραφικές πληροφορίες μπορείτε να επικοινωνήσετε στην τηλεφωνική γραμμή 210 68 34 322

© LEO copyright One-Alpha AND LEO® ARE REGISTERED TRADEMARKS OWNED BY LEO GROUP

L E O

LEO Pharmaceutical Products Hellas Ltd.
Μενεξέδων 10, 145 64 Κηφισιά , Τηλ. 210 6834322, fax. 210 6834342
Γραφείο Βορείου Ελλάδος: Υμηττού 5, 544 53 - Θεσσαλονίκη, Τηλ. 2310 989221, Fax. 2310 989236, http://www.leo.gr

LEO®

ΟΣΤΟΥΝ

ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ
Γεώργιος Λυρίτης

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ
Παναγιώτης Παπαγγελόπουλος

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΕΚΔΟΣΗΣ
Ανδρέας Μαυρογένης

ΜΕΛΗ ΕΚΔΟΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Βοσκάκη Ειρήνη	Πασπάτη Ιωάννα
Γιαννίκου Παναγιώτα	Ράπτου Παναγιώτα
Ιωακειμίδης Δημήτριος	Σάπκας Γεώργιος
Καπετάνος Γεώργιος	Τζάνος Γεώργιος
Καραχάλιος Θεόφιλος	Τροβάς Γεώργιος
Μπάκας Ελευθέριος	Χάλντη Λούμπνα
Παπαϊωάννου Νικόλαος	Χατζηδάκης Δημήτριος

ISSN 1106 109X

QUARTERLY PUBLICATION OF THE HELLENIC SOCIETY FOR THE STUDY OF BONE METABOLISM

EDITOR IN CHIEF
George Lyritis

ASSOCIATE EDITOR
P. Papagelopoulos

ASSISTANT EDITOR
A. Mavrogenis

EDITORIAL BOARD

I. Voskaki	I. Paspati
P. Giannikou	P. Raptou
D. Ioakimidis	G. Sapkas
G. Kapetanos	G. Tzanos
Th. Karahalios	G. Trovas
E. Bakas	L. Khaldi
N. Papaioannou	D. Hadjidakis

Συνδρομές/Διαφημίσεις: κα Φωτεινή Παχούλα, Τηλ. 210 6128606

DTP: Υλονομη, Τηλ. 210 2846530, Παραγωγη: Press Line, Τηλ. 210 5225479

ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΕΜΜΟ 2011–2012

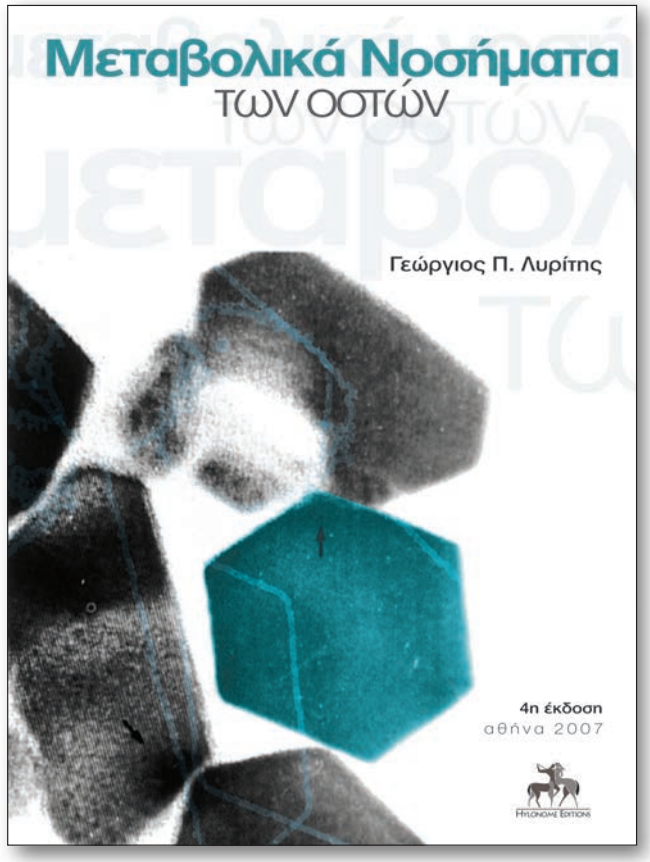
Προεδρος
Ευαγγελία Καταξάκη

Αντιπροεδρος
Φωτεινή Παπαδοπούλου

Γενικος Γραμματεας
Χρήστος Κοσμίδης

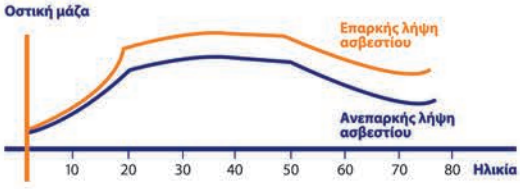
Ταμιας
Αικατερίνη Σφυρόερα

Μελη
Γεώργιος Αντύπας
Σπύρος Ασλανίδης
Πολυζώης Μάκρας

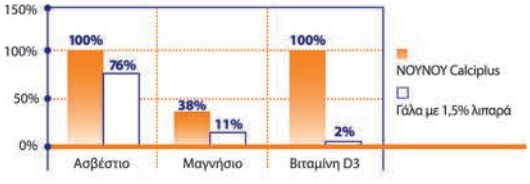


Η δύναμη της έρευνας και της επιστήμης σε ένα μοναδικό συνδυασμό

Εξέλιξη της οστικής μάζας στις γυναίκες



Κάλυψη της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης με 2 ποτήρια γάλα (500 ml)



Η καθημερινότητα μιας γυναίκας είναι γεμάτη από μικρές και μεγάλες κινήσεις.

Κάποιες από αυτές είναι απλές και άλλες πιο έντονες.

Όλες βασίζονται σε ένα γερό σκελετό, σε ένα γερό σώμα.

Γι' αυτό, είναι σημαντικό όλοι μας να θωρακίζουμε τα οστά μας και να διατηρούμε ένα γερό σκελετό και κυρίως οι γυναίκες, οι οποίες έχουν αυξημένες διατροφικές ανάγκες σε Ασβέστιο, Μαγνήσιο και Βιταμίνη D3. Το Ασβέστιο και το Μαγνήσιο είναι τα πιο βασικά δομικά συστατικά των οστών και η Βιταμίνη D3 συμβάλλει στην αύξηση της απορρόφησής τους στο έντερο και τη συγκράτησή τους στα οστά.

Γι' αυτό, το NOYNOY Calciplus έχει δημιουργήσει μια σειρά προϊόντων (γάλα και γιαούρτι), που περιέχει τον πολύτιμο συνδυασμό Ασβεστίου, Μαγνησίου και Βιταμίνης D3, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη απορρόφηση και συγκράτηση του ασβεστίου από τα οστά.

Σύμφωνα με μελέτες*, ο συνδυασμός αυτός του NOYNOY Calciplus αυξάνει την οστική μάζα με μετρήσιμα αποτελέσματα, + 8% στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης και +4% στην περιοχή της λεκάνης.

NOYNOY®
Calciplus
Γερή, ώς το κόκκαλο.

ADEL SAATCHI & SAATCHI

Επίσημος χορηγός των:

ΕΛΙΟΣ Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης

* Κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τις επιστημονικές ομάδες του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου και της Ιατρικής Σχολής Αθηνών σε δείγμα 101 μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ηλικίας 55-65 ετών.

Η υγεία των οστών μας δεν είναι παιχνίδι...

GREY

Για υγιή οστά... ασβέστιο.

Η εμμηνόπαυση, η εγκυμοσύνη, η γαλουχία αυξάνουν τις ανάγκες του οργανισμού σε ασβέστιο. Η έλλειψη άσκησης, η υπερκατανάλωση καφέ και αλκοόλ, το κάπνισμα αυξάνουν τον κίνδυνο για οστεοπόρωση σε άνδρες και γυναίκες.

Το Caltrate συμπληρώνει καθημερινά τη διατροφή σε ασβέστιο και βιταμίνη D.

- Περιέχει 600mg στοιχειακού ασβεστίου καθώς και βιταμίνη D για κλινικά αποδεδειγμένη απορρόφηση του ασβεστίου.
- Σε μορφή **δισκίου** για εύκολη λήψη.

No 1 στον κόσμο

CALT-04-Oct20II

ΣΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΙΑ

Συμπλήρωμα Διατροφής Ασβεστίου με Βιταμίνη D

Caltrate®

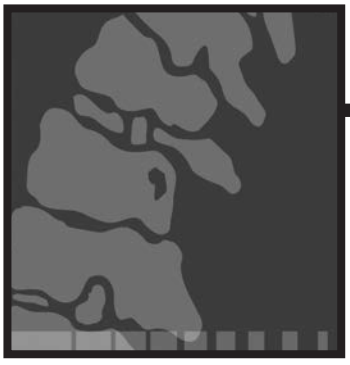
Σωστή φροντίδα για γερά οστά!

Αρ. Γνωστοποίησης ΕΟΦ: 10173/11.02.2010

Pfizer Hellas A.E.,
Λ. Μεσογείων 243, 154 51 Ν. Ψυχικό.
Για πληροφορίες: 210-99.49.500

Pfizer

Τα συμπληρώματα διατροφής δεν υποκαθιστούν την ενδεδειγμένη και ισορροπημένη διατροφή, αλλά την συμπληρώνουν



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τόμος 23, Τεύχος 1, Ιανουάριος-Φεβρουάριος-Μάρτιος 2012

Μελέτη *in vitro* και *in vivo* της δράσης του Ελληνικού φυτού *Sideritis euboea* (τσάϊ του βουνού) – διερεύνηση μηχανισμού δράσης
Ι.Α. Δοντά και συν 8

In vitro and *in vivo* effect of the Greek plant *Sideritis euboea* (mountain tea) – study of its mechanism of action
I.A. Dontas et al 8

Διαφορική έκφραση των ισομορφών του IGF-1 στα κύτταρα MG-63 ανθρώπινου οστεοσαρκώματος
Α. Αρμακόλας και συν 26

IGF-1 isoform expression in MG-63 human osteoblast-like osteosarcoma cells
A. Armakolas et al 26

Το σηματοδοτικό μονοπάτι IKK-MAPK-IκB/ NF-κB ως στόχος μηχανικής διέγερσης οστεοβλαστικών κυττάρων
Γ. Νταλαγιώργου και συν 38

The signalling pathway IKK-MAPK-IκB/NF-κB as a target of mechanical loading in osteoblast-like cells
G. Dalagiorgou et al 38

Καλοήθεις όγκοι των οστών στα παιδιά
Ι. Λυμπάρη 49

Benign bone tumors in children
J. Lympari 49

Σχετιζόμενη με διφωσφονικά οστεονέκρωση της γνάθου
Α. Μητρόπουλος και συν 60

Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw
A. Mitropoulos et al 60

Οδηγίες προς τους συγγραφείς 65

Instructions to authors 65

Προσεχείς επιστημονικές εκδηλώσεις 66

Scientific meetings 66

Μελέτη *in vitro* και *in vivo* της δράσης του Ελληνικού φυτού *Sideritis euboea* (τσάϊ του βουνού) – διερεύνηση μηχανισμού δράσης

Ι.Α. ΔΟΝΤΑ[1,2], Π.Π. ΛΕΛΟΒΑΣ[1], Π. ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ[3], Ε. ΚΑΣΣΗ[3], Σ. ΚΟΥΡΚΟΥΛΗΣ[4], Σ. ΜΗΤΑΚΟΥ[5], Χ.Κ. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΣ[1], Ν. ΑΛΙΓΙΑΝΝΗΣ[5], Α. ΓΑΛΑΝΟΣ[1], Γ.Π. ΛΥΡΙΤΗΣ[1]

[1] Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης», Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
[2] Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής & Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας», Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
[3] Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
[4] Μονάδα Εμβιομηχανικής, Εργαστήριο Αντοχής Υλικών ΕΜΠ
[5] Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Φαρμακευτικό Τμήμα ΕΚΠΑ

** Βραβείο 2006 της ΕΕΜΜΟ στην Πρόταση των: Ισμήνη Α. Δοντά, Παρασκευή Μουτσάτσου, Χρήστος Γιαννακόπουλος, Λούμπνα Χάλντη, Αντώνης Γαλανός, Γεώργιος Π. Λυρίτης*

Περίληψη

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης του εκχυλίσματος του φυτού *Sideritis euboea* (SID), το οποίο καταναλώνεται ευρέως ως τσάϊ του βουνού, σε κυπαροκαλλιέργειες οστεοβλαστών και στην οστική πυκνότητα και αντοχή του πειραματικού προτύπου της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, δηλαδή του ώριμου ωοθηκεκτομημένου (OVX) επίμυος. **Υλικά και Μέθοδοι:** Σε κυπαροκαλλιέργειες οστεοβλαστών προστέθηκε SID και οιστραδιόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αντίστοιχα, 32 ώριμοι θηλυκοί επίμυες Wistar χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: Ελέγχου, OVX, και OVX που λάμβαναν SID (OVX+SID) χορηγούμενο εντός του ποσίμου ύδατός τους (330 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, αρχής γενομένης αμέσως μετά την OVX επί 6 μήνες. Μετρήθηκαν η οστική πυκνότητα (BMD) της κνήμης στην αρχή της μελέτης, 3 και 6 μήνες μετά την OVX, η μηχανική αντοχή του μηριαίου οστού και το βάρος σώματος και μήτρας στο τέλος της μελέτης. **Αποτελέσματα:** Το εκχύλισμα SID προκάλεσε σημαντική και δοσοεξαρτώμενη μείωση της οστεοβλαστικής έκκρισης της IL-6 καθώς και του RANKL. Η *in vivo* μελέτη έδειξε ότι η % αλλαγή της BMD της κνήμης ήταν παρόμοια στις Ομάδες Ελέγχου και OVX+SID στους 3 μήνες, ενδεικτική ισχυρής οστεοπροστατευτικής δράσης. Στους 6 μήνες η δράση αυτή ήταν λιγότερο ισχυρή, όμως η οστική απώλεια ήταν λιγότερη στα OVX+SID ζώα απ' ότι στα OVX (-14.37% έναντι -20.46% αντίστοιχα, $p<0.05$). Στις περισσότερες παραμέτρους του pQCT, η Ομάδα OVX+SID είχε ενδιάμεσες τιμές από τις άλλες δύο ομάδες. Η δοκιμασία αντοχής του μηριαίου έδειξε αύξηση της αντοχής της Ομάδας OVX+SID σε σχέση με την OVX. Το βάρος σώματος και μήτρας ήταν παρόμοια στην Ομάδα OVX+SID και OVX. **Συμπέρασμα:** Η χορήγηση του εκχυλίσματος SID *in vitro* σε καλλιέργειες οστεοβλαστών φάνηκε να μειώνει την έκκριση της IL-6 καθώς και του RANKL. Η *in vivo* χορήγησή του είχε σημαντική προστατευτική δράση στην οστική ποσότητα και ποιότητα των OVX+SID επιμύων σε σύγκριση με τους OVX, χωρίς να εμφανίζει ανεπιθύμητη επίδραση στη μήτρα. Οι δράσεις αυτές είναι παρόμοιες με των εκλεκτικών τροποποιητών των υποδοχέων οιστρογόνων και αξίζουν περαιτέρω κλινικής έρευνας για την επιβεβαίωση του ρόλου του συγκεκριμένου εκχυλίσματος στην πρόληψη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης.

Λέξεις κλειδιά: Ωοθηκεκτομή, Επίμυες, Οστεοπόρωση, Οστική Πυκνότητα, Απορροφησιομετρία Διπλής Ενεργειακής Δέσμης Ακτίνων Χ, Δοκιμή Κάμψης 3 Σημείων

In vitro and *in vivo* effect of the Greek plant *Sideritis euboea* (mountain tea) – study of its mechanism of action

I.A. DONTAS[1,2], P.P. LELOVAS[1], P. MOUTSATSOU[3], E. KASSI[3], S. KOURKOULIS[4], S. MITAKOU[5], C.K. YIANNAKOPOULOS[1], N. ALIGIANNIS[5], A. GALANOS[1], G.P. LYRITIS[1]

[1] Laboratory for Research of the Musculoskeletal System "Th. Garofalides", School of Medicine, University of Athens, Greece
[2] Laboratory of Experimental Surgery & Surgical Research "N.S. Christeas", School of Medicine, University of Athens, Greece
[3] Laboratory of Biological Chemistry, School of Medicine, University of Athens, Greece
[4] Unit of Biomechanics, Laboratory of Testing and Materials, National Technical University of Athens, Greece
[5] Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Greece

Summary

The aim of this study was to investigate the effect of *Sideritis euboea* extract (SID), commonly consumed as mountain tea, on osteoblast cultures and on bone mineral density and the strength of the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis. **Methods:** Osteoblast cultures were treated with SID extract and estradiol at different concentrations. Additionally, 32 mature female Wistar rats were separated into Controls (sham-operated), OVX, and OVX plus SID in their drinking water (330 mg/kg body weight/day), starting immediately after OVX for 6 months. Tibial bone mineral density (BMD) at baseline and at 3 and 6 months post-OVX, 3-point-bending of the femur, and body and uterine weight at the study end were examined. **Results:** Osteoblast secretion of IL-6 and RANKL was significantly reduced by SID extract, with both effects being dose-dependent and more potent at the higher concentrations. The *in vivo* study showed that BMD percentage change from baseline of the whole tibia was similar in Control and OVX+SID rats at 3 months, revealing a strong osteoprotective effect. At 6 months, the protective effect was weaker, but still significant (OVX vs OVX+SID, -20.46% vs -14.37%, $p<0.05$). The metaphyseal tibial BMD percentage change from baseline to 3 and 6 months between the OVX and OVX+SID groups was statistically significant (-26.47% vs -15.57% and -31.22% vs -16.57%, respectively), demonstrating that SID administration preserved the proximal tibial BMD of the OVX+SID group significantly. In most of the pQCT parameters examined, the OVX+SID group had intermediate values of the other two groups. Three-point-bending showed a significant increase in bone strength of the treated compared to the OVX group. Body and uterine weights were similar in the treated and OVX groups. **Conclusions:** SID extract administration demonstrated a significant bone quantity and quality protective effect in OVX+SID rats compared with OVX rats, without having an undesirable effect on their uteri. This mechanism of action is similar to selective estrogen receptor modulators' and merits further clinical studies to ascertain its potential role in postmenopausal osteoporosis prevention.

Keywords: Ovariectomy, Rat, Osteoporosis, Bone mineral density, Dual-energy x-ray absorptiometry, Three-point-bending

Εισαγωγή

Η σύγχρονη έρευνα υποστηρίζει ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ διατροφής και υγείας, δεδομένου ότι τα επί μέρους συστατικά πολλών φυτών της διατροφής, αλλά και τα φυτικά εκχυλίσματα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη παθήσεων όπως είναι η οστεοπόρωση, ο καρκίνος και η στεφανιαία νόσος [1-3]. Η οστεοπόρωση θεωρείται ως μία από τις κυριότερες αιτίες αναπηρίας και θανάτου σε προχωρημένες ηλικίες, λόγω της αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας των οστεοπορωτικών καταγμάτων, και η πιο διαδεδομένη μορφή της είναι η μετεμμηνοπαυσιακή. Υπάρχουν πολλές φαρμακευτικές αντιοστοπορωτικές θεραπείες οι οποίες εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση του νοσήματος, όπως θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, η καλσιτονίνη, τα διφωσφονικά, οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων οιστρογόνων (SERMs), η παραθορμόνη και το ρανελικό στρόντιο [4,5]. Όμως, αρκετά συχνά παρατηρείται μειωμένη συμμόρφωση των ασθενών εξαιτίας ανεπιθύμητων παρενεργειών, σοβαρών ή λιγότερο σοβαρών, που παρατηρούνται κατά τη μακροχρόνια χορήγηση των προαναφερθέντων παραγόντων [6-8].

Η επιθυμία για μια μη φαρμακολογική προστατευτική αγωγή καθώς και επιδημιολογικές ενδείξεις για την ευεργετική επίδραση διαφόρων φυτικών συστατικών στα οστά, έχει οδηγήσει στη μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων που επιδεικνύουν φυτοοιστρογονικές ή/και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [9-12]. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ωρισμένα φυτά και οι συστατικές τους ενώσεις εμφανίζουν δράση ανάλογη των οιστρογόνων (ως φυσικοί SERMs ή φυτοοιστρογόνα), γεγονός που δίνει πολλές ελπίδες για τη μη φαρμακευτική δυνατότητα πρόληψης και αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης, αποφεύγοντας την εμφάνιση παρενεργειών, που δεν εξασφαλίζεται απόλυτα με τη σύγχρονη θεραπεία υποκατάστασης [13-18].

Τα ολικά φυτικά εκχυλίσματα και οι φυτικές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη λειτουργία των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, κατά τρόπο όμοιο με αυτό των οιστρογόνων, δηλαδή παρεμβαίνοντας στο μηχανισμό μετάδοσης μηνύματος. Αυτό το επιτυγχάνουν τροποποιώντας την δράση σημαντικών παραγόντων της μεταγραφής, όπως είναι οι υποδοχείς οιστρογόνων ERα/ERβ, οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών GRα/GRβ, οι μεταγραφικοί παράγοντες (AP-1, NF-kB) και οι MAPK κινάσες (ERKs) που αλληλεπιδρούν και μεσολαβούν στην ενδοκυττάρια ροή πληροφοριών, ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση κυτταρικών μορίων που εμπλέκονται στη λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών [19-23].

Η Ελληνική χλωρίδα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αρωματικά φυτά, μεταξύ των οποίων και το *Sideritis euboea*, το αφέψημα του οποίου (τσάι του βουνού της Εύβοιας) παραδοσιακά καταναλώνεται ευρέως στην Ελλάδα. Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει ότι τα είδη του γένους *Sideritis* (οικογένεια Lamiaceae) υπάρχουν σε διάφορες περιοχές/χώρες της Μεσογείου [24] και είναι πλούσια σε φαινολικά, φλαβονοειδή και τερπενοειδή συστατικά [25-27], τα οποία του προσδίδουν τις αντιοξειδωτικές [28,29], αντιφλεγμονώδεις [30,31], αναλγητικές [31], αντιρρευματικές, αντιελκωτικές [32], και αντιμικροβιακές [26,33] του ιδιότητες.

Ενώ μία *in vitro* μελέτη υποστηρίζει την αντιοιστρογονική του δράση στο μαστό και στη μήτρα, καθώς και την οιστρογονική του δράση στα οστά [34], εν τούτοις, δεν είναι γνωστή η *in vivo* δράση του *S. euboea*, και ούτε έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης του. Δεδομένου ότι η ανεύρεση νέων φυτικών εκχυλισμάτων με ιδιότητες SERMs είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν αφενός μεν η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του υδατικού φυτικού εκχυλίσματος του *S. euboea* μέσω της ρύθμισης της ιντερλευκίνης 6 (IL-6), της οστεοπροτεγερίνης (OPG) και του ενεργοποιητή του υποδοχέα του NFkB προσδέματος (Receptor activator of NFkB ligand - RANKL) *in vitro* σε οστεοβλάστες, αφετέρου δε η *in vivo* επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος του *S. euboea* στα οστά του θηλυκού ωοθηκεκτομημένου ώριμου επίμυος, ο οποίος είναι διεθνώς ανεγνωρισμένο πειραματικό πρότυπο της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης [35].

Υλικά και μέθοδοι

Α) In vitro μελέτη

α) Κυτταρική Καλλιέργεια

Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά KS483 (προοστεοβλαστική σειρά από θόλο κρανίου εμβρύου επίμυος) που έχει την ικανότητα να σχηματίζει *in vitro* επιμεταλλωμένα οζίδια. Η κυτταρική σειρά καλλιεργείται σε καλλιεργητικό υλικό α-MEM (Gibco BRL) εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco BRL) και πενικιλλίνη/ στρεπτομυκίνη (Gibco BRL), σε επωαστή CO_2 i (5% CO_2-95% air) στους 37°C και ανακαλλιεργείται κάθε 3-4 μέρες σε αραίωση 1:5 έως 1:6 χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης/ EDTA (trypsin 0.125%/EDTA 0.01%).

Για τα πειράματά μας τοποθετήθηκαν κύτταρα με πυκνότητα 45.000 κύτταρα/πηγάδι (well) των 12-well plates σε 1 ml/well α-MEM phenol red free (Gibco BRL) εμπλουτισμένο με 10% FBS DCC-treated (επώαση του ορού με άνθρακα για απομάκρυνση των στεροειδών ενώσεων). Υπό τις ανωτέρω συνθήκες παρέμειναν για 48 ώρες και ακολούθως έγινε αλλαγή καλλιεργητικού υλικού χωρίς την προσθήκη (control) ή με την προσθήκη του υπό μελέτη υδατικού εκχυλίσματος (*S. euboea*) σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και οιστραδιόλης (17β-estradiol) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} M και επώαση για 48 ώρες.

Προηγήθηκε πείραμα time-course προκειμένου να αποφασιστεί για πόσες ώρες θα γίνει η επώαση των κυττάρων με τις προαναφερθείσες ουσίες. Μετά το τέλος της επώασης, τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για 7 λεπτά και τα υπερκείμενα της φυγοκέντρησης τοποθετήθηκαν στους -200°C μέχρι να αναλυθούν.

β) Προσδιορισμός των IL-6, OPG και RANKL

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της IL-6, της OPG και του RANKL στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών που επωάστηκαν ή όχι με τις διάφορες συγκεντρώσεις του υδατικού εκχυλίσματος του *S. euboea* και με την οιστραδιόλη, έγινε με ELISA μέθοδο (R & D Systems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Β) In vivo μελέτη

α) Ζώα εργαστηρίου

Το πειραματικό πρωτόκολλο έλαβε έγκριση από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής Νομαρχίας Αθηνών (Άδεια πειραματισμού Κ 5181/2006), σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, σε συμμόρφωση με την Οδηγία 86/609/ΕΟΚ, και του Νόμου 2015/1992, σύμφωνα με την «Ευρωπαϊκή συνθήκη για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, 123/1986»). Τριάντα δύο ενήλικοι (10 μηνών) θηλυκοί επίμυες της φυλής Wistar αποκτήθηκαν από την καταχωρημένη Εγκατάσταση Εκτροφής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Τα ζώα στεγάστηκαν τέσσερα ανά κλωβό, υπό τις συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες, με θερμοκρασία να κυμαίνεται μεταξύ 19°C και 22°C, σχετική υγρασία 55% και 65%, 15 πλήρεις εναλλαγές αέρα/ώρα και με κύκλους ημέρας/νύκτας από 6^{ης} πρωινής ως 6^{ης} απογευματινής. Μετά από μετρήσεις σωματικών βαρών, οι επίμυες διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες: ομάδα ελέγχου (n=8), ομάδα ωοθηκεκτομής χωρίς θεραπευτική παρέμβαση (OVX; n=8), ομάδα ωοθηκεκτομής με φυτικό εκχύλισμα *S. euboea* (OVX+SID; n=16) σύμφωνα με το σωματικό τους βάρος και κατανέμοντας ομοιόμορφα άτομα από ίδιες τοκετοομάδες σε κάθε πειραματική ομάδα έτσι ώστε να αποφευχθεί τυχόν ανατομική ή γενετική ποικιλία ανάμεσά τους. Μετρήσεις των σωματικών τους βαρών πραγματοποιήθηκαν κάθε δεύτερη εβδομάδα ενώ γινόταν καταμέτρηση της κατανάλωσης τροφής και νερού δύο φορές την εβδομάδα.

β) Μετρήσεις οστικής πυκνότητας

Σε όλα τα ζώα εκτιμήθηκε η οστική τους πυκνότητα (BMD) πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση και 3 και 6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή. Η ακινητοποίηση των επίμυων για τις μετρήσεις έγινε με την ενδομυϊκή χορήγηση αναισθησίας 3 mg/Kg ξυλαζίνης και 80 mg/Kg κεταμίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή απορροφησιομετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης ακτίνων X (dual energy X-ray absorptiometry - DEXA) GE Lunar Prodigy Densitometer με το ειδικό λογισμικό για μικρά θηλαστικά. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η οστική πυκνότητα όλης της κνήμης, συμπεριλαμβανομένου του φλοιώδους και του σπογγώδους οστού, με την τοποθέτηση περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest - ROI) να περιλαμβάνει καθ' ολοκληρία την κνήμη. Για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας (BMD) του σπογγώδους οστού επιλέχθηκε η εγγύς μετάφυση της κνήμης (ως αντιπροσωπευτικό δείγμα του σκελετού του επίμυος ταχείας οστικής εναλλαγής) με την τοποθέτηση της ROI 2 mm x 2 mm, 3 mm περιφερικά της κνημιαίας αρθρικής επιφανείας. Η ακρίβεια της μεθόδου *in vitro* είναι 0.5%. Γινόταν βαθμονόμηση του συστήματος πριν από τη μέτρηση κάθε ομάδας ζώων.

γ) Ωοθηκεκτομή

Η ομάδα ελέγχου υπέστη εικονική ωοθηκεκτομή. Η παρουσία αυτής της ομάδας είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της οστικής πυκνότητας ηλικιακά συζευγμένων μη ωοθηκεκτομημένων ζώων καθόλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμες οι αλλαγές της οστικής πυκνότητας που προκύπτουν στα λαμβάνοντα και μη λαμβάνοντα θεραπεία ωοθηκεκτομημένα ζωικά πρότυπα. Η χειρουργική αναισθησία των επιμύων επιτεύχθηκε με την ενδομυϊκή χορήγηση 5 mg/Kg ξυλαζίνης και 100 mg/Kg κεταμίνης, την οποία ακολούθησε αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή.

δ) Χορήγηση του εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα *S. euboea* χορηγήθηκε στις φιάλες του ποσίμου νερού στην ομάδα των OVX+SID επιμύων *ad libitum* αμέσως μετά την πραγματοποίηση του χειρουργείου. Οι φιάλες ανακινούνταν δύο φορές την ημέρα ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία ιζήματος. Η ανασύσταση του εκχυλίσματος γινόταν δύο φορές εβδομαδιαία, σύμφωνα με την τελευταία καταγεγραμμένη κατανάλωση. Η κατανάλωση του υδατικού εκχυλίσματος από την OVX+SID ομάδα αλλά και οι καταναλώσεις ύδατος από τις υπόλοιπες ομάδες υπολογίζονταν δύο φορές την εβδομάδα. Ο μέσος όρος πρόσληψης ύδατος ήταν 18 mL και ο μέσος όρος πρόσληψης του εκχυλίσματος ήταν 330 mg/kg ζώντος βάρους ανά ημέρα στην ομάδα των OVX+SID επιμύων.

ε) Προετοιμασία του εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα προετοιμάσθηκε από τα υπέργεια μέρη του φυτού *S. euboea*. Τα φυτά συλλέχθηκαν από το όρος Δίρφυ της νήσου Εύβοιας. Στη συνέχεια αποξηράθηκαν στον αέρα, κονιορτοποιήθηκαν και κατεργάστηκαν με βρασμένο νερό (3.5 g φυτού/100 ml νερού) για 15 min. Για τη λήψη ενός εκχυλίσματος εύκολου στη συντήρηση και με υψηλότερη συγκέντρωση και σταθερότητα, επιλέχθηκε η χρήση της τεχνικής ξήρανσης δια ψεκασμού (Spray Drying Technique). Το υδατικό διάλυμα διηθούνταν και υπόκειντο στην μέθοδο ξήρανσης δια ψεκασμού. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εξάτμιση της υγρασίας μέσω διόδου από ακροφύσιο, με την ανάμιξη του διαλύματος με το μέσο ξήρανσης (άζωτο). Το εναιώρημα, μετά την ανάμιξή του με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, υπεισερχόταν στη συσκευή ξήρανσης (B-290 minispray dryer; BÜCHI Labortechnik) με θερμοκρασία εισόδου 139°C, θερμοκρασία εξόδου 60-65°C, λειτουργία αναρρόφησης 100%, ροή ψεκασμού 600 Nl/h και απόδοση αντλίας 22%. Αμέσως μετά το πέρας της διαδικασίας η σκόνη φυλάχθηκε και αποθηκεύθηκε σε κλειστές φιάλες.

στ) Ανάλυση του εκχυλίσματος

Η αρχική ανάλυση του *S. euboea* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και αποκάλυψε την παρουσία φλαβονοειδών και φαινυλοπροπανοειδών γλυκοσιδών, ιριδοειδών και σακχάρων. Στη συνέχεια το υδατικό διάλυμα αναλύθηκε και με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων HPLC έτσι ώστε να ανιχνευθούν τα κοινά φαινολικά του συστατικά. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (ThermoFinnigan, San Jose, CA) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του διαλύματος αποτελούνταν από μια αντλία SpectralSystem P4000, έναν απαερωτή SpectralSystem 1000, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SpectralSystem AS3000, και έναν ανιχνευτή SpectralSystem UV2000 PDA. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την διαχείριση των αποτελεσμάτων ήταν το ChromQuest 2.1. Η εκτίμηση του βιοχημικού προφίλ του υδατικού διαλύματος του *S. euboea* πραγματοποιήθηκε σε στήλη Lichrosorb RP18 (250x4.0 mm, 5.0 μm). Τα φασματογράμματα μετρήθηκαν στα 220, 280 και 365 nm, με τα υπό παρακολούθηση φάσματα να εκτιμώνται σε ένα εύρος μηκών κύματος από 190 με 900 nm. Συγκρίνοντας τους χρόνους απορρόφησης (retention time) και τα απορροφούμενα φάσματα κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθούν τέσσερα διαφορετικά μόρια, που ανήκαν στην οικογένεια των φλαβονοειδών γλυκοσιδών: ισοσκουτελαρεΐνη 7-O-[6‴-O-ακέτυλο-β- D-αλλοπυρανοσύλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη], 4΄-O- μεθυλισοσκουτελαρεΐνη 7-O-[6‴-O-ακέτυλο-β-D- αλλοπυρανοσύλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη], 4΄-O- μεθυλυπολαετίνη 7-O-[6‴-O-ακέτυλο-β-D- αλλοπυρανοσύλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη], υπολαετίνη 7-O-[6‴-O-ακέτυλο-β-D-αλλοπυρανοσύλ-(1→2)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη], μαζί με ακτεοσίδη, μαρτυνοσίδη και χλωρογενικό οξύ.

ζ) Ευθανασία, νεκροψία, και συλλογή οστών

Μετά από ευθανασία με πτητικό αναισθητικό, τα ζώα εξετάστηκαν για τυχόν κακοήθειες ή άλλες παθολογικές καταστάσεις. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον έλεγχο των ωοθηκών έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η επιτυχία της ωοθηκεκτομής με την απουσία ωοθηκικού ιστού και την παρατήρηση σημαντικής ατροφίας των κεράτων της μήτρας. Στην συνέχεια συλλέχθηκαν οι μήτρες και ζυγίσθηκαν άμεσα σε μικροζυγό ακριβείας (Sartorius handy microbalance). Επίσης συλλέχθηκαν τα αριστερά μηριαία και οι αριστερές κνήμες και αμέσως μετά τη συλλογή τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες και πληρώθηκαν με φυσιολογικό ορό και μετρήθηκαν με τη μέθοδο της περιφερικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας.

η) Μετρήσεις περιφερικής Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT)

Οι αξιολογήσεις των κνημών και των μηριαίων πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή των οστών σε συσκευή περιφερικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας (Norland-Stratec XCT 2000) που βρίσκεται στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος. Οι *ex vivo* μετρήσεις των οστικών δοκιμίων έγιναν ως εξής: τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες και πληρώθηκαν με φυσιολογικό ορό, για προσομοίωση των γύρω μαλακών μορίων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν ένας-ένας στο κέντρο του τοπογραφικού πεδίου του μηχανήματος pQCT. Οι μετρήσεις της κνήμης πραγματοποιήθηκαν στις αποστάσεις 4, 10 και 14 mm από την εγγύς αρθρική επιφάνεια της κνήμης, ενώ οι μετρήσεις των μηριαίων πραγματοποιήθηκαν στις τομές 40%, 50% και 60% από την κεφαλή του μηριαίου. Η

θέσεις των τομών έγιναν μετά από σάρωση ολόκληρου του μήκους του οστικού δοκιμίου.

θ) Δοκιμές μηχανικής αντοχής των οστών

Η εμβιομηχανική των οστών εκτιμήθηκε *ex vivo* με το πέρας της πειραματικής μελέτης. Επιλέχθηκε η μηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων (three-point-bending). Μετά τη συλλογή τους, τα αριστερά μηριαία καθαρίστηκαν από τους παρακείμενους ιστούς, και αμέσως μετά την εκτίμησή τους στη συσκευή pQCT, τυλίχθηκαν σε γάζες ποτισμένες με φυσιολογικό ορό και φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι τη στιγμή της εκτέλεσης των εμβιομηχανικών δοκιμών μία εβδομάδα μετά. Η μέθοδος αυτή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [36] είναι η καλύτερη για τη μακρά συντήρηση των οστικών δειγμάτων πριν από την εκτέλεση των δοκιμών μηχανικής αντοχής. Η μέθοδος κάμψης τριών σημείων επιλέχθηκε για την αξιοπιστία της, την ευκολία εκτέλεσής της, και για το μικρό χρόνο κατά τον οποίο τα οστικά δοκίμια είναι εκτεθειμένα (και για τις ελάχιστες αλλοιώσεις που προκαλούνται στις μηχανικές ιδιότητες των δοκιμίων). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή MTS 858 Mini Bionix.

Τα μηριαία τοποθετήθηκαν οριζόντια σε στρογγυλευμένες αρπάγες που βρίσκονταν σε απόσταση 22 mm μεταξύ τους. Δόθηκε προσοχή έτσι ώστε όλα τα δοκίμια να τοποθετηθούν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όσον αφορά στην κατεύθυνσή τους, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα λάθη εξαιτίας εσφαλμένης θέσης των δειγμάτων. Σε περίπτωση εσφαλμένης τοποθέτησης, εξαιτίας ανατομικών παραλλαγών των δοκιμίων, μπορούσε να παρατηρηθεί στροφή κατά τη διάρκεια της φόρτισης. Τα δοκίμια αυτά αποκλείονταν από τη στατιστική ανάλυση. Η φόρτιση εφαρμόσθηκε στη μεσότητα της διάφυσης του μηριαίου με τη χρήση εμβόλου με στρογγυλεμένη άκρη. Ο ρυθμός φόρτισης που επιλέχθηκε ήταν 1 mm/min έτσι ώστε να προσομοιωθούν όσον το δυνατόν πιστότερα οι *in vivo* στατικές συνθήκες. Η φόρτιση εφαρμοζόταν σταθερά μέχρις ότου επέλθει η θραύση (κάταγμα) του δοκιμίου. Κατά τη διάρκεια του πειράματος κατεγράφοντο συνεχώς συναρτήσει του χρόνου οι τιμές του επιβαλλομένου φορτίου (σε Newtons) και της επαγόμενης παραμόρφωσης (βέλους κάμψεως) (σε mm). Μετά το πείραμα με επεξεργασία των δεδομένων αυτών ελήφθησαν οι καμπύλες φορτίου–παραμόρφωσης μέχρι και τη στιγμή της αστοχίας (κατάγματος) του οστού.

Στατιστική ανάλυση

Α) In vitro μελέτη

Όλες οι τιμές εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση (mean ± standard deviation) τριών πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την εφαρμογή t-test, two-tailed distribution, assuming two-sample unequal variance.

Κάθε τιμή $p<0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$).

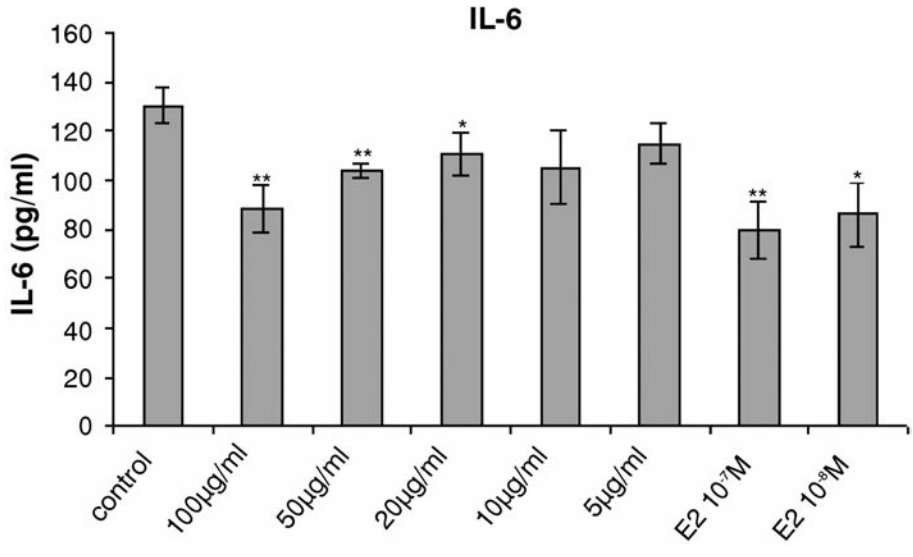
Β) In vivo μελέτη

Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής των δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov test και P-P plots. Οι συγκρίσεις των απολύτων τιμών των μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διασποράς μιας κατεύθυνσης (one-way analysis of variance / ANOVA). Πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμή Bonferroni. Για τη σύγκριση των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους για όλες τις παραμέτρους της κάθε ομάδας χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς μιας κατεύθυνσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (one-factor repeated measures analysis of variance). Πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο Tukey critical difference. Για να αναδειχθεί η πορεία της οστικής πυκνότητας κατά τους έξι μήνες του πειραματισμού και για τις τρεις ομάδες, υπολογίστηκε η διάμεση τιμή της ποσοστιαίας μεταβολής από τις αρχικές μετρήσεις μετά από τρεις και έξι μήνες αντίστοιχα. Οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών από τις αρχικές μετρήσεις κατά την περίοδο της παρατήρησης εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis. Οι πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Mann-Whitney U test. Ως στατιστική σημαντικότητα ορίσθηκε το $p<0.05$. Όλες οι αναλύσεις εκτελέσθηκαν με το λογισμικό SPSS version 16.00 (SPSS Inc. Chicago, IL).

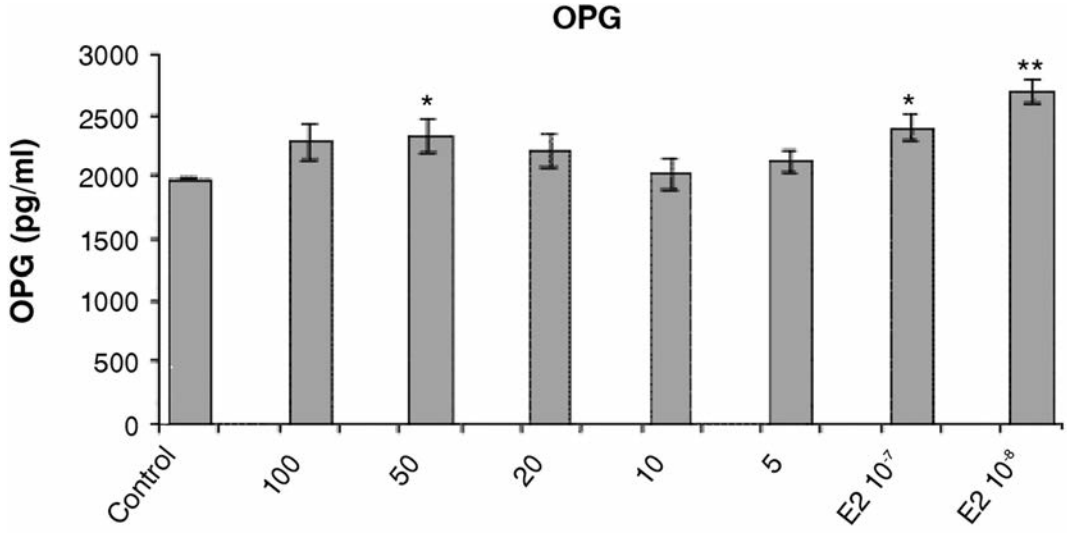
Αποτελέσματα

Α) In vitro μελέτη

Στην Εικόνα 1 φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης (Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση της IL-6 (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.



Εικ. 1. Στην εικόνα φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης (Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση της IL-6 (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.

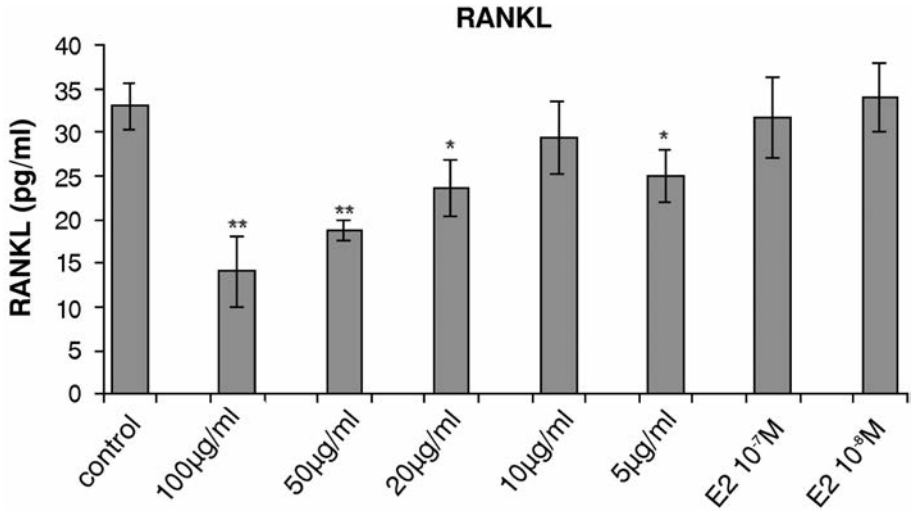


Εικ. 2. Στην εικόνα φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης (Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση της OPG (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.

Η οιστραδιόλη μειώνει σημαντικά την έκκριση της IL-6 από τους οστεοβλάστες επίμυος τόσο σε συγκέντρωση 10^{-7} ($p<0.01$), όσο και σε συγκέντρωση 10^{-8} ($p<0.05$) σε σχέση με το μάρτυρα (control).

Το εκχύλισμα *S. euboea* φαίνεται να μειώνει επίσης την έκκριση της IL-6 από τους οστεοβλάστες επίμυος σε όλες τις συγκεντρώσεις, με στατιστική σημαντικότητα όμως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 100 μg/ml (67% του μάρτυρα), 50 μg/ml (79% του μάρτυρα), 20 μg/ml (85% του μάρτυρα) (με $p<0.01$, $p<0.01$ και $p<0.05$ αντίστοιχα).

Στην Εικόνα 2 φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *S. euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης



Εικ. 3. Στην εικόνα φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης (Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση του RANKL (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.

Βάρος μητρών				
Ομάδα	**N**	**Μέση τιμή**	**SD**	**Τιμή p**
Ελέγχου	8	0.629	0.19	<0.0005
OVX	8	0.136 *	0.03	
OVX+Sid	16	0.135 *	0.01	

Πίν. 1. Βάρος μητρών των επιμύων σε γραμμάρια. *[Ομάδες: Ελέγχου, OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sid (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea) * p<0.05 σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου].*

Ποσοστιαία μεταβολή για όλη την κνήμη				
Ομάδα	**% μεταβολή 0-3 μήνες**	**Τιμή p μεταξύ των ομάδων**	**% μεταβολή 0-6 μήνες**	**Τιμή p μεταξύ των ομάδων**
	Διάμεσος		**Διάμεσος**	
Ελέγχου	-3.02%	0.016	-6.02%	0.005
OVX	-11.38% [α]		-20.46% [α]	
OVX+Sid	-4.67% [β]		-14.37% [α β]	

Πίν. 2. Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας όλης της κνήμης. *(Ομάδες: Ελέγχου, OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sid (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea). [α] p<0.005 σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου. [β] p<0.005 σε σύγκριση με την Ομάδα OVX).*

Ποσοστιαία μεταβολή για την εγγύς μετάφυση της κνήμης				
Ομάδα	**% μεταβολή 0-3 μήνες**	**Τιμή p μεταξύ των ομάδων**	**% μεταβολή 0-6 μήνες**	**Τιμή p μεταξύ των ομάδων**
	Διάμεσος		**Διάμεσος**	
Ελέγχου	0.24%	<0.0005	-0.58%	0.002
OVX	-26.47% [α]		-31.22% [α]	
OVX+Sid	-15.57% [α β]		-16.57% [α β]	

Πίν. 3. Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας της εγγύς μετάφυσης της κνήμης. *(Ομάδες: Ελέγχου, OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sid (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea). [α] p<0.005 σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου. [β] p<0.005 σε σύγκριση με την Ομάδα OVX).*

(Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση της OPG (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.

Η οιστραδιόλη αύξησε σημαντικά την έκκριση της OPG και στις δύο συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκε με πιο έκδηλο το αποτέλεσμα της μικρότερης συγκέντρωσης (10^{-8} Μ).

Το εκχύλισμα *S. euboea* φαίνεται να αυξάνει την έκκριση της OPG από τους οστεοβλάστες επίμυος μόνο στη συγκέντρωση 50 μg/ml (18% του μάρτυρα, p<0.05).

Στην Εικόνα 3 φαίνεται η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *S. euboea* σε τελικές συγκεντρώσεις 100, 50, 20, 10, 5 μg/ml και της οιστραδιόλης (Ε2) σε τελικές συγκεντρώσεις 10^{-7}, 10^{-8} Μ στην έκκριση του RANKL (σε pg/ml) από τους οστεοβλάστες.

Το εκχύλισμα *S. euboea* μείωσε σημαντικά την έκκριση του RANKL από τους οστεοβλάστες επίμυος σε συγκεντρώσεις 100, 50, 20 και 5 μg/ml (με p<0.01, p<0.01, p<0.05 και p<0.05 αντίστοιχα).

Αντιθέτως η οιστραδιόλη δεν επηρέασε την έκκριση του RANKL σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκε.

Β) In vivo μελέτη

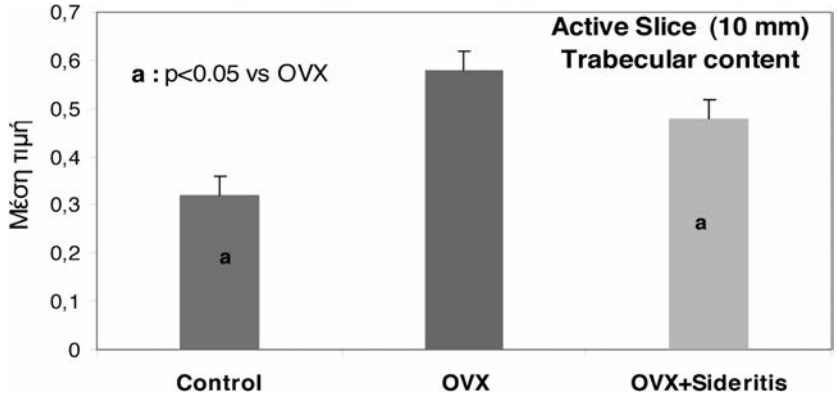
α) Σωματικά βάρη επιμύων και βάρη μητρών

Η σύγκριση των ποσοστιαίων αλλαγών των σωματικών βαρών των επιμύων στο τέλος της μελέτης ανέδειξε στατιστικά σημαντική αλλαγή μεταξύ των Ομάδων Ελέγχου και Ωοθηκεκτομής (OVX) καθώς και μεταξύ των Ομάδων Ελέγχου και παρέμβασης (OVX+SID), ενώ καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις ποσοστιαίες αλλαγές των σωματικών βαρών μεταξύ των Ομάδων OVX και OVX+SID.

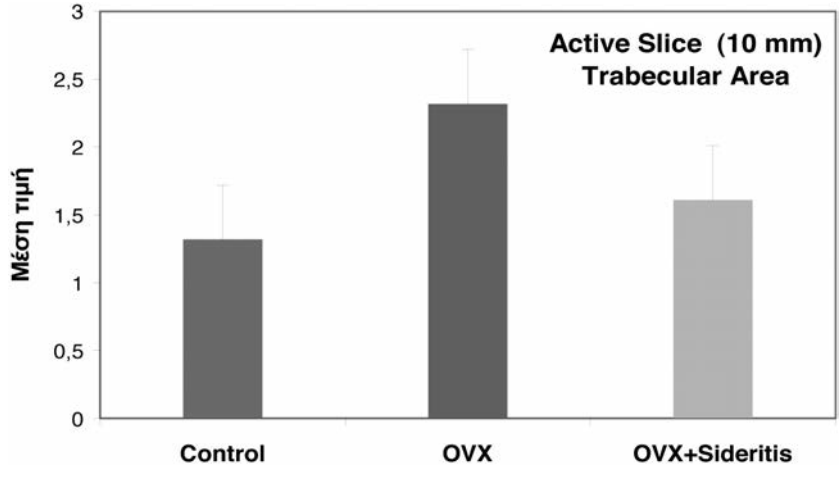
Όσον αφορά στις μήτρες, κατά την επισκόπηση στη διάρκεια της νεκροψίας, η εμφάνιση τους στις Ομάδες OVX και OVX+SID ήταν ατροφική, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση των βαρών τους. Πιο συγκεκριμένα, το μέσο βάρος των Ομάδων OVX και OVX+SID ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο από το μέσο βάρος των μητρών της Ομάδας Ελέγχου (Πίνακας 1). Αξίζει να αναφερθεί ότι το μέσο βάρος των μητρών των Ομάδων OVX και OVX+SID ήταν ουσιαστικά ταυτόσημο. Κατά τη νεκροψία δεν παρατηρήθηκε κανένα παθολογικό εύρημα.

β) Ποσοστιαίες αλλαγές της οστικής πυκνότητας

Οι ποσοστιαίες μεταβολές που προέκυψαν μετά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις DEXA φαίνονται στον Πίνακα 2. Η σύγκριση των ποσοστιαίων αλλαγών της οστικής πυκνότητας για την Ομάδα Ελέγχου και OVX για όλη την κνήμη από την αρχική μέτρηση ως τους τρεις μήνες ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά (-3.02% έναντι -11.38%, p<0.05) ενώ μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου και της OVX+SID δεν ήταν σημαντική (-3.02% έναντι -4.67%). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν μια σημαντική προστατευτική δράση του εκχυλίσματος κατά τη διάρκεια των πρώτων μηνών. Οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων αλλαγών της οστικής πυκνότητας, όσον αφορά σε όλη την κνήμη, μεταξύ της αρχικής και της τελικής μέτρησης (6 μήνες) διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ όλων των ομάδων. Η σύγκριση της ποσοστιαίας αλλαγής μεταξύ των OVX και OVX+SID ομάδων (-20.46% έναντι -14.37%, p<0.05) φανερώνει ότι το φυτικό εκχύλισμα προστάτεψε σημαντικά την οστική πυκνότητα της κνήμης των επιμύων αλλά όχι σε τόσο



Εικ. 4. Μάζα του σπογγώδους (σε mg/mm) στα 10 mm της διάφυσης της κνήμης από την αρθρική της επιφάνεια. *[Ομάδες: Control (ελέγχου), OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sideritis (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea)].*



Εικ. 5. Εμβαδόν του σπογγώδους (σε mm^2) στα 10 mm της διάφυσης της κνήμης από την αρθρική της επιφάνεια. *[Ομάδες: Control (ελέγχου), OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sideritis (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea)].*

σημαντικό βαθμό συγκριτικά με το πρώτο τρίμηνο.

Για το σπογγώδες οστούν της εγγύς μετάφυσης της κνήμης, οι ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας από την αρχική μέτρηση στους τρεις και έξι μήνες αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 3). Συγκεκριμένα, οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών από την αρχική μέτρηση στους τρεις και έξι μήνες μεταξύ των Ομάδων Ελέγχου και OVX+SID (0.24% έναντι -15.57% και -0.58% έναντι -16.57%, αντίστοιχα) ήταν στατιστικά σημαντικές, υποδεικνύοντας ότι η προστατευτική δράση του φυτικού εκχυλίσματος δεν ήταν τόσο ισχυρή ώστε να αντισταθμίσει πλήρως την οστική απώλεια του σπογγώδους οστού στην εγγύς μετάφυση της κνήμης όπου παρατηρείται μετά από ωοθηκεκτομή στους επίμυες. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι υπήρξε σημαντική προστατευτική δράση του εκχυλίσματος και η οποία φανερώνεται από τη σύγκριση της ποσοστιαίας μεταβολής από την αρχική μέτρηση στους τρεις και έξι μήνες μεταξύ των Ομάδων OVX και OVX+SID (-26.47% έναντι -15.57% και -31.22% έναντι -16.57%, αντίστοιχα).

		Διάφυση κνήμης		Διάφυση μηριαίου		
Παράμετρος	**Ομάδες**	10 mm	14 mm	40%	50%	60%
Μάζα σπογγώδους (Trabcnt, mg/mm)	Control	**0.35**	**0.14**	**0.57**	**0.60**	**0.53**
	OVX	**0.64**	**0.49**	**0.98**	**1.11**	**1.01**
	OVX+Sid	**0.44**	**0.30**	**0.76**	**0.78**	**0.76**
Επιφάνεια σπογγώδους (Traba, mm²)	Control	**1.32**	**0.50**	**2.19**	**2.38**	**2.19**
	OVX	**2.41**	**1.75**	**4.04**	**4.50**	**4.33**
	OVX+Sid	**1.61**	**1.08**	**3.24**	**3.31**	**3.08**
Ολική οστική πυκνότητα (Totden, mg/mm²)	Control	611.63	**666.63**	736.08	681.10	**673.64**
	OVX	525.75	**567.75**	590.37	533.96	**536.80**
	OVX+Sid	573.07	**613.90**	627.70	580.98	**596.97**
Μάζα φλοιώδους (Crtcnt, mg/mm)	Control	4.70	**5.64**	8.80	7.42	7.07
	OVX	2.86	**2.79**	6.46	4.95	4.86
	OVX+Sid	3.09	**3.25**	6.86	5.51	5.54
Πάχος φλοιώδους (Crtthkc, mm)	Control	0.62	**0.76**	0.68	0.61	0.94
	OVX	0.36	**0.35**	0.53	0.43	0.62
	OVX+Sid	0.42	**0.43**	0.56	0.48	0.43
Ενδοστική περίμετρος (Endoc, mm)	Control	7.34	**6.37**	**9.83**	9.90	**9.48**
	OVX	9.42	**9.01**	**11.29**	11.59	**11.35**
	OVX+Sid	8.65	**8.11**	**10.72**	10.88	**10.41**

Πίν. 4. Παράμετροι pQCT που μετρήθηκαν στην κνήμη και το μηριαίο οστούν. Οι έντονες τιμές εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των Ομάδων. Οι μη έντονες τιμές δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των Ομάδων. *[Ομάδες: Control (ελέγχου), OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sid (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea)]*.

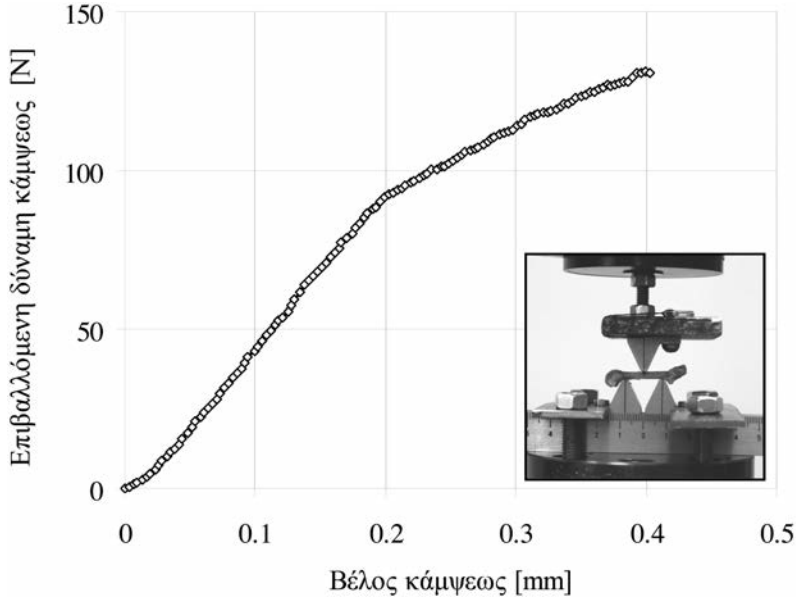
γ) Μετρήσεις περιφερικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας

Σε όλες τις παραμέτρους, έτσι όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις της περιφερικής τομογραφίας, φάνηκε ότι η ομάδα των ζώων στην οποία χορηγήθηκε το φυτικό εκχύλισμα είχε μια ενδιάμεση τιμή σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου και την Ομάδα OVX. Η προστατευτική αυτή δράση του εκχυλίσματος δεν ήταν ικανή να αποδώσει στατιστικά σημαντικές διαφορές για όλες τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν.

Αναλυτικότερα, στην πρώτη τομή που πραγματοποιήθηκε στην κνήμη, 4 mm άπω της κατά γόνυ αρθρικής επιφάνειας, η οστική μάζα ήταν για την Ομάδα Ελέγχου 13.36±1.69 mg/mm, για την Ομάδα OVX 9.42±1.26 mg/mm και για την Ομάδα του φυτικού εκχυλίσματος (OVX+SID) 11.17±1.82 mg/mm. Η οστική πυκνότητα ήταν για την Ομάδα Ελέγχου 475.34±41.55 mg/mm², για την Ομάδα OVX 350.91±19.67 mg/mm² και για την Ομάδα OVX+SID 392.57±44.12 mg/mm². Το εμβαδόν του φλοιώδους ήταν για την Ομάδα Ελέγχου 12.11±2.95 mm², για την Ομάδα OVX 4.34±1.12 mm² και για την Ομάδα OVX+SID 7.09±2.80 mm². Η σύγκριση αυτών των τιμών ανέδειξε μια ενδιάμεση τιμή για την ομάδα του *S. euboea*, η οποία διέφερε στατιστικά σημαντικά σε σχέση και με τις δύο ομάδες. Συμπερασματικά, η δράση του *S. euboea* προστάτεψε τη μετάφυση της κνήμης από την οστική απώλεια, όπως φαίνεται από τη σύγκριση με την Ομάδα OVX, αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό που να μην διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

Από τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν στη διάφυση της κνήμης στα 10 mm από την αρθρική επιφάνεια, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανέδειξαν η μάζα και το εμβαδόν του σπογγώδους (Εικόνες 4 και 5).

Από τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν στη διάφυση της κνήμης στα 14 mm από την αρθρική επιφάνεια, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανέδειξαν η ολική οστική πυκνότητα, η μάζα του σπογγώδους, το εμβαδόν του σπογγώδους, η μάζα του φλοιώδους, το πάχος του φλοιώδους και η ενδοοστική περίμετρος (Πίνακας 2).



Εικ. 6. Τυπική καμπύλη επιβαλλόμενης δύναμης κάμψεως – βέλους κάμψεως από τις δοκιμές κάμψεως τριών σημείων (ένθετη φωτογραφία).

Από τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν στο 40% της διάφυσης του μηριαίου, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανέδειξαν η μάζα του σπογγώδους και το εμβαδόν του σπογγώδους (Πίνακας 4).

Στη μεσότητα της διάφυσης του μηριαίου, οι παράμετροι που ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ήταν η οστική μάζα του σπογγώδους, το εμβαδόν του σπογγώδους και η ενδοοστική περίμετρος (Πίνακας 4).

Οι παράμετροι που ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο 60% της διάφυσης του μηριαίου ήταν η ολική οστική πυκνότητα, η οστική μάζα του σπογγώδους, το εμβαδόν του σπογγώδους και η ενδοοστική περίμετρος (Πίνακας 4).

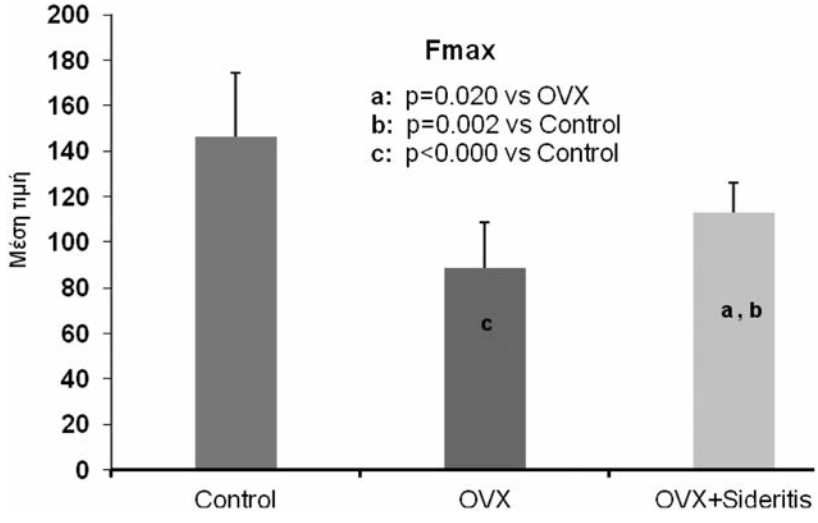
δ) Εμβιομηχανικές παράμετροι

Κατά τη διάρκεια της μηχανικής δοκιμής τριών σημείων κατεγράφοντο συνεχώς συναρτήσει του χρόνου οι τιμές του επιβαλλομένου φορτίου (σε Newtons) και της επαγόμενης παραμόρφωσης (βέλους κάμψεως) (σε mm) (Εικόνα 6). Η μέγιστη φόρτιση (Fmax σε Newton) πριν το κάταγμα που υπέστησαν τα μηριαία οστά κατά την εκτέλεση της μηχανικής δοκιμής τριών σημείων ήταν για την Ομάδα Ελέγχου 146.44±28.43 N (μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση), για την Ομάδα OVX 88.70±20.73 N, ενώ για την Ομάδα OVX+SID ήταν 112.97±13.36 N. Αναδείχτηκε μια στατιστικά σημαντικά υψηλότερη τιμή στην ομάδα παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα της απλής ωοθηκεκτομής (OVX+SID συγκριτικά με OVX, p=0.02), μεταξύ Ομάδας Ελέγχου και OVX (p<0.000), και μεταξύ Ομάδας Ελέγχου και OVX+SID (p=0.002) (Εικόνα 7).

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του *Sideritis euboea* σε καλλιέργειες οστεοβλαστών όσον αφορά στην έκκριση μορίων που διαμεσολαβούν τη συνομιλία οστεοβλαστών-οστεοκλαστών, επάγοντας την οστεοκλαστογένεση. Σε προηγούμενη μελέτη μας είχε δειχθεί ότι το υδατικό εκχύλισμα του *S. euboea* οδηγεί σε επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και επιμετάλλωσης (καλλιέργειες οστεοβλαστικής σειράς επίμυος KS483), σε συγκεντρώσεις 50 και 25 μg/ml [34]. Η ισορροπία ανάμεσα στην έκκριση της OPG και του RANKL, όπως επίσης και η έκκριση της IL-6 από τους οστεοβλάστες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οστεοκλαστογένεση και κατ' επέκταση στη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής [37].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, φαίνεται ότι το ίδιο εκχύλισμα έχει δυνατότητα να μειώνει



Εικ. 7. Η μέγιστη φόρτιση (F max σε Newtons) που υπέστησαν τα οστικά δοκίμια πριν το κάταγμα. *[Ομάδες: Control (ελέγχου), OVX (ωοθηκεκτομής), OVX+Sideritis (ωοθηκεκτομής+Sideritis euboea)]*.

την επαγόμενη από τους οστεοβλάστες οστεοκλαστική δραστηριότητα, μειώνοντας την έκκριση της IL-6 αλλά και το λόγο RANKL/OPG. Από τις διάφορες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, τα 50 μg/ml φαίνεται να είχαν τη θετικότερη επίδραση, τόσο στην αναστολή της έκκρισης IL-6, όσο και στη μείωση του λόγου RANKL/OPG.

Μαζί με το υπό μελέτη εκχύλισμα χορηγήθηκε και οιστραδιόλη (17β-E2), μια ορμόνη με γνωστή αντιοστεοκλαστική δραστηριότητα τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες. Βρέθηκε ότι η οιστραδιόλη μειώνει την απελευθέρωση της IL-6 από τους οστεοβλάστες και στις δύο συγκεντρώσεις, αποτέλεσμα που συμφωνεί με προγενέστερες μελέτες [38,39]. Οι Cheung και συνεργάτες μάλιστα βρήκαν ότι η IL-6 μειώνεται με την επίδραση της οιστραδιόλης τόσο σε πρωτογενείς ανθρώπινες καλλιέργειες οστεοβλαστών (η βασική IL-6 αλλά και η μετά διέγερση με LPS), όσο και σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (SaOS).

Όσον αφορά στην επίδραση της οιστραδιόλης στην έκκριση διαλυτής OPG, βρέθηκε ότι η οιστραδιόλη επάγει την έκκρισή της και στις δυο συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, αποτέλεσμα που επίσης συμφωνεί με προγενέστερες μελέτες [40,41]. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι υπάρχουν *in vitro* μελέτες που έχουν δείξει μείωση της έκκρισης της OPG υπό την επίδραση οιστραδιόλης σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις, όπως επίσης και καμμία επίδραση· μια πιθανή εξήγηση των διαφορετικών αποτελεσμάτων είναι η χρησιμοποίηση διαφορετικής κυτταρικής σειράς ή/και πρωτογενών καλλιεργειών στις προαναφερθείσες εργασίες, γεγονός που συνεπάγεται και διαφορετική αναλογία ERa/ERβ, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι κάθε υποδοχέας επιδρά διαφορετικά στην έκφραση της OPG [42].

Η επίδραση της οιστραδιόλης στην έκφραση του RANKL φάνηκε να μην είναι στατιστικά σημαντική. Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι η οιστραδιόλη δεν επηρέασε την έκφραση του RANKL, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο [38-40], ενώ οι Lindberg και συνεργάτες παρατήρησαν αύξηση του RANKL mRNA [42].

Όσον αφορά στις πειραματικές μελέτες των δυνητικά ευεργετικών φυτικών εκχυλισμάτων που πραγματοποιούνται *in vivo* σε επίμυες, υποστηρίζεται ότι τα εκχυλίσματα θα πρέπει να χορηγούνται αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή έτσι ώστε να αποτρέψουν την απώλεια οστού που παρατηρείται αμέσως μετά τη χειρουργική παρέμβαση στα συγκεκριμένα ζωικά πρότυπα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό μια και τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν συνήθως ένα ήπιο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό και στην παρούσα μελέτη το υδατικό διάλυμα του *S. euboea* χορηγήθηκε αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή. Το συγκεκριμένο φυτό καταναλώνεται ευρέως ως αφέψημα στην Ελλάδα με το όνομα «τσάι του βουνού».

Ως καταλληλότερο ζωικό πρότυπο για την μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, επιλέχθηκε ο ώριμος θηλυκός ωοθηκεκτομημένος επίμυς. Το συγκεκριμένο πρότυπο συνδύαζε ιδανικότερα τα ζωοτεχνικά και επιστημονικά κριτήρια καταλληλότητας για την εκτέλεση της μελέτης της χορήγησης φυτικού εκχυλίσματος στον οστικό μεταβολισμό υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε. Η εκτίμηση της οστικής πυκνότητας και ποιότητας πραγματοποιήθηκε με τις μετρήσεις DEXA, pQCT και με τις εμβιομηχανικές δοκιμές. Η ηλικία των επιμύων κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η μελέτη ήταν 10 μηνών, η οποία είναι η ηλικία απόκτησης της κορυφαίας οστικής μάζας στο συγκεκριμένο ζωικό είδος και θεωρείται η καταλληλότερη για την προσομοίωση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης του ανθρώπου [35,43].

Στις μετρήσεις DEXA που πραγματοποιήθηκαν 3 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή, η ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας, από την αρχική μέτρηση, ήταν για τους ωοθηκεκτομημένους χωρίς παρέμβαση επίμυες -11.38% για όλη την κνήμη και -26.47% για την εγγύς μετάφυση της κνήμης. Η κατά πολύ μικρότερη απώλεια για όλη την κνήμη οφείλεται στο άφθονο φλοιώδες οστούν που περικλείεται κατά την οριοθέτηση της περιοχής ενδιαφέροντος που περιελάμβανε όλη την κνήμη. Το φλοιώδες οστούν δεν υφίσταται τέτοια δραματική απώλεια, όπως το σπογγώδες, στην πρώιμη μετά την ωοθηκεκτομή περίοδο. Το ισχυρό ευεργετικό αποτέλεσμα της χορήγησης του φυτικού εκχυλίσματος του *S. euboea* στην οστική πυκνότητα όλης της κνήμης στους 3 μήνες σε σχέση με την αρχική μέτρηση ήταν οστική απώλεια μόνο -4.67%, ποσοστό παρόμοιο και στατιστικά μη σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα ελέγχου όπου η οστική απώλεια ήταν -3.02%. Αυτή η ευεργετική δράση ήταν λιγότερο δυναμική κατά το τέλος της μελέτης όπου οι ωοθηκεκτομημένοι επίμυες που λάμβαναν το φυτικό εκχύλισμα είχαν απώλεια της οστικής τους πυκνότητας κατά -14.37% και οι ωοθηκεκτομημένοι χωρίς παρέμβαση -20.46% σε σχέση με την αρχική τους μέτρηση.

Στην εγγύς μετάφυση της κνήμης όπου υπάρχει σπογγώδες οστούν παρατηρήθηκε ταχεία οστική απώλεια αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή και μέχρι τους 3 μήνες. Ο ρυθμός της οστικής απώλειας μειώνεται κατά πολύ μετά την πάροδο των τριών μηνών, όταν η οστική απώλεια αρχίζει να αντισταθμίζεται από την οστική παραγωγή και ο οστικός μεταβολισμός εισέρχεται σε σταθερή κατάσταση [35]. Τα αποτελέσματα της μελέτης έρχονται σε συμφωνία με αυτές τις καλά μελετημένες οστικές μεταβολές. Η ποσοστιαία απώλεια της οστικής πυκνότητας στο πρώτο τρίμηνο για την εγγύς μετάφυση της κνήμης συγκριτικά με την αρχική μέτρηση για τους ωοθηκεκτομημένους χωρίς παρέμβαση επίμυες ήταν -26.47% ενώ στους έξι μήνες ήταν -31.22%. Συγκριτικά, η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος προστάτεψε από την δραστική απώλεια το σπογγώδες οστούν της εγγύς μετάφυσης της κνήμης. Η ποσοστιαία μεταβολή στους πρώτους τρεις μήνες ήταν -15.57%, επιδεικνύοντας μια σημαντική προστατευτική δράση στη φάση της ταχείας οστικής απώλειας. Η ευεργετική επίδραση συνεχίστηκε και στο επόμενο τρίμηνο όπου η ποσοστιαία μεταβολή από την αρχική μέτρηση ήταν -16.57%.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις με τη μέθοδο pQCT για την ολική οστική μάζα της εγγύς μετάφυσης της κνήμης, όπου κυριαρχεί το σπογγώδες οστούν, ήταν για την ομάδα ελέγχου 13.36±1.69 mg/mm, για την ομάδα της ωοθηκεκτομής 9.42±1.26 mg/mm και για την ομάδα του φυτικού εκχυλίσματος 11.17±1.82 mg/mm. Η ολική οστική πυκνότητα ήταν για την ομάδα ελέγχου 475.34±41.55 mg/mm^2 για την ομάδα της ωοθηκεκτομής 350.91±19.67 mg/mm^2 και για την ομάδα του φυτικού εκχυλίσματος 392.57±44.12 mg/mm^2. Το εμβαδόν του φλοιώδους ήταν για την ομάδα ελέγχου 12.11±2.95 mm^2 για την ομάδα της ωοθηκεκτομής 4.34±1.12 mm^2 και για την ομάδα του φυτικού εκχυλίσματος 7.09±2.80 mm^2. Στις τομές της κνήμης στα 10 mm και 14 mm όπως και στις τομές 40%, 50% και 60% της διάφυσης του μηριαίου, όπου κυριαρχεί το φλοιώδες οστούν, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές για την οστική μάζα του σπογγώδους και το εμβαδόν του με έναν αμφιλεγόμενο τρόπο:

Η ομάδα ελέγχου φαίνεται να υφίσταται τη μεγαλύτερη απώλεια οστικής μάζας του σπογγώδους και του εμβαδού του σε σχέση με την ομάδα της ωοθηκεκτομής. Στους επίμυες το μεγαλύτερο μέρος της οστικής απώλειας μετά την ωοθηκεκτομή οφείλεται στην ενδοοστική απορρόφηση [35]. Η απώλεια αυτή οστού έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πορώδους στην έσω επιφάνεια του φλοιού του οστού και πιθανά στην εκτίμηση, από τη συσκευή pQCT, μέρους του φλοιώδους οστού ως σπογγώδες. Την άποψη αυτή επιβεβαιώνει και η εξαιρετικά αυξημένη ενδοοστική περίμετρος στις τομές 14 mm της κνήμης και στο 60% του μηριαίου, όπως επίσης και το αυξημένο εμβαδόν

του σπογγώδους σε όλες τις τομές για την ομάδα της ωοθηκεκτομής. Συνυπολογίζοντας τις παρατηρήσεις των Danielsen και συνεργατών [44] και του Burr [45] ότι η οστική απώλεια στο σπογγώδες θα πρέπει να υπολογίζεται στο έσω δεύτερο ή τρίτο της συνολικής του επιφάνειας, τότε μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα του *S. euboea* προστάτεψε, για όλες τις τομές, την οστική μάζα του φλοιώδους σε σύγκριση με την ομάδα της ωοθηκεκτομής και μάλιστα σε τέτοιο βαθμό ώστε να μη διαφέρει στατιστικά σημαντικά με την ομάδα ελέγχου.

Παρόμοιες μελέτες, με από του στόματος χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων έχουν πραγματοποιηθεί και για φυτά *Silybum marianum*, *Ulnus wallichiana* και *Butea monosperma*, και έχει βρεθεί ότι έχουν ευεργετική δράση στα οστά [46-48]. Οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν χρονικό διάστημα τριών μηνών, κατά το διάστημα δηλαδή που παρατηρείται ταχεία οστική απώλεια στο σπογγώδες οστούν στο σκελετό του επίμυος. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε περαιτέρω η επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος του *S. euboea* και κατά το χρονικό διάστημα της σταθερής κατάστασης για το σπογγώδες. Προηγούμενη μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί από την ομάδα μας για εκχύλισμα προερχόμενο από το φυτό *Onobrychis ebenoides* κατέδειξε μια υψηλώς στατιστικά σημαντική προστατευτική δράση στην απώλεια οστικής πυκνότητας για όλη την κνήμη (-2.04%) και για την εγγύς μετάφυση της κνήμης (-12.75%) μετά από εξάμηνη χορήγηση [10]. Παρόλο που στην παρούσα μελέτη το προστατευτικό αποτέλεσμα ήταν λιγότερο θεαματικό σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη (-14.37% και -16.57% για όλη και για την εγγύς μετάφυση της κνήμης αντίστοιχα), η διαφορά της ποσοστιαίας μεταβολής της οστικής πυκνότητας σε σχέση με τους ωοθηκεκτομημένους επίμυες που δεν είχαν υποστεί καμιά θεραπευτική παρέμβαση ήταν στατιστικά σημαντική.

Η μέτρηση της οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA είναι μια ποσοτική εκτίμηση, και βρίσκεται σε αντιστοιχία με την εμβιομηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων που επιλέχθηκε για να εκτιμηθεί η οστική ποιότητα. Η δοκιμή κάμψης τριών σημείων πραγματοποιήθηκε *ex vivo* στα μηριαία οστά των επιμύων. Τα αποτελέσματα των δοκιμών έδειξαν μια σημαντική μείωση της μέγιστης φόρτισης που απαιτούνταν για την πρόκληση κατάγματος στα υπό δοκιμή μηριαία των ωοθηκεκτομημένων ζώων, ενώ για την ομάδα που λάμβανε το εκχύλισμα η τιμή της απαιτούμενης για την πρόκληση κατάγματος φόρτισης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη.

Επιπλέον, κατά την επισκόπηση των μητρών κατά τη διενέργεια της νεκροψίας, παρατηρήθηκε ότι ήταν ατροφικές στις ομάδες της ωοθηκεκτομής και ωοθηκεκτομής με παρέμβαση· η παρατήρηση αυτή αποδείχθηκε και από το ταυτόσημο βάρος των οργάνων έτσι όπως προέκυψε από τη ζύγισή τους σε μικροζυγό ακριβείας. Τα αποτελέσματα αυτά είναι μια σημαντική ένδειξη ότι το φυτικό εκχύλισμα του *S. euboea* δρα με τρόπο αντίστοιχο των εκλεκτικών τροποποιητών των υποδοχέων οιστρογόνων, δηλαδή ενώ είχε σημαντικά ευεργετική επίδραση στα οστά των ωοθηκεκτομημένων επιμύων δεν επηρέασε το βάρος των μητρών τους. Σε παρόμοια αποτελέσματα εκλεκτικής ευεργετικής επίδρασης στα οστά από τη χορήγηση φυτοοιστρογονικών εκχυλισμάτων έχουν καταλήξει και άλλες μελέτες [47,49]. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε μετά από μακροχρόνια διαιτητική πρόσληψη ισοφλαβονών έδειξε ότι μια συνεχής έκθεση στις ουσίες αυτές μπορεί να οδηγήσει σε πιθανή ευαισθητοποίηση των μητρών σε εξωγενή οιστρογονικά ερεθίσματα [50].

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το φυτικό εκχύλισμα του *S. euboea* έχει τη δυνατότητα *in vitro* να μειώνει την επαγόμενη από τους οστεοβλάστες οστεοκλαστική δραστηριότητα, μειώνοντας την έκκριση της IL-6 αλλά και του RANKL. Επιπρόσθετα, *in vivo* αναδείχθηκε μια ανάλογη δράση με αυτή των εκλεκτικών τροποποιητών των υποδοχέων οιστρογόνων, όπως προέκυψε από την ευεργετική επίδραση του εκχυλίσματος στα οστά, με όλες τις μεθόδους που επιλέχθηκαν για να εκτιμηθεί η οστική τους πυκνότητα και ποιότητα, ενώ αντίθετα καμιά δυσμενής επίδραση δεν παρατηρήθηκε στις μήτρες. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί σε ποιο από τα επιμέρους συστατικά οφείλεται η ευεργετική επίδραση του εκχυλίσματος, καθώς επίσης και επιδημιολογικές ή κλινικές μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες καταναλώνουν το αφέψημα παραδοσιακά, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και συστάσεις για τη συστηματική του κατανάλωση.

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς εκφράζουν τις θερμές ευχαριστίες τους στην Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μεταβολισμού

των Οστών για τη χρηματοδότηση της ερευνητικής πρότασης της παρούσης μελέτης το 2006, με την οποία κατέστη δυνατή η πραγματοποίησή της.

Ευχαριστούν επίσης για την πολύτιμη συνδρομή τους την κα Μαρία Κατσίρη κατά τις μετρήσεις και αναλύσεις DEXA, την κα Χρυσαυγή Καψή κατά τις παρεμβάσεις στα ζώα εργαστηρίου, τον κο Γεώργιο Κινικλή κατά τις μετρήσεις και αναλύσεις pQCT, την κα Άννα Τσιαπάρα κατά τις νεκροψίες και τον φροντιστή πειραματοζώων κο Παναγιώτη Προκόπη.

Correspondence
Ismene Dontas,
26 Athanasiou Diakou Str,
145 61 Kifissia, Greece
E-mail: idontas@med.uoa.gr

Αλληλογραφία
Ισμήνη Δοντά,
Αθανασίου Διάκου 26,
Κηφισιά 145 61
E-mail: idontas@med.uoa.gr

Βιβλιογραφία

1. Atkinson AS, Ward EW. Clinical nutrition: 2. The role of nutrition in the prevention and treatment of adult osteoporosis. CMAJ 2001; 165(11):1511-4.
2. Ferrari CK, Torres EA. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic disease of aging. Biomed Pharmacother 2003; 57(5-6):251-60.
3. Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. Am J Clin Nutr 2000; 71:1003-7.
4. Bayly JR. Current therapies for osteoporosis. In: Pearson D, Miller CG, eds. Clinical Trials in Osteoporosis. 2nd ed. London, UK: Springer-Verlag, 2007:189-210.
5. Kanis J, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int 2008;19:399-428.
6. Hamilton B, McKoy K, Taggart H. Tolerability and compliance with risedronate in clinical practice. Osteoporos Int 2003; 14:259-262.
7. Imaz I, Zegarra P, Gonzalez-Enriquez J, Rubio B, Alcazar R, Amate JM. Poor bisphosphonate adherence for treatment of osteoporosis increases fracture risk: systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int 2010; 21:1943-1951.
8. Ringe JD, Christodoulakos GE, Mellström D, Petto H, Nickelsen T, Marin F, Pavo I. Patient compliance with alendronate, risedronate and raloxifene for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women. Curr Med Res Opin 2007; 23:2677-2687.
9. Coxam V. Phyto-oestrogens and bone health. Proc Nutr Soc 2008; 67:184-195.
10. Dontas I, Halabalaki M, Moutsatsou P, Mitakou S, Papoutsi Z, Khaldi L, Galanos A, Lyritis GP. Protective effect of plant extract from Onobrychis ebenoides on ovariectomy-induced bone loss in rats. Maturitas 2006; 53:234-242.
11. Mundy GR. Nutritional modulators of bone remodeling during aging. Am J Clin Nutr 2006; 83:427S-430S.
12. Putnam SE, Scutt AM, Bicknell K, Priestley CM, Williamson EM. Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. Phytother Res 2007; 21:99-112.
13. Papoutsi Z, Kassi E, Papaevangeliou D, Pratsinis H, Zoumbourlis V, Halabalaki M, Mitakou S, Kalofoutis A, Moutsatsou P. Plant 2-Arylobenzofurans demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile. Steroids 2004;69:727-34.
14. Hidaka S. Natural products with potential for osteoporosis examined *in vivo* and *in vitro*. J Tradit Med 2009; 26:1-10.
15. Boue SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. J Agric Food Chem 2003; 51(8):2193-9.
16. Compston JE. Sex steroids and bone. Physiol Rev 2001; 81(1):419-447.
17. Ju YH, Carlson KE, Sun J, Pathak D, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Helferich WG. Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified brussel sprouts on growth and gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells. J Agric Food Chem 2000; 48(10):4628-34.

18. Writing Group for Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 2002; 288:321-33.
19. Quaedackers ME, Van Den Brink CE, Wissink S, Schreurs RH, Gustafsson Jk JA, Van Der Saag PT, Van Der Burg BB. 4-hydroxytamoxifen transrepresses nuclear factor-kappa B activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER)alpha, and not through ER beta. Endocrinology 2001; 142(3):1156-66.
20. Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M. Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signaling. IUBMB Life 2004; 56(3):145-51.
21. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. Oncogene 2002; 21(23):3727-38.
22. Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. J Agric Food Chem 2003; 51(26):7632-5.
23. Campbell MJ, Hamilton B, Shoemaker M, Tagliaferri M, Cohen I, Tripathy D. Antiproliferative activity of Chinese medicinal herbs on breast cancer cell *in vitro*. Anticancer Res 2002; 22(6C):3843-52.
24. Obon de Castro C, Rivera-Nunez D. A taxonomic revision of the section Sideritis (Genus Sideritis) (Labiatae). Lubrecht and Cramer Ltd, Berlin - Stuttgart, 1994.
25. Charami MT, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles C. Antioxidant and antiinflammatory activities of Sideritis perfoliata subsp. perfoliata (Lamiaceae). Phytother Res 2008; 22:450-454.
26. Diaz RM, Garcia-Granados A, Moreno E, et al. Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of diterpenoid compounds from Sideritis. Planta Med 1988; 54:301-304.
27. Kupeli E, Sahin FP, Calis I, Yesilada E, Ezer N. Phenolic compounds of Sideritis ozturkii and their *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activities. J Ethnopharmacol 2007; 112:356-360.
28. Ertas A, Ozturk M, Boga M, Topcu G. Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of ent-kaurane diterpenoids from Sideritis arguta. J Nat Prod 2009; 72:500-502.
29. Tsaknis J, Lalas S. Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euboea* (mountain tea). J Agric Food Chem 2005; 53:6375-6381.
30. Charami MT, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles C. Antioxidant and antiinflammatory activities of Sideritis perfoliata subsp. perfoliata (Lamiaceae). Phytother Res 2008; 22:450-454.
31. Menghini L, Massarelli P, Bruni G, Menghini A. Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of Sideritis syriaca L. herba extracts. J Med Food 2005; 8:227-231.
32. Gürbüz I, Ozkan AM, Yesilada E, Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). J Ethnopharmacol 2005; 101:313-318.
33. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsarbopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. J Agric Food Chem 2001; 49(2):811-5.
34. Kassi E, Papoutsi 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; 52:6956-61.
35. Jee WSS, Yao W. Overview: animals models of osteopenia and osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact 2001; 1:193-207.
36. Δοντά Ι, Λελόβας Π. Πειραματικά πρότυπα οστεοπόρωσης. Εκδόσεις Υλονόμη, Αθήνα 2011.
37. Kassem M, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. J Bone Miner Res 1996; 11:193-199.
38. Cheung J, Mak Y, Papaioannou S, Evans B, Fogelman I, Hampson G. Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-β oestradiol and raloxifene. J Endocrinology 2003; 177:423-433.

39. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstand CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 1999; 140:4367-4370.
40. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17β-Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-α. Endocrinology 2001; 142:2205-2212.
41. Taranta A, Brama M, Teti A, De Luca V, Seandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine JD, Migliaccio S. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity *in vitro*. Bone 2002;30:368-376.
42. Lindberg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Halleen JM, Carlsten H, Gustafsson J-A, Ohlsson C. Estrogen receptor α, but not estrogen receptor β, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-κB ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. J Endocrinology 2001; 171:425-433.
43. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. Comp Med 2008; 58:424-30.
44. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. Calcif Tissue Int 1993; 52:26-33.
45. Burr DB. Muscle strength, bone mass and age-related bone loss. J Bone Miner Res 1997; 12:1547-1551.
46. El-Shitany NA, Hegazy S, El-Desoky K. Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats. Phytomedicine 2010; 17:116-125.
47. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Tyagi AM, Kumar A, Rawat P, Kumar M, Nagar GK, Arya KR, Manickavasagam L, Jain GK, Maurya R, Chattopadhyay N. Extract and fraction from *Ulmus wallichiana* Planchon promote peak bone achievement and have a nonestrogenic osteoprotective effect. Menopause 2010; 17:393-402.
48. Pandey R, Gautam AK, Bhargavan B, Trivedi R, Swarnkar G, Nagar GK, Yadav DK, Kumar M, Rawat P, Manickavasagam L, Kumar A, Maurya R, Goel A, Jain GK, Chattopadhyay N, Singh D. Total extract and standardized fraction from the stem bark of *Butea monosperma* have osteoprotective action: evidence for the nonestrogenic osteogenic effect of the standardized fraction. Menopause 2010; 17:602-610.
49. Siddiqui JA, Sharan K, Swarnkar G, Rawat P, Kumar M, Manickavasagam L, Maurya R, Pierroz D, Chattopadhyay N. Quercetin-6-C-beta-d-glucopyranoside isolated from *Ulmus wallichiana* planchon is more potent than quercetin in inhibiting osteoclastogenesis and mitigating ovariectomy-induced bone loss. Menopause 2011; 18(2):198-207.
50. Möller FJ, Diel P, Zierau O, Hertrampf T, MaaQ J, Vollmer G. Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor. Toxicol Lett 2010; 196:142-153.

Διαφορική έκφραση των ισομορφών του IGF-1 στα κύτταρα MG-63 ανθρώπινου οστεοσαρκώματος

Α. ΑΡΜΑΚΟΛΑΣ[1], Α. ΦΙΛΙΠΠΟΥ[1], Σ. ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΟΣ[2], Α. ΘΕΟΣ[1], Μ. ΚΑΠΑΡΕΛΟΥ[1], Ν. ΠΙΣΙΜΙΣΗΣ[1], Α. ΝΕΖΟΣ[1], Ζ. ΠΑΝΤΕΛΕΑΚΟΥ[1], Π. ΠΑΠΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ[3], Μ. ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ[1]

[1] Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, ΕΚΠΑ

[2] Πανεπιστημιακή Ορθοπαιδική Κλινική, Νοσοκομείο Κ.Α.Τ.

[3] Α' Πανεπιστημιακή Ορθοπαιδική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

Περίληψη

Το ανθρώπινο γονίδιο του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) κωδικοποιεί διαφορετικά μετάγραφα/ισομορφές, ονομαστικά τα IGF-1Ea, IGF-1Eb και IGF-1Ec, μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν: α) να εξετάσει την έκφραση των ισομορφών του IGF-1 στα κύπαρα στα κύπαρα MG-63 ανθρώπινου οστεοσαρκώματος που εμφανίζουν οστεβλαστικό φαινότυπο μετά από επίδραση με διάφορους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες και β) να διερευνήσει το ρόλο του βιορυθμιστικού συστήματος του IGF-1 στα κύπαρα MG-63. Η έκφραση των ισομορφών του IGF-1 χαρακτηρίστηκε σε επίπεδο mRNA μέσω ημιποσοτικής (RT-PCR) και ποσοτικής (qRT-PCR) ανάλυσης αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τέλος, μέσω της μεθόδου αποκλεισμού μέσω χρώσης (trypan blue assay) διερευνήθηκε η μιτογόνος δράση του ώριμου πεπτιδίου του IGF-1 και ενός συνθετικού πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην περιοχή Ε της ισομορφής IGF-1Ec (συνθετικό πεπτίδιο Ε) στα κύπαρα MG-63, καθώς επίσης και σε κύπαρα MG-63 μετά από μοριακή τροποποίηση τους με τη χρήση siRNAs, η οποία ανέστειλε την έκφραση των υποδοχέων του IGF-1 (IGF-1R KO) και της ινσουλίνης (IR KO). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι στις παρούσες πειραματικές συνθήκες τα κύπαρα MG-63 εκφράζουν μόνο τα μετάγραφα IGF-1Ea και IGF-1Ec. Η εξωγενής χορήγηση μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β_1 (TGF-β_1) και διϋδροτεστοστερόνης (DHT) αύξησε σημαντικά την έκφραση του IGF-1Ea mRNA και επήγαγε την προηγουμένως μη ανιχνεύσιμη έκφραση του IGF-1Eb στα κύπαρα MG-63. Η χορήγηση IGF-1, ινσουλίνης και του συνθετικού πεπτιδίου Ε προκάλεσε την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυπάρων MG-63, ενώ μόνο το πεπτίδιο Ε επήγαγε τον πολλαπλασιασμού των κυπάρων IGF-1R KO and IR KO. Τα ερευνητικά μας ευρήματα ανέδειξαν μια διαφορική έκφραση των ισομορφών του IGF-1 στα κύπαρα MG-63 η οποία φαίνεται ότι ρυθμίζεται από άλλους παράγοντες και ορμόνες και ενδέχεται να διαδραματίζει έναν πολυδύναμο ρόλο στην παθοφυσιολογία του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Ειδικότερα η έκφραση της ισομορφής IGF-1Ec πιθανώς να εμπλέκεται στη βιολογία του οστεοσαρκώματος μέσω της παραγωγής του πεπτιδίου Ec, του οποίου η δράση διαμεσολαβείται από κάποιο μηχανισμό ανεξάρτητο από τον υποδοχέα του IGF-1 και της ινσουλίνης.

Λέξεις κλειδιά: Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1), Ισομορφές IGF-1, Οστεοσάρκωμα, Κύπαρα MG-63

IGF-1 isoform expression in MG-63 human osteoblast-like osteosarcoma cells

A. ARMAKOLAS[1], A. PHILLIPOU[1], S.G. PNEUMATICOS[2], A. THEOS[1], M. KAPARELOU[1], N. PISSIMISSIS[1], A. NEZOS[1], Z. PANTELEAKOU[1], P. PAPAGELOPOULOS[3], M. KOUTSILIERIS[1]

[1] Department of Experimental Physiology, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens

[2] Third Department of Orthopaedics, Athens University Medical School, KAT Hospital

[3] First Department of Orthopaedics, Athens University Medical School, ATTIKON University Hospital

Summary

The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene gives rise to multiple transcripts, the IGF-1Ea, IGF-1Eb and IGF-1Ec by an alternative splicing mechanism. The aims of this study were: a) to study the expression levels of the IGF-1 isoforms to MG-63 human osteoblast-

like osteosarcoma cells before and after the administration of various growth factors and hormones and b) to determine the bioregulatory role of the IGF-1 system in the MG-63 cells. The expression of the IGF-1Ea, IGF-1Eb and IGF-1Ec. We also examined the mitogenic effects of the IGF-1 and of a synthetic peptide related to the E domain of IGF-1Ec (the active part of IGF-1Ec isoform), in MG-63 cells as well as in MG-63 cells which have been molecularly modified to restrain the expression of type I IGF receptor (IGF-1R) and of insulin receptor (IR) by siRNA techniques (IR or IGF-1R KO MG-63 cells), using trypan blue exclusion assay. The results of this study suggest that under the present experimental conditions the MG-63 cells express only the IGF-1Ea and IGF-1Ec transcripts. Exogenous administration of dihydrotestosterone (DHT) and of transformation Growth factor β_1 (TGF-β_1) significantly increased the expression of IGF-1Ea and it induced the previously undetectable expression of IGF-1Eb transcript. Exogenous administration of the IGF-1, insulin and the synthetic E peptide stimulated the growth of MG-63 cells while only E peptide stimulated the growth of IGF-1R K.O and IR K.O MG-63 cells. These data suggest that the expression of all IGF-1 isoforms is hormonally regulated in MG-63 cells and that the expression of IGF-1Ec may be involved in the osteosarcoma biology and pathophysiology by generating the Ec peptide which is acting via an IGF-1R-independent and IR-independent mechanism.

Keywords: Insulin-like growth factor 1, MG-63 osteosarcoma cells, IGF-1 isoforms

Εισαγωγή

Η έκφραση του γονιδίου του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) ρυθμίζεται κύρια από την αυξητική ορμόνη (GH) και τις στεροειδείς ορμόνες του φύλου, ενώ το βιοδραστικό του παράγωγο, ο IGF-1, που αρχικά έχει περιγραφεί ως σωματομεδίνη C, παράγεται κατά κύριο λόγο από το συκώτι, διαμεσολαβώντας έτσι τις δράσεις της GH στην ανάπτυξη του σκελετού. Συνεπώς, ο άξονας GH/IGF-1 ελέγχει τη σκελετική ανάπτυξη καθώς και την οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση [1]. Οι βιολογικές δράσεις του IGF-1 αποδίδονται στη σύνδεσή του με τον τύπου I υποδοχέα του (IGF-1R). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα του IGF-1 και η συνακόλουθη σηματοδότησή του επηρεάζει τις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης, απόπτωσης και επισκευής του DNA ουσιαστικά σε όλους τους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων του οστεοσαρκώματος [2]. Επιπλέον, ο IGF-1 μπορεί να συνδέεται, με χαμηλότερη συγγένεια, με τον υποδοχέα τύπου II (IGF-2R) που διαμεσολαβεί κυρίως την εσωτερικοποίηση του IGF-1 καθώς και μεταβολικές διαδικασίες [1,2], και με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IR), ο οποίος επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση [2]. Τέλος, ο IGF-1 συνδέεται και ενεργοποιεί τον υβριδικό υποδοχέα IGF-1R/IR ο οποίος συνίσταται από έναν ημιυποδοχέα IR που συνδέεται με έναν ημι-υποδοχέα IGF-1R, προκαλώντας κυτταρικές αποκρίσεις που βρίσκονται υπό εντατική διερεύνηση, ειδικότερα για το ρόλο τους στη βιολογία του καρκίνου [3].

Δεδομένου ότι το βιορυθμιστικό σύστημα του IGF-1 εμπλέκεται στη βιολογία του καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του οστεοσαρκώματος, οι υποδοχείς του IGF-1 έχουν καταστεί ελκυστικοί υποψήφιοι για στοχευμένες θεραπείες και αποτελεσματικότητα της χρήσης αντι-IGF-1R αντισωμάτων στην αναστολή της δράσης του IGF-1 έχουν διερευνηθεί σε διάφορες κλινικές δοκιμές [4-7].

Είναι ενδιαφέρον ότι το γονίδιο του IGF-1, το οποίο περιλαμβάνει 6 εξώνια, δίδει γένεση σε πολλαπλά ετερογενή μετάγραφα, μέσω του μηχανισμού εναλλακτικού ματίσματος [8-12]. Στον άνθρωπο, τα τρία μετάγραφα/ισομορφές του IGF-1, δηλ., τα IGF-1Ea, IGF-1Eb και IGF-1Ec, παράγουν ένα κοινό βιοδραστικό μόριο, το ώριμο πεπτίδιο του IGF-1, ωστόσο, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή του πεπτιδίου επέκτασης (πεπτίδιο E) στο καρβοξυλικό άκρο τους [13, 14]. Το μετάγραφο που προέρχεται από την παραλλαγή ματίσματος του IGF-1Ec ονομάστηκε αρχικά ‘‘μηχανοαυξητικός παράγοντας’’ (mechano growth factor, MGF) λόγω της φερόμενης ως ειδικής έκφρασής του στο σκελετικό μυ μετά από μηχανική επιβάρυνση και βλάβη του [15,16]. Πρόσφατα, η ερευνητική μας ομάδα έχει τεκμηριώσει την έκφραση του IGF-1Ec σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα [17]. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση ενός συνθετικού πεπτιδίου E που αντιστοιχεί στην περιοχή E του IGF-1Ec βρέθηκε ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό ποικίλων τύπων κυττάρων (μυοβλαστών, καρδιομυοκυττάρων, κυττάρων ενδομητρίου και καρκινικών προστατικών κυττάρων) μέσω ενός μηχανισμού πιθανώς ανεξάρτητου από τον IGF-1R και τον IR [16-20]. Στην παρούσα μελέτη, χαρακτηρίστηκε η έκφραση των ισομορφών του IGF-1 σε επίπεδο mRNA και διερευνήθηκε εάν υπάρχει διαφορική ρύθμισή της στα κύτταρα MG-63 του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος μετά από επίδρασή τους με διά-

φορους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες. Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι ενδεχόμενες αυτόνομες δράσεις του συνθετικού πεπτιδίου Ε της ισομορφής IGF-1Ec στα κύτταρα MG-63.

Υλικά και Μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες. Η κυτταρική σειρά MG-63, που αποκτήθηκε από την American Type Cell Culture (ATCC, Bethesda, MD, USA), χρησιμοποιήθηκε ως ένα *in vitro* μοντέλο για τη διερεύνηση της παθοφυσιολογίας των οστεοβλαστών και της βιολογίας του οστεοσαρκώματος [1,21,22]. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 5% CO_2) ως μη ''κορεσμένη'' μονή στοιβάδα κυττάρων (δηλ., σε πυκνότητα κυττάρων μικρότερη από το 80% του κορεσμού), χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Cambrex, Walkerville, MD, USA), συμπληρωμένο με 10% θερμο-αδρανοποιημένο εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, Biochrom, Berlin, Germany) και με 100 U/ml πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Cambrex, Walkerville, MD ΗΠΑ). Το θρεπτικό μέσο στην κυτταροκαλλιέργεια ανανεώνονταν κάθε 2-3 ημέρες.

Η κυτταρική σειρά HLE-B3 του επιθηλίου του φακού του ανθρώπινου ματιού, που αποκτήθηκε επίσης από την ATCC, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας για τον έλεγχο της έκφρασης των ισομορφών του IGF-1, καθώς η ερευνητική μας ομάδα έχει δείξει ότι τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, τις ισομορφές IGF-1Eb και IGF-1Eb [24]. Τα κύτταρα HLE-B3 διατηρούνταν επίσης σε συνθήκες καλλιέργειας (37°C, 5% CO_2) ως μονή στοιβάδα κυττάρων χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F-12; Cambrex, Walkerville, MD, USA) συμπληρωμένο με 10% FBS και 100 U/ml πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Το θρεπτικό μέσο στην κυτταροκαλλιέργεια ανανεώνονταν κάθε 2-3 ημέρες.

Κυτταρικές επιδράσεις με αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες. Για τη διερεύνηση του ενδεχόμενου διαφορικής ρύθμισης της έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 στα κύτταρα MG-63 οστεοβλαστικού φαινότυπου μετά από επίδρασή τους με διάφορους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δράση του IGF-1, του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β_1 (TGF-β_1), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (b-FGF), της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) της διϋδροτεστοστερόνης (DHT), της οιστραδιόλης (17β-E_2), της δεξαμεθαζόνης (DEXA), του ζολενδρονικού οξέος (ZOMETA) και του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) στην έκφραση των ισομορφών του IGF-1 στα κύτταρα MG-63.

Ειδικότερα, κύτταρα MG-63 καλλιεργούνταν σε πιάτα των 6 κελιών με θρεπτικό μέσο EMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS μέχρι τον κορεσμό της μονής στοιβάδας τους. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο αντικαθίστατο με θρεπτικό που περιείχε 0,5% FBS για 24 h, προκειμένου να αποκαλυφθεί η πλήρης επίδραση των παραγόντων που θα χρησιμοποιούνταν ακολούθως στις κυτταρικές επιδράσεις. Τα κύτταρα ακολούθως εκτίθονταν για 48 ώρες σε IGF-1 (25 ng/ml), ή TGF-β_1 (25 ng/ml), ή β-FGF (25 ng/ml), ή IL-6 (25 ng/ml), ή DHT (100 nM), ή 17β-E_2 (100 nM), ή DEXA (100 nM), ή ZOMETA (100 μM), ή EDTA (100 μM). Κύτταρα MG-63 χωρίς επίδρασή τους με οποιοδήποτε παράγοντα (δηλ., καλλιεργούμενα σε θρεπτικό EMEM εμπλουτισμένο με 0,5% FBS) χρησιμοποιήθηκαν ως συνθήκες ελέγχου (control).

Μετρήσεις αποκλεισμού μέσω χρώσης με κυανούν του τρυπανίου (trypan blue assays). Για τον έλεγχο της μιτογόνου δράσης των υπό διερεύνηση πεπτιδίων (δηλ., της ινσουλίνης, του ώριμου IGF-1 και του συνθετικού πεπτιδίου Ε της ισομορφής IGF-1Ec) κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλεισμού (προσδιορισμός του αριθμού ζώντων κυττάρων) μέσω χρώσης με κυανούν του τρυπανίου όπως περιγράφεται αλλού [19,20], με σκοπό να συγκριθούν οι φυσιολογικές δράσεις των διαφορετικών αυτών πεπτιδίων στα κύτταρα MG-63. Εν συντομία, κύτταρα MG-63 καλλιεργούνταν σε πιάτα των 6 κελιών με πυκνότητα 2,3 x 10^4 κύτταρα/κελί και σε θρεπτικό μέσο EMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS. Μετά από 24 h το θρεπτικό μέσο αντικαθίστατο με θρεπτικό που περιείχε 0,5% FBS για 24 h. Τα κύτταρα ακολούθως εκτίθονταν για 24 h σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, δηλ., 0,066 nM, 3,29 nM, ή 6,58 nM ανασυνδυασμένου ανθρώπινου IGF-1 70 αμινοξέων (rhIGF-1, Chemicon international Inc., Temecula, CA, USA), που αντιστοιχεί στο ώριμο πεπτίδιο του IGF-1, ή σε 0,086 nM, 2,58 nM, ή 5,165 nM ινσουλίνης (Novo Nordisk, Denmark), ή σε 0,168 nM, 8,43 nM, ή 16,85 nM του συνθετικού πεπτιδίου Ε. Ειδικότερα, το συνθετικό αυτό πεπτίδιο αντιστοιχεί στα τελευταία 24 αμινοξέα του καρβοξυλικού άκρου της ισομορφής IGF-1Ec (τμήματα των εξονίων 5 και 6) [23] με βάση την προβλεπόμενη νουκλεοτιδική ακολουθία (cDNA) του ανθρώπι-

νου πεπτιδίου Ec [12]. Συντέθηκε από την Eastern Quebec Proteomic Core Facility (Ste-Foy, Quebec, Canada), καθαρίστηκε σε ποσοστό >90% με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η αμινοξική του αλληλουχία αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας και HPLC. Συγκεκριμένα, η αμινοξική ακολουθία του συνθετικού πεπτιδίου Ε είναι: NH_2-YQPP-STNKNTKSQRRKGSTFEERK-COOH και το προβλεπόμενο μέγεθός του είναι 2.967 Da [23]. Για συνθήκες ελέγχου, κύτταρα MG-63 εκτέθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων MG-63 στις παραπάνω διαφορετικές κυτταροκαλλιέργειες μετρήθηκε 24 ώρες μετά, χρησιμοποιώντας μετρήσεις αποκλεισμού μέσω χρώσης με κυανού του τρυπανίου [19,20].

Αναστολή της έκφρασης (silencing) του υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) και του τύπου Ι υποδοχέα του IGF-1 (IGF-1R). Stealth siRNAs (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή της έκφρασης των υποδοχέων IR και IGF-1R στα κύτταρα MG-63. Οι αλληλουχίες των siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για τον IGF-1R: UCUUCA-AGGGCAAUUUGCUCAUUAA και για τον IR: ACA-AACUGCCCGUUGAUGACGGUGG. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη αλληλουχία siRNA (universal negative control stealth siRNA, Invitrogen) για τη διαμόλυνση των κυττάρων ελέγχου. Η διαμόλυνση των κυττάρων MG-63 με siRNAs πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης (Lipofectmine 2000, Invitrogen) σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή, όπως έχει περιγραφεί αλλού [19,20]. Εν συντομία, 200 nM siRNA αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με λιποφεκταμίνη για 30 λεπτά και στη συνέχεια χορηγήθηκαν σε κύτταρα MG-63 τα οποία καλλιεργούνταν σε πιάτα των 24 κελιών σε πυκνότητα 50-60% του κορεσμού μονής στοιβάδας. Η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης ελέγχθηκε 48 ώρες μετά την χορήγηση των siRNAs στα κύτταρα, όπως έχει περιγραφεί αλλού [19-20].

Απομόνωση RNA από κύτταρα MG-63 και HLE-B3. Ολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα MG-63 και HLE-B3 χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το απομονωθέν RNA διαλύονταν σε νερό κατεργασμένο με διαίθυλο-πυροανθρακικό οξύ (DEPC H_2O) και η συγκέντρωση και καθαρότητά του προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά (Genova, Jenway, Essex, UK), με έλεγχο της απορρόφησης στα 260 και 280 nm. Ο λόγος της απορρόφησης 260:280 βρέθηκε να κυμαίνεται στο εύρος του 1,8 έως 2,0. Η ποιότητα και η ακεραιότητα του ολικού RNA αξιολογήθηκαν περεταίρω με έλεγχο του ηλεκτροφορητικού προτύπου του 18S και 28S ριβοσωματικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, μετά από χρώση του με τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφησή του υπό υπεριώδες φως (UV). Τα δείγματα RNA αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους και τον προσδιορισμό του ειδικού mRNA της κάθε ισομορφής του IGF-1, σύμφωνα με τις διαδικασίες της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT).

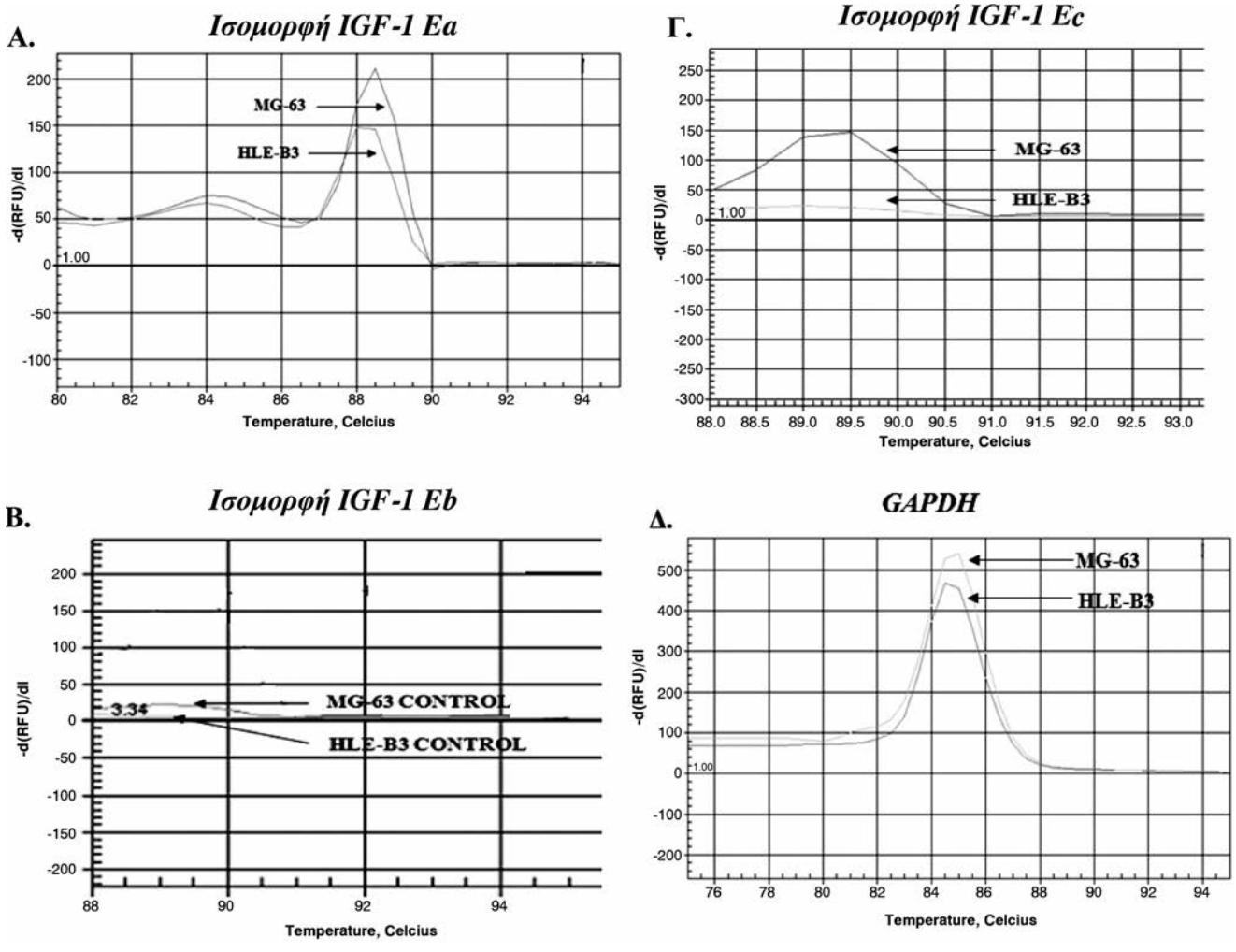
Ειδικότερα, το ολικό RNA μεταγράφονταν αντίστροφα σε cDNA μέσω της διαδικασίας της RT, χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Δύο (2) μg ολικού RNA από κάθε δείγμα κυττάρων αναμιγνύονταν με εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας (300 ng/αντίδραση), oligo dT (200 ng/αντίδραση), 2 μl δεσοξυτριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (dNTPs, 0,5 mM από το καθένα), και DEPC-H_2O σε συνολικό όγκο 12 μl, θερμαίνονταν στους 65°C για 5 min και ακολούθως τοποθετούνταν σε πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναμιγνύονταν με 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος της RT (FSB, X5), 2 μl διθειοθρεϊτόλη (DTT) (0.1 M), 1 μl αναστολέων RNAασών (50 U/μl) και 1 μl SuperScript II (200 U/μl), σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Τα δείγματα ακολούθως επωάζονταν σε θερμοκρασία 45°C για 50 min, σύμφωνα με το προβλεπόμενο πρωτόκολλο. Στο τέλος της αντίδρασης της RT, τα δείγματα θερμαίνονταν στους 70°C για 20 min, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η αντίδραση και αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους ως προς την έκφραση των ειδικών mRNAs του IGF-1, μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).

Ημιποσοτική και ποσοτική RT-PCR. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος της ποσοτικής RT-PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), για τον έλεγχο της έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 στα κύτταρα MG-63, και της ημιποσοτικής RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασής τους μετά από επίδραση των κυττάρων με διάφορους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες.

Ειδικότερα, στην ημιποσοτική RT-PCR το ριβοσωματικό RNA 18S (18S Universal, Ambion, Austin, TX, USA) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για

τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των mRNAs των ισομορφών του IGF-1. Οι εκκινητές του 18S αναμιγνύονταν με ανταγωνιστές τους (competimers) σε βελτιστοποιημένη αναλογία ανάλογα με το βαθμό έκφρασης του κάθε ειδικού mRNA-στόχου (σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο για τη σχετική RT-PCR, Ambion). Οι συνθήκες των αντιδράσεων τόσο της RT όσο και της PCR για κάθε ειδικό mRNA του IGF-1 κρατούνταν σταθερές για όλα τα δείγματα, με τη χρησιμοποίηση των ίδιων προαναμεμιγμένων αντιδραστηρίων για όλα τα συγκρινόμενα δείγματα. Οι συνθήκες της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών (αραιώσεις του cDNA, μίγμα εκκινητών-ανταγωνιστών 18S, θερμοκρασία ιβριδισμού) βελτιστοποιήθηκαν και εξομαλύνθηκαν, έτσι ώστε για μια ορισμένη συνθήκη, η συνενίσχυση των προϊόντων της PCR, τόσο του cDNA-στόχου όσο και του 18S, να είναι σε υψηλό βαθμό γραμμική (μετά από αναλύσεις παλινδρόμησης) σε ένα ορισμένο εύρος κύκλων της PCR όταν τα προϊόντα της PCR εκφράζονταν σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της έκφρασης των ισομορφών IGF-1Ea, IGF-1Eb και IGF-1Ec ήταν όμοια με αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως [16]. Το κάθε ζεύγος εκκινητών ήταν σχεδιασμένο να εντοπίζεται σε διαφορετικά εξώνια του γονιδίου του IGF-1, ώστε να αποφεύγεται η ενίσχυση γενομικού DNA και να ανιχνεύει μόνο μία συγκεκριμένη ισομορφή (μετάγραφο) του IGF-1. Όλοι οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από την Invitrogen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Τα αναμενόμενα μεγέθη των ειδικών προϊόντων της PCR επιβεβαιώθηκαν αρχικά με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης και, στη συνέχεια, οι ακολουθίες των cDNAs όλων των διαφορετικών ισομορφών προσδιορίστηκαν με ανάλυση αλληλούχισης (Sequencing), ταυτοποιώντας περαιτέρω την διαφορική ανίχνευση του κάθε ειδικού μεταγράφου του IGF-1. Σε προκαταρκτικά πειράματα το κάθε ζεύγος εκινητών για τα διαφορετικά μετάγραφα του IGF-1 ελέγχθηκε επίσης για τη συμβατότητά του με τους εκκινητές του 18S Universal.

Για τη διαδικασία της ημιποσοτικής PCR, 2 μl από κάθε προϊόν RT (cDNA) προστίθονταν σε 23 μl μίγματος PCR που είχε παρασκευαστεί με 1,6 mM $MgCl_2$, 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος PCR (X10), 0,2 mM dNTPs, 1μM από τον κάθε εκκινητή του ειδικού ζεύγους εκκινητών για την εκάστοτε ισομορφή του IGF-1, 0,5 μM μίγματος εκκινητή-ανταγωνιστή του 18S και 1,25 μονάδες DNA Taq πολυμεράση (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), σε έναν συνολικό όγκο 25 μl. Οι αντιδράσεις της PCR έγιναν σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 Peltier Thermal Cycler, (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA), με αρχικό στάδιο αποδιάταξης 3 min στους 95°C, 1 min υβριδισμού στους 58-60°C (ανάλογα με τους εκκινητές), 1 min επέκτασης στους 72°C, και ενός τελικού σταδίου 3 min στους 72°C. Τα περιγραφέντα στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και επέκτασης επαναλαμβάνονταν για 35-40 κύκλους (ανάλογα με τα αποτελέσματα των ελέγχων γραμμικότητας για κάθε ειδικό μετάγραφο του IGF-1 με το 18S). Οκτώ (8) μl από κάθε προϊόν της PCR αναμεμιγμένα με 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος ‘‘φόρτωσης’’ DNA ηλεκτροφορούνταν οριζόντια σε πήκτωμα αγαρόζης 2-2,5% (σε σταθερή τάση ηλεκτρικού πεδίου 80 V) για 45 έως 60 min [ανάλογα με το διαφορετικό βαθμό διαχωρισμό των ζωνών μεταξύ του ειδικού κάθε φορά cDNA (ισομορφής) του IGF-1 και του 18S λόγω μεγέθους κάθε προϊόντος της PCR]. Για τον έλεγχο του αναμενόμενου μεγέθους κάθε ειδικού cDNA του IGF-1, στο πήκτωμα αγαρόζης ηλεκτροφορούνταν ταυτόχρονα και δείκτες μοριακής μάζας με διαβάθμιση 100 ζευγών βάσεων (DNA ladder, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αγαρόζης βάφονταν με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφίζονταν υπό φωτισμό UV με ψηφιακή μηχανή και ειδικό σύστημα απεικόνισης (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290, Carestream Health, Inc. Rochester, NY, USA). Οι απεικονισθείσες ζώνες ποσοτικοποιούνταν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς τους (πυκνομετρία), χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό (Scientific Imaging Systems, Kodak ID, New Haven, CT, USA). Ειδικότερα, μετρούνταν η πυκνότητα της κάθε ζώνης σε όλη την επιφάνειά της (εμβαδό) και εξομαλύνονταν με την αντίστοιχη ζώνη του 18S. Οι παράμετροι για την επεξεργασία της εικόνας κρατήθηκαν σταθερές σε όλα τα πηκτώματα, χρησιμοποιώντας προκαθορισμένα κριτήρια κορεσμού για την ψηφιακή κάμερα. Ο συνολικός χρόνος έκθεσης καθορίζονταν από το πρώτο σημείο κορεσμού στην εικόνα, χωριστά για το κάθε πήκτωμα. Σημειώνεται ότι η ηλεκτροφόρηση κάθε προϊόντος της PCR πραγματοποιούνταν εις διπλούν, σε διαφορετικά πηκτώματα, και η μέση τιμή των δύο λαμβάνονταν ως τελική για περαιτέρω ανάλυση. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί αμερόληπτη ανάλυση, ο σχετικός ποσοτικός προσδιο-



Εικ. 1. Ανίχνευση της έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 σε επίπεδο mRNA με τη χρήση ποσοτικής RT-PCR και ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve) για κάθε ισομορφή (**Α-Γ**). Στις πειραματικές συνθήκες τις παρούσας μελέτης, η ισομορφή IGF-1Eb βρέθηκε ότι δεν εκφράζεται (**Β**). Ως εσωτερικός αμετάβλητος μάρτυρας για όλες τις ισομορφές χρησιμοποιήθηκε η GAPDH (**Δ**), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυπαρική σειρά HLE-B3 του επιθηλίου του φακού του ανθρώπινου ματιού, που έχει δειχθεί ότι δεν εκφράζει τις ισομορφές IGF-1Eb και IGF-1Ec [24].

ρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε από δύο ανεξάρτητους ερευνητές εν αγνοία των ερευνητικών υποθέσεων της μελέτης.

Για τη διαδικασία της ποσοτικής RT-PCR, κάθε αντίδραση RT πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 20 μL και περιελάμβανε 2 μg RNA αναμεμιγμένο με 0,5 mM dNTPs (HT Biotechnology, Cambridge, UK), 3 μg/μl εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 40 U αναστολέων RNAασών από ανθρώπινο πλακούντα (HT Biotechnology), ρυθμιστικό διάλυμα της RT [αποτελούμενο από τελικές συγκεντρώσεις 10 mM DTT, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, και 50 mM Tris-HCl; (Finnzymes, Espoo, Finland)], 200 U αντίστροφης μεταγραφάσης (Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Finnzymes) και νερό καθαρισμένο από νουκλεάσες (Qiagen, Valencia, CA, USA). Το παράγωγο cDNA ακολούθως ενισχύονταν με qRT–PCR. Για την ανίχνευση των ισομορφών του IGF-1 χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ημιποσοτική RT-PCR, ενώ για τον έλεγχο της έκφρασης των υποδοχέων IGF-1R και IR στα κύπταρα MG-63 που διαμολύνθηκαν με siRNAs

χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών: για τον IGF-1R, sense 5′-ACCCGGAGTACTTCAGCGC-3′, antisense, 5′-CACAGAAGCTTCGTTGAGAA-3 και για τον IR sense 5′-ACTCTCAGATCCTGAAG-GAGCTGGA-3′, antisense 5′-AGTGTTGGGGA-AAGCTGCCAC-3′. Κάθε αντίδραση qRT-PCR πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 25 μl χρησιμοποιώντας 12 μl SYBR green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0,5 μg/ml oligo dTs (Fermentas, GMBH, Germany), 2 μl cDNA, and 0.3 μM για κάθε εκκινητή. Ως εσωτερικός αμετάβλητος μάρτυρας σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH). Οι παράμετροι της qRT-PCR ήταν: 95°C για 30 sec, και ακολούθως 36 κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 94°C για 20 sec, υβριδισμού στους 60°C για 30 sec και επέκτασης στους 72°C για 30 sec, με ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72°C για 5 min. Η ταυτοποίηση το προϊόντος της PCR έγινε από την καμπύλη τήξης για την κάθε ισομορφή.

Στατιστική ανάλυση. Η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA) (SPSS v. 11 statistical package, SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA). Tukey's post hoc ανάλυση εφαρμόστηκε για την ανάδειξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα του μέσου (S.E.M). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίσθηκε στο $P<0,05$, με δίπλευρο έλεγχο.

Αποτελέσματα

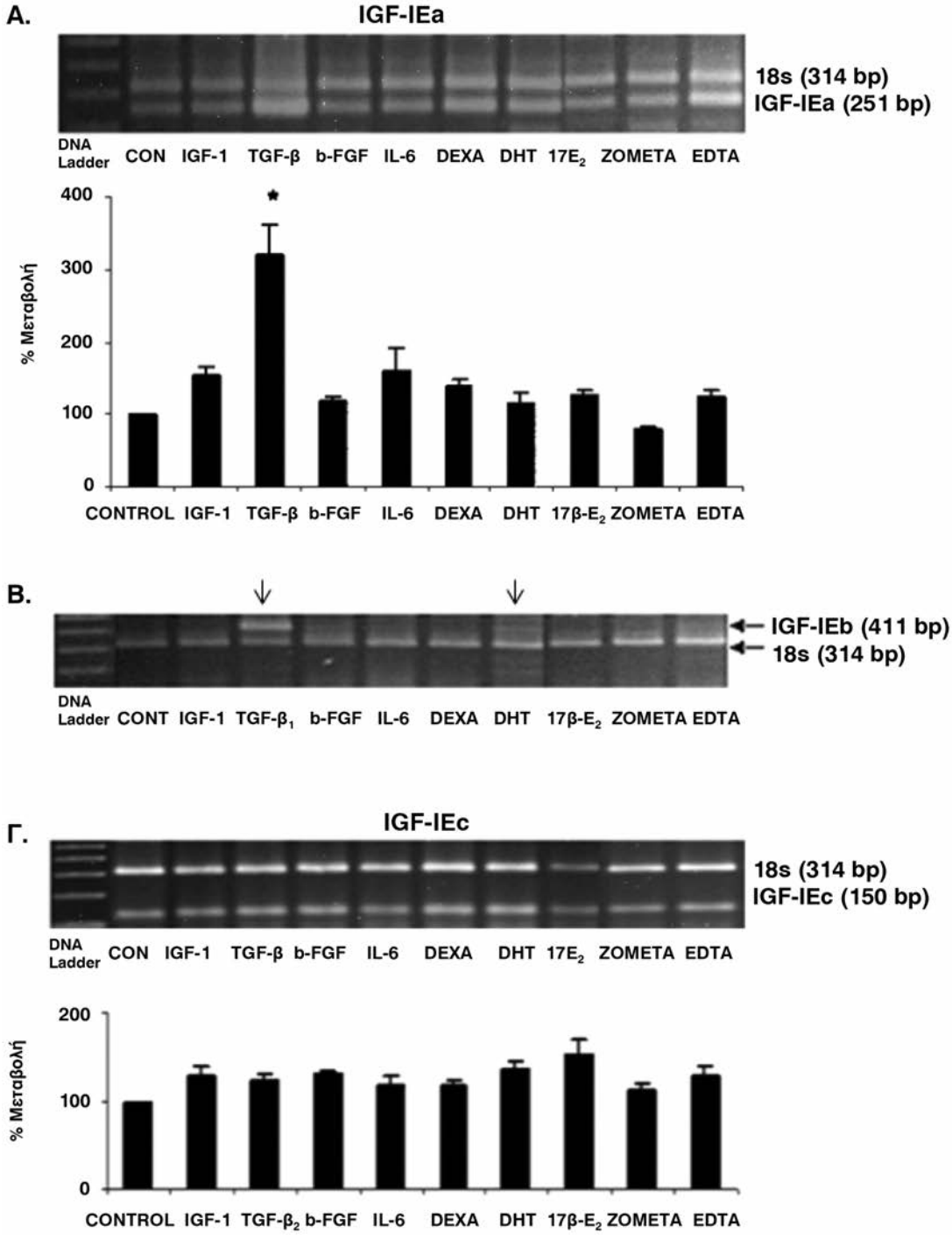
Η ανάλυση της έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 σε επίπεδο mRNA μέσω ποσοτικής RT-PCR έδειξε ότι, υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης, τα κύτταρα MG-63 εκφράζουν μόνο τις ισομορφές IGF-1Ea και IGF-1Ec και όχι την ισομορφή IGF-1Eb (Εικόνα 1 Α-Γ).

Το διαφορικό πρότυπο έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 και η απουσία έκφρασης της ισομορφής IGF-1Eb στα κύτταρα MG-63 επιβεβαιώθηκε περεταίρω μέσω της ανάλυσης ημιποσοτικής RT-PCR (Εικόνα 2 Α-Γ). Επιπλέον, η έκθεση των κυττάρων MG-63 σε IGF-1, b-FGF, IL-6, DHT, 17β-E_2, DEXA, ZOMETA και EDTA δεν μετέβαλε σημαντικά ($p>0.05$) την έκφραση των ισομορφών του IGF-1 (Εικόνα 2 Α-Γ). Ωστόσο, η επίδραση των κυττάρων με TGF-β_1 αύξησε σημαντικά τα επίπεδα mRNA της ισομορφής IGF-IEa ($p<0.01$) και επήγαγε, όπως και η DHT, την έκφραση της ισομορφής IGF-IEb (Εικόνα 2 Α,Β). Η mRNA έκφραση της ισομορφής IGF-IEc δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά από επίδραση των κυττάρων MG-63 με τους ανωτέρω παράγοντες ή ορμόνες (Εικόνα 2 Γ).

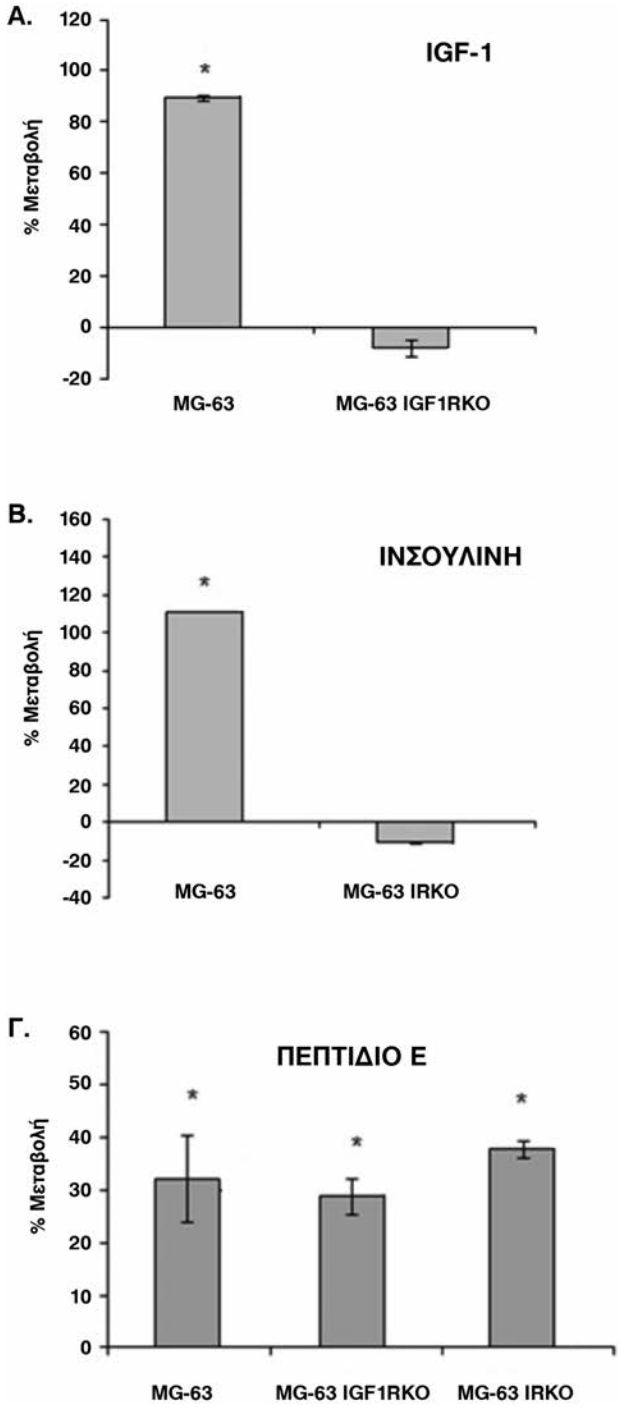
Για τη διερεύνηση του ενδεχομένως αυτόνομου ρόλου της ισομορφής IGF-1Ec στα κύτταρα MG-63, στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η μιτογόνος δράση της ινσουλίνης, του ώριμου IGF-1 και ενός συνθετικού πεπτιδίου (που σχεδιάστηκε να περιέχει τα τελευταία 24 αμινοξέα της περιοχής Ε της ισομορφής IGF-1Ec) στα κύτταρα MG-63, *in vitro*. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τόσο η ινσουλίνη και ο IGF-1 όσο και το συνθετικό πεπτίδιο Ε επήγαγαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG-63 (Εικόνα 3 Α-Γ). Προκειμένου να ελεγχθεί περεταίρω εάν η δράση του συνθετικού πεπτιδίου Ε διαμεσολαβείται μέσω του IGF-1R και/ή του IR, προχωρήσαμε στην αναστολή της έκφρασης (ΚΟ) των υποδοχέων IGF-1R και IR σε κύτταρα MG-63, δημιουργώντας κύτταρα MG-63 IGF-1R ΚΟ και MG-63 IR ΚΟ, αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της έκφρασης των ανωτέρω υποδοχέων στα κύτταρα MG-63 επιβεβαιώθηκε μέσω qRT-PCR, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [19,20]. Στην παρούσα μελέτη, επιτεύχθηκε αναστολή της έκφρασης των υποδοχέων IGF-1R και IR κατά 80% έως 90% της αντίστοιχης έκφρασης των γονικών κυττάρων ελέγχου, ή των κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε διαμόλυνση με siRNA αρνητικού μάρτυρα (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Βρέθηκε ότι, αν και η μιτογόνος δράση του IGF-1 και της ινσουλίνης ανεστάλη στα κύτταρα MG-63 IGF-1R ΚΟ και MG-63 IR ΚΟ αντίστοιχα (Εικόνα 3 Α,Β), η εξωγενής χορήγηση του συνθετικού πεπτιδίου Ε εξακολούθησε να επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG-63 IGF-1R ΚΟ και MG-63 IR ΚΟ (Εικόνα 3 Γ), υποδηλώνοντας ότι οι δράσεις του πεπτιδίου Ε στα κύτταρα MG-63 πιθανώς δεν διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς IGF-1R, IR ή τον υβριδικό υποδοχέα IGF-1R/IR.

Συζήτηση

Το οστεοσάρκωμα είναι ο συνηθέστερος μη-αιματολογικός, πρωτοπαθής, κακοήθης όγκος των οστών στην παιδική ηλικία και την εφηβεία. Εμφανίζεται συνήθως στη περιοχή της μετάφυσης των μακρών οστών, η οποία αποτελεί την ανατομική περιοχή που ανταποκρίνεται στα αυξανόμενα επίπεδα αυξητικής



Εικ. 2. Έλεγχος της έκφρασης των ισομορφών IGF-1Ea (**Α**), IGF-1Eb (**Β**) και IGF-1Ec (**Γ**) σε επίπεδο mRNA με τη χρήση ημιποσοτικής RT-PCR στα κύπαρα MG-63 ύστερα από επίδρασή τους με διάφορους παράγοντες ή ορμόνες. Ο TGF-β_1 προκάλεσε σημαντική αύξηση της ισομορφής IGF-IEa και επήγαγε, όπως και η DHT, την έκφραση της ισομορφής IGF-IEb συγκριτικά με τις συνθήκες ελέγχου (control, CON). Το ριβοσωματικό RNA 18S χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για όλες τις ισομορφές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα του μέσου τριών επαναληπτικών πειραμάτων (mean±SEM). *IGF-1: Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1, TGF-β_1: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β_1, b-FGF: βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών, IL-6: ιντερλευκίνη 6, DHT: διϋδροτεστοστερόνη, 17β-E_2: οιστραδιόλη, DEXA: δεξαμεθαζόνη, ZOMETA: ζολενδρονικό οξύ, EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ.*
**: σημαντικά διαφορετικό από τις συνθήκες ελέγχου, $p<0.01$).*



ορμόνης (GH)/IGF-1 στον ορό του αίματος (δηλ. στο περιφερικό άκρο του μηρού και στο κεντρικό άκρο της κνήμης). Το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με οστεοσάρκωμα είναι φτωχό παρά την εφαρμογή της συνδυαστικής θεραπείας χειρουργικής επέμβασης και χημειοθεραπείας [25]. Δεδομένου ότι η μέγιστη επίπτωση του οστεοσαρκώματος συμπίπτει με το αυξητικό τίναγμα της εφηβείας, το οποίο με τη σειρά του αντιστοιχεί στις κορυφαίες συγκεντρώσεις των επιπέδων του IGF-1 στην κυκλοφορία, ο υποδοχέας του (IGF-1R) έχει καταστεί ένας προφανής στόχος στη διερεύνηση της παθοφυσιολογίας του οστεοσαρκώματος [4-7,25-28].

Οι θεραπείες με στόχο τον IGF-1R, όπως με χρήση του μονοκλωνικού αντι-IGF-1R αντισώματος R1507, ανέστειλαν αποτελεσματικά την ανάπτυξη όγκων ανθρώπινου οστεοσαρκώματος που μεταμοσχεύθηκαν σε πειραματικά ποντίκια [29]. Ωστόσο, ενώ ορισμένοι από αυτούς τους όγκους αλλομοσχευμάτων ανταποκρίνονται στη θεραπεία, άλλοι παρουσιάζουν περιορισμένη ή καθόλου αναστολή της ανάπτυξής τους [30-34]. Με φάση αυτά τα ευρήματα, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ενδεχομένως άλλοι μιτογόνοι παράγοντες πέρα από τον IGF-1 εμπλέκονται στη βιολογία του οστεοσαρκώματος. Στην παρούσα μελέτη τεκμηριώθηκε ότι το συνθετικό πεπτίδιο Ε, που αποτελεί προϊόν μετάφρασης της περιοχής Ε της ισομορφής IGF-1Ec, παρουσίασε μιτογόνο δραστηριότητα στα κύτταρα MG-63 μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τους υποδοχείς IGF-1R και IR. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί ένα αντι-IGF-1R αντίσωμα δεν μπορεί να παρεμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος *in vitro* [29]. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα άλλοι αυξητικοί παράγοντες να έχουν αυτή την ανεξάρτητη από τον IGF-1R δράση στην αύξηση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος.

Εξάλλου, ο TGF-β_1 ενίσχυσε την έκφραση της ισομορφής IGF-1Ea σε επίπεδο mRNA και, όπως και η DHT, επήγαγε την έκφραση της ισομορφής IGF-1Eb στα κύτταρα MG-63, η οποία ήταν μη ανιχνεύσιμη στα

Εικ. 3. Η μιτογόνος δράση του ώριμου πεπτιδίου IGF-1, της ινσουλίνης και του συνθετικού πεπτιδίου Ε της ισομορφής IGF-1Ec μετά από 24 ώρες επίδρασης στα κύτταρα MG-63, όπως αξιολογήθηκε με τη μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρώση κυανού του τρυπανίου (trypan blue assay). Τόσο ο IGF-1 και η ινσουλίνη όσο και το συνθετικό πεπτίδιο Ε επήγαγαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG-63. Ωστόσο, ενώ στα κύτταρα στα οποία είχε ανασταλεί η έκφραση των υποδοχέων του IGF-1 (MG-63 IGF-1R KO) και της ινσουλίνης (MG-63 IR KO), ο IGF-1 (6,58 nM) (**Α**) και η ινσουλίνη (5,165 nM) (**Β**) αντίστοιχα δεν επήγαγαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το συνθετικό πεπτίδιο Ε (16,85 nM) αύξησε σημαντικά των αριθμό των κυττάρων σε σύγκριση με τις συνθήκες ελέγχου (**Γ**). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα του μέσου (mean±SEM) τριών επαναληπτικών πειραμάτων. **: σημαντικά μεγαλύτερο ($p<0.05$) από τις συνθήκες ελέγχου (δηλ. από κύτταρα μετά από επίδρασή τους με αρνητικό μάρτυρα των stealth siRNAs).*

κύτταρα ελέγχου. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση των ισομορφών του IGF-1 φαίνεται να είναι ορμονοεξαρτώμενη στα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος και θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν το γεγονός ότι το οστεοσάρκωμα έχει μεγαλύτερη συχνότητα στους άντρες παρά στις γυναίκες κατά την εφηβεία [35]. Επιπλέον, η έκφραση των ισομορφών του IGF-1 σε αυτά τα κύτταρα οστεοβλαστικού φαινότυπου ρυθμίζεται διαφορικά από άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGF-β_1, υποδηλώνοντας περεταίρω ότι πιθανώς να διαδραματίσουν έναν πολυσχιδή ρόλο σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαδικασίες του οστικού μεταβολισμού [10].

Ωστόσο ένα από τα ερωτήματα που παρέμενε προς διερεύνηση σχετικά με το ρόλο του συστήματος του IGF-1 στη βιολογία του οστεοσαρκώματος ήταν γιατί εκφράζονται διαφορετικές ισομορφές του IGF-1 για την παραγωγή του ίδιου βιοδραστικού μορίου, δηλαδή του ώριμου IGF-1. Για την περεταίρω διερεύνηση αυτού του ερωτήματος εξετάσαμε τις δράσεις του πεπτιδίου Ε (που αποτελεί προϊόν μετάφρασης της περιοχής Ε της ισομορφής IGF-1Ec) στα κύτταρα MG-63. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι το συνθετικό πεπτίδιο Ε επήγαγε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG-63 κατά παρόμοιο τρόπο με αυτόν του IGF-1 και της ινσουλίνης, υποδηλώνοντας ότι οι ισομορφές του IGF-1 ενδεχομένως να παράγουν και άλλα δραστικά μόρια πέρα από το ώριμο πεπτίδιο του IGF-1 τα οποία εμπλέκονται στη βιολογία του οστεοσαρκώματος.

Η βιολογική δράση του IGF-1 διαμεσολαβείται μέσω του IGF-1R, σε μικρότερο βαθμό μέσω του IR και ενδεχομένως μέσω των υβριδικών υποδοχέων IGF-1R/IR. Έτσι, στην παρούσα μελέτη προχωρήσαμε στην αναστολή της έκφρασης των υποδοχέων IGF-1R και IR. στα κύτταρα MG-63 (MG-63 IGF-1R KO και MG-63 IR KO), παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο επίσης το σχηματισμό του υβριδικού υποδοχέα IGF-1R/IR. Η αναστολή της έκφρασης των υποδοχέων IGF-1R και IR στα κύτταρα MG-63 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του διαμεσολαβούμενου από τον IGF-1R και τον IR πολλαπλασιασμού των κυττάρων MG-63 IGF-1R KO και MG-63 IR KO, αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά, είναι ενδιαφέρον ότι η εξωγενής χορήγηση του συνθετικού πεπτιδίου Ε επήγαγε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων IGF-1R KO and IR KO, υποδηλώνοντας ότι η μιτογόνος δράση του στα κύτταρα MG-63 πιθανώς να διαμεσολαβείται μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τους υποδοχείς IGF-1R, IR και IGF-1R/IR. Έτσι, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν περαιτέρω ότι οι ισομορφές του IGF-1 ενδεχομένως να παράγουν βιοδραστικά παράγωγα πέρα από τον ώριμο IGF-1. Ωστόσο, ο πειραματικός σχεδιασμός και τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δεν μας επιτρέπουν να επιβεβαιώσουμε την υπόθεσή μας ότι η περιοχή Ε της ισομορφής IGF-1Ec είναι βιολογικά σταθερή και παράγεται σε επαρκή ποσά από τα κύτταρα MG-63 ώστε να έχει ισχυρή μιτογόνο δράση σε αυτά. Παραμένει προς διερεύνηση εάν το πεπτίδιο Ec είναι βιολογικά σταθερότερο στη μορφή του προ-πεπτιδίου IGF-1Ec και εάν ενδεχομένως υφίσταται πρωτεολυτικό διαχωρισμό όταν πρόκειται να δράσει άμεσα στο στόχο του. Έτσι, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνίσουν τους παράγοντες που ρυθμίζουν τον διαχωρισμό και την έκκριση του πεπτιδίου Ec της ισομορφής IGF-1Ec καθώς και το μηχανισμό δράσης του στα κύτταρα του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος.

Correspondence
Michael Koutsilieris,
Department of Experimental Physiology, Medical School,
National & Kapodistrian University of Athens,
75 Micras Asias, PC 11527 Goudi-Athens, Greece
E-mail: mkoutsil@med.uoa.gr

Αλληλογραφία
Μιχάλης Κουτσιλιέρης,
Εργαστήριο Φυσιολογίας,
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών,
Μικράς Ασίας 75, ΤΚ 115 27, Γουδή-Αθήνα
E-mail: mkoutsil@med.uoa.gr

Βιβλιογραφία

1. Canalis E, McCarthy T and Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 1988; 81:277-281.
2. Burrow S, Andrulis IL, Pollak M and Bell RS. Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. J Surg Oncol 1998; 69: 21-27.
3. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L and Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. Endocr Rev

2009; 30:586-623.
4. Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S, Benjamin R, Eckhardt SG, Eid JE, Greig G, Habben K, McCarthy CD and Gore L. A phase I study of weekly r1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-i receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2010; 16:2458-2465.
5. Haluska P, Shaw HM, Batzel GN, Yin D, Molina JR, Molife LR, Yap TA, Roberts ML, Sharma A, Gualberto A, Adjei AA and de Bono JS. Phase I dose escalation study of the anti insulin-like growth factor-i receptor monoclonal antibody cp-751,871 in patients with refractory solid tumors. Clin Cancer Res 2007; 13:5834-5840.
6. Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, von Mehren M, Patnaik A, Padavic K, Hill M, Mays T, McCoy T, Fox NL, Halpern W, Corey A and Cohen RB. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J Clin Oncol 2007; 25:1390-1395.
7. Rowinsky EK, Youssoufian H, Tonra JR, Solomon P, Burtrum D and Ludwig DL. Imc-a12, a human igg1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. Clin Cancer Res 2007; 13:5549-5555.
8. Hill M and Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. J Physiol 2003; 549:409-418.
9. Li-ling T, Yuan-liang W and Cai-Xin S. The stress reaction and its molecular events:splicing variants. Biochem Biophy Res Comm 2004; 320(2):287-291.
10. Okazaki R, Durham SK, Riggs BL and Conver CA. Transforming growth factor and forskolin increase all classes of insulin-like growth factor-1 transcripts in normal and human osteoblast-like cells. Biochem Biophys Res Commun 1995; 207:963-970.
11. Bloor CA, Knight RA, Kedia, RK, Spiteri MA and Allen JT. Differential mRNA expression of insulin-like growth factor-1 splice variants in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(2):265-272.
12. Chew SL, Lavender P, Clark AJL and Ross RJM. An alternatively spliced human IGF-I transcript (IGF-IEc) with hepatic tissue expression that diverts away from the mitogenic IBE1 peptide. Endocrinology 1995; 136:1939-1944.
13. Sandberg-Nordqvist AC, Stahlbom PA and Reinecke M. Characterization of insulin-like growth factor-I in human primary brain tumors. Cancer Res 1993; 53:2475-2478.
14. Shavlakadze T, Rosenthal NA, Wynn N and Grounds MD. Reconciling data from transgenic mice that over-express IGF-1 specifically in skeletal muscle. Growth Horm IGF Res 2005; 15:4-18.
15. Cheema U, Brown R, Mudera V, Yang SY, McGrouther G and Goldspink G: Mechanical signals and IGF-I gene splicing *in vitro* in relation to development of skeletal muscle. J Cell Physiol 2005; 202(1):67-75.
16. Philippou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, Pissimissis N and Koutsilieris M. Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: Characterization of the MGF E peptide actions *in vitro*. In Vivo 2009; 23(4):567-575.
17. Stavropoulou A, Halapas A, Sourla A, Philippou A, Papageorgiou E, Papalois A and Koutsilieris M. IGF-1 expression in infarcted myocardium and MGF E peptide actions in rat cardiomyocytes *in vitro*. Mol Med 2009; 15(5-6):127-135.
18. Stavropoulou A, Philippou A, Halapas A, Sourla A, Pissimissis N, Koutsilieris M. uPA, uPAR and $TGF\beta_1$ Expression during Early and Late Post Myocardial Infarction Period in Rat Myocardium. In Vivo 2010; 24(5):647-652.
19. Milingos DS, Philippou A, Armakolas A, Papageorgiou E, Sourla A, Protopapas A, Liapi A, Antsaklis A, Mastrominas M and Koutsilieris M. Insulin-like growth factor-1Ec (MGF) expression in eutopic and ectopic endometrium: characterization of the MGF E peptide actions *in vitro*. Mol Med 2011; 17(1-2):21-28.
20. Armakolas A, Philippou A, Panteleakou Z, Nezos A, Sourla A, Petraki C, Koutsilieris M. Preferential expression of IGF-1Ec (MGF) transcript in cancerous tissues of human prostate: evidence for a novel and autonomous growth factor activity of MGF E peptide in human prostate cancer cells.

Prostate 2010; 70(11):1233-1242.
21. Koutsilieris M, Rabbani SA, Bennett HP and Goltzman D. Characteristics of prostate-derived growth factors for cells of the osteoblast phenotype. J Clin Invest 1987; 80:941-946.
22. Boulanger J, Reyes-Moreno C and Koutsilieris M. Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 human osteosarcoma cells. Int J Cancer 1995; 61(5):692-697.
23. Philippou A, Stavropoulou A, Sourla A, Pissimissis N, Halapas A, Maridaki M and Koutsilieris M. Characterization of a rabbit antihuman mechano growth factor (MGF) polyclonal antibody against the last 24 amino acids of the E domain. In Vivo 2008; 22:27-35.
24. Moschos MM, Armakolas A, Philippou A, Pissimissis N, Panteleakou Z, Nezos A, Kaparelou M and Koutsilieris M. Expression of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and type I IGF receptor mRNAs in human HLE-B3 lens epithelial cells. In Vivo 2011; 25(2):179-184.
25. Hingorani P and Kolb EA. Past, present and future of therapies in pediatric sarcomas. Future Oncol 2010; 6:605-618.
26. Osborne R. Commercial interest waxes for igf-1 blockers. Nat Biotechnol 2008; 26:719-720.
27. Kappel CC, Velez-Yanguas MC, Hirschfeld S and Helman LJ: Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor i for *in vitro* growth. Cancer Res 1994; 54:2803-2807.
28. Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M and Andrulis IL. Insulin-like growth factor 1 (igf-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. Cancer Res 1995; 55:129-134.
29. Kolb EA, Kamara D, Zhang W, Lin J, Hingorani P, Baker L, Houghton P and Gorlick R. R1507, a fully human monoclonal antibody targeting IGF-1R, is effective alone and in combination with rapamycin in inhibiting growth of osteosarcoma xenografts. Pediatr Blood Cancer 2010; 55(1):67-75.
30. Janeway KA and Grier HE. Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects. Lancet Oncol 2010; 11(7):670-678.
31. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M and Bacci G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: State of the art. Cancer Treat Rev 2006; 32:423-436.
32. Dong J, Demarest SJ, Sereno A, Tamraz S, Langley E, Doern A, Snipas T, Perron K, Joseph I, Glaser SM, Ho SN, Reff ME and Hariharan K. Combination of two insulin-like growth factor-I receptor inhibitory antibodies targeting distinct epitopes leads to an enhanced antitumor response. Mol Cancer Ther 2010; 9:2593-2604.
33. Kurmasheva RT, Dudkin L, Billups C, Debelenko LV, Morton CL and Houghton PJ. The insulin-like growth factor-1 receptor-targeting antibody, CP-751,871, suppresses tumor-derived VEGF and synergizes with rapamycin in models of childhood sarcoma.Cancer Res 2009; 69(19):7662-7671.
34. Dorfman HD and Czerniak B. Bone cancers. Cancer 1995; 75:203-210.
35. Levi N. Incidence of osteosarcoma, chondrosarcoma and Ewing's sarcoma in east Denmark: Reverse male to female ratio in osteosarcoma. Eur J Orthop Surg Traumatol 1998; 8:147-148.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι IKK-MAPK-IκB/ NF-κB ως στόχος μηχανικής διέγερσης οστεοβλαστικών κυττάρων

Γ. ΝΤΑΛΑΓΙΩΡΓΟΥ, Δ. ΚΑΡΑΤΖΑΣ, Χ. ΠΙΠΕΡΗ, Ε. ΜΠΑΣΔΡΑ, Α.Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Περίληψη

Η οστεοπόρωση αποτελεί την πιο συχνή μεταβολική νόσο των οστών με σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις και υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. Χαρακτηρίζεται από ελάπωση της οστικής μάζας, διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστού, μειωμένη αντοχή και αυξημένη συχνότητα καταγμάτων. Η οστική απώλεια οφείλεται σε υπερβολική δραστηριότητα των οστεοκλαστών (κύπαρα αποδόμησης του οστού) και μειωμένη δραστηριότητα των οστεοβλαστών (κύπαρα παραγωγής οστού). Η οστεοβλαστική δραστηριότητα μπορεί να προαχθεί με τη μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών. Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν ο σχεδιασμός ενός *in vitro* μοντέλου μηχανοδιέγερσης οστεοβλαστών για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην οστεοπόρωση. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι, με την εφαρμογή μηχανικής δύναμης για 6 και 12 ώρες στα προ-οστεοβλαστικά κύπαρα, ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB/cRel και η πρόσδεσή του στο κυπαρικό DNA. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι ο NF-κB πιθανό να ρυθμίζει την έκφραση οστεοειδικών γονιδίων (όπως ο *Runx2*) έπειτα από μηχανική διέγερση. Η εμπλοκή του φλεγμονώδους παράγοντα NF-κB στη ρύθμιση της έκφρασης οστεοειδικών γονιδίων και ο μοριακός μηχανισμός αυτής της επίδρασης ανοίγουν νέες προοπτικές για την κατανόηση του φαινομένου της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης –και, συνεπώς, της οστικής αναδόμησης- μετά από φυσικά ερεθίσματα, όπως αυτό του μηχανικού στρες, η δυσλειτουργία του οποίου ευθύνεται για πολλές οστικές παθοφυσιολογίες.

Λέξεις κλειδιά: Κύπαρα περιοδοντικού συνδέσμου (PDL cells), Μηχανική διέγερση, NF-κB, Runx2

The signalling pathway IKK-MAPK-IκB/NF-κB as a target of mechanical loading in osteoblast-like cells

G. DALAGIORGOU, D. KARATZAS, C. PIPERI, E. BASDRA, A.G. PAPAVASSILIOU
Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens

Summary

Osteoporosis is the most common metabolic bone disease with severe social and economic implications and high rates of morbidity and mortality. It is characterized by reduction of the bone mass, disruption of bone microarchitecture, decreased tolerance and increased fracture frequency. Bone loss is due to excessive activity of osteoclasts (bone reduction cells) and reduced activity of osteoblasts (bone production cells). Osteoblastic activity can be promoted by osteoblast mechanical stimulation. The aim of this study was to design an *in vitro* osteoblast mechanotransduction model in order to investigate the molecular mechanisms implicated in osteoporosis. The findings indicate that, under the application of mechanical force for 6 and 12 hours in pro-osteoblastic cells, the activation of transcriptional factor NF-κB/cRel and its binding to cellular DNA become apparent, indicating that NF-κB is possible to regulate the expression of osteospecific genes (such as *Runx2*) after mechanical stimulation. The involvement of the inflammatory factor NF-κB in the regulation of osteospecific genes' expression and the molecular mechanism underlying this relationship opens new perspectives for understanding the physiology of osteoblastic differentiation and, consequently, of bone reconstruction after physical stimulation such as mechanical stress, the dysfunction of which is responsible for a number of bone pathologies.

Keywords: PerioDontal Ligament cells (PDL cells), Mechanotransduction, NF-κB, Runx2

Εισαγωγή

Τα οστά σχηματίζονται από τον οστίτη ιστό, ένα εξειδικευμένο συνδετικό ιστό, που αποτελείται από ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία, την οστική μητρική ή θεμέλια ουσία, και πέντε διαφορετικά είδη κυττάρων. Αυτά περιλαμβάνουν τα οστεοπρογονικά κύτταρα, τους οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα, τους οστεοκλάστες και τα επενδυτικά οστικά κύτταρα (lining cells) ή οστεοβλάστες εν ηρεμία ή επιφανείας. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα αποτελούν πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα (stem cells) κι εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες.

Οι οστεοβλάστες, οι οποίοι εντοπίζονται στις οστικές επιφάνειες, είναι τα αρμόδια κύτταρα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών της μητρικής ουσίας και την ασβεστοποίησή της [1]. Τα οστεοκύτταρα, τα πιο πολυάριθμα κύτταρα του οστίτη ιστού βρίσκονται σε κοιλότητες (lacunae) μέσα στην ασβεστοποιημένη μητρική ουσία, ενώ επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω οστικών σωληναρίων, χασματοσυνδέσεων, καθώς και με τις αποφυάδες που διαθέτουν. Τα οστεοκύτταρα είναι ανενεργοί οστεοβλάστες που έχουν παγιδευτεί στη θεμέλια ουσία. Οι οστεοκλάστες προέρχονται από προγονικά κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού, ενώ διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε πολυπύρηνα γιγαντοκύτταρα, εντοπισμένα στα βοθρία οστικής απορρόφησης (βοθρία του Howship) με λειτουργικό ρόλο την απορρόφηση του οστού, εκκρίνοντας ιόντα υδρογόνου, τα οποία διαλύουν τους κρυστάλλους καθώς και υδρολυτικά ένζυμα τα οποία πέπτουν τον οστίτη ιστό [1].

Τα πιο ενεργά κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες, υπεύθυνοι για την παραγωγή και την απορρόφηση του οστού, αντίστοιχα. Ο απώτερος πρόγονος του οστεοβλάστη είναι το πολυδύναμο, αρχέγονο μεσεγχυματικό κύτταρο (stem cell), που εκτός από τη μεγάλη αναγεννητική του ικανότητα, μπορεί εν δυνάμει να διαφοροποιηθεί προς την κατεύθυνση άλλων κυτταρικών σειρών. Το πρώτο στάδιο στη διαφοροποίηση του αρχέγονου μεσεγχυματικού κυττάρου προς τη σειρά των οστεοπαραγωγών κυττάρων είναι το επαγώγιμο οστεοπρογονικό κύτταρο (osteoprogenitor), δηλαδή το κύτταρο που δεν έχει ακόμα λάβει το τελικό καθοριστικό μήνυμα διαφοροποίησης του προς οστεοβλάστη, αλλά που υπό κατάλληλες συνθήκες, όπως κατά την επαφή του με μη τιτανωμένο οστό, θα ακολουθήσει αυτή την οδό διαφοροποίησης.

Η ύπαρξη τέτοιων επαγώγιμων οστεοπρογονικών κυττάρων πιστεύεται ότι εξηγεί την έκτοπη παραγωγή οστίτη ιστού σε εξωσκελετικούς ιστούς. Το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης είναι ο προ-οστεοβλάστης, ο οποίος είναι προκαθορισμένος να εξελιχθεί σε οστεοβλάστη. Οι προ-οστεοβλάστες έχουν ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης, η οποία όμως μειώνεται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω. Οι οστεοβλάστες δεν έχουν δυνατότητα διαίρεσης. Μικρό ποσοστό οστεοβλαστών εγκλωβίζεται σε τιτανωμένη μητρική ουσία και μετατρέπεται σε οστεοκύτταρα. Θεωρείται πως πολλοί οστεοβλάστες παραμένουν ανενεργοί στις οστικές επιφάνειες ως επενδυτικά κύτταρα [2].

Σε γενετικό επίπεδο, η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών είναι μια διαδικασία που γίνεται βαθμιαία [3]. Κατά τον κύκλο της ζωής του, ο οστεοβλάστης εκφράζει όλα τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή οστίτη ιστού, αλλά όχι ταυτόχρονα. Αρχικά, εκφράζονται γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*Runx2, Osterix*), καθώς και γονίδια που αφορούν στη σύνθεση πρωτεϊνών της μητρικής ουσίας (κολλαγόνο και μη κολλαγόνες πρωτεΐνες). Ακολουθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζεται με την ωρίμανση του οστεοειδούς και, τέλος, εκφράζονται γονίδια υπεύθυνα για την τιτάνωση (π.χ. οστεοκαλσίνη, σιαλοπρωτεΐνη οστού, αλκαλική φωσφατάση και οστεοποντίνη).

Στην κατεύθυνση αυτή, τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (PerioDontal Ligament cells, PDL cells) αποτελούν κύτταρα τύπου οστεοβλάστη (πρόδρομοι οστεοβλάστες) που είναι ικανοί να διαφοροποιηθούν πλήρως σε απόκριση ποικίλων εξωκυττάριων ερεθισμάτων και τα οποία μπορούν να συνθέτουν φατνιακό οστό για τη σκελετική υποστήριξη του δοντιού. Τα PDL κύτταρα συνιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην έρευνα των οστών λόγω του οστεοβλαστικού τους χαρακτήρα, αλλά και λόγω της σχετικά εύκολης εξαγωγής και απομόνωσής τους από την οδοντική ρίζα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αποκρίνονται στην άσκηση μηχανικών δυνάμεων διαμέσου κυτταρικών γεγονότων όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο καταβολισμός και η σύνθεση της θεμέλιας ουσίας. Όλες αυτές οι διαδικασίες ελέγχονται από τους προαναφερθέντες παράγοντες [4-7].

Ένας κομβικός ρυθμιστής της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Runx2, ο οποίος προσδένεται στις περιοχές των υποκινητών όλων των σημαντικών οστεοβλαστοειδικών γονιδίων (*οστεοκαλσίνης, κολλαγόνου τύπου Ι α3, σιαλοπρωτεΐνης οστού, αλκαλικής φωσφατάσης, οστεο-*

ποντίνης και κολλαγενάσης III), ελέγχοντας την έκφρασή τους [8-10]. Έχει επίσης καταδειχθεί από μελέτες της ομάδας μας ότι χαμηλής έντασης μηχανική διάταση σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα (PDL) οδηγεί σε απευθείας αύξηση της έκφρασης και της προσδετικής στο DNA ικανότητας του *Runx2* [11]. Η ιδιότητα του μεταγραφικού παράγοντα Runx2 να αποτελεί μόριο κεντρικής σημασίας στην μηχανοεπαγωγική διαδικασία, προάγει την αντίληψη πως η εμβιομηχανική παρέμβαση θα μπορούσε να βοηθήσει στην ενδυνάμωση των οστών σε οστεοεκφυλιστικές ασθένειες, χωρίς τη δημιουργία παρενεργειών σχετιζόμενων με φαρμακολογικές αγωγές.

Ο Runx2 αποτελεί ένα θεμελιώδη οστεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα. Είναι επίσης σημαντικός κατά την δημιουργία του υπερτροφικού χόνδρου, ο οποίος αποτελεί υπόστρωμα για τη δημιουργία του οστεοβλαστικού οστού. Η έκφρασή του είναι απαραίτητη και επαρκής για την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλαστικά κύτταρα. Ο Runx2 αποτελεί μέλος της οικογένειας runx, η οποία συνιστά τρία γονίδια, *runx1, runx2 και runx3* (*cbfa2, pebp2aB, AML1-3*, αντίστοιχα). Και τα τρία αυτά γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που περιέχουν μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA και δημιουργούν ετεροδιμερή με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή πυρηνικό παράγοντα πρόσδεσης b (Core-binding factor b, Cbfb), επίσης γνωστό και σαν ενισχυτή του πολυώματος-πρωτεΐνη πρόσδεσης 2b (polyomavirus enhancer binding protein 2b, Pebp2b). Ο Cbfb δεν προσδένεται απευθείας στο DNA, αλλά προάγει αλλοστερικά την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών Runx στο DNA και αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής τους προσφέροντας σταθερότητα ενάντια στην πρωτεολυτική διάσπασή τους από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος [12].

Ο Runx2 ανακαλύφθηκε ερευνώντας οστεοειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση της οστεοκαλσίνης, του μόνου γονιδίου που εκφράζεται αποκλειστικά στους οστεοβλάστες και σε κανέναν άλλο τύπο κυττάρου που παράγει εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ο Runx2 δρα ως βασικός ρυθμιστής, ο οποίος προσδένεται στο οστεοβλαστοειδικό cis-στοιχείο 2 (osteoblast specific element 2, OSE2) που βρίσκεται στον υποκινητή όλων των γονιδίων που σχετίζονται με τον οστεοβλάστη. Εκφράζεται πολύ νωρίς κατά την σκελετική ανάπτυξη, εμφανιζόμενος πρωταρχικά στα αναπτυσσόμενα μεσεγχυματικά κύτταρα των περιοχών που προσδιορίζονται να δημιουργήσουν οστό και συνεχίζει κατά την μετ-εμβρυική ζωή, κατά τη διάρκεια των σταδίων της οστικής δημιουργίας [12].

Η σημαντικότητα του μεταγραφικού παράγοντα Runx2 στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και ωρίμανση, μελετήθηκε και κατά την άσκηση μηχανικής δύναμης σε προγονικά οστεοβλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, μηχανική διάταση σε ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα (PDL) οδηγεί σε απευθείας αύξηση της έκφρασης και της προσδετικής στο DNA ικανότητας του Runx2. Η επαγωγή αυτή ξεκινά από την κυτταρική μεμβράνη μέσω των ιντεγκρινών, οι οποίες αποτελούν τις πρωτεΐνες έναρξης του σήματος, το οποίο διαπερνά το κυτταρόπλασμα μέσω των μονοπατιών των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούν το μιτογόνο (Mitogen-activated protein kinases MAPKs). Συγκεκριμένα η κινάση ρύθμισης των εξωκυττάριων σημάτων (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) ενεργοποιείται με τρόπο χρονικά εξαρτώμενο και παράλληλο με την αύξηση της προσδετικής στο DNA ικανότητας του Runx2. Η φωσφορυλιωμένη πλέον ERK1/2 ενεργοποιεί τον παράγοντα Runx2 στον πυρήνα, ο οποίος επάγει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση [11].

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor-κB) που σχετίζεται με τη διαδικασία της φλεγμονής, φαίνεται να επάγεται κατά τη διάρκεια της ανακατασκευής του οστού και να προωθεί το σχηματισμό των οστεοκλαστών (μέσω του μονοπατιού RANK-RANKL), διεγείροντας όλες τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, αλλά, πιθανά, και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση μετά από την επίδραση μηχανικής διέγερσης. Κατά γενική ομολογία, ο NF-κB συμμετέχει στη ρύθμιση γονιδίων που έχουν κυρίως στόχο την ανοσοδιέγερση [13]. Διάφοροι παράγοντες όπως κυτταροκίνες, λιποπολυσακχαρίτες (LPS), υπεριώδης ακτινοβολία (Ultraviolet, U.V.), αυξητικοί παράγοντες, ιοί, μηχανικό στρες κ.ά., μπορούν να αποτελέσουν σήματα για την ενεργοποίηση του NF-κB [14].

Ο NF-κB δεν είναι μία μοναδική πρωτεΐνη. Στον άνθρωπο 5 μέλη της οικογένειας των NF-κB/Rel πρωτεϊνών έχουν ταυτοποιηθεί. Αυτές είναι οι εξής: c-Rel, NF-κB1 (p50/p105), NF-κB (p52/p100), RelA (p65) και η RelB [14]. Είναι γνωστό, ότι ο NF-κB δεν παράγεται κατά τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης ή κάποιου βαθμού ενεργοποίησης του κυττάρου, αλλά προϋπάρχει στο κυτταρόπλασμα ανενεργός. Υπό κανονικές συνθήκες, τα διμερή του NF-κB εντοπίζονται καθηλωμένα στο κυτταρόπλασμα με την δράση των

ανασταλτικών πρωτεϊνών ΙκΒ (ΙκΒα, ΙκΒβ και ΙκΒε).

Μετά την επίδραση κάποιου ερεθίσματος, οι αναστολείς αυτοί φωσφορυλιώνονται και οδηγούνται σε πρωτεολυτική αποδόμηση – η διαδικασία εξαρτάται από το σύμπλοκο των ΙκΒ κινασών (ΙΚΚ) και το μονοπάτι ουβικιτίνης/πρωτεασώματος. Η απομάκρυνση των αναστολέων μέσω της ουβικιτινυλίωσης οδηγεί στην ενεργοποίηση και μετατόπιση των διμερών του NF-κΒ στον πυρήνα, όπου αναγνωρίζουν θέσεις δέσμευσης πάνω στην αλληλουχία του DNA (κΒ sites) και επάγουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων που ρυθμίζουν την σύμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία, τη φλεγμονή, την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων [15-17].

Μέχρι στιγμής υπάρχουν ενδείξεις ότι ο NF-κΒ ενεργοποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα του οστεοβλαστικού κυττάρου μετά από μηχανικό ερέθισμα [18,19]. Κατ' επέκταση, υπάρχουν ισχυρές πιθανότητες να επάγει και την έκφραση του οστεοειδικού γονιδίου runx2.

Ο στόχος του ερευνητικού αυτού έργου περιλαμβάνει την διερεύνηση και ταυτοποίηση των πιθανών θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον υποκινητή του οστεοειδικού γονιδίου *runx2* έπειτα από μηχανική διέγερση. Τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτή την ερευνητική εργασία, σκοπό έχουν να βοηθήσουν στην αποκωδικοποίηση της λειτουργίας και ρύθμισης της οστικής ανακατασκευής και να θέσουν νέα δεδομένα στη θεραπευτική στρατηγική πολλών οστεοεκφυλιστκών ασθενειών.

Υλικά και μέθοδοι

Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου (PDL)

Τα PDL κύτταρα απομονώθηκαν από ιστούς του περιοδοντικού συνδέσμου οι οποίοι εξήχθησαν από τη ρίζα υγειών δοντιών από δότες ηλικίας μεταξύ 20 και 30 χρονών για λόγους ορθοδοντικής θεραπείας.

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με απόξεση των υπολειμμάτων του περιοδοντικού ιστού και τοποθέτηση τους σε τρυβλία με την προσθήκη 5 ml θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle στο οποίο προστέθηκε ορός FBS (10%), μη βασικά αμινοξέα και αντιβιοτικά (1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Τα ανθρώπινα κύτταρα συνεχίστηκε να καλλιεργούνται στο ίδιο θρεπτικό υλικό και μετά την πάροδο περίπου δυο εβδομάδων και ενδιάμεσες αλλαγές σε θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκε ανάπτυξη ινοβλαστών περιοδοντικής μεμβράνης (PDL) στις περιφέρειες των υπολειμμάτων του περιοδοντικού ιστού. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε και κύτταρα μεταξύ του 5ου και 8ου σταδίου ζωής χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της μηχανικής διέγερσης. Οι καλλιέργειες συντηρούνταν στους 37°C σε υγρή ατμόσφαιρα με 5%CO_2.

Εφαρμογή μηχανικής δύναμης στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου

Τα PDL καλλιεργήθηκαν σε ειδικά καλλιεργητικά τριβλία Lumox Dish σε αναλογία 1:4. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα μεταξύ του 5 και του 8 σταδίου ζωής (passage) αφού είχε πρώτα επιβεβαιωθεί ο οστεοβλαστικός τους χαρακτήρας. Μετά από 24 ώρες οι καλλιέργειες των hPDL κυττάρων υπέστησαν μια διαρκή τάση (stretching) με τη χρήση εδικής συσκευής. Η βάση των ειδικών αυτών τριβλίων αποτελείται από μια ελαστική, υδρόφιλη και διαπερατή από αέρια μεμβράνη πολυτετραφθοροαιθυλενίου, η οποία μπορεί να υποστεί ομοιόμορφη τάση όταν τοποθετείται επάνω σε μια σφαιροειδή κυρτή επιφάνεια από πλεξιγκλάς [20-23]. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για τέσσερις διαφορετικές χρονικές περιόδους των 6, 12, 24 και 48 ωρών. Ταυτόχρονα επωάστηκαν καλλιέργειες με κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν τάση (unstretched) σαν μάρτυρες (control).

Χρώση με αλκαλική φωσφατάση στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου και με τη μέθοδο Von Kossa ως ένδειξη επιμετάλλωσης

Η χρώση με αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση του οστεοβλαστικού χαρακτήρα των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου. Η χρώση επιτεύχθηκε με το kit ανίχνευσης της Αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase Detection Kit-Millipore). Προκειμένου να ανιχνεύσουμε τις αποτιτανώσεις που δημιουργούν τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο Von Kossa.

Απομόνωση κυτοσολικού περιεχομένου

Η απομόνωση του κυτοσολικού και πυρηνικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Schreiber [24,25]. Για τον υπολογισμό της ποσότητας του κυτοσολικού και πυρηνικού περιεχομένου των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου χρησιμοποιήθηκε η υπολογιστική μέθοδος Bradford.

Αναγνώριση των θέσεων πρόσδεσης του NF-κΒ στον υποκινητή του γονιδίου Runx2

Η ύπαρξη των θέσεων πρόσδεσης του NF-κΒ έχει διερευνηθεί με τη χρήση του αναλυτικού λογισμικού Genomatix-sequence analysis software (Genomatix Software GmbH 1998-2008) το οποίο βρίσκεται διαθέσιμο στο διαδίκτυο (http://www.genomatix.de/products/index.html).

Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως διερευνητές είναι οι εξής:

Η αλληλουχία του NF-κΒ/c-Rel (wild-type), 5'-gagcaagg**gggaaaagccaca**gtggtaggc-3' (κορυφαίος κλώνος), η οποία προέρχεται από την περιοχή -131 έως -119 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου *runx2* και περιέχει το μοτίβο gggaaaagccaca του NF-κΒ/c-Rel.

Η αλληλουχία που περιέχει το δεύτερο NF-κΒ/c-Rel μοτίβο 5-tggatgcc**aggaaaggcctta**ccacaagcc-3 (-189...-177) και η τρίτη νουκλεοτιδική αλληλουχία που περιέχει το τρίτο NF-κΒ/c-Rel μοτίβο 5-gagtagaa**aggaaagcccta**actgcagag-3 (-324...-312) ανάμεσα στην αλληλουχία του υποκινητή του *Runx2* γονιδίου.

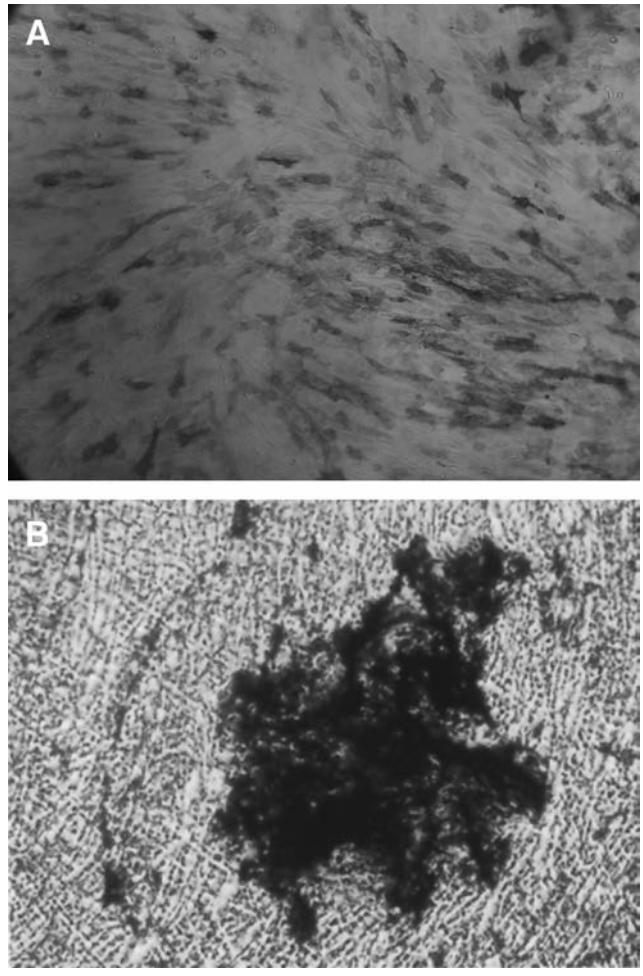
Επιβεβαίωση της πυρηνικής μετατόπισης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ/c-Rel

Η επιβεβαίωση της πυρηνικής μετατόπισης του μεταγραφικού παράγοντα πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ανοσοστυπώματος κατά Western [26]. Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με την SDS-PAGE ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά αυτών (transfer) από το πήγμα διαχωρισμού σε μεμβράνη απλής νιτρικής κυτταρίνης. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα c-Rel/NFkB ήταν το c-Rel sc-71 και η αραίωση ήταν 1/200. Το ειδικό αντίσωμα για την ανίχνευση της ακτίνης ήταν το sc-6895, goat anti-mouse monoclonal, σε αραίωση 1/200.

Ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης του NF-κΒ στον υποκινητή του γονιδίου runx2

Η προσδετική ικανότητα του NF-κΒ υπολογίστηκε με ανάλυση της μετατόπισης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας χρησιμοποιώντας την παρακάτω μέθοδο Electrophoretic Mobility Shift Assay Kit, EMSA, PIERCE Biotechnology.

Επίσης, σημάναμε με βιοτίνη στο 3' άκρο το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί στη θέση δέσμευσης του υπό μελέτη μεταγραφικού παράγοντα (π.χ. NF-κΒ) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, Biotin 3' End DNA Labeling Kit, PIERCE Biotechnology.



Εικ. 1. Α. Χρώση των PDL κυττάρων με ALP. **Β.** Χρώση Von Kossa σε κύτταρα PDL μετά από 3 εβδομάδες καλλιέργειας.

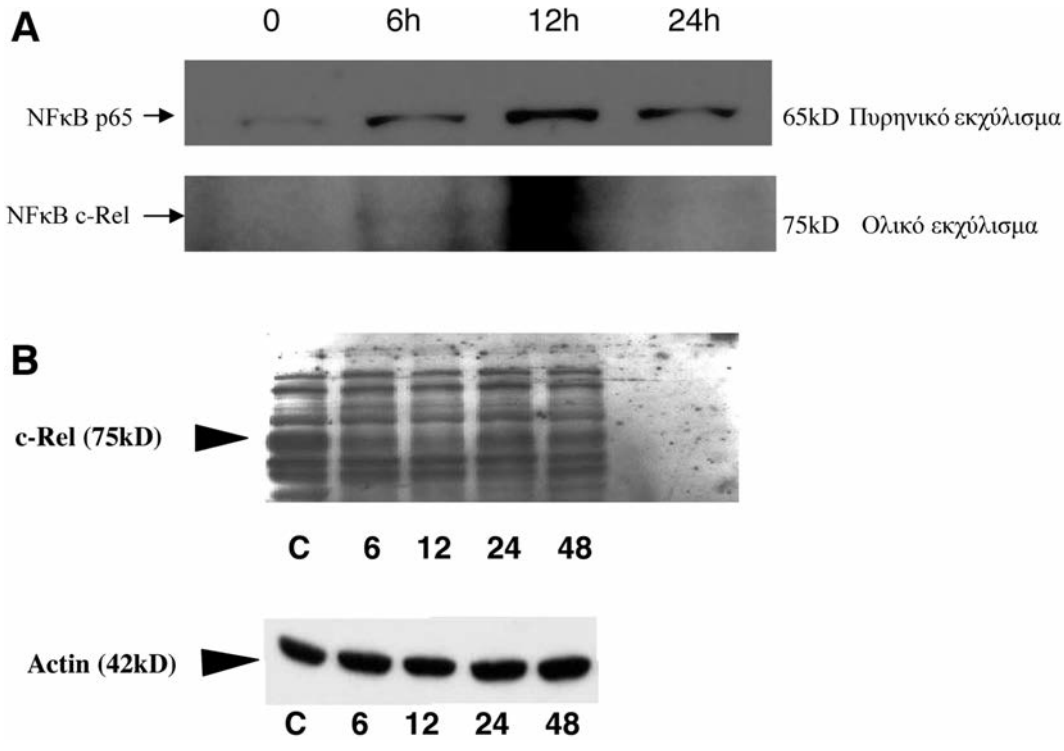
Ποσοτικοποίηση και εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Η ποσοτικοποίηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Adobe Photoshop CS2.

Αποτελέσματα

Επιβεβαίωση οστεοβλαστικού χαρακτήρα των κυττάρων με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και επιβεβαίωση του φαινομένου της επιμετάλλωσης (mineralization)

Το οστεογενετικό δυναμικό των συγκεκριμένων κυττάρων χαρακτηρίζεται και από τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης. Στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφα-



Εικ. 2. Α. Ανοσοαποτύπωση της μηχανικής διέγερσης των κυπάρων του περιοδοντικού συνδέσμου για 6, 12 και 24 ώρες. **Β.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης NFκB/c-Rel σε δείγματα κυπάρων μαρτύρων (unstretched) και κυπάρων που έχουν υποστεί μηχανική διέγερση για 6, 12, 24 και 48 ώρες. **Β.**Έκφραση της πρωτεΐνης ακτίνης στα ίδια δείγματα.

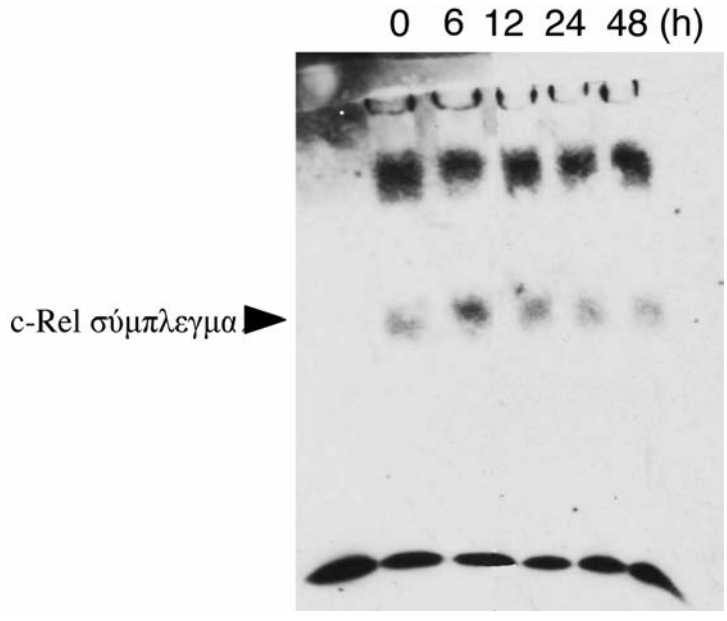
τάσης εντοπίστηκε έπειτα από 5 ημέρες καλλιέργειας. Στην παρακάτω εικόνα εμφανίζεται η ισχυρή χρώση της αλκαλικής φωσφατάσης με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε. Παρατηρείται χρώση σε ποσοστό κυττάρων άνω του 85% (Εικόνα 1Α).

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, είναι και η ικανότητά τους να δημιουργούν οζίδια επιμετάλλωσης (mineralization nodules). Στα συγκεκριμένα κύτταρα της μελέτης μας εμφανίστηκαν περιοχές εναπόθεσης μετάλλων έπειτα από καλλιέργεια 3 εβδομάδων. Μετά την ακόλουθη χρώση με Von Kossa, αυτές οι εναποθέσεις μετάλλων ήταν ορατές σαν άμορφα καφέ-μαύρα ιζήματα (Εικόνα 1Β). Τα ιζήματα αυτά διακρίνονταν σε περιοχές με μεγάλη συγκέντρωση κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western της πρωτεΐνης NF-κB/c-Rel

Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB διερευνήθηκε με τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης, ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Με τον ίδιο τρόπο, ανιχνεύτηκε και η έκφραση της πρωτεΐνης ακτίνης στα πειραματικά δείγματα, η οποία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα ευρήματα. Στις Εικόνες 2Α και 2Β παρουσιάζονται οι ζώνες αμαύρωσης που εμφανίστηκαν στο φωτογραφικό film κατά την ECL, οι οποίες αντιστοιχούν στον c-Rel, αφού η προκείμενη μεμβράνη είχε επωασθεί με αντίσωμα ειδικό για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Στην Εικόνα 2Α παρουσιάζεται η επαγωγή του διμερούς συμπλόκου cRel/p65 σε PDL κύτταρα που έχουν υποστεί τάση. Η ανάλυση των πυρηνικών και κυτταρικών εκχυλισμάτων έδειξε μια αύξηση στην έκφραση των επιπέδων της p65, σε συμφωνία με τη διάρκεια της εφαρμογής του μηχανικού ερεθίσματος. Παρατηρήθηκε επίσης, αύξηση των επιπέδων του c-Rel στις 6 και στις 12 ώρες σε μηχανικής διέγερσης σε ολικά εκχυλίσματα. Στις 24 ώρες η ζώνη του c-Rel φθάνει στα μικρότερα επίπεδα ανίχνευσης της ανοσοανάλυσης. Ταυτόχρονα εξετάστηκε και η ενεργοποίηση του c-Rel έπειτα από μηχανική διέγερση σε



Εικ. 3. Η εφαρμογή μηχανικής τάσης στα hPDL κύπαρα επάγει την προσδετική ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα c-Rel (υπομονάδα του NF-κB) στο DNA. Η μηχανική τάση εφαρμόστηκε στα PDL κύπαρα στις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Απομονώθηκαν τα πυρηνικά εκχυλίσματα, από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες (10 μg) στις οποίες αναλύθηκε η προσδετική στο DNA δραστηριότητα του NF-κB/c-rel με την τεχνική της EMSA, χρησιμοποιώντας μια βιοτινιλυομένη αλληλουχία που περιέχει την ανθρώπινη c-rel αλληλουχία ως ανιχνευτή. Η στήλη 0 αναφέρεται σε κύπαρα που δεν έχουν υποστεί τάση αλλά έχουν καλλιεργηθεί υπό τις ίδιες συνθήκες με τα κύπαρα που έχουν υποστεί τάση για το μέγιστο της εφαρμογής (48 ώρες).

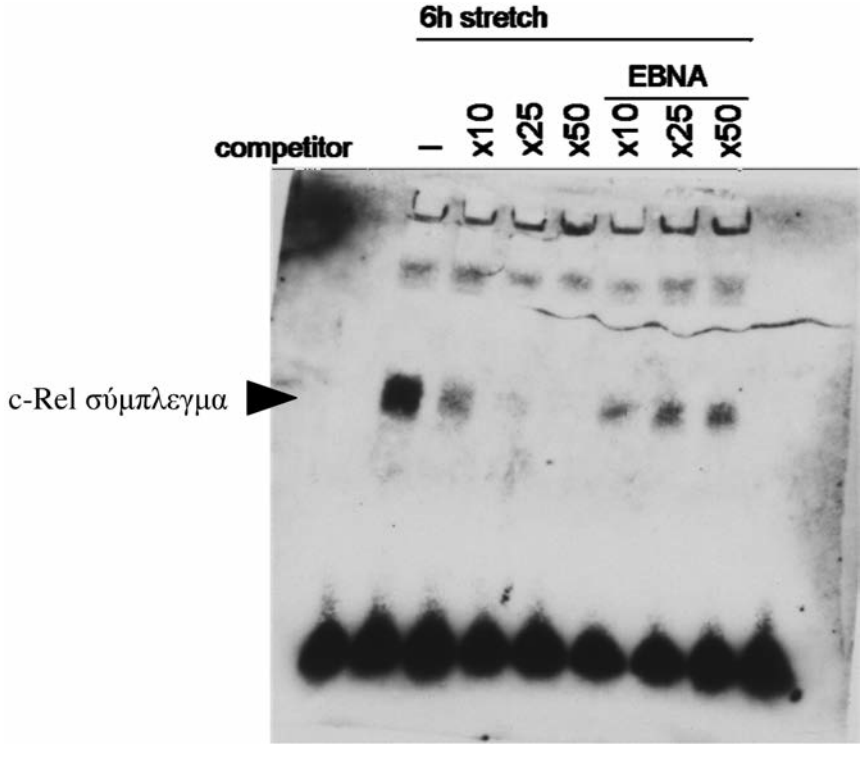
κυτταροπλασματικό εκχύλισμα των PDL κυττάρων σαν επιβεβαίωση του παραπάνω πειράματος (Εικόνα 2Β).

Με την εφαρμογή μηχανικής δύναμης γίνεται εμφανής η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB/cRel και η μετατόπισή του στον πυρήνα. Στην εικόνα φαίνεται η μείωση στην ποσότητα της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης c-Rel (75kD) 6 και 12 ώρες εφαρμογής μηχανικής τάσης με την τεχνική Western blot. Το αποτέλεσμα ενισχύει την πιθανότητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στον πυρήνα, γεγονός που επιβεβαιώνεται στα επόμενα αποτελέσματα.

Μέθοδος μετατόπισης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας της πρωτεΐνης NF-κB/c-Rel

Στην Εικόνα 3, ανθρώπινα κύπαρα περιοδοντικού συνδέσμου διεγέρθηκαν μηχανικά για 6, 12, 24, 48 ώρες. Κύπαρα που δεν υπέστησαν μηχανική διέγερση χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες της ενεργοποίησης του NF-κB. Η ένταση των επαρμάτων στο φιλμ της αυτοραδιογραφίας υπολογίστηκε με ειδικό πρόγραμμα ποσοτικοποίησης για τη σύγκριση της επαγωγής μεταξύ των διαφορετικών τρόπων διέγερσης. Η πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα c-Rel επιβεβαιώνεται και κατά την απομόνωση κυτοπλασματικών πρωτεϊνών, στις οποίες φαίνεται το αντίστροφο αποτέλεσμα με την δοκιμασία αλλαγής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας.

Η σύγκριση αυτή έδειξε ότι η άσκηση μηχανικής δύναμης ενεργοποιεί τη μετανάστευση του NF-κB από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και την επακόλουθη δέσμευσή του στην αλληλουχία του DNA που αναγνωρίζει. Η ενεργοποίηση του NF-κB έπειτα από μηχανική διέγερση 6 ωρών είναι περίπου 65% μεγαλύτερη από την απουσία μηχανικής διέγερσης. Μετά το πέρας των 6 ωρών, η επαγωγή του NF-κB επανέρχεται σταδιακά στα επίπεδα των μαρτύρων. Η ειδικότητα της δέσμευσης του NF-κB στην αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει μελετήθηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί. Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ανταγωνιστική αντίδραση με μη σημασμένο και μη ειδικό ανιχνευτή. Τα αποτελέσματα



Εικ. 4. Πείραμα ανταγωνιστικής δραστηριότητας με την παρουσία 10, 25 και 50 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση μη σημασμένου c-Rel ανιχνευτή (στήλες 3-5) και πυρηνικά εκχυλίσματα από hPDL κύπαρα που έχουν υποστεί τάση για 48 ώρες. Στις στήλες 6-8 έχει χρησιμοποιηθεί μη σημασμένος ανιχνευτής της πρωτεΐνης EBNA με 10, 25 και 50 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση καθώς και πυρηνικά εκχυλίσματα hPDL κυπάρων που έχουν υποστεί τάση για 48 ώρες. Η στήλη 1 και 9 περιέχουν ελεύθερο DNA ανιχνευτή.

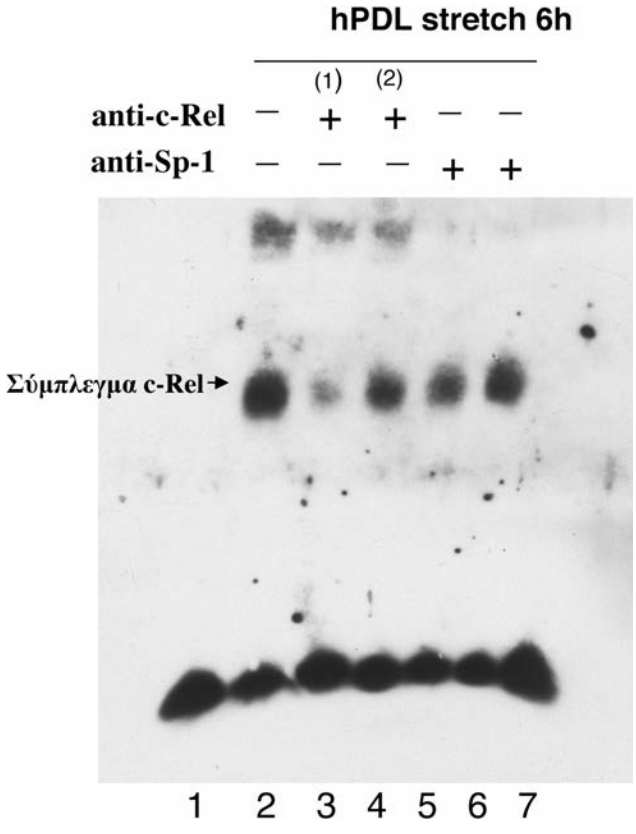
φαίνονται στην Εικόνα 4. Τέλος, στην Εικόνα 5 φαίνεται το πείραμα υπερμετατόπισης (supershift) της EMSA που πραγματοποιήθηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα hPDL κυττάρων που έχουν υποστεί τάση για 6 ώρες και στα οποία έχει προστεθεί αντι-c-Rel και αντι-Sp1 αντίσωμα (στήλες 2-6).

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε ευρήματα σύμφωνα με τα οποία ο βασικός ρυθμιστής της διαδικασίας της φλεγμονής, ο NF-κB, αποτελεί μόριο κλειδί της μηχανικής διέγερσης σε hPDL-οστεοβλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι διαρκώς εκτεθειμένα σε μηχανικές πιέσεις στο φυσικό τους περιβάλλον και μπορούν να διαφοροποιηθούν, με σκοπό να συμμετάσχουν ενεργά στην αποκατάσταση του περιοδοντικού συνδέσμου (PDL) και την ανάπλαση του περιβάλλοντος οστού. Δείξαμε ότι από ένα φυσικό σήμα όπως η άσκηση μηχανικής διέγερσης, παρατηρείται μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα που συνοδεύεται και από αύξηση της ικανότητας πρόσδεσής του στο DNA-στόχο του (τον υποκινητή του γονιδίου *Runx2*). Τα πειράματα μας επιβεβαίωσαν καταρχήν την πυρηνική αυτή μετατόπιση του NF-κB έπειτα από μηχανική διέγερση αλλά επιπλέον και τη χρονική σύμπτωση της επαγωγής του παράγοντα αυτού με τον Runx2. Πράγματι ο NF-κB αλλά και ο Runx2 επάγονται στις 6 ώρες της άσκησης μηχανικής δύναμης, και στη συνέχεια επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα των μαρτύρων.

Η επαγωγή αυτή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μετά από μηχανική διέγερση επιβάλλει τη διερεύνηση του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε αυτή η επαγωγή. Ωστόσο η ενεργοποίηση του NF-κB έπειτα από μηχανική διέγερση δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς και άρα το ποσοστό επιρροής των κινασών και των μεμβρανικών καναλιών είναι άγνωστο μέχρι στιγμής.

Η οστεοπόρωση, η πιο κοινή ασθένεια των οστών



Εικ. 5. Υπερμετατόπιση (supershift) της EMSA που πραγματοποιήθηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα hPDL κυπάρων που έχουν υποστεί τάση για 6 ώρες και στα οποία έχει προστεθεί αντι-c-Rel και αντι-Sp1 αντίσωμα (στήλες 2-6). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος-ανιχνευτή (στήλη 3, 5) προέρχεται από την επώαση του πυρηνικού εκχυλίσματος και του αντισώματος c-Rel (1) και Sp-1 αντίστοιχα και την έπειτα προσθήκη του ανιχνευτή ενώ στις στήλες 4 και 6 έχει επωαστεί πρώτα το σύμπλοκο πυρηνικού εκχυλίσματος-ανιχνευτή και έπειτα προστέθηκε το αντίσωμα c-Rel (2) και Sp-1.

έχει σαν αποτέλεσμα την παρέκκλιση της μηχανομεταγωγής μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών και η κλινική εικόνα περιλαμβάνει μείωση της οστικής πυκνότητας, λέπτυνση του οστικού ιστού και αυξημένη ευαισθησία στα κατάγματα. Ανάλογη οστική απώλεια είναι δυνατό να προκαλείται από μείωση μηχανικού φορτίου λόγω παρατεταμένης ανάπαυσης ή λόγω έκθεσης σε μικροβαρύτητα. Σήμερα, η φαρμακολογική θεραπεία της οστεοπόρωσης περιλαμβάνει τη χορήγηση διφωσφωνικών, επιλεγμένους τροποποιητές των υποδοχέων των οιστρογόνων, καλσιτονίνης και ανάλογα της παραθυρεοειδούς ορμόνης. Η οστική απώλεια σε αυτή την κατάσταση μπορεί να μειωθεί ή να αναστραπεί με τη μηχανική διέγερση των οστεοβλαστών. Επιπρόσθετα, η φυσική άσκηση μπορεί να εμποδίσει τη μείωση της οστικής πυκνότητας κατά την περίοδο μετά την εμμηνόπαυση ή κατά τη γήρανση [28].

Η στρατηγικές εφαρμογής της μηχανοδιέγερσης στους οστεοβλάστες αποδεικνύονται ωφέλιμες και στην επούλωση των οστικών καταγμάτων. Τα αποτελέσματα της άσκησης φορτίου εξαρτώνται σημαντικά από τον ρυθμό, τον τρόπο και το μέγεθος του φορτίου, καθώς επίσης και από το μέγεθος του χάσματος του κατάγματος. Οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα αποκρίνονται διαφορετικά στα ποικίλα μηχανικά περιβάλλοντα και συνεπώς, η άκαμπτη μονιμοποίηση των καταγμάτων συνεπάγεται στην άμεση οστική κατασκευή και την οστική γεφύρωση του χάσματος του κατάγματος, ενώ η εύκαμπτη μονιμοποίηση μπορεί να συνεπάγεται σε έμμεση επούλωση που χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία περιοστεϊκών όζων και ενδοχόνδρινη οστική κατασκευή. Η εφαρμογή κυκλικών συμπιεστικών μετατοπίσεων είναι δυνατό να ενδυναμώνει την επούλωση μέσω αυξημένης κατασκευής όζων και γρηγορότερης οστεοποίησης.

Όμως, η περιπλοκότητα των μηχανισμών για την οστεοβλαστική διαφοροποίηση και τις αλληλεπιδράσεις με τα οστεοκύτταρα και τους οστεοκλάστες, υποδεικνύουν και την ανολοκλήρωτη αποκωδικοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Συνεπώς, υπάρχει πληθώρα μορίων των οποίων η δράση πρέπει να ταυτοποιηθεί και να ερμηνευτεί. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οστεοκύτταρα αισθάνονται τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του μηχανικού ερεθίσματος και τα μεταβιβάζουν στους οστεοβλάστες παραμένουν άγνωστοι, όπως και οι μηχανισμοί με τους οποίους οι οστεοβλάστες συντονίζουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών. Για το λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της μοριακής βάσης της μηχανομεταγωγής στη φυσιολογία του οστού ώστε να εκτιμηθεί η θεραπευτική στρατηγική που πρέπει να ακολουθηθεί και να αποφευχθούν οι τυχόν παρενέργειες που παρουσιάζονται με τη χρήση των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Correspondence
Athanasios G. Papavassiliou,
Department of Biological Chemistry,
Medical School, University of Athens,
Mikras Asias 75, PC 11527 Goudi, Greece
Email: papavas@med.uoa.gr

Αλληλογραφία
Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου,
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας,
Ιατρική Σχολή Παν/μίου Αθηνών,
Μικράς Ασίας 75, ΤΚ 11527, Γουδή
Email: papavas@med.uoa.gr

Βιβλιογραφία

1. Junqueira CL, Carneiro J, Kelley RO (1991). Basic Histology, 6th Edition, (Greek Translation by Paschalidis Publishing Company), pp 186-205.
2. Goltzman D (2002). Discoveries, Drugs and Skeletal Disorders. Nature 1:784-796.
3. Ducy P, Karsenty G (1998). Genetic Control of Cell Differentiation in the Skeleton. Curr Opin Cell Biol 10:614-619.
4. Chiba M, Komatsu K (1993). Mechanical responses of the periodontal ligament in the transverse section of the rat mandibular incisor at various velocities of loading *in vitro*. J Biomech 26:561-570.
5. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD (2000). Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. Periodontology 24:56-72.
6. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z (1991). Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and *in vitro*. Am J Orthodont Dentofac Orthoped 99:226-240.
7. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y (1994). Cyclic-tension force stimulates interleukin-1β production by human periodontal ligament cells, J Periodont Res 29:328-333.
8. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89:747-754.
9. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. J Biol Chem 274:6972-6978.
10. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C (1999). Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation, Mol Cell Biol 19:4431-4442.
11. Ziros PG, Gil APR, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Athanasios G. Papavassiliou AG (2002). The Bone-specific Transcriptional Regulator Cbfa1 Is a Target of Mechanical Signals in Osteoblastic Cells. J Biol Chem 277:23934-23941.
12. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG (2008). Runx2: of bone and stretch. Int J Biochem Cell Biol 40:1659-1663.
13. Naumann M (2000). Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. Biochem Pharmacol 60:1109-1114.
14. Ghosh S, May MJ, Kopp E (1998). NF-kB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. Ann Rev Immunol 16:225-260.
15. Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G (2004). Linking JNK signalling to NF-kB: a key to survival. J Cell Sci 117:5197-5208.
16. Ghosh S, Karin M (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 109:S81-S96.
17. Karin M and Lin A (2002). NF-κB at the crossroads of life and death. Nat Immunol 3:221-227.
18. Agarwal S, Long P, Seyedain A, Piesco N, Shree A, Gassner R (2003). A central role for nuclear factor-kB pathway in the anti-inflammatory and pro-inflammatory actions of mechanical strain, FASEB J 17:899-901.
19. Liu J, Zou L, Zheng Y, Zhao Z, Li Y, Yang P, Luo S (2007). NF-kB responds to mechanical strains in osteoblast-like cells, and lighter strains create an NF-kB response more readily. Cell Biol Int 31:1220-1224.
20. Basdra EK, Papavassiliou AG, Huber LA (1995). Rab and rho GTPases are involved in specific response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching. Biochimica et Biophysica Acta 1268:209-213.
21. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG (1998).

Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. FEBS Lett 430:358-362.
22. Basdra EK, Komposch G (1997). Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an *in vitro* analysis. Eur J Orthod 19:615-621.
23. Peverali FA, Basdra EK, Papavassiliou AG (2001). Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. Mol Med 7:68-78.
24. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989). Rapid detection, of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells. Nucleic Acids Res 17:6419.
25. Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem 162:156-159.
26. Laemmli KU (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
27. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease, Trends Mol Med 15:208-216.
28. Krane SM (2005). Identifying genes that regulate bone remodelling as potential therapeutic targets. JEM 201:841-843.

Καλοήθεις όγκοι των οστών στα παιδιά

Ι. ΛΥΜΠΑΡΗ
Α' Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία», Αθήνα, Ελλάδα

Περίληψη

Η διάγνωση ενός όγκου των οστών σε ένα παιδί μπορεί να αποτελέσει πηγή μεγάλου άγχους τόσο για τους γονείς όσο και για τον θεράποντα ιατρό. Ευτυχώς οι περισσότεροι όγκοι των οστών στα παιδιά είναι καλοήθεις. Αν και υπάρχει μια ποικιλία καλοηθών όγκων των οστών που επηρεάζουν τους ανώριμους σκελετικά ασθενείς, οι περισσότεροι έχουν τόσο χαρακτηριστική κλινική και ακτινολογική εικόνα που η διάγνωση μπορεί να τεθεί με λογική ακρίβεια χωρίς βιοψία. Εντούτοις, ορισμένοι καλοήθεις όγκοι των οστών μπορούν να χαρακτηρίζονται από δυνητική κακοήθεια και είναι φρονιμότερο να γίνει επιπρόσθετη εκτίμηση από κάποιον ειδικευμένο στην Ορθοπαιδική Ογκολογία. Οι εναλλακτικές επιλογές στη θεραπεία εν μέρει σχετίζονται με το στάδιο της βλάβης. Υποτροπές συγκεκριμένων βλαβών μπορεί να είναι προβληματικές. Με την εξοικείωση με την κλινική εικόνα των πιο συχνών καλοηθών όγκων στα παιδιά, οι ιατροί θα μπορούν να περιορίζουν φόβους και ανησυχίες, να θέτουν διάγνωση και να κάνουν θεραπευτικές συστάσεις με περισσότερο αποτελεσματικό τρόπο.

Λέξεις κλειδιά: Καλοήθεις όγκοι, Παιδική ηλικία

Benign bone tumors in children

J. LYMPARI
First Pediatric Department, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, Greece

Summary

The diagnosis of a bone tumor in a child can be a source of great anxiety for the patient, the parents, and the treating physician. Fortunately, most bone tumors in children are benign. Although there are a variety of benign bone tumors that affect skeletally immature patients, most have such characteristic clinical and radiographic presentations that the diagnosis can be made with reasonable accuracy without a biopsy. However, some benign bone tumors can simulate a malignant process and may be best handled by referral to a person trained in orthopaedic oncology for additional evaluation. Treatment alternatives are in part related to the stage of the lesion. Recurrences of certain lesions, such as aneurysmal bone cysts and osteoblastomas, can be problematic. By becoming familiar with the presentation of the more common benign bone tumors in children, physicians will be able to alleviate fears, establish a diagnosis, and make treatment recommendations in the most effective manner.

Keywords: Benign bone tumors, Childhood

Εισαγωγή

Η πραγματική επίπτωση των καλοηθών όγκων των οστών στα παιδιά είναι άγνωστη. Τα περισσότερα από τα δεδομένα που αφορούν στην επίπτωση των καλοηθών όγκων των οστών βασίζονται σε υλικό σειρών από βιοψίες ή θεραπευμένων βλαβών. Επιπλέον πολλοί καλοήθεις όγκοι των οστών στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα διαγιγνώσκονται ακτινογραφικά και ποτέ δεν απαιτούν επιπρόσθετη θεραπεία. Ο Codman, ο οποίος πρώτος αναγνώρισε την σπανιότητα των όγκων των οστών δημοσίευσε αντίστοιχη καταγραφή και μελέτη αυτών [1]. Παρόμοιες σειρές που ακολούθησαν δημιούργησαν τη βάση με την οποία εκτιμάται η επίπτωση των όγκων [2].

Σαν ομάδα οι καλοήθεις όγκοι των οστών στα παιδιά αντιπροσωπεύουν ένα ετερογενές μείγμα βλαβών. Εντούτοις οι περισσότερες καλοήθεις βλάβες έχουν ειδική και χαρακτηριστική κλινική και ακτινολογική εικόνα. Τα ινώδη ελλείμματα του φλοιού και τα εγχονδρώματα είναι συνήθως ασυμπτωματικά και ανακαλύπτονται μόνο ως τυχαίο εύρημα. Σε αντίθεση, το οστεοειδές οστέωμα και οι ανευρυσματικές κύστεις των οστών συνήθως συνοδεύονται από συμπτώματα άλγους τα οποία ωθούν τον ασθενή να αναζητήσει ιατρική βοήθεια. Άλλοι όγκοι μπορεί να προ-

βάλλουν ως μάζα (π.χ. οστεοχόνδρωμα) ή ως παθολογικό κάταγμα (π.χ. μονόχωρη οστική κύστη) [3,4].

Η φυσική πορεία αυτών των όγκων της παιδικής ηλικίας καθώς και οι ανάγκες για θεραπεία ποικίλουν. Κάποιες βλάβες, όπως τα ινώδη ελλείμματα του φλοιού συνήθως δεν απαιτούν θεραπεία, ενώ άλλες βλάβες όπως η ανευρυσματική κύστη, το χονδροβλάστωμα και το οστεοβλάστωμα συνήθως απαιτούν χειρουργική αντιμετώπιση και μπορεί να είναι επιρρεπείς σε τοπική υποτροπή. Επιπλέον άλλες (π.χ. ιστιοκύττωση Langerhans και οστεοειδές οστέωμα) παρουσιάζουν μια πιο απρόβλεπτη πορεία και μπορεί είτε να λυθούν αυτόματα είτε να χρειαστούν θεραπεία.

Εκτός από τις εμφανείς διαφορές των διαφόρων καλοηθών όγκων των οστών που προσβάλλουν τα παιδιά, η διάγνωση καθενός από αυτούς τους όγκους μπορεί συχνά να τεθεί με βάση τη χαρακτηριστική κλινική και ακτινολογική εικόνα. Είναι σημαντικό ο Ορθοπαιδικός να μπορεί να αναγνωρίσει τους πιο κοινούς καλοήθεις όγκους των οστών στα παιδιά ώστε να αποφεύγεται άσκοπη βιοψία, να μπορούν να ανακουφιστούν οι φόβοι και να μπορούν να γίνονται οι κατάλληλες συστάσεις για θεραπεία.

Ταξινόμηση

Η σταδιοποίηση των καλοηθών όγκων γίνεται σύμφωνα με την ακτινολογική τους εικόνα και την εμφανή κλινική συμπεριφορά. Το σύστημα σταδιοποίησης της Εταιρίας Μυοσκελετικών Όγκων (Musculoskeletal Tumor Society - MSTS) για τις συγκεκριμένες βλάβες, περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο στάδιο 1 οι βλάβες είναι στατικές, μη εμφανείς οι οποίες τυπικά αυτοιώνται. Στο στάδιο 2 οι βλάβες είναι ενεργείς αλλά παραμένουν μέσα στα όρια των οστών και σχετίζονται με καταστροφή των οστών ή αναδιαμόρφωση. Στο στάδιο 3 οι βλάβες είναι ενεργείς και τοπικά επιθετικές με τάση να επεκταθούν πέρα από τον φλοιό στους πέριξ μαλακούς ιστούς.

Η εκτίμηση του σταδίου είναι χρήσιμη όχι μόνο για να τεκμηριώσει τη διάγνωση αλλά και για να γίνει ο κατάλληλος θεραπευτικός σχεδιασμός. Οι βλάβες του σταδίου 1 συνήθως δεν απαιτούν χειρουργική παρέμβαση και μπορούν να παρακολουθούνται περιοδικά για να επιβεβαιώνεται ότι η βλάβη είναι στατική. Οι βλάβες του σταδίου 2 μπορεί να χρειαστούν παρέμβαση αν προκαλούν δομική/στηρικτική αδυναμία ή είναι σοβαρά συμπτωματικές. Η φύση της παρέμβασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων του ειδικού τύπου του όγκου, της εντόπισής του και της ηλικίας του ασθενούς. Οι βλάβες του σταδίου 3 συνήθως απαιτούν χειρουργική θεραπεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις συστήνονται επεμβάσεις διαμέσου της βλάβης αλλά μπορεί να απαιτηθεί ενίσχυση με επιπρόσθετους τρόπους θεραπείας. Μη ολοκληρωμένη ή ανεπαρκής θεραπεία μπορεί να ωθήσει τέτοιες βλάβες σε τοπική υποτροπή.

Κλινική εικόνα

Η παραπομπή ενός παιδιού με καλοήθη όγκο των οστών σε Ορθοπαιδικό επισπεύδεται συνήθως από την ανεύρεση μιας οστικής βλάβης ως τυχαίο εύρημα σε ακτινογραφία μετά από τραυματισμό ή εξαιτίας της έναρξης σημείων ή συμπτωμάτων όπως άλγος, ψηλαφητή μάζα ή ένα παθολογικό κάταγμα. Δεν υπάρχει μία χαρακτηριστική εικόνα για όλους τους καλοήθεις όγκους των οστών αλλά μπορεί να υπάρχει μια πολύ χαρακτηριστική εικόνα για έναν δεδομένο τύπο όγκου, συνήθως ένα ειδικό σύνολο σημείων, συμπτωμάτων και ακτινολογικών ευρημάτων. Σε σπάνια παραδείγματα ένας καλοήθης όγκος μπορεί να είναι η αρχική εκδήλωση μιας συστηματικής νόσου όπως στο σύνδρομο Albright και στην ιστιοκύττωση Langerhans. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προσομοιάζει με μια κακοήθη διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει σε άσκοπο άγχος και διαγνωστικές εξετάσεις [5].

Άλγος

Όποτε ένα παιδί διαμαρτύρεται για μυοσκελετικό άλγος ο θεράπων πρέπει να εξετάζει τη φύση και την εντόπιση του πόνου, τη διάρκεια των συμπτωμάτων καθώς και κάθε παράγοντα που προκαλεί επίταση ή ύφεση των συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα του παιδιού συχνά αποδίδονται αρχικά σε «άλγη ανάπτυξης» ή σε μη γνωστό τραυματισμό. Αυτό πράγματι συμβαίνει όταν δεν λαμβάνονται ακτινογραφίες ή είναι χαμηλής ποιότητας ή διαλάθουν ορθής διάγνωσης. Η πιθανότητα ενός καλοήθους όγκου των οστών πρέπει πάντα να περιλαμβάνεται στην διαφορική διάγνωση ανεξήγητων μυοσκελετικών αλγών στα παιδιά.

Οι καλοήθεις όγκοι των οστών μπορεί να είναι μια πηγή άλγους χωρίς υποκείμενο κάταγμα αναλόγως με τον τύπο του όγκου, το μέγεθος και την εντόπιση. Οι όγκοι που εμφανίζονται συνήθως με εντοπισμένο άλγος περιλαμβάνουν την ανευρυσματική κύστη, την ιστιοκύττωση Langerhans (παλαιότερα γνωστή ως ηωσινόφιλο κοκκίωμα), το οστεοβλάστωμα και το οστε-

οειδές οστέωμα. Τα συμπτώματα μπορεί να σχετίζονται με δομική αδυναμία στο πάσχον οστό ή στην περίπτωση του οστεοειδούς οστεώματος, σε υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις προσταγλανδινών μέσα στον όγκο. Ακόμα και βλάβες του ινώδους ιστού της μετάφυσης μπορεί να γίνουν επώδυνες αν μεγαλώσουν αρκετά ώστε να καταστρέφουν την οστική δομή και ακεραιότητα. Άλλοι τυπικά ασυμπτωματικοί όγκοι όπως το οστεοχόνδρωμα μπορεί να είναι συμπτωματικοί λόγω δευτερευόντων αιτιών όπως το κάταγμα, υποτροπιάζον τραύμα και τοπικό ερεθισμό από περιβάλλουσες δομές (τένοντας, μυς, αρτηρία ή νεύρο). Όταν το άλγος που σχετίζεται με οστεοχόνδρωμα είναι αποτέλεσμα μηχανικού ερεθισμού τα συμπτώματα εντοπίζονται στη θέση του όγκου και τυπικά επιδεινώνονται από συγκεκριμένες δραστηριότητες.

Από την άλλη, μπορεί να προκαλέσουν σημαντικό πόνο όταν επηρεάζουν παρακείμενο νεύρο. Ένα οστεοχόνδρωμα που περιλαμβάνει το εγγύς άκρο της περόνης μπορεί να πιέζει το κοινό περονιαίο νεύρο. Ομοίως οστεοβλάστωμα της σπονδυλικής στήλης μπορεί να εκδηλώνεται ως πόνος στο κάτω άκρο, μιμούμενο πάθηση μεσοσπονδυλίου δίσκου, ή ως σκολίωση. Το μέγεθος και η εντόπιση του όγκου μπορεί επίσης να είναι παράγοντες για το εάν ή όχι ο όγκος μπορεί να γίνει συμπτωματικός. Η ινώδης δυσπλασία και το μη οστεοποιό ίνωμα είναι συνήθως ασυμπτωματικές βλάβες, εκτός αν λάβουν μεγάλες διαστάσεις ώστε να εξασθενίσουν το οστό και να προκαλέσουν μικροκατάγματα τα οποία προκαλούν συμπτώματα.

Ο χαρακτήρας του άλγους μπορεί να κατευθύνει στη διάγνωση. Το ιστορικό άλγους για εβδομάδες ή μήνες, το οποίο επιδεινώνεται τη νύχτα και ανακουφίζεται με ασπιρίνη ή μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, χαρακτηρίζει τόσο συχνά το οστεοειδές οστέωμα που είναι σχεδόν διαγνωστικό. Όταν ο γιατρός λαμβάνει τέτοιο ιστορικό η υποψία ενός οστεοειδούς οστεώματος πρέπει να είναι ισχυρή ακόμα και αν οι αρχικές ακτινογραφίες της περιοχής αδυνατούν να αποκαλύψουν μια αδρή βλάβη. Χαρακτηριστική είναι η ανταν άκλαση του πόνου προς το γόνατο, όταν η συγκεκριμένη βλάβη εντοπίζεται στην περιοχή του ισχίου. Ο συνδυασμός ισχυρής υποψίας ενός μικρού όγκου και η λήψη λεπτομερούς ιστορικού θα πρέπει να οδηγούν το θεράποντα σε σπινθηρογράφημα οστών ή/και ακτινογραφίες ισχίου όταν οι ακτινογραφίες γόνατος αποτύχουν να αποκαλύψουν την αιτία των συμπτωμάτων του ασθενούς [6].

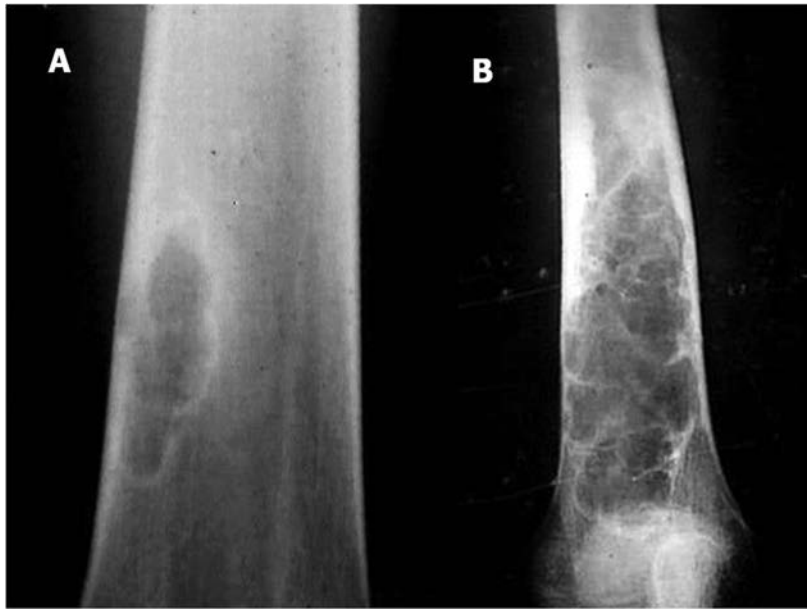
Ψηλαφητή μάζα

Ο πιο συχνός καλοήθης όγκος των οστών που προβάλει ως ψηλαφητή μάζα σε ένα αναπτυσσόμενο παιδί είναι το οστεοχόνδρωμα. Η μάζα που σχετίζεται με μια τέτοια βλάβη, είναι σταθερή και ακίνητη και μπορεί να είναι μαλακή. Η φυσική εξέταση μπορεί να προσδιορίσει αν η μάζα έχει οστική προέλευση. Στην περίπτωση ενός μισχωτού οστεοχονδρώματος, είναι ίσως σχετικά εύκολο να εκτιμήσει κανείς ότι εξορμάται από οστό. Όταν το οστεοχόνδρωμα έχει ευρεία βάση και είναι χωρίς μίσχο μπορεί να είναι πιο δύσκολο να γίνει διάκριση αν η μάζα προέρχεται από το υποκείμενο οστό. Αυτός ο τύπος βλάβης μπορεί να φαίνεται ότι εκτείνεται στο οστό, όπως στην περίπτωση της μονόχωρης οστικής κύστης, της ινώδους δυσπλασίας ή στην περίπτωση ανευρυσματικής κύστης.

Οι γονείς και το παιδί συχνά είναι ανίκανοι να παρέχουν ένα ιστορικό ανάπτυξης της βλάβης αν αυτή έχει παρατηρηθεί πρόσφατα. Εντούτοις μπορεί να είναι ικανοί να δώσουν ένα ιστορικό πρόσφατης σκελετικής ανάπτυξης ή ενός οικογενειακού μοντέλου κληρονομικότητας. Ο ιατρός πρέπει να εξετάσει τον ασθενή προσεκτικά, ψάχνοντας για οστικές μάζες ή γωνιώδεις παραμορφώσεις των άκρων για να εκτιμηθεί αν ο ασθενής έχει πολλαπλά οστεοχονδρώματα. Οι μεμονωμένες εξοστώσεις υπερτερούν των πολλαπλών κληρονομικών εξοστώσεων τουλάχιστον 10:1. Ένας αυτοσωματικός επικρατούν τύπος μεταβίβασης εμφανίζεται στο 70% των ασθενών με πολλαπλά οστεοχονδρώματα. Μετά από τη λήψη ιστορικού και την κλινική εξέταση, πρέπει να ληφθούν απλές ακτινογραφίες της προσβαλλόμενης περιοχής [7,8].

Παθολογικό κάταγμα

Ορισμένοι καλοήθεις όγκοι των οστών υποδιαγιγνώσκονται μέχρις ότου προσβάλλουν δομικά το οστό σε τέτοιο σημείο ώστε να υποστεί κάταγμα. Οι όγκοι που μπορεί να προβάλλουν με παθολογικό κάταγμα συνήθως αναπτύσσονται βραδέως και εξασθενούν το οστό (σταδίου 2 βλάβες). Οι πιο συνήθεις περιλαμβάνουν τη μονόχωρη οστική κύστη, την ινώδη δυσπλασία και το μη οστεοποιό ίνωμα. Περίπου 50% των μονόχωρων οστικών κύστεων πρωτοδιαγιγνώσκονται μετά από παθολογικό κάταγμα. Λιγότερο πιθανό να εκδηλωθούν ευθύς εξαρχής με παθολογικό κάταγμα είναι οι πιο επιθετικοί καλοήθεις όγκοι όπως οι ανευρυσματικές κύστεις των οστών οι οποίες έχουν την τάση να προκαλούν συμπτώματα άλγους νωρίτερα από κάταγμα.



Εικ. 1. Α) Ινώδες έλειμμα του φλοιού. Ονομάζεται έτσι όταν η βλάβη είναι μικρή (<2 εκ.). Δυνατόν να είναι υποπεριοστικό ή μέσα στο φλοιό. **Β)** Μη οστεοποιούμενο ίνωμα. Ο όρος χρησιμοποιείται για μεγαλύτερες βλάβες. Επεκτείνεται και προς τη μυελική κοιλότητα.

Επομένως όταν ένα παιδί προσέρχεται με παθολογικό κάταγμα, πρέπει να λαμβάνεται ένα λεπτομερές ιστορικό για τα προηγηθέντα συμπτώματα [9].

Τυχαίο εύρημα

Πολλοί καλοήθεις όγκοι των οστών στα παιδιά ανακαλύπτονται ως τυχαίο εύρημα σε ακτινογραφίες ή σπινθηρογραφήματα που πραγματοποιήθηκαν για άλλους λόγους. Οι ιατροί που δεν είναι εξοικειωμένοι με την κλινική και ακτινολογική εικόνα των καλοηθών όγκων των οστών συχνά αντιμετωπίζουν δυσκολία να διαβεβαιώσουν με ακρίβεια τον ασθενή και τους γονείς ότι η βλάβη είναι καλοήθης, γεγονός που οδηγεί σε άγχος, πολλαπλές απεικονιστικές εξετάσεις, ακόμα και βιοψία. Είναι υποχρέωση του Ορθοπαιδικού να είναι ικανός να αναγνωρίζει την καλοήθη φύση της βλάβης και να διαβεβαιώσει ότι ο όγκος δεν είναι απειλητικός για τη ζωή του ασθενούς.

Οι καλοήθεις όγκοι των οστών που τείνουν να ανακαλύπτονται τυχαία είναι συνήθως σταδίου 1 ή σταδίου 2. Οι όγκοι σταδίου 3 συχνά εκδηλώνονται με πόνο πριν ανακαλυφθούν ακτινολογικά. Καλοήθεις όγκοι που γενικά είναι ασυμπτωματικοί αλλά παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα στο σπινθηρογράφημα οστών περιλαμβάνουν την ινώδη δυσπλασία, τις παθήσεις του ινώδους συνδετικού ιστού των οστών και το εγχόνδρωμα. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι απλές ακτινογραφίες της προσβληθείσας περιοχής και η γνώση ότι οι καλοήθεις βλάβες (ειδικά του σταδίου 2 βλάβες) μπορεί να είναι ενεργείς στο σπινθηρογράφημα οστών είναι αυτά που χρειάζεται ο ιατρός για να διαβεβαιώσει ότι η βλάβη είναι πιθανότατα καλοήθης. Άλλοι καλοήθεις όγκοι των οστών που μπορεί να είναι ενεργείς στο σπινθηρογράφημα οστών περιλαμβάνουν την ανευρυσματική οστική κύστη και το οστεοειδές οστέωμα. Εντούτοις καθώς οι δύο αυτοί όγκοι συνδυάζονται συχνά με άλγος, οι περισσότεροι ασθενείς αναζητούν ιατρική βοήθεια πριν η βλάβη ανευρεθεί ακτινολογικά. Επειδή οι καλοήθεις όγκοι ανακαλύπτονται ως τυχαίο εύρημα συνεπάγεται ότι πολλοί άλλοι παραμένουν αδιάγνωστοι (Εικόνα 1).

Απεικονιστικά ευρήματα

Η πιο χρήσιμη απεικονιστική εξέταση για την εκτίμηση ενός όγκου των οστών είναι η απλή ακτινογραφία. Τουλάχιστον λήψεις δύο επιπέδων (κατά μέτωπο και πλάγια) επικεντρωμένες στη βλάβη πρέπει να ληφθούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι απλές ακτινογραφίες, σε συνδυασμό με το κλινικό ιστορικό είναι τα μόνα που απαιτούνται για να τεθεί η σωστή διάγνωση.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αξονική τομογραφία και λιγότερο συχνά η μαγνητική τομογραφία μπορεί να φανούν χρήσιμες στην εκτίμηση συγκεκριμένων βλαβών. Το σπινθηρογράφημα οστών με τεχνήτιο χρησιμοποιείται για να εκτιμηθούν άλλες θέσεις πιθανής οστικής συμμετοχής σε καταστάσεις που μπορεί να είναι πολυοστικές όπως η ινώδης δυσπλασία, το πολλαπλό εγχόνδρωμα και η ιστιοκύτταση Langerhans [10].

Απλή ακτινογραφία

Η απλή ακτινογραφία είναι η πιο χρήσιμη απεικονιστική εξέταση για να τεθεί η διάγνωση όταν υπάρχει υποψία όγκου των οστών. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ειδική διάγνωση μπορεί να τεθεί χωρίς επιπλέον απεικονιστικές εξετάσεις. Οι σημαντικοί παράγοντες που συνήθως μπορούν να ληφθούν από ανασκόπηση των ακτινογραφιών και είναι χρήσιμοι στο να περιοριστεί η διαφορική διάγνωση είναι η εντόπιση του όγκου (πλατύ έναντι μακρού οστού), το τμήμα του οστού (επίφυση, μετάφυση ή διάφυση), τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης της βλάβης (όπως καθορίζονται από τα όρια του όγκου και την παρουσία ή απουσία αντίδρασης του περιόστεου) και την παρουσία ή απουσία επασβεστώσεων στον όγκο [11].

Η μονόχωρη (απλή) οστική κύστη, το εγχόνδρωμα, το οστεοβλάστωμα και το μη οστεοποιό ίνωμα έχουν προτίμηση σε ορισμένα οστά. Οι μονόχωρες οστικές κύστεις είναι πιο πιθανό να συμβούν στο εγγύς βραχιόνιο και στο εγγύς μηριαίο. Αυτές οι θέσεις αποτελούν το 80-90% των περιπτώσεων. Τα οστεοβλαστώματα έχουν προτίμηση στα οπίσθια στοιχεία της σπονδυλικής στήλης. Τα μη οστεοποιά ινώματα απαντώνται συχνότερα στο άπω μηριαίο και στην εγγύς κνήμη.

Οι περισσότεροι καλοήθεις όγκοι στα παιδιά προσβάλλουν τις μεταφύσεις των μακρών οστών. Αυτό ισχύει για το οστεοειδές οστέωμα, το οστεοχόνδρωμα, το εγχόνδρωμα, το χονδρομυξοειδές ίνωμα, την ινώδη δυσπλασία, το μη οστεοποιό ίνωμα, τη μονόχωρη οστική κύστη και την ανευρυσματική κύστη. Η ιστιοκύτταση Langerhans έχει προτίμηση στα πλατέα οστά, όπου περίπου το 70% αυτών των βλαβών συμβαίνουν στο κρανίο, τη γνάθο, την σπονδυλική στήλη, τα οστά της λεκάνης και τις πλευρές. Σπάνια προσβάλει τα οστά της άκρας χειρός και του ποδός. Σε αντίθεση το οστεοχόνδρωμα και το χονδροβλάστωμα προσβάλλουν τα πλατέα οστά στο 10% μόνο των περιπτώσεων. Η ινώδης δυσπλασία μπορεί να προσβάλλει κάθε μακρύ οστό καθώς και τις πλευρές και το κρανίο. Συμμετοχή της σπονδυλικής στήλης, της λεκάνης, της ωμοπλάτης των χεριών ή των ποδιών είναι σπάνια [12].

Το τμήμα του οστού που συμμετέχει αποτελεί επίσης παράγοντα. Οι περισσότεροι όγκοι των οστών βρίσκονται στη μετάφυση ή τη διάφυση. Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί το χονδροβλάστωμα. Περισσότερα από 95% όλων των χονδροβλαστωμάτων εντοπίζονται στην επίφυση. Έτσι όταν η βλάβη εντοπίζεται στην επίφυση ενός μακρού οστού, ειδικά στο εγγύς βραχιόνιο, η διάγνωση του χονδροβλαστώματος πρέπει να θεωρείται πολύ πιθανή. Στην περίπτωση αυτή η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει το γιγαντοκυτταρικό όγκο, την οστεομυελίτιδα και το εγχόνδρωμα. Βλάβες που τείνουν να εντοπίζονται περιλαμβάνουν το οστεοχόνδρωμα, το εγχόνδρωμα, το οστεοβλάστωμα και την ανευρυσματική κύστη. Λίγοι καλοήθεις όγκοι των οστών αναπτύσσονται τυπικά στη διάφυση. Το οστεοειδές οστέωμα και η ιστιοκύτταση Langerhans είναι πολύ πιο συχνά σε αυτή τη θέση.

Ορισμένοι όγκοι επεκτείνονται πέραν της αρχικής θέσης προτίμησής. Η ινώδης δυσπλασία μπορεί να περιλαμβάνει την μετάφυση ή/και τη διάφυση ενός δεδομένου οστού. Ομοίως οι μονόχωρες οστικές κύστεις θεωρείται ότι ξεκινούν από τη μετάφυση αλλά μεταναστεύουν πέρα από την επίφυση καθώς το οστό υφίσταται κατά μήκος αύξηση, έτσι ώστε μπορεί να εντοπίζονται στη διάφυση όταν τελικά ανακαλύπτονται.

Η εντόπιση του όγκου πρέπει να διευκρινίζεται αν είναι στο φλοιό ή στο μυελό. Οι ενδομυελικές βλάβες θα πρέπει περαιτέρω να χαρακτηριστούν ως κεντρικές ή έκκεντρες. Οι όγκοι που έχουν τη βάση τους στον φλοιό περιλαμβάνουν το οστεοχόνδρωμα και το οστεοειδές οστέωμα. Οι όγκοι που τείνουν να εντοπίζονται κεντρικά στο μυελικό τμήμα του οστού περιλαμβάνουν το εγχόνδρωμα, την ινώδη δυσπλασία και τη μονόχωρη οστική κύστη. Οι έκκεντρες μυελικές βλάβες περιλαμβάνουν το μη οστεοποιό ίνωμα, το χονδρομυξοειδές ίνωμα και την ανευρυσματική κύστη.

Οι καλοήθεις όγκοι των οστών μπορεί να προσβάλουν τη σπονδυλική στήλη, αν και αυτό δε συμβαίνει συχνά. Τα παιδιά με συμμετοχή των σπονδύλων μπορεί να παρουσιάσουν ραιβόκρανο ή σκολίωση με ή χωρίς πόνο. Ειδικά το καλόηθες οστεοβλάστωμα έχει προτίμηση στη σπονδυλική στήλη, με συχνότητα που φθάνει το 40% όλων των οστεοβλαστωμάτων. Από την άλλη, το 10% όλων των οστεοειδών οστεωμάτων, εντοπίζονται στη σπονδυλική στήλη και το ιερό οστό. Άλλες βλάβες που μπορεί να περιλαμβάνουν την σπονδυλική

στήλη είναι η ιστιοκύττωση Langerhans, το οστεοχόνδρωμα και η ανευρυσματική οστική κύστη [13].

Οι απλές ακτινογραφίες μπορούν να παρέχουν στοιχεία για το στάδιο και επομένως την βιολογική συμπεριφορά μιας βλάβης. Τρία ακτινολογικά πρότυπα έχουν περιγραφεί από τους Madewell και συν. [14]: γεωγραφικό (geographic), σκωροφαγωμένο (moth-eaten), διεισδυτικό (permeative). Αυτά τα πρότυπα καταστροφής αντιπροσωπεύουν αύξοντες ρυθμούς ανάπτυξης, από τον αργό στο γεωγραφικό πρότυπο στο ταχύ στο διεισδυτικό πρότυπο. Το πιο συνηθισμένο πρότυπο που απαντάται στις καλοήθεις βλάβες είναι το γεωγραφικό με έναν τυπικά αργό ρυθμό ανάπτυξης. Σε αντίθεση, οι περισσότεροι πρωτογενείς κακοήθεις όγκοι των οστών στα παιδιά έχουν ακτινολογικά ένα διεισδυτικό πρότυπο. Υπάρχει ωστόσο μία αλληλεπικάλυψη. Δεν είναι όλοι οι καλοήθεις όγκοι με γεωγραφική εμφάνιση και δεν είναι όλοι οι κακοήθεις διεισδυτικοί. Η ιστιοκύττωση Langerhans μπορεί να προσομοιάζει σε μια επιθετική κακοήθη βλάβη ακτινολογικά.

Οι γεωγραφικές βλάβες μπορεί να χαρακτηρίζονται από σκληρία στα όριά τους. Τα σκληρυντικά όρια σχετίζονται με βλάβες, όπως η ινώδης δυσπλασία, το χονδρομυξοειδές ίνωμα και περιστασιακά το χονδροβλάστωμα. Η απουσία σκληρυντικού ορίου είναι ενδεικτική αυξανόμενου ρυθμού ανάπτυξης. Οι όγκοι που μπορεί να εκδηλώνονται με αυτόν τον τρόπο περιλαμβάνουν την ινώδη δυσπλασία, την ανευρυσματική οστική κύστη, το χονδροβλάστωμα και περιστασιακά το χονδρομυξοειδές ίνωμα. Εντούτοις υπάρχει αξιοσημείωτη αλληλεπικάλυψη στην ακτινολογική εικόνα και τη βιολογική δραστηριότητα ορισμένων όγκων. Το χονδροβλάστωμα και η ινώδης δυσπλασία για παράδειγμα μπορεί να είναι είτε ανενεργείς είτε ενεργείς βλάβες. Επιπρόσθετα της διάγνωσης το πρότυπο του οστού παρέχει πληροφορίες για το αν θα απαιτηθεί παρέμβαση. Στην περίπτωση της ινώδους δυσπλασίας ένα σκληρυντικό όριο υποδηλώνει ότι η βλάβη είναι ανενεργής και είναι λιγότερο πιθανό να εξελιχθεί συγκριτικά με μια παρόμοια βλάβη χωρίς σκληρυντικό όριο.

Τέλος, η ύπαρξη επασβέστωσης μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον τύπο του ιστού του όγκου. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές στο χονδροβλάστωμα, το εγχόνδρωμα και το χονδρομυξοειδές ίνωμα. Αν και η αξονική τομογραφία και η μαγνητική τομογραφία είναι πιο ευαίσθητες για την ανίχνευση χόνδρου μέσα σε έναν οστικό όγκο από την απλή ακτινογραφία, συνήθως δεν είναι απαραίτητες για να τεθεί η διάγνωση [15].

Σπινθηρογράφημα οστών

Ο ρόλος του σπινθηρογραφήματος οστών με τεχνήτιο στην εκτίμηση των παιδιών με καλοήθεις όγκους είναι είτε να βοηθήσει στη διευκρίνιση της ακριβούς θέσης μιας μικρής επώδυνης βλάβης σε μια περιοχή με σύνθετη ανατομία (π.χ. οστεοειδές οστέωμα) ή να εκτιμήσει το παιδί για σε περιπτώσεις βλαβών που μπορεί να εντοπίζονται σε περισσότερες θέσεις, όπως η ινώδης δυσπλασία και το πολλαπλό εγχόνδρωμα. Η εντόπιση μικρών βλαβών στη σπονδυλική στήλη, στη λεκάνη ή τις πλευρές συχνά επιτυγχάνεται με σπινθηρογράφημα οστών με τεχνήτιο.

Ασθενείς με ιστιοκύττωση Langerhans πρέπει να εκτιμώνται για πολλαπλές οστικές εντοπίσεις αλλά το σπινθηρογράφημα οστών δεν είναι αξιόπιστο καθώς ορισμένες βλάβες μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα ενώ άλλες όχι. Έτσι το σπινθηρογράφημα μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα επιβοηθητικό στην περίπτωση διαφορικής διάγνωσης μεταξύ ενός κακοήθους όγκου, που απεικονίζεται ως ενεργός, και της ιστιοκύττωσης Langerhans που μπορεί να μην είναι ενεργή. Αν η βλάβη δεν παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα στο σπινθηρογράφημα η διάγνωση της ιστιοκύττωσης Langerhans πρέπει να λαμβάνεται έντονα υπόψη. Στην τελευταία περίπτωση, προκειμένου να τεθεί με ακρίβεια η διάγνωση, μπορεί να απαιτηθεί βιοψία [16].

Αξονική τομογραφία

Η αξονική τομογραφία χρησιμοποιείται καλύτερα ως επιπρόσθετη εξέταση μετά την απλή ακτινογραφία για σκοπούς σταδιοποίησης και προεγχειρητικού σχεδιασμού παρά ως διαγνωστικό εργαλείο. Θα πρέπει να προτιμάται της μαγνητικής τομογραφίας επειδή ο καθορισμός της αρχιτεκτονικής των οστών είναι πρωταρχικής σημασίας. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην εκτίμηση της έκτασης της διαταραχής του φλοιού λόγω ενεργών ή επιθετικών όγκων, όπως η ανευρυσματική κύστη, η ινώδης δυσπλασία και το εγχόνδρωμα. Αν και καμιά απεικονιστική μέθοδος δεν μπορεί να προβλέψει τον κίνδυνο παθολογικού κατάγματος, η αξονική τομογραφία μπορεί με περισσότερη ακρίβεια να εκτιμήσει την ακεραιότητα του φλοιού συγκριτικά με την απλή ακτινογραφία. Στις περιπτώσεις στις οποίες υπάρχει ανησυχία για επικείμενο κάταγμα ή υπάρχει ήδη κάποιο μικροκάταγμα, η ακεραιότητα του φλοιού εκτιμάται καλύτερα με αξονική τομογραφία. Μπορεί επίσης μπορεί να έχει ένδειξη όταν ένας όγκος που

περιλαμβάνει τις πλευρές, την σπονδυλική στήλη ή την λεκάνη δεν μπορεί επαρκώς να απεικονιστεί με απλή ακτινογραφία λόγω ανατομικών παραγόντων.

Η αξονική τομογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην εντόπιση της φωλεάς (nidus) ενός οστεοειδούς οστεώματος. Η φωλεά αποτελεί μια στρογγυλή αραιωτική σκίαση διαμέτρου 0.5-1 εκατοστό συχνά με πυκνωτική κεντρική κηλίδα, που περιβάλλεται στα μακρά οστά από χαρακτηριστική αντιδραστική σκλήρυνση με ατρακτοειδή μορφή. Αξίζει να παρατηρήσει κανείς ότι στα σπογγώδη οστά, καθώς και στις επιφύσεις λείπει η αντιδραστική σκλήρυνση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στον προεγχειρητικό σχεδιασμό όταν η φωλεά εντοπίζεται σε υποπεριοστική θέση. Σε σπάνιες περιπτώσεις ένα οστεοχόνδρωμα μπορεί να φαίνεται ότι εξορμάται απευθείας από τον φλοιό του οστού παρά να περιλαμβάνει ανάμικτα στοιχεία του μυελού του πάσχοντος οστού και του όγκου. Όταν απαντάται αυτή η περίπτωση η βλάβη πρέπει να διαχωριστεί από ένα παραοστικό οστεοσάρκωμα. Η αξονική τομογραφία ενός οστεοχονδρώματος θα δείξει συνέχεια ανάμεσα στον μυελό του πάσχοντος οστού και του όγκου. Στο παραοστικό οστεοσάρκωμα δεν υπάρχει τέτοια συνέχεια. Η αξονική τομογραφία μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη στο διαχωρισμό μιας μονόχωρης οστικής κύστης από μια ανευρυσματική κύστη [17].

Μαγνητική τομογραφία

Γενικά η μαγνητική τομογραφία δεν ενδείκνυται για τη διάγνωση ή την εκτίμηση καλοηθών όγκων των οστών στα παιδιά. Εντούτοις ασθενείς συχνά προσέρχονται στον Ορθοπαιδικό αφού η μαγνητική τομογραφία έχει ήδη πραγματοποιηθεί. Παρόλα αυτά μπορεί να είναι χρήσιμη σε ορισμένες περιπτώσεις καλοηθών όγκων των οστών.

Το χόνδρινο περίβλημα ενός οστεοχονδρώματος έχει αξιοσημείωτα όμοια χαρακτηριστικά με εκείνα του αρθρικού χόνδρου (π.χ. αυξημένη ένταση σήματος στην Τ1 και Τ2 ακολουθίες). Επιπρόσθετα, η μαγνητική τομογραφία μπορεί να είναι χρήσιμη στην εκτίμηση του μεγέθους του χόνδρινου περιβλήματος όταν εκτιμάται ο κίνδυνος δευτεροπαθούς χονδροσαρκώματος. Βλάβες που περιέχουν χόνδρινο ιστό όπως το χονδροβλάστωμα, το εγχόνδρωμα και το χονδρομυξοειδές ίνωμα έχουν αυξημένη ένταση στην Τ2 ακολουθία και μπορεί να είναι λοβωτές σε εμφάνιση. Περιοχές με πυκνή αποτιτάνωση μπορεί να φαίνονται σαν εστιακές περιοχές με σήμα χαμηλής εντάσεως στις Τ2 ακολουθίες. Τα χονδροβλαστώματα είναι γνωστό ότι προκαλούν σημαντικό οίδημα γύρω από τον όγκο. Όταν ελέγχεται με μαγνητική τομογραφία μια σημαντικής έκτασης περιοχή με οίδημα (φωτεινή απεικόνιση στις Τ2 ακολουθίες) που περιβάλει τον όγκο μπορεί να οδηγήσει στο εσφαλμένο συμπέρασμα ότι η υποκείμενη διαταραχή είναι λοιμώδης, τραυματική ή κακοήθης.

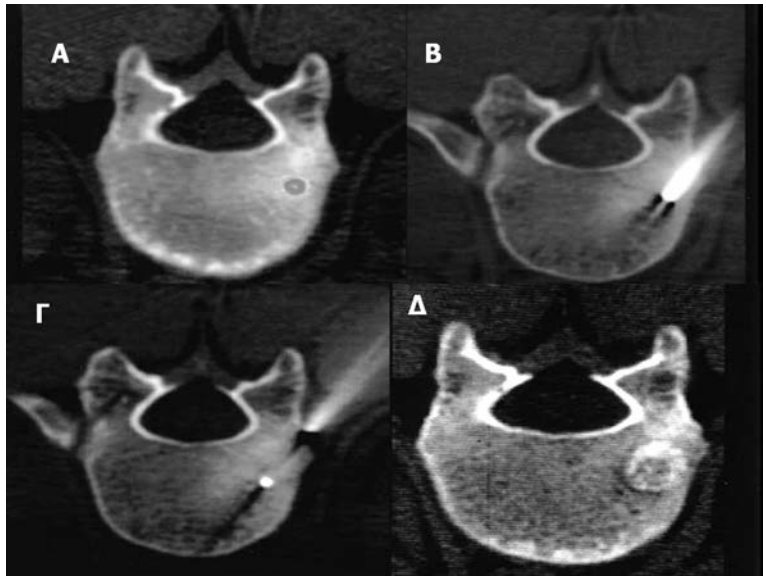
Η απεικόνιση της ινώδους δυσπλασίας σε μαγνητική τομογραφία ποικίλει. Σε μερικές περιπτώσεις έχει μειωμένης έντασης σήμα και στις Τ1 και στις Τ2 ακολουθίες. Σε άλλους ασθενείς εντούτοις η ένταση του σήματος στις Τ2 ακολουθίες μπορεί να είναι αυξημένη με ταυτόχρονη στικτή απεικόνιση.

Θεραπεία

Αφού τεθεί η διάγνωση ενός καλοήθους όγκου των οστών σε ένα παιδί, ο θεράπων ιατρός θα πρέπει να σκεφτεί έναν αριθμό παραγόντων προτού αποφασίσει τη θεραπεία. Αυτοί περιλαμβάνουν την φυσική πορεία του όγκου, τον κίνδυνο παθολογικού κατάγματος και τους κινδύνους και τα οφέλη που σχετίζονται με την επεμβατική ή την μη επεμβατική θεραπεία. Το σύστημα σταδιοποίησης της Εταιρίας Μυοσκελετικών Όγκων (Musculoskeletal Tumor Society) για τους καλοήθεις όγκους είναι χρήσιμο για να καθοριστεί ποιοι όγκοι είναι πιο πιθανό να απαιτήσουν θεραπεία και ποιοι μπορούν απλά να παρακολουθούνται με ασφάλεια. Οι όγκοι του σταδίου 1 συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενοι ή σταθεροί και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν απαιτούν χειρουργική θεραπεία. Αυτό είναι ξεκάθαρο στα εγχονδρώματα, οστεοχονδρώματα, μονόχωρες κύστεις των οστών και στα μικρού μεγέθους μη οστεοποιά ινώματα. Εντούτοις μεγάλες μονόχωρες κύστεις των οστών και μη οστεοποιά ινώματα μπορεί να ενέχουν έναν κίνδυνο για παθολογικό κάταγμα.

Βλάβες που γειτνιάζουν με το συζευκτικό χόνδρο είναι καλύτερο να αντιμετωπίζονται μη επεμβατικά μέχρις ότου η βλάβη να απομακρυνθεί από την περιοχή ανάπτυξης του οστού ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος τραυματισμού της αυξητικής πλάκας. Τοπική υποτροπή είναι εξαιρετικά σπάνια. Τα παθολογικά κατάγματα θα αντιμετωπιστούν με χειρουργική ή μη χειρουργική θεραπεία [18].

Τα οστεοειδή οστεώματα θεωρούνται βλάβες σταδίου 2. Έχει φανεί ότι η φυσική πορεία αυτού του όγκου είναι αυτόματη υποχώρηση σε σειρές αρκετών ετών. Τα συμπτώματα μπορεί σε μερικές περιπτώσεις



Εικ. 2. Α) Απεικόνιση με αξονική τομογραφία (CT) οστεοειδούς οστεώματος στο σώμα του 12ου θωρακικού σπονδύλου σε αγόρι 15 ετών. **Β)** και **Γ)** Χρήση θερμικού καυτηριασμού της βλάβης με ραδιοκύματα με καθοδήγηση υπό CT. **Δ)** 6 μήνες μετά την παρέμβαση διαπιστώνεται η βλάβη με στοιχεία νέκρωσης.

να ελεγχθούν με σαλικυλικά ή μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Στους ασθενείς που δεν ανέχονται ή δεν θέλουν φαρμακευτική αντιμετώπιση μπορεί να εφαρμοσθεί η χειρουργική εξαίρεση της βλάβης [19]. Η πλήρης αφαίρεση του όγκου μειώνει τον κίνδυνο τοπικής υποτροπής συγκριτικά με λιγότερο επιθετικές μεθόδους, αλλά ενέχει τον κίνδυνο επαπειλούμενου κατάγματος. Σε οστά που φορτίζονται υπό το βάρος του σώματος, η εξαίρεση της βλάβης μπορεί να απαιτεί επιπλέον πλήρωση της περιοχής με οστικό μόσχευμα ή/και εσωτερική οστεοσύνθεση. Στο κενό που δημιουργείται τοποθετούνται σπογγώδη μοσχεύματα από το λαγόνιο ή σπανιότερα από την κνήμη ή όταν η βλάβη είναι μεγαλύτερη από τράπεζα οστών.

Για να ελαχιστοποιηθεί το ποσό του αφαιρούμενου οστού και ο κίνδυνος επαπειλούμενου κατάγματος, οι Ward και συν. [20] συστήνουν τη χρήση γλυφάνου για την αφαίρεση τέτοιου είδους βλάβης. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση υψηλής ταχύτητας γλύφανο για την αφαίρεση του φλοιού μέχρις ότου να αναγνωρισθεί η φωλεά. Η τελευταία τότε αφαιρείται Το nidus τότε εκτέμνεται με τη χρήση ειδικού ξέστρου και ο ιστός αποστέλλεται για ιστολογική επιβεβαίωση και καλλιέργεια.

Άλλες ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές που περιγράφονται για την αφαίρεση του οστεοειδούς οστεώματος περιλαμβάνουν τον καθοδηγούμενο υπό αξονική τομογραφία θερμικό καυτηριασμό της φωλεάς με ραδιοκύματα (RF) ή laser [21].

Τα πλεονεκτήματα της αφαίρεσης με ραδιοκύματα περιλαμβάνουν το γεγονός ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ασθενείς χωρίς να απαιτηθεί νοσηλεία, συνδυάζεται με λιγότερες επιπλοκές συγκριτικά με τις ανοιχτές επεμβάσεις και είναι σχεδόν ισάξια με την χειρουργική εκτομή σε σχέση με τα ποσοστά υποτροπής του όγκου [22], (Εικόνα 2).

Η αντιμετώπιση του οστεοχονδρώματος είναι η χειρουργική (εξαίρεση ολόκληρης εξόστωσης συμπεριλαμβανομένου του υπερκείμενου θυλάκου, μαζί με το περιόστεο και βάση με λεπτό στρώμα φυσιολογικού οστού) εφόσον υπάρχουν συγκεκριμένες ενδείξεις: όταν προκαλούνται συμπτώματα από πίεση αγγείων ή νεύρων, δυσχέρεια κινητικότητας άρθρωσης και αισθητικοί λόγοι. Έχει παρατηρηθεί υποτροπή έως 2% επί ατελούς χειρουργικής εκτομής καθώς και εξαλλαγή σε χονδροσάρκωμα σε ποσοστό 1%. Κλινικά στοιχεία υπέρ εξαλλαγής, θεωρούνται η γρήγορη αύξηση ή αύξηση μετά την ωρίμανση του σκελετού και ο πόνος, ενώ ακτινολογικά η πυκνή ασβέστωση στην κορυφή πάχους άνω των 2 χιλιοστών με μυξοειδείς

αλλοιώσεις και η υποτροπή μετά την εγχείρηση.

Όγκοι όπως το εγχόνδρωμα, η ινώδης δυσπλασία και η μονόχωρη κύστη μπορεί να εκδηλώνονται σαν βλάβες σταδίου 1 ή σταδίου 2. Τα περισσότερα εγχονδρώματα στα παιδιά είναι σταδίου 1 και μπορούν να αντιμετωπιστούν μη επεμβατικά. Σε περιπτώσεις υποτροπιαζόντων καταγμάτων ενδείκνυνται η απόξεση και η πλήρωση. Ομοίως η ινώδης δυσπλασία που εκδηλώνεται ως βλάβη σταδίου 1 μπορεί επίσης να αντιμετωπιστεί συντηρητικά. Οι βλάβες σταδίου 2, ανάλογα με την εντόπισή τους την ηλικία του ασθενούς, τα συμπτώματά του και τον κίνδυνο κατάγματος, μπορεί να απαιτήσουν χειρουργική θεραπεία. Σε σκελετικά ανώριμους ασθενείς οι ενδείξεις για χειρουργείο περιλαμβάνουν υποτροπιάζον κάταγμα και προοδευτική δυσμορφία. Δυστυχώς η απλή απόξεση και τα οστικά μοσχεύματα στα παιδιά και στους ενήλικες σχετίζονται με τοπική υποτροπή. Η χειρουργική θεραπεία θα περιλαμβάνει την ολική εξαίρεση της βλάβης και την πλήρωση της περιοχής με οστικό μόσχευμα και αν απαιτηθεί εσωτερική οστεοσύνθεση [23].

Η φυσική πορεία της μονόχωρης οστικής κύστης είναι η τάση να υποχωρεί με τη σκελετική ωρίμανση και πολλές μπορούν απλά να παρακολουθηθούν χωρίς ειδική θεραπεία. Πριν από τη σκελετική ωρίμανση οι μονόχωρες οστικές κύστεις μπορούν να προκαλέσουν υποτροπιάζοντα κατάγματα. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα έκδηλο σε βλάβες που σχετίζονται με σημαντική λέπτυνση του φλοιού, σε περιοχές που δέχονται το σωματικό βάρος, όπως το εγγύς μηριαίο και σε περιοχές που υπόκεινται σε στροφικές δυνάμεις, όπως το βραχιόνιο. Αρχικά τα περισσότερα παθολογικά κατάγματα πρέπει να θεραπεύονται συντηρητικά. Κατάγματα με παρεκτόπιση που περιλαμβάνουν το εγγύς μηριαίο μπορεί να απαιτήσουν χειρουργική αντιμετώπιση με σταθεροποίηση.

Πριν από το 1979 η θεραπεία των μονόχωρων οστικών κύστεων αποτελείτο πρωτίστως από απόξεση και πλήρωση με οστικό μόσχευμα. Οι Scaglietti και συν. [24] δημοσίευσαν μελέτη με διαδερμική αναρρόφηση και έγχυση κορτικοστεροειδούς (μεθυλπρεδνιζολόνη). Η διαδερμική αναρρόφηση και έγχυση, φαίνεται να συνδέεται με μικρότερη νοσηρότητα συγκριτικά με τις ανοιχτές διαδικασίες. Εντούτοις οι ασθενείς και οι γονείς τους θα πρέπει να ενημερώνονται ότι περισσότερες από μια εγχύσεις μπορεί πιθανόν να απαιτηθούν και ότι μια ανοιχτή επέμβαση πιθανόν να ενδείκνυται όταν οι κλειστές διαδικασίες αποτύχουν.

Η ιστιοκύττωση Langerhans μπορεί περιστασιακά να ιαθεί αυτόματα με την πάροδο του χρόνου. Πρακτικά πολλοί ασθενείς με ιστιοκύττωση υποβάλλονται σε βιοψία ή αναρρόφηση για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση όταν είναι αδύνατον να αποκλεισθεί λοίμωξη ή σάρκωμα Ewing βάσει κλινικών και ακτινολογικών κριτηρίων μόνο. Η βιοψία μπορεί να πραγματοποιηθεί διαδερμικά ή με ανοικτή επέμβαση. Αν η διάγνωση επιβεβαιωθεί με ανοικτή βιοψία η βλάβη μπορεί να αντιμετωπισθεί με απλή απόξεση. Οι Capanna και συν. [25] δημοσίευσαν ποικίλα αποτελέσματα μετά από έγχυση κορτικοστεροειδών. Μικρής δόσης ακτινοβολία (500-600 cGy) είναι πολύ αποτελεσματική για μεγάλες ή μη προσπελάσιμες βλάβες όπως εκείνες στη σπονδυλική στήλη ή τη λεκάνη αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε κάθε βλάβη.

Το οστεοβλάστωμα, το χονδροβλάστωμα, το χονδρομυξοειδές ίνωμα και η ανευρυσματική κύστη συνήθως εκδηλώνονται ως βλάβες σταδίου 2 ή 3.Το χονδρομυξοειδές ίνωμα μπορεί να θεραπευτεί με πλήρη απόξεση και πλήρωση με οστικό μόσχευμα. Στα παιδιά με ανοιχτές επιφυσιακές πλάκες, η χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να καθυστερεί όσο το δυνατόν περισσότερο για να αποφευχθεί τραυματισμός του επιφυσιακού δίσκου.

Τα χονδροβλαστώματα εκδηλώνονται ως βλάβες σταδίου 2 ή 3 αλλά σε αντίθεση με το χονδρομυξοειδές ίνωμα έχουν τάση για πιο επιθετική συμπεριφορά και τοπική υποτροπή. Για αυτό το λόγο συνιστάται θεραπεία με απόξεση. Βλάβες που περιλαμβάνουν την αυξητική πλάκα απαιτούν ολική εξαίρεση ακόμα και με τον κίνδυνο πρώιμης σύγκλισης. Μεγάλες βλάβες μπορεί να απαιτήσουν πλήρωση με οστικό μόσχευμα.

Τα οστεοβλαστώματα σταδίου 2 και 3 διαφέρουν στην ανταπόκρισή τους στη θεραπεία. Για βλάβες που περιορίζονται μέσα στο οστό (σταδίου 2) η απόξεση και η πλήρωση με μόσχευμα συνήθως αρκούν. Στις βλάβες σταδίου 3, η ίδια θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπή περίπου 20%. Γι' αυτό το λόγο η εκτομή θα πρέπει να είναι ευρεία. Εντούτοις αυτό μπορεί να μην είναι πάντα εφικτό χωρίς σημαντική νοσηρότητα ειδικά στη σπονδυλική στήλη. Ο ρόλος της θεραπείας με ακτινοβολία παραμένει αμφιλεγόμενος. Φαίνεται πως έχει θέση σε περιπτώσεις βλαβών της σπονδυλικής στήλης με εξάπλωση στα μαλακά μόρια ή στον επισκληρίδιο χώρο, ή μετά από τοπική υποτροπή.

Οι ανευρυσματικές κύστεις επίσης εκδηλώνονται ως σταδίου 2 ή 3 βλάβες. Η φυσική τους πορεία είναι

αυτή της συνεχιζόμενης αύξησης αν παραμείνουν χωρίς θεραπεία. Απλή απόξεση συνδέεται με μη αποδεκτά υψηλά ποσοστά (>50%) τοπικής υποτροπής. Σε μια προσπάθεια να μειωθεί η τοπική υποτροπή μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτενής απόξεση μέσω ειδικού γλυφάνου υψηλής ταχύτητας. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να χρειαστεί η σταθεροποίηση του οστού με εσωτερική οστεοσύνθεση. Επίσης έχει εφαρμοσθεί η κρυοχειρουργική μέθοδος με εισαγωγή στην κύστη, ύστερα από απόξεση, υγρού αζώτου σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (-20°C). Ανεγχείρητες ή δύσκολα προσπελάσιμες βλάβες ειδικά αυτές που περιλαμβάνουν την σπονδυλική στήλη πρέπει να αντιμετωπίζονται αρχικά με εμβολισμό και στη συνέχεια με ακτινοβολία.

Συμπέρασμα

Ενώ η πραγματική επίπτωση των καλοηθών όγκων στα παιδιά είναι άγνωστη παραμένει μια κλινική οντότητα με την οποία συχνά έρχεται αντιμέτωπος ο γενικός Ορθοπαιδικός. Καθώς εξοικειώνονται με τα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά των πιο κοινών καλοηθών όγκων, οι θεράποντες θα είναι σε θέση να θέσουν με ακρίβεια τη σωστή διάγνωση χωρίς την ανάγκη βιοψίας στις περισσότερες περιπτώσεις. Με την κατανόηση της φυσικής πορείας του όγκου και το στάδιο κατά την εμφάνισή του μπορούν να γίνουν οι κατάλληλες συστάσεις θεραπείας. Αυτό επιτρέπει στους γονείς και το παιδί να ενημερωθούν κατάλληλα εξαρχής και να αποφευχθεί η υπερ- και η υπο- θεραπεία αυτών των όγκων.

Correspondence
Julia Lympari,
"Aghia Sophia" Children's Hospital,
Athens, Greece
E-mail: jlympari@yahoo.gr

Αλληλογραφία
Ιουλία Λυμπάρη,
Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία»,
Αθήνα
E-mail: jlympari@yahoo.gr

Βιβλιογραφία

1. Codman EA (1922). The registry of cases of bone sarcoma. Surg Gynecol Obstet 34:335-343.
2. Unni KK (1996). Dahlin's Bone Tumors: General Aspects and Data on 11,087 Cases, 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp 11-24, 47-58, 121-142.
3. Jaffe H (1935). "Osteoid osteoma": A benignosteoblastic tumor composed of osteoid and atypical bone. Arch Surg 31:709-728.
4. Jaffe HL (1950). Aneurysmal bone cyst. Bull Hosp Joint Dis 11:3-13.
5. Frassica FJ, Waltrip RL, Sponseller PD, Ma LD, McCarthy EF Jr (1996). Clinicopathologic features and treatment of osteoid osteoma and osteoblastoma in children and adolescents. Orthop Clin North Am 27:559-574.
6. Carnesale PG (1998). Benign tumors of bone, in Canale ST (ed): Campbell's Operative Orthopaedics, 9th ed. St Louis: Mosby Year Book, vol 1, pp 683-702.
7. Scarborough MT, Moreau G (1996). Benign cartilage tumors. Orthop Clin North Am 27:583-589.
8. Schmale GA, Conrad EU III, Raskind WH (1994). The natural history of hereditary multiple exostoses. J Bone Joint Surg Am 76:986-992.
9. Copley L, Dormans JP (1996). Benign pediatric bone tumors: Evaluation and treatment. Pediatr Clin North Am 43:949-966.
10. Crone-Munzebrock W, Brassow F (1983). A comparison of radiographic and bone scan findings in histiocytosis X. Skeletal Radiol 9:170-173.
11. Tachdjian MO (1990). Pediatric Orthopedics, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, vol 2, pp 1163-1171, 1206-1217, 1251-1272.
12. Brien EW, Mirra JM, Kerr R (1997). Benign and malignant cartilage tumors of bone and joint: Their anatomic and theoretical basis with an emphasis on radiology, pathology and clinical biology: I. The intramedullary cartilage tumors. Skeletal Radiol 26:325-353.
13. Boriani S, Capanna R, Donati D, Levine A, Picci R, Savini R (1992). Osteoblastoma of the spine. Clin Orthop 278:37-45.
14. Madewell JE, Ragsdale BD, Sweet DE (1981). Radiologic and pathologic analysis of solitary bone lesions: Part I. Internal margins. Radiol Clin North Am 19:715-748.
15. Giudici MA, Moser RP Jr, Kransdorf MJ (1993). Cartilaginous bone tumors. Radiol Clin North Am 31:237-259.

16. Yasko AW, Fanning CV, Ayala AG, Carrasco CH, Murray JA (1998). Percutaneous techniques for the diagnosis and treatment of localized Langerhans-cell histiocytosis (eosinophilic granuloma of bone). J Bone Joint Surg Am 80:219-228.
17. Kransdorf MJ, Sweet DE (1995). Aneurysmal bone cyst: Concept, controversy, clinical presentation and imaging. AJR Am J Roentgenol 164:573-580.
18. Arata MA, Peterson HA, Dahlin DC (1981). Pathological fractures through nonossifying fibromas: Review of the Mayo Clinic experience. J Bone Joint Surg Am 63:980-988.
19. Kneisl JS, Simon MA (1992). Medical management compared with operative treatment for osteoid-osteoma. J Bone Joint Surg Am 74:179-185.
20. Ward WG, Eckardt JJ, Shayestehfar S, Mirra J, Grogen T, Oppenheim W (1993). Osteoid osteoma: Diagnosis and management with low morbidity. Clin Orthop 291:229-235.
21. Roger B, Bellin MF, Wioland M, Grenier P (1996). Osteoid osteoma: CT-guided percutaneous excision confirmed with immediate follow-up scintigraphy in 16 outpatients. Radiology 201:239-242.
22. Rosenthal DI, Hornicek FJ, Wolfe MW, Jennings LC, Gebhardt MC, Mankin HJ (1998). Percutaneous radiofrequency coagulation of osteoid osteoma compared with operative treatment. J Bone Joint Surg Am 80:815-821.
23. Enneking WF, Gearen PF (1986). Fibrous dysplasia of the femoral neck: Treatment by cortical bonegrafting. J Bone Joint Surg Am 68:1415-1422.
24. Scaglietti O, Marchetti PG, Bartolozzi P (1979). The effects of methylprednisolone acetate in the treatment of bone cysts: Results of three years follow-up. J Bone Joint Surg Br 61:200-204.
25. Capanna R, Springfield DS, Ruggieri P, et al (1985). Direct cortisone injection in eosinophilic granuloma of bone: A preliminary report on 11 patients. J Pediatr Orthop 5:339-342.

Σχετιζόμενη με διφωσφονικά οστεονέκρωση της γνάθου

Α. ΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΣ[1], Ε. ΜΗΤΣΙΟΚΑΠΑ[2], Α.Φ. ΜΑΥΡΟΓΕΝΗΣ[3], Π.Ι. ΠΑΠΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ[3]
[1] Χειρουργός Οδοντίατρος, Πάτρα
[2] Μονάδα Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης, Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών
[3] Α' Ορθοπαιδική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ», Αθήνα

Περίληψη

Τα διφωσφονικά χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τη θεραπεία καταστάσεων που συνδέονται με τον καρκίνο όπως οστικές μεταστάσεις, υπερασβεστιαιμία και οστεολυτικές βλάβες, και στη συνέχεια η χρήση τους εγκρίθηκε για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Η οστεονέκρωση της γνάθου αποτελεί σπάνια αλλά σοβαρή επιπλοκή των διφωσφονικών, με συνεχώς αυξανόμενη κλινική σημασία λόγω της συχνότερης χρήσης των διφωσφονικών σήμερα σε σχέση με το παρελθόν. Η αιτιολογία και η παθογένεια της οστεονέκρωσης της γνάθου παραμένουν άγνωστες.Έχουν αναγνωρισθεί δύο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου: η δραστικότητα και διάρκεια της θεραπείας με διφωσφονικά, και οι πρόσφατες οδοντιατρικές χειρουργικές επεμβάσεις. Η πρόληψη είναι ο σκοπός της σύγχρονης αντιμετώπισης. Η θεραπεία παραμένει εμπειρική και εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνοψη των σύγχρονων οδηγιών για την πρόληψη και θεραπεία της οστεονέκρωσης της γνάθου σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με διφωσφονικά.

Λέξεις κλειδιά: Διφωσφονικά, Οστεονέκρωση, Γνάθος

Bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw

A. MITROPOULOS[1], E. MITSIOKAPA[2], A.F. MAVROGENIS[3], P.J. PAPAGELOPOULOS[3]
[1] Dentist, Patras, Greece
[2] Department of Physical Medicine and Rehabilitation, University Hospital of Patras, Greece
[3] First Department of Orthopaedics, Athens University Medical School, "ATTIKON" University Hospital, Athens Greece

Summary

Bisphophonates have been initially used for the treatment of complications of cancer including bone metastases, hypercalcemia, lytic skeletal lesions, and recently for the management of osteoporosis. Osteonecrosis of the jaw is a rare and serious complication of bisphosphonate therapy. The problem is growing because biphosphonates are currently more commonly used than in the past. The etiopathogenesis of osteonecrosis of the jaw remainσ unknown. Two risk factors have been identified: the potency and length of bisphosphonate uptake, and recent dental intervention. Prevention is the mainstay of management. Treatment is based on experts opinion and depends on the stage of the disease. The purpose of the present study is to summarize the current guidelines for the prevention and management of osteonecrosis of the jaw in patients with bisphosphonates treatment.

Keywords: Bisphosphonates, Osteonecrosis, Jaw

Εισαγωγή

Τα διφωσφονικά αρχικά χρησιμοποιηθήκαν για την αντιμετώπιση καταστάσεων και επιπλοκών σχετιζόμενων με τον καρκίνο όπως οστικές μεταστάσεις, υπερασβεστιαιμία, και οστεολυτικές βλάβες. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση διαφόρων άλλων παθήσεων του σκελετού όπως συγγενείς σκελετικές παθήσεις στα παιδιά, και στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης (νεανική, μετεμμηνοπαυσιακή, μετά θεραπεία με κορτιζόνη, μετά μεταμόσχευση, από ακινητοποίηση, και από ανεπάρκεια των ανδρογόνων) [1,2].

Η οστεονέκρωση της γνάθου αποτελεί σπάνια αλλά σοβαρή επιπλοκή της θεραπείας με διφωσφονικά, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2003 [1-6]. Οι ασθενείς που δεν έχουν ιστορικό ακτινοθεραπείας,

οι οποίοι πρόσφατα ή κατά το παρελθόν έλαβαν διφωσφονικά και εκδηλώνουν συμπτώματα στη γναθοπροσωπική χώρα τα οποία επιμένουν για περισσότερο από 8 εβδομάδες, μπορεί να πάσχουν από σχετιζόμενη με διφωσφονικά οστεονέκρωση της γνάθου [1]. Ο κίνδυνος οστεονέκρωσης της γνάθου σε ασθενείς με κακοήθη νεοπλάσματα που αντιμετωπίσθηκαν με διφωσφονικά κυμαίνεται από 1% έως 11%, ανάλογα με το φάρμακο, τη δοσολογία και τη διάρκεια της θεραπείας με διφωσφονικά, και την εκτέλεση οδοντιατρικών ή σπανιότερα άλλων χειρουργικών επεμβάσεων στη στοματική κοιλότητα [2-5]. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, η συχνότητα οστεονέκρωσης της κάτω γνάθου είναι 7% έως 10% [2].

Κλινική εικόνα και αιτιοπαθογένεια

Η οστεονέκρωση είναι όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το θάνατο των κυττάρων των οστών (οστεοκύτταρα του φλοιώδους οστού και κύτταρα του μυελού των οστών στο σπογγώδες οστούν, όπως αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, στρωματικά κύτταρα, προ-οστεοβλάστες, ώριμες οστεοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, και οστεοκλάστες). Η οστεονέκρωση επίσης προκαλεί το θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων των οστών και των αγγείων των οστών με αποτέλεσμα μείωση της ροής του αίματος στο οστό. Συνεπώς, η οστεονέκρωση από μόνη της δεν είναι νόσος αλλά το τελικό αποτέλεσμα της διακοπής της ροής του αίματος στο οστούν από διάφορους παράγοντες.

Παρά το γεγονός ότι η αιτιοπαθογένεια της σχετιζόμενης με διφωσφονικά οστεονέκρωσης της γνάθου παραμένει ασαφής, διαφέρει κλινικά από τις υπόλοιπες μορφές οστεονέκρωσης. Η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται από επώδυνη διόγκωση και λοίμωξη της γνάθου, οίδημα των μαλακών ιστών, χαλάρωση των οδόντων, και αποκάλυψη του οστού. Σπανιότερα μπορεί να είναι ασυμπτωματική [7]. Όλες οι περιπτώσεις έχουν περιγραφεί στα οστά της κάτω και άνω γνάθου, με συχνότερη εντόπιση στην κάτω γνάθο (63%) σε σχέση με την άνω γνάθο (38%) [8]. Μία περίπτωση έχει αναφερθεί στα οστά του έξω ακουστικού πόρου [9]. Γενικά, η νόσος προσβάλλει περιοχές εντός της στοματικής κοιλότητας οι οποίες καλύπτονται από λεπτό και ευάλωτο βλεννογόνο, όπως οι υπερώες και η γλωσσική επιφάνεια της κάτω γνάθου [10].

Έχουν συσχετισθεί δύο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου με την αιτιοπαθογένεια της σχετιζόμενης με διφωσφονικά οστεονέκρωσης της γνάθου: η δραστικότητα του φαρμάκου και η διάρκεια της θεραπείας με διφωσφονικά, και οι πρόσφατες οδοντιατρικές χειρουργικές παρεμβάσεις στη στοματική κοιλότητα [1-6]. Τα κύρια διφωσφονικά που έχουν συνδεθεί με την εκδήλωση οστεονέκρωσης της γνάθου ήταν τα ενδοφλέβια χορηγούμενα διφωσφονικά ζολεδρονικό οξύ (Zometa®) και παμιδρονάτη (Aredia®). Ο κίνδυνος οστεονέκρωσης ήταν σημαντικά υψηλότερος με τη χορήγηση του ζολεδρονικού οξέος σε σχέση με την παμιδρονάτη [4,6]. Ο κίνδυνος ήταν 1% το πρώτο έτος και έως 21% το τρίτο έτος θεραπείας με ζολεδρονικό οξύ, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος σε ασθενείς που ελάμβαναν παμιδρονάτη ήταν 0% τα δύο πρώτα έτη θεραπείας και 7% στα τέσσερα έτη [6]. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις οστεονέκρωσης της γνάθου σε ασθενείς οι οποίοι ελάμβαναν από του στόματος διφωσφονικά όπως αλεδρονάτη (Fosamax®) και ρισεδρονάτη (Actonel®) [11,12]. Η ισχυρή συσχέτιση με τα δύο ενδοφλέβια χορηγούμενα διφωσφονικά μπορεί να σχετίζεται με τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα των ενδοφλέβιων συγκριτικά με εκείνη των από του στόματος χορηγούμενων διφωσφονικών. Ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ενδοφλέβια χορηγούμενων διφωσφονικών είναι βιοδιαθέσιμο για ενσωμάτων στην οστική θεμέλια ουσία συγκριτικά με περίπου 1% των από του στόματος χορηγούμενων διφωσφονικών που απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα [13].

Η διάρκεια της θεραπείας με διφωσφονικά έχει επίσης συσχετισθεί με την εκδήλωση οστεονέκρωσης της γνάθου: οι ασθενείς με οστεονέκρωση της γνάθου είχαν λάβει κατά μέσο όρο 35 εγχύσεις διφωσφονικών σε σύγκριση με 15 εγχύσεις σε ασθενείς χωρίς οστεονέκρωση της γνάθου. Περίπου το 70% των ασθενών που αναπτύσσουν οστεονέκρωση της γνάθου είχαν στο ιστορικό τους κάποια πρόσφατη οδοντιατρική ή άλλη χειρουργική επέμβαση στη στοματική κοιλότητα [10]. Ωστόσο, ακόμη και αυτόματη (χωρίς χειρουργική επέμβαση) σχετιζόμενη με διφωσφονικά οστεονέκρωση της γνάθου έχει αναφερθεί σε ποσοστό έως 30% των ασθενών [4].

Πρόληψη

Η πρόληψη είναι η καλύτερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση της σχετιζόμενης με διφωσφονικά οστεονέκρωσης της γνάθου [1-3]. Έχει σημασία να παρακολουθούνται κλινικά οι ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν διφωσφονικά για πρώιμα κλινικά σημεία εκδήλωσης της νόσου. Η πρόληψη θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- Πριν την έναρξη της θεραπείας με διφωσφονικά όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να υφίστανται οδοντιατρικό έλεγχο, να θεραπεύεται οποιαδήποτε πιθανή εγκατεστημένη λοίμωξη της στοματικής κοιλότητας, και να αντιμετωπίζονται δυνητικοί παράγοντες ανάπτυξης στοματικής λοίμωξης οι οποίοι αναγνωρίζονται από την οδοντιατρική εξέταση. Η οδοντιατρική θεραπεία θα πρέπει να περιλαμβάνει εξαγωγή οδόντων τα οποία δεν δύναται να διασωθούν, και να ολοκληρώνονται επανορθωτικές οδοντιατρικές χειρουργικές επεμβάσεις στη στοματική κοιλότητα με σκοπό τη στοματική υγιεινή. Μετά την ολοκλήρωση των οδοντιατρικών πράξεων, πριν την έναρξη της θεραπείας με διφωσφονικά θα πρέπει να επιτρέπεται ο απαραίτητος χρόνος για την πλήρη επούλωση των οδοντιατρικών χειρουργικών τραυμάτων, και οι ασθενείς να λαμβάνουν οδηγίες και να εκπαιδεύονται σχετικά με τους κανόνες στοματικής υγιεινής, την αποφυγή κακώσεων του στοματικού βλεννογόνου, και την έγκαιρη αναγνώριση κλινικών συμπτωμάτων που μπορεί να σχετίζονται με την εκδήλωση οστεονέκρωσης όπως πόνος, οίδημα, οστική προβολή ή/και αποκάλυψη οστού από το στοματικό βλεννογόνο [1-5].
- Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με διφωσφονικά, οι ασθενείς θα πρέπει να ακολουθούν αυστηρά τους κανόνες στοματικής υγιεινής και να αποφεύγουν μη επείγουσες επεμβάσεις στη στοματική κοιλότητα.
- Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται υπό θεραπεία με διφωσφονικά θα πρέπει να συστήνεται αυστηρή στοματική υγιεινή, αποφυγή οποιονδήποτε οδοντιατρικών χειρισμών που μπορεί να οδηγήσουν σε οστική βλάβη, τα δόντια που δεν μπορούν να διασωθούν δεν θα πρέπει να αφαιρούνται αλλά να αντιμετωπίζονται με ενδοδοντική θεραπεία, να αποφεύγεται η τοποθέτηση οδοντιατρικών γναθικών εμφυτευμάτων, και να γίνεται τακτική εξέταση από οδοντίατρο [1,3,4].
- Ασυμπτωματικοί ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται υπό θεραπεία με διφωσφονικά και χρειάζεται να υποβληθούν σε κοινές οδοντιατρικές επεμβάσεις θα πρέπει να ενημερώνονται για τον κίνδυνο εκδήλωσης οστεονέκρωσης της γνάθου, και τη σημασία διατήρησης ιδανικής στοματικής υγιεινής, προληπτικής οδοντικής υγείας, και άμεσης οδοντιατρικής εξέτασης σε περίπτωση εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων [1,2]. Ο κίνδυνος οστεονέκρωσης σε ασθενείς υπό θεραπεία με από τους στόματος διφωσφονικά είναι σημαντικά μικρότεροι συγκριτικά με εκείνους υπό ενδοφλέβια θεραπεία, αλλά εξαρτάται περισσότερο από τη διάρκεια της θεραπείας σε εκείνους υπό από του στόματος θεραπεία [12].
- Σε ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν διφωσφονικά για λιγότερο από τρία έτη και δεν έχουν παράγοντες κινδύνου δεν απαιτείται αναβολή της χειρουργικής επέμβασης στην στοματική κοιλότητα ή στη γναθοπροσωπική περιοχή [1]. Απλές οδοντιατρικές επεμβάσεις μπορεί να γίνουν στους ασθενείς αυτούς χωρίς κίνδυνο. Ωστόσο, εξαγωγές οδόντων και γναθοπροσωπικές επεμβάσεις θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς η πώρωση των οστών μπορεί να είναι μειονεκτική. Οι ασθενείς με αφαιρούμενες τεχνητές οδοντοστοιχίες θα πρέπει να εξετάζονται για περιοχές κάκωσης του στοματικού βλεννογόνου [10].
- Σε ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν διφωσφονικά για περισσότερο από τρία έτη και σε εκείνους οι οποίοι λαμβάνουν κορτικοστεροειδή μαζί με διφωσφονικά, η θεραπεία με διφωσφονικά θα πρέπει να διακόπτεται για τουλάχιστον τρεις μήνες πριν την οδοντιατρική επέμβαση, και να ξεκινά αφού έχει επέλθει πλήρης επούλωση του οδοντιατρικού/χειρουργικού τραύματος στη στοματική κοιλότητα [1].

Θεραπεία

Σε ασθενείς με κλινικά έκδηλη οστεονέκρωση της γνάθου, η διακοπή της θεραπείας και η επαναχορήγηση των διφωσφονικών (ειδικά για τα ενδοφλέβια χορηγούμενα) εξαρτάται από την αξιολόγηση των κινδύνων και τα οφέλη για τον ασθενή, τα οποία θα πρέπει να καθορίζονται σε συνεργασία από τον αιματολόγο/ογκολόγο και τον οδοντίατρο/γναθοχειρουργό [1]. Η διακοπή της θεραπείας με διφωσφονικά σχετίζεται με σταθεροποίηση της νόσου, αποφυγή επέκτασης ή εμφάνισης νέων εστιών οστεονέκρωσης, και σταδιακή βελτίωση της κλινικής εικόνας. Ωστόσο, η διακοπή της θεραπείας με διφωσφονικά για 6 έως 12 μήνες μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη ίαση ή αυτόματη απολυματοποίηση του προσβεβλημένου οστού [1].

Η θεραπεία της σχετιζόμενης με διφωσφονικά οστεονέκρωσης της γνάθου σήμερα είναι εμπειρική, και εξαρτάται από το κλινικό στάδιο της νόσου ανάλογα με την παρουσία ή απουσία κλινικών συμπτωμάτων των ασθενών (Πίνακας) [14]. Ο σκοπός της θεραπείας είναι η ανακούφιση από τον πόνο, ο έλεγχος της λοίμωξης, και η αναστολή της εξέλιξης της οστεονέκρωσης. Δυστυχώς, οι ασθενείς με σχετιζόμενη

Στάδιο	Θεραπεία
Στάδιο 0 Μη ειδικά κλινικά ευρήματα και συμπτώματα, απουσία οστεονέκρωσης ή αποκάλυψης του οστού, ασθενείς με θεραπεία με από τους στόματος ή ενδοφλέβια διφωσφονικά	Καμία θεραπεία, ενημέρωση και εκπαίδευση των ασθενών
Στάδιο 1 Οστεονέκρωση ή αποκάλυψη του οστού, ασυμπτωματικοί ασθενείς χωρίς σημεία λοίμωξης	Στοματικές πλύσεις με στοματικά διαλύματα με αντιβιοτικά, κλινική εξέταση κάθε τρεις μήνες, εκπαίδευση των ασθενών, αναθεώρηση των ενδείξων θεραπείας με διφωσφονικά
Στάδιο 2 Οστεονέκρωση ή αποκάλυψη του οστού με σημεία λοίμωξης (πόνος, ερυθρότητα, με ή χωρίς πυώδη έκκριση)	Στοματικές πλύσεις με στοματικά διαλύματα με αντιβιοτικά, από του στόματος αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, αναλγητικά, επιπολής καθαρισμός για νεαροποίηση και περιορισμό της λοίμωξης των μαλακών ιστών
Στάδιο 3 Οστεονέκρωση ή αποκάλυψη του οστού, λοίμωξη, και ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω: παθολογικό κάταγμα, συρίγγιο εκτός της στοματικής κοιλότητας, σημαντική οστεόλυση η οποία επεκτείνεται στο κάτω χείλος της γνάθου	Στοματικές πλύσεις με στοματικά διαλύματα με αντιβιοτικά, αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, αναλγητικά, χειρουργικός καθαρισμός του νεκρωτικού οστού και της λοίμωξης

Πίν. 1. Σταδιοποίηση και θεραπεία της σχετιζόμενης με διφωσφονικά οστεονέκρωσης της γνάθου. *(Από American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons)*.

με διφωσφονικά οστεονέκρωση της γνάθου δεν ανταποκρίνονται στις κλασσικές θεραπείες για οστεομυελίτιδα και μετακτινική οστεονέκρωση όπως η ευρεία χειρουργική εκτομή και το υπερβαρικό οξυγόνο. Ο χειρουργικός καθαρισμός του νεκρωτικού οστού είναι δύσκολος καθώς ολόκληρο το οστούν της γνάθου έχει συνήθως προσβληθεί (από τη δράση του διφωσφονικού ή τη νόσο). Για το λόγο αυτό, η χειρουργική θεραπεία θα πρέπει να καθυστερεί όσο το δυνατό καθώς τα χειρουργικά τραύματα μπορεί να οδηγήσουν σε επέκταση της οστεονέκρωσης [1,2]. Η χειρουργική θεραπεία ενδείκνυται για ασθενείς με οστεονέκρωση της γνάθου σταδίου 3 και για εκείνους με οστικά απολύματα [1].

Correspondence
Andreas Mitropoulos,
48-50 Riga Fereou Str,
PC 26221, Patra, Greece
E-mail: ametros@hotmail.com

Αλληλογραφία
Ανδρέας Μητρόπουλος,
Ρήγα Φεραίου 48-50,
ΤΚ 26221, Πάτρα
E-mail: ametros@hotmail.com

Βιβλιογραφία

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, et al (2009). American 1 Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. Austral Endodontic J 35:119-130.
2. Drake MT, Clarke BL, Khosla S (2008). Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. Mayo Clinic Proc 83:1032-1045.
3. Kyle RA, Yee GC, Somerfield MR, et al (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 clinical practice guideline up-date on the role of bisphosphonates in multiple myeloma. J Clin Oncol 25:2464-2472.

4. Lacy MQ, Dispenzieri A, Gertz MA, et al (2006). Mayo clinic consensus statement for the use of bisphosphonates in multiple myeloma. Mayo Clinic Proc 81:1047-1053.
5. Terpos E, Sezer O, Croucher PI, et al (2009). The use of bisphosphonates in multiple myeloma: Recommendations of an expert panel on behalf of the European Mye-loma Network. Ann Oncol 20:1303-1317.
6. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, et al (2005). Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. J Clin Oncol 23:8580-8587.
7. Marx RE (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 61:1115-1117.
8. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. J Oral Maxillofac Surg 63:1567-1575.
9. Polizzotto MN, Cousins V, Schwarer AP (2006). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. Br J Haematol 132:114.
10. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM (2005). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone. An emerging oral complication of supportive cancer therapy. Cancer 104: 83–93.
11. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg 62:527-534.
12. American Dental Association Council on Scientific and Affairs (2006). Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. J Am Dent Assoc 137:1144-1150.
13. Ezra A, Golomb G (2000). Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. Adv Drug Deliv Rev 42:175-195.
14. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E (2006). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102:433-441.

Θράκης 2, 151 24 Μαρούσι
Τηλ./FAX: 210-6128606
E-mail: eemmo@otenet.gr

Οδηγίες προς τους συγγραφείς

Το «ΟΣΤΟΥΝ», επιστημονικό όργανο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών, έχει σκοπό την ενημέρωση και επιμόρφωση των ιατρών πάνω στον τομέα της φυσιολογίας και παθολογίας του μυοσκελετικού συστήματος και ειδικότερα των Μεταβολικών Νοσημάτων των Οστών. Για την πραγμάτωση του σκοπού αυτού το περιοδικό δημοσιεύει:

- Άρθρα του εκδότη.
- Ξένες δημοσιεύσεις. Γράφονται από ξένο, διαπρεπή συγγραφέα κατόπιν συνεννοήσεως με τη συντακτική επιτροπή. Μεταφράζονται με ευθύνη της συντακτικής επιτροπής.
- Ανασκοπήσεις. Ολοκληρωμένες αναλύσεις ιατρικών θεμάτων στις οποίες θα υπογραμμίζονται ιδιαίτερα οι σύγχρονες απόψεις.
- Κλινικές και εργαστηριακές μελέτες.
- Ερευνητικές εργασίες.
- Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις (Case Reports).
- Σεμινάρια, στρογγύλες τράπεζες, συμπόσια.
- Επίκαιρα θέματα. Σύντομη περιγραφή των τελευταίων απόψεων σε συγκεκριμένο θέμα.
- Γράμματα προς τον Εκδότη.

Έκταση άρθρων: Οι ανασκοπήσεις δεν πρέπει να ξεπερνούν τις 7.500 λέξεις (25 δακτυλογραφημένες σελίδες). Η σύνταξη διατηρεί το δικαίωμα να δημοσιεύει άρθρα ανασκόπησης με μεγαλύτερη έκταση. Οι ερευνητικές εργασίες, καθώς και οι κλινικές και εργαστηριακές μελέτες, δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 3.500 λέξεις. Οι ενδιαφέρουσες περιπτώσεις και τα επίκαιρα θέματα δεν πρέπει να ξεπερνούν τις 1.000 λέξεις και τα γράμματα προς τον Εκδότη τις 400 λέξεις.

Σύνταξη των κειμένων: Τα άρθρα πρέπει να είναι δακτυλογραφημένα με διπλό διάστημα, σε λευκό χαρτί, στη μία μόνο όψη, με περιθώρια τουλάχιστον 3.5 εκ. Σε ξεχωριστή σελίδα γράφονται ο τίτλος, η Ελληνική περίληψη με τους όρους ευρετηρίου, η Αγγλική περίληψη, το κείμενο, οι βιβλιογραφικές παραπομπές, οι πίνακες, οι εικόνες και οι λεζάντες των εικόνων. Η αρίθμηση των σελίδων αρχίζει από τη σελίδα με τον τίτλο. Οι αριθμοί αναγράφονται στο άνω δεξιό μέρος κάθε σελίδας.

Σελίδα με τον τίτλο: Περιλαμβάνει: 1) τον τίτλο του άρθρου, 2) το όνομα του (ων) συγγραφέα (ων), 3) το ίδρυμα από το οποίο προέρχεται η εργασία, 4) το όνομα, διεύθυνση και τηλέφωνο του συγγραφέα, 5) ενδεχόμενες πηγές που ενίσχυσαν και βοήθησαν στην πραγματοποίηση της εργασίας.

Ελληνική περίληψη και όροι ευρετηρίου: Η περίληψη πρέπει να είναι ουσιαστική και κατατοπιστική και να μην υπερβαίνει τις 200 λέξεις. Μετά την περίληψη παρατίθενται 3-10 λέξεις (όροι ή μικρές φράσεις) ευρετηριασμού, απαραίτητες για τη σύνταξη των ευρετηρίων του περιοδικού. Οι λέξεις αυτές πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους λεξικογράφησης που χρησιμοποιεί το Index Medicus.

Αγγλική περίληψη (Summary): Στην Αγγλική περίληψη πρέπει να περιλαμβάνονται ο τίτλος και τα ονόματα των συγγραφέων. Η περίληψη πρέπει να είναι εκτεταμένη και να αποτελεί πραγματική σύνοψη του κειμένου. Την αγγλική περίληψη συνοδεύουν οι όροι ευρετηριασμού επίσης στα Αγγλικά.

Βιβλιογραφικές παραπομπές: Η βιβλιογραφία και οι βιβλιογραφικές παραπομπές στο κείμενο θα τοποθετούνται με αριθμητική σειρά. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο απαραίτητες βιβλιογραφικές παραπομπές που θα αναφέρονται στο κείμενο. Όταν σε ένα σημείο του κειμένου χρειάζονται πολλές παραπομπές, τότε αναφέρονται με χρονολογική σειρά. Αναγράφονται κατά σειρά τα επώνυμα, τα αρχικά των ονομάτων των συγγραφέων, το έτος δημοσιεύσεως (σε παρένθεση), ο τίτλος της εργασίας, το όνομα του περιοδικού, ο τόμος και η πρώτη σελίδα του άρθρου, με τις συντομεύσεις που αναφέρονται στο Index Medicus π.χ.

Handler NM (1985) Osteoarthritis as a public health problem.
Clin Rheum Dis 11:175

Προκειμένου για βιβλίο θα αναφέρεται το όνομα του συγγραφέα, η χρονολογία εκδόσεως, ο τίτλος, ο εκδοτικός οίκος και η πόλη που εκδόθηκε το βιβλίο π.χ.

Rasmussen H. Bordier PJ (1974). The Physiological and Cellular Basis of Metabolic Bone Disease. Williams and Wilkins. Baltimore.

Καλούνται οι συγγραφείς να ερευνούν την Ελληνική βιβλιογραφία και να αναφέρονται στους Έλληνες συγγραφείς.

Πίνακες: Δακτυλογραφούνται με διπλό διάστημα σε χωριστή σελίδα ο καθένας. Αναφέρονται στο κείμενο και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς. Πρέπει να συνοδεύονται από περιεκτική, σύντομη λεζάντα, ώστε για την κατανόησή τους να μην είναι απαραίτητη η αναφορά του αναγνώστη στο κείμενο.

Εικόνες (σχήματα, φωτογραφίες): Τα σχήματα (σχεδιαγράμματα) πρέπει να γίνονται σε ριζόχαρτο με σινική μελάνη ή ραπιντογράφο. Το ίδιο ισχύει και για τα στοιχεία που αναφέρονται σε αυτά. Οι φωτογραφίες πρέπει να είναι ασπρόμαυρες, τυπωμένες σε γυαλιστερό χαρτί, στο πίσω μέρος του οποίου να σημειώνεται με απλό μολύβι το όνομα του συγγραφέα και ο αριθμός της εικόνας όπως μπαίνει στο κείμενο. Ένα βέλος δείχνει το πάνω μέρος της φωτογραφίας. Εάν χρησιμοποιηθούν εικόνες ασθενών θα πρέπει τα πρόσωπά τους να μην διακρίνονται, αλλιώς θα πρέπει να υποβληθεί στη Σύνταξη έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς για τη δημοσίευση των φωτογραφιών. Εάν μία φωτογραφία έχει δημοσιευθεί αλλού πρέπει να συνοδεύεται από γραπτή άδεια του εκδότη που έχει το copyright αναδημοσίευσης της φωτογραφίας. Στη λεζάντα της φωτογραφίας θα πρέπει να αναφέρεται η πηγή προέλευσής της. Οι λεζάντες των σχημάτων και των φωτογραφιών δακτυλογραφούνται με διπλό διάστημα, σε ξεχωριστή σελίδα και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς.

Γλώσσα: Ως γλώσσα του περιοδικού θεωρείται η νεοελληνική και ως σύστημα γραφής το μονοτονικό. Ξένοι όροι πρέπει να αποφεύγονται, ιδίως όταν υπάρχουν αντίστοιχοι Ελληνικοί σε χρήση. Αν ο Ελληνικός όρος θεωρηθεί αδόκιμος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο ξενικός σε παρένθεση.

Τα άρθρα που υποβάλλονται θα θεωρούνται για δημοσίευση με την προϋπόθεση ότι τα αποτελέσματα ή το ίδιο το κείμενο δεν έχουν δημοσιευθεί και δεν έχουν υποβληθεί για δημοσίευση σε άλλο περιοδικό. Ό,τι δημοσιεύεται στο «ΟΣΤΟΥΝ» δεν μπορεί να αναδημοσιευθεί χωρίς τη γραπτή έγκριση του Διευθυντή Σύνταξης.

Τα προς δημοσίευση άρθρα θα πρέπει να στέλνονται σε 3 πλήρη αντίγραφα, με συνοδευτική επιστολή, στη διεύθυνση: «ΟΣΤΟΥΝ», Διευθυντή Σύνταξης, Θράκης 2, 151 24 Μαρούσι.

Προσεχείς Επιστημονικές Εκδηλώσεις

27 Ιουνίου - 1 Ιουλίου 2012

8ο ΘΕΡΙΝΟ ΣΧΟΛΕΙΟ, ΕΕΜΜΟ
Royal Myconian Hotel, Μύκονος
Διοργάνωση: Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών
Θράκης 2, 15124, Μαρούσι
Τηλ./Fax: 210 6128606
E-mail: info@eemmo.gr
Website: www.eemmo.gr
Οργάνωση-Γραμματεία: PCO-CONVIN S.A.,
Κ. Βάρναλη 29, 15233 Χαλάνδρι
Τηλ.: 210 6833600
Fax: 210 6847700
Email: congress@pco-convin.gr

28-30 Σεπτεμβρίου 2012

20ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΕΜΜΟ
Avra Imperial Hotel, Χανιά
Διοργάνωση: Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών
Θράκης 2, 15124, Μαρούσι
Τηλ./Fax: 210 6128606
E-mail: info@eemmo.gr
Website: www.eemmo.gr
Οργάνωση-Γραμματεία: PCO-CONVIN S.A.,
Κ. Βάρναλη 29, 15233 Χαλάνδρι
Τηλ.: 210 6833600
Fax: 210 6847700
Email: congress@pco-convin.gr

1-4 July 2012

OSTEOPOROSIS AND BONE CONFERENCE 2012
Manchester Central Convention Complex
Conference Secretariat:
HG3 Conferences
First Floor
Hornbeam Business Park
Hookstone Road
Harrogate
HG2 8QT
Tel.: +44 (0)843 289 4750
Fax: +44 (0)1423 855999
Email: joanne.mcbratney@hg3.co.uk
Website: www.nos.org.uk/conference

November 29 - December 1, 2012

IOF-ECCEO 12
INTERNATIONAL CONFERENCE ON PROGRESS IN BONE AND MINERAL RESEARCH 2012
Vienna / Austria
Contact: Conference Secretariat,
Vienna Academy of Postgraduate Medical Education and Research
Tel.: 011-43-1-40-513-8335
Fax: 011-43-1-40-513-8318
Email: bone2012@medacad.org
Website: http://www.ausbmr.at/ausbmr.htm

Calcioral D3

STRONG COMBINATION FOR STRONG BONES

1 δισκίο την ημέρα

Πριν 21 mm Τώρα 18 mm

Λιγότερες λήψεις φαρμάκου ημερησίως - Καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς.[1]

Συσκευασία των 30 μασώμενων δισκίων - Λ.Τ.: 9,22 €
(σε περίπτωση τροποποίησης του ΔΤ ισχύει η νεότερη τιμή)
Τρόπος Διάθεσης: Χορηγείται με Ιατρική Συνταγή

1. Claxton A. et al CLIN THERAPEUTICS/VOL 23, NO.8, 2001

CalD 005-11-2011

www.pitsilidis.gr

Για περισσότερες πληροφορίες απευθυνθείτε στην εταιρία:

Takeda NYCOMED

Nycomed: a Takeda Company

Λ. Κηφισίας 196, Χαλάνδρι, 152 31 Αθήνα,
Τηλ.: 210 67 29 570, Fax: 210 67 29 571
Λ. Καραμανλή 60, 546 42 Θεσ/νίκη,
Τηλ.: 2310 87 04 80, Fax: 2310 87 04 79
www.nycomed.gr

Calcioral D3

STRONG COMBINATION FOR STRONG BONES

1000mg ασβέστιο
και 800 IU βιταμίνη D3

Το όφελος του ασθενή σας δικαιώνει την επιλογή σας

Δύναμη και ποιότητα ξανά

Preo 005-11-2011

ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ Το Preotact περιέχει παραθορμόνη που παράγεται με χρήση στελέχους Escherichia coli τροποποιημένου με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Το φαρμακευτικό προϊόν διατίθεται σε δίχωρο φυσίγγιο. Ο πρώτος χώρος περιέχει 1,61 mg παραθορμόνης. Κάθε δόση 71,4 μικρολίτρων περιέχει 100 μικρογραμμάρια παραθορμόνης. Κάθε φυσίγγιο περιέχει 14 δόσεις.Ο δεύτερος χώρος περιέχει στείρο διαλύτη για ανασύσταση. **ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ** Κόνις και διαλύτης για ενέσιμο διάλυμα. Λευκή έως υπόλευκη κόνις και διαυγής, άχρωμος διαλύτης. **Θεραπευτικές Ενδείξεις.** Θεραπεία της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υψηλό κίνδυνο καταγμάτων. **Δοσολογία και τρόπος χορήγησης.** Η συνιστώμενη δόση είναι 100 μικρογραμμάρια παραθορμόνης χορηγούμενα άπαξ ημερησίως ως υποδόρια ένεση στην κοιλιά. **Αντενδείξεις** Το Preotact αντενδείκνυται σε ασθενείς: με υπερευαισθησία στην παραθορμόνη ή σε κάποιο από τα έκδοχα, που έχουν προηγουμένως υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία του σκελετού, με προϋπάρχουσα υπερασβεστιαιμία και άλλες διαταραχές του μεταβολισμού φωσφόρου- ασβεστίου, με μεταβολικές νόσους των οστών άλλες από την πρωτοπαθή οστεοπόρωση (περιλαμβανομένων του υπερπαραθυρεοειδισμού και της οστικής νόσου του Paget),με ανεξήγητες αυξήσεις του οστικού κλάσματος της αλκαλικής φωσφατάσης, με σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία,με σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία. **Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση** Ασθενείς που ξεκινούν τη θεραπεία με το Preotact πρέπει να παρακολουθούνται στους μήνες 1, 3 και 6 για αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στον ορό ή/και στα ούρα. Παρακολούθηση πέραν των 6 μηνών δε συνιστάται για ασθενείς των οποίων το ολικό ασβέστιο στον ορό είναι εντός των φυσιολογικών ορίων στους 6 μήνες.Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με το Preotact παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στον ορό. Οι συγκεντρώσεις του ασβεστίου στον ορό φθάνουν ένα μέγιστο μεταξύ 6 και 8 ωρών μετά τη χορήγηση και φυσιολογικά επανέρχονται στις αρχικές τιμές σε 20 έως 24 ώρες μετά κάθε χορήγηση παραθορμόνης. Επομένως εάν οποιαδήποτε δείγματα αίματος λαμβάνονται από έναν ασθενή για την παρακολούθηση των επιπέδων ασβεστίου, αυτό πρέπει να γίνεται τουλάχιστον 20 ώρες μετά την πιο πρόσφατη ένεση. Αντιμετώπιση του αυξημένου ασβεστίου στον ορό Ασθενείς με επίμονα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στον ορό (πάνω από το ανώτερο φυσιολογικό επίπεδο) πρέπει να αξιολογούνται για υποκείμενη νόσο (π.χ. υπερπαραθυρεοειδισμό). Εάν δε βρεθεί υποκείμενη κατάσταση, οι εξής διαδικασίες αντιμετώπισης πρέπει να ακολουθούνται: Η χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D πρέπει να διακοπεί.Η συχνότητα χορήγησης του Preotact πρέπει να μεταβληθεί σε 100 μικρογραμμάρια μέρα παρά μέρα. Εάν τα αυξημένα επίπεδα συνεχίζονται, η θεραπεία με το Preotact πρέπει να διακοπεί και η ασθενής να παρακολουθείται μέχρι οι μη φυσιολογικές τιμές να επανέλθουν στο φυσιολογικό. Ασθενείς με προϋπάρχουσα υπερασβεστιαιμία ή/και υπερασβεστιουρία Το Preotact έχει μελετηθεί σε ασθενείς με προϋπάρχουσα υπερασβεστιαιμία ή/και υπερασβεστιουρία. Σε αυτές τις ασθενείς, η θεραπεία με το Preotact ήταν περισσότερο πιθανό να επιδεινώσει την υποκείμενη υπερασβεστιαιμία ή/και υπερασβεστιουρία τους.Το Preotact δεν έχει μελετηθεί σε ασθενείς με ενεργό ουρολιθίαση. Το Preotact πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή σε ασθενείς με ενεργό ή προηγούμενη ουρολιθίαση.Προσοχή απαιτείται σε ασθενείς που λαμβάνουν καρδιακούς γλυκοσίδες. Μελέτες σε αρουραίους δείχνουν αυξημένη επίπτωση οστεοσαρκώματος με μακροχρόνια χορήγηση Preotact. Η εμφάνιση οστεοσαρκώματος παρατηρήθηκε μόνο σε δόσεις που οδηγούσαν σε συστηματικές εκθέσεις ≥ αυτής που είναι 27 φορές υψηλότερη από την παρατηρούμενη σε ανθρώπους με τη δόση των 100 μικρογραμμαρίων. Μέχρι περαιτέρω κλινικά δεδομένα να είναι διαθέσιμα, ο συνιστώμενος χρόνος θεραπείας των 24 μηνών δεν πρέπει να υπερβαίνεται.Το Preotact περιέχει μετακρεσόλη που μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις. Αυτό το φαρμακευτικό προϊόν περιέχει λιγότερο από 1 mmol νατρίου (23 mg) ανά δόση. **Ανεπιθύμητες ενέργειες** Τα πιο κάτω στοιχεία ανεπιθύμητων ενεργειών βασίζονται σε δύο μελέτες ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο που περιλάμβαναν 2642 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση από τις οποίες 1341 έλαβαν παραθορμόνη. Περίπου το 71,4 % των ασθενών που έλαβαν παραθορμόνη ανέφεραν τουλάχιστον μια ανεπιθύμητη ενέργεια.Η υπερασβεστιαιμία ή/και η υπερασβεστιουρία αντιπροσωπεύουν τις γνωστές φαρμακοδυναμικές δράσεις της παραθορμόνης στο γαστρεντερικό σωλήνα, στους νεφρούς και στα οστά. Η υπερασβεστιαιμία αναφέρθηκε στο 25,3 % των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το Preotact και η υπερασβεστιουρία αναφέρθηκε στο 39,3 % των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το Preotact. Η υπερασβεστιαιμία ήταν παροδική και αναφέρθηκε πιο συχνά στους πρώτους 3 μήνες της θεραπείας. Ελεγχόταν κατά τη διάρκεια του κλινικού προγράμματος με παρακολούθηση των εργαστηριακών τιμών και τη χρήση προκαθορισμένου αλγορίθμου ελέγχου.Η μόνη άλλη πολύ συχνά αναφερόμενη ανεπιθύμητη ενέργεια ήταν η ναυτία. Το Preotact αυξάνει τις συγκεντρώσεις ουρικού οξέος στον ορό. Για όλα τα άτομα που έλαβαν 100 μικρογραμμάρια παραθορμόνης, αύξηση του ουρικού οξέος του αίματος αναφέρθηκε για 8 άτομα (0,6 %) και υπερουριχαιμία αναφέρθηκε για 5 άτομα (0,4 %). Αν και ουρική αρθρίτιδα, αρθραλγία και νεφρολιθίαση αναφέρθηκαν ως ανεπιθύμητες ενέργειες, δεν έχει πλήρως επιβεβαιωθεί η συσχέτιση με τις αυξήσεις στα επίπεδα ουρικού οξέος εξαιτίας της χορήγησης του Preotact. Αντισώματα στην παραθορμόνη Σε μια μεγάλη κλινική μελέτη φάσης III, αντισώματα στην παραθορμόνη ανιχνεύθηκαν στο 3 % των γυναικών που ελάμβαναν Preotact σε σύγκριση με το 0,2 % των γυναικών που ελάμβαναν εικονικό φάρμακο. Σε αυτές τις γυναίκες με θετικό τίτλο, δεν υπήρξε ένδειξη αντιδράσεων υπερευαισθησίας, αλλεργικών αντιδράσεων, επιδράσεων στην ανταπόκριση της οστικής πυκνότητας ή επιδράσεων στο ασβέστιο του ορού. **ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ** Nycomed Danmark ApS Langebjerg 1 DK-4000 Roskilde, Δανία.
Λ.Τ. 466,12 €. **Ποσοστό Επιχορήγησης από τους Οργανισμούς Κοινωνικών Ασφαλίσεων 90%**
(σε περίπτωση τροποποίησης του ΔΤ ισχύει η νεότερη τιμή)

ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ
Χορηγείται με ιατρική συνταγή

Για περισσότερες πληροφορίες απευθυνθείτε στην εταιρία.

Takeda NYCOMED
Nycomed: a Takeda Company

Λ. Κηφισίας 196, Χαλάνδρι, 152 31 Αθήνα,
Τηλ.: 210 67 29 570, Fax: 210 67 29 571
Λ. Καραμανλή 60, 546 42 Θεσ/νίκη,
Τηλ.: 2310 87 04 80, Fax: 2310 87 04 79
www.nycomed.gr

Preotact®
(ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΟΣΤΙΚΟΣ ΟΡΜΟΝΗ (rDNA))

Παράγει οστούν, εμπιστοσύνη και ελπίδα