



**University of Crete** Faculty of Medicine

**ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ  
ΜΕ ΟΣΤΙΚΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ – 7 ΚΑΙ  
ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ  
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ  
ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ  
ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ:  
ΚΛΙΝΙΚΗ, *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Ελευθερίου Αιμιλίου Τσιρίδη**

**Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης**

**Ηράκλειο Κρήτης, Απρίλιος 2004**

## Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής: Αλέξανδρος Χατζηπαύλου,  
Καθηγητής Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας,  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη: Χαράλαμπος Σαββάκης,  
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής,  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Lucy DiSilvio,  
Senior Lecturer, Department of Musculoskeletal Sciences,  
University College London and Royal Free Medical School,  
University of London, UK

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον καθηγητή Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας κ. Αλέξανδρο Χατζηπαύλου για την ανάθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την τεχνική και επιστημονική υποστήριξη στην διεκπεραίωσή της και για την συμβολή του στην εισαγωγή μέρους της ερευνητικής εργασίας μου στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης.

Ευχαριστώ τον καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής κ. Χαράλαμπο Σαββάκη για την υποστήριξη, τη συνεπή καθοδήγηση και την ενθάρρυνση κατά τη διάρκεια των επισκέψεων μου στην Κρήτη.

Ευχαριστώ την καθηγήτρια Βιολογίας κ. Lucy DiSilvio για τη μακρόχρονη φιλία της, τη συνεχή υποστήριξή της, τη στενή επιτήρηση των εργαστηριακών μελετών της παρούσας διατριβής και για τη συμβολή της στην εισαγωγή μου στο πεδίο έρευνας της ιστικής μηχανικής του οστού.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον καθηγητή Αγγειοχειρουργικής κ. Αστέριο Κατσαμούρη για την αδιάκοπη συμβολή του ως μέντορα στην ανάπτυξη της καριέρας μου στην χειρουργική και την έρευνα. Επίσης τον ευχαριστώ πολύ για την ειλικρινή του φιλία, την αμέριστη ενθάρρυνση και το συνεχές ενδιαφέρον του κατά τη διεξαγωγή της Διδακτορικής μου Διατριβής, καθώς και για την κριτική ανάγνωση και βελτίωση του τελικού κειμένου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους Διευθυντές Ορθοπαιδικούς Χειρουργούς Graham Gie και John Timperley (Princess Elizabeth Orthopaedic Centre, Royal Devon and Exeter Hospital, Exeter, UK) για την πρόσβαση στους ασθενείς της Μελέτης I, τους καθηγητές George Bentley, Allen Goodship και

Martin Ferguson-Pell (Institute of Orthopaedics, Royal National Orthopaedic Hospital, Stanmore, UK), και τους τεχνικούς του εργαστηρίου της Dr Lucy DiSilvio, Dr P Sarathchandra, Dr N Gurav, κκ. A Bhalla, Z Ali, I Rushdi και M Kayser (Department of Musculoskeletal Science, Institute of Orthopaedics, Royal National Orthopaedic Hospital, Stanmore, UK) για την υποστήριξη στην διεκπεραίωση των Μελετών II, III και IV και τον καθηγητή Gordon Blunn (Department of Biomedical Engineering, Institute of Orthopaedics, Royal National Orthopaedic Hospital, Stanmore, UK) για την τεχνική υποστήριξη στην πάκτωση του μοσχεύματος στις Μελέτες II, III και IV.

Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή Ορθοπαιδικής Χειρουργικής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης Thomas Einhorn για την κριτική ανάγνωση των εργαστηριακών μελετών.

Για τη λεπτομερή φιλολογική επιμέλεια και γενική παρουσίαση του κειμένου, ευχαριστώ θερμά τη φιλόλογο Καίτη Σμπώκου. Για την επιμέλεια της μετάφρασης των ιατρικών όρων από την αγγλική στην ελληνική γλώσσα, ευχαριστώ θερμά τους λοχαγούς ιατρούς Θεόδωρο Τσάχαλη και Ευγένιο Τσιρίδη.

Τέλος, ιδιαίτερα ευχαριστώ το Κοινωφελές Ίδρυμα «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης» για την υποτροφία διδακτορικών σπουδών που μου χορήγησε για τα έτη 2001-2003 και το Εθνικό Σύστημα Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας (NHS) για την χρηματική επιχορήγηση «Culyer Award» προκειμένου να ολοκληρωθούν οι εργαστηριακές μελέτες της παρούσας διατριβής.

*Στην αγαπημένη μου σύζυγο,  
ψυχίατρο Εύα Μαρία Τσαπάκη-Τσιρίδη,  
για την αστείρευτη συμπαράστασή της  
που δίνει νόημα στον καθημερινό μου αγώνα.*

*Στους γονείς μου Αιμίλιο, Αλίκη, Ιωάννη<sup>†</sup> και Χριστοθέα  
Στα αδέρφια μου Ευγένιο και Ελένη*

*Every apparent blessing  
contains the seeds of danger,  
every area of trouble gives out a ray of hope;  
and the one unchangeable certainty is that  
nothing is certain or unchangeable.*

**John Fitzgerald Kennedy**

[τελευταία προσφώνηση  
στο Αμερικανικό Κοινοβούλιο πριν  
τη δολοφονία του (1963)]

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. **Tsiridis E**, Narvani AA, Haddad FS, Timperley JA, and Gie GA (2004) Impaction femoral allografting and cemented revision for periprosthetic femoral fractures. *J Bone Joint Surg Br*, in press.
2. **Tsiridis E**, Narvani AA, Timperley JA, Gie GA (2004) Dynamic compression plates for Vancouver type B periprosthetic femoral fractures. A critical review of 18 cases with a mean follow-up of 39.9 months. *Acta Orthop Scand*, in press.
3. DiSilvio L, Gurav N, and **Tsiridis E** (2004) Bone Tissue Engineering. In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Wnek GE and Bowlin GL (eds), New York, NY: Marcel Dekker, Inc. pp. 1600, in press.
4. **Tsiridis E**, Ali Z, Bhalla A, Bentley G, Goodship A, and DiSilvio L (2004) *In vitro* and *in vivo* osteoinductive activity of impacted demineralised bone matrix and bone allograft with and without OP-1. *Clin Orthop*, submitted.
5. **Tsiridis E** (2003) The Mennen femoral plate for fixation of periprosthetic femoral fractures following hip arthroplasty. *Injury*, 34: 799.
6. **Tsiridis E** and Narvani A (2003) Mennen plate fixation for the treatment of periprosthetic femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A: 1851.
7. **Tsiridis E**, Haddad FS, and Gie GA (2003) Dall-Miles plates for periprosthetic femoral fractures. A critical review of 16 cases. *Injury*, 34: 107.
8. **Tsiridis E**, Haddad FS, and Gie GA (2003) The management of periprosthetic femoral fractures around hip replacements. *Injury*, 34: 95.
9. Bhalla A, **Tsiridis E**, Goodship AE, and DiSilvio L. (2002) Enhancing the osseointegrative properties of hydroxyapatite by the addition of human mesenchymal stem cells, and recombinant human osteogenic protein 1 (BMP-7). *Eur Cells Mater*, 4 (Suppl. 2): 129.
10. Ali Z, DiSilvio L, Goodship AE, and **Tsiridis E** (2002) Addition of human mesenchymal stem cells and osteogenic protein-1 to demineralised bone matrix and insoluble collagenous matrix results in *de novo* bone formation. *Eur Cells Mater*, 4 (Suppl. 2): 127.
11. **Tsiridis E** and Gie GA (2002) Mal-united femoral fractures adjacent to loose total hip arthroplasties. Salvage with impaction grafting. A case report. *Injury*, 33: 81.
12. Heliotis M and **Tsiridis EE** (2001) Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Med Hypotheses*, 57: 675.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	<b>2</b>
<b>I. ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ</b>	<b>2</b>
<b>1. Κύτταρα</b>	<b>5</b>
<i>Μικτά κύτταρα του μυελού των οστών</i>	<b>6</b>
<i>Πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών των Ενηλίκων</i>	<b>6</b>
<i>Πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά εμβρυικά κύτταρα</i>	<b>8</b>
<i>Γενετικά διαφοροποιημένα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα</i>	<b>8</b>
<i>Διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες</i>	<b>9</b>
<b>2. Εκμαγεία</b>	<b>10</b>
<b>i. Βιολογικά Εκμαγεία</b>	<b>10</b>
<i>Αυτομόσχευμα και αλλομόσχευμα</i>	<b>10</b>
<i>Αποασβεστοποιημένο οστό</i>	<b>11</b>
<b>ii. Εκμαγεία Σιλικόνης</b>	<b>14</b>
<b>iii. Κεραμικά Εκμαγεία</b>	<b>14</b>
<i>Υδροξυαπατίτης</i>	<b>15</b>
<i>Ανθρακικό ασβέστιο και τριφωσφορικό ασβέστιο</i>	<b>16</b>
<i>Κεραμικά με οστεογενετικές πρωτεΐνες</i>	<b>16</b>
<b>iv. Πολυμερή</b>	<b>16</b>
<b>v. Πρόσφατες και μελλοντικές εφαρμογές στην τεχνολογία των εκμαγείων</b>	<b>17</b>
<i>Πόρωση του εκμαγείου</i>	<b>17</b>



<i>Η αρχιτεκτονική επιφανείας του εκμαγείου</i>	17
<i>Βιοαπορροφησιμότητα του εκμαγείου</i>	18
<i>Νανοτοπογραφία και βιομιμική του εκμαγείου</i>	18
<i>Παρασκευή εκμαγείων χωρίς επεξεργασία με διαλυτικά ή θερμότητα (supercritical fluid technology)</i>	19
<b>3. Αυξητικοί Παράγοντες</b>	19
<b>II. ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΑ ΚΑΤΑΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ: ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	23
<b>1. Επιδημιολογία</b>	23
<b>2. Ταξινόμηση</b>	24
<b>3. Παράγοντες κινδύνου</b>	26
<b>4. Πρόληψη</b>	27
<b>5. Θεραπεία</b>	28
<b>i. Συντηρητική θεραπεία</b>	28
<b>ii. Χειρουργική θεραπεία</b>	29
<i>Αναθεώρηση της αρθροπλαστικής</i>	30
<i>Ανοικτή ανάταξη και εσωτερική οστεοσύνθεση</i>	32
<i>Οστεοσύνθεση με φλοιώδες αλλομόσχευμα</i>	33
<i>Οστεοσύνθεση με φλοιώδες αλλομόσχευμα και πλάκες</i>	34
<i>Αναθεώρηση με πακτωμένο φρέσκο αλλομόσχευμα</i>	34
<b>III. ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΙΣΧΙΟΥ ΜΕ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ</b>	36
<b>1. Η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος</b>	36
<b>2. Οστεοαγωγή και οστεοεπαγωγή</b>	37
<b>3. Αποασβεστοποίηση και BMPs</b>	37

4. Υδροξυαπατίτης	39
5. Τα περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου και η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος	40
<b>ΥΠΟΘΕΣΗ</b>	43
<b>ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΚΟΠΟΙ</b>	43
<b>ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΘΕΣΗΣ</b>	44
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	45
<b>ΜΕΛΕΤΗ Ι. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ</b>	45
1. Χειρουργική τεχνική	47
<i>Προσπέλαση και ανάταξη</i>	47
<i>Προετοιμασία του μοσχεύματος</i>	48
<i>Προετοιμασία του αυλού του μηριαίου</i>	48
<i>Ενσφήνωση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος</i>	49
2. Μετεγχειρητική φροντίδα	49
3. Αξιολόγηση του θεραπευτικού αποτελέσματος	49
4. Στατιστική ανάλυση	50
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ</b>	51
1. Επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας	51
2. Αναρρόφηση του μυελού των οστών	51
<i>Τεχνική αναρρόφησης – Περιγραφή πρωτοκόλλου</i>	51
3. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων (mesenchymal stem cells)	52

<i>Συνθήκες αντισηψίας</i>	52
<i>Περιγραφή πρωτοκόλλου</i>	53
<i>Χαρακτηρισμός των πρώιμων μεσεγχοματικών κυττάρων</i>	55
<i>Η καλλιέργεια των πρώιμων μεσεγχοματικών κυττάρων</i>	56
<i>Γενικός σχεδιασμός κυτταροκαλλιιεργειών</i>	56
<b>4. Προετοιμασία του DBM και ICBM</b>	57
<i>Επεξεργασία μηριαίας κεφαλής</i>	57
<i>Προετοιμασία του μερικός αποασβεστοποιημένου οστού (DBM)</i>	58
<i>Προετοιμασία του πλήρους αποασβεστοποιημένου οστού (ICBM)</i>	59
<b>5. Η στρώση των καλλιιεργειών και οι ομάδες μελέτης</b>	60
<i>Χρονικός σχεδιασμός των δοκιμασιών</i>	61
<i>α. Για την δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης</i>	61
<i>β. Για την δοκιμασία της ραδιοσεσημασμένης θυμιδίνης</i>	61
<b>6. Δοκιμασία Alamar Blue</b>	62
<i>Πρωτόκολλο</i>	62
<b>7. Δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης</b>	63
<i>Πρωτόκολλο</i>	63
<b>8. Δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR</b>	64
<i>Πρωτόκολλο</i>	64
<b>9. Η ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων με την δοκιμασία του ολικού DNA (Hoechst 33258)</b>	65
<i>Πρωτόκολλο</i>	66
<i>Καμπύλη ομαλοποίησης του DNA</i>	66
<b>10. Ηλεκτρονική Μικροσκόπηση Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)</b>	67

11. Χρώση Von Kossa	68
12. Ακτινολογικός έλεγχος	68
13. Στατιστική ανάλυση	68
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙΙ. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ. <i>IN VITRO</i> ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ</b>	69
1. Υδροξυαπατίτης	69
2. Πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών	70
3. Προετοιμασία του υδροξυαπατίτη	70
4. Η στρώση των καλλιεργειών και οι ομάδες μελέτης	70
5. Στατιστική ανάλυση	72
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙV. <i>IN VIVO</i> ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1</b>	73
1. Γενικός σχεδιασμός	73
2. Επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας	73
3. Εκπαίδευση στην πειραματική χειρουργική	73
4. Προετοιμασία του αποασβεστοποιημένου οστού	74
5. OP-1	74
6. Αρουραίοι	75
7. Χειρουργική τεχνική	75
8. Συλλογή των μοσχευμάτων	76
9. Επεξεργασία των δειγμάτων	76
<i>Αποασβεστοποίηση</i>	76
<i>Αφυδάτωση</i>	77

<i>Κατάτμηση των δειγμάτων</i>	77
<i>Ενυδάτωση</i>	77
<b>10. Χρώση</b>	<b>78</b>
<b>11. Αξιολόγηση ιστολογικών παρασκευασμάτων</b>	<b>78</b>
<b>12. Στατιστική ανάλυση</b>	<b>79</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>80</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ Ι. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ</b>	<b>80</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ</b>	<b>86</b>
<b>1. Χαρακτηρισμός των MSCs</b>	<b>86</b>
<b>2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός</b>	<b>87</b>
<i>Δοκιμασία Alamar Blue για την καλλιέργεια των MSCs στο DBM και το ICBM</i>	<b>87</b>
<i>Δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR για την καλλιέργεια των MSCs στο DBM και το ICBM</i>	<b>89</b>
<b>3. Κυτταρική διαφοροποίηση</b>	<b>91</b>
<i>Δοκιμασία παραγωγής αλκαλικής φωσφατάσης για την καλλιέργεια των MSCs στο DBM και το ICBM</i>	<b>91</b>
<b>4. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στο DBM</b>	<b>93</b>
<b>5. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στο DBM + OP-1</b>	<b>94</b>
<b>6. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στο ICBM + OP-1</b>	<b>96</b>
<b>7. Σχέση κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MSCs μεταξύ του DBM και ICBM</b>	<b>97</b>

8. Σχέση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSCs μεταξύ του DBM και ICBM	98
9. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κυττάρων στο αλλομόσχευμα: Ηλεκτρονική μικροσκόπηση	99
10. Χρώση Von Kossa	101
11. Ακτινογραφία μοσχευμάτων	102
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙΙ. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥ-ΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ. <i>IN VITRO</i> ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ</b>	103
1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	103
<i>Δοκιμασία Alamar Blue για την καλλιέργεια των MSCs στον HA</i>	103
<i>Δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR για την καλλιέργεια των MSCs στον HA</i>	104
2. Κυτταρική διαφοροποίηση	105
<i>Δοκιμασία παραγωγής αλκαλικής φωσφατάσης για την καλλιέργεια των MSCs στον HA</i>	105
3. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στο HA	106
4. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στον HA + OP-1	108
5. Σχέση κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MSCs μεταξύ του HA και HA + OP-1	109
6. Σχέση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSCs μεταξύ του HA και HA + OP-1	110
7. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κυττάρων στον HA: Ηλεκτρονική μικροσκόπηση	111
<b>ΣΧΕΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ MSCs ΜΕΤΑΞΥ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ (DBM, DBM + OP-1, ICBM, ICBM + OP-1, HA, HA + OP-1)</b>	112
<i>Ημέρα 1: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR</i>	112
<i>Ημέρα 7: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR</i>	113

<i>Ημέρα 14: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR</i>	113
<b>ΣΧΕΣΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ MSCs ΜΕΤΑΞΥ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ (DBM, DBM + OP-1, ICBM, ICBM + OP-1, HA, HA + OP-1)</b>	114
<i>Ημέρα 1: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης</i>	115
<i>Ημέρα 7: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης</i>	116
<i>Ημέρα 14: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης</i>	117
<b>ΜΕΛΕΤΗ IV. IN VIVO ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1</b>	117
<b>1. Το μοντέλο</b>	119
<b>2. Μακροσκοπική παρατήρηση</b>	119
<b>3. Ιστολογική παρατήρηση</b>	119
<i>Φρέσκο αλλομόσχευμα</i>	119
<i>Αποασβεστοποιημένο οστό</i>	121
<b>4. Ιστολογική ταξινόμηση</b>	121
<b>5. Αποτελέσματα</b>	122
<b>6. Στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων</b>	122
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	124
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	124
<b>ΜΕΛΕΤΗ I. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ</b>	125
<b>i. Συμπέρασμα και κλινική σημασία της μελέτης</b>	130
<b>ii. Η γένεση της υπόθεσης της βελτίωσης της οστεοεπαγωγικής ικανότητας του πακτωμένου αλλομοσχεύματος</b>	131

<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ</b>	<b>132</b>
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙΙΙ. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥ-ΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ. <i>IN VITRO</i> ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ</b>	<b>140</b>
Σχέση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης μεταξύ όλων των μοσχευμάτων στις Μελέτες ΙΙ και ΙΙΙ	145
<b>ΜΕΛΕΤΗ ΙV. <i>IN VIVO</i> ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1</b>	<b>145</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>150</b>
<b>Η ΑΠΟΨΗ ΤΟΥ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ</b>	<b>152</b>
<b>ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ</b>	<b>152</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>153</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>204</b>
<b>ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ: Μελέτη Ι</b>	<b>204</b>
<b>ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, Μελέτη ΙΙ</b>	<b>211</b>
<b>ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, Μελέτη ΙΙΙ</b>	<b>228</b>
<b>ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, Μελέτη ΙV</b>	<b>241</b>
<b>ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΜΕΤΑΞΥ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΙΙ ΚΑΙ ΙΙΙ</b>	<b>245</b>



## **ΕΙΚΟΝΕΣ**

<b>Εικόνα 1.</b> Τα τρία στοιχεία της ιστικής μηχανικής του οστού: κύτταρα (cells), βιολογικά εκμαγεία-φορείς (3D-matrix) και αυξητικοί παράγοντες (signalling molecules)	<b>3</b>
<b>Εικόνα 2.</b> Η πώρωση του κατάγματος. Εμβρυομορφογένεση της οστεοποίησης	<b>4</b>
<b>Εικόνα 3.</b> Πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (αρουραίου, x170)	<b>5</b>
<b>Εικόνα 4.</b> Διαφοροποιημένος οστεοβλάστης	<b>5</b>
<b>Εικόνα 5.</b> Μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό	<b>13</b>
<b>Εικόνα 6.</b> Η δράση των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (Miyazono et al, 2001)	<b>20</b>
<b>Εικόνα 7.</b> Περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου. Κατάγματα Vancouver τύπου B1, B2 και B3, από αριστερά	<b>26</b>
<b>Εικόνα 8.</b> Κακή πώρωση περιπροσθετικού κατάγματος (Tsiridis and Gie, 2002)	<b>28</b>
<b>Εικόνα 9.</b> Αναθεώρηση της πρόθεσης της εικόνας 8	<b>28</b>
<b>Εικόνα 10.</b> Περιπροσθετικό κάταγμα Vancouver B3	<b>31</b>
<b>Εικόνα 11.</b> Αναθεώρηση με υποκατάσταση του εγγύς μηριαίου	<b>31</b>
<b>Εικόνα 12.</b> Πλάκα Dall-Miles	<b>32</b>
<b>Εικόνα 13.</b> Θραύση Tsiridis et al (2003a)	<b>32</b>
<b>Εικόνα 14.</b> Φλοιώδες αλλομόσχευμα στην πλάγια επιφάνεια του μηριαίου συγκρατείται με κυκλωτερή σύρματα	<b>35</b>
<b>Εικόνα 15.</b> Φλοιώδη αλλομοσχεύματα στην πρόσθια και πλάγια επιφάνεια του μηριαίου που συγκρατούνται με κυκλωτερή συρμάτινα καλώδια τύπου Dall-Miles. Η πρόθεση έχει αναθεωρηθεί με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα μετά από προηγούμενο περιπροσθετικό κάταγμα του μηριαίου	<b>35</b>
<b>Εικόνα 16α.</b> Κάταγμα Vancouver B2	<b>81</b>
<b>Εικόνα 16β.</b> Αναθεώρηση και πλάκα Dall-Miles	<b>81</b>
<b>Εικόνα 16γ.</b> Αποτυχία του βραχέος στελέχους	<b>81</b>
<b>Εικόνα 16δ.</b> Αναθεώρηση με μακρύ στέλεχος και φλοιώδες αλλομόσχευμα	<b>81</b>
<b>Εικόνα 17.</b> Μακρό στέλεχος με τσιμέντο. Μη Πώρωση	<b>81</b>

<b>Εικόνα 18α.</b> Κάταγμα Vancouver B2	82
<b>Εικόνα 18β.</b> Αναθεώρηση με μακρύ στέλεχος, πακτωμένο αλλομόσχευμα και πλάκα DCP	82
<b>Εικόνα 19α.</b> Κάταγμα τύπου B3	82
<b>Εικόνα 19β.</b> Αναθεώρηση με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα	82
<b>Εικόνα 19γ.</b> Αποτυχία της αναθεώρησης	82
<b>Εικόνα 19δ.</b> Αναθεώρηση με μακρό στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα	82
<b>Εικόνα 20α.</b> Διεγχειρητικά περιπροσθετικά κατάγματα κατά τη διάρκεια της Αναθεώρησης	83
<b>Εικόνα 20β.</b> Αναθεώρηση με βραχύ στέλεχος, πακτωμένο αλλομόσχευμα και φλοιώδες αλλομόσχευμα αμφίπλευρα	83
<b>Εικόνα 20γ.</b> Δώδεκα μήνες μετά, ενσωμάτωση του πακτωμένου και του φλοιώδους Αλλομοσχεύματος	83
<b>Εικόνα 21.</b> Θετική χρώση αλκαλικής φωσφατάσης	86
<b>Εικόνα 22.</b> Αρνητική χρώση αλκαλικής φωσφατάσης	86
<b>Εικόνα 23.</b> Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία Alamar Blue. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές φθορισμού την 14 <sup>η</sup> και 21 <sup>η</sup> ημέρα	88
<b>Εικόνα 24.</b> Ιστόγραμμα: Δοκιμασία <sup>3</sup> H-TdR. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές ακτινοβολίας την 7 <sup>η</sup> και 14 <sup>η</sup> ημέρα	90
<b>Εικόνα 25.</b> Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία ALP. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας όλες τις ημέρες	92
<b>Εικόνα 26.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων	94
<b>Εικόνα 27.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη άνοδος πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1	95
<b>Εικόνα 28.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη πορεία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1	97
<b>Εικόνα 29.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη πορεία πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο DBM και ICBM	98

<b>Εικόνα 30.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Διαφοροποίηση των κυττάρων στο DBM. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο ICBM	<b>99</b>
<b>Εικόνα 31.</b> DBM + OP-1 ημέρα 7	<b>100</b>
<b>Εικόνα 32.</b> DBM + OP-1 ημέρα 14	<b>100</b>
<b>Εικόνα 33.</b> ICBM + OP-1 ημέρα 7	<b>100</b>
<b>Εικόνα 34.</b> ICBM + OP-1 ημέρα 14	<b>100</b>
<b>Εικόνα 35.</b> DBM χωρίς OP-1	<b>101</b>
<b>Εικόνα 36.</b> ICBM + OP-1	<b>101</b>
<b>Εικόνα 37.</b> DBM + OP-1	<b>101</b>
<b>Εικόνα 38.</b> DBM	<b>102</b>
<b>Εικόνα 39.</b> DBM + OP-1	<b>102</b>
<b>Εικόνα 40.</b> ICBM + OP-1	<b>102</b>
<b>Εικόνα 41.</b> ICBM	<b>102</b>
<b>Εικόνα 42.</b> Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία Alamar Blue. Ο HA + OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές φθορισμού όλες τις ημέρες	<b>104</b>
<b>Εικόνα 43.</b> Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία $^3\text{H-TdR}$ . Ο HA + OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές ακτινοβολίας την ημέρα 7 και 14	<b>105</b>
<b>Εικόνα 44.</b> Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία ALP. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας την ημέρα 1 και 14	<b>106</b>
<b>Εικόνα 45.</b> Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων	<b>107</b>
<b>Εικόνα 46.</b> Γραφική Παράσταση. Παρατηρείται αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων στον HA + OP-1. Αυτό διαφοροποιεί τον HA από το DBM (εικόνα 27)	<b>108</b>
<b>Εικόνα 47.</b> Γραφική Παράσταση. Ο συνδυασμός του HA με το OP-1 δίνει υψηλότερες τιμές κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλες τις ημέρες. Η διαφορά με τον HA γίνεται στατιστικά σημαντική την 14 <sup>η</sup> ημέρα	<b>109</b>

<b>Εικόνα 48.</b> Γραφική Παράσταση. Η διαφοροποίηση των κυττάρων είναι ανάλογη στα δύο υποστρώματα. Παρατηρείται στατιστική υπεροχή του HA + OP-1 έναντι του HA τις ημέρες 7 και 14 ( $p = 0.001$ , $p = 0.004$ αντίστοιχα)	<b>110</b>
<b>Εικόνα 49.</b> Ημέρα 1 HA χωρίς OP-1 (x43)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 50.</b> Ημέρα 1 HA με OP-1 (x43)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 51.</b> Ημέρα 7 HA χωρίς OP-1 (x100)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 52.</b> Ημέρα 7 HA με OP-1 (x100)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 53.</b> Ημέρα 14 HA χωρίς OP-1 (x200)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 54.</b> Ημέρα 14 HA με OP-1 (x200)	<b>111</b>
<b>Εικόνα 55.</b> Ξυρισμένο κοιλιακό τοίχωμα. Το ψαλίδι δείχνει την μέση γραμμή	<b>117</b>
<b>Εικόνα 56.</b> Προετοιμασία του δέρματος με ιωδιούχο διάλυμα	<b>118</b>
<b>Εικόνα 57.</b> Τομή δέρματος μέσης γραμμής	<b>118</b>
<b>Εικόνα 58.</b> Δεξιά θήκη	<b>118</b>
<b>Εικόνα 59.</b> Αριστερή θήκη	<b>118</b>
<b>Εικόνα 60.</b> Πλάκα 96 εμβυθισμάτων με το πακτωμένο αλλομόσχευμα	<b>118</b>
<b>Εικόνα 61.</b> Αλλομόσχευμα μέσα στις θήκες	<b>118</b>
<b>Εικόνα 62.</b> Αλλομόσχευμα	<b>118</b>
<b>Εικόνα 63.</b> Μικροτεμάχιο αλλομοσχεύματος (χρώση H&E, x66)	<b>120</b>
<b>Εικόνα 64.</b> Αλλομόσχευμα με OP-1	<b>120</b>
<b>Εικόνα 65.</b> Σχηματισμός νέου οστού (βέλος, χρώση H&E, x330)	<b>120</b>
<b>Εικόνα 66.</b> DBM	<b>120</b>
<b>Εικόνα 67.</b> Σχηματισμός νέου οστού (βέλος, χρώση H&E, x330)	<b>120</b>
<b>Εικόνα 68.</b> DBM + OP-1	<b>120</b>
<b>Εικόνα 69.</b> Σχηματισμός νέου οστού και μυελού των οστών (βέλος, χρώση H&E με alcian blue και sirrus red, x66)	<b>120</b>

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

<b>Διάγραμμα.</b> Διαστρωμάτωση δεδομένων (Π: Πώρωση, ΜΠ: Μη Πώρωση)	<b>46</b>
--	-----------

## ΠΙΝΑΚΕΣ

<b>Πίνακας 1.</b> Ταξινόμηση διεγχειρητικών περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου. Περιγραφή του κατάγματος σε σχέση με το στέλεχος	<b>24</b>
<b>Πίνακας 2.</b> Ταξινόμηση μετεγχειρητικών περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου. Περιγραφή του κατάγματος σε σχέση με το στέλεχος της πρόθεσης	<b>25</b>
<b>Πίνακας 3.</b> Παράγοντες Κινδύνου	<b>26</b>
<b>Πίνακας 4α.</b> Πρόληψη των περιπροσθετικών καταγμάτων κατά την διάρκεια της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου	<b>27</b>
<b>Πίνακας 4β.</b> Πρόληψη των περιπροσθετικών καταγμάτων κατά την διάρκεια της αναθεώρησης της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου	<b>27</b>
<b>Πίνακας 5.</b> Ταξινόμηση Vancouver για τα περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου	<b>47</b>
<b>Πίνακας 6.</b> Ιστολογική ταξινόμηση οστεογένεσης κατά Salkeld (Salkeld et al, 2001)	<b>79</b>
<b>Πίνακας 7.</b> Η σχέση μεταξύ της πώρωσης, του μήκους του στελέχους και της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος	<b>80</b>
<b>Πίνακας 8α.</b> Συμπληρωματική οστεοσύνθεση με φλοιώδες αλλομόσχευμα (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΦΑ: φλοιώδες αλλομόσχευμα)	<b>83</b>
<b>Πίνακας 8β.</b> Αριθμός φλοιωδών αλλομοσχευμάτων (ΦΑ) και πώρωση (Π: πώρωση, ΜΠ: μη πώρωση, + ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα)	<b>84</b>
<b>Πίνακας 9.</b> Συμπληρωματική οστεοσύνθεση με πλάκες Dynamic Compression Plates (DCP) και Dall-Miles (DM) (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΦΑ: φλοιώδες αλλομόσχευμα)	<b>84</b>
<b>Πίνακας 10.</b> Επιπλοκές (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΜΠ: μη πώρωση)	<b>85</b>

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>Συντομογραφία</b>	<b>Ολογράφως (Αγγλικά)</b>	<b>Ολογράφως (Ελληνικά)</b>
<b>DBM</b>	<b>Demineralised Bone Matrix</b>	πλήρως αποασβεστοποιημένο οστό
<b>ICBM</b>	<b>Insoluble Collagenous Bone Matrix</b>	μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό
<b>FFA</b>	<b>Fresh Frozen Allograft</b>	φρέσκο παγωμένο αλλομόσχευμα
<b>TMX</b>	<b>Thermanox</b>	πλαστικό «θέρμανοξ»
<b>OP-1</b>	<b>Osteogenic Protein - 1</b>	οστεογενετική πρωτεΐνη - 1
<b>BMP-7</b>	<b>Bone Morphogenetic Protein - 7</b>	οστική μορφογενετική πρωτεΐνη - 7
<b>SEM</b>	<b>Scanning Electron Microscopy</b>	ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
<b>MSC</b>	<b>Mesenchymal Stem Cells</b>	πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα
<b>ALP</b>	<b>Alkaline Phosphatase</b>	αλκαλική φωσφατάση
<b><sup>3</sup>H-TdR</b>	<b>Tritiated Radioactive Thymidine</b>	ραδιοσημασμένη θυμιδίνη
<b>H&amp;E</b>	<b>Haematoxylin &amp; Eosin</b>	αιματοξυλίνη και ηωσίνη
<b>DMEM</b>	<b>Dublecco's Minimum Essential Medium</b>	θρεπτικό υπόστρωμα του Duplecco
<b>FBS</b>	<b>Fetal Bovine Serum</b>	ορός εμβρύου βοός
<b>P/S</b>	<b>Penicillin/Streptomycin</b>	πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
<b>rh</b>	<b>recombinant human</b>	ανασυνδυασμένη ανθρώπινη
<b>TCA</b>	<b>Trichloroacetic acid</b>	τριχλωροξικό οξύ
<b>PBS</b>	<b>Phosphate Buffered Saline</b>	ουδέτερος φωσφορούχος ορός
<b>EtOH</b>	<b>Ethyl Alcohol</b>	αιθυλική αλκοόλη
<b>UVL</b>	<b>UltraViolet Light</b>	υπεριώδης ακτινοβολία
<b>CI</b>	<b>Confidence Interval</b>	όρια βεβαιότητας

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα διατριβή θα εξετάσει τη βιολογική ανταπόκριση του πακτωμένου οστικού αλλομοσχεύματος σε τέσσερα επίπεδα:

- Σε κλινικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας το μοντέλο του ανθρώπινου πακτωμένου οστικού αλλομοσχεύματος στην αντιμετώπιση των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού.
- Σε κυτταρικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας το συνδυασμό, μερικώς και πλήρως αποασβεστοποιημένου ανθρώπινου πακτωμένου οστικού αλλομοσχεύματος με πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών και της ανασυνδιασμένης ανθρώπινης οστικής μορφογεννετικής πρωτεΐνης-7.
- Σε κυτταρικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας το συνδυασμό, του υδροξυαπατίτη με πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών και της ανασυνδιασμένης ανθρώπινης οστικής μορφογεννετικής πρωτεΐνης-7.
- Σε πειραματικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας το μοντέλο του αρουραίου. Πακτωμένο οστικό αλλομόσχευμα και μερικώς αποασβεστοποιημένο πακτωμένο οστικό αλλομόσχευμα αρουραίου μεταμοσχεύθηκε με ή χωρίς ανασυνδιασμένη ανθρώπινη οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 μέσα στους κοιλιακούς μυς 16 αρουραίων, που παρείχαν τα πρώιμα οστεοπρογενετικά μεσεγχυματικά κύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος.

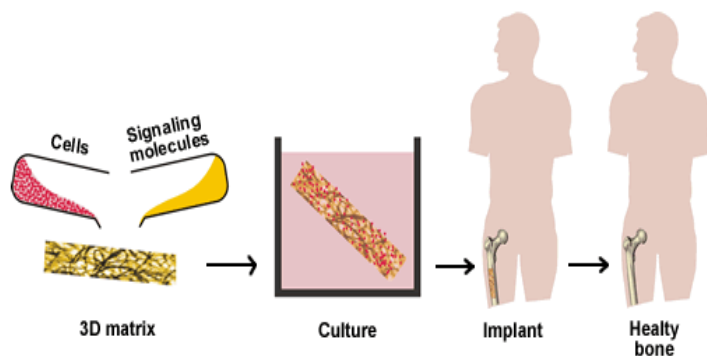
# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

## **I. ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ**

Η ιστική μηχανική του οστού αποτελεί ένα νέο πεδίο έρευνας της βιοϊατρικής που περιλαμβάνει μια σειρά βιολογικών τεχνικών και αρχών της μηχανικής, με σκοπό την αποκατάσταση του τραυματισμένου ή παθολογικού οστού (Vacanti and Vacanti, 1994; Crane et al, 1995; Einhorn, 1999; Goldstein et al, 1999; Hollinger and Winn, 1999; Fleming et al, 2000; Calvert et al, 2003; Cancedda et al, 2003; Hunziker, 2003; Jadlowiec et al, 2003; Kofron et al, 2003; Marcacci et al, 2003). Τα κύρια βιολογικά "εργαλεία" που χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική του οστού είναι (εικόνα 1):

1. τα πολυδύναμα πρόιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (Pelled et al, 2002; Hutmacher et al, 2003; Kruyt et al, 2004)
2. τα βιολογικά ή μη εκμαγεία-φορείς, που φιλοξενούν και μηχανικά στηρίζουν τα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει κατά την περίπτωση της κυτταρικής καλλιέργειας (*in vitro*) αλλά και κατά τη διάρκεια μίας χειρουργικής πράξης (*in vivo*), κατά την οποία τα κύτταρα επιστρατεύονται από την κυκλοφορία ή το οστό-δέκτη και υφίστανται οστεοβλαστική φαινοτυπική διαφοροποίηση με σκοπό την αναδόμησή του (Hutmacher, 2000; Ripamonti and Tasker, 2000; Rose and Oreffo, 2002) και
3. οι αυξητικοί παράγοντες, που για τα περισσότερα θηλαστικά είναι εξειδικευμένες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, που δρουν σε ειδικούς υποδοχείς των πρόιμων μεσεγχυματικών κυττάρων. Μέσω κυτταροπλασματικών διαβιβαστών επεμβαίνουν στον πυρήνα των κυττάρων με αποτέλεσμα να προκαλούν την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στη φαινοτυπική διαφοροποίηση των πολυδύναμων πρόιμων μεσεγχυματικών κυττάρων σε ώριμους οστεοβλάστες, ικανούς να παράγουν νέο οστίτη ιστό (Reddi and Cunningham, 1991; Reddi, 1994; Ripamonti, 1999; Reddi, 2000; Gittens and Uludag, 2001; Ramoshebi et al, 2002).





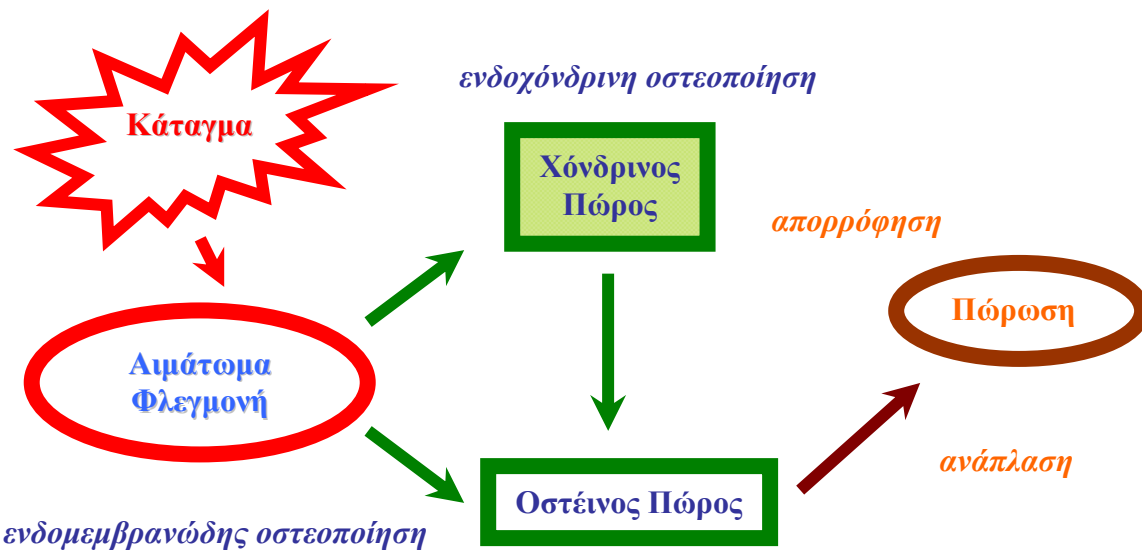
**Εικόνα 1.** Τα τρία στοιχεία της ιστικής μηχανικής του οστού: κύτταρα (cells), βιολογικά εκμαγεία-φορείς (3D matrix) και αυξητικοί παράγοντες (signalling molecules) (Vaccaro, 2002)

Η οστεοαρθρίτιδα, ο καρκίνος (πρωτοπαθής οστικός ή μεταστατικός), το τραύμα, οι συγγενείς ανωμαλίες και τα μεταβολικά νοσήματα είναι τα μείζονα οστικά παθολογικά προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη Ορθοπαιδική. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την επανόρθωση των οστικών βλαβών είναι μέθοδοι αντικατάστασης, που αφορούν μηχανικές συσκευές (πλάκες, βίδες, σύρμα, ήλοι) ή τεχνητές αρθρώσεις, που δεν αποκαθιστούν τον παθολογικό οστίτη ιστό ούτε αφομοιώνονται από τον δέκτη οργανισμό, αλλά μόνο υποκαθιστούν ή στηρίζουν το οστό. Ωστόσο στην τρέχουσα ορθοπαιδική πρακτική η χρήση του οστικού μοσχεύματος (αλλομόσχευμα ή αυτομόσχευμα) είναι ευρέως διαδεδομένη και ασφαλώς αποτελεί μία περισσότερο βιολογική προσέγγιση της θεραπείας πολλών οστικών βλαβών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής γίνονται περίπου 450.000 επεμβάσεις οστικής μεταμόσχευσης το χρόνο, με συνολικό κόστος περισσότερο από 120 δισεκατομμύρια δολάρια (Vaccaro, 2002). Υπάρχουν ωστόσο προβλήματα που σχετίζονται με την οστική μεταμόσχευση. Η αυτομεταμόσχευση ενέχει το πρόβλημα της διαθεσιμότητας αλλά και της βλάβης της δότριας οστικής περιοχής (συνήθως οι λαγόνιες ακρολοφίες της πυέλου), ενώ η αλλομεταμόσχευση ενέχει τον κίνδυνο της μετάδοσης ιογενών νοσημάτων (Pruss et al, 2002; Li et al, 2002; Swenson and Arnocsky, 2003) και το πρόβλημα της απόρριψης του μοσχεύματος λόγω ανοσολογικής ασυμβατότητας με το δέκτη (Friedlaender and Horowitz, 1992;

Friedlaender et al, 1999; Lewandrowski et al, 2001). Η αντικατάσταση και η ανακατασκευή του οστού, όπως περιγράφηκαν πιο πάνω, αποτέλεσαν την κυρία θεραπευτική αλλά και ερευνητική ατζέντα της Ορθοπαιδικής κατά το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι η οστική εμβρυομορφογένεση μέσω της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης, που αφορά στην πλειονότητα των οστών του ανθρώπινου σώματος, περνά από τρεις διακριτές φάσεις (Richards et al, 1998; Liu et al, 1999):

- τη χημιοταξία και μίτωση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών στην περιοχή της οστικής βλάβης
- τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες που παράγουν το χόνδρινο εκμαγείο (ανώριμο οστό)
- την ασβεστοποίηση του χόνδρινου εκμαγείου και τη νεο-αγγείωση, την παραγωγή μυελού των οστών και έτσι την παραγωγή ώριμου οστού.

Έχει επίσης γίνει κατανοητό ότι η φυσική διαδικασία επούλωσης του οστικού τραύματος (κατάγματος) ή ελλείμματος στον ενήλικο σκελετό, περνά και αυτή από τα πιο πάνω στάδια (Balaburski and O'Connor, 2003; Gerstenfeld et al, 2003; Wildermann et al, 2004).



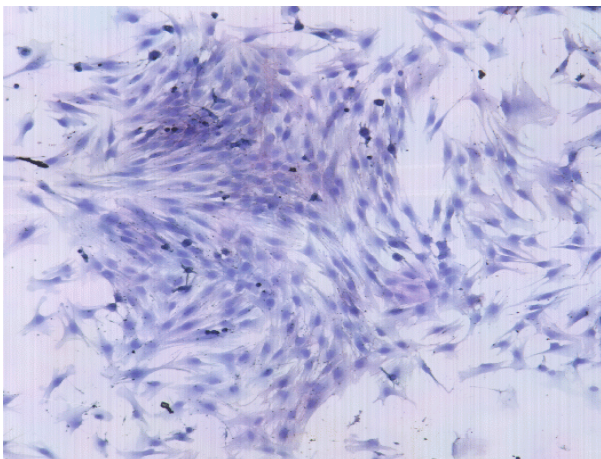
**Εικόνα 2.** Η πόρωση του κατάγματος. Εμβρυομορφογένεση της οστεοποίησης.

Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε την απαρχή και τη βάση της ιστικής μηχανικής, που, χρησιμοποιώντας αρχές της μηχανικής και της βιολογίας, επιχειρεί να επέμβει στα πιο πάνω στάδια με σκοπό να τροποποιήσει και να βελτιώσει την ανταπόκριση του οργανισμού σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις των οστών. Οι επιμέρους στόχοι της ιστικής μηχανικής αφορούν, όπως έχει προαναφερθεί, το κύτταρο, το εκμαγείο-φορέα και τους αυξητικούς παράγοντες.

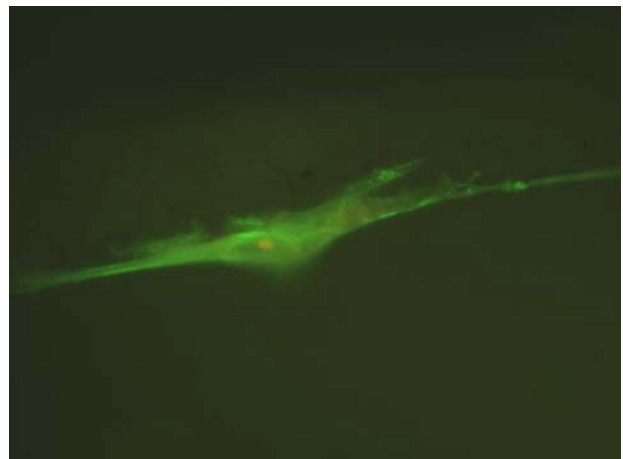
## 1. Κύτταρα

Πέντε διαφορετικοί τύποι κυττάρων με κοινό γνώρισμα την οστεογενετική ικανότητα χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική (Gerstenfeld et al., 1990, Aronow et al., 1990, Owen et al 1990, Lian et al 1998):

1. μικτά κύτταρα του μυελού των οστών
2. πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών των ενηλίκων (εικόνα 3)
3. πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά εμβρυϊκά κύτταρα
4. γενετικά διαφοροποιημένα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα
5. διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες (εικόνα 4)



**Εικόνα 3.** Πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (αρουραίου, x170)



**Εικόνα 4.** Διαφοροποιημένος οστεοβλάστης

### *Μικτά κύτταρα του μυελού των οστών*

Αυτά είναι τα πρώτα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην ιστική μηχανική. Η βασική γνώση ότι ο μυελός των οστών περιέχει πρώιμα πολυδύναμα κύτταρα όλων των σειρών οδήγησε στους αρχικούς πειραματισμούς. Η πρόσληψή τους από τη λαγόνια ακρολοφία (οπίσθια άνω λαγόνια άκανθα στους ανθρώπους) είναι εύκολη και ασφαλής και μπορεί να γίνει κατά τη διάρκεια της γενικής αναισθησίας οποιασδήποτε Ορθοπαιδικής επέμβασης. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε εκτεταμένα, με θετικά αποτελέσματα, στο ζωικό μοντέλο του αρουραίου, του κουνελιού και του σκύλου (Paley et al, 1986; Beresford, 1989; Tiedeman et al, 1991; Lane et al, 1999). Αργότερα, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε περιορισμένη κλίμακα στη θεραπεία των καταγμάτων των κάτω άκρων στον άνθρωπο, χωρίς όμως να κερδίσει ευρεία αναγνώριση, παρά την σχετικά ικανοποιητική αναπαραγωγισιμότητα και αξιοπιστία της μεθόδου (Connolly, 1995, 1998). Σύντομα έγινε κατανοητό ότι η πλειονότητα των κυττάρων του μυελού των οστών του ενήλικου οργανισμού ανήκε στην αιματογενή σειρά καθώς και ότι τα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα αποτελούσαν ένα πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων του μυελού των οστών. Επιπρόσθετα ο αριθμός των πρώιμων οστεοπρογενετικών κυττάρων του μυελού των οστών ελαττωνόταν δραματικά με την πάροδο της ηλικίας αλλά και λόγω διαφόρων ασθενειών (Liang et al, 1992; Quarto et al, 1995).

### *Πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών των ενηλίκων*

Τα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι ανώριμα, αδιαφοροποίητα, πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Έχουν τη δυνατότητα να αναπαράγονται χωρίς να διαφοροποιούνται. Επίσης παρουσιάζουν πλαστικότητα στη συμπεριφορά τους, καθώς μπορούν να εξελιχθούν προς διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Blau et al, 2001; Kuehnle and Goodell, 2002). Προκειμένου τα κύτταρα αυτά να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας και δράσης των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών

«μηνυμάτων» (κυτοκινών, υποδοχέων της μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος) καθώς και των πρωτεϊνών που παράγονται από την ενδοκυττάρια ερμηνεία αυτών των μηνυμάτων (έκφραση γονιδίων ειδικών της κάθε ώριμης κυτταρικής σειράς). Η συνολική δράση των πρωτεϊνών αυτών εκδηλώνονται με τη διαφοροποίηση των πρώιμων κυττάρων σε ώριμα κύτταρα μιας συγκεκριμένης σειράς. Τα πρώιμα μεσεγγυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, όπως και όλα τα πρώιμα πολυδύναμα κύτταρα, έχουν δύο χαρακτηριστικά γνωρίσματα. Πρώτον, είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, μυοβλάστες και λιποκύτταρα (Bianco et al, 1999, Vats et al, 2002) και, δεύτερον, είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται (Bonnet, 2003; Kotobuki et al, 2004), εκτός εάν κάποιο βιοχημικό ή μηχανικό ερέθισμα επιδράσει επάνω τους, οπότε εκλεκτικά διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα διαφόρων σειρών (Prockop et al, 2003; Shea et al, 2003). Τα πρώιμα μεσεγγυματικά κύτταρα έχουν το επιπρόσθετο πλεονέκτημα ότι μπορεί να συλλεγούν σε μικρές ποσότητες και να αναπτυχθούν σε κυτταρικές καλλιέργειες. Ωστόσο είναι σχετικά δύσκολο να απομονώσει κανείς τα πρώιμα μεσεγγυματικά κύτταρα του μυελού των οστών και να συλλέξει σε ικανό αριθμό, καθώς αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων του μυελού των οστών. Επίσης, ο αριθμός τους ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας και κατά συνέπεια είναι δύσκολο να εντοπιστούν σε ηλικιωμένους ασθενείς. Οι Jaiswal et al (1997) ανέφεραν 30 επιτυχείς επανειλημμένους διπλασιασμούς του πληθυσμού των πρώιμων μεσεγγυματικών κυττάρων *in vitro*, χωρίς αυτά να διαφοροποιηθούν αλλά και χωρίς να χάσουν την κύρια ικανότητά τους τελικά να εξελίσσονται σε οστεοπρογενετικά κύτταρα και οστεοβλάστες. Παραμένει ωστόσο άγνωστο κατά πόσο η τεράστια αυτή δυνατότητα και πλαστικότητα των πρώιμων μεσεγγυματικών κυττάρων στο πειραματικό εργαστήριο μπορεί να αναπαραχθεί στην κλινική πραγματικότητα (Rose and Oreffo, 2002).

### *Πρώιμα πολυδύναμα μεσεγχυματικά εμβρυϊκά κύτταρα*

Τα κύτταρα αυτά συνήθως προέρχονται από το έσω τοίχωμα της βλαστοκύστης του εμβρύου. Καθώς προέρχονται από τα πολύ πρώιμα στάδια της εξέλιξης του εμβρύου, είναι πολυδύναμα, αθάνατα και αδιαφοροποίητα (Keller, 1995; Thomson et al, 1998; McLaren, 2000). Ωστόσο, όπως κάθε κύτταρο που προέρχεται από γενετικά διαφορετικό οργανισμό, εάν μεταμοσχευθούν, μπορεί να προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση στον υποψήφιο δέκτη (Vats et al, 2002). Αυτό, σε συνδυασμό με τα ηθικά και κοινωνικά προβλήματα που προκαλεί η χρήση εμβρυϊκών κυττάρων, έχει περιορίσει τη χρήση τους μόνο σε ερευνητικό επίπεδο (McLaren, 2001). Η δυναμική των κυττάρων αυτών είναι τέτοια, ώστε να θεωρείται σχεδόν βέβαιο ότι στο μέλλον η χρήση τους μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πλήρους μυσκελετικού ιστού ακόμη και αρθρικού χόνδρου χωρίς τη μεσολάβηση βιολογικού εκμαγείου (πχ κολλαγόνου ή αυτό- ή αλλομοσχεύματος) (Oreffo and Triffitt, 1999). Οι Thomson et al (1998) έδειξαν ότι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα (από την εμβρυϊκή βλαστοκύστη) μπορούν να αναπαράγονται ασταμάτητα και ότι έχουν την ικανότητα να εξελίσσονται και να ωριμάζουν σε κύτταρα οποιασδήποτε σειράς.

### *Γενετικά διαφοροποιημένα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα*

Η εφαρμογή των τεχνικών της γενετικής θεραπείας επί των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών είναι μια νέα προσέγγιση της έρευνας, προκειμένου να προκληθεί οστεογένεση (Lieberman et al, 1999; Hannallah et al, 2003; Jin et al, 2003; Rose et al, 2003). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την τροποποίηση του γενετικού υλικού των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων (*ex vivo* ενσωμάτωση ξένου DNA προερχομένου συνήθως από ιούς, στο DNA του κυττάρου στόχου) κατά τέτοιο τρόπο (εξειδικευμένη αλληλουχία βάσεων του DNA που μεταφράζει την παραγωγή των οστεογενετικών πρωτεϊνών), ώστε τα κύτταρα αυτά όχι μόνο να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες αλλά να είναι επίσης σε θέση να παράγουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες-μεταβιβαστές

εξωκυττάρων μηνυμάτων (πχ. οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες), που με τη σειρά τους να πυροδοτούν την οστεογένεση (Scaduto and Lieberman, 1999). Οι Breitbart et al (1999) και, πιο πρόσφατα, οι Hidaka et al (2003) έδειξαν ότι διά μεταφοράς γενετικού υλικού από ρετροϊό (retroviral transduction) πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα ήταν σε θέση να παράγουν οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 (BMP-7) και ως εκ τούτου να προκαλέσουν οστεοβλαστική διαφοροποίηση και κατά συνέπεια οστό. Επίσης, οι Musgrave et al (1999) έδειξαν ότι μεταφορά γενετικού υλικού από αδενοϊό ήταν σε θέση να παράγει οστική μορφογενετική πρωτεΐνη - 2 (BMP-2) και επακόλουθα εξωσκελετική οστεοποίηση, στους κοιλιακούς μύς αρουραίων. Και οι δύο πιο πάνω προσεγγίσεις έχουν επαναληφθεί πρόσφατα από την ομάδα του Huard στο Pittsburgh των ΗΠΑ, χρησιμοποιώντας είτε πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών είτε πρώιμα μυϊκά κύτταρα (μυοβλάστες) (Musgrave et al, 2000; Hannallah et al, 2003). Η προσέγγιση αυτή έχει αρκετούς περιορισμούς, κυρίως λόγω των κινδύνων που ελλοχεύουν κατά τη τροποποίηση του DNA του κυττάρου στόχου. Όχι μόνο εγκυμονεί την πιθανότητα ανοσολογικής αντίδρασης απόρριψης, όταν τα γενετικά τροποποιημένα αυτά κύτταρα μεταμοσχεύονται στον ανοσολογικά ξένο δέκτη, αλλά διακυβεύει και τη βιοασφάλεια λόγω της πιθανότητας μετάθεσης του γενετικού υλικού του ιού σε μη αναμενόμενη θέση του γονιδιώματος του κυττάρου-στόχου, με συνέπεια την πιθανή μελλοντική ογκογένεση. Τα ερωτήματα αυτά θα πρέπει να απαντηθούν πριν την κλινική χρήση αυτής της τεχνικής στην οστική αναγέννηση (Asahara et al, 2000).

#### *Διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες*

Αναμφίβολα τα κύτταρα αυτά παράγουν οστό. Αυτό μπορεί να γίνει άμεσα και γρήγορα καθώς τα κύτταρα αυτά είναι ώριμα, διαφοροποιημένα κύτταρα του οστίτη ιστού. Το μοναδικό τους μειονέκτημα είναι ότι έχουν περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και σύντομα μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα (Chien et al, 2000).

## 2. Εκμαγεία

### i. Βιολογικά Εκμαγεία

Κυρίαρχο ρόλο στην οστεογένεση παίζει το βιολογικό εκμαγείο. Το εκμαγείο λειτουργεί με τρεις τρόπους: πρώτον με την απευθείας επιστράτευση κυττάρων (επαγωγή) από το περιβάλλον οστό, δεύτερον με την μεταφορά και απόδοση κυττάρων και οστεοεπαγωγικών παραγόντων στο σημείο της οστικής βλάβης (ρόλος οχήματος) και τρίτον με τη δράση του ως βιολογικό ικρίωμα που θα προσανατολίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (οστεοαγωγή). Το ιδανικό εκμαγείο θα πρέπει να είναι οστεοεπαγωγικό, οστεοαγώγιμο και να έχει την κατάλληλη πορώδη αρχιτεκτονική ώστε να διευκολύνει την ανάπτυξη των κυττάρων αλλά και των νεοαγγείων (Vacca, 2002). Επίσης, το εκμαγείο θα πρέπει να είναι ιστοσυμβατό, μηχανικά σταθερό σε σχέση με το περιβάλλον οστό και βιοαπορροφήσιμο, έτσι ώστε να προλαμβάνονται οι αντιδράσεις τύπου "ξένου σώματος", όταν παραμένει στο δέκτη για μακρό χρονικό διάστημα. Επίσης θα πρέπει να αποστειρώνεται εύκολα, χωρίς να χάνει τις βιολογικές και βιοχημικές του ιδιότητες (Alsberg et al, 2003; Warren et al, 2004).

#### *Αυτομόσχευμα και αλλομόσχευμα*

Το αυτομόσχευμα και το αλλομόσχευμα αποτελούν τα παραδοσιακά βιολογικά εκμαγεία που χρησιμοποιούνται στην Ορθοπαιδική κλινική πράξη.

#### *Αυτομόσχευμα*

Το σπογγώδες αυτομόσχευμα είναι περισσότερο οστεοεπαγωγικό και οστεοπαραγωγικό καθώς διαθέτει σε μεγαλύτερο βαθμό αυξητικούς παράγοντες σε σχέση με το μηχανικά σταθερότερο φλοιώδες αυτομόσχευμα. Το αυτομόσχευμα είναι ιστοσυμβατό και δεν έχει το μειονέκτημα της μετάδοσης ιογενών και άλλων λοιμώξεων που έχει το αλλομόσχευμα. Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τη μεταμόσχευση του σπογγώδους αλλομοσχεύματος η οστική μάζα είναι μηχανικά αδύνατη. Ωστόσο η πορώδης φύση του σπογγώδους αλλομοσχεύματος επιτρέπει τη γρήγορη



επαναγγείωση του και την εισροή πρώιμων μεσεγγυματικών κυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος με αποτέλεσμα την οστεογένεση. Ελάχιστοι αυτόχθονες ώριμοι οστεοβλάστες του αρχικού αυτομοσχεύματος τελικώς επιβιώνουν (Cypher and Grossman, 1996). Το αντίθετο συμβαίνει στο φλοιώδες αυτομόσχευμα όπου η αρχική σταθερότητα του μόσχευματος, στη στροφική παραμόρφωση αλλά κυρίως στη συμπίεση, σταδιακά ελαττώνεται, καθώς το μόσχευμα απορροφάται από τους οστεοκλάστες του γύρω οστού-δέκτη και έτσι το μόσχευμα σύντομα χάνει μέχρι και το 1/3 της αρχικής του δύναμης (Burchardt, 1987). Το αυτομόσχευμα φλοιώδες ή σπογγώδες έχει συγκεκριμένα μειονεκτήματα, όπως η περιορισμένη διαθεσιμότητα, η μεγάλη απώλεια αίματος κατά την λήψη του, η πιθανότητα λοίμωξης στην εστία συγκομιδής, το υψηλό κόστος και ο χρόνιος πόνος που συχνά ακολουθεί τη λήψη του (Kurz et al, 1989; Younger and Chapman, 1989).

#### *Αλλομόσχευμα*

Το αλλομόσχευμα είναι μία εναλλακτική λύση του αυτομοσχεύματος. Έχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα και μπορεί να συντηρηθεί για πολλούς μήνες στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ωστόσο είναι κατώτερο σε ότι αφορά τις οστεοεπαγωγικές ιδιότητες και ασφαλώς δεν διαθέτει ζωντανά κύτταρα. Η βιολογική του κατωτερότητα οφείλεται στην ανοσολογική αντίδραση που προκαλεί και στο υψηλό ποσοστό φλεγμονής και λοίμωξης που παρατηρείται κατά τη μεταμόσχευσή του (Mankin et al, 1996; Strong et al, 1996). Πέραν της ανοσολογικής ασυμβατότητας το μείζον πρόβλημα του αλλομοσχεύματος είναι η μετάδοση ηπατίτιδας Β και C καθώς και HIV (Simonds et al, 1992).

#### *Αποασβεστοποιημένο οστό*

Η επεξεργασία του οστού με υδροχλωρικό οξύ καταστρέφει τα ζωντανά κύτταρα (οστεοβλάστες και λιποκύτταρα) και προκαλεί αποασβεστοποίηση. Η απώλεια των κυττάρων ελαττώνει την ανοσολογική δυναμική του οστού (Friedlaender and Horowitz, 1992; Friedlaender et al, 1999), ελαττώνει το ιογενές φορτίο (Li et al, 2001; Pruss et al, 2002; Swenson and Arnoczky, 2003) και καθιστά το οστό

περισσότερο συμβατό για αλλομεταμόσχευση. Αυτό που απομένει μετά την αποασβεστοποίηση είναι ο κολλαγονικός σκελετός (κολλαγόνο τύπου I), μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, οστεοποντίνη (osteopontin) και οστεοκαλσίνη (osteocalcin) και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες. Ο Marsall Urist έδειξε το 1965 (Urist, 1965) ότι η εμφύτευση μερικώς αποασβεστοποιημένου οστού σε έκτοπη εστία (κοιλιακούς μυς αρουραίων) προκάλεσε οστεοποίηση. Η συναρπαστική αυτή παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι αυξητικοί παράγοντες καθηλωμένοι στον κολλαγονικό σκελετό, του μερικώς αποασβεστοποιημένου οστού, επέδρασαν σε μία ομάδα πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων, που επιστρατεύτηκαν στην περιοχή από την κυκλοφορία του αίματος, καθώς φυσικά οι μυς δεν διέθεταν οστεοβλάστες και προκάλεσαν τη διαφοροποίηση των πρώιμων αυτών κυττάρων σε οστεοβλάστες που τελικώς παρήγαγαν οστό (Van de Putte and Urist, 1965; Urist et al, 1967). Αργότερα βρέθηκε ότι οι οστεοεπαγωγικοί αυτοί παράγοντες ήταν πρωτεΐνες που ανήκαν στην υπερικογένεια TGF- $\beta$ , η οποία ρυθμίζει τη διαφοροποίηση, την έκφραση και τον πολλαπλασιασμό πολλών και διαφορετικών κυτταρικών σειρών, μεταξύ των οποίων και των οστεοπρογενετικών κυττάρων και ως εκ τούτου ονομάστηκαν Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (Hahn et al, 1992; Wozney, 1992). Το πλήρως αποασβεστοποιημένο οστό (Insoluble Collagenous Bone Matrix, ICBM) δεν έχει καμιά οστεοεπαγωγική δυνατότητα λόγω της πλήρους καταστροφής όλων των πρωτεϊνών επιφανείας από τη διαδικασία αποασβεστοποίησης (υδροχλωρικό οξύ). Ο συνδυασμός του ωστόσο με τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες επαναφέρει τις οστεοεπαγωγικές του ιδιότητες (Sampath and Reddi, 1981,1984). Οι ίδιοι ερευνητές (Sampath and Reddi, 1983) έδειξαν επίσης, ότι το ICBM που προέρχεται από διάφορα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, μπορεί να συνδυαστεί με ανασυνδυασμένες ανθρώπινες οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες και να ανακτήσει τις οστεοεπαγωγικές του ιδιότητες με την επαγωγή έκτοπης οστεοποίησης, στο πειραματικό μοντέλο του αρουραίου. Η παρατήρηση αυτή έδειξε τη βιολογική συνάφεια της πρωτεϊνικής δομής των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών στα θηλαστικά. Το μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό (DBM) έχει

χρησιμοποιηθεί με αρκετή επιτυχία σε ζωικά μοντέλα επιβεβαιώνοντας την οστεοεπαγωγικότητα αλλά και την οστεοαγωγικότητά του. Το DBM έχει χρησιμοποιηθεί μόνο του (Edwards et al, 1998) ή σε συνδυασμό με αυτομόσχευμα (Muschler et al, 1996) ή κεραμικά εκμαγεία, όπως ο υδροξυαπατίτης (Alper et al, 1989). Οι Killian et al (1998) έδειξαν αυξημένα ποσοστά επούλωσης της καλοήθους οστικής κύστης του άνω τριτημορίου του βραχιόνιου οστού μετά από απόξεση της κοιλότητας της κύστης και μεταμόσχευση με αποασβεστοποιημένο οστό. Οι Glowacki et al (1981a, 1981b) χρησιμοποίησαν το αποασβεστοποιημένο οστό σε πολλές εφαρμογές της γναθοχειρουργικής για τη κάλυψη κενών του σπλαχνικού και του προσωπικού κρανίου με εντυπωσιακή επιτυχία (Mulliken and Glowacki, 1980). Οι Michelson και Curl (1996) πέτυχαν εξίσου καλά αποτελέσματα στην αρθρόδεση της ποδοκνημικής άρθρωσης χρησιμοποιώντας αποασβεστοποιημένο οστό αντί για το λαγόνιο αυτομόσχευμα. Οι Tiedemann et al (1995) χρησιμοποίησαν το αποασβεστοποιημένο οστό μαζί με λαγόνιο αυτομόσχευμα για τη θεραπεία οστικών κενών συνεπεία διαφόρων καταγμάτων και έδειξαν επούλωση σε ποσοστό 97%. Η ομάδα του Boden έδειξε στο μοντέλο των τρωκτικών αλλά και στον άνθρωπο καλά αποτελέσματα από τη χρήση αποασβεστοποιημένου οστού στην οπίσθια σπονδυλοδεσία (Morone and Boden, 1998; Martin et al, 1999).



**Εικόνα 5.** Μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό

## **ii. Εκμαγεία Σιλικόνης**

Τα εκμαγεία σιλικόνης παρουσιάζουν ικανότητα απευθείας πρόσφυσης στο οστό. Αποτελούνται από διαφορετικά μείγματα οξειδίου του νατρίου, ασβεστίου, φωσφόρου, αλουμινίου και σιλικόνης.

Παρουσιάζουν οστεοαγωγιμότητα και αυξημένες ικανότητες πρόσφυσης στο οστό λόγω της πρόσμιξης της σιλικόνης (Hench and Wilson, 1984). Πρόσφατα ο συνδυασμός τους με πολυσουλφόνες και πολυουρεθάνη έχει βελτιώσει την αντοχή και τα βιομηχανικά χαρακτηριστικά των υλικών αυτών (Schulte et al, 2000).

## **iii. Κεραμικά εκμαγεία**

Τα βιοαπορροφήσιμα κεραμικά που έχουν μελετηθεί ευρέως είναι το  $\text{CaCO}_3$  (Jamali et al, 2002; Monchau et al, 2002), το  $\text{CaSO}_4$  (Hadjipavlou et al, 2002; Murashima et al, 2002) και το  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Friedman and Constantino, 1998; Bloemers et al, 2003; Gauthier et al, 2003). Ο σημαντικότερος λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούνται είναι η ιστοσυμβατότητά τους με το ανθρώπινο οστό, καθώς δεν έχουν πρωτεΐνες και κατά συνέπεια παρουσιάζουν μικρή αντιγονική δράση, αλλά και γιατί αποτελούνται κυρίως από ασβέστιο όπως και το φυσικό οστό (Hammerle et al, 1997). Επιπρόσθετα διαθέτουν αυξημένη οστεοαγωγιμότητα και συνδέονται απευθείας με το οστό χωρίς τη διαμεσολάβηση αντιδραστικού ινώδους ιστού, στο όριο υλικού-οστού, όπως συμβαίνει στην πλειονότητα των βιοϋλικών που εμφυτεύονται στο ανθρώπινο σώμα (Hardy et al, 1994). Το κυριότερο, ωστόσο, πρόβλημα κατά τη χρήση τους είναι η ευθραυστότητά τους και η μικρή τους αντοχή στην ελαστική και στροφική παραμόρφωση. Ακόμη η συνήθως αργή και πολλές φορές υπολειμματική βιοαπορροφησιμότητά τους αποτελεί ένα μειονέκτημα. Τα μονοπύρρηνα μακροφάγα του σώματος είναι σε θέση να φαγοκυττώνουν κόκκους κεραμικού υδροξυαπατίτη μέχρι 2-10  $\mu\text{m}$ . Έτσι μεγαλύτερα τεμάχια μπορεί να παραμείνουν ως ξένα σώματα μέχρι και 10 χρόνια. Τα κεραμικά εκμαγεία έχουν πρόσφατα συνδυαστεί με την οστεοπρογενετική πρωτεΐνη-2 (rh BMP -2) σε *in vivo* μοντέλα πλήρωσης οστικών κενών με επιτυχία (Hollinger and Winn, 1999; Takahashi et al, 1999).

### *Υδροξυαπατίτης [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]*

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί το κύριο ανόργανο συστατικό του φυσικού οστού και σε συνθετική μορφή είναι διαθέσιμος από το 1970. Κατασκευάζεται σε πορώδη, συμπαγή και κοκκώδη μορφή. Ως κεραμικό παρασκευάζεται με θέρμανση μεταξύ 700 και 1300 °C και για το λόγο αυτό έχει κρυσταλλική δομή. Ο κεραμικός υδροξυαπατίτης είναι ανθεκτικός στη συμπίεση αλλά παρουσιάζει μειωμένη αντοχή στην ελαστική παραμόρφωση και στη παραμόρφωση από δυνάμεις διάσχυσης και διάτασης (shearing) (Oonishi et al, 1997a). Η χρήση του στην Ορθοπαιδική έχει επεκταθεί στην επικάλυψη των μεταλλικών προθέσεων για την ενίσχυση της οστεοενσωμάτωσής τους (Havelin et al, 2000) και κατ' επέκταση της πλήρωσης οστικών κενών (Oonishi et al, 1997b; Li et al, 2002). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πορώδης υδροξυαπατίτης που δημιουργείται από την υδροθερμική σύντηξη μεταξύ φωσφορικού ασβεστίου και ειδικών θαλάσσιων κοραλλιών (Genus *Gonipora*, *Porites*) (Holmes et al, 1986; van Eeden and Ripamonti, 1994; Preidler et al, 1996). Ο σκοπός αυτής της σύντηξης είναι να δημιουργηθεί υδροξυαπατίτης παρόμοιος δομικά με το θαλάσσιο κοράλλι, που η μορφολογία της πόρωσής του είναι παρόμοια με αυτή του σπογγώδους οστού. Παρόλα αυτά οι εμβιομηχανικές του ιδιότητες είναι όμοιες με αυτές του απλού κεραμικού υδροξυαπατίτη, δηλαδή μειωμένη αντοχή στην ελαστική παραμόρφωση και στις διασχιστικές-διατατικές δυνάμεις (shearing). Το πλεονέκτημα του κοραλλιογενούς υδροξυαπατίτη είναι ότι δεν προκαλεί το φαινόμενο της "αποφυγής του μηχανικού φορτίου" ("stress shielding") και κατά συνέπεια επιτρέπει την οστική ανάπλαση με βάση το νόμο του Wolff (Frassica et al, 1997; Skerry and Suva, 2003). Σύμφωνα με το νόμο αυτό, περισσότερο συμπαγές οστό βρίσκεται στο φλοιό των οστών ενώ περισσότερο σπογγώδες οστό βρίσκεται στις μεταφύσεις. Αρχικά, αμέσως μετά τη μεταμόσχευση, η αντοχή και η πλαστικότητα του κοραλλιογενούς υδροξυαπατίτη παραμένουν χαμηλά. Καθώς όμως νέο οστό διεισδύει και αναπτύσσεται μέσα στο δίκτυο του κοραλλιού, ο υδροξυαπατίτης ανακάμπτει σε ότι αφορά την αντοχή και την ελαστικότητά του (Holmes et al, 1984). Ο κοραλλιογενής υδροξυαπατίτης έχει δοκιμαστεί με

επιτυχία σε φορτιζόμενες οστικές επιφάνειες, όπως η άνω επίφυση της κνήμης (Bucholz et al, 1989) αλλά και μη φορτιζόμενες, όπως το εγγύς άκρο του βραχιονίου οστού (Wolfe et al, 1999). Επίσης έχει εκτεταμένα δοκιμαστεί στη σπονδυλοδεσία με ή χωρίς αυτομόσχευμα (Boden et al, 1999).

#### *Ανθρακικό ασβέστιο [CaCO<sub>3</sub>] και Τριφωσφορικό ασβέστιο [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]*

Ο συνδυασμός ανθρακικού και τριφωσφορικού ασβεστίου με τον υδροξυαπατίτη (Yin et al, 2003; Zhang et al, 2003; Xu et al, 2004) και διαφόρους αυξητικούς παράγοντες έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετά *in vivo* μοντέλα κατάγματος (Emery et al 1996; Fuller et al, 1996) καθώς επίσης και σε *in vivo* πειραματικές σπονδυλοδεσίες με επιτυχία (Passuti et al, 1989). Το τριφωσφορικό ασβέστιο έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του σπογγώδους οστού σε συντριπτικά ή οστεοπορωτικά κατάγματα (Goodman et al, 1998; Kopylov et al, 1999; Mahr et al, 2000; Schildhauer et al, 2000) στον άνθρωπο παρά το γεγονός ότι έχει ενοχοποιηθεί για ισχαιμική νέκρωση και μη-πώρωση των καταγμάτων.

#### *Κεραμικά με οστεογενετικές πρωτεΐνες*

Κεραμικά και οστεοπρογενετικές πρωτεΐνες (rh BMP-2) έχουν πρόσφατα συνδυαστεί σε *in vivo* μοντέλα με επιτυχία (Takahashi et al, 1999), ενώ η χρήση οστεοπρογενετικών κυττάρων έχει συνδυαστεί με κεραμικά εκμαγεία σε πρόσφατες *in vivo* μελέτες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Solchaga et al, 2002).

#### **iv. Πολυμερή**

Τα πολυμερή είχαν παλαιότερα χρησιμοποιηθεί ως υλικά εσωτερικής οστεοσύνθεσης χωρίς όμως ευρεία αποδοχή. Πρόσφατα, έχουν εμφανιστεί ξανά στο προσκήνιο της έρευνας ως εκμαγεία-φορείς οστεοεπαγωγικών παραγόντων (Xynos et al, 2000; Deschamps et al, 2002; Claase et al, 2003; Karp et

al, 2003; Kim et al, 2003; Lu et al, 2003; Mendes et al, 2003; Saito and Takaoka, 2003). Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο πολυμερές είναι το PLGA (poly lactic glycolic acid), το οποίο παρασκευάζεται σε τρισδιάστατη πορώδη μορφή και απορροφάται από το σώμα. Επίσης τα παράγωγά του, PLA (poly lactic acid) και PGA (poly glycolic acid) προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Yang et al, 2003). Ο συνδυασμός τους με τον υδροξυαπατίτη και το τριφωσφορικό ασβέστιο με την τεχνική των διφασικών εκμαγείων, έχουν ενισχύσει την οστεοεπαγωγική τους ικανότητα αλλά και την οστεοαγωγικότητά τους (Daculsi et al, 1999; Marra et al, 1999).

#### **v. Πρόσφατες και μελλοντικές εφαρμογές στην τεχνολογία των εκμαγείων**

##### *Πόρωση του εκμαγείου*

Το κατάλληλο μέγεθος των πόρων είναι αναγκαίο χαρακτηριστικό του εκμαγείου για την διευκόλυνση της κυτταρικής ανάπτυξης, την έκλυση αυξητικών παραγόντων και την νεοαγγειογένεση. Οι Burg et al (2000) βρήκαν ότι η ιδανική διάμετρος του πόρου πρέπει να είναι 200-400 μm ενώ οι Pineda et al (1996) υποστήριξαν ότι η μέγιστη διάμετρος δεν πρέπει να ξεπερνά τα 200 μm. Πρόσφατα έχει γίνει κατανοητό ότι το εκμαγείο πρέπει να διαθέτει μικρούς και μεγάλους πόρους το δε ποσοστό της πορώδους σε σχέση με το συμπαγές υλικό θα πρέπει να είναι μεταξύ 50-70% ώστε να διευκολύνεται η μετανάστευση και η καθήλωση των κυττάρων στην επιφάνειά του. Επίσης το δίκτυο των πόρων θα πρέπει να διαθέτει ενδοεπικοινωνία κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διευκολύνεται ο προσανατολισμός των νεοαγγείων (Klein et al, 1983; Lin et al, 2003).

##### *Η αρχιτεκτονική επιφανείας του εκμαγείου*

Καθώς τα κεραμικά εκμαγεία αποτελούν την κυριότερη ομάδα βιοϋλικών με αποδεδειγμένες οστεοεπαγωγικές ιδιότητες, η αρχιτεκτονική της επιφανείας τους έχει συγκεντρώσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Ιδιαίτερα ο υδροξυαπατίτης με πορώδη μορφή (sintered porous

hydroxyapatite, SPHA) ο οποίος ονομάζεται και "έξυπνο υλικό" ("smart material"), κατασκευάζεται με τη μορφή εναλλασσομένων κοιλοτήτων και προσεκβολών, με τέτοια γεωμετρία, που να προκαλεί την οστεοεπαγωγή, χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων (Friedman and Constantino, 1998; Ripamonti et al, 2001).

#### *Βιοαπορροφησιμότητα εκμαγείου*

Σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση της συμπεριφοράς των βιοϋλικών είναι η μελέτη και ερμηνεία της κινητικής της βιοαπορροφησιμότητας τους σε συνδυασμό με την μηχανική ισχύ του υλικού. Έτσι νέα πολυμερή, όπως οι πολυ-ορθο-εστέρες (poly-orthoesters), παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της σταδιακής επιφανειακής απορρόφησης και της σταδιακής υποκατάστασης από οστό. Έτσι το υπόλοιπο βιοϋλικό, πλην αυτού της επιφανείας, παραμένει αναλλοίωτο προσφέροντας μηχανική στήριξη (Andriano et al, 1999).

#### *Νανοτοπογραφία και βιομιμητική του εκμαγείου*

Μια άλλη εξέλιξη στην έρευνα των βιοαπορροφήσιμων υλικών είναι η συνεχής αλλαγή της επιφανειακής τους τοπογραφίας (νανοτοπογραφία) και της επιφανειακής τους ενέργειας (βιομιμητική). Και οι δύο αυτές παράμετροι επηρεάζουν την πρόσφυση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην επιφάνεια των βιοϋλικών (Dalby et al, 2002; Green et al, 2002). Επίσης η προσαρμογή του βιοϋλικού στο μηχανικό περιβάλλον της δέτριας οστικής περιοχής μπορεί να επηρεάσει την πρόσφυση αλλά ακόμα και τον προσανατολισμό των κυττάρων στο βιοϋλικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τον ερεθισμό μηχανοϋποδοχέων των κυττάρων με την χρήση αργά εκλυομένων χημικών διαβιβαστών στην επιφάνεια των βιοϋλικών. Παράδειγμα βιομιμητικού υλικού είναι το εκμαγείο PGLA με συνδυασμό αναστολέων της πύλης του ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ ). Ο συνδυασμός αυτός σε ένα μοντέλο κυκλικά φορτιζόμενου περιβάλλοντος και πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων, προκαλεί την αύξηση της



γονιδιακής έκφρασης του κολλαγόνου τύπου I από μεσεγχυματικά κύτταρα, χαρακτηριστικού της οστεοβλαστικής τους διαφοροποίησης (Yang et al, 2002). Ένα άλλο παράδειγμα βιομίμησης είναι η ενσωμάτωση μικροπεπτιδίων (αλυσίδες αμινοξέων που περιέχουν αργινίνη, θυμίνη και ασπαρτικό οξύ) στην επιφάνεια των βιοϋλικών. Τα μικροπεπτίδια αυτά αυξάνουν την πρόσφυση των κυττάρων στην επιφάνεια του υλικού κατά τρόπο αντίστοιχο της πρόσφυσης των κυττάρων στο κολλαγονικό σκελετό του οστού (Quirk et al, 2001).

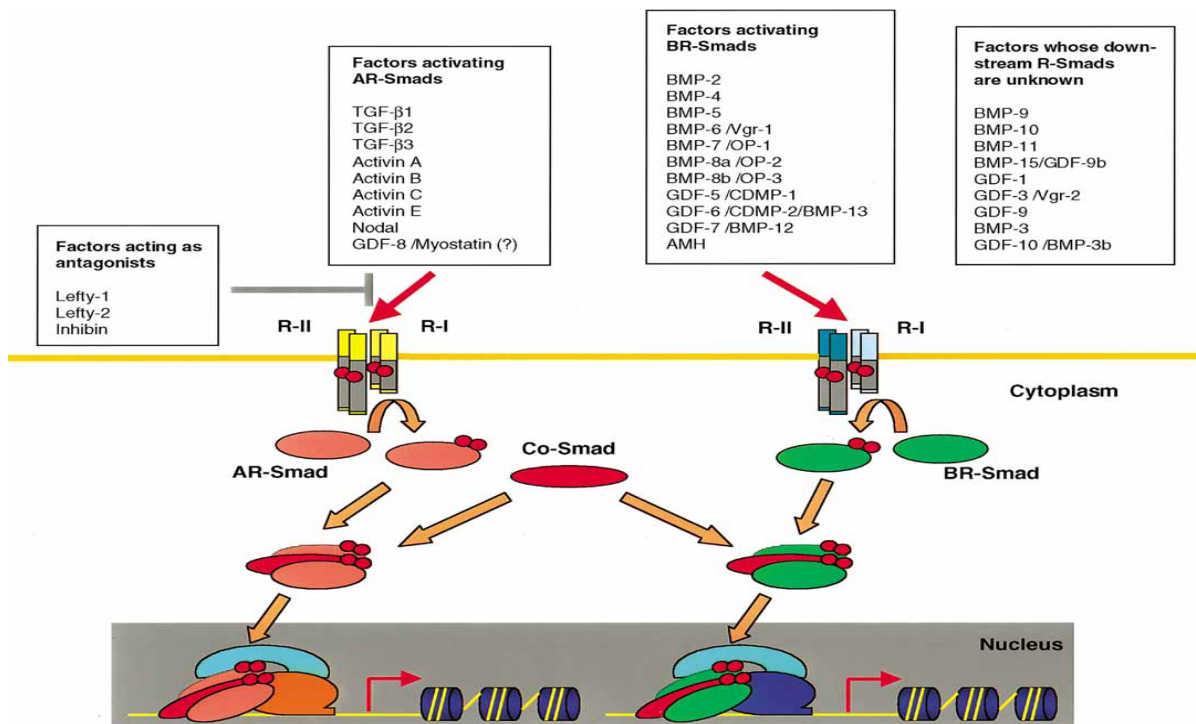
*Παρασκευή εκμαγείων χωρίς επεξεργασία με διαλυτικά ή θερμότητα (supercritical fluid technology)*

Η νέα αυτή τεχνολογία επιτρέπει την ενσωμάτωση αυξητικών παραγόντων στο εκμαγείο και κατά συνέπεια την ενίσχυση της οστεοεπαγωγικής ικανότητάς του εκμαγείου χωρίς την επεξεργασία με χημικούς παράγοντες ή θερμικές δοκιμασίες (Kompella and Koushik, 2001). Έτσι οι αυξητικοί παράγοντες ενσωματώνονται στο εκμαγείο, καθώς η απουσία του χημικού ή θερμικού παράγοντα τους προφυλάσσει από την καταστροφή της πρωτεϊνικής τους δομής (Green et al, 2002).

### **3. Αυξητικοί Παράγοντες**

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα και δρουν ως διαβιβαστές μηνυμάτων για τα γειτονικά κύτταρα, ώστε αυτά να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται. Δρουν στο μυσκελετικό σύστημα αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως στο νευρικό και στο ουροποιητικό σύστημα αλλά και νωρίτερα στην εξέλιξη του οργανισμού κατά την οργανογένεση και κατά την διαμόρφωση των άνω και κάτω άκρων. Οι παράγοντες αυτοί δρουν σε ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές που μεταβιβάζουν την πληροφορία στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της βιολογικής απάντησης του κύτταρου-στόχου (Stein and Staros, 1996). Ένα σύνολο αυξητικών παραγόντων εμπλέκεται στη διαδικασία της εμβρυϊκής ενδοχόνδρινης οστεομορφογένεσης που είναι παρόμοια με τη διαδικασία πάρωσης του

κατάγματος, όπως ο transforming growth factor - $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Critchlow et al, 1995), bone morphogenetic proteins (BMPs) (Wozney et al, 1988), fibroblast growth factor (FGF) (Kato et al, 1998), platelet derived growth factor (PDGF) (Nash et al, 1994), insulin-like growth factor (IGF) (Trippel et al, 1998). Οι Hauschka et al (1988) έδειξαν ότι η οστεογένεση είναι αποτέλεσμα συνδυασμένης δράσης διαφόρων αυξητικών παραγόντων, που δρουν σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας. Οι πιο σημαντικοί αυξητικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την χονδρογένεση και την οστεογένεση ανήκουν στην υπερικογένεια TGF- $\beta$ . Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες είναι ο σημαντικότερος εκπρόσωπος της υπερικογένειας αυτής. Υπάρχουν 15 οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP-2 ως BMP-16), που ρυθμίζουν την οστεογένεση μέσω της επιστράτευσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των πρώιμων μεσεγχεματικών κυττάρων του μυελού των οστών (Urist, 1965; Wozney et al, 1988; Kingsley, 1994; Reddi, 2001).



**Εικόνα 6.** Η δράση των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (Miyazono et al, 2001)

Η βιολογική τους δράση εκφράζεται μέσω ειδικών υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης τύπου I (ten Dijke et al, 1994; Yamashita et al, 1994) και τύπου II (Rosenzweig et al, 1995), οι οποίοι είναι σερίνη /θρεονίνη κινάσες. Οι κινάσες αυτές είναι ένζυμα που φωσφοριλιώνουν ειδικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται *Smads*, όπως τις χαρακτήρισε η ομάδα του Gelbart το 1995 και τις ενεργοποιούν (Sekelsky et al, 1995). Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες *Smads* μεταβαίνουν στον πυρήνα του κυττάρου και παίρνουν μέρος στην ρύθμιση της αντιγραφής (transcriptional regulation) των γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών (πχ κολλαγόνου, πρωτεογλυκανών, οστικής σιαλοπρωτεΐνης, οστεοποντίνης, οστεοκαλσίνης και ορμονικών υποδοχέων για την παραθορμόνη και τη βιταμίνη D3) που είναι χαρακτηριστικές της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης (Derynck et al, 1996; Savage et al, 1996; Sakou et al, 1999). Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες έχουν δοκιμαστεί εκτεταμένα σε *in vitro* (Gazzerro et al, 1998; Rickard et al 1998; Suzawa et al, 1999) και *in vivo* (Gerhart et al, 1993; Cook et al, 1994; Bostrom et al, 1996; Ripamonti et al, 1996; Kirker-Head et al, 1998) πειράματα καθώς και κλινικές μελέτες τα τελευταία χρόνια (Johnson and Urist, 1998; Johnson et al, 1988, 1990; Boden et al, 2000a, 2000b; Friedlaender, 2001; Friedlaender et al, 2001). Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 7 (Friedlaender et al, 2001; Pecina et al, 2001; Johnsson et al, 2002) και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-2 (Boden et al, 2000b; Burkus et al, 2002; Govender et al, 2002; Lieberman et al, 2002) έχουν μελετηθεί περισσότερο, στην κλινική πράξη, καθώς έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν οστεοεπαγωγή σε σημαντικότερο βαθμό από ότι οι άλλες μορφογενετικές πρωτεΐνες. Μπορεί να απομονωθούν από τα οστά ζώων ή να δημιουργηθούν με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA (recombinant human BMP-2, recombinant human BMP-7). Η χρήση τους επικεντρώνεται στην τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA για τις εφαρμογές τους στα κλινικά πειράματα. Πρόσφατα έχει εισαχθεί στην έρευνα των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών η τεχνική της γενετικής θεραπείας (gene therapy) (Evans and Robbins, 1995). Η γενετική θεραπεία βασίζεται σε δύο στρατηγικές. Στην πρώτη *in vivo* στρατηγική ένας ιός εισάγεται απευθείας στον

οργανισμό στην περιοχή όπου σταθμεύουν τα κύτταρα στόχοι ενώ στη δεύτερη *ex vivo* στρατηγική, τα κύτταρα στόχοι μεταφέρονται εκτός του οργανισμού και "μολύνονται" με το γενετικό υλικό ενός ιού (ρετροϊού ή αδενοϊού). Το γενετικό αυτό υλικό των ιών αυτών είναι ειδικά παρασκευασμένο, ώστε να διαθέτει την αλληλουχία των βάσεων που κωδικοποιούν τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (He et al, 1998). Κατ' αυτόν τον τρόπο το "μολυσμένο" από τον ιό κύτταρο ενσωματώνει στο DNA του πυρήνα του και πολλαπλασιάζει το γενετικό υλικό του ιού, που μεταφράζεται με τη παραγωγή των υπό ζήτηση οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών. Τα "μολυσμένα" αυτά κύτταρα είτε βρίσκονται στη περιοχή της βλάβης (*in vivo*) είτε επανέρχονται στην περιοχή της βλάβης με αυτομεταμόσχευση (*ex vivo*) και δρουν θεραπευτικά. Ωστόσο, υπάρχουν σαφή προβλήματα βιοασφάλειας που δεν επιτρέπουν τη χρήση τους στην κλινική πράξη. Οι ρετροϊοί εισάγουν το γενετικό τους υλικό σε τυχαίες περιοχές του DNA του κυττάρου-δέκτη και αυτό μπορεί να προκαλέσει απρόβλεπτες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς επίσης έχουν μικρή δυνατότητα πρόσληψης (μέχρι 8kb) νουκλεϊκού οξέος (εξωγενές DNA) λόγω του μικρού μεγέθους του γονιδιώματός τους. Το ίδιο ισχύει και για τους αδενοϊούς που έχουν δυνατότητα πρόσληψης μέχρι 4kb εξωγενούς DNA, ενώ επιπρόσθετα χάνουν γρήγορα την ικανότητα έκφρασης από το δέκτη πιθανόν λόγω αντισωματικής αντίδρασης του οργανισμού απέναντι στο "μολυσμένο" κύτταρο δέκτη (Niyibizi et al, 1998; Franceschi et al, 2000; Krebsbach et al, 2000; Baltzer et al, 1999a, 1999b, 2000a, 2000b; Cheng et al, 2001).

## II. ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΑ ΚΑΤΑΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ: ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Επιδημιολογία

Τα περιπροσθετικά κατάγματα του ισχίου αυξάνονται σε συχνότητα και πολυπλοκότητα τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται από τη μια μεριά στο γεγονός της αύξησης του αριθμού των ολικών αρθροπλαστικών του ισχίου και από την άλλη στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης του πληθυσμού. Τα κατάγματα αυτά μπορεί να συμβούν διεγχειρητικά ή μετεγχειρητικά. Στην τελευταία αυτή περίπτωση συνδυάζονται με τη χαλάρωση της πρόθεσης και πολλές φορές με την οστεόλυση του περιβάλλοντος οστού. Διεγχειρητικά, η επίπτωση τους βρίσκεται περίπου στο 1% των αρθροπλαστικών με τσιμέντο (Lowenhielm et al, 1989; Garcia-Cimbrelo et al, 1992) και στο 3-18% των αρθροπλαστικών χωρίς τσιμέντο (Christensen et al, 1989; Stuchin, 1990; Mont et al, 1992; Berry et al, 1999). Όταν τα κατάγματα αυτά συμβαίνουν μετά από μια αναθεώρηση της αρθροπλαστικής του ισχίου, τα ποσοστά είναι υψηλότερα και ανέρχονται στο 6.3% για τις αναθεωρήσεις με τσιμέντο (Garbuz et al, 1998) και στο 17.6% για τις αναθεωρήσεις χωρίς τσιμέντο (Morrey and Kavanagh, 1992). Μετεγχειρητικά η επίπτωση των περιπροσθετικών καταγμάτων υπολογίζεται γύρω στο 1% μετά από αρθροπλαστική του ισχίου και στο 4% μετά από αναθεώρηση της αρθροπλαστικής του ισχίου (Kavanagh, 1992). Οι Lowenhielm et al (1989) σε μια ανασκόπηση 1,442 αρθροπλαστικών του ισχίου βρήκαν ότι η πιθανότητα μετεγχειρητικού περιπροσθετικού κατάγματος, μετά από ολική αρθροπλαστική ή αναθεώρηση ήταν 25.3 στα 1000 περιστατικά σε μια χρονική περίοδο 15 ετών, ενώ οι Beals and Tower (1996) βρήκαν ότι το ποσοστό αυτό στη διάρκεια ζωής μιας πρόθεσης είναι λιγότερο από 1%. Η επίπτωση των περιπροσθετικών καταγμάτων μετά από μία ημιολική αρθροπλαστική είναι άγνωστο. Σε μια έρευνα με 93 κατάγματα το 7% συνέβη γύρω από πρόθεση τυπού Austin Moore (Tower and Beals, 1999). Η επίπτωση των περιπροσθετικών καταγμάτων μετά

από αρθροπλαστική αναθεώρησης ολικής αρθροπλαστικής με πακτωμένο αλλομόσχευμα είναι μεταξύ του 5 και 24% (Masterson et al, 1997; Meding et al, 1997; Leopold and Rosenberg, 2000). Αναφέρεται ότι η ενίσχυση της αναθεώρησης με φλοιώδες αλλομόσχευμα (Emerson et al, 1992) ή μακρά πρόθεση (Elting et al, 1995) ελαττώνει την συχνότητα της πιο πάνω επίπλοκης μετά από την αναθεώρηση με πακτωμένο αλλομόσχευμα. Τα περιπροσθετικά κατάγματα συμβαίνουν συνήθως κατά τη διάρκεια ατυχημάτων χαμηλής ενέργειας, όπως πτώση στο έδαφος ή μετά από απλή στροφική παραμόρφωση κατά τη διάρκεια καθημερινών δραστηριοτήτων (Montijo et al, 1989; Jensen et al, 1990; Stern et al, 1991; Incavo et al 1998).

## 2. Ταξινόμηση

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη ταξινόμηση των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου αλλά μέχρι σήμερα καμιά δεν έχει κερδίσει καθολική αναγνώριση. Μερικές ταξινομήσεις περιγράφουν καλύτερα τα διεγχειρητικά κατάγματα (Johansson et al, 1981; Mallory et al, 1989, Schwartz et al, 1989; Stuchin, 1990) (πίνακας 1),

<b>Johansson et al (1981)</b>	<b>Τύπος 1</b> εγγύς	<b>Τύπος 2</b> μέση	<b>Τύπος 3</b> άπω	
<b>Stuchin et al (1990)</b>	<b>Τύπος 1</b> εγγύς	<b>Τύπος 2</b> μέση	<b>Τύπος 3</b> άπω	<b>Τύπος 4</b> μηριαίο υπερκονδύλιο
<b>Mallory et al (1989)</b>	<b>Τύπος 1</b> εγγύς του μείζονα τροχαντήρα	<b>Τύπος 2</b> 4 cm άπω του μείζονα τροχαντήρα	<b>Τύπος 3</b> άπω του τύπου 2	
<b>Schwartz et al (1989)</b>	<b>Εγγύς</b>		<b>Άπω</b>	

**Πίνακας 1.** Ταξινόμηση διεγχειρητικών περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου. Περιγραφή του κατάγματος σε σχέση με το στέλεχος.

ενώ άλλες περιγράφουν καλύτερα τα μετεγχειρητικά κατάγματα (Johansson et al, 1981; Bethea et al, 1982; Cooke and Newman, 1988; Roffman and Mendes 1989) (πίνακας 2).

<b>Tower and Beals (1999)</b>	<b>Τύπος I</b> διατροχαντήριο	<b>Τύπος II</b> μέση	<b>Τύπος III</b> (IIIΑ, IIIΒ, IIIC) άπω	<b>Τύπος IV</b> υπερκονδύλιο		
<b>Duncan et al (1995) (Vancouver)</b>	<b>Τύπος A</b> διατροχαντήριο	<b>Τύπος B</b> (B1, B2, B3) μέση	<b>Τύπος C</b> άπω			
<b>Roffman and Mendes (1989)</b>	<b>Σταθερό</b>	<b>Ασταθές</b>				
<b>Mont and Maar (1994)</b>	<b>Τύπος 1</b> διατροχαντήριο	<b>Τύπος 2</b> εγγύς	<b>Τύπος 3</b> μέση	<b>Τύπος 4</b> άπω	<b>Τύπος 5</b> συντριπτικό	<b>Τύπος 6</b> υπερκονδύλιο
<b>Cooke and Newman (1988)</b>	<b>Τύπος 1</b> συντριπτικό	<b>Τύπος 2</b> μέση (λοξό ή σπειροειδές)	<b>Τύπος 3</b> άπω (λοξό)	<b>Τύπος 4</b> άπω (εγκάρσιο)		
<b>Johansson et al (1981)</b>	<b>Τύπος 1</b> εγγύς	<b>Τύπος 2</b> μέση	<b>Τύπος 3</b> άπω			
<b>Jensen et al (1990)</b>	<b>Τύπος 1</b> εγγύς	<b>Τύπος 2</b> μέση	<b>Τύπος 3</b> άπω			
<b>Bethea et al (1982)</b>	<b>Τύπος A</b> άπω	<b>Τύπος B</b> μέση	<b>Τύπος C</b> συντριπτικό			
<b>Whittaker et al (1974)</b>	<b>Τύπος 1</b> διατροχαντήριο	<b>Τύπος 2</b> μέση	<b>Τύπος 3</b> άπω			

**Πίνακας 2.** Ταξινόμηση μετεγχειρητικών περιπροσθετικών κατάγματων του μηριαίου. Περιγραφή του κατάγματος σε σχέση με το στέλεχος της πρόθεσης.

Ωστόσο οι περισσότερες ταξινομήσεις μπορούν να εφαρμοστούν και στα διεγχειρητικά και στα μετεγχειρητικά κατάγματα πχ η ταξινόμηση Oregon (Tower and Beals, 1999), η Jensen (Jensen et al, 1988), η Whittaker (Whittaker et al, 1974), η Mont-Maar (Mont and Maar, 1994), η Johansson (Johansson et al, 1981) και η Vancouver (Duncan and Masri, 1995, Brady et al, 1999). Οι πιο δημοφιλείς ωστόσο ταξινομήσεις στη βιβλιογραφία είναι οι κατά Johansson και Vancouver. Ένα σύστημα ταξινόμησης θα πρέπει να είναι αναπαραγωγίμο και αξιόπιστο. Μέχρι σήμερα μόνο το σύστημα Vancouver πληρεί αυτές τις στατιστικές προϋποθέσεις (Brady et al, 2000), καθώς συμπεριλαμβάνει στην περιγραφή του την ανατομική θέση του κατάγματος, την ποιότητα του περιβάλλοντος οστού και την σταθερότητα της πρόθεσης (εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Περιπροσθητικά κατάγματα του μηριαίου. Κατάγματα Vancouver τύπου B1, B2 και B3, από αριστερά

### 3. Παράγοντες Κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου μπορεί να αφορούν τον ασθενή ή την πρόθεση (McElfresh and Coventry, 1974; Scott et al, 1975; Dunn and Hess, 1976; Poss et al, 1976; Talab et al, 1979; Pellicci et al, 1980; Pazzaglia and Byers, 1984; Wang et al, 1985; Eschenroeder and Krakow, 1988; Fitzgerald et al, 1988; Fredin, 1988; Missakian and Rand, 1993; Kelley, 1994) (πίνακας 3).

	<b>Διεγχειρητικά Κατάγματα</b>	<b>Μετεγχειρητικά Κατάγματα</b>
<b>Ασθενής</b>	Οστεοπόρωση Οστεομαλακία Ρευματοειδής Αρθρίτιδα Ατελής Οστεογένεση Νόσος Paget Δυσπλαστικό Ισχίο Παλαιό κάταγμα εγγύς μηριαίου	Θήλυ Εμμηνόπαυση Οστεοπόρωση
<b>Πρόθεση</b>	Διάτρηση Πρόθεση χωρίς τσιμέντο Αναθεώρηση ισχίου	Διάτρηση Οστεόλυση Χαλάρωση στελέχους Παρεμβολή τσιμέντου Ευένδοτα σημεία (π.χ., οπές βιδών, απολήξεις πλακών, βλαισότητα στελέχους)

**Πίνακας 3.** Παράγοντες Κινδύνου



#### 4. Πρόληψη

Η πρόληψη αυτών των καταγμάτων είναι υψίστης σημασίας, καθώς η θεραπεία τους είναι εξαιρετικά δύσκολη και το ποσοστό επιπλοκών υψηλό (Taylor et al, 1978; Sydney and Mallory, 1990; Incavo et al, 1991; Larson et al, 1991; Head et al, 1993; Reich and Jaffe, 1994; Egan and Di Cesare, 1995; Younger et al, 1995; Lavernia, 1998; Lewallen and Berry, 1998) (πίνακας 4α και 4β).

Επέμβαση	Διεγχειρητικά	Πρώιμη Μετεγχειρητική Περίοδος	Απότερη Μετεγχειρητική Περίοδος
<b>Ολική Αρθροπλαστική του Ισχίου</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• κατάλληλη επιλογή πρόθεσης</li> <li>• εξάρθρωση του ισχίου πριν την αφαίρεση υλικών οστεοσύνθεσης</li> <li>• κατάλληλη διατομή του αυχένα του μηριαίου</li> <li>• κεντρικός γλυφανισμός</li> <li>• προσεκτική είσοδος του στελέχους για την αποφυγή κατάγματος</li> <li>• προφυλακτική κυκλοτερής επίδεση του στελέχους με σύρματα σε περίπτωση ρωγμώδους κατάγματος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• καλές πρόσθιο-οπίσθιες και πλάγιες ακτινογραφίες ολοκλήρου του μηριαίου σε όρθια θέση και πλήρη φόρτιση</li> <li>• σταδιακή φυσιοθεραπεία</li> <li>• ιατρική και κοινωνική φροντίδα για την αποφυγή πτώσεων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αναθεώρηση στην περίπτωση ασυμπτωματικής οστεόλυσης</li> <li>• επίμονος μετεγχειρητικός πόνος μπορεί να σημαίνει κάταγμα</li> </ul>

**Πίνακας 4α.** Πρόληψη των περιπροσθετικών καταγμάτων κατά την διάρκεια της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου.

Επέμβαση	Διεγχειρητικά	Πρώιμη Μετεγχειρητική Περίοδος	Απότερη Μετεγχειρητική Περίοδος
<b>Αναθεώρηση της Ολικής Αρθροπλαστικής του Ισχίου</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• όπως και για την ολική αρθροπλαστική του ισχίου (πίνακας 4α)</li> <li>• προσοχή κατά τη διάρκεια αφαίρεσης του στελέχους και του τσιμέντου</li> <li>• ελεγχόμενη οστεοτομία μηριαίου με την χρήση λεπτού τρυπανιού</li> <li>• τροχαντήρια οστεοτομία για την αφαίρεση σταθερών στελεχών</li> <li>• η νέα πρόθεση να ξεπερνά την άπω γραμμή του κατάγματος κατά τουλάχιστον το μήκος δύο ομόπλευρων μηριαίων διαμέτρων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• όπως και για την ολική αρθροπλαστική του ισχίου (πίνακας 4α)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• όπως και για την ολική αρθροπλαστική του ισχίου (πίνακας 4α)</li> </ul>

**Πίνακας 4β.** Πρόληψη των περιπροσθετικών καταγμάτων κατά την διάρκεια της αναθεώρησης της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου.

## 5. Θεραπεία

### i. Συντηρητική θεραπεία

Η συντηρητική θεραπεία έχει ρόλο μόνο ιστορικό στην αντιμετώπιση αυτών των καταγμάτων (Mc Elfresh and Coventry, 1974; Scott et al, 1975). Με τις σύγχρονες τεχνικές δυνατότητες για τη θεραπεία των καταγμάτων και για την αναθεώρηση του ισχίου καθώς και με την ύπαρξη των τραπεζών οστού, έχει γίνει πλέον δυνατή η χειρουργική αντιμετώπιση των περιπροσθετικών καταγμάτων στις περισσότερες περιπτώσεις. Έτσι αποφεύγουμε τις σοβαρότατες επιπλοκές από την μακρά κατάκλιση



**Εικόνα 8.** Κακή πώρωση περιπροσθετικού κατάγματος (Tsiridis and Gie, 2002)



**Εικόνα 9.** Αναθεώρηση της πρόθεσης της εικόνας 8

(Johnson et al, 1984) και την αδυναμία διατήρησης της ανάταξης με σκελετική έλξη. Η συντηρητική θεραπεία έχει ποσοστό χαλάρωσης της πρόθεσης 19-100%, ποσοστό μη-πώρωσης από 25-42% και ποσοστό κακής-πώρωσης μέχρι και 45% (Johansson et al, 1981; Bethea et al, 1982; Beals and Tower, 1996; Tsiridis and Gie, 2002) (εικόνες 8 και 9). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις

που ο ασθενής δεν μπορεί να αντεπεξέλθει σε μακρό χειρουργικό χρόνο και δεν υπάρχει άλλη επιλογή πλην της συντηρητικής θεραπείας (Mont and Maar, 1994; Duncan and Masri, 1995; Beals and Tower, 1996). Επίσης τα κατάγματα του εγγύς μηριαίου πέριξ της ζώνης των τροχαντήρων (τύπου AG και AL) μπορεί να αντιμετωπισθούν συντηρητικά καθώς είναι συνήθως αποσπαστικά κατάγματα του μείζονα και ελάσσονα τροχαντήρα (Tower and Beals, 1999). Η σκελετική έλξη χρησιμοποιείται μόνο προεγχειρητικά για την επίτευξη αναλγησίας και την πρόληψη εμβολής αν και τις περισσότερες φορές

είναι σχεδόν αδύνατο να επιτευχθεί ανάταξη του κατάγματος (Johansson et al, 1981; Johnson et al, 1984; Mont and Maar, 1994).

## **ii. Χειρουργική θεραπεία**

Η αρχή της χειρουργικής θεραπείας είναι βασισμένη στη φιλοσοφία της ταξινόμησης Vancouver, με άλλα λόγια στην αποκατάσταση της σταθερότητας της πρόθεσης, στην αποκατάσταση της οστικής μάζας και στην ανάταξη του κατάγματος. Ο σκοπός της χειρουργικής θεραπείας είναι η πώρωση του κατάγματος, η ανατομική του ανάταξη, η σταθεροποίηση ή αναθεώρηση της πρόθεσης, η συντήρηση ή αποκατάσταση της οστικής μάζας και η γρήγορη κινητοποίηση του ασθενούς. Η χειρουργική αποκατάσταση επιτυγχάνεται με ενδομυελική ή εξωμυελική οστεοσύνθεση ή συνδυασμό και των δύο. Τα διεγχειρητικά κατάγματα πολλές φορές περνούν απαρατήρητα κατά τη διάρκεια της επέμβασης. Συχνά συμβαίνουν με τη χρήση προθέσεων χωρίς τσιμέντο και εντοπίζονται κυρίως εγγύς του ελάσσονα τροχαντήρα (Mallory et al, 1989; Mont and Maar, 1994). Σε αρκετές σειρές ικανοποιητικά μετεγχειρητικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν, όταν η πρόθεση παρέμενε σταθερή παρά την παρουσία του κατάγματος (Mallory et al, 1989; Stuchin, 1990; Kavanagh, 1992; Mont and Maar, 1994). Στη περίπτωση αναγνώρισης διεγχειρητικού κατάγματος η προφυλακτική χρήση κυκλοτερούς σύρματος σε σημείο χαμηλότερο του άπω ορίου του κατάγματος συνήθως σταματά την επέκτασή του (Incavo et al, 1990) ή ακόμη και η χρήση φλοιώδους αλλομοσχεύματος μπορεί επιπρόσθετα να αυξήσει την αντοχή του ραγέντος φλοιού (Emerson et al, 1992). Στην περίπτωση διάτρησης του φλοιού κατά την είσοδο του στελέχους ή στην περίπτωση αστάθειας της πρόθεσης λόγω του περιπροσθητικού κατάγματος η πρόθεση θα πρέπει να αντικαθίσταται με μακρύτερη (Kelley, 1994) που να ξεπερνά την άπω γραμμή του κατάγματος (stress riser) κατά τουλάχιστον το μήκος 2 σύστοιχων μηριαίων διαμέτρων (Larson et al, 1991; Morrey and Kavanagh, 1992; Stuchin, 1990). Η παρατήρηση αυτή βασίστηκε σε πειραματική in vivo εργασία, που έγινε σε μηριαία οστά σκύλων, όπου η τεχνική διάτρηση του μηριαίου οστού

μείωσε την αντοχή του οστού κατά 56% σε σχέση με την αντοχή της αντίθετης πλευράς. Στη συνέχεια του ίδιου πειράματος, η θεραπεία του τεχνητού κατάγματος με πρόθεση, που ξεπερνούσε τη διάτρηση κατά τουλάχιστον το μήκος 2 σύστοιχων μηριαίων διαμέτρων, η αντοχή του οστού αυξήθηκε από 56% σε 84% σε σχέση με την αντίθετη πλευρά (Larson et al, 1991).

#### *Αναθεώρηση της αρθροπλαστικής*

Οι περισσότεροι συγγραφείς συνιστούν αναθεώρηση με μακρά πρόθεση στην περίπτωση που η πρόθεση θεωρηθεί χαλαρή μετά από ένα περιπροσθετικό κάταγμα (Adolphson et al, 1987; Cooke and Newman, 1988; Duncan and Masri, 1995). Κατά τη διάρκεια της αναθεώρησης το στέλεχος της πρόθεσης θα πρέπει να ξεπερνά την άπω γραμμή του κατάγματος κατά τουλάχιστον 2 ομόπλευρες διαμέτρους. Ακόμη και με τη χρήση αυτής της εμβιομηχανικής αρχής το σύνολο των επιπλοκών όπως η μη-πώρωση και το επανειλημμένο κάταγμα φθάνει το 12-20% (Duncan and Masri, 1995). Μέχρι πρότινος οι περισσότεροι συγγραφείς συνιστούσαν αναθεώρηση με τσιμέντο (Cooke and Newman, 1988; Duncan and Masri, 1995; Lewallen and Berry, 1998), ενώ τελευταία οι αναθεωρήσεις χωρίς τσιμέντο κερδίζουν έδαφος (Kelley, 1994; Mont and Maar 1994, Beals and Tower, 1996; Incavo et al, 1998). Η αναθεώρηση με μακρό στέλεχος επιτρέπει καλή σταθεροποίηση του κατάγματος παρόμοια με αυτή της ενδομυελικής ήλωσης. Ένα μακρό στέλεχος με τσιμέντο προσφέρει την ίδια σταθερότητα με ένα στέλεχος χωρίς τσιμέντο ωστόσο παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι το τσιμέντο παρεμβάλλεται μεταξύ των θραυσμάτων του οστού (Cooke and Newman, 1988) και εμποδίζει δυνητικά την πώρωση (Incavo et al, 1990; Jensen et al, 1990). Αρκετοί συγγραφείς έχουν χρησιμοποιήσει στελέχη χωρίς τσιμέντο που διαθέτουν πορώδη υφή της επιφανείας του εγγύς τμήματος τους, με σκοπό την εγγύς πρόσφυση της πρόθεσης. Τα στελέχη αυτά έχουν δώσει φτωχά αποτελέσματα λόγω της κακής πρόσφυσης στο εγγύς μηριαίο όταν αυτό είναι οστεολυτικό (Berry et al, 1995; Peters et al, 1995; Malkani et al, 1996; Mulliken et al, 1996). Εναλλακτικά, η αναθεώρηση με μακρό στέλεχος, χωρίς

τσιμέντο, αλλά με πλήρη πορώδη επικάλυψη όλης της επιφανείας του, που προσφύεται στο λιγότερο



**Εικόνα 10.**  
Περιπροσθητικό κάταγμα  
Vancouver B3



**Εικόνα 11.** Αναθεώρηση με  
υποκατάσταση του εγγύς  
μηριαίου

οστεολυτικό άπω μηριαίο, προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα στο στέλεχος άλλα και στο κάταγμα (Moran, 1996; Incavo et al 1998).

Πρόσφυση στο άπω μηριαίο μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τη χρήση στελέχους τύπου Wagner (Kolstad, 1994) με αύλακες, όταν βεβαίως η οστική μάζα της διάφυσης είναι άθικτη (Incavo et al 1998).

Επιπρόσθετα, πολλοί συγγραφείς

συνιστούν οστεομεταμόσχευση για την ενίσχυση της πόρωσης του κατάγματος (Chandler and Tigges, 1998). Οι Bethea et al (1982) ανέφεραν ότι 75% των μετεγχειρητικών καταγμάτων σχετίζονται με χαλάρωση της πρόθεσης. Εάν συγχρόνως το οστό είναι οστεολυτικό συνιστάται αναθεώρηση με μακρύ στέλεχος με τσιμέντο ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους ασθενείς (Duncan and Masri, 1995). Οι ίδιοι συγγραφείς συνιστούν αντικατάσταση του εγγύς μηριαίου με μαζικό αλλομόσχευμα στην περίπτωση συντριπτικού κατάγματος σε νέους ασθενείς ή υποκατάσταση του εγγύς μηριαίου με μαζική πρόθεση, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στην Ορθοπαιδική Ογκολογία σε ηλικιωμένους ασθενείς (εικόνες 10 και 11). Στην τελευταία περίπτωση το οστό του ασθενούς διαφυλάσσεται έτσι ώστε να επικαλύπτει ως αγγειούμενο αυτομόσχευμα το μαζικό φλοιώδες αλλομόσχευμα του εγγύς μηριαίου (Wong and Gross, 1999). Οι Head et al (1999) δημοσίευσαν την εμπειρία του από 262 επεμβάσεις, από το 1983-1997, όπου χρησιμοποίησε φλοιώδες αλλομόσχευμα για την αποκατάσταση του οστεολυτικού εγγύς μηριαίου με 85% επιτυχία, ενώ και άλλοι συγγραφείς ανέφεραν ενθαρρυντικά

αποτελέσματα με μικρότερο ωστόσο χρόνο παρακολούθησης των αποτελεσμάτων (5 χρόνια) (DiFazio et al, 1993; Haddad et al, 2000). Επίσης προθέσεις τυπού Kent με μακρύ στέλεχος και τη δυνατότητα καθήλωση με βίδες στο άπω μηριαίο έχουν χρησιμοποιηθεί με σχετική επιτυχία άλλα χωρίς επιβεβαιωμένα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία.

#### *Ανοικτή ανάταξη και εσωτερική οστεοσύνθεση*

Η ανάταξη επιτυγχάνεται με κυκλοτερή σύρματα διαφόρων διαμέτρων ή με τη χρήση συσφιγκτήρων τύπου Parham ή Partridge (Partridge and Evans, 1982). Ωστόσο, κλινικές και εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η κυκλοτερής οστεοσύνθεση με σύρματα δεν είναι επαρκής (Garcia-Cimbrello et al, 1992). Οι τεχνικές AO/ASIF με τη χρήση πλακών DCP και DCS έχουν δώσει καλά αποτελέσματα ιδιαίτερα όταν η πρόθεση είναι σταθερή (Wang et al, 1985; Escenroeder and Krackow, 1988; Zenni et al, 1988; Dysart et al, 1989; Montijo et al, 1989; Stuchin, 1990; Serocki et al, 1992; Jukkala-Portio et al, 1998; Siegmeth et al, 1998). Οι πλάκες αυτές τοποθετούνται με βίδες και ενισχυτικά σύρματα γύρω από το κάταγμα. Επιπρόσθετες δυσκολίες προκύπτουν όταν το κάταγμα καταλαμβάνει όλο το μήκος



της πρόθεσης (τύπος B κατά Vancouver). Στην περίπτωση αυτή η χρήση των βιδών δεν ενδείκνυται και ειδικές πλάκες που επιτρέπουν τη χρήση συρμάτινων καλωδίων, έχει πρόσφατα παρουσιασθεί στη βιβλιογραφία.

Παράδειγμα αποτελούν οι πλάκες τύπου Ogden (Zenni et al, 1988; Montijo et al, 1989) και Dall-Miles (Dall and Miles,

1983; Berman and Zamarin, 1993; Haddad et al, 1997; Kamineni et al, 1999; Tadross et al, 2000). Οι

Tsiridis et al (2003a) (εικόνες 12 και 13) ανέφεραν επιπλοκές από τη χρήση των πλακών αυτών με 2 περιπτώσεις θραύσης της πλάκας σε μια παρουσίαση 16 περιστατικών από το Exeter. Οι Haddad et al (1997) ανέφεραν επιτυχία χρησιμοποιώντας τις πλάκες Dall-Miles σε συνδυασμό, όμως, με πλάκα φλοιώδους αλλομοσχεύματος σε 4 ασθενείς. Όμως, οι Tadross et al (2000) ανέφεραν αποτυχία σε 6 από τα 9 περιστατικά που θεράπευσαν με τη χρήση της πλάκας τύπου Dall-Miles. Τέλος οι πλάκες τύπου Mennen που έχουν ενσωματωμένους βραχίονες για περίσφιξη έχουν χρησιμοποιηθεί με αμφίβολα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία και θεωρούνται από τους περισσότερους συγγραφείς αναξιόπιστες για τη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων. Ίσως η μοναδική τους ένδειξη είναι ασθενείς που δεν μπορούν να υποβληθούν σε πολύωρες αναθεωρήσεις και απαιτούν μια γρήγορη επέμβαση με σχετική σταθεροποίηση του κατάγματος (Mennen, 1981, 1984, 1989; Dave et al, 1995; Radcliffe and Smith, 1996; Uchio et al, 1997; Petersen, 1998; Kamineneni and Ware, 1999; Tsiridis, 2003; Tsiridis and Narvani, 2003).

#### *Οστεοσύνθεση με φλοιώδες αλλομόσχευμα*

Η πρώτη βιβλιογραφική παρουσίαση της μεθόδου έγινε από τους Malinin et al (1984). Η μέθοδος αυτή προσέλυσε το ενδιαφέρον καθώς όχι μόνο αποκαθιστούσε τη σταθερότητα του κατάγματος άλλα συγχρόνως αποκαθιστούσε και την οστική μάζα που συνήθως ήταν υπολειμματική στις περιπτώσεις των περιπροσθετικών καταγμάτων (Malinin et al, 1984; Emerson et al 1992; Mihalko et al, 1992; Pak et al, 1993). Το φλοιώδες αλλομόσχευμα τοποθετείται συνήθως σε δύο επιφάνειες του μηριαίου (την πρόσθια και την πλάγια). Η εσωτερική επιφάνεια του φλοιώδους αλλομοσχεύματος διαμορφώνεται με τρόπο ώστε να εφαρμόζει στο μηριαίο οστό-λήπτη. Η όλη κατασκευή συγκρατείται με κυκλωτήρ σύρματα (Head et al, 1998). Οι Emerson et al (1992) έδειξαν εξαιρετικά αποτελέσματα με ποσοστό πωρώσεις μέχρι και 96.6% σε 8.4 μήνες. Οι Head et al (2000) ανέφεραν 96% επιβίωση της πρόθεσης, στα 10 χρόνια παρακολούθησης, με ποσοστό αναθεώρησης 3.2% σε 160 κατάγματα

χρησιμοποιώντας αυτή τη τεχνική από το 1987-1990. Πρόσφατα και άλλοι συγγραφείς έχουν επιβεβαιώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα από τη χρήση αυτής της τεχνικής (Chandler, 1997; Head et al, 1998; Head and Malinin, 2000; Emerson, 2000). Ωστόσο ένα από τα ευλογά ερωτήματα που προκύπτουν είναι το αντιγονικό φορτίο των φλοιωδών αλλομοσχευμάτων. Οι Friedlaender et al (1976) έδειξαν ότι το ξηρό αλλομόσχευμα είναι λιγότερο αντιγονικό απ' ό,τι το φρέσκο αλλομόσχευμα. Εμβιομηχανικά βέβαια το φρέσκο αλλομόσχευμα είναι περισσότερο ανθεκτικό στη συμπίεση σε σχέση με το ξηρό αλλομόσχευμα (Pelker and Friedlaender. 1987). Σήμερα στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται περισσότερο τα ξηρά αλλομοσχεύματα, που προέρχονται από τράπεζες οστού (εικόνα 14).

#### *Οστεοσύνθεση με Φλοιώδες αλλομόσχευμα και πλάκες*

Ο συνδυασμός φλοιώδους αλλομοσχεύματος (στην πρόσθια ή έσω πλευρά του μηριαίου) και πλάκας προσφέρει καλύτερη ποιότητα οστεοσύνθεσης. Η στήριξή τους γίνεται με κυκλωτερή σύρματα και βίδες. Η πλάκα εμβιομηχανικά προστατεύει το αλλομόσχευμα το οποίο σταδιακά ενσωματώνεται με το οστό-δέκτη και έτσι μακροχρόνια ενισχύεται το μηριαίο οστό (Ries, 1993). Οι Tower and Beals (1999) συνιστούν ότι ο συνδυασμός αλλομοσχεύματος / πλάκας θα πρέπει να ξεπερνά την άπω γραμμή του κατάγματος κατά τουλάχιστο 2 μηριαίες διαμέτρους. Επίσης θα πρέπει ο συνδυασμός των πλακών να είναι κλιμακωτός στο άπω άκρο του μηριαίου ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη φόρτισης του μηριαίου στο κάτω άκρο των πλακών. Οι Haddad et al (1997) παρουσίασαν τη τεχνική αυτή με καλά αποτελέσματα, ενώ οι Incavo et al (1998) συνέστησαν τη χρήση στελέχους χωρίς τσιμέντο, τύπου Wagner, σε συνδυασμό με φλοιώδες αλλομόσχευμα και κυκλωτερή σύρματα.

#### *Αναθεώρηση με πακτωμένο φρέσκο αλλομόσχευμα*

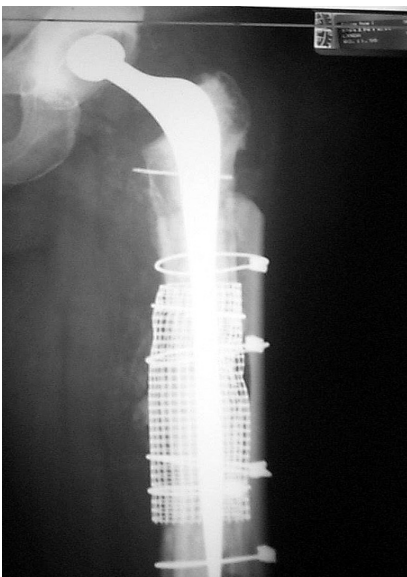
Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία στην αναθεώρηση του ισχίου και ιδιαίτερα στη σοβαρή οστεόλυση του μηριαίου και της κοτύλης. Η ομάδα του Exeter



πρωτοεισήγαγε την τεχνική στην ορθοπαιδική βιβλιογραφία το 1993 (Gie et al, 1993; Slooff et al, 1996). Η αλλομεταμόσχευση πακτωμένου φρέσκου σπογγώδους οστού έχει το πλεονέκτημα της διαθεσιμότητας και της αποφυγής του τραυματισμού της δότριας περιοχής του ασθενούς αλλά και το μειονέκτημα της πιθανής μετάδοσης ιογενών ασθενειών (Huo et al, 1992). Η τεχνική δεν έχει δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για τη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού. Στην παρούσα διατριβή μελετάται το αποτέλεσμα της τεχνικής στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου, σε 106 ασθενείς (εικόνα 15).



**Εικόνα 14.** Φλοιώδες αλλομόσχευμα στην πλάγια επιφάνεια του μηριαίου συγκρατείται με κυκλωτήρη σύρματα



**Εικόνα 15.** Φλοιώδη αλλομοσχεύματα στην πρόσθια και πλάγια επιφάνεια του μηριαίου που συγκρατούνται με κυκλωτήρη συρμάτινα καλώδια τύπου Dall-Miles. Η πρόθεση έχει αναθεωρηθεί με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα μετά από προηγούμενο περιπροσθετικό κάταγμα του μηριαίου.

### **III. ΙΣΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΙΣΧΙΟΥ ΜΕ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ**

#### **1. Η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος**

Η αναθεώρηση της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου αποτελεί ένα νέο και πολύπλευρο πρόβλημα για τον Ορθοπαιδικό Χειρουργό. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριάντα χρόνων η ολική αρθροπλαστική του ισχίου έχει γίνει κοινός τόπος, καθώς ο αριθμός των ηλικιωμένων ασθενών αυξάνει. Αυτή η αύξηση έχει ως αποτέλεσμα την έξαρση στην εμφάνιση της πιο συνηθισμένης μετεγχειρητικής επιπλοκής, που είναι η οστεόλυση γύρω από την πρόθεση. Η οστεόλυση με τη σειρά της είναι η κυριότερη αιτία άλλων σοβαρών επιπλοκών όπως τα περιπροσθετικά κατάγματα του ισχίου καθώς και η αύξηση του αριθμού των αναθεωρήσεων της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου, με συνέπεια την αύξηση του ποσοστού αναπηρίας των ασθενών αλλά και την αύξηση των δαπανών για την υγεία (Lavernia, 1998). Η αναθεώρηση της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου είναι μια τεχνικά δύσκολη επέμβαση. Οι τύποι και τα υλικά των προθέσεων καθώς και τα χειρουργικά εργαλεία συνεχώς εξελίσσονται, αλλά το μείζον ζήτημα της οστικής αναγέννησης παραμένει ανικανοποίητο. Πρόσφατα, οι Gie et al (1993) εισήγαγαν την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος για τη θεραπεία της οστεόλυσης στην αναθεώρηση της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου. Η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση φρέσκου παγωμένου οστικού αλλομοσχεύματος το οποίο τεμαχίζεται σε κομμάτια λίγων χιλιοστών με τη χρήση μύλου. Το μόσχευμα στη συνέχεια ενσφηνώνεται στον αυλό του μηριαίου οστού με την αλληπάλληλη χρήση εργαλείων ενσφήνωσης (impactors-fantom stems). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία νέου αυλού (neo-endosteum), μέσα στον οποίο θα πακτωθεί με χειρουργικό τσιμέντο η νέα μηριαία πρόθεση. Η κυρία παρατήρηση πάνω στην οποία έχει βασισθεί η υπόθεση αυτής της διατριβής είναι ότι σημαντικές εξελίξεις στην κατανόηση και την έρευνα της

οστικής αναγέννησης, οι οποίες έχουν παρουσιασθεί εδώ και τριάντα χρόνια στη βιβλιογραφία, δεν έχουν εισαχθεί και χρησιμοποιηθεί ακόμα στην κλινική Ορθοπαιδική πράξη και ιδιαίτερα στη τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος.

## **2. Οστεοαγωγή και οστεοεπαγωγή**

Οι έννοιες οστεοαγωγής και οστεοεπαγωγής έχουν γίνει κατανοητές με τη βοήθεια πειραμάτων της μοριακής βιολογίας. Οστεοαγωγή είναι η ικανότητα ενός βιολογικού ή μη υλικού να δρα ως εκμαγείο που να επιτρέπει τη δημιουργία οστού ορθοτοπικά, δηλαδή δίπλα ή μέσα σε ένα οστικό κενό. Σε αντίθεση με την οστεοαγωγή οστεοεπαγωγή είναι η ικανότητα ενός βιολογικού ή μη υλικού ή αυξητικού παράγοντα να δημιουργεί οστό ετεροτοπικά, για παράδειγμα σε σημεία μακριά από το σκελετό, όπως μέσα στους μυς (Urist, 1965, 1972, 1989; Ripamonti, 1991a). Με άλλα λόγια, οστεοεπαγωγή είναι η φαινοτυπική μετατροπή των πρόιμων μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται είτε από το μυελό των οστών και την κυκλοφορία είτε από τους περιβάλλοντες μυς, σε οστεοπρογενετικά κύτταρα και ακολούθως σε οστεοβλάστες. Το τοπικό σήμα ή ερέθισμα για την έναρξη αυτής της δραστηριότητας το δίνουν πιθανότατα οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες. Η ετεροτοπική οστεοεπαγωγή είναι ο θεμέλιος λίθος της έρευνας για την απόδειξη της ικανότητας των αυξητικών παραγόντων και άλλων υλικών (πχ του υδροξυαπατίτη), να παράγουν οστό (Urist, 1965, 1989; Ripamonti, 1991a). Εξ ορισμού, ένα υλικό ή ένας αυξητικός παράγοντας θεωρούνται οστεοεπαγωγικά μόνο εφόσον μπορούν να παράγουν οστό ετεροτοπικά.

## **3. Αποασβεστοποίηση και BMPs**

Η μέθοδος απασβέστωσης του οστού και η παραγωγή του μερικά αποασβεστοποιημένου οστού (demineralised bone matrix ή DBM) έχει περιγραφεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία. Η ανακάλυψη από τον Marsall Urist (1965) ότι το μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό προκαλεί ενδοχόνδρινη παραγωγή

οστού σε ετεροτοπικές εστίες στα τρωκτικά δημιούργησε τον πυρήνα της κυτταρικής έρευνας πάνω στην αναδόμηση και ανάπτυξη του οστού και του αρθρικού χόνδρου. Η χρήση του μερικώς αποασβεστοποιημένου οστού έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί οστό στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο (Einhorn et al, 1984; Gepstein et al, 1987; Gebhart and Lane, 1991; Tiedeman et al, 1991) και το DBM είναι σήμερα ευρέως αποδεκτό ως υποκατάστατο οστικού μοσχεύματος στην κλινική πράξη (Glowacki et al, 1981a; Mulliken et al, 1981; Kaban et al, 1982; Sonis et al, 1983). Ορισμένες μελέτες βέβαια στη βιβλιογραφία έχουν δείξει ότι η οστεογένεση που προκαλεί το DBM οφείλεται περισσότερο στη διαδικασία της οστεοαγωγής παρά στη διαδικασία της οστεοεπαγωγής (Groeneveld et al, 1999; Becker et al, 1994). Η ενδεχόμενη αποτυχία της οστεοεπαγωγής, ίσως να οφείλεται στις διαδικασίες επεξεργασίας του εμπορικά διαθέσιμου αποασβεστοποιημένου οστού, όπως για παράδειγμα οι διαδικασίες αποστείρωσης του μοσχεύματος, που ουσιαστικά καταστρέφουν λόγω της θερμότητας, τις αυξητικές πρωτεΐνες του κολλαγονικού του σκελετού (Becker et al, 1995). Ωστόσο η αναπαραγωγή έναρξη της οστικής διαφοροποίησης σε ετεροτοπικές εστίες από το μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό έδωσαν το έναυσμα για την υπόθεση της ύπαρξης των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (Bone Morphogenetic Proteins) (Reddi and Huggins, 1972; Urist, 1972; Reddi, 1981). Εδώ θα πρέπει να τονισθεί ότι κατά τη διαδικασία της αποασβεστοποίησης μόνο μετά την αφαίρεση των λιποκυττάρων και του ασβεστίου από το οστικό μόσχευμα επιτυγχάνεται τελικώς η οστεοεπαγωγή (Urist, 1965, 1980; Ripamonti, 1991a). Επομένως είναι απλό να συμπεράνει κανείς ότι το φρέσκο παγωμένο αλλομόσχευμα που χρησιμοποιείται στη σύγχρονη Ορθοπαιδική χειρουργική λειτουργεί περισσότερο ως μηχανικό εκμαγείο, που προάγει την οστεοαγωγή, μέσα στο οποίο τελικά συμβαίνουν νεοαγγειοποίηση και οστεογένεση.

Στην παρούσα διατριβή υποστηρίζεται ότι ο απλός χειρισμός του οστικού μοσχεύματος με την αφαίρεση των λιποκυττάρων (defatening) και του ασβεστίου (demineralisation) κατά τον τρόπο που

έχει υποδειχθεί εδώ και τριάντα χρόνια, θα μας προσφέρει οστικό αλλομόσχευμα, το οποίο θα είναι καθαρότερο, λιγότερο αντιγονικό και με υψηλή οστεοεπαγωγική ικανότητα (Urist et al, 1975; Urist, 1980; Sampath and Reddi, 1981; Ripamonti, 1991a). Η θεμελιώδης δοκιμασία που οδήγησε στην ανακάλυψη της παρουσίας των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών ήταν η αφαίρεση της υδατοδιαλυτής πρωτεϊνικής μάζας από το μερικώς αποασβεστοποιημένο οστό αφήνοντας πίσω της τον αδιάλυτο κολλαγονικό οστικό σκελετό (insoluble collagenous bone matrix ή ICBM) του οστού (Wozney et al, 1988; Luyten et al, 1989; Sampath et al, 1990).

#### **4. Υδροξυαπατίτης**

Η χρήση αποστειρωμένων βιολογικών και συνθετικών οστικών υποκατάστατων με ή χωρίς την προσθήκη ανασυνδυσμένων ανθρώπινων οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (rh-BMPs) έχει μελετηθεί (Ripamonti, 1992a; Ripamonti et al, 1993, 1997). Ο υδροξυαπατίτης είναι το μοναδικό οστικό υποκατάστατο το οποίο πειστικά έχει δείξει σημαντικές οστεοεπαγωγικές ικανότητες ετεροτοπικά από μόνος του, χωρίς τη προσθήκη των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών σε πιθήκους (non-human primates baboons) (Ripamonti et al, 1993, 1997; van Eeden and Ripamonti, 1994). Πιο συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι ο πορώδης υδροξυαπατίτης λειτουργεί ως υπόστρωμα για την απορρόφηση των ενδογενώς παραγόμενων οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν την παραγωγή του οστού με οστεοεπαγωγή (Ripamonti, 1991b; Ripamonti et al, 1993; van Eeden and Ripamonti, 1994). Αυτός ο ενδογενής μηχανισμός, που προκαλεί οστεοεπαγωγή στους πιθήκους με τη χρήση του υδροξυαπατίτη, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τη μελέτη της επίδρασης του μεγέθους και της γεωμετρίας των πόρων των μοσχευμάτων του υδροξυαπατίτη, στην οστική μορφογένεση (van Eeden and Ripamonti, 1994). Είναι αξιοσημείωτο ότι το οστό αναπτύσσεται στον πορώδη υδροξυαπατίτη μόνο εφόσον έχει τη μορφή αλληπάλληλων κυβοειδών σχηματισμών (block forms) (Ripamonti, 1991b; Ripamonti et al, 1993; van Eeden and Ripamonti, 1994). Αντιθέτως,

οστό δεν αναπτύσσεται, εάν ο υδροξυαπατίτης είναι σε μορφή κόκκων (granular form) (van Eeden and Ripamonti, 1994). Ακόμη και στην περίπτωση όπου οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν μαζί με κοκκώδη υδροξυαπατίτη, κατά την εκτέλεση πειραμάτων σε τρωκτικά φάνηκε ότι δεν μπορεί να αναπτυχθεί οστό (Ripamonti et al, 1992a). Αυτό καταδεικνύει τη σημασία της γεωμετρίας του υποστρώματος-εκμαγείου και του πώς αυτή επιδρά στην οστεογένεση. Οι Magan και Ripamonti (1996) χαρακτηριστικά το περιγράφουν ως "γεωμετρική επαγωγή της οστεογένεσης".

### **5. Τα περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου και η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος**

Η επί κυτταρικού επιπέδου παρέμβαση στην οστική πάρωση, που αφορά ένα περιπροσθετικό κάταγμα, μπορεί να επαυξηθεί με την εφαρμογή των αρχών της οστεοεπαγωγής που περιγράφηκαν πιο πάνω.

Επί του παρόντος στην Ορθοπαιδική πράξη η πάρωση των καταγμάτων βασίζεται στην εγγενή ικανότητα του οστού να επουλώνεται και σε τεχνικές οστικής μεταμόσχευσης. Η περιπροσθετική οστεόλυση, ιδιαίτερα του μηριαίου (Pazzaglia and Byers, 1984; Reich and Jaffe, 1994; Kelley, 1996) καθώς και η αποκατάσταση και αύξηση του ελλειμματικού οστικού αποθέματος, είναι ιδιαίτερα σημαντικής αξίας για την πρόληψη της αποτυχίας της αναθεώρησης της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου (Chandler and Tigges, 1998; Garbuz et al, 1998; Emerson, 2000; Haddad et al, 2000; Head and Malinin, 2000; Head et al, 2000). Η απλούστερη τεχνική για την αποκατάσταση του οστικού ελλείμματος είναι η χρήση του χειρουργικού τσιμέντου (Stern et al, 1991). Φρέσκο παγωμένο οστικό αλλομόσχευμα χρησιμοποιείται επί του παρόντος ως μια πιο βιολογική προσέγγιση στο πρόβλημα, ωστόσο η λύση αυτή ενέχει τον κίνδυνο μετάδοσης ιογενών λοιμώξεων (Huo et al, 1992).

Αυτομόσχευμα χρησιμοποιείται περιορισμένα λόγω της μικρής του διαθεσιμότητας κυρίως από τη πύελο. Το φρέσκο παγωμένο ή ξηρό φλοιώδες αλλομόσχευμα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή πλάκας (structural onlay graft) και κατ' αυτόν τον τρόπο να επωφεληθεί κανείς τις μηχανικές ιδιότητες και την αντοχή του φλοιώδους οστού (Malinin et al, 1984; Pelker and Friedlaender, 1987;

Emerson et al, 1992). Αυτός είναι ένας τρόπος επαύξησης του οστικού αποθέματος προσθέτοντας οστό γύρω από τον ήδη υπάρχοντα φλοιό.

Μια άλλη τεχνική, για να αυξήσει κάποιος την οστική μάζα, είναι η τεχνική του πακτωμένου οστικού αλλομοσχεύματος (impaction grafting), όπου μικρά κομμάτια, σπογγώδους κυρίως, αλλομοσχεύματος τοποθετούνται μέσα στον αυλό του μηριαίου οστού ή της κοτύλης και εκεί ενσφηνώνονται με ειδική τεχνική και εργαλεία. Τα αρχικά αποτελέσματα της τεχνικής αυτής ήταν πολύ ενθαρρυντικά (Gie et al, 1993; Elting et al, 1995; Nelissen et al, 1995). Πιο πρόσφατα βέβαια παρουσιάστηκαν στη βιβλιογραφία σειρές που δείχνουν αυξημένο αριθμό επιπλοκών όπως μετεγχειρητικά κατάγματα και βύθιση (subsidence) της πρόθεσης μέσα στον μηριαίο αυλό. Οι επιπλοκές αυτές ενισχύουν την υποψία ότι το φρέσκο παγωμένο αλλομόσχευμα δεν αφομοιώνεται από το περιβάλλον οστό και πολύ πιθανό απορρίπτεται ανοσολογικά λόγω του αντιγονικού του φορτίου (Eldridge et al, 1997; Masterson et al, 1997; Meding et al, 1997; Pekkarinen et al, 2000).

Το πρόβλημα της απόρριψης του φρέσκου παγωμένου αλλομοσχεύματος από το λήπτη πιστεύουμε ότι σχετίζεται με το αντιγονικό του φορτίο. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι διατηρώντας τα λιποκύτταρα και τα οστεοκύτταρα του οστού αυξάνεται η αντιγονική του ικανότητα και έτσι ο κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος (Urist, 1965, 1980; Einhorn et al, 1984; Ripamonti, 1991a). Η αφαίρεση των λιποκυττάρων των οστεοκυττάρων και του ασβεστίου από την οστική μάζα ελαττώνει την αντιγονικότητά του. Επιπρόσθετα ελαττώνοντας την κυτταρική μάζα και μετακινώντας ένα μεγάλο ποσό του ασβεστίου αποκαλύπτονται οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες που βρίσκονται επάνω στην επιφάνεια του οστικού κολλαγονικού σκελετού (Urist, 1965, 1972, 1989; Reddi and Huggins, 1972; Reddi, 1981; Wozney et al, 1988; Ripamonti, 1991a, ; Ripamonti et al, 1997). Στη Γναθοχειρουργική μικρά οστικά κενά του σπλαγχνικού και του προσωπικού κρανίου έχουν θεραπευθεί

με τη χρήση του αποασβεστοποιημένου οστού και του υδροξυαπατίτη με ή χωρίς το συνδυασμό οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (Holmes, 1979; Holmes and Hagler, 1988; Ripamonti, 1991a, 1992b; Ripamonti et al, 1992b, 1994, 1997).



## ΥΠΟΘΕΣΗ

Η χρήση της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος είναι δυνατή στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού. Η βελτίωση της οστεογενετικής ικανότητας της τεχνικής αυτής, επιτυγχάνεται με τη χρήση (α) ανθρώπινου αποασβεστοποιημένου οστού ή υδροξυαπατίτη ως οστεοαγωγίμου εκμαγείου, (β) οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης BMP-7 (rh OP-1) ως οστεοεπαγωγικού αυξητικού παράγοντα και (γ) πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων του ανθρώπινου μυελού των οστών ως πηγή οστεοβλαστών.

## ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΚΟΠΟΙ

1. Η χρήση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στην θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού (κλινική μελέτη).
2. Η βελτίωση της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος χρησιμοποιώντας αποασβεστοποιημένο ανθρώπινο πακτωμένο αλλομόσχευμα, πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών και ανασυνδιασμένη ανθρώπινη οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 (μελέτη *in vitro*).
3. Η βελτίωση της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος χρησιμοποιώντας υδροξυαπατίτη, πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών και ανασυνδιασμένη ανθρώπινη οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 (μελέτη *in vitro*).
4. Ο προσδιορισμός της οστεογένεσης χρησιμοποιώντας αποασβεστοποιημένο πακτωμένο αλλομόσχευμα και ανασυνδιασμένη ανθρώπινη οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 στο μοντέλο του αρουραίου (μελέτη *in vivo*).

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΘΕΣΗΣ

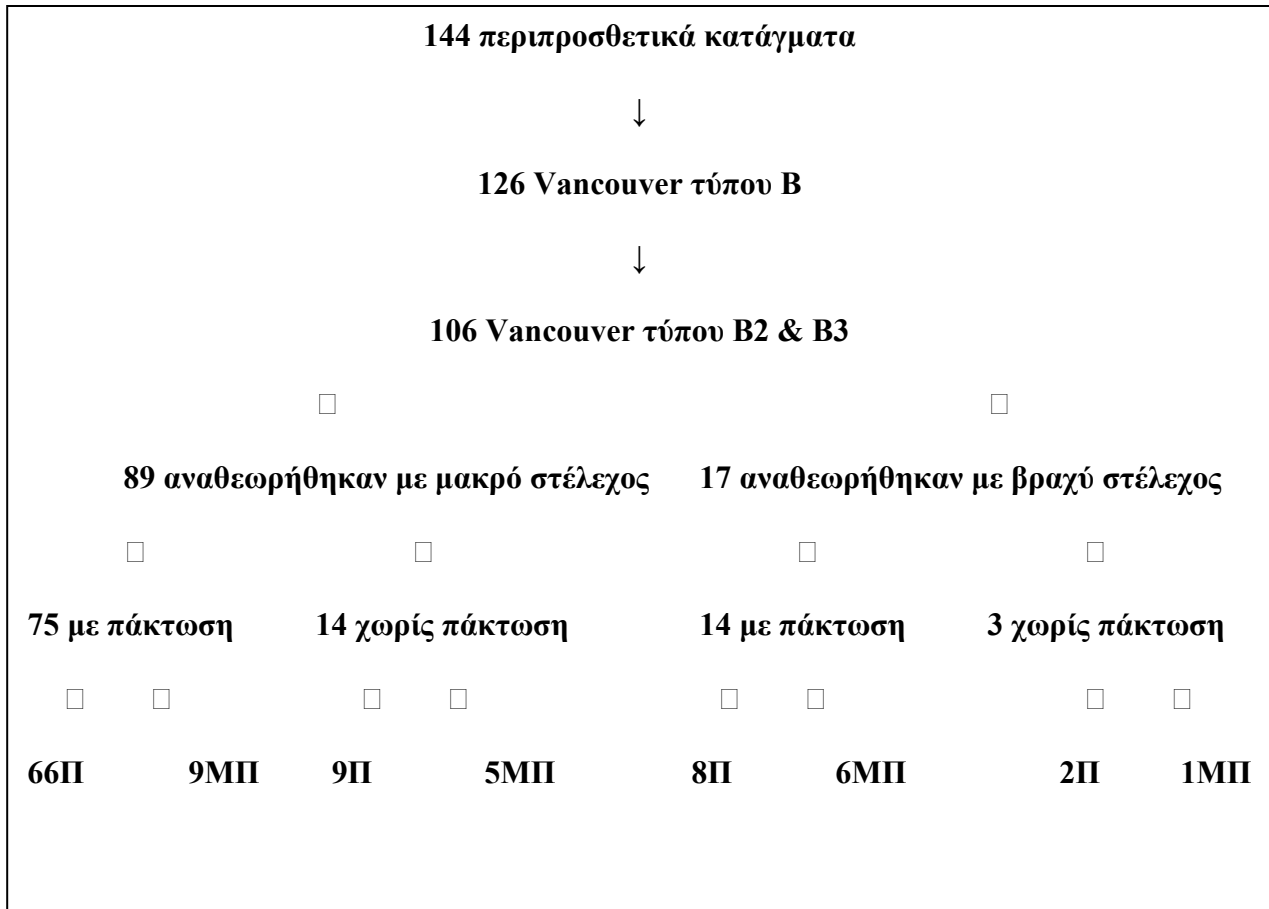
Η γνώση των αρχών της αναδόμησης του οστού, όπως αυτή περιγράφηκε πιο πάνω, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι υπάρχει δυνατότητα χρήσης της τεχνικής του φρέσκου πακτωμένου αλλομοσχεύματος στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού. Η τεχνική αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως στη κλινική πράξη και δεν έχει δημοσιευθεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα. Επίσης, υποθέτουμε ότι μπορούμε να επιτύχουμε βελτίωση της τεχνικής αυτής σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλο με τη χρήση του ανθρώπινου αποασβεστοποιημένου οστού ή του υδροξυαπατίτη με BMP-7 (rh OP-1) και πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών. Η οστεοεπαγωγική ικανότητα του πιο πάνω συνδυασμού, στο μοντέλο του πακτωμένου μοσχεύματος, δεν έχει δημοσιευθεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα.

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### **ΜΕΛΕΤΗ Ι. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ**

Μεταξύ του 1985 και 2000 144 περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου οστού θεραπεύτηκαν στο Ορθοπαιδικό τμήμα του Νοσοκομείου Exeter (Princess Elizabeth Orthopaedic Centre), που αποτελεί το μεγαλύτερο κέντρο αναφοράς για την επανορθωτική χειρουργική του ισχίου στη Μεγάλη Βρετανία. Τα κατάγματα ταξινομήθηκαν με τη μέθοδο Vancouver. Τα κατάγματα τύπου A και τύπου C καθώς και τα κατάγματα τύπου B1 εξαιρέθηκαν από τη μελέτη, διότι δεν απαιτούσαν για τη θεραπεία τους αναθεώρηση του μηριαίου στελέχους και οστική αναδόμηση. Περιπτώσεις με ταυτόχρονα κατάγματα της κοτύλης και κατάγματα γύρω από ολική αρθροπλαστική του γόνατος επίσης εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Από τους 144 ασθενείς οι 106 βρέθηκαν να έχουν υποστεί κατάγματα τύπου B2 και B3 και αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης. 89 από αυτούς θεραπεύτηκαν με αναθεώρηση του μηριαίου στελέχους με τσιμέντο και την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος και 17 με αναθεώρηση μόνο με τσιμέντο χωρίς την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος (βλέπε Διάγραμμα). Η μελέτη Ι είναι μία αναδρομική μελέτη παρατήρησης των ασθενών που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πληροφοριών από τα αρχεία των ασθενών. Συγκεκριμένα από τα καταγεγραμμένα αρχεία συνελέγησαν δημογραφικά στοιχεία, στοιχεία για τη θεραπεία των ασθενών με ιδιαίτερη έμφαση στην τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, τεχνικά στοιχεία αναφορικά με την επανορθωτική αναθεώρηση του ισχίου, καθώς και στοιχεία από την κλινική παρακολούθηση αυτών των ασθενών (βλέπε στο παράρτημα την πλήρη βάση δεδομένων επί 144 ασθενών). Επιπρόσθετα έγινε ανασκόπηση όλων των προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών ακτινογραφιών (πρόσθιο-οπίσθια και πλάγια προβολή) με έμφαση στο μήκος της πρόθεσης (προ και μετεγχειρητικά), στον τύπο του στελέχους της πρόθεσης, στη μέθοδο εσωτερικής οστεοσύνθεσης και στην πάρωση του κατάγματος. Η διάμετρος επίσης του

μηριαίου οστού μετρήθηκε στο ομόπλευρο μηριαίο σε τμήμα του οστού που δεν είχε υποστεί βλάβη από το κατάγμα ή στο ετερόπλευρο μηριαίο, όταν η συντριπτικότητα του κατάγματος ή η οστεόλυση στο ομόπλευρο μηριαίο απαγόρευαν την μέτρηση της διαμέτρου.



**Διάγραμμα.** Διαστρωμάτωση δεδομένων (Π: Πώρωση, ΜΠ: Μη Πώρωση)

Το στέλεχος της αναθεώρησης χαρακτηρίστηκε "μακρύ", όταν ξεπερνούσε το απώτερο σημείο του κατάγματος κατά το μήκος 2 ομόπλευρων μηριαίων διαμέτρων, και "βραχύ" όταν αυτό δεν συνέβαινε. Τα περισσότερα κατάγματα συνέβησαν κατά τη διάρκεια τραυματισμού χαμηλής ενέργειας, συνήθως πτώση στο σπίτι ή στο δρόμο. Τελικώς βρέθηκαν 126 κατάγματα τύπου B κατά την ταξινόμηση Vancouver και από αυτά τα 106 ήταν τύπου B2 και B3 (πίνακας 5). Στους ασθενείς συμπεριλαμβανόταν 32 άνδρες και 74 γυναίκες με μέση ηλικία 68 έτη (εύρος 39-91). Ογδόντα-εννέα (89) από τους 106 ασθενείς θεραπεύτηκαν με αναθεώρηση της μηριαίας πρόθεσης με "μακρό"

στέλεχος και 17 με αναθεώρηση με "βραχύ" στέλεχος. 89 από τους 106 ασθενείς θεραπεύτηκαν με τη τεχνική του πακτωμένου αλλομόσχευματος, ενώ οι υπόλοιποι 17 ασθενείς θεραπεύτηκαν χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα. Εβδομήντα-πέντε (75) ασθενείς θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα και 14 με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα. Στους υπόλοιπους 17 που θεραπεύτηκαν χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, 14 ασθενείς θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος και τσιμέντο και τέλος, 3 ασθενείς με βραχύ στέλεχος και τσιμέντο (βλέπε Διάγραμμα).

Τύπος Κατάγματος	Ανατομία	Υποδιαιρέσεις
Τύπος Α	εγγύς	ΑG (μείζων τροχαντήρας) ΑL (ελάσσων τροχαντήρας)
Τύπος Β	μέση	Β1: σταθερό στέλεχος & επαρκές οστό Β2: ασταθές στέλεχος & επαρκές οστό Β3: ασταθές στέλεχος & ανεπαρκές οστό
Τύπος C	άπω	

**Πίνακας 5.** Ταξινόμηση Vancouver για τα περιπροσθετικά κατάγματα του μηριαίου

## 1. Χειρουργική τεχνική

### *Προσπέλαση και ανάταξη*

Η προσπέλαση έγινε με μακρά πλάγιο-οπίσθια τομή που περιελάμβανε την προϋπάρχουσα τομή. Στη συνέχεια έγινε αναρρόφηση με σύριγγα υγρού από την άρθρωση, πριν αυτή να ανοιχθεί και μικροβιολογικός έλεγχος (χρώση Gram και μικροσκόπηση). Εάν υπήρχε αυξημένος αριθμός ουδετερόφιλων ( $> 10^5$  κατά οπτικό πεδίο) ή κλινική υποψία σηπτικής αρθρίτιδας ή η χρώση αναδείκνυε βακτηριδιακή μόλυνση τότε η επέμβαση σταματούσε και γινόταν σε δύο στάδια (πρώτο στάδιο επέμβαση τύπου Girdlestone με αφαίρεση της παλαιάς πρόθεσης και του τσιμέντου και δεύτερο στάδιο, μετά από 6 εβδομάδες μέχρι και 3 μήνες με αναθεώρηση της αρθροπλαστικής με ή χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα εφόσον οι δείκτες της φλεγμονής και της μόλυνσης επανερχόταν στο

φυσιολογικά όρια). Το κάταγμα του μηριαίου χρησιμοποιούνταν για να διευκολύνει την προσπέλαση και αφαίρεση της πρόθεσης ενώ στη συνέχεια το κάταγμα ανατασσόταν με τη χρήση κυκλοτερών συρμάτων και μερικές φορές με τη χρήση πλακών εσωτερικής οστεοσύνθεσης ή φλοιωδών αλλομοσχευμάτων. Πολλές φορές για την αφαίρεση του στελέχους κρινόταν απαραίτητη η εκτεταμένη οστεοτομία του μηριαίου από τον μείζονα τροχαντήρα προς τη διάφυση του οστού.

#### *Προετοιμασία του μοσχεύματος*

Φρέσκο παγωμένο αλλομόσχευμα από μηριαίες κεφαλές δοτών χρησιμοποιήθηκε από την τράπεζα οστού του νοσοκομείου. Συνήθως 2-3 κεφαλές ήταν απαραίτητες. Ο έλεγχος της ιστοσυμβατότητα ABO και ο αιματολογικός έλεγχος του δότη γινόταν κατά τη διάρκεια της δωρεάς αλλά και 6 μήνες μετά για τον αποκλεισμό της ηπατίτιδας B, C, και HIV και πριν δοθεί η άδεια χρήσης του μοσχεύματος για την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Δύο μεγέθη οστικών τεμαχίων παρασκευάστηκαν για την τεχνική. Τα μικρά, μεγέθους 2-4mm, που παρασκευαζόταν με τη χρήση ειδικού μύλου (Noviomagus Bone Mill, A-one Medical BV, Nijmegen, Netherlands), χρησιμοποιήθηκαν για την αλλομεταμόσχευση του άπω μηριαίου, ενώ τα μεγάλα, μεγέθους > 5mm, που προετοιμάζονται με το χέρι, χρησιμοποιήθηκαν για την αλλομεταμόσχευση του εγγύς μηριαίου. Το ιδανικό μόσχευμα ήταν το σπογγώδες οστό και ως εκ τούτου όλα τα φλοιώδη τμήματα των μηριαίων κεφαλών αφαιρέθηκαν και δεν χρησιμοποιήθηκαν.

#### *Προετοιμασία του αυλού του μηριαίου*

Μετά την αφαίρεση της υπάρχουσας πρόθεσης και την ανάταξη του κατάγματος τα κενά του μηριαίου «γεφυρώθηκαν» με ειδικό πλέγμα (Stryker-Howmedica-Osteonics, Caen, France) που στερεώθηκε με κυκλοτερή σύρματα στο μηριαίο οστό, αφού πρώτα είχε ανασηκωθεί τον έξω πλάγιος μηριαίος μυς για την αποκάλυψη ολόκληρου του οστού. Το μηριαίο κανάλι στη συνέχεια αποφρασσόταν εσωτερικά και περιφερικά με ειδικό πλαστικό πώμα-αναστολέα του τσιμέντου(cement restrictor), που βίδωνε σε

ειδικό οδηγό. Ο οδηγός αυτός παρέμενε εκτός του μηριαίου αυλού κεντρικά, έτσι ώστε να υποδεχθεί τους ειδικούς συμπιεστές για την ενσφήνωση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος.

#### *Ενσφήνωση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος*

Τα τεμάχια του αλλομοσχεύματος ενσφηνώνονταν διαδοχικά γύρω από τον οδηγό και μέσα στο μηριαίο κανάλι με τη χρήση ειδικών συμπιεστών και εκμαγείων του στελέχους. Το μόσχευμα ενσφηνώνονταν και πακτώνονταν με τη χρήση ειδικού σφυριού που εφαρμοζόταν στον οδηγό. Το μηριαίο κανάλι στη συνέχεια πληρώθηκε με τσιμέντο (Antibiotic-Simplex, Howmedica, Auckland, New Zealand) και πρόθεση τύπου Exeter (polished- tapered-collarless stem Stryker-Howmedica-Osteonics, Caen, France) εισήλθε στον αυλό σε όλους τους ασθενείς. Στο κάτω άκρο του στελέχους προστέθηκε κεντροποιητής (centraliser, Stryker-Howmedica-Osteonics, Caen, France) πριν την είσοδο αυτού στο μηριαίο αυλό ώστε το στέλεχος να διατηρεί κεντρική κατεύθυνση και να μην αποκλίνει σε ραιβότητα ή βλαισότητα.

## **2. Μετεγχειρητική φροντίδα**

Οι ασθενείς επιτράπηκε να περπατούν με βακτηρίες χωρίς όμως να φορτίζουν το κάτω άκρο με όλο το βάρος του σώματος πάρα μόνο να αγγίζουν το έδαφος με το πέλμα για τη στήριξη και την διατήρηση της ισορροπίας. Σταδιακά επιτράπηκε η πλήρης φόρτιση μέχρι τη συμπλήρωση 6 μηνών από την επέμβαση.

## **3. Αξιολόγηση του θεραπευτικού αποτελέσματος**

Οι 12 μήνες θεωρήθηκαν ως σημείο αναφοράς για την τελική αξιολόγηση της παρωσείας των καταγμάτων. Μετά από τους 12 μήνες το κάταγμα χαρακτηριζόταν "πωρωμένο" ή "μη πωρωμένο" με βάση κλινικά και ακτινολογικά κριτήρια. Η παρακολούθηση των ασθενών κατά τη διάρκεια των 12

μηγών γινόταν στις 6 εβδομάδες, τους 3, 6 και 12 μήνες με την κλινική εξέταση του ασθενούς και τη λήψη ακτινογραφιών (πρόσθιο-οπίσθιες και πλάγιες προβολές) κάθε φορά. Ακτινολογικά το κάταγμα θεωρούνταν "πρωμένο" όταν δεν υπήρχε διακοπή της συνέχειας του φλοιώδους οστού στην πρόσθιο-οπίσθια και πλάγια ακτινογραφία. Η παρουσία εξωτερικού πόρου ήταν απαραίτητη για τη διάγνωση της πώρωσης, ωστόσο δεν ήταν δυνατό πάντοτε να ελεγχθεί πλήρως λόγω της επιπροβολής των υλικών οστεοσύνθεσης. Κλινικά το κάταγμα θεωρούνταν "πρωμένο", όταν ο ασθενής ήταν σε θέση να περπατά με πλήρη φόρτιση του μέλους με ή χωρίς βοήθημα βάδισης (πχ βακτηρία), χωρίς πόνο ή ελαφρό περιοδικό πόνο που όμως δεν περιόριζε τις καθημερινές του δραστηριότητες ή τη βάδιση. Η ταξινόμηση της λειτουργικότητας του ισχίου έγινε με την κλίμακα Harris (Harris Hip Score) που μετρήθηκε σε όλα τα χρονικά σημεία επανελέγχου των ασθενών μέχρι τους 12 μήνες και καταγράφηκε για τους σκοπούς της μελέτης.

#### **4. Στατιστική ανάλυση**

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος STATA έκδοση 7.0. χρησιμοποιώντας την τεχνική logistic regression. Για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των ασθενών, που τελικώς κατέληξαν σε "πώρωση" του κατάγματος και αυτών που κατέληξαν σε "μη πώρωση" και σε συνάρτηση με το μήκος της πρόθεσης και τη χρήση της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, καθώς και το συνδυασμό τους, χρησιμοποιήθηκε το πηλίκιο των πιθανοτήτων (odds ratio) με όρια βεβαιότητας (confidence intervals) 95% και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ( $p$ )  $\leq 0.05$ .



**ΜΕΛΕΤΗ Π. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ  
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. *IN  
VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ  
ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ**

**1. Επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας**

Η διαδικασία εγκρίθηκε από την επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Stanmore, του Λονδίνου (Research and Development Ethics Committee of The Royal National Orthopaedic Hospital, Institute of Orthopaedics, University College London and Royal Free Hospital Medical School, Stanmore, UK).

**2. Αναρρόφηση του μυελού των οστών**

*Τεχνική Αναρρόφησης-Περιγραφή πρωτοκόλλου*

Φρέσκος μυελός των οστών αναρροφήθηκε από την οπίσθια άνω λαγόνιο άκανθα 4 ασθενών, ανδρών, μετά από γραπτή και προφορική ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεση κατά τη διάρκεια ολικής αρθροπλαστικής του ομόπλευρου ισχίου. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 63 έτη (εύρος 62-64). Όλοι οι ασθενείς έπασχαν από πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα του ισχίου χωρίς ιστορικό άλλης συστηματικής νόσου ή ιστορικό άλλης φαρμακευτικής θεραπείας πλην των αντιφλεγμονωδών και παυσίπονων για την οστεοαρθρίτιδα. Η διαδικασία έγινε με βάση προηγούμενη εμπειρία, όπως παρουσιάζεται στη σχετική βιβλιογραφία (Connolly and Shindell 1986, Connolly 1998). Ο ασθενής τοποθετήθηκε στην πλάγια θέση ως επί αρθροπλαστικής του ισχίου. Η αναρρόφηση του μυελού των οστών έγινε κάτω από γενική αναισθησία πριν την έναρξη της ολικής αρθροπλαστικής του ισχίου και με συνθήκες γενικής αντισηψίας. Μικρή τομή 2mm έγινε περίπου 5 cm πίσω και πλαγίως της πρόσθιας άνω λαγόνιας άκανθας. Ειδική βελόνα για την αναρρόφηση του μυελού των οστών (Lee-

Lok, Minneapolis, MN, USA) εισήλθε μέσω της τομής αυτής στο οστό και με περιστροφικές κινήσεις προωθήθηκε στο σπογγώδες τμήμα της λαγόνιας ακρολοφίας. Άμεση αναρρόφηση 2-4ml μυελού των οστών έγινε από το σημείο επιλογής μέσα σε πλαστική σύριγγα των 10 ml. Η σύριγγα είχε προηγούμενα επικαλυφθεί εσωτερικά με 1ml φυσιολογικού ορού, που περιείχε 1000 μονάδες ηπαρίνης, με σκοπό την αντιπηκτική προστασία του αναρροφήματος. Πέντε ακόμη προσπάθειες αναρρόφησης μυελού έγιναν κατά την ίδια μέθοδο ακολουθώντας την γραμμή της οπίσθιας άνω λαγόνιας άκανθας. Από κάθε σημείο εισόδου της βελόνας στο σπογγώδες οστό γινόταν μία απόπειρα αναρρόφησης. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε με βάση τη γνώση ότι 2-4 ml αναρροφήματος είναι αρκετά, καθώς η πλειονότητα των κυττάρων του μυελού ανήκουν στην αιματογενή σειρά και περαιτέρω αναρρόφηση από το κάθε σημείο απλώς αυξάνει το ποσοστό αυτών των κυττάρων στο δείγμα. Το υλικό της αναρρόφησης περίπου 10 ml (2ml x 5 αναρροφήσεις) κατά ασθενή συγκεντρώθηκε σε ηπαρινισμένα αποστειρωμένα κωνοειδή (Falcon) των 50 ml (Connolly and Shindell, 1986; Connolly, 1998).

### **3. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρόωμων μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells)**

#### *Συνθήκες Αντισηψίας*

Ο χειρισμός ανθρώπινων κυττάρων έγινε σε ειδική αίθουσα που ήταν προορισμένη μόνο γι' αυτή τη χρήση. Για την αποφυγή μολύνσεων στην αίθουσα αυτή δεν γινόταν χειρισμοί κυττάρων που προερχόταν από ζώα. Η αίθουσα διέθετε το δικό της θάλαμο νημάτινης ροής (laminar-flow hood) και τον δικό της επωαστήρα (incubator) που λειτουργούσε στους 37° C και ποσοστό 95% υγρασίας με 5% CO<sub>2</sub>. Επίσης το δωμάτιο διέθετε το δικό του μικροσκόπιο (inverted face contrast microscope OLYMPUS T2, Japan).

### *Περιγραφή πρωτοκόλλου*

MSCs απομονώθηκαν από τη συλλογή του μυελού των οστών με βάση μέθοδο που περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Bain, 2001). Σε κάθε ένα από τα κωνοειδή (Falcon) των 50ml που περιείχαν περίπου 10 ml μυελού των οστών προστέθηκαν 10 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας (media), που αποτελούνταν από 90% Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (Sigma) 10% Fetal Bovine Serum (ορός εμβρύου βοός, Sigma) και 1% P/S [PenicillinG (sodium salt) 100u/ml & Streptomycin sulphate 100µg/ml] (Sigma), που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως θρεπτικό υπόστρωμα (standard medium). Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 20000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και κατά τον τρόπο αυτό απομονώθηκε ίζημα (pellet) αποτελούμενο από τα κύτταρα του μυελού των οστών στον πυθμένα του κωνοειδούς σωληναρίου (Falcon). Το ίζημα αυτό στη συνέχεια διαλύθηκε ξανά μέσα σε 10 ml θρεπτικού υποστρώματος. Το διάλυμα που προέκυψε μεταφερόταν στη συνέχεια με σύριγγα και ενιόνταν στην επιφάνεια διαλύματος Ficoll (Amersham Pharmasin Biotech), που αποτελεί διάλυμα με βαθμίδωση πυκνότητας (density gradient medium) (1.077g/ml). Το κωνοειδές, το οποίο περιείχε το διάλυμα Ficoll (Amersham Pharmasin Biotech), φυγοκεντρήθηκε στη συνέχεια στα 1160g (15.000 rpm ) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υποκόκκινου χρώματος, χαμηλής πυκνότητας, τμήμα από την επιφάνεια του διαλύματος Ficoll, συλλέχθηκε σε νέο κωνοειδές χωρητικότητας 50ml. Προστέθηκαν 10ml PBS (phosphate buffer saline) (Sigma) και το διάλυμα με τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκε ξανά σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά στις 20000rpm. Το αποτελούμενο από κύτταρα ίζημα, το οποίο δημιουργήθηκε στον πυθμένα του κωνοειδούς διαλύθηκε ξανά σε 10ml θρεπτικού υποστρώματος και στη συνέχεια επετεύχθει επιμελής ανάμιξη με συνεχείς αναρροφήσεις με πιπέτα 5ml μέχρι αυτό να διαλυθεί επαρκώς. Ένα (1) µl από το κυτταρικό διάλυμα που προέκυψε αναρροφήθηκε με την πιπέτα για τη μέτρηση των κυττάρων στις δύο πλευρές της πλάκας αρίθμησης κυττάρων (haemocytometer slide, Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) υπό μικροσκόπηση σε μεγέθυνση  $\times 4$ . Έτσι υπολογίστηκε ο μέσος όρος του αριθμού των

κυττάρων (n) μετρώντας τα κύτταρα στα 8 τεταρτημόρια και διαιρώντας το σύνολο δια του 8. Κατά συνέπεια τα κύτταρα του διαλύματος υπολογίστηκε ότι βρισκόταν σε συγκέντρωση  $c = n \times 10^4 / \text{ml}$ . Η αναγωγή αυτή των κυττάρων στη συγκέντρωση των 10ml του κωνοειδούς μας έδωσε την τελική συγκέντρωση των κυττάρων του διαλύματος. Η συγκέντρωση των κυττάρων βρέθηκε να είναι περίπου  $2 \times 10^5 / \text{ml}$ . Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφερόταν σε συγκέντρωση  $2 \times 10^5 / \text{ml}$  σε πλαστικές φιάλες (flasks) των 25ml (με ελεύθερη επιφάνεια  $75 \text{cm}^2$ ) και 10ml θρεπτικού υποστρώματος προστίθεντο, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση των κυττάρων ανά φιάλη να είναι  $2 \times 10^4 / \text{ml}$ . Τα κύτταρα παρέμειναν σ' αυτή την καλλιέργεια για μια εβδομάδα με αλλαγή του θρεπτικού υποστρώματος κάθε δεύτερη ημέρα. Από τη δεύτερη εβδομάδα και μετά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιταχύνθηκε. Όταν οι καλλιέργειες έφτασαν σε επίπεδο κορεσμού περίπου 80%, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και αποκολλήθηκαν με την προσθήκη 2.5 ml τρυψίνης (0.25% trypsin με 0.1 mM EDTA) (Life Technologies) ανά φιάλη και αφέθηκαν για 5 λεπτά στον επωαστήρα. Η δράση της τρυψίνης εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 5 ml FBS. Τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν, μετρήθηκαν, διαιρέθηκαν σε αναλογία 1/5, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τριβλία κυτταρικής καλλιέργειας ( $100 \times 20 \text{mm}$ ) με 10 ml θρεπτικού υποστρώματος. Το αυτό επαναλήφθηκε 6 φορές (6 passages) τις επόμενες 3 εβδομάδες με αλλαγή του θρεπτικού υποστρώματος κάθε δεύτερη μέρα και διαίρεση των κυττάρων κάθε τέταρτη μέρα όταν η αρχική καλλιέργεια ήταν κορεσμένη κατά 50% (semi-confluent). Η διατήρηση των κυτταρικών καλλιεργειών γινόταν στον ειδικό για τα ανθρώπινα κύτταρα επωαστήρα που λειτουργούσε στους  $37^\circ \text{C}$  με 95% υγρασία και 5%  $\text{CO}_2$ . Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιούνταν πάντα ήταν το Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (Sigma), που περιείχε 10% Fetal Bovine Serum (Sigma) και 1% P/S [PenicillinG (sodium salt) 100u/ml & Streptomycin sulphate 100mg/ml] (GIBCO).

### *Χαρακτηρισμός των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων*

Η ικανότητα των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες αξιολογήθηκε με την παραγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης από τα κύτταρα. Η παρουσία της αλκαλικής φωσφατάσης καταδείχθηκε με ιστολογική χρώση (Haynesworth et al, 1992). Η οστεοβλαστική διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων προκλήθηκε με τη χρήση οστεοβλαστικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας. Κύτταρα του μυελού των οστών από την έκτη κυτταροκαλλιέργεια (6<sup>th</sup> passage) μετρήθηκαν, όπως περιγράφεται πιο πάνω, και διαιρέθηκαν σε 4 χωριστές υποκαλλιέργειες. Η κάθε υποκαλλιέργεια περιείχε  $2 \times 10^5$ /ml κύτταρα ανά τριβλίο κυτταρικής καλλιέργειας σε 10 ml θρεπτικού υποστρώματος. Σε 2 από τις υποκαλλιέργειες αυτές το θρεπτικό υπόστρωμα ενισχύθηκε με οστεογενετικό συμπλήρωμα (50μM ascorbate-sulphate, 10mM β Glycerol phosphate, και 100nM of dexamethasone, Sigma), ενώ στις άλλες δύο το θρεπτικό υπόστρωμα παρέμεινε σταθερό (DMEM με 10% FBS και 1% P/S). Αλλαγή του θρεπτικού υποστρώματος γινόταν κάθε τρεις ημέρες για δύο εβδομάδες και στις δύο διαφορετικές καλλιέργειες. Η αύξηση της παραγωγής της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) μετρήθηκε ως δείκτης της οστεοβλαστικής φαινοτυπικής διαφοροποίησης των κυττάρων. Επιλεγμένες κυτταροκαλλιέργειες από τις δύο ομάδες (με και χωρίς οστεοβλαστικό θρεπτικό υπόστρωμα) μονιμοποιήθηκαν με κρύο (4°C) 10% neutral buffered formaline μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας. Στη συνέχεια επώασθηκαν για 10 λεπτά με sodium-α-naphthyl phosphate σε "tris" buffer, pH=10, μαζί με Fast Red Violet salt. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι καλλιέργειες προστατεύθηκαν από το φως. Μετά την επώαση οι καλλιέργειες ξεπλύθηκαν με απιονισμένο ύδωρ (dionized water), και αφέθηκαν στον αέρα να ξεραθούν. Η παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης χρωμάτισε τις κυτταροκαλλιέργειες με το οστεογενετικό μέσο βυσσινί χρώμα. Με το τρόπο αυτό τα MSCs χαρακτηρίστηκαν πλήρως (ήτοι απέδειξαν την ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοπρογενετικά κύτταρα) και έτσι τα υπόλοιπα κύτταρα του αρχικού δείγματος χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα (Jaiswal et al, 1997).

### *Η καλλιέργεια των πρώιμων μεσεγχοματικών κυττάρων (MSCs)*

Τα πρώιμα μεσεγχοματικά κύτταρα MSCs, μετά τον χαρακτηρισμό τους, καλλιεργήθηκαν σε standard medium και επώασθηκαν στους 37°C με 95% υγρασία και 5% CO<sub>2</sub>, με βάση πρωτόκολλο από τη βιβλιογραφία (Jaiswal et al, 1997). Αλλαγή του μέσου γινόταν τρεις φορές την εβδομάδα και η καλλιέργεια διαιρούνταν σε αναλογία 1/1, όταν η καλλιέργεια ήταν σχεδόν 90% κορεσμένη. Για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε 0.25% τρυψίνη με 1mM EDTA (Life Technologies) για 5 λεπτά στους 37°C στον επωαστήρα. Η κυτταροκαλλιέργεια διατηρήθηκε έτσι για μία εβδομάδα. Από τα δείγματα των κυττάρων των 4 ασθενών, που ταυτόχρονα καλλιεργήθηκαν, η καλύτερη κυτταρική σειρά επελέγη για περαιτέρω καλλιέργεια μετά από τη δεύτερη εβδομάδα. Τα υπόλοιπα κύτταρα (από τους 3 ασθενείς που δεν χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη) διαιρέθηκαν σε δείγματα των 2 × 10<sup>5</sup>/ml σε 90% FBS, με 10% dimethyl sulfoxide (freezing medium) σε ependorf tubes, ψύχθηκαν στους -80°C και αποθηκεύθηκαν. Η σειρά που επελέγη αναπτύχθηκε σε διαδοχικές κυτταροκαλλιέργειες για 7 συνεχείς φορές μέχρις ότου ο αριθμός των κυττάρων ήταν επαρκής για το πείραμα.

### *Γενικός σχεδιασμός κυτταροκαλλιεργειών*

Έξι τύποι μοσχευμάτων εξετάστηκαν (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, TMX, TMX+OP-1). Το DBM και το ICBM αντιπροσώπευσαν βιολογικά εκμαγεία ενώ το TMX που είναι συμπαγές πλαστικό υλικό χωρίς οστεοεπαγωγικές ιδιότητες χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου). Περιληπτικά χρησιμοποιήθηκαν δύο πλάκες με 12 εμβυθίσματα (2 x 12-well plates) για την κάθε ομάδα (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, TMX, TMX+OP-1) για κάθε χρονικό σημείο (24 wells ανά χρονικό σημείο). Οκτώ (8) επαναλήψεις του κάθε δείγματος αντιστοιχούσαν σε κάθε μια μέθοδο (Alamar Blue, ALP, 3H-TdR) ανά χρονικό σημείο. Τρία (3) χρονικά σημεία εξετάστηκαν (ημέρα 1<sup>η</sup>, ημέρα 7<sup>η</sup>, και ημέρα 14<sup>η</sup>) με μοναδική εξαίρεση τη δοκιμασία του Alamar Blue, όπου τα δείγματα της 14<sup>ης</sup>

ημέρας παρέμειναν στην καλλιέργεια για μια επιπλέον εβδομάδα και εξετάστηκαν και την 21<sup>η</sup> ημέρα. Αυτό έγινε προκειμένου να δοκιμασθεί η δραστηριότητα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με σκοπό την παραγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων. Η ίδια πρακτική δεν εφαρμόστηκε στις άλλες δοκιμασίες αλλά ούτε και στη μελέτη III, όπως θα δούμε πιο κάτω, καθώς το όριο των 14 ημερών θεωρήθηκε ικανό για την παραγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Σε κάθε δισκίο προστέθηκε συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων μετά από μέτρηση, που ήταν  $2 \times 10^5$  MSCs ανά well σε 2ml θρεπτικού υποστρώματος. Επίσης προστέθηκε η ίδια ποσότητα αυξητικού παράγοντα (400ng OP-1) ανα 0.25g αλλομοσχεύματος (DBM, ICBM, TMX) (Haynesworth et al, 1992; Jaiswal et al, 1997).

#### **4. Προετοιμασία του DBM και ICBM**

Οστό για την παρασκευή του DBM και του ICBM προήλθε από τις μηριαίες κεφαλές των ιδίων ασθενών που προσέφεραν τα δείγματα του μυελού των οστών, κατά τη διάρκεια της αρθροπλαστικής του ισχίου. Η διαδικασία εκτέλεσης του πειραματικού μέρους της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Λονδίνου (Research and Development Ethics Committee of The Royal National Orthopaedic Hospital, Institute of Orthopaedic, University College London and Royal Free Hospital Medical School, Stanmore, UK).

##### *Επεξεργασία Μηριαίας Κεφαλής*

Σπογγώδες οστό αφαιρέθηκε από το εσωτερικό της μηριαίας κεφαλής με ειδικό κοχλιάριο κάτω από συνθήκες αντισηψίας και μέσα στο θάλαμο κάθετης νημάτινης ροής (laminar flow hood). Επίσης τμήματα φλοιοσπογγώδη από τον αυχένα του μηριαίου χρησιμοποιήθηκαν αλλά όχι από το χόνδρινο τμήμα της κεφαλής.

### *Προετοιμασία του μερικώς αποασβεστοποιημένου οστού (DBM)*

Για την αποασβεστοποίηση του οστού χρησιμοποιήθηκε τροποποίηση πρωτοκόλλου από τη βιβλιογραφία (Urist, 1965; Sampath and Reddi, 1981). Το οστό από τις μηριαίες κεφαλές κόπηκε σε μικρά τεμάχια με το χέρι μεγέθους λίγων χιλιοστών (1-2mm). Η αποασβεστοποίηση των τεμαχίων έγινε στη χοάνη με τρεις διαδοχικές εκπλύσεις του οστού με 0.5N HCl (BDH Laboratory Supplies) στους 37°C. Τα οστικά τεμάχια τοποθετήθηκαν σε τριβλία κυτταροκαλλιέργειας (100×20mm) και το διάλυμα του HCl οξέος προστέθηκε μέχρι αυτά να σκεπαστούν. Για τη διευκόλυνση της αποασβεστοποίησης τα δισκία τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρες για 10 λεπτά. Μετά το τέλος των τριών διαδοχικών εκπλύσεων το όξινο διάλυμα αναρροφήθηκε και τα οστικά τεμάχια ξεπλύθηκαν με PBS (Sigma) σε θερμοκρασία δωματίου και πάντα μέσα στη χοάνη μέχρι που το pH του διαλύματος ουδετεροποιήθηκε (pH=7). Στη συνέχεια τα οστικά τεμάχια μεταφέρθηκαν σε στέγνα τριβλία κυτταροκαλλιέργειας και με τη βοήθεια αποστειρωμένων εργαλείων τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 εμβυθισμάτων (96-well plates). Οστέινα δισκία πακτωμένου αλλομοσχεύματος και βάρους περίπου 0.25g κατασκευάστηκαν με τη συμπίεση μικροτεμαχίων DBM (1-2mm το κάθε ένα). Τα οστέινα δισκία είχαν διαστάσεις διάμετρο περίπου 5mm (ίση με τη διάμετρο κάθε υποδοχής της πλάκας 96 εμβυθισμάτων) και ύψος περίπου 3mm που καταλάμβανε περίπου το 1/3 του ύψους κάθε εμβυθίσματος. Η τεχνική αποτέλεσε πειραματική εξομοίωση της ενσφίνωσης σπογγώδους οστού, όπως συμβαίνει στην τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Η συμπίεση έγινε με τη χρήση πλαστικού αποστειρωμένου ενσφηνωτή, κυλινδρικού σχήματος, που παρασκευάστηκε από το τμήμα Biomedical Engineering του Royal National Orthopaedic Hospital, Institute of Orthopaedic, University College London and Royal Free Hospital, Stanmore, UK. Ο ενσφηνωτής εφάρμοζε ακριβώς στις διαστάσεις της υποδοχής του εμβυθίσματος, η δε ενσφίνωση έγινε με διαδοχικές κατακόρυφες κινήσεις μέχρις ότου το δισκίο μπορούσε να αναληφθεί συμπαγές και ολόκληρο από την υποδοχή. Τότε μόνο σταματούσε η ενσφίνωση.



### *Προετοιμασία του πλήρως αποασβεστοποιημένου οστού (ICBM)*

Μετά τη μερική αποασβεστοποίηση (παρασκευή του DBM) ένα τμήμα του DBM προετοιμάστηκε για την παρασκευή ICBM (Sampath and Reddi, 1981). Αρχικά τα τεμάχια του DBM πλύθηκαν με απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (absolute ethanol, 30ml/g οστού, BDH Laboratory Supplies) δύο φορές σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά τη φορά, ώστε να απομακρυνθούν το υπόλοιπο λίπος και κύτταρα. Η αιθυλική αλκοόλη αναρροφήθηκε και τα οστικά τεμάχια μεταφέρθηκαν σε νέα δισκία κυτταροκαλλιέργειας. Αιθυλ-αιθέρας (BDH Laboratory Supplies) προστέθηκε στα δισκία και τα οστικά τεμάχια αφέθηκαν στους 4°C (ψυγείο) ώστε να αποξηρανθούν κατά τη διάρκεια της νύκτας. Την επόμενη μέρα έγινε έκπλυση των οστικών τεμαχίων δύο φορές. Για 1 ώρα την πρώτη φορά και για μισή ώρα τη δεύτερη φορά με 50mM Tris HCl (BDH Laboratory Supplies). Στη συνέχεια αναρροφήθηκε το Tris HCl και το pH του οστού, ουδετεροποιήθηκε με την προσθήκη PBS (Sigma) και το οστό τελικώς εκπλύθηκε με απεσταγμένο φιλτραρισμένο νερό (distilled filtered water). Στη συνέχεια έγιναν δύο ακόμη πλύσεις με διάλυμα 4M GnHCl (υδροχλωρική γουανιδίνη, Sigma) σε 50mM διαλύματος Tris HCL με και με την προσθήκη αναστολέων της πρωτεάσης [100mM protease amino caproic acid (Sigma), 5 mM benzamidine (Aldrich), 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Aldrich), 5mM N-ethylmaleimide (Aldrich)]. Ακολούθησε έκπλυση με PBS (Sigma), αναρρόφηση του PBS και έκπλυση με απεσταγμένο φιλτραρισμένο νερό. Το στερεό οστικό υπόλειμμα μεταφέρθηκε σε νέα δισκία κυτταροκαλλιέργειας, όπου προστέθηκε αιθυλ-αιθέρας και αφέθηκε στους 4°C (ψυγείο), ώστε να αποξηρανθεί κατά τη διάρκεια της νύκτας. Την επόμενη ημέρα προετοιμάστηκαν δισκία πακτωμένου ICBM με τη μέθοδο που περιγράφηκε πιο πάνω για τα δισκία του DBM . Τα δισκία του DBM και του ICBM μέσα στα 96 well plates αποστειρώθηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία μέσα στο θάλαμο κάθετης νημάτινης ροής (UV light in laminar flow hood) για 24 ώρες. Κατόπιν αυτού συντηρήθηκαν στους 4°C και ήταν έτοιμα να στρωθούν στην κυτταροκαλλιέργεια των MSCs και OP-1.

## 5. Η στρώση των καλλιεργείων και οι ομάδες μελέτης

Για το DBM και το ICBM δύο ομάδες καλλιεργείων προετοιμάστηκαν. Η ομάδα ένα στρωνόταν με MSCs ( $2 \times 10^5$  MSCs / δισκίο DBM, ICBM) μόνο και η ομάδα δύο με MSCs ( $2 \times 10^5$  MSCs / δισκίο DBM, ICBM) και rhOP-1 (R&D Systems) σε αναλογία 400ng/0.25g οστικού πακτωμένου μοσχεύματος (Ripamonti et al, 1996). Μία τρίτη κατηγορία καλλιεργείων, η κατηγορία ελέγχου (controls), χρησιμοποίησε αντί οστικού μοσχεύματος συνθετικό συμπαγές υλικό 0.25g επίσης, που ονομάζεται Thermanox (Nunc) (MG Scientific). Η ομάδα αυτή επίσης στρώθηκε με MSCs [ $2 \times 10^5$  MSCs / τεμάχιο 0.25g Thermanox (Nunc)] με ή χωρίς rhOP-1 (R&D Systems). Τα MSCs στρώθηκαν πάνω στα δείγματα του συμπιεσμένου οστού και του Thermanox με άμεση έγχυση 1ml διαλύματος κυττάρων που περιείχε  $2 \times 10^5$  MSCs και στη συνέχεια επώασθηκαν στους 37°C 5% CO<sub>2</sub> για 45 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η απορρόφηση και η προσκόλληση περισσότερων κυττάρων στο οστικό εκμαγείο. Ταυτόχρονα έγινε και η έγχυση του OP-1 (400ng/0.25g). Μετά το πέρας των 45 λεπτών οι πλάκες 12 εμβυθισμάτων συμπληρώθηκαν με 2ml θρεπτικού υποστρώματος κατά εμβύθισμα και επώασθηκαν στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε ποσοτικά με τη χρήση της δοκιμασίας Alamar Blue και την απορρόφηση ραδιοσημασμένης θυμιδίνης (<sup>3</sup>H-TdR), ενώ η κυτταρική διαφοροποίηση αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Η ποιοτική αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης έγινε με την χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy), την χρώση Von Kossa και την ακτινολογική επιβεβαίωση της ασβεστοποίησης (X-ray). Οι δοκιμασίες έγιναν σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία: ημέρα 1, ημέρα 7 και ημέρα 14. Έτσι συνολικά υπήρξαν 6 ομάδες δειγμάτων (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, TMX, TMX+OP-1) και 3 διαφορετικές δοκιμασίες. Επίσης 8 δείγματα για την κάθε δοκιμασία ανά μέρα. Έτσι για τη κάθε ομάδα προετοιμάστηκαν 2 πλάκες 12 εμβυθισμάτων ανά μέρα.

### *Χρονικός σχεδιασμός των δοκιμασιών*

Η παρακάτω διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε χρονικό σημείο.

Ημέρα 1: Γίνεται η δοκιμασία του Alamar Blue για τα 8 εμβυθίσματα που αντιστοιχούν σε αυτή και χρώση Von Kossa των κυτταροκαλλιιεργειών των ιδίων εμβυθισμάτων.

Ημέρα 2: Προστέθηκαν 2ml ραδιοσημασμένης θυμιδίνης ( $^3\text{H-TdR}$ ) στα 8 εμβυθίσματα που αντιστοιχούν σε αυτή τη δοκιμασία.

Ημέρα 3: Ψύξη-θέρμανση για τη λύση των κυττάρων σε όλα τα wells (Rago et al 1990). Ακολούθησε η μέτρηση του ολικού DNA κατά εμβύθισμα η δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  και η δοκιμασία της δραστηριότητας της ALP.

#### *α. Για τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης*

Εκατό (100) μl δείγματος από το κάθε εμβύθισμα μεταφέρονται στην πλάκα ανάγνωσης του Fluoroscan και προστίθενται 1μg/ml Hoechst 33258 για τη μέτρηση του ολικού DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί η δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανάγονται στο ολικό DNA κατά well. Έτσι υπολογίζεται η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης ανά μονάδα DNA. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων αλλά και μεταξύ των διαφόρων δοκιμασιών.

#### *β. Για τη δοκιμασία της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης*

Εκατό (100) μl δείγματος από το κάθε εμβύθισμα μεταφέρονται στην πλάκα ανάγνωσης του Fluoroscan και προστίθενται 1μg/ml Hoechst 33258 για τη μέτρηση του ολικού DNA όπως πιο πάνω. Στη συνέχεια ακολούθησε η δοκιμασία της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης και τα αποτελέσματα επίσης ανάγονται στο ολικό DNA.

## 6. Δοκιμασία Alamar Blue [Alamar Blue Assay]

Η δοκιμασία Alamar Blue<sup>(TM)</sup> (Serotec) αξιολογεί ποσοτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό βασισμένη στην αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (Nakayama et al, 1997). Συγκεκριμένα το σύστημα διαθέτει έναν δείκτη οξειδωσης-αναγωγής (oxidation-reduction indicator REDOX) που αλλάζει χρώμα, όταν το θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρικής καλλιέργειας γίνεται αναγωγικό ως συνέπεια κυτταρικού πολλαπλασιασμού (το περιβάλλον των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται είναι πιο αναγωγικό, καθώς ελεύθερα  $H^+$  παράγονται από τη μετατροπή ενέργειας πχ NADPH σε NADP που διασπά το ATP σε ADP). Καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται το περιβάλλον γίνεται αναγωγικό και έτσι το Alamar Blue αλλάζει χρώμα από οξειδωτικό μπλε σε αναγωγικό κόκκινο. Η μέτρηση της φθορίζουσας ακτινοβολίας του Alamar Blue έγινε με τον μετρητή φθορίζουσας ακτινοβολίας (Fluoroscan, Life Sciences) στα 590 nm.

### *Πρωτόκολλο*

Οκτώ (8) δείγματα είναι διαθέσιμα για το κάθε χρονικό σημείο (ημέρα 1, 7, 14). Το μέσο της κυτταρικής καλλιέργειας αναρροφήθηκε από τα υπό μελέτη εμβυθίσματα για κάθε μια από τις 6 ομάδες (σύνολο 48 δείγματα ανά μέρα) και τοποθετήθηκε σε νέα πλάκα 96 εμβυθισμάτων (Falcon). Πεντακόσια (500) μl διαλύματος Alamar Blue (συγκέντρωση 1/10 σε DMEM) προστέθηκε σε κάθε εμβύθισμα και αφήθηκε στον επωαστήρα για 4 ώρες (37°C και 5% CO<sub>2</sub>). Τα εμβυθίσματα που δεν είχαν κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου και έλαβαν την ίδια ποσότητα Alamar Blue. Μετά το τέλος της επώασης δείγματα των 100μl από το κάθε εμβύθισμα μεταφέρθηκαν σε ειδική πλάκα ανάγνωσης (reading plate) για την ανάγνωση της φθορίζουσας ακτινοβολίας από το Fluoroscan σε μήκος κύματος 590 nm.

## 7. Δοκιμασία Αλκαλικής φωσφατάσης [Alkaline phosphatase (ALP) assay]

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται δεσμευμένο στην κυτταρική μεμβράνη. Η ακριβής δράση της αλκαλικής φωσφατάσης είναι άγνωστη αλλά πιθανολογείται ότι συμμετέχει στην διάσπαση της πυροφωσφατάσης ενός ισχυρού αναστολέα της εναπόθεσης φωσφορικού ασβεστίου. Υπάρχουν 4 ισοένζυμα της ALP στην κυκλοφορία (από τα οστά, το έντερο, το ήπαρ και από τον πλακούντα). Η οστικής προέλευσης ALP παράγεται από τους οστεοβλάστες και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την οστεογένεση. Είναι ο πιο ευρέως αναγνωρίσιμος βιοχημικός δείκτης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας. Σε αλκαλικό pH η αλκαλική φωσφατάση, καταλύει την μετατροπή του p-nitrophenolphosphate σε p-nitrophenol που έχει χρώμα κίτρινο (Sabokbar et al, 1994). Η δοκιμασία της μέτρησης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης είναι μέθοδος ποσοτικής αξιολόγησης της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και έκφρασης του οστεοβλαστικού φαινότυπου. Η ALP βρίσκεται είτε δεσμευμένη στην κυτταρική μεμβράνη (δεσμευμένη ALP) είτε εκλύεται από το κύτταρο στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (ελεύθερη ALP). Η δραστηριότητα της ALP (δεσμευμένη και ελεύθερη) συσχετίζεται με το βαθμό της διαφοροποίησης των κυττάρων. Περισσότερη δραστηριότητα ALP συνεπάγεται οστεοβλαστική φαινοτυπική διαφοροποίηση. Η μέτρηση της παραγωγής της κίτρινης p-nitrophenol γίνεται στα 405nm χρησιμοποιώντας COBAS-BIO (Roche) αναλυτή φυγοκέντρισης (Wlodarski and Reddi, 1986; Sabokbar et al, 1994).

### *Πρωτόκολλο*

Οκτώ (8) δείγματα είναι απαραίτητα για το κάθε χρονικό σημείο (ημέρες 1,7,14). Για την μέτρηση της δεσμευμένης στην κυτταρική μεμβράνη ALP έγινε λύση των κυττάρων με τη μέθοδο ψύξης-θέρμανσης (βλέπε «χρονικός σχεδιασμός δοκιμασιών»). Το θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρικής καλλιέργειας αναρροφήθηκε από τα εμβυθίσματα και αντικαταστάθηκε με 500 μl απεσταγμένο νερό σε κάθε εμβύθισμα. Οι πλάκες 12 εμβυθισμάτων στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε τρεις κύκλους ψύξης -

θέρμανσης διάρκειας 2 ωρών ο καθένας (1 ώρα ψύξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και μια ώρα θέρμανση στους  $37^{\circ}\text{C}$ ) (Rago et al 1990). Με τη λύση των κυττάρων, η δεσμευμένη ALP απελευθερώθηκε στο περιβάλλον. Η μέτρηση της έγινε με την απελευθέρωση του p-nitrophenol (κίτρινου χρώματος) από την P-nitrophenol phosphate (PNPP) στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Για την εφαρμογή της δοκιμασίας, 2ml διαλύματος, που περιείχε 1M diethanolamin (DEA), 10mM PNPP, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.22M NaCl, pH 9.8 (Merck), προστέθηκε σε κάθε εμβύθισμα. Πενήντα (50) μl δείγματος από το κάθε εμβύθισμα (8 εμβυθίσματα για το κάθε χρονικό σημείο) μεταφέρθηκαν με την πιπέτα σε ειδικούς σωλήνες erpendorf και αναλύθηκαν στα 405nm χρησιμοποιώντας αναλυτή φυγοκέντρισης COBAS-BIO (Roche). Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης μετρήθηκε σε U (Units) / L (Litre).

### **8. Δοκιμασία $^3\text{H-TdR}$ ( $^3\text{H-TdR}$ assay)**

Η μέθοδος αυτή αξιολογεί τη σύνθεση του νέου DNA που ασφαλώς συσχετίζεται με ανάλογη αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η σύνθεση του νέου DNA μπορεί να αξιολογηθεί με την μέτρηση του βαθμού ενσωμάτωσης του  $^3\text{H-TdR}$  στον κυτταρικό κύκλο στη φάση S (G1, S, G2, M). Καθώς ο ρυθμός σύνθεσης του DNA αντικατοπτρίζει την μιτωτική δραστηριότητα, η ακτινοβολία που εκπέμπεται από το ενσωματωμένο  $^3\text{H-TdR}$  αντικατοπτρίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Urist et al, 1965; Ahmed et al, 1994).

#### *Πρωτόκολλο*

8 δείγματα ήταν διαθέσιμα για τη δοκιμασία για τη κάθε χρονική στιγμή. Ακολούθησε αναρρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος από τα εμβυθίσματα. Υπενθυμίζουμε ότι προηγήθηκε η προσθήκη 2 ml θρεπτικού υποστρώματος με ραδιενεργό  $^3\text{H-TdR}$  σε συγκέντρωση 1mCi/ml σε κάθε ένα από τα εμβυθίσματα την προηγούμενη ημέρα (βλέπε «χρονικός σχεδιασμός δοκιμασιών»). Τα κύτταρα αφήθηκαν στον επωαστήρα για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρικής καλλιέργειας με την ραδιενεργό  $^3\text{H-TdR}$  αναρροφήθηκε και καταστράφηκε με ειδικό πρωτόκολλο για

τα ραδιενεργά υλικά. Τα εμβυθίσματα ξεπλύθηκαν με PBS τρεις φορές και στη συνέχεια προστέθηκε σε κάθε εμβύθισμα 0.5 ml απεσταγμένου νερού για τη λύση των κυττάρων με τη μέθοδο ψύξης-θέρμανσης, όπως περιγράφηκε πιο πάνω (Rago et al, 1999). Το προϊόν της λύσης μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorf και σε κάθε ένα από αυτά προστέθηκαν 600μl διαλύματος 5% TCA (trichloro acetic acid) σε PBS (5% TCA=2.5 μl 100% διαλύματος TCA σε 50 μl PBS). Η τελική συγκέντρωση 5% TCA ήταν απαραίτητη για την καθίζηση του DNA. Στη συνέχεια οι σωλήνες erpendorf αναδεύτηκαν. Ακολούθησε η διαδικασία της αναρρόφησης όπου χάρτινα φίλτρα εμβαπτίστηκαν σε 5% TCA και τοποθετήθηκαν στα ειδικά εμβυθίσματα του αναρροφητή φίλτρου (Vaccum filter plate). Τα δείγματα από τον κάθε σωλήνα erpendorf αναρροφήθηκαν με πιπέτα και διηθήθηκαν μέσω του χάρτινου φίλτρου. Τα εμβυθίσματα εμποτίστηκαν ξανά με 100 μl 5% TCA. Ακολούθησε μηχανική αναρρόφηση (vaccum). Η ίδια διαδικασία εμποτισμού των εμβυθισμάτων με 5% TCA επαναλήφθηκε 2 φορές ακόμη με το ίδιο διάλυμα των 100 μl 5% TCA σε κάθε εμβύθισμα. Τέλος τα εμβυθίσματα ξεπλύθηκαν με 95% EtOH και τα φίλτρα αφέθηκαν να ξεραθούν στον αέρα για 15 λεπτά. Τα φίλτρα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν το καθένα ξεχωριστά σε ειδικά μικρά δοχεία και σε κάθε ένα από αυτά τα δοχεία προστέθηκαν 500μl διαλύματος 0.01M KOH. Τα δοχεία στη συνέχεια αφέθηκαν για 12 ώρες στον αναδευτήρα. Την επομένη μέρα προστέθηκαν 3ml σπινθιρογραφικού υγρού (scintillation fluid) στο κάθε δοχείο και αφέθηκαν στον αναδευτήρα για 30 λεπτά. Τα ειδικά αυτά δοχεία τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στις αντίστοιχες υποδοχές και τα δείγματα διαβάστηκαν σε μετρητή β-ακτινοβολίας (Packard, Tri-Carb 4000).

## **9. Η ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων με τη δοκιμασία του ολικού DNA [Total DNA assay Hoechst 33258]**

Η φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258 (Sigma) είναι bisbenzimidazole DNA-διαμεσολαβητής (interactor) που συνδέεται με το ζευγάρι βάσεων αδενίνη-θυμίνη του DNA και φθορίζει στο 460 nm μήκος κύματος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ολικού DNA σε κάθε εμβύθισμα

και κατά συνέπεια στην εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων σε αυτό. Με τον τρόπο αυτό αντικειμενοποιούνται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών της δραστηριότητας της ALP και της απορρόφησης της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης  $^3\text{H-TdR}$ , καθώς με την απλή μέθοδο των τριών υπολογίζουμε την δραστηριότητα της ALP και την απορρόφηση της  $^3\text{H-TdR}$  κατά μονάδα DNA, που μετράται σε  $\mu\text{g/ml}$ . Η διαδικασία αυτή βοηθά ώστε να προκύπτουν συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων αλλά και μεταξύ των διαφόρων τεχνικών. Η διαδικασία της μέτρησης του ολικού DNA γίνεται πάντοτε πριν τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης και πριν τη δοκιμασία της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, όπως αναλυτικά περιγράφεται στη παράγραφο «χρονικός σχεδιασμός των δοκιμασιών» (Labarca and Paigen, 1980; Otto and Tsou, 1985; Rago et al, 1990).

#### *Πρωτόκολλο*

Το θρεπτικό υπόστρωμα της κυτταρικής καλλιέργειας από το κάθε εμβύθισμα αναρροφήθηκε και ακολούθησε έκπλυση του εμβυθίσματος 2 φορές με 1ml PBS. Το θρεπτικό υπόστρωμα αντικαταστάθηκε με 500  $\mu\text{l}$  απεσταγμένο νερό. Τα κύτταρα λύθηκαν για το κάθε χρονικό σημείο (ημέρα 1, 7, 14) με τη μέθοδο της ψύξης- θέρμανσης ( $-80\text{C}^\circ +37\text{C}^\circ$ ) σε τρεις κύκλους 2 ωρών ο κάθε ένας, όπως περιγράφηκε πιο πάνω (Rago et al, 1990). Εκατό (100)  $\mu\text{l}$  δείγματος από το κάθε εμβύθισμα μεταφέρθηκαν με την πιπέτα σε ειδική πλάκα ανάγνωσης (reading plate). Σε κάθε εμβύθισμα της πλάκας ανάγνωσης προστέθηκαν επίσης 100  $\mu\text{l}$  διαλύματος Hoechst 33258 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) σε 10 mM Tris, 2M NaCl, 1mM EDTA. Η πλάκα στη συνέχεια διαβάστηκε από τον μετρητή φθορίζουσας ακτινοβολίας (Life Science, Fluoroscan) στα 460nm.

#### *Καμπύλη ομαλοποίησης του DNA*

Πριν από την εφαρμογή της πιο πάνω τεχνικής, έγινε καμπύλη ομαλοποίησης του DNA, για τη βαθμονόμηση (calibration) του μετρητή. Χρησιμοποιήθηκε ειδική πλάκα ανάγνωσης καθώς και δείγματα 100  $\mu\text{l} \times 3$  από 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125  $\mu\text{g/ml}$  (21 δείγματα) standard DNA (calf



thymus SIGMA) σε διάλυμα SSC (saline sodium citrate) (Life Technologies), (pH=7). Η πλάκα ανάγνωσης στη συνέχεια διαβάστηκε από τον μετρητή φθορίζουσας ακτινοβολίας (Life Science, Fluoroscan) στα 460nm. Τελικώς τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε mg/ml από τον υπολογιστή με genesis software.

#### **10. Ηλεκτρονική Μικροσκόπηση Σάρωσης [Scanning Electron Microscopy (SEM)]**

Δείγματα αλλομοσχεύματος DBM και ICBM από 2 χρονικά σημεία (7<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα) επιλέχθηκαν και προετοιμάστηκαν για ηλεκτρονική μικροσκόπηση. Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε 1.5% glutaraldehyde με 0.1M sodium cacodylate (pH 7.2-7.4) στους 4<sup>ο</sup> C για 2 ώρες (πρώτη μονιμοποίηση, primary fixation). Τα δείγματα ακολούθως πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για 20 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε χρώση των δειγμάτων με 1% τετροξείδιο του οσμίου (osmium tetroxide) και 1% τανικό οξύ (tannic acid) για 1 ώρα (δεύτερη μονιμοποίηση, secondary fixation) και ακολούθησε ξανά έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 20 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια αφυδατώθηκαν με επανειλημμένες εμβαπτίσεις σε EtOH σε διαδοχικές συγκεντρώσεις 20%, 30%, 40%, 50%, 60% και 70%. Τα δείγματα στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 0.5% uranyl acetate σε 70% EtOH για 30 λεπτά και ξανά αφυδατώθηκαν με EtOH σε διαδοχικές συγκεντρώσεις 90%, 96%, και 100%. Τελικά τα δείγματα αφέθηκαν να ξεραθούν με hexamethyl disilazane (critical point drying SEM dryer). Στη συνέχεια ακολούθησε επικάλυψη με πάστα αργύρου (silver paste) και η προετοιμασία για τον sputter coater (επικάλυψη με φύλλο κράματος χρυσού / παλλαδίου [gold / palladium]). Κατόπιν τα δείγματα εισήλθαν στον ειδικό χώρο του SEM και η πόρτα έκλεισε αεροστεγώς. Για την ηλεκτρονική μικροσκόπηση χρησιμοποιήθηκε το Joel Winsem JSM-35C 6300 Series Field Emission Electron Microscope.

## **11. Χρώση Von Kossa [Von Kossa Staining]**

Οι κυτταρικές καλλιέργειες την 14<sup>η</sup> μέρα χρωματίστηκαν με τη χρώση Von Kossa. Οι κυτταρικές καλλιέργειες στα εμβυθίσματα, που αντιστοιχούσαν στη δοκιμασία του Alamar Blue τη 14<sup>η</sup> ημέρα μονιμοποιήθηκαν με 10% φορμαλίνη για μια ώρα και επώασθησαν με 2% διάλυμα νιτρικού αργύρου (silver nitrate) για 10 min στο σκοτάδι. Στη συνέχεια τα εμβυθίσματα εκπλύθηκαν με απιονισμένο νερό (deionized water) και εκτέθηκαν σε φωτεινή πηγή για 15 λεπτά μέσα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Η χρώση έβγαψε τις ασβεστοποιημένες εστίες του νεοσχηματισμένου οστού χρώμα καφέ-μαύρο. Η ασβεστοποίηση του DBM και ICBM ήταν το αποτέλεσμα της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των κυττάρων που βρισκόταν στην καλλιέργεια. Η χρώση Von Kossa είναι μια ποιοτική μέθοδος αξιολόγησης της φαινοτυπικής διαφοροποίησης των MSCs ώριμους οστεοβλάστες. Η ασβεστοποίηση αξιολογήθηκε συγκριτικά στα ενισχυμένα και μη ενισχυμένα με OP-1 δείγματα του αλλομοσχεύματος (DBM, ICBM) (Bills et al, 1974).

## **12. Ακτινολογικός έλεγχος**

Τέσσερα διαφορετικά δείγματα μικροτεμαχίων πακτωμένου αλλομοσχεύματος από τη 14<sup>η</sup> ημέρα ανασύρθηκαν από τις κυτταροκαλλιέργειες και μεταφέρθηκαν πάνω σε ξεχωριστή ακτινολογική πλάκα. Τα δείγματα προέρχονταν από καλλιέργειες DBM, DBM+OP-1, ICM, ICM+OP-1. Ακτινογραφίες ελήφθησαν με οδοντιατρική ακτινολογική συσκευή (Siemens, 2000).

## **13. Στατιστική ανάλυση**

Οκτώ (8) επαναλήψεις του κάθε δείγματος (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, TMX, TMX+OP-1) για την κάθε χρονική στιγμή (ημέρα 1, 7, 14) και για την κάθε δοκιμασία (Alamar Blue, ALP, <sup>3</sup>H-TdR) εξετάστηκαν. Ο μέσος όρος της κάθε μέτρησης με το  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error of the mean) παρουσιάστηκε με ιστογράμματα. Το paired Student's *t*-test

χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ ενισχυμένων και μη δειγμάτων με OP-1 και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του  $p \leq 0.05$ . Συνολική συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (συμπεριλαμβανομένων και των αντιστοίχων αποτελεσμάτων της μελέτης III, που ακολουθεί), αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό και την φαινοτυπική διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγγυματικών κυττάρων με τη μέθοδο της μέτρησης της απορρόφησης της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης και τη μέθοδο της μέτρησης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης αντίστοιχα, σε όλα τα χρονικά σημεία, έγινε με τη μέθοδο one way ANOVA. Η ανάλυση των επιμέρους σχέσεων μεταξύ των διαφόρων αλλομοσχευμάτων, έγινε με την δοκιμασία post-hoc Tukey HSD και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του  $p \leq 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 11.0.

### **ΜΕΛΕΤΗ III. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 1. *IN VITRO* ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ**

#### **1. Υδροξυαπατίτης (H/A)**

Πορώδης υδροξυαπατίτης με ποσοστό πόρωσης 74.6% (Image Analysis) και επεξεργασία θερμικής δόμησης (κρυσταλοποίησης) μεταξύ 1200 και 1300 °C, χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη (Προέλευση: Department of Biomedical Engineering, Royal National Orthopaedic Hospital, Institute of Orthopaedics, Stanmore, University College London and Royal Free Medical School, London, UK). Το βάρος κάθε τεμαχίου ήταν μεταξύ 0.07 και 0.1gr. Όλα τα τεμάχια του υδροξυαπατίτη που επελέγησαν για την μελέτη αποστειρώθηκαν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 160 °C και στη συνέχεια αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες αποστείρωσης πριν τη χρήση τους.

## **2. Πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών**

Η αναρρόφηση των κυττάρων του μυελού των οστών, η απομόνωση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων και ο χαρακτηρισμός των κυττάρων αυτών έγιναν με τη μέθοδο που περιγράφηκε στις μεθόδους της μελέτης II.

## **3. Προετοιμασία του υδροξυαπατίτη (H/A)**

Ο H/A είναι εύθρυπτο υλικό και η τεχνική του πακτωμένου μοσχεύματος δεν μπορεί να εφαρμοστεί με την ίδια ευκολία όπως για το DBM και το ICBM. Η τεχνική της συμπίεσης γίνεται με την ίδια μέθοδο αλλά εφαρμόζοντας μικρότερη δύναμη, ώστε να αποφεύγεται ο εκτεταμένος θρυμματισμός του υλικού. Δισκία βάρους περίπου 0.25g κατασκευάστηκαν με συμπίεση μικροτεμαχίων H/A. Τα δισκία είχαν διάμετρο περίπου 5mm, ίση με τη διάμετρο κάθε εμβυθίσματος της πλάκας 96 εμβυθισμάτων και ύψος περίπου 3mm, που καταλαμβάνει περίπου το 1/3 του ύψους κάθε εμβυθίσματος. Η τεχνική αποτέλεσε πειραματική εξομοίωση της μεθόδου ενσφίνωσης του σπογγώδους οστού, όπως αυτή χρησιμοποιείται στην τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Η ενσφίνωση του H/A έγινε με τη χρήση πλαστικού αποστειρωμένου ενσφηνωτή κυλινδρικού σχήματος που παρασκευάστηκε από το τμήμα Εβιομηχανικής (Department of Biomedical Engineering Royal National Orthopaedic Hospital, Institute of Orthopaedics, Stanmore, University College London and Royal Free Medical School, London UK) του Stanmore. Ο ενσφηνωτής εφάρμοζε ακριβώς στις διαστάσεις της υποδοχής κάθε εμβυθίσματος, η δε ενσφίνωση έγινε με διαδοχικές κατακόρυφες κινήσεις μέχρις ότου το δισκίο να μπορεί να αναληφθεί συμπαγές και ολόκληρο από την υποδοχή. Τότε μόνο η ενσφίνωση σταματούσε.

## **4. Η στρώση των καλλιεργειών και οι ομάδες μελέτης**

Τέσσερις τύποι μοσχευμάτων εξετάστηκαν (HA, HA+OP-1, TMX, TMX+OP-1) ενώ το TMX χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Για τον υδροξυαπατίτη (H/A) προετοιμάστηκαν δύο ομάδες

καλλιερχειών. Η ομάδα ένα στρωνόταν με MSCs ( $2 \times 10^5$  κύτταρα / δισκίο H/A) και η ομάδα δύο στρωνόταν με MSCs ( $2 \times 10^5$  κύτταρα / δισκίο H/A) και rh-OP-1 (R&D Systems) σε τελική αναλογία 400ng/0.25g πακτωμένου υδροξυαπατίτη (Ripamonti et al, 1996). Σε μία τρίτη κατηγορία καλλιερχειών, την κατηγορία ελέγχου (controls), χρησιμοποιήθηκε αντί του H/A συνθετικό συμπαγές υλικό βάρους 0.25gr (Thermanox [Nunc], MG Scientific). Η μια ομάδα TMX έλαβε MSCs ( $2 \times 10^5$  κύτταρα / τεμάχιο 0.25g Thermanox-Nunc) με rh-OP-1 και η άλλη χωρίς rh-OP-1 (R&D Systems). Οι δοκιμασίες έγιναν σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία την ημέρα 1, 7 και 14. Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων ήταν οι μέθοδοι του Alamar Blue, της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης και της ALP αντίστοιχα. Το ολικό DNA μετρήθηκε όπως περιγράφεται στις μεθόδους της μελέτης II για την αντικειμενοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση εκφράζονται ανά μονάδα DNA. Οκτώ (8) δείγματα ήταν διαθέσιμα για την κάθε δοκιμασία την κάθε χρονική στιγμή. Δύο (2) πλάκες 12 εμβυθισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανά ομάδα βιοϋλικού (H/A, H/A+OP-1, TMX, TMX+OP-1) ανά μέρα πειράματος (1, 7, 14). Τα MSCs στρώθηκαν πάνω στα δείγματα του συμπιεσμένου H/A και του Thermanox με άμεση έγχυση 1ml διαλύματος κυττάρων που περιείχε  $2 \times 10^5$  MSCs και επώασθηκε στους  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  για 45 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η απορρόφηση και η προσκόλληση περισσότερων κυττάρων στο εκμαγείο. Ταυτόχρονα έγινε και η έγχυση του OP-1 (400ng/0.25g). Μετά το πέρας των 45 λεπτών τα εμβυθίσματα των πλακών 12 εμβυθισμάτων συμπληρώθηκαν με 2ml θρεπτικού υποστρώματος και επώασθηκαν στους  $37^\circ\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$  για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε ποσοτικά με τη χρήση της δοκιμασίας Alamar Blue και την απορρόφηση ραδιοσημασμένης θυμιδίνης ( $^3\text{H-TdR}$ ) και η κυτταρική διαφοροποίηση με τη μέτρηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Η αντικειμενοποίηση των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ALP και  $^3\text{H-TdR}$  έγινε με την μέτρηση του ολικού DNA (Hoescht 33258), όπως αναλυτικά περιγράφεται στη μελέτη II. Η διαδικασία αυτή

βοήθησε ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων αλλά και μεταξύ των διαφόρων δοκιμασιών. Η ποιοτική αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης έγινε με την χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκόπισης (SEM). (βλέπε μελέτη II).

## 5. Στατιστική ανάλυση

Εξετάστηκαν 8 επαναλήψεις του κάθε δείγματος (H/A, H/A+OP-1, TMX, TMX+OP-1) για τη κάθε χρονική στιγμή (μέρα 1, 7, 14) και για τη κάθε δοκιμασία (Alamar Blue, ALP, <sup>3</sup>H-TdR). Ο μέσος όρος της κάθε μέτρησης με το  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error of the mean) παρουσιάστηκε με ιστογράμματα. Η στατιστική μέθοδος paired Student's *t*-test χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ ενισχυμένων και μη δειγμάτων με OP-1 και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του  $p \leq 0.05$ . Συνολική συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (συμπεριλαμβανομένων και των αντιστοίχων αποτελεσμάτων της μελέτης II που προηγήθηκε), αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό και την φαινοτυπική διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων με τη μέθοδο της μέτρησης της απορρόφησης της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης και τη μέθοδο της μέτρησης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης αντίστοιχα, σε όλα τα χρονικά σημεία, έγινε με τη μέθοδο one way ANOVA. Η ανάλυση των επιμέρους σχέσεων μεταξύ των διαφόρων αλλομοσχευμάτων, έγινε με τη δοκιμασία post-hoc Tukey HSD και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του  $p \leq 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 11.0.

# **ΜΕΛΕΤΗ IV. *IN VIVO* ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1**

## **1. Γενικός σχεδιασμός**

Δεκάξι (16) αρουραίοι τύπου Wistar διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες των 8 ζώων η κάθε μια (Takikawa et al, 2003). Η κάθε ομάδα έλαβε δύο δισκία του ίδιου τύπου αλλομοσχεύματος στους ορθούς κοιλιακούς μυς. Το ένα δισκίο ήταν ενισχυμένο με OP-1 και το άλλο όχι. Η πρώτη ομάδα έλαβε δύο δισκία φρέσκου αλλομοσχεύματος (FFA και FFA+OP-1) και η δεύτερη ομάδα δύο δισκία αποασβεστοποιημένου αλλομοσχεύματος (DBM και DBM+OP-1). Οι αρουραίοι θυσιάστηκαν μετά από 28 ημέρες και τα μοσχεύματα εξετάστηκαν ιστολογικά αναφορικά με την δημιουργία νέου οστού.

## **2. Επιτροπή Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας**

Άδεια για την διεξαγωγή της μελέτης (project licence) παραχωρήθηκε από την Κτηνιατρική Σχολή του University College London. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν με βάση το πρωτόκολλο έρευνας που κατατέθηκε και εγκρίθηκε από το University College London.

## **3. Εκπαίδευση στην πειραματική χειρουργική**

Ειδική εκπαίδευση στον χειρισμό των ζώων την αναισθησία και την πειραματική χειρουργική έγινε στο Κτηνιατρικό τμήμα του University College London. Μετά την παρακολούθηση σεμιναρίων και γραπτών τελικών εξετάσεων δίπλωμα για τον πειραματικό χειρισμό των ζώων παραχωρήθηκε στον κύριο ερευνητή καθώς και ειδική άδεια (personal Animal Act Licence) από το Υπουργείο Εσωτερικών της Μεγάλης Βρετανίας (Home Office).

#### 4. Προετοιμασία του αποασβεστοποιημένου οστού

Η συλλογή οστού έγινε από τα άνω και κάτω άκρα αρσενικών αρουραίων τύπου Wistar ηλικίας 6 μηνών και μέσου βάρους 500gr, που θυσιάστηκαν με βάση πρωτόκολλο του Πανεπιστημίου του Λονδίνου (Schedule One) με τη χρήση CO<sub>2</sub>. Οι μαλακοί ιστοί αφαιρέθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες στην χοάνη του εργαστηρίου και τα οστά συγκεντρώθηκαν σε αποστειρωμένα κωνοειδή των 50ml μέσα σε PBS με 2% Penicillin/Streptomycin και πάνω σε πάγο. Τα οστά τεμαχίστηκαν με το χέρι σε μικροτεμάχια μεγέθους 1-2 mm. Τα μικροτεμάχια διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες. Η ομάδα ένα συγκεντρώθηκε σε νέο αποστειρωμένο κωνοειδές και καταψύχθηκε ως είχε στους -80°C. Η ομάδα δύο συγκεντρώθηκε σε διαφορετικό αποστειρωμένο κωνοειδές και η διαδικασία της μερικής αποασβεστοποίησης για την παρασκευή DBM ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται στη μέθοδο II. Στη συνέχεια ακολούθησε η παρασκευή των δισκίων βάρους 0.25gr, όπως περιγράφεται στη μέθοδο II, μέσα στις πλάκες 96 εμβυθισμάτων, που αποστειρώθηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) για 24 ώρες μέσα στο θάλαμο κάθετης νημάτινης ροής του εργαστηρίου και στη συνέχεια καταψύχθηκαν στους -80°C μέχρι την ημέρα του πειραματικού χειρουργείου (Urist, 1965; Sampath and Reddi, 1981).

#### 5. OP-1

Δύο (2) μg OP-1/ 0.25gr πακτωμένου αλλομοσχεύματος χρησιμοποιήθηκαν (R/D systems). Η ποσότητα ήταν τετραπλάσια της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα *in vitro* πειράματα (μελέτη II και μελέτη III) λόγω της διαφοράς κλίμακας μεγέθους οργανισμού υπό παρατήρηση (Ripamonti et al, 1996). Η έγχυση και απορρόφηση του OP-1 έγινε στα προετοιμασμένα δισκία του DBM αμέσως πριν την πειραματική χειρουργική επέμβαση. Ακολούθως οι πλάκες 96 εμβυθισμάτων αφέθηκαν στον επωαστήρα για 30 λεπτά, ώστε να δοθεί χρόνος στο OP-1 να απορροφηθεί επαρκώς από τα δισκία του DBM.



## 6. Αρουραίοι

Δεκαέξι (16) αρουραίοι τύπου Wistar, ηλικίας 6 μηνών και μέσου βάρους 500gr εγκλιματίστηκαν στα εργαστήρια του University College London Veterinary Department and Experimental Surgery Laboratory. Τα ζώα παρέμειναν για εγκλιματισμό 2 εβδομάδες. Τέσσερις (4) αρουραίοι ανατράφηκαν ανά κλωβό, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και με καθημερινό έλεγχο της υγείας τους.

## 7. Χειρουργική Τεχνική

Οι αρουραίοι μεταφέρθηκαν στο ειδικό δωμάτιο επεμβάσεων ανα 4 στους ειδικούς κλωβούς. Ένας αρουραίος κάθε φορά λάμβανε αναισθησία με πτητικό αλοθάνειο στην αρχή στον ειδικό θάλαμο αναισθησίας. Η διατήρηση της αναισθησίας γινόταν με ειδική μάσκα κεφαλής και αλοθάνειο κατά τη διάρκεια της επέμβασης. Η χειρουργική επιφάνεια ξυριζόταν επιμελώς υπό γενική αναισθησία. Ο κάθε αρουραίος τοποθετούνταν πάνω σε θερμαινόμενη μαλακή επιφάνεια η οποία ήταν καλυμμένη με αποστειρωμένα χειρουργικά πανιά. Κάτω από συνθήκες απόλυτης αντισηψίας από τον χειρουργό (αποστειρωμένη στολή και αποστειρωμένα γάντια μιας χρήσης για την κάθε επέμβαση) έγινε προετοιμασία του δέρματος με ιωδιούχο διάλυμα (Betadine) 3 φορές, με αποστειρωμένη κομπρέσα και τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας. Ακολούθησε μέση κοιλιακή τομή του δέρματος ενώ στη συνέχεια ανασηκώθηκαν οι πτυχές του δέρματος εκατέρωθεν της λευκής γραμμής. Ακολούθησε εκατέρωθεν της λευκής γραμμής κάθετη τομή στη μάζα των κοιλιακών μυών 1-2 εκατοστών περίπου και διήνιση των μυών μέχρι το οπίσθιο πέταλο της περιτονίας του ορθού κοιλιακού μυός. Στη συνέχεια το δισκίο του αλλομοσχεύματος χωρίς OP-1 εμφυτευόταν στη δεξιά μυϊκή θήκη και το δισκίο του αλλομοσχεύματος με OP-1 εμφυτευόταν στην αριστερή μυϊκή θήκη κάθε αρουραίου. Οι 8 πρώτοι αρουραίοι έλαβαν FFA και FFA+OP-1 ενώ οι 8 επόμενοι DBM και DBM+OP-1. Οι θήκες κλείστηκαν με απλή συνεχή ραφή με απορροφήσιμο ράμμα Vicryl 4/0 και το δέρμα με οριζόντια mattress ραφή με μη απορροφήσιμο Prolene 4/0. Οι αρουραίοι παρακολούθηθηκαν στην ανάνηψη, μέχρι που ανέκτησαν

τις αισθήσεις τους και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους κλωβούς τους. Κάθε αρουραίος έλαβε υποδορίως στη ραχιαία επιφάνεια του αυχένα προληπτικά 100 µl διαλύματος 25 µg/ml Enrofloxacin (flucloxacillin) για χημειοπροφύλαξη έναντι της μόλυνσης του χειρουργικού τραύματος. Η δόση ήταν μία και δεν επαναλήφθηκε μετεγχειρητικά, καθώς όλες οι επεμβάσεις τελείωσαν στον αναμενόμενο χρόνο χωρίς επιπλοκές και χωρίς σημαντική απώλεια αίματος.

## **8. Συλλογή των Μοσχευμάτων**

Όλοι οι αρουραίοι κατάφεραν να επιβιώσουν και τις 28 μέρες του πειράματος. Καμία επιπλοκή δεν παρατηρήθηκε. Οι αρουραίοι θυσιάστηκαν την 28η ημέρα με βάση πρωτόκολλο του Πανεπιστημίου του Λονδίνου (Schedule One) με τη χρήση CO<sub>2</sub>. Χρησιμοποιήθηκε κλωβός CO<sub>2</sub> (100%). Κάτω από συνθήκες αντισηψίας όπως περιγράφηκε πιο πάνω και μέση κοιλιακή τα μοσχεύματα συλλέχθηκαν αδρά μαζί με τον περιβάλλοντα μυ.

## **9. Επεξεργασία των Δειγμάτων**

Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους μονιμοποιήθηκαν σε 10% φορμαλίνη (neutral buffered formalin) για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών τα δείγματα καθαρίστηκαν από τους υπολειπόμενους μαλακούς ιστούς. Τα δείγματα ακτινογραφήθηκαν πριν την αποασβεστοποίηση.

### *Αποασβεστοποίηση*

Για την αποασβεστοποίηση χρησιμοποιήθηκε υγρό Gooding and Stewart's στους 37°C που αποτελεί διάλυμα φορμικού οξέος (200ml formic acid) και φορμαλίνης (100ml formalin) σε απεσταγμένο νερό (700 ml). Τα δείγματα παρέμειναν στο υγρό για 48 ώρες. Τα δείγματα ακτινογραφήθηκαν για την επιβεβαίωση της αποασβεστοποίησης.

### *Αφυδάτωση*

Τα δείγματα αναλήφθηκαν με λαβίδες από το υγρό Gooding and Stewart's και ξεπλύθηκαν κάτω από το νερό βρύσης για 10 λεπτά. Κάθε δείγμα στη συνέχεια εισήλθε διαδοχικά και για 45 λεπτά τη φορά σε διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης (διαδοχικά αυξανόμενης πυκνότητας 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 100% EtOH). Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ακετόνη (acetone) για 15 λεπτά και σε χλωροφόρμιο (chloroform) για 20 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη μεταφορά των δειγμάτων σε διάλυμα 1:1 χλωροφορμίου / παραφίνης για 30 λεπτά. Τα δείγματα τελικά μεταφέρθηκαν σε ειδικό μεταλλικό πλαίσιο και καλύφθηκαν με παραφίνη μέχρι αυτή να πήξει. Μετά το στάδιο αυτό τα δείγματα ήταν έτοιμα για την κατάτμηση (sectioning).

### *Κατάτμηση των Δειγμάτων (Sectioning)*

Τα δείγματα μεταφέρονται στον μικροτόμο. Επανειλημμένες τομές των 3μm από τη μεσότητα του κάθε δείγματος συλλέγονται. Οι τομές μεταφέρονται σε λεκάνη με αποστειρωμένο θερμαινόμενο νερό, για να διαταθούν και στη συνέχεια απλώνονται με τη μέθοδο της επίπλευσης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα για μικροσκόπηση. Τα δείγματα αφήνονται να ξεραθούν στον αέρα για μια ώρα. Τα δείγματα ελέγχονται κάτω από το μικροσκόπιο (OLYMPUS BX51, Japan) για την ποιότητα και το πάχος τους. Πριν τη χρώση τα γυάλινα φιλμ με τα δείγματα πρέπει να ενυδατωθούν ξανά.

### *Ενυδάτωση*

Τα δείγματα εμβαπτίζονται σε xylene για την διάλυση της παραφίνης για 10 λεπτά δύο φορές. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα ελαττούμενης πυκνότητας αιθυλικής αλκοόλης για 2 λεπτά τη φορά (100%×3, 90%, 80%, 70% EtOH) και τέλος σε απεσταγμένο νερό.

## 10. Χρώση

Η αιματοξυλίνη είναι μια βασική χρωστική που βάφει τα όξινα τμήματα του κυττάρου μπλε (βασοφιλία). Η αιματοξυλίνη βάφει κυρίως τους πυρήνες των κυττάρων και το δικτυοενδοπλασματικό δίκτυο του κυτταροπλάσματος. Η ηωσίνη είναι μια όξινη χρωστική που βάφει τα βασικά τμήματα του κυττάρου κόκκινο-ροζ χρώμα (οξυφιλία). Το κυτταρόπλασμα του κυττάρου και το νέο οστό βάφονται κόκκινα από την ηωσίνη. Τα δείγματα εμβαπτίζονται στην αιματοξυλίνη 10 φορές για 2 λεπτά τη φορά και στη συνέχεια σε αποστειρωμένο νερό 2 φορές για 1 λεπτό τη φορά σε ξεχωριστά δοχεία νερού την κάθε φορά, μέχρι το νερό να αποδειχθεί καθαρό. Στη συνέχεια τα δείγματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα 0.3% υδροξειδίου του αμμωνίου 10 φορές και ξεπλένονται με αποστειρωμένο νερό 2 φορές. Στο σημείο αυτό οι αντικειμενοφόρες πλάκες ελέγχονται για την χρώση της αιματοξυλίνης και, αν είναι απαραίτητο, η χρώση επαναλαμβάνεται. Ακολούθως τα δείγματα εμβαπτίζονται διαδοχικά σε 50%, 75%, 95%, 100%, 100% EtOH και στη συνέχεια στην ηωσίνη 3 φορές έως ότου τα δείγματα βαφτούν κόκκινα. Ακολουθεί εμβάπτιση σε 100%, και 100% EtOH και xylene 2 φορές για 1 λεπτό τη φορά. Στο τέλος προστίθεται μέσο σταθεροποίησης (permount) (cytoseal 60 Richard-Allan Scientific) και τα δείγματα σκεπάζονται με το γυάλινο κάλυμμα για την μικροσκόπηση.

## 11. Αξιολόγηση Ιστολογικών Παρασκευασμάτων

Η αξιολόγηση της οστεογένεσης έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές. Κάθε ένας από αυτούς εξέτασε 2 αντιπροσωπευτικές τομές από το κάθε δείγμα ( $2 \times 16 = 32$  δείγματα συνολικά). Η επιλογή των αντιπροσωπευτικών τομών έγινε με κριτήριο την οστεογένεση. Από κάθε δείγμα επιλέχθηκαν οι τομές με το περισσότερο νεοσχηματισμένο οστό ( $2$  αντιπροσωπευτικές τομές  $\times 32$  δείγματα =  $64$  αντικειμενοφόρες πλάκες για τον κάθε παρατηρητή). Ο κάθε κριτής βαθμολόγησε τα δύο δείγματα και ο μέσος όρος των τεσσάρων βαθμολογιών αποτέλεσε τον τελικό βαθμό του δείγματος. Η

βαθμολόγηση έγινε με βάση την κλίμακα οστεομορφογένεσης που αναπτύχθηκε από τους Salkeld et al (2001) (πίνακας 6).

<b>Γενική Αξιολόγηση</b>	<b>Ειδική Αξιολόγηση</b>	<b>Νέο οστό / Μόσχευμα</b>	<b>Βαθμός</b>
<b>Αλλομόσχευμα, λίγο νέο οστό</b>	Αλλομόσχευμα, καθόλου νέο οστό	0/100 = 0%	0
	Αλλομόσχευμα, ελάχιστο νέο οστό	20/100 = 20%	1
	Αλλομόσχευμα , λίγο νέο οστό	40/100 = 40%	2
<b>Νέο οστό, Λίγο αλλομόσχευμα</b>	Αλλομόσχευμα, αρκετό νέο οστό	60/100	3
	Αλλομόσχευμα, πολύ νέο οστό	80/100	4
	Αλλομόσχευμα, πολύ νέο οστό και μυελός των οστών	100/100	5

**Πίνακας 6.** Ιστολογική ταξινόμηση οστεογένεσης κατά Salkeld (Salkeld et al, 2001).

## 12. Στατιστική Αξιολόγηση

Συνολική συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αναφορικά με την οστεογένεση έγινε με τη μέθοδο one way ANOVA. Η ανάλυση των επιμέρους σχέσεων μεταξύ των διαφόρων αλλομοσχευμάτων (FFA, FFA+OP-1, DBM, DBM+OP-1) έγινε με τη δοκιμασία post-hoc Tuckey HSD και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του  $p \leq 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 11.0.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΜΕΛΕΤΗ Ι. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ

Το αναλυτικό Διάγραμμα (σελ. 46) παρουσιάζει τους ασθενείς, τη θεραπεία και τα αποτελέσματα.

Ογδόντα-πέντε (85) κατάγματα τελικά πωρώθηκαν (80.2%), αφήνοντας 21 μη πωρωμένα (19.8%) σε όλες τις ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, 75 από τα 89 (84.26%) κατάγματα, που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος πωρώθηκαν, ενώ μόνο 10 από τα 17 (58.82%) που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος πωρώθηκαν. Πιο αναλυτικά 66 από τα 75 (88%) κατάγματα που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος και την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος πωρώθηκαν, ενώ μόνο 8 από τα 14 (57.14%) κατάγματα που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος και την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος πωρώθηκαν.

	Πώρωση		Πηλίκo Πιθανοτήτων (95% CI)	Επίπεδο Στατιστικής Σημαντικότητας p (p value)
	Ναι [N (%)]	Όχι [N (%)]		
<b>Μήκος Στελέχους</b>				
Μακρό	75 (88)	14 (67)	3.75 (1.21 – 11.6)	0.022
Βραχύ	10 (12)	7 (33)		
Σύνολο	85 (100)	21 (100)		
<b>Πακτωμένο Αλλομόσχευμα</b>				
Με	74 (87)	14 (71)	2.69 (0.86 – 8.45)	0.090
Χωρίς	10 (13)	6 (29)		
Σύνολο	85 (100)	21 (100)		
<b>Μακρό Στέλεχος με πακτωμένο αλλομόσχευμα</b>	66 (88)	9 (64)	4.07 (1.10 – 15.0)	0.035
<b>Μακρό Στέλεχος χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα</b>	9 (12)	5 (36)		
Σύνολο	75 (100)	14 (100)		
<b>Μακρό Στέλεχος με πακτωμένο αλλομόσχευμα</b>	66 (89)	7 (60)	5.5 (1.54 – 19.6)	0.009
<b>Βραχύ Στέλεχος με πακτωμένο αλλομόσχευμα</b>	7 (11)	5 (40)		
Σύνολο	74 (100)	15 (100)		

**Πίνακας 7.** Η σχέση μεταξύ της πώρωσης, του μήκους του στελέχους και της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος.

Ο πίνακας 7 παρουσιάζει τα απόλυτα αποτελέσματα αλλά και τα ποσοστά πώρωσης σε κάθε υποομάδα καθώς και την πιθανότητα (odds ratio) πώρωσης, όταν συγκριθούν μεταξύ τους οι ομάδες με βραχύ και μακρύ στέλεχος, με πακτωμένο αλλομόσχευμα ή χωρίς. Τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος βρέθηκε ότι έχουν σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να πωρωθούν από τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος (ratio=3.75, 95% CI: 1.21-11.6, p=0.022) (εικόνες 16α, 16β, 16γ, 16δ).



**Εικόνα 16α.** Κάταγμα Vancouver B2



**Εικόνα 16β.** Αναθεώρηση και πλάκα Dall-Miles

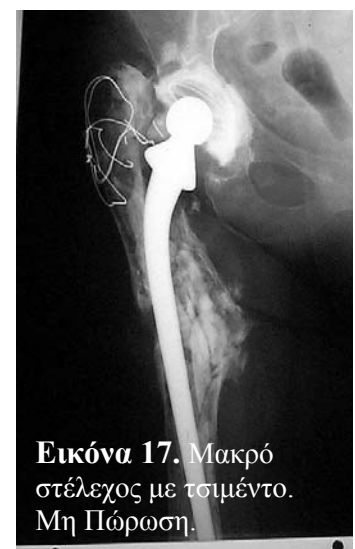


**Εικόνα 16γ.** Αποτυχία του βραχέος στελέχους



**Εικόνα 16δ.** Αναθεώρηση με μακρύ στέλεχος και φλοιώδες αλλομόσχευμα

Επίσης τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα πώρωσης από αυτά με μακρύ στέλεχος αλλά χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα (odds ratio=4.07, 95%CI: 1.10-15.0, p=0.035) (εικόνες 17, 18α και 18β). Τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα είχαν 5.5 φορές μικρότερη πιθανότητα πώρωσης από αυτά που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα (odds ratio=5.5, 95%CI: 1.54-19.6, p=0.009) (εικόνες 19α, 19β, 19γ, 19δ). Επιπρόσθετα, υπήρξε μια ισχυρή ένδειξη ότι τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με πακτωμένο αλλομόσχευμα πωρώθηκαν καλύτερα από αυτά που θεραπεύτηκαν μόνο με τσιμέντο και

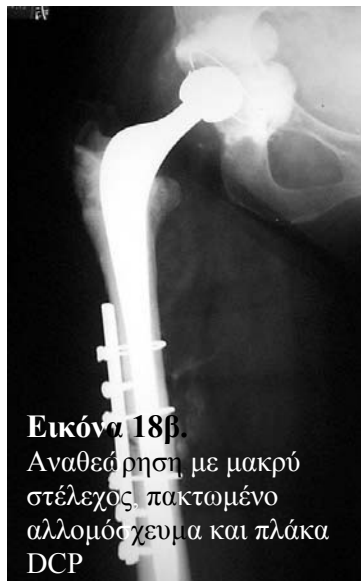


**Εικόνα 17.** Μακρό στέλεχος με τσιμέντο. Μη Πώρωση.

χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να φτάσει τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (odds ratio=2.69, 95%CI: 0.86-8.45, p=0.090) (εικόνες 20α, 20β, 20γ).



**Εικόνα 18α.** Κάταγμα Vancouver B2



**Εικόνα 18β.**  
Αναθεώρηση με μακρύ  
στέλεχος, πακτωμένο  
αλλομόσχευμα και πλάκα  
DCP



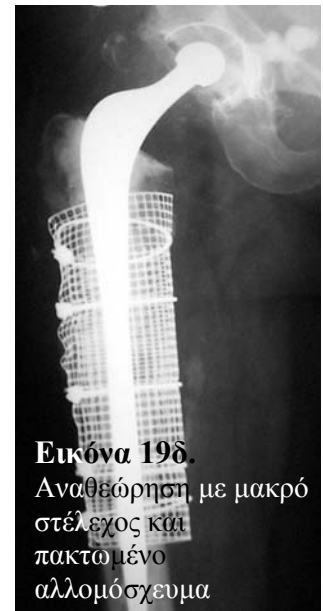
**Εικόνα 19α.**  
Κάταγμα τύπου B3



**Εικόνα 19β.**  
Αναθεώρηση με  
βραχύ στέλεχος και  
πακτωμένο  
αλλομόσχευμα



**Εικόνα 19γ.** Αποτυχία  
της αναθεώρησης



**Εικόνα 19δ.**  
Αναθεώρηση με μακρό  
στέλεχος και  
πακτωμένο  
αλλομόσχευμα

Μόνο 3 ασθενείς από το σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος με τσιμέντο και χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα. Σε έναν από αυτούς τους ασθενείς το κάταγμα απέτυχε να παρωθεί (εικόνες 16α, 16β). Συμπληρωματική οστεοσύνθεση επιτεύχθηκε με τη χρήση φλοιωδών



μοσχευμάτων, πλακών δυναμικής συμπίεσης (DCP) και πλακών τύπου Dall/Miles. Ο πίνακας 8α παρουσιάζει τη χρήση των φλοιωδών μοσχευμάτων κατά ομάδα ασθενών.



**Εικόνα 20α.** Διεγχειρητικά περιπροσθητικά κατάγματα κατά τη διάρκεια της αναθεώρησης



**Εικόνα 20γ.** Δώδεκα μήνες μετά, ενσωμάτωση του πακτωμένου και του φλοιώδους αλλομόσχευματος



**Εικόνα 20β.** Αναθεώρηση με βραχύ στέλεχος, πακτωμένο αλλομόσχευμα και φλοιώδες αλλομόσχευμα αμφίπλευρα

Μια ή δύο πλάκες φλοιώδους μοσχεύματος χρησιμοποιήθηκαν στο πρόσθιο και/ή στο πλάγιο τμήμα του μηριαίου. Τα ακτινολογικά αποτελέσματα σε σχέση με τη χρήση μίας ή δύο πλακών φλοιώδους μοσχεύματος παρουσιάζονται στον πίνακα 8β.

	<b>Βραχύ + ΠΑ</b>	<b>Βραχύ - ΠΑ</b>	<b>Μακρό + ΠΑ</b>	<b>Μακρό - ΠΑ</b>
<b>Με ΦΑ</b>	1	1	9	0
<b>Χωρίς ΦΑ</b>	13	2	66	14
<b>Σύνολο</b>	14	3	75	14

**Πίνακας 8α.** Συμπληρωματική οστεοσύνθεση με φλοιώδες αλλομόσχευμα (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΦΑ: φλοιώδες αλλομόσχευμα)

	1 ΦΑ	2 ΦΑ	Σύνολο
<b>Βραχύ – ΠΑ + ΦΑ</b>	1(ΜΠ)	0	1
<b>Μακρό + ΠΑ + ΦΑ</b>	6(Π)	3(Π)	9
<b>Βραχύ + ΠΑ + ΦΑ</b>	0	1(Π)	1

**Πίνακας 8β.** Αριθμός φλοιωδών αλλομοσχευμάτων (ΦΑ) και πόρωση (Π: πόρωση, ΜΠ: μη πόρωση, + ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα)

Σε ένα από τα 11 κατάγματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε πλάκα φλοιώδους αλλομοσχεύματος, το κάταγμα τελικώς απέτυχε να πωρωθεί. Αυτή ήταν μια περίπτωση όπου ένα βραχύ στέλεχος χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα και με ένα μόνο φλοιώδες αλλομόσχευμα χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του κατάγματος. Πέραν των φλοιωδών αλλομοσχευμάτων εξωμυελική σταθερότητα επιτεύχθηκε επίσης μέσω πλακών DCP και Dall/Miles (πίνακας 9).

	Βραχύ + ΠΑ	Βραχύ - ΠΑ	Μακρό + ΠΑ	Μακρό - ΠΑ	Σύνολο
<b>DCP</b>	4 (Π = 2, ΜΠ = 2)	0	7 (Π = 7)	1 (Π = 1)	12
<b>D/M</b>	3 (Π = 2, ΜΠ = 1)	0	6 (Π = 6)	0	9
<b>Σύνολο</b>	7	0	13	1	21

**Πίνακας 9.** Συμπληρωματική οστεοσύνθεση με πλάκες Dynamic Compression Plates (DCP) και Dall-Miles (DM) (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΦΑ: φλοιώδες αλλομόσχευμα)

Σε 2 από τις 12 περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε πλάκα DCP το κάταγμα απέτυχε να πωρωθεί (εικόνα 19γ). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις η αναθεώρηση έγινε με βραχύ στέλεχος και πιο συγκεκριμένα στη μια περίπτωση με πακτωμένο αλλομόσχευμα και στην άλλη χωρίς. Τέλος, από τις 9 περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε πλάκα τύπου Dall/Miles, στη μία το κάταγμα απέτυχε να πωρωθεί. Σ' αυτήν την περίπτωση η αναθεώρηση έγινε με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα (εικόνα 16γ). Ο μέσος χρόνος πόρωσης για όλα τα κατάγματα που τελικά πωρώθηκαν ήταν 7.44 μήνες (εύρος 3-12). Η ταξινόμηση της λειτουργικότητας του ισχίου κατά Harris (Harris Hip Score) μετρήθηκε σε 66 (62.26%) από τους 106 ασθενείς κατά την τελική αξιολόγηση της πόρωσης

στους 12 μήνες. Όλοι αυτοί οι 66 ασθενείς κατέληξαν σε επιτυχημένη πόρωση του κατάγματος. Ο μέσος όρος της ταξινόμησης κατά Harris για όλα τα κατάγματα που πωρώθηκαν ήταν 81 (εύρος 55-91). 21 (19.8%) κατάγματα δεν πωρώθηκαν. Δεκατέσσερα (14) από αυτά τα κατάγματα ανήκαν στην κατηγορία όπου η πρόθεση είχε αναθεωρηθεί με μακρό στέλεχος (9 με πακτωμένο αλλομόσχευμα και 5 χωρίς). Τα υπόλοιπα 7 κατάγματα είχαν αναθεωρηθεί με βραχύ στέλεχος (6 με πακτωμένο αλλομόσχευμα και 1 χωρίς). Συνολικά 4 (3.7%) από τα κατάγματα που δεν πωρώθηκαν κατέληξαν σε σήψη (2 με μακρύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα και 2 με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα) (πίνακας 10).

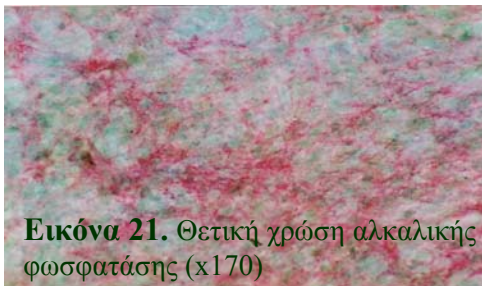
<b>Επιπλοκή</b>	<b>Βραχύ + ΠΑ</b>	<b>Βραχύ - ΠΑ</b>	<b>Μακρό + ΠΑ</b>	<b>Μακρό - ΠΑ</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>Μόλυνση</b>	2	0	2	0	4
<b>ΜΠ</b>	4	1	7	5	5
<b>Σύνολο</b>	6	1	9	5	21

**Πίνακας 10.** Επιπλοκές (+ ΠΑ: με πακτωμένο αλλομόσχευμα, - ΠΑ: χωρίς πακτωμένο αλλομόσχευμα, ΜΠ: μη πόρωση)

**ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ**

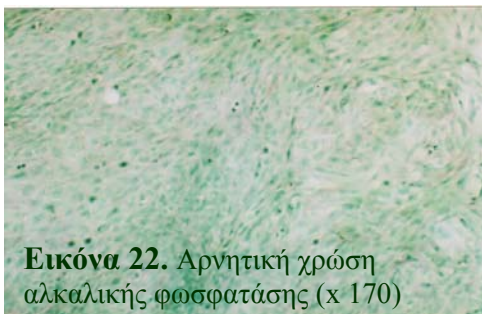
**1. Χαρακτηρισμός των MSCs**

Τα MSCs χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια ιστολογικής χρώσης για την ALP όπως φαίνεται στις εικόνες 21 και 22. Οι περιοχές πορφυρού χρώματος στην εικόνα 21 αποτελούν περιοχές θετικά



χρωματισμένες με την χρώση της αλκαλικής φωσφατάσης στις καλλιέργειες όπου προστέθηκε οστεογενετικό μέσο. Αυτό καταδεικνύει ότι τα κύτταρα υπό την επιρροή εξωγενών παραγόντων έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε

οστεοβλάστες και, ως εκ τούτου, να παράγουν και να εκλύουν στον εξωκυττάριο χώρο αλκαλική φωσφατάση. Αντίθετα στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το κλασικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας χωρίς τους οστεογενετικούς παράγοντες δεν παρατηρήθηκε χρώση της αλκαλικής



φωσφατάσης, για τα ίδια κύτταρα εικόνα 22. Στη δεύτερη αυτή περίπτωση τα κύτταρα παρέμειναν αδιαφοροποίητα

μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (MSCs). Τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των

οστών, χρησιμοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος

πάντοτε με το κλασικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας (DMEM+10%FBS+1%PBS). Συνεπώς, καθώς τα κύτταρα αυτά δεν διέθεταν τη δυνατότητα φαινοτυπικής διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες (εικόνα

21), κάθε διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στα επόμενα πειράματα, αποδόθηκε στους παράγοντες που τροποποιήθηκαν στη διάρκεια των πειραμάτων, δηλαδή το οστικό αλλομόσχευμα (DBM, ICBM)

και στο OP-1.

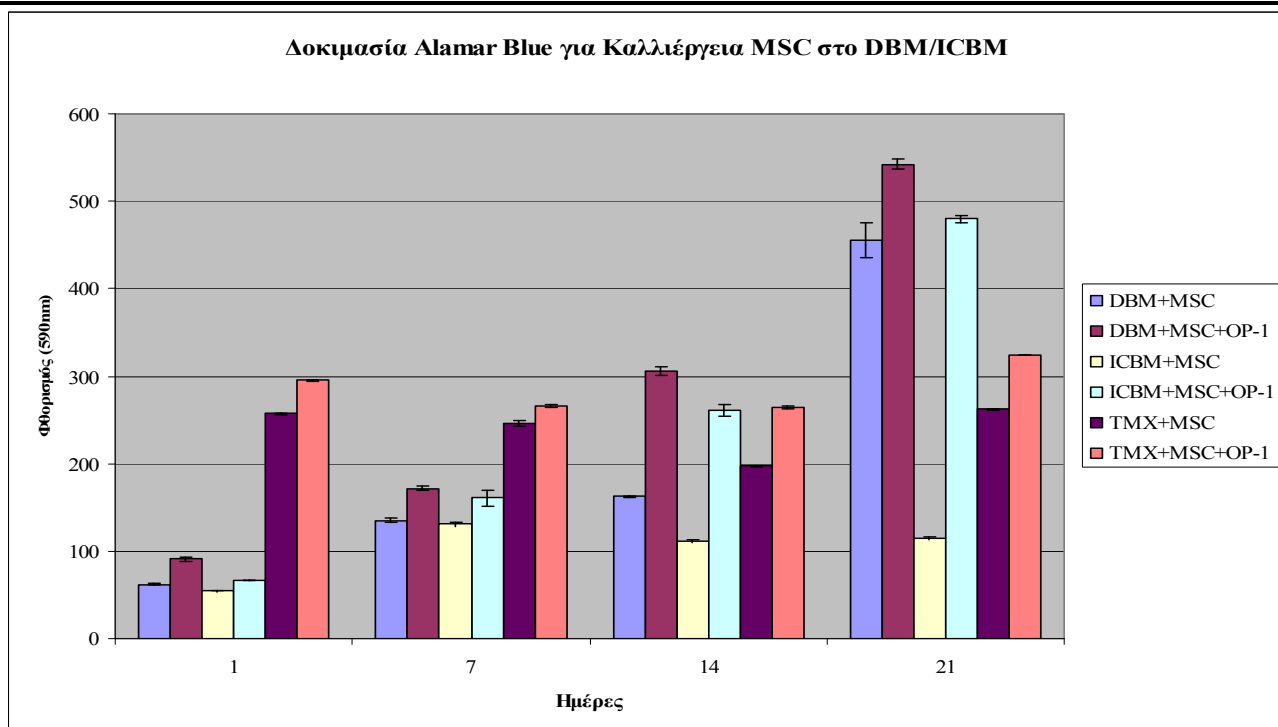
## 2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

### *Δοκιμασία Alamar Blue για την καλλιέργεια των MSCs στο DBM και στο ICBM*

Η ποσοτική αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε με τη δοκιμασία του Alamar Blue (εικόνα 23) και τη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  (εικόνα 24). Η δοκιμασία του Alamar Blue έδειξε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα δύο οστικά υποστρώματα DBM και ICBM με άλλα και χωρίς τη προσθήκη OP-1. Το πλαστικό υλικό TMX χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα ελέγχου. Την ημέρα 1 η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν σχετικά μικρή και για τα δύο οστικά μοσχεύματα DBM (μέσος φθορισμός 61.74nm) και ICBM (μέσος φθορισμός 54.028nm), ωστόσο η προσθήκη του OP-1 προκάλεσε στατιστικά σημαντική υπεροχή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο DBM [ $p < 0.01$ , 95%CI: -34.5-(-23.2)] και στο ICBM [ $p < 0.01$ , 95%CI: -13.55-(-11.17)] σε σχέση με τα μη ενισχυμένα δείγματα. Η διαφορά αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική την ημέρα 7 για το DBM [ $p < 0.01$ , 95%CI: -48.3 -(-25.9)], και το ICBM [ $p = 0.024$ , 95% CI: -55.67 -(-4.32)], την ημέρα 14 για το DBM [ $p < 0.01$ , 95% CI: -153.2 -(-134.1)] και το ICBM [ $p < 0.01$ , 95%CI: -165.5 -(-133.9)], και την ημέρα 21 για το DBM [ $p < 0.01$ , 95% CI: -126.7-(-48.2)] και το ICBM [ $p < 0.01$ , 95%CI: -374.9- (-354.2)]. Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι, ενώ ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ακολούθησε σαφώς ανοδική πορεία στα δείγματα του DBM και ICBM που ήταν ενισχυμένα με το OP-1, με ανιούσα μέση απορρόφηση (90.6, 171.9, 306.3, 542.43) για το DBM και (66.4, 160.6, 260.9, 480.2) για το ICBM, στα 590 nm, ο πολλαπλασιασμός επιβραδύνθηκε στα δείγματα χωρίς OP-1. Αυτό ήταν λιγότερο εμφανές για το DBM όπου η μέση τιμή φθορισμού ακολούθησε ανιούσα πορεία μεταξύ 162.62nm και 454.95nm από τη 14<sup>η</sup> έως την 21<sup>η</sup> ημέρα, ωστόσο στατιστικά σημαντικά υπολειπόμενη του DBM+OP-1 των αντίστοιχων ημερών. Αντίθετα για το ICBM ο φθορισμός έφτασε σε ένα plateau μεταξύ 111.24nm και 115.43nm μεταξύ των ημερών 7 και 14. Η διαφορά στο βαθμό της επιβράδυνσης, μεταξύ του DBM και του ICBM οφείλεται στην εγγενή οστεοεπαγωγική ικανότητα του DBM. Το DBM διατηρεί την ικανότητα προαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι την 21<sup>η</sup> μέρα, ενώ

το ICBM σαφώς υπολείπεται και διατηρεί την σταθερή αλλά όχι επαυξανόμενη ικανότητα της οστεοαγωγιμότητας. Όπως παρατηρούμε στο ιστόγραμμα της εικόνας 23, η προσθήκη του OP-1 ανέτρεψε την αναμενόμενη καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού προς όφελος της διαφοροποίησης (η σχέση πολλαπλασιασμού διαφοροποίησης των κυττάρων θα συζητηθεί πιο κάτω μετά την συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης), όπως συμβαίνει στα μη ενισχυμένα με OP-1 δείγματα. Η ανατροπή του φυσιολογικού αυτού φαινομένου έχει ιδιαίτερη θεραπευτική αξία δεδομένου ότι μπορεί να επιταχύνει την οστεογένεση. Παρόλ' αυτά η νεοπλασματική δράση του OP-1 είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί. Επιμέρους αναλυτικά δεδομένα και λεπτομερής στατιστική ανάλυση για τη δοκιμασία Alamar Blue στο παράρτημα.

	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 14	Ημέρα 21
<b>DBM</b>	61.73	134.7	162.62	454.95
<b>DBM + OP-1</b>	90.58	171.98	306.27	542.49
<b>ICBM</b>	54.03	130.62	111.24	115.43
<b>ICBM + OP-1</b>	66.39	160.52	260.95	480.1



**Εικόνα 23.** Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία Alamar Blue. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές φθορισμού την 14<sup>η</sup> και 21<sup>η</sup> ημέρα.

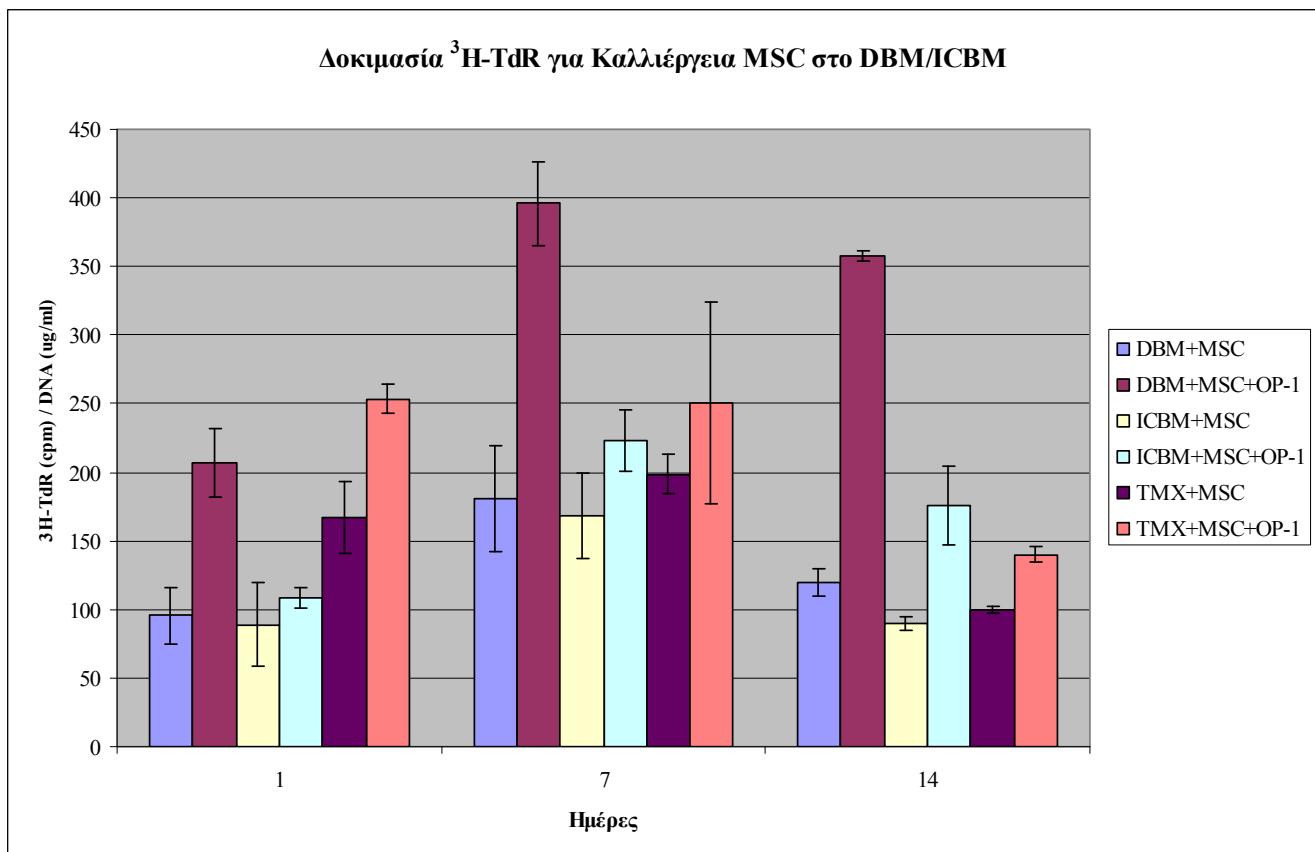
### *Δοκιμασία $^3\text{H-TdR}$ για την καλλιέργεια MSC στο DBM και στο ICBM*

Η δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  επιβεβαίωσε την πιο πάνω παρατήρηση. Σε όλα τα χρονικά σημεία τα ενισχυμένα με OP-1 δείγματα παρουσίασαν μεγαλύτερη απορρόφηση ραδιοσημασμένης θυμιδίνης σε σχέση με τα μη ενισχυμένα δείγματα. Χαρακτηριστικά για το DBM στατιστικά σημαντική διάφορα βρέθηκε σε όλα τα χρονικά σημεία με έξαρση την ημέρα 7 [DBM/DBM+OP-1: ημέρα 1:  $p=0.025$ , 95%CI: -189.89 -(-33.56), ημέρα 7:  $p=0.01$ , 95%CI: -272.56 -(-158.33), ημέρα 14:  $p<0.001$ , 95% CI: -279.29 -(-196.91)]. Διαφορά παρατηρήθηκε και για τα δείγματα του ICBM (ICBM/ICBM+OP-1: ημέρα 1:  $p=0.5$ , ημέρα 7:  $p=0.3$ , ημέρα 14:  $p=0.07$ ) χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ενισχυμένων και μη δειγμάτων. Εδώ επίσης επιβεβαιώνεται ξανά και μάλιστα πιο εμφατικά, η παρατήρηση της επιβράδυνσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων προς όφελος της διαφοροποίησής τους, όπως θα δούμε με τα αποτελέσματα της αλκαλικής φωσφατάσης πιο κάτω, για τα μη ενισχυμένα με OP-1 δείγματα του DBM και του ICBM και μάλιστα με κατιούσα πορεία από την ημέρα 7 προς την ημέρα 14 [μέση τιμή ακτινοβολίας διαδοχικά για τις ημέρες 1,7,14 για το DBM: 95.4, 180.6, 119.95 και μέση τιμή ακτινοβολίας διαδοχικά για τις ημέρες 1,7,14 για το ICBM: 89.03, 168.53, 88.61]. Εδώ, σε ελαφρά αντίθεση με τη δοκιμασία του Alamar Blue τα ενισχυμένα με OP-1 δείγματα διατήρησαν τις υψηλές τιμές απορρόφησης ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, αλλά παρουσίασαν μια ήπια πτωτική τάση επίσης, από την ημέρα 7 προς τη ημέρα 14, η οποία ήταν σαφώς μικρότερη στο DBM+OP-1, προφανώς προς όφελος της επερχόμενης διαφοροποίησης προς τον οστεοβλαστικό φαινότυπο [μέση τιμή ακτινοβολίας διαδοχικά για τις ημέρες 1, 7, 14 του DBM+OP-1: 207.09, 396.02, 358.055]. Για το ICBM+OP-1 παρατηρήθηκε η ίδια τάση αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα απορρόφησης ραδιοσημασμένης θυμιδίνης [μέση τιμή ακτινοβολίας διαδοχικά για τις ημέρες 1,7,14 του ICBM+OP-1: 108.75, 222.99, 175.41]. Η ερμηνεία αυτής της διαφοράς έγκειται στην έλλειψη εγγενούς οστεοεπαγωγικής ικανότητας του πλήρως αποασβεστοποιημένου αλλομοσχεύματος (ICBM) σε σχέση με το μερικώς αποασβεστοποιημένο DBM, που διατηρεί τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια του

κολλαγονικού του σκελετού. Ωστόσο και στη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  η παρουσία του OP-1 ανέτρεψε την αναμενόμενη ελάττωση του πολλαπλασιασμού προς όφελος της διαφοροποίησης και διατήρησε την απορρόφηση του ραδιοσημασμένης θυμιδίνης σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα χρονικά σημεία.

Επιμέρους αναλυτικά δεδομένα και λεπτομερής στατιστική ανάλυση για τη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  στο παράρτημα. Η απορρόφηση της σεσημασμένης θυμιδίνης μετρήθηκε με την εκπομπή ακτινοβολίας σε  $\text{cpm}/\text{DNA } \mu\text{g}/\text{ml}$ .

	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 14
<b>DBM</b>	95.36	180.57	119.95
<b>DBM+OP-1</b>	207.09	396.02	358.055
<b>ICBM</b>	89.032	168.53	88.62
<b>ICBM+OP-1</b>	108.75	222.99	175.41



**Εικόνα 24.** Ιστόγραμμα: Δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$ . Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές ακτινοβολίας την 7<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα.



### 3. Κυτταρική διαφοροποίηση

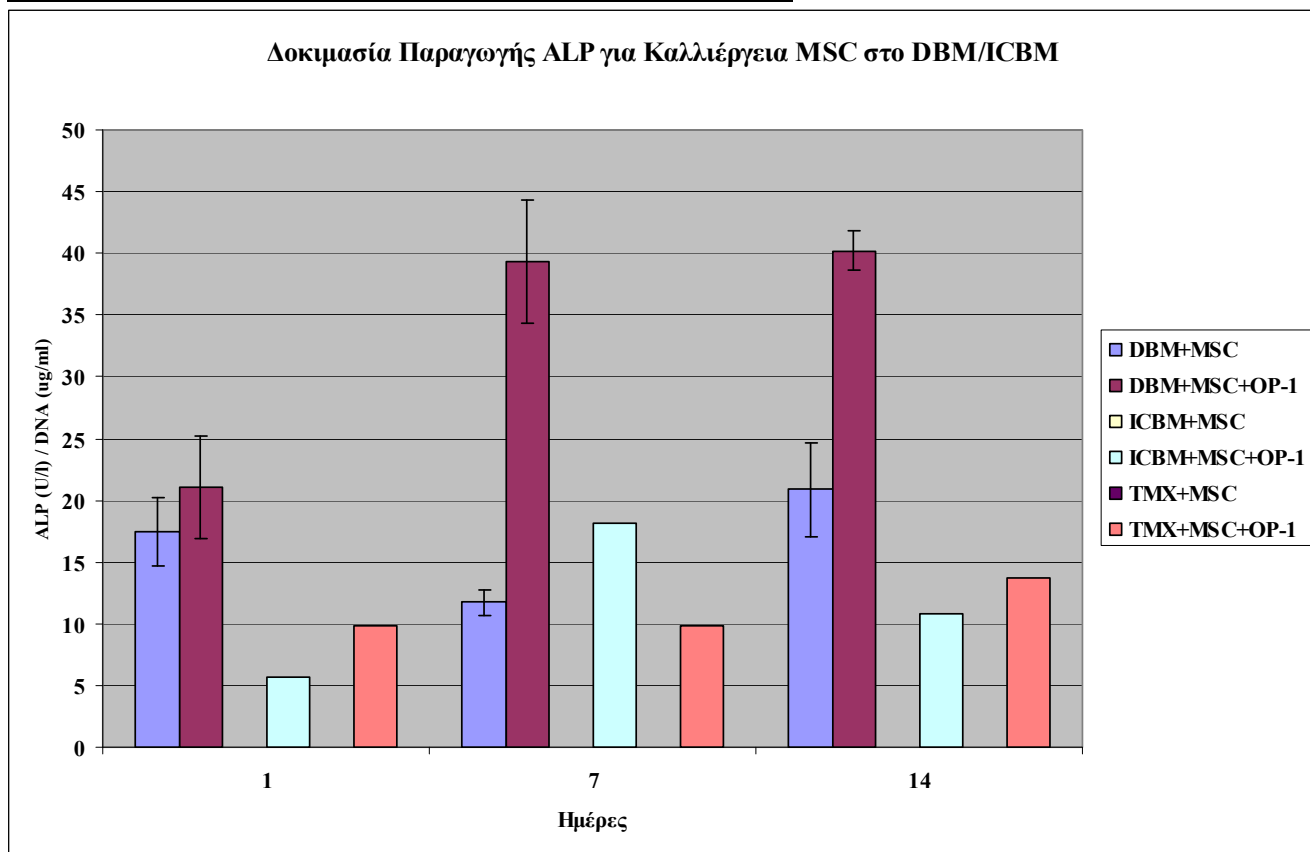
*Δοκιμασία παραγωγής αλκαλικής φωσφατάσης για την καλλιέργεια MSCs στο DBM και στο ICBM*

Η διαφοροποίηση των πρόωμων μεσεγχυματικών κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1 αξιολογήθηκε με την παραγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης. Η παραγωγή της ALP μετρήθηκε με τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης μετά τη λύση των κυττάρων. Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης μετρήθηκε σε U/L/ DNA  $\mu\text{g/ml}$ . Η παραγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης είναι μια αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη μέθοδος βιολογικής αξιολόγησης της οστεοβλαστικής φαινοτυπικής διαφοροποίησης. Την ημέρα 1, η διαφορά της δραστηριότητας της ALP μεταξύ ενισχυμένων με OP-1 και μη δειγμάτων για το DBM ήταν υπαρκτή αλλά όχι στατιστικά σημαντική ( $p=0.2$  95%CI: -13.16-5.9), ενώ τις επόμενες ημέρες στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των ενισχυμένων με OP-1 και μη δειγμάτων του DBM [DBM/DBM+OP-1: ημέρα 7  $p=0.018$  95%CI: -46.5 -(-8.8), και ημέρα 14  $p=0.03$  95%CI: -35.3 -(-3.3)]. Για το ICBM και το TMX διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ ενισχυμένων και μη με OP-1 δειγμάτων αλλά η στατιστική σημαντικότητα δεν υπολογίστηκε, λόγω της μηδενικής τιμής μέτρησης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, στα μη ενισχυμένα δείγματα, σε όλες τις χρονικές στιγμές. Αυτό συγχρόνως κατέδειξε και την πλήρη έλλειψη οστεοεπαγωγικής ικανότητας των ICBM και TMX όπως αναμενόταν. Συνολικά παρατηρήθηκε ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων προς τον οστεοβλαστικό φαινότυπο, πυροδοτήθηκε, από την παρουσία του OP-1 σε όλα τα δείγματα. Ιδιαίτερα στο DBM+OP-1 παρατηρήθηκε υψηλή παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης με υψηλότερη τιμή τη ημέρα 14 [μέση τιμή δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης στο DBM+OP-1: την ημέρα 1: 21.04 U/L/DNA την ημέρα 7: 39.37 U/L/DNA και την ημέρα 14: 40.23 U/L/DNA]. Το αυτό παρατηρήθηκε και στο ICBM+OP-1 αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα και με πτωτική τάση τη 14<sup>η</sup> ημέρα [μέση τιμή δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης στο ICBM+OP-1: την ημέρα 1: 5.68 U/L/DNA την ημέρα 7: 18.19 U/L/DNA και την ημέρα 14: 10.8 U/L/DNA].

Υποθέτουμε ότι και εδώ η ανοδική τάση των τιμών της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης

που παρατηρήθηκε στα δείγματα του DBM+OP-1 οφείλεται στην επαυξητική δράση του OP-1 ως προς τις εγγενείς οστεοεπαγωγικές ικανότητες του DBM, που οφείλονται στην παρουσία οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών πάνω στον κολλαγονικό του σκελετό. Αντίθετα το ICBM ακόμα και με την ενίσχυση του OP-1 δεν κατάφερε να διατηρήσει ισχυρή οστεοεπαγωγική ικανότητα από την 1<sup>η</sup> έως τη 14<sup>η</sup> ημέρα, με αποτέλεσμα την πτωτική τάση των τιμών της δραστηριότητας της ALP τη ημέρα 14. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι το ICBM+OP-1 υπολείπεται αισθητά του μη ενισχυμένου με OP-1 DBM τις ημέρες 1 και 14, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να φτάνει το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας.

	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 14
<b>DBM</b>	17.41	11.71	20.89
<b>DBM+OP-1</b>	21.04	39.37	40.23
<b>ICBM</b>	0	0	0
<b>ICBM+OP-1</b>	5.68	18.19	10.81



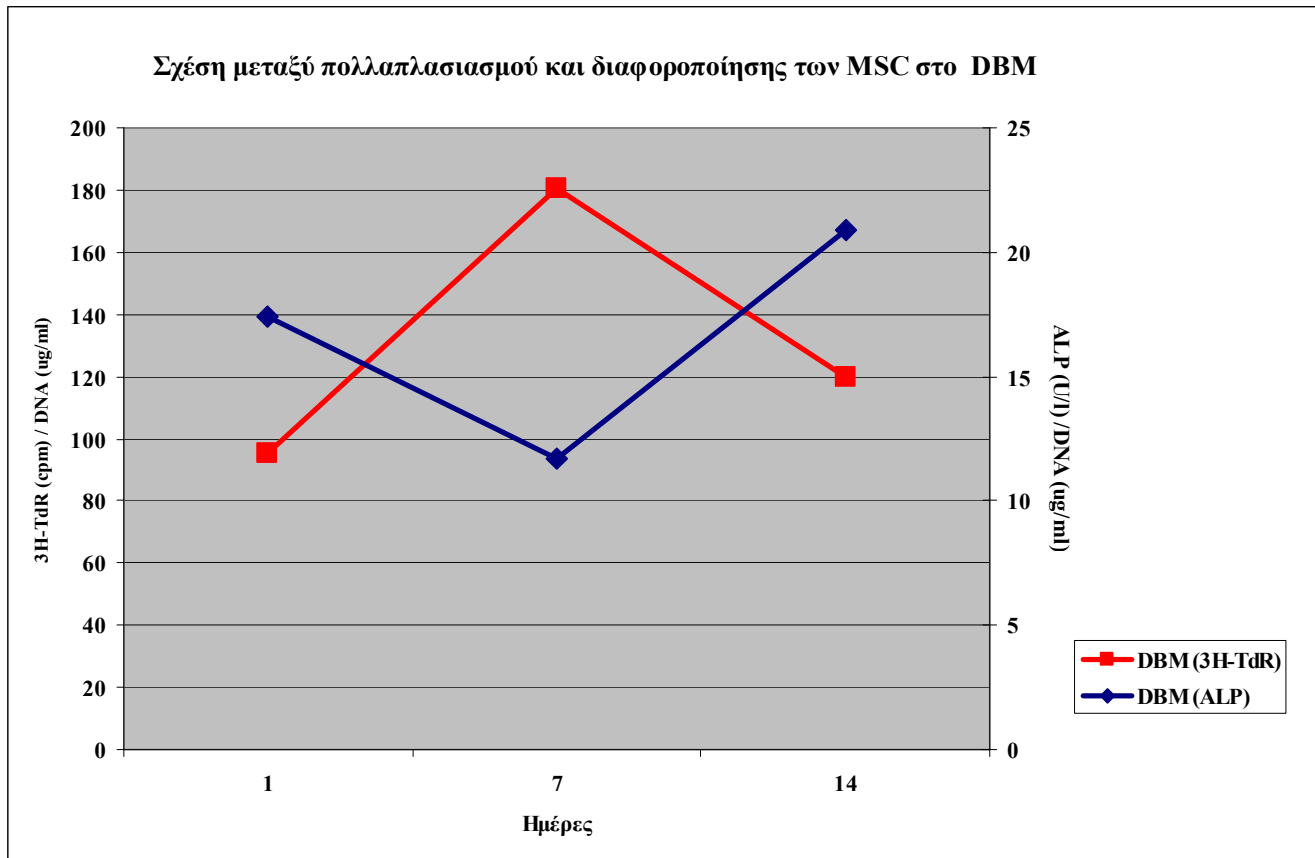
**Εικόνα 25.** Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία ALP. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας όλες τις ημέρες.

Το εύλογο συμπέρασμα είναι ότι η οστεοεπαγωγική δραστηριότητα οφείλεται σε ένα σύνολο αυξητικών παραγόντων και ίσως σε μια αλληλουχία γεγονότων, στην οποία λαμβάνουν μέρος διάφορες οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες. Έτσι το DBM διατηρώντας πλήθος διαφορετικών μορφογενετικών πρωτεϊνών στην επιφάνειά του, υπερτερεί του ICBM+OP-1 που ουσιαστικά διαθέτει μόνο την μορφογενετική πρωτεΐνη -7. Ωστόσο το OP-1 πυροδοτεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, όταν προστίθεται στο DBM, ενώ μόνο του το OP-1 έχει ασθενείς οστεοεπαγωγικές ικανότητες, όπως φαίνεται επίσης στο δείγμα ελέγχου TMX+OP-1. Επιμέρους αναλυτικά δεδομένα και λεπτομερής στατιστική ανάλυση για τη δοκιμασία παραγωγής ALP στο παράρτημα.

#### 4. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στο DBM

Ενδιαφέρουσα ήταν η αντιστρόφως ανάλογη σχέση που παρατηρήθηκε, μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, στα δείγματα του DBM. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η ανταπόκριση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων σε μια ισορροπημένη παρουσία αυξητικών παραγόντων, όπως αυτή στον κολλαγονικό σκελετό του μερικώς αποασβεστοποιημένου DBM, είναι η σταδιακή επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων προς όφελος της επιτάχυνσης της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Η γραφική παράσταση της εικόνας 26 αναπαριστά την διαπίστωση αυτή.

	Διαφοροποίηση στο DBM (ALP, U/L/DNA)	Πολλαπλασιασμός στο DBM ( <sup>3</sup> H-TdR, cpm/DNA)
<b>Ημέρα 1</b>	17.41	95.36
<b>Ημέρα 7</b>	11.71	180.57
<b>Ημέρα 14</b>	20.89	119.95



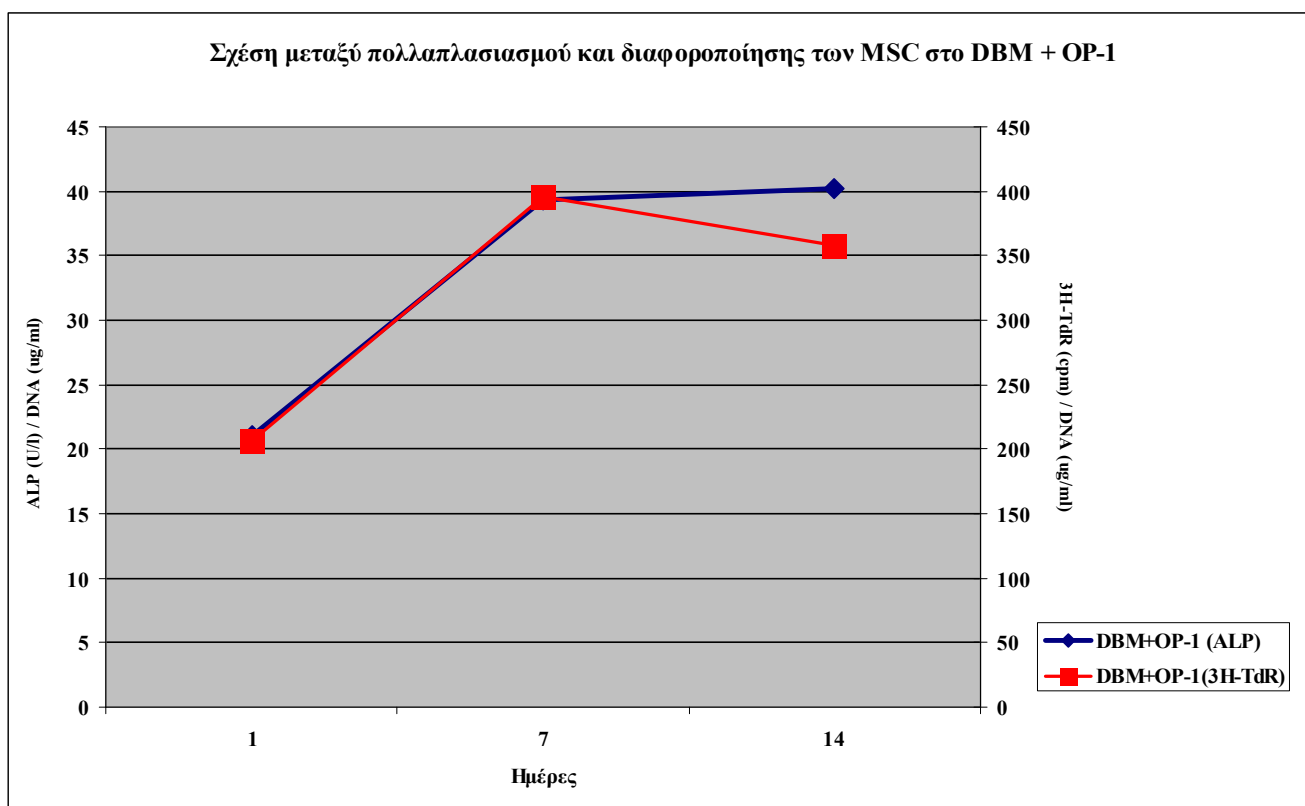
**Εικόνα 26.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων.

### 5. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSC στο DBM+OP-1

Σε σύγκριση με την πιο πάνω γραφική παράσταση η προσθήκη OP-1 στο DBM προάγει συγχρόνως και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Όχι μόνο αλλάζει η μορφολογία της γραφικής παράστασης με παράλληλη και ανοδική πορεία των δύο φαινομένων αλλά υπερδιπλασιάζονται και οι απόλυτες τιμές των δοκιμασιών της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης αλλά και της εκπομπής της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης. Αναμφίβολα η παρουσία του OP-1 έχει διττή δραστηριότητα. Προάγει ποσοτικά την οστεογένεση με την επαύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά, κυρίως, ενισχύει ποιοτικά την οστεοεπαγωγή και τη διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα αυξάνει τις απόλυτες τιμές των δοκιμασιών της διαφοροποίησης και του

πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αναμφίβολα υπάρχει σαφής αλληλεπίδραση μεταξύ των μορφογενετικών πρωτεϊνών της επιφάνειας του DBM, με το εξωγενές OP-1. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι δεν παρατηρείται η αυτή ποιοτική και ποσοτική αναβάθμιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού ταυτόχρονα στο ICBM, παρά το ότι και εδώ τα δύο φαινόμενα ακολουθούν παράλληλη (ανάλογη) και όχι αντιστρόφως ανάλογη πορεία, όπως αυτή που παρατηρείται στο DBM.

	Διαφοροποίηση στο DBM+OP-1 (ALP U/L/DNA)	Πολλαπλασιασμός στο DBM+OP-1 ( <sup>3</sup> H-TdR cpm/DNA)
Ημέρα 1	21.036	207.09
Ημέρα 7	39.37	396.022
Ημέρα 14	40.23	358.055

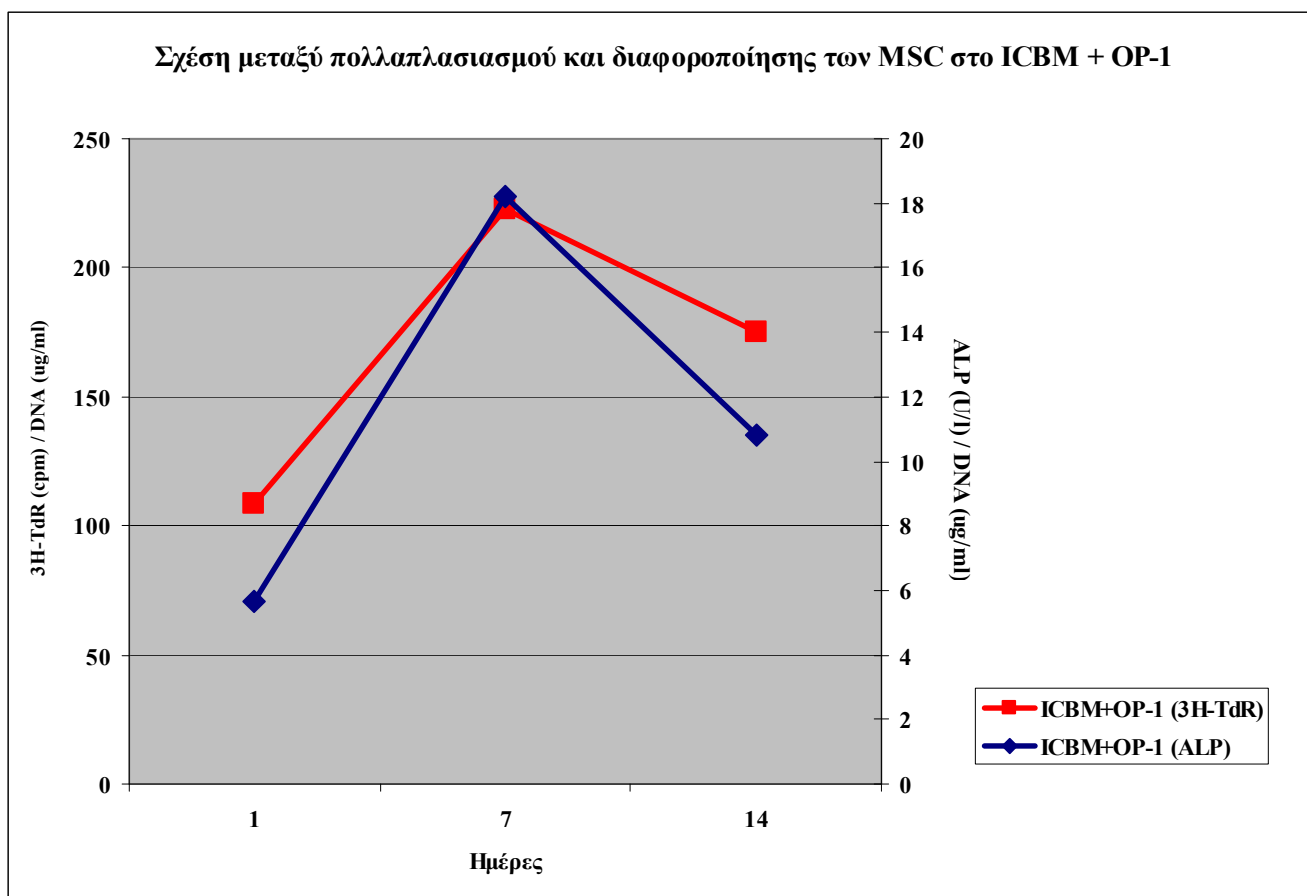


**Εικόνα 27.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη άνοδος πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1.

## 6. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSC στο ICBM+OP-1

Αναμφίβολα η διαφοροποίηση αλλά και ο πολλαπλασιασμός ακολούθησαν παράλληλη (ανάλογη) αυξητική πορεία με την προσθήκη του OP-1 στο ICBM. Τα επίπεδα ωστόσο των απόλυτων τιμών και για τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης αλλά και για την ακτινοβολία από την απορρόφηση της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης δεν ανέβηκαν στο ύψος των αντιστοιχών τιμών που παρατηρήθηκαν στα δείγματα του DBM+OP-1. Αντίθετα οι απόλυτες τιμές των δοκιμασιών κυμάνθηκαν στα επίπεδα των αντίστοιχων τιμών για το DBM χωρίς OP-1(εικόνα 26). Είναι αξιοσημείωτο ότι και οι δύο κυτταρικές δραστηριότητες επαυξήθηκαν με κορύφωση την 7<sup>η</sup> ημέρα ενώ στη συνέχεια παρουσίασαν καθοδική πορεία. Αναμφίβολα η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει την διεγερτική δράση του OP-1 στο ICBM. Ωστόσο καταδεικνύει και την αδυναμία του OP-1 να διατηρήσει την οστεοεπαγωγική ικανότητα του αλλομοσχεύματος καθώς αυτό υπολείπεται άλλων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνειά του, όπως αυτοί που παρατηρούνται στο DBM. Επανερχόμενοι λοιπόν στην γραφική παράσταση που αναπαριστά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση στο DBM+OP-1 (εικόνα 27), διαπιστώνουμε την πολυσυλλεκτικότητα της οστεομορφογένεσης και την συμπληρωματικότητα διαφόρων αυξητικών παραγόντων και μορφογενετικών πρωτεϊνών στην τελική οστεογένεση, παρά την επιμέρους δράση κάθε ενός από αυτούς στον πολλαπλασιασμό ή στη διαφοροποίηση των πρώιμων οστεογενετικών κυττάρων.

	Διαφοροποίηση στο ICBM+OP-1 (ALP U/L/DNA)	Πολλαπλασιασμός στο ICBM+OP-1 ( <sup>3</sup> H-TdR cpm/DNA)
Ημέρα 1	5.68	108.752
Ημέρα 7	18.19	222.99
Ημέρα 14	10.81	175.41



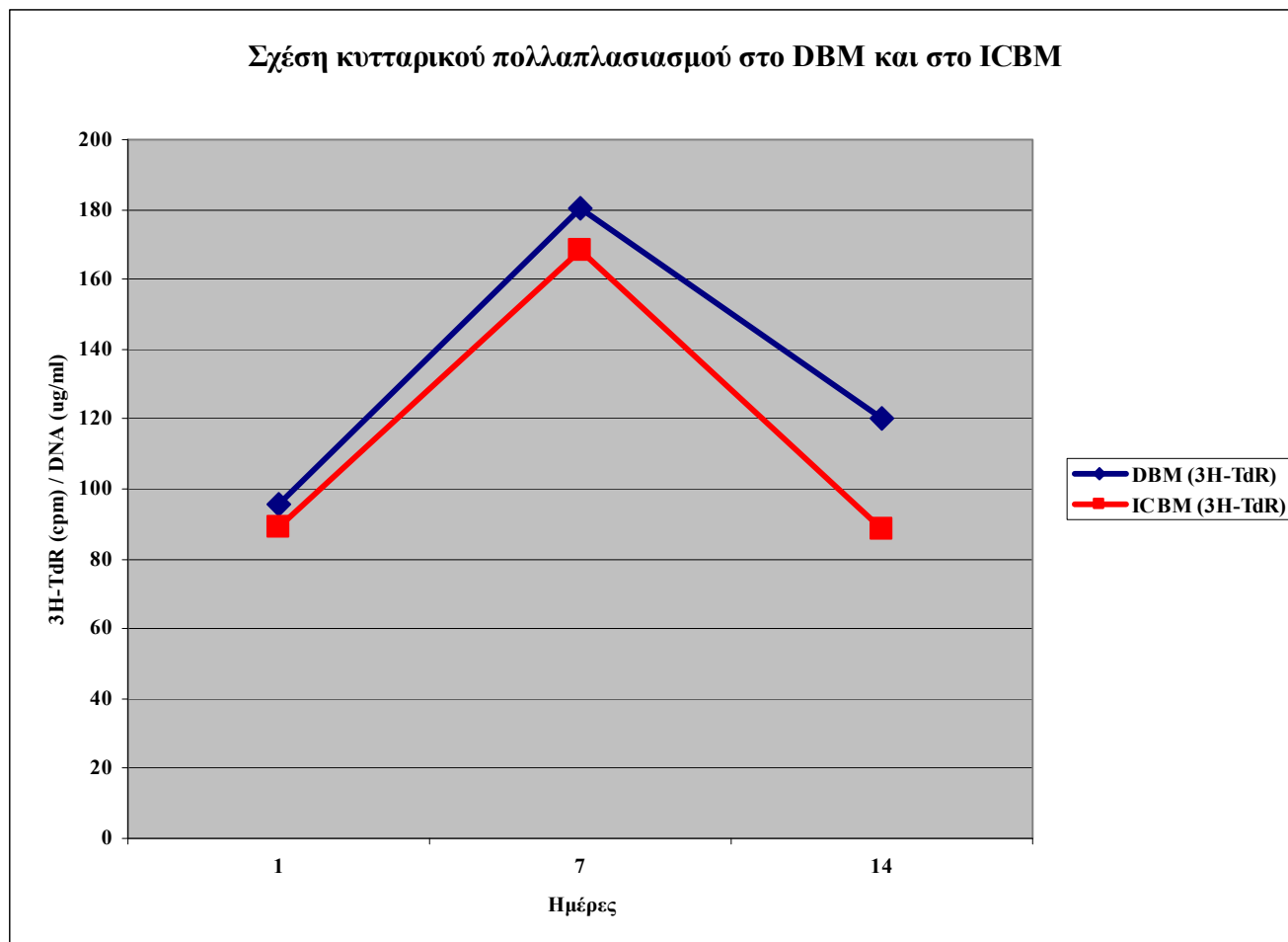
**Εικόνα 28.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη πορεία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1.

### 7. Σχέση κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MSCs μεταξύ του DBM και του ICBM

Η γραφική παράσταση που ακολουθεί καταδεικνύει την επάρκεια και των δύο μοσχευμάτων ως προς το να φιλοξενούν τα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα και να προάγουν τον πολλαπλασιασμό τους με αντίστοιχο ρυθμό. Αναμφίβολα το DBM δίνει υψηλότερες τιμές σε σχέση με το ICBM, πράγμα που αποδίδεται στις μορφογενετικές πρωτεΐνες που διαθέτει, όπως εκτενώς αναπτύχθηκε πιο πάνω.

Παρόλ' αυτά είναι αξιοσημείωτο ότι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο αλλομοσχευμάτων δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε κανένα χρονικό σημείο.

	Πολλαπλασιασμός στο DBM ( <sup>3</sup> H-TdR cpm/DNA)	Πολλαπλασιασμός στο ICBM ( <sup>3</sup> H-TdR cpm/DNA)
Ημέρα 1	95.363	89.032
Ημέρα 7	180.570	168.53
Ημέρα 14	119.950	88.62



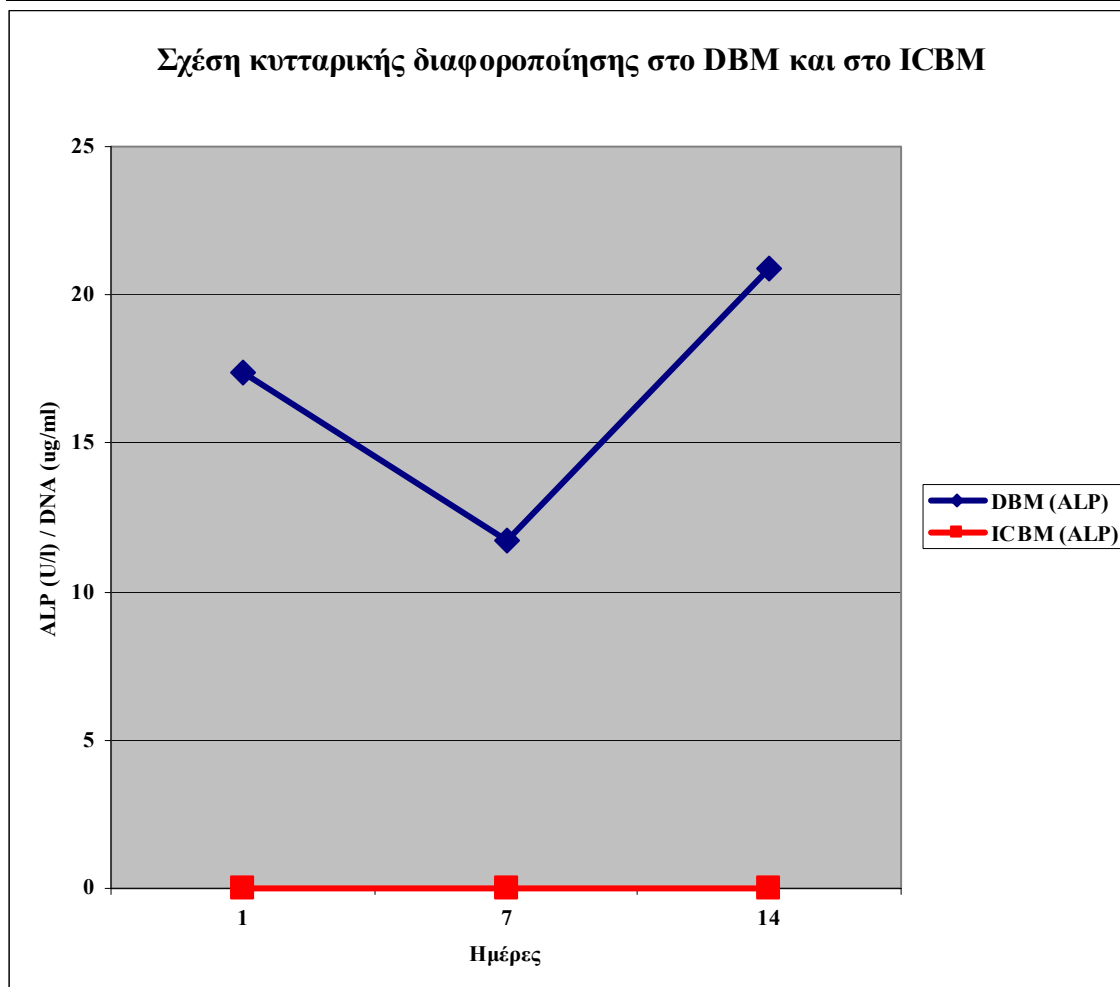
**Εικόνα 29.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Παράλληλη πορεία πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο DBM και ICBM.

### 8. Σχέση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSCs μεταξύ του DBM και του ICBM

Η γραφική παράσταση που ακολουθεί καταδεικνύει τη σαφή οστεοεπαγωγική υπεροχή του DBM έναντι του ICBM σε ότι αφορά τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Το ICBM παρουσιάζει μηδενική διαφοροποίηση.



	Διαφοροποίηση στο DBM (ALP U/L/DNA)	Διαφοροποίηση στο ICBM (ALP U/L/DNA)
Ημέρα 1	17.41	0
Ημέρα 7	11.71	0
Ημέρα 14	20.89	0

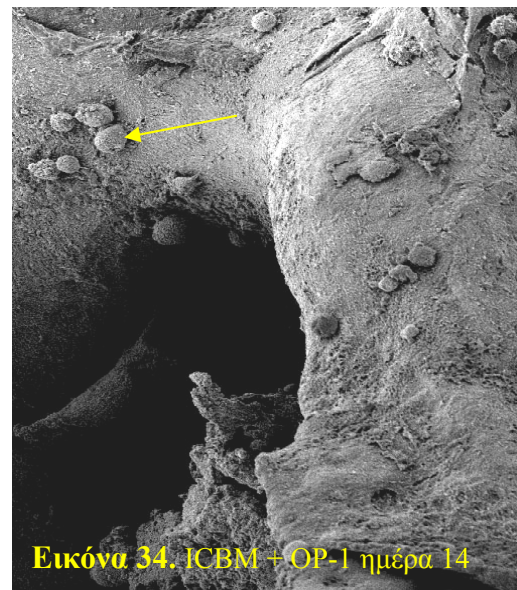
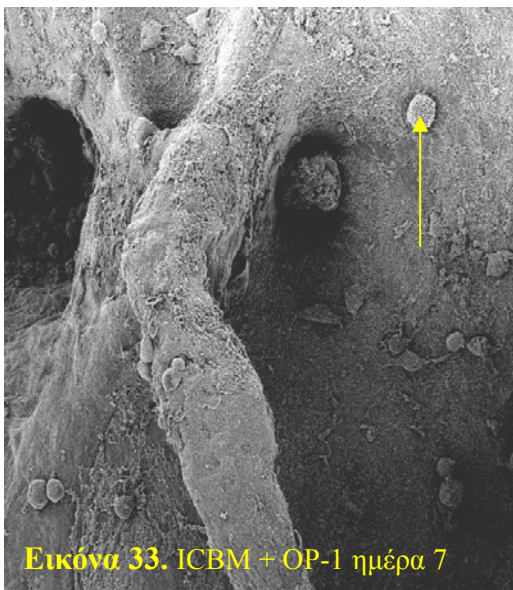
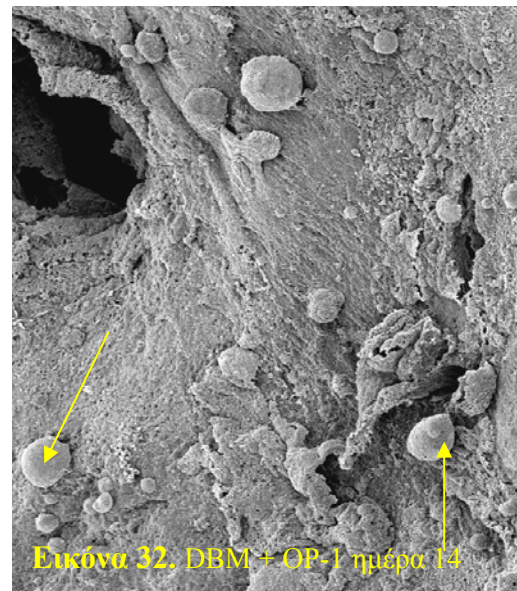
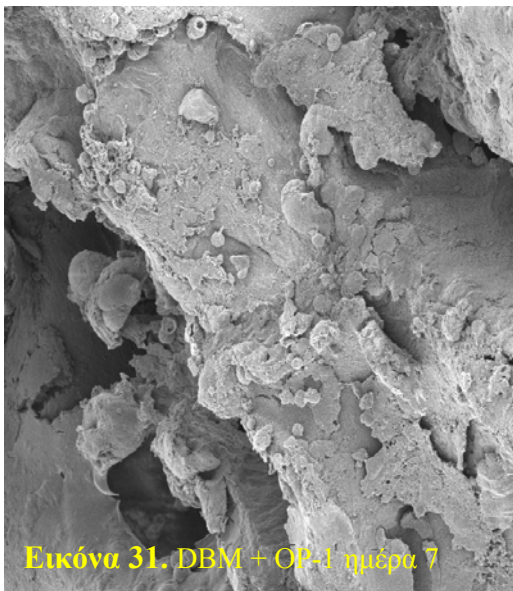


**Εικόνα 30.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Διαφοροποίηση των κυττάρων στο DBM. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο ICBM.

### 9. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κυττάρων στο αλλομόσχευμα: Ηλεκτρονική μικροσκόπηση [Scanning Electron Microscopy]

Η συμπεριφορά των κυττάρων και η επιμέρους διαφοροποίηση της μορφολογίας τους αξιολογήθηκαν με την ηλεκτρονική μικροσκόπηση σάρωσης (SEMs). Η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του DBM και του ICBM μελετήθηκε σε όλα τα χρονικά σημεία. Ο αριθμός των κυττάρων

πολλαπλασιάστηκε με το χρόνο. Στις 7 και στις 14 ημέρες και στα δύο αλλομοσχεύματα DBM (εικόνες 31 και 32) και ICBM (εικόνες 33 και 34) τα κύτταρα ήταν επαρκώς καθηλωμένα στην επιφάνεια του οστού, με την ανάπτυξη φιλοποδιών και την συνάθροιση σε ομάδες. Οι ομάδες αυτές των κυττάρων, εισχώρησαν μέσα στους φυσικούς πόρους του οστού, φαινόμενο γνωστό ως φαινόμενο σχηματισμού κυπελλοειδών κοιλάνσεων (cupping), που είναι χαρακτηριστικό της οστεοβλαστογένεσης και της απόπειρας των οστεοβλαστών να μεταναστεύσουν μέσα στον εσωτερικό κολλαγονικό σκελετό του οστού.



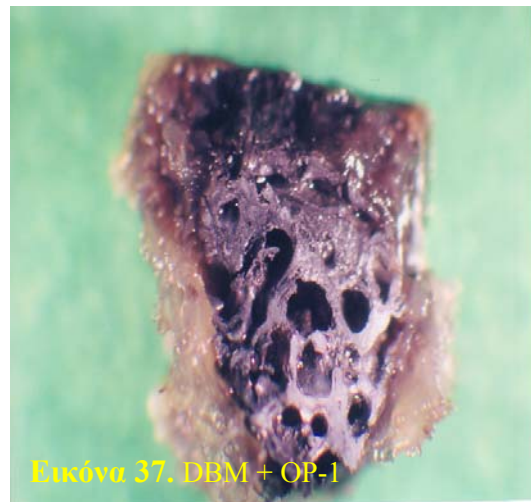
Τα βέλη δείχνουν κύτταρα και φιλοπόδια. Το φαινόμενο σχηματισμού κυπελλοειδών κοιλάνσεων (cupping) συλλαμβάνεται στο κάτω δεξιό μέρος της εικόνας 32 που αφορά το DBM+OP-1 τη 14<sup>η</sup> μέρα (ένδειξη κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και διαφοροποίησης).

## 10. Χρώση Von Kossa



Η χρώση Von Kossa είναι ένας χαρακτηριστικός έμμεσος δείκτης της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η χρώση έγινε σε δείγματα 14 ημερών. Οι εικόνες 35, 36 και 37 παρουσιάζουν φωτογραφίες μικροτεμαχίων συμπιεσμένου σπογγώδους οστού στις οποίες το μαύρο χρώμα αντιπροσωπεύει εναπόθεση ασβεστίου. Χαρακτηριστικά το DBM χωρίς OP-1 παρουσιάζει μέτριου βαθμού ασβεστοποίηση σε σχέση με το

DBM+OP-1. Η προσθήκη του OP-1 στο ICBM οδήγησε σε ασβεστοποίηση ανάλογη και

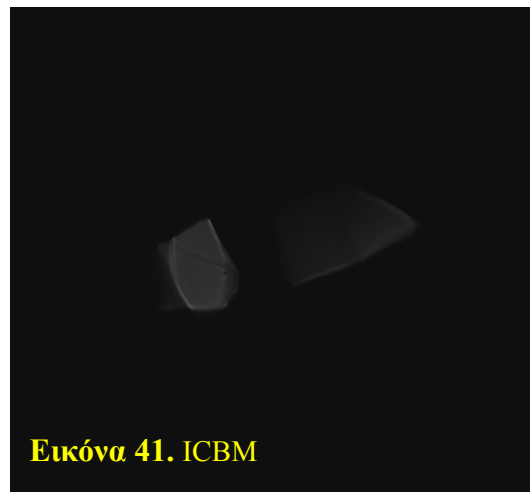
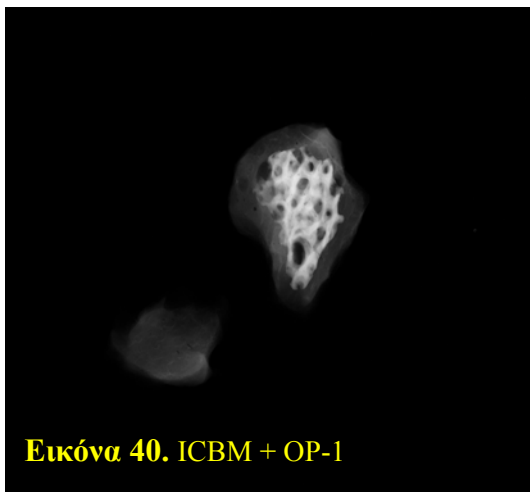
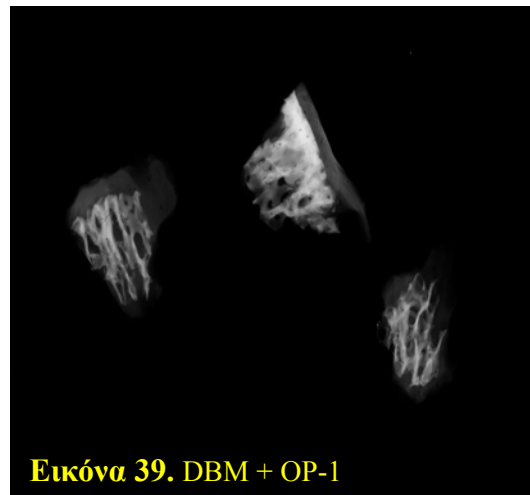
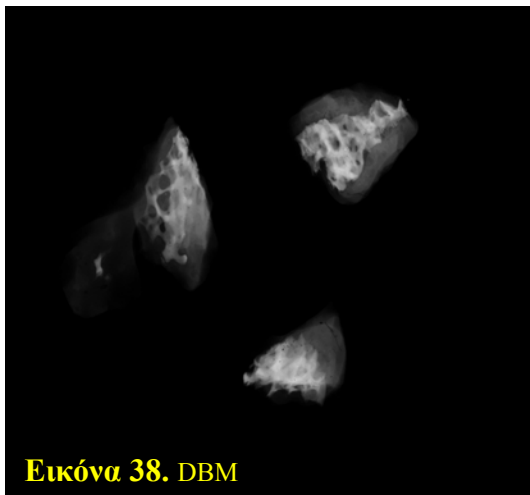


παρόμοιας έκτασης με αυτήν του DBM αλλά σαφώς μικρότερη αυτής του DBM+OP-1. Η τελευταία παρατήρηση επιβεβαίωσε τις πιο πάνω ποσοτικές μετρήσεις του πολλαπλασιασμού και κυρίως της

διαφοροποίησης των κυττάρων υπό την επίδραση του OP-1. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στατιστικά με τη σύγκριση όλων των αλλομοσχευμάτων μεταξύ τους ως προς τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση (βλέπε one way ANOVA post-hoc Tukey HSD).

### 11. Ακτινογραφία μοσχευμάτων

Ακτινολογική επιβεβαίωση της οστεοποίησης έγινε επίσης στις 14 ημέρες. Επιβεβαιώθηκε και εδώ η νέο-οστεογένεση και ασβεστοποίηση των αλλομοσχευμάτων με την προσθήκη του OP-1 σε σχέση με το ICBM μόνο του. Επίσης επιβεβαιώθηκε η ανάλογη ασβεστοποίηση μεταξύ του DBM και του ICBM+OP-1 και η υπεροχή του DBM+OP-1 έναντι και των δύο προηγούμενων. Οι εικόνες 38, 39, 40 και 41 παρουσιάζουν οστικά τεμάχια DBM και ICBM με ή χωρίς OP-1.



**ΜΕΛΕΤΗ ΙΙΙ. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ 1. *IN VITRO* ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ**

**1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός**

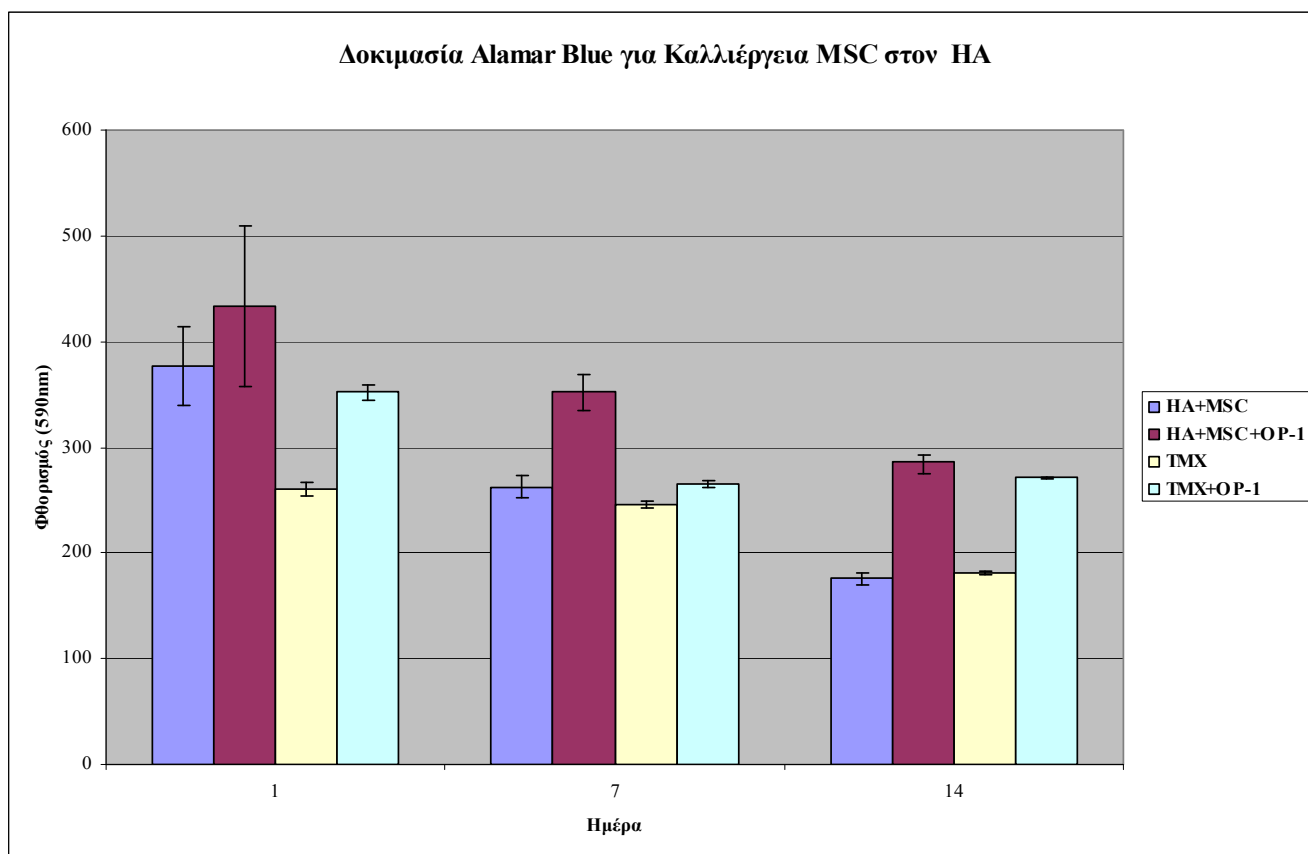
*Δοκιμασία Alamar Blue για την καλλιέργεια MSCs στον HA*

Ο υδροξυαπατίτης απέδειξε την αξιοπιστία του ως βιοϋλικού επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην επιφάνειά του. Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού σαφώς ενισχύθηκε από την παρουσία του OP-1 σε όλα τα χρονικά σημεία. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι ο υδροξυαπατίτης μόνος του παρουσίασε σημαντική οστεοαγωγιμότητα συγκρίσιμη με αυτή του OP-1 στο TMX. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ακολούθησε μια σχετικά σταθερή δραστηριότητα στο εύρος της ζώνης φθορισμού μεταξύ 200nm και 400nm κατά τη διάρκεια των 14 ημερών.

Συγκεκριμένα για τον H/A διαδοχικά τις ημέρες 1, 7, 14 ο μέσος φθορισμός ήταν: 376.60, 262.33, 175.61 αντίστοιχα και για τον H/A+OP-1 σαφώς επαυξημένα αλλά αντίστοιχα ο μέσος φθορισμός ήταν: 433.61, 351.93, 286.51.

Η προσθήκη OP-1 προκάλεσε αναμφίβολα επαύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτό ήταν φανερό, πέραν των απόλυτων αριθμών των μετρήσεων του φθορισμού σε όλα τα χρονικά σημεία, και στη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ H/A και H/A+OP-1 τις ημέρες 7 [p=0.014 95%CI: -144.87 -(-34.33)] και 14 [p=0.004 95%CI: -154.66 -(-67.13)]. Επιμέρους αναλυτικά δεδομένα και λεπτομερής στατιστική ανάλυση για τη δοκιμασία Alamar Blue στο παράρτημα.

	<b>Ημέρα 1</b>	<b>Ημέρα 7</b>	<b>Ημέρα 14</b>
<b>H/A</b>	376.60	262.33	175.61
<b>H/A + OP-1</b>	433.61	351.93	286.51



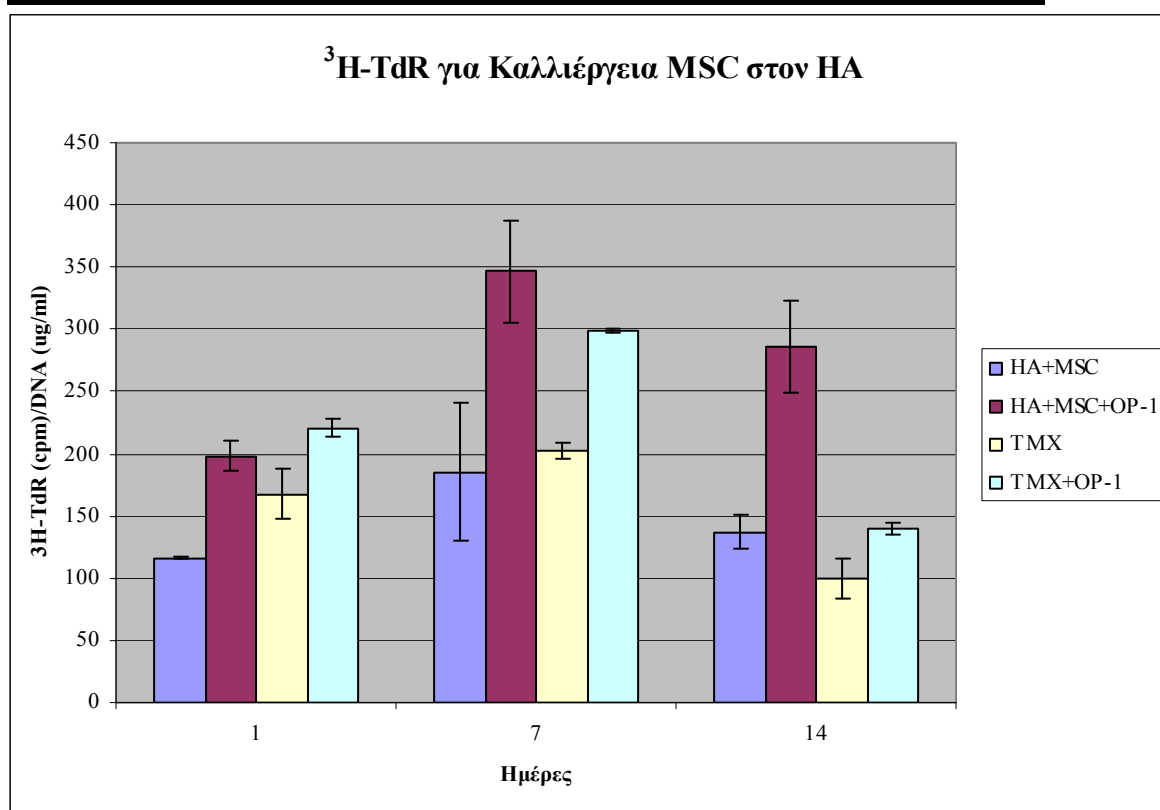
**Εικόνα 42.** Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία Alamar Blue. Ο HA + OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές φθορισμού όλες τις ημέρες.

#### Δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR για τη καλλιέργεια MSC στον HA

Η δοκιμασία αυτή επιβεβαίωσε, όπως αναμενόταν, την παρατήρηση ότι η προσθήκη του OP-1 επαυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον H/A. Εδώ επίσης ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός φτάνει σε μία περιοχή κόρου ακτινοβολίας 200-300 crp, για όλα τα χρονικά σημεία. Ασφαλώς και εδώ οι απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης είναι υψηλότερες για τα δείγματα του H/A+OP-1 σε σχέση με τα δείγματα του H/A. Η διαφορά αυτή φτάνει στα επίπεδα της στατιστικής σημαντικότητας σε όλα τα χρονικά σημεία μεταξύ H/A+OP-1 και H/A [ημέρα 1 p=0.021 95%CI: -134.68 -(-29.48), ημέρα 7 p=0.008 95%CI: -223.27 -(-99.85), και ημέρα 14 p=0.015 95%CI: -244.29 -(-54.14)]. Ακόμη είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε στο ιστόγραμμα της εικόνας 43 ότι οι

απόλυτες τιμές μέσης ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης για το OP-1 ήταν συγκρίσιμες και στα δύο πρώτα χρονικά σημεία υψηλότερες των αντίστοιχων τιμών του Η/Α. Ωστόσο η παρατήρηση αυτή είναι χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία για το ερώτημα της παρούσας διατριβής, η οποία εξετάζει πρωταρχικά, την βελτίωση της οστεογενετικής ικανότητας του αλλομοσχεύματος, που θα χρησιμοποιηθεί για την πλήρωση οστικών κενών.

	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 14
H/A	116.36	185.17	136.90
H/A+OP-1	198.44	346.73	286.12



**Εικόνα 43.** Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR. Ο HA + OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές ακτινοβολίας την ημέρα 7 και 14.

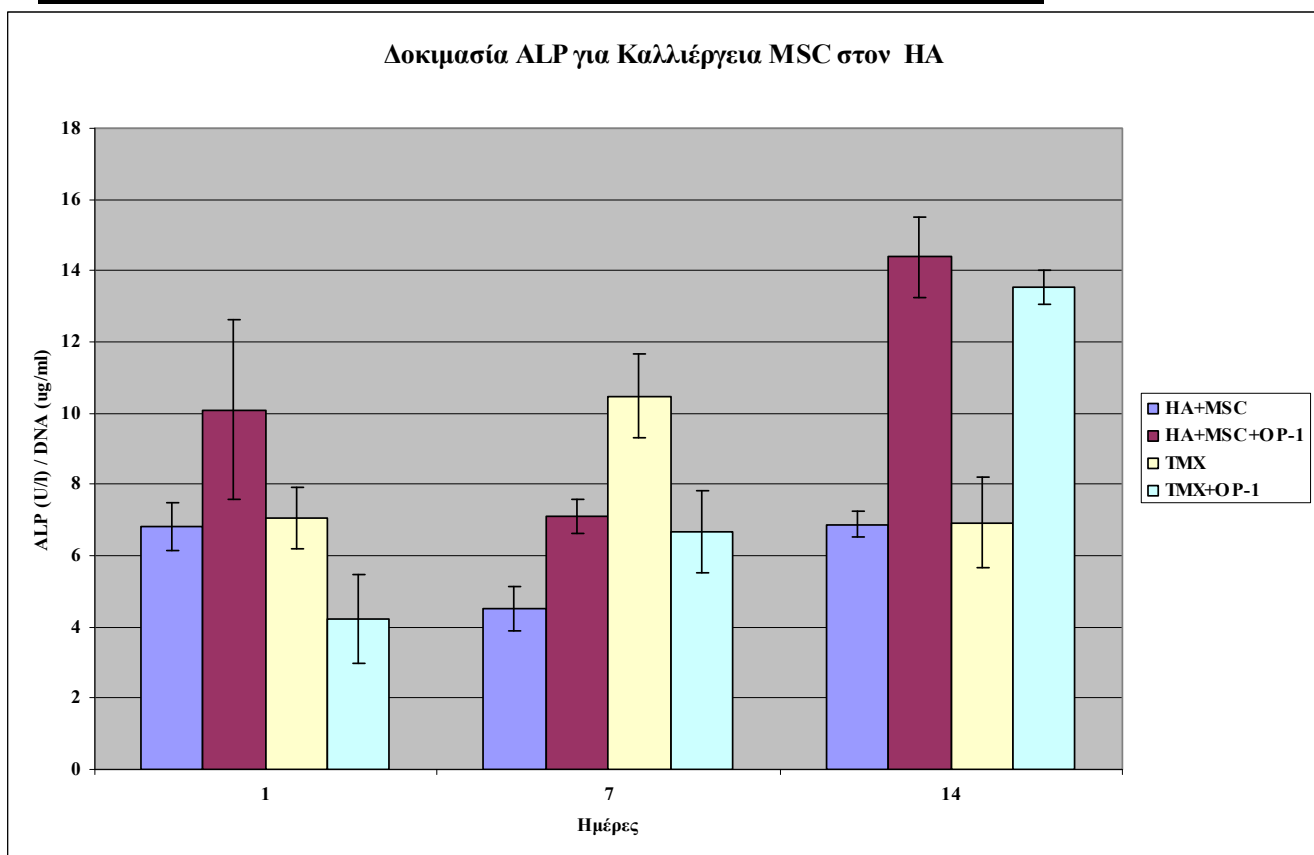
## 2. Κυτταρική διαφοροποίηση

*Δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης για την καλλιέργεια των MSCs στον HA*

Η διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων προς τον οστεοβλαστικό φαινότυπο έγινε εμφανής σε όλα τα χρονικά σημεία. Ιδιαίτερα ωστόσο, η διαδικασία αυτή επαυξήθηκε στα δείγματα

του Η/Α που είχαν ενισχυθεί με OP-1. Η διαφορά μεταξύ ενισχυμένων και μη δειγμάτων έφτασε στο μέγιστο την 14<sup>η</sup> ημέρα, ωστόσο στατιστική σημαντικότητα επιβεβαιώθηκε από την 7<sup>η</sup> ημέρα μεταξύ του Η/Α και του Η/Α+OP-1 [ημέρα 7 p=0.001 95%CI: -3.31 -(-1.89), ημέρα 14 p=0.004 95%CI:-10.35-(-4.67)].

	Ημέρα 1	Ημέρα 7	Ημέρα 14
<b>Η/Α</b>	6.81	4.50	6.87
<b>Η/Α+OP-1</b>	10.1	7.10	14.39



**Εικόνα 44.** Πίνακας και Ιστόγραμμα: Δοκιμασία ALP. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 δίνει τις υψηλότερες τιμές δραστηριότητας την ημέρα 1 και 14.

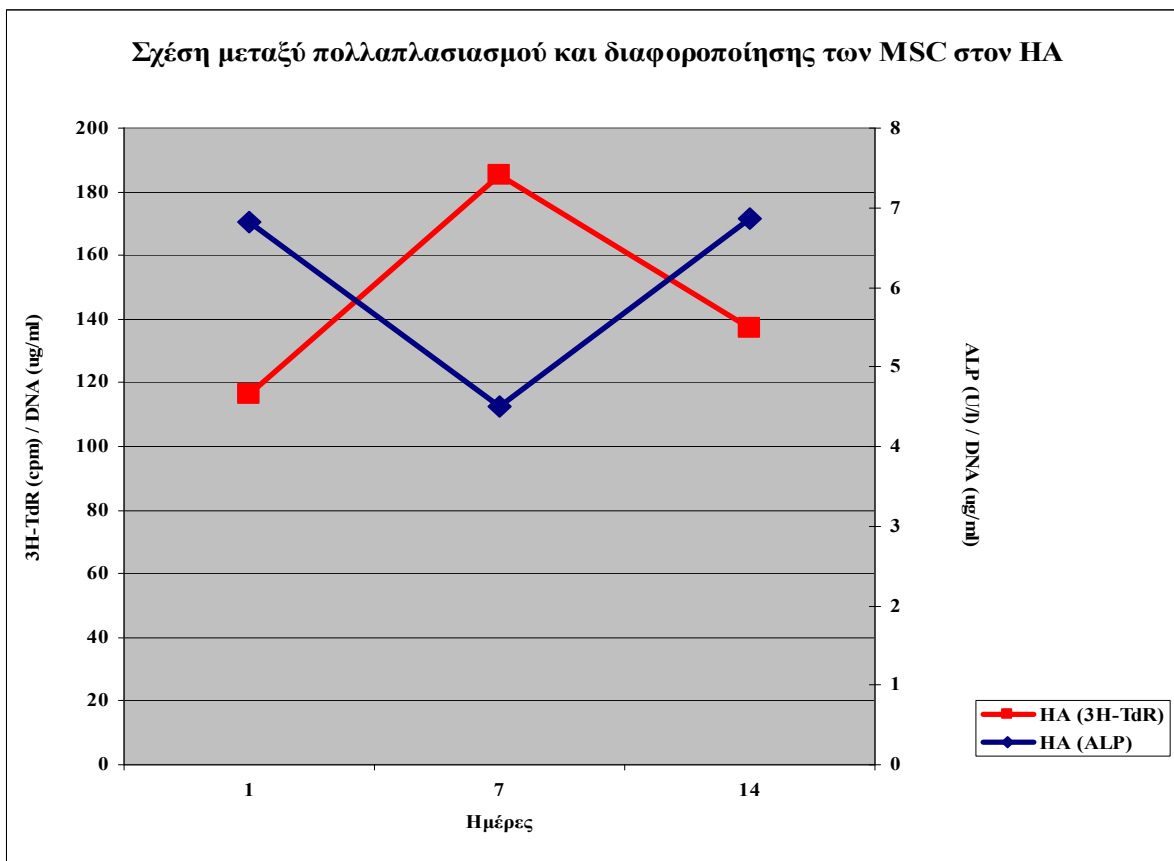
### 3. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στον Η/Α

Η σχέση μεταξύ των δύο κυτταρικών δραστηριοτήτων είναι αντιστρόφως ανάλογη. Ο

πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιβραδύνεται, ενώ η διαφοροποίηση επιταχύνεται με την πάροδο



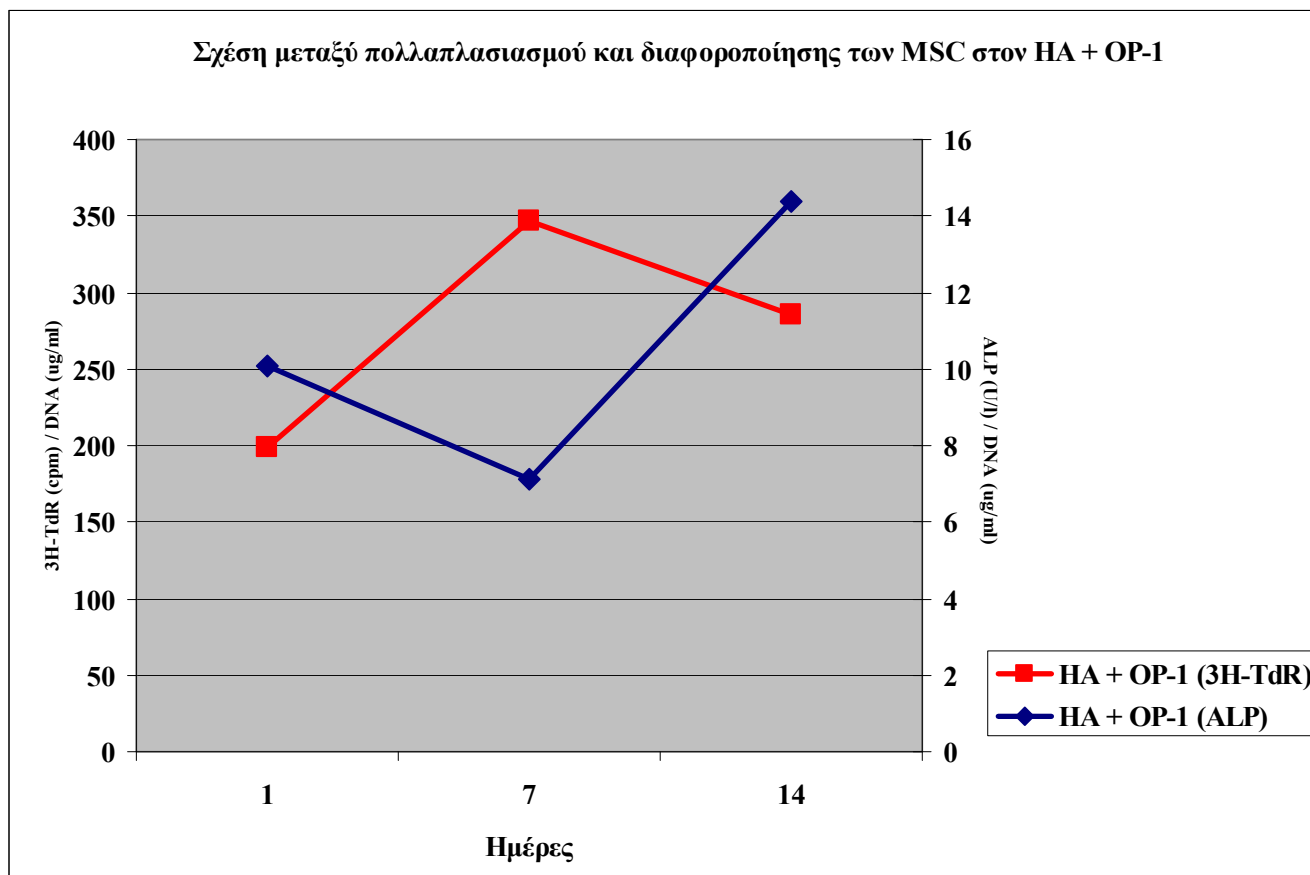
των ημερών κατά τρόπο αντιστρόφως ανάλογο και αντίστοιχο της μορφολογίας των ιστογραμμάτων του DBM (εικόνα 26 και εικόνα 45). Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι και οι απόλυτες τιμές μέτρησης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (διαφοροποίηση) αλλά και της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης (πολλαπλασιασμός) είναι αντίστοιχες στα δύο μοσχεύματα (H/A και DBM). (Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς των μεσαίων τιμών μεταξύ H/A και DBM θα μελετηθεί πιο κάτω κατά ημέρα πειράματος). Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μεταξύ του H/A και του DBM σε όλα τα χρονικά σημεία. Αντίθετα, σε ότι αφορά τη διαφοροποίηση, στατιστικά σημαντική διαφορά, με επικράτηση του DBM έναντι του H/A παρατηρείται τις ημέρες 1 [ $p=0.041$  95%CI: -20.82-(-0.36)] και 14 [ $p=0.026$  95%CI: -26.73-(-1.3)]. (Βλέπε πιο κάτω αποτελέσματα ANOVA για όλα τα μοσχεύματα).



**Εικόνα 45.** Πίνακας και Γραφική Παράσταση: Αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων.

#### 4. Σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs στον H/A+OP-1

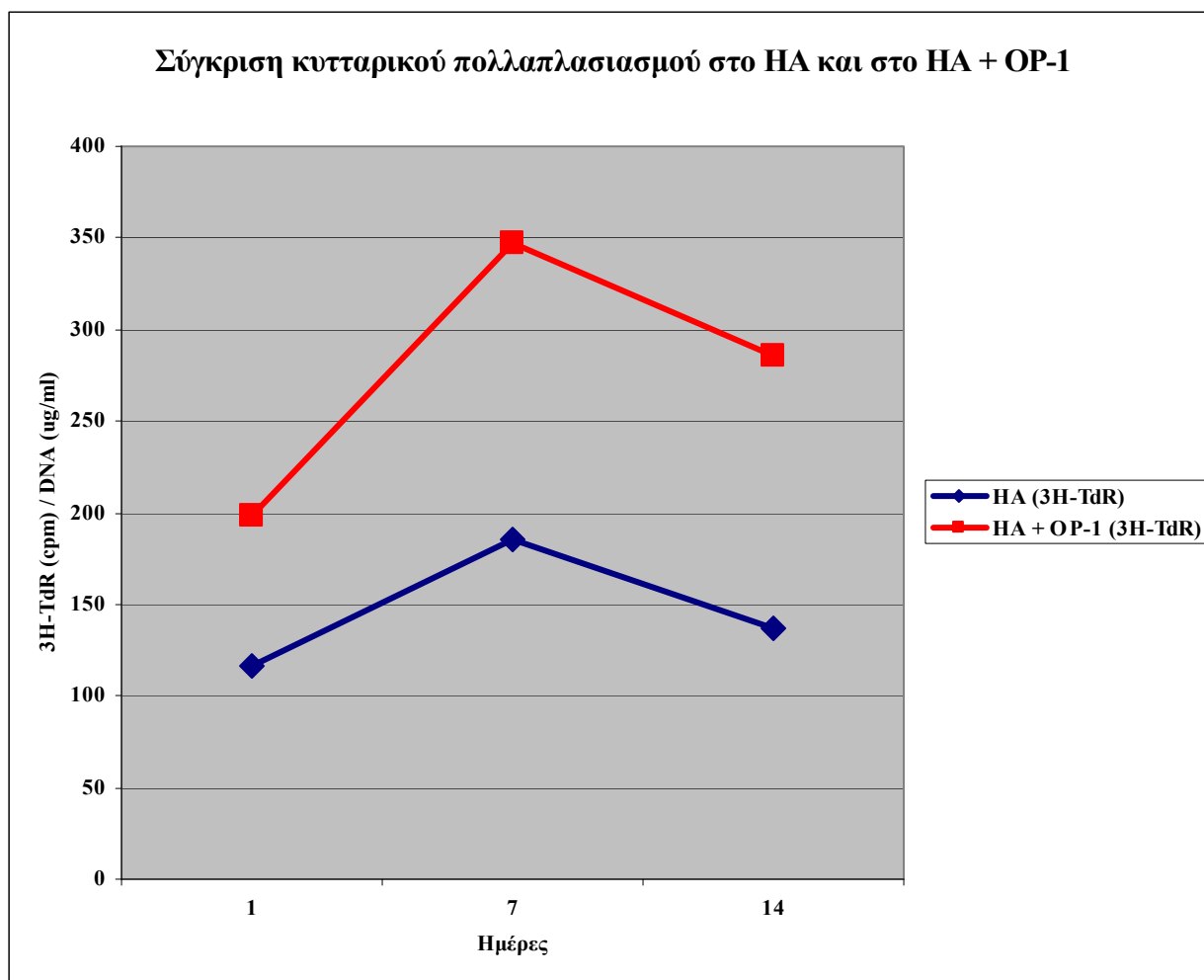
Σαφώς αναβαθμισμένη παρουσιάζεται η κυτταρική δραστηριότητα με την προσθήκη του OP-1 στον H/A. Οι απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης καθώς και οι τιμές της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης είναι υψηλότερες από αυτές της πιο πάνω παραγράφου για τον H/A χωρίς OP-1. Η μορφολογία ωστόσο των ιστογραμμάτων παραμένει η ίδια όπως περιγράφηκε πιο πάνω [ιστόγραμμα H/A (εικόνα 45) και ιστόγραμμα DBM (εικόνα 26)]. Το στοιχείο αυτό διαφοροποιεί τον H/A+OP-1 από το DBM+OP-1 όπου στο τελευταίο η προσθήκη του OP-1 ανέτρεψε την αντιστρόφως ανάλογη σχέση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης [βλέπε πιο πάνω σχέση μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSC στο DBM+OP-1(εικόνα 27)].



**Εικόνα 46.** Γραφική Παράσταση. Παρατηρείται αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων στον HA + OP-1. Αυτό διαφοροποιεί τον HA από το DBM (εικόνα 27).

## 5. Σχέση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MSC μεταξύ του H/A και του H/A+OP-1

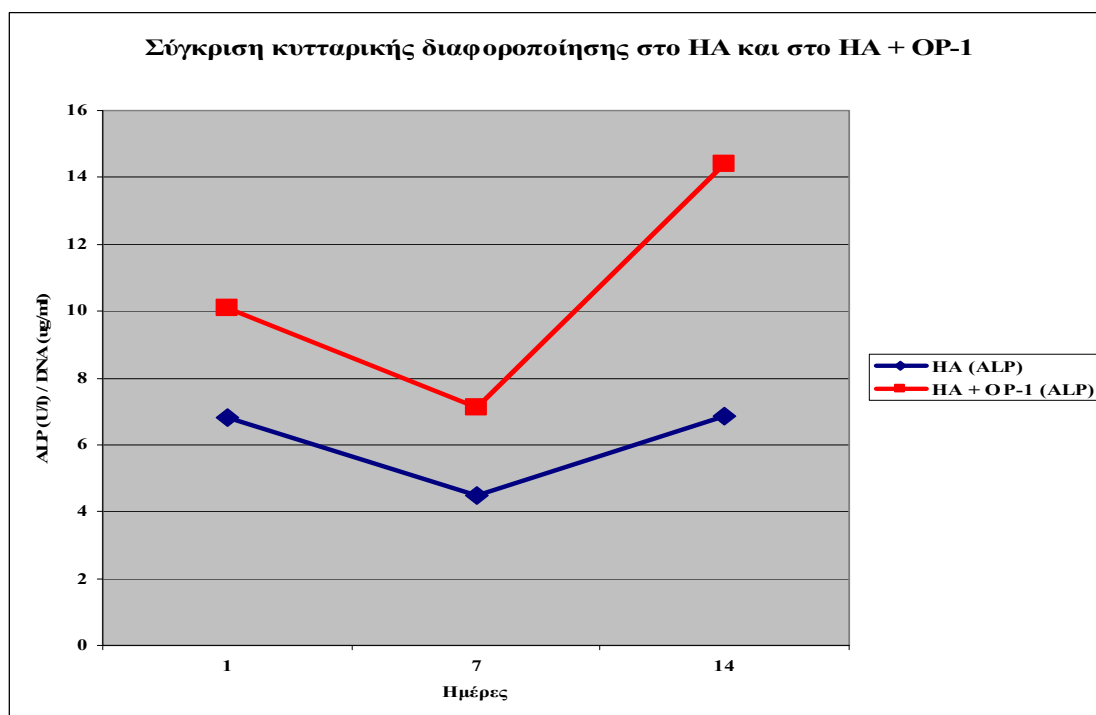
Εδώ η διαφορά είναι φανερή σε όλα τα χρονικά σημεία. Η προσθήκη του OP-1 πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ωστόσο δίνει στατιστικά σημαντική υπεροχή στον H/A+OP-1 έναντι του H/A, μόνο στη μέρα 14 [ $p=0.01$  95%CI: 57.71-240.57]. Τις ημέρες 1 [ $p=0.13$  95%CI: -17.9-182.05] και 7 [ $p=0.093$  95%CI: -18.78-341.9] δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης. (Βλέπε πιο κάτω αποτελέσματα ANOVA για όλα τα μοσχεύματα).



**Εικόνα 47.** Γραφική Παράσταση. Ο συνδυασμός του HA με το OP-1 δίνει υψηλότερες τιμές κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλες τις ημέρες. Η διαφορά με τον HA γίνεται στατιστικά σημαντική την 14<sup>η</sup> ημέρα.

## 6. Σύγκριση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSCs μεταξύ του H/A και του H/A+OP-1

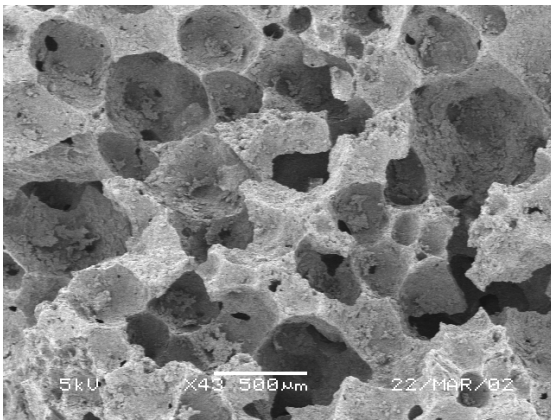
Η κυτταρική διαφοροποίηση παρουσιάζει αντίστοιχη μορφολογία στα τρία μοσχεύματα (H/A, H/A+OP-1 και DBM). Σαφώς τροποποιημένη είναι η κυτταρική διαφοροποίηση στο ιστόγραμμα του DBM+OP-1, όπου παρουσιάζει υψηλότερες απόλυτες τιμές και άνοδο από την 1<sup>η</sup> στην 7<sup>η</sup> μέρα, με ηπιότερη ανοδική τάση προς τη 14<sup>η</sup> (εικόνα 27). Πραγματικά η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στην πλειονότητα των χρονικών σημείων μεταξύ του DBM+OP-1 και των άλλων μοσχευμάτων [ημέρα 1 ICBM:  $p < 0.001$  95%CI: 10.09-31.97, ICBM+OP-1:  $p < 0.007$ , 95%CI: 3.48-25.36, H/A:  $p = 0.005$ , 95%CI: 3.98-24.45, H/A+OP-1:  $p = 0.03$ , 95%CI: 0.7-21.16, ημέρα 7  $p < 0.01$  για όλα τα μοσχεύματα και ημέρα 14 DBM:  $p = 0.02$  95%CI: 6.62-32.05, ICBM:  $p < 0.001$  95%CI: 27.52-52.94, ICBM+OP-1:  $p = 0.006$  95%CI: 4.23-29.65, H/A:  $p < 0.001$  95%CI: 20.64-46.07, H/A+OP-1:  $p < 0.001$  95%CI: 13.13-38.56] με εξαίρεση μόνο την ημέρα 1, για το DBM (ημέρα 1 DBM:  $p = 0.87$  95%CI: -7.3-14.5). (Βλέπε πιο κάτω αποτελέσματα ANOVA για όλα τα αλλομοσχεύματα).



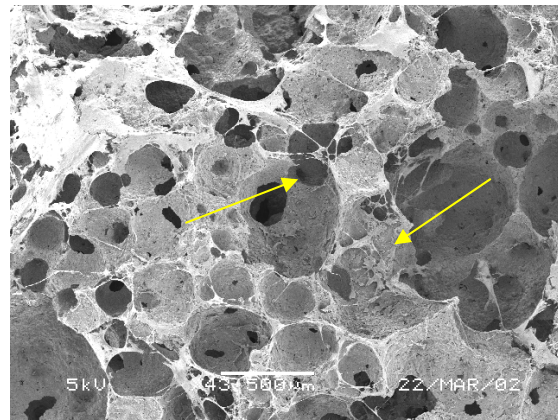
**Εικόνα 48.** Γραφική Παράσταση. Η διαφοροποίηση των κυττάρων είναι ανάλογη στα δύο υποστρώματα. Παρατηρείται στατιστική υπεροχή του HA + OP-1 έναντι του HA τις ημέρες 7 και 14 ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.004$  αντίστοιχα).

## 7. Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των MSCs στο Η/Α: Ηλεκτρονική Μικροσκόπηση

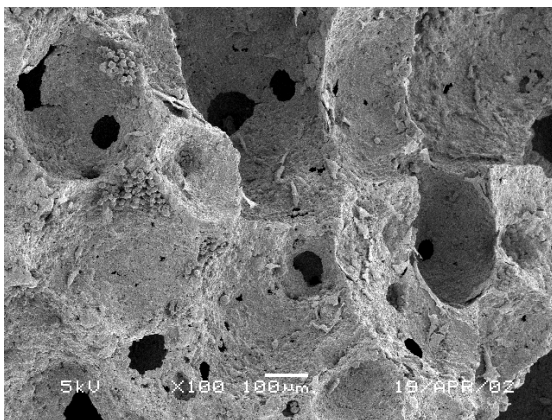
Τα ενισχυμένα με OP-1 δείγματα παρουσιάζουν οφθαλμοφανή οστεοβλαστική δραστηριότητα (βέλη).



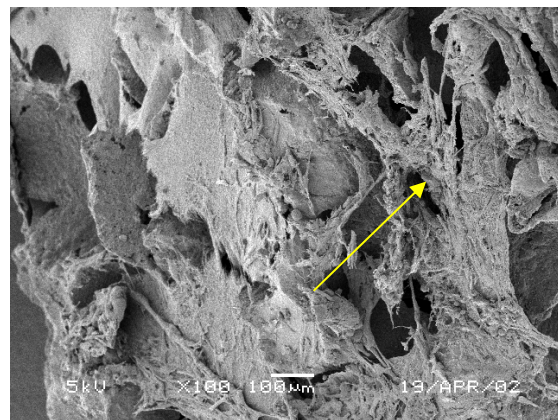
**Εικόνα 49.** Ημέρα 1: ΗΑ χωρίς OP-1 (x43)



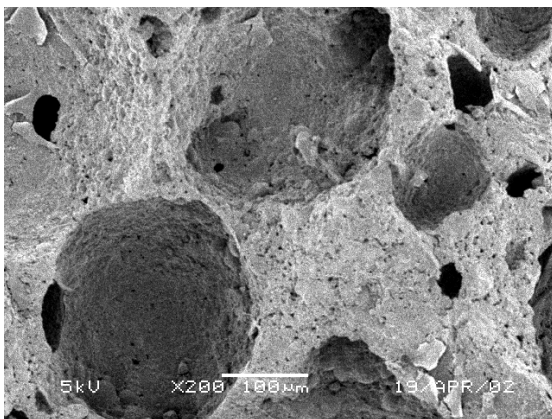
**Εικόνα 50.** Ημέρα 1: ΗΑ με OP-1 (x43)



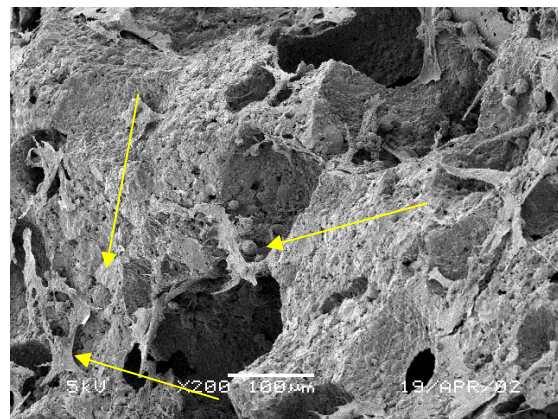
**Εικόνα 51.** Ημέρα 7: ΗΑ χωρίς OP-1 (x100)



**Εικόνα 52.** Ημέρα 7: ΗΑ με OP-1 (x100)



**Εικόνα 53.** Ημέρα 14: ΗΑ χωρίς OP-1 (x200)



**Εικόνα 54.** Ημέρα 14: ΗΑ με OP-1 (x200)

## ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ MSCS ΜΕΤΑΞΥ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, HA, HA+OP-1)

Η επιμέρους ανάλυση της σχέσης έγινε κατά ημέρα καλλιέργειας με τη χρήση της μεθόδου one way ANOVA και δοκιμασία post-hoc Tukey HSD για την αναζήτηση της επιμέρους διαφοράς μεταξύ των ομάδων των μοσχευμάτων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 11.0.

### *Ημέρα 1: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία $^3\text{H-TdR}$*

Το DBM+OP-1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική υπεροχή σε σχέση με τα περισσότερα από τα άλλα μοσχεύματα (DBM:  $p=0.025$  95%CI: 11.75-211.7, ICBM:  $p=0.01$  95%CI:24.54-211.57, ICBM+OP-1:  $p=0.037$  95%CI: 4.8-191.8) αλλά όχι με τον H/A (HA:  $p=0.08$ , HA+OP-1:  $p=1$ ) από τον οποίο όμως υπερείχε και στις δύο περιπτώσεις στις απόλυτες μέσες τιμές ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης (Βλέπε μέσες τιμές πίνακες δεδομένων, παράρτημα). Ο H/A+OP-1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική υπεροχή σε σχέση με το DBM (H/A+OP-1/DBM  $p=0.042$  95%CI: 3.1-203.05). Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι ο H/A δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το DBM, το ICBM αλλά και το ICBM+OP-1. Είναι ενδιαφέρον ακόμη να παρατηρήσει κανείς ότι στις απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης το DBM υπερείχε αλλά όχι στατιστικά σημαντικά του H/A και υπολείπταν όμως στατιστικά σημαντικά του H/A+OP-1. Αναμφισβήτητα αναδεικνύεται εδώ η βιοσυμβατότητα του H/A και η σχετική υπεροχή του όταν συνδυάζεται με το OP-1 έναντι άλλων μοσχευμάτων (H/A+OP-1/DBM  $p=0.042$  95%CI: 3.1-203, H/A+OP-1/ICBM  $p=0.018$  95%CI: 15.9-202.9). Ωστόσο ο H/A+OP-1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το DBM+OP-1 και ICBM+OP-1. Σε ότι αφορά τις απόλυτες τιμές υπερέχει του δεύτερου και υπολείπεται του πρώτου. Ως γενικό συμπέρασμα, από την ημέρα 1, για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  φαίνεται ότι: το DBM+OP-1 αποτελεί το αλλομόσχευμα

με την ισχυρότερη οστεοαγωγιμότητα και ακολουθείται από το H/A+OP-1. (Βλέπε και βάση δεδομένων, με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 1, παράρτημα).

*Ημέρα 7: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR*

Το DBM+OP-1 υπερέρχει στατιστικά σημαντικά από το DBM ( $p=0.005$  95%CI: 59.26-371.63), από το ICBM ( $p=0.003$  95%CI: 71.3-383,67), από το ICBM+OP-1 ( $p=0.025$  95%CI: 17.09-329.46), και από τον HA ( $p=0.01$  95%CI: 42.15-379.54). Δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά του H/A+OP-1 αλλά υπερέρχει ως προς τις απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης. Το H/A+OP-1 υπερέρχει του DBM και του ICBM+OP-1 αλλά μόνο στις απόλυτες μέσες τιμές αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Ο H/A δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά του ICBM+OP-1 και του DBM ωστόσο υπολείπεται και των δύο στις απόλυτες μέσες τιμές. Ως γενικό συμπέρασμα, από την ημέρα 7 για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR φαίνεται ότι: το DBM+OP-1 αποτελεί το αλλομόσχευμα με την ισχυρότερη οστεοαγωγιμότητα. (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 7, παράρτημα).

*Ημέρα 14: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR*

Το DBM+OP-1 υπερέρχει στατιστικά σημαντικά του DBM ( $p<0.001$  95%CI: 146.67-329.53), ICBM ( $p<0.001$  95% CI: 178-360.86), ICBM+OP-1 ( $p<0.001$  95% CI: 91.21-274.07), και του H/A ( $p<0.001$  95%CI: 129.71-312.58). Δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά του H/A+OP-1 αλλά υπερέρχει ως προς τις απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης. Ο H/A+OP-1 υπερέρχει στατιστικά σημαντικά του DBM ( $p<0.001$  95%CI: 74.67-257.53), του ICBM ( $p<0.001$  95%CI: 106-288.86), του ICBM+OP-1 ( $p=0.013$  95%CI: 19.2-202.07) και του H/A ( $p=0.001$  95% CI:57.71-240.57). Ο H/A, το DBM και το ICBM+OP-1 δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και οι απόλυτες τιμές της ακτινοβολίας της ραδιοσημασμένης θυμιδίνης για κάθε ένα από αυτά τα

μοσχεύματα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Ως γενικό συμπέρασμα, από την ημέρα 14 για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  φαίνεται ότι: το DBM+OP-1 αποτελεί το αλλομόσχευμα με την ισχυρότερη οστεοαγωγιμότητα και ακολουθείται από το H/A+OP-1. (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 14, παράρτημα).

### **ΣΧΕΣΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ MSCs ΜΕΤΑΞΥ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ (DBM, DBM+OP-1, ICBM, ICBM+OP-1, HA, HA+OP-1)**

Η επιμέρους ανάλυση της σχέσης έγινε κατά ημέρα καλλιέργειας με τη χρήση της μεθόδου one way ANOVA και δοκιμασία post-hoc Tukey HSD για την αναζήτηση της επιμέρους διαφοράς μεταξύ των ομάδων των μοσχευμάτων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 11.0.

*Ημέρα 1: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης.*

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέρα 7 καθώς το DBM+OP-1 υπερέρχει στατιστικά σημαντικά όλων των μοσχευμάτων εκτός του DBM. Έτσι υπερέρχει του ICBM ( $p < 0.001$  95%CI: 10.097-31.976), του ICBM+OP-1 ( $p = 0.007$  95%CI: 3.48-25.36), του H/A ( $p = 0.005$  95%CI: 3.98-24.45), και του H/A+OP-1 ( $p = 0.033$  95%CI: 0.7-21.16). Στην περίπτωση βέβαια του H/A+OP-1 το 95% CI εμπεριέχει το 1 και έτσι το αποτέλεσμα δεν θεωρείται στατιστικά ισχυρό παρά ταύτα η απόλυτη τιμή δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης του DBM+OP-1 είναι σαφώς υψηλότερη αυτής του H/A+OP-1. Το DBM υπερέρχει στατιστικά σημαντικά του ICBM ( $p = 0.001$  95%CI: 6.47-28.34) και του HA ( $p = 0.04$  95%CI: 0.36-20.82). Τα υπόλοιπα μοσχεύματα βρίσκονται στο ίδιο εύρος απόλυτων τιμών δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης. Το ICBM+OP-1 υπερέρχει του H/A+OP-1 και του H/A και το H/A+OP-1 υπερέρχει του H/A ως προς τις απόλυτες τιμές. Ως γενικό συμπέρασμα, από την ημέρα 1 για τη μέτρηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης φαίνεται



ότι: το DBM+OP-1 αποτελεί το αλλομόσχευμα με την ισχυρότερη οστεοεπαγωγική ικανότητα και ακολουθείται από το DBM. Αυτό διαφοροποιεί την εικόνα σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς έχουμε την αντικατάσταση, στην οστεοεπαγωγική ιεραρχία των μοσχευμάτων, του H/A+OP-1 από το DBM. (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 1, παράρτημα).

#### *Ημέρα 7: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης*

Το DBM+OP-1 υπερέχει στατιστικά σημαντικά από όλα τα άλλα μοσχεύματα. Από το DBM ( $p < 0.001$  95%CI: 17.86-37.45), το ICBM ( $p < 0.001$  95%CI: 29.57-49.16), το ICBM+OP-1 ( $p < 0.001$  95%CI: 9.25-28.84), το HA ( $p < 0.001$  95%CI: 25.07-44.66), και το HA+OP-1 ( $p < 0.001$  95%CI: 22.46-42.05). Εδώ το DBM και το ICBM+OP-1 βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα απόλυτων τιμών δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, με υπεροχή του ICBM+OP-1. Εμφανώς επίσης το ICBM+OP-1 υπερέχει στατιστικά έναντι των H/A ( $p = 0.001$  95%CI: 6.025-25.61) και H/A+OP-1 ( $p = 0.05$  95%CI: 3.41-23) επίσης. Εδώ το DBM βρίσκεται σχεδόν ισοδύναμο, στις απόλυτες τιμές δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, με το H/A+OP-1 επιβεβαιώνοντας τις εγγενείς οστεοεπαγωγικές ικανότητες του, αλλά και την επάρκεια του H/A ως βιοϋλικού που ανταποκρίνεται, προς την κυτταρική διαφοροποίηση, σε βαθμό ανάλογο των βιολογικών μοσχευμάτων. Ως γενικό συμπέρασμα από την ημέρα 7 για τη μέτρηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης φαίνεται ότι: το DBM+OP-1 αποτελεί το αλλομόσχευμα με την ισχυρότερη οστεοεπαγωγική ικανότητα και ακολουθείται από το ICBM+OP-1. Το DBM και το H/A+OP-1 ακολουθούν διατηρώντας την αξιοπιστία και την επανάληψη των αρχικών παρατηρήσεων. Αυτό επαναφέρει την εικόνα των αρχικών παρατηρήσεων σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς παρατηρούμε την μόνιμη υπεροχή του DBM+OP-1 και την ισοσκέλιση των διαφορών μεταξύ

του DBM, ICBM+OP-1 και H/A+OP-1. (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 1, παράρτημα).

*Ημέρα 14: Μέτρηση οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης*

Το DBM+OP-1 υπερέρχει στατιστικά σημαντικά από το DBM ( $p=0.02$  95%CI: 6.62-32.05), το ICBM ( $p<0.001$  95%CI: 27.52-52.94), το ICBM+OP-1 ( $p=0.006$  95%CI: 4.23-29.65), το HA ( $p<0.001$  95%CI: 20.65-46.07), και το HA+OP-1 ( $p<0.001$  95%CI: 13.13-38.55). Το HA+OP-1 δεν διαφέρει στατιστικά από το DBM, το ICBM+OP-1, και το HA. Οι απόλυτες τιμές της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, για κάθε ένα από αυτά τα μοσχεύματα, βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με υψηλότερη την τιμή του DBM και χαμηλότερη του H/A. Το H/A+OP-1 υπερέρχει αλλά μόνο στις απόλυτες τιμές της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης του H/A, και του ICBM+OP-1, αλλά υπολείπεται του DBM. Επίσης το ICBM+OP-1 υπερέρχει του H/A. Ως γενικό συμπέρασμα, από την ημέρα 14 για τη μέτρηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης φαίνεται ότι: το DBM+OP-1 αναμφίβολα αποτελεί το αλλομόσχευμα με την ισχυρότερη οστεοεπαγωγική ικανότητα. Η οστεοεπαγωγική ικανότητα των λοιπών μοσχευμάτων διατηρείται στα ίδια μεταξύ τους επίπεδα (DBM>H/A+OP-1>ICBM+OP-1>H/A), δίνοντας τη δυνατότητα επιλογής αλλά και συνδυασμών στην κλινική πράξη. (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων για την ημέρα 14, παράρτημα).

**ΜΕΛΕΤΗ IV. *IN VIVO* ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ  
ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ  
ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1**

**1. Το μοντέλο**

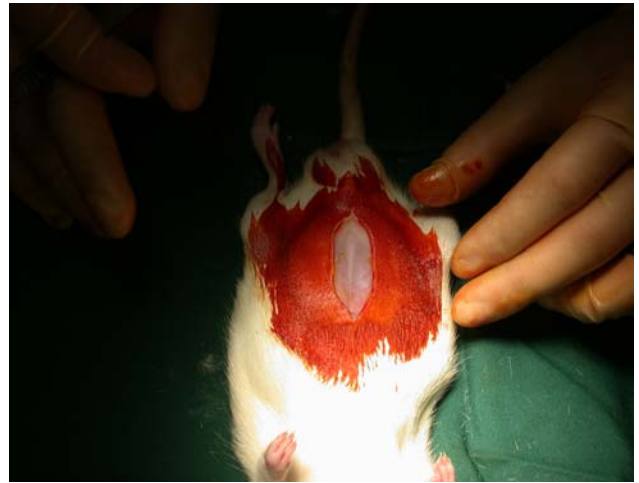
Η μετεγχειρητική πορεία και των 16 αρουραίων ήταν ανεπίπλεκτη. Η επούλωση των χειρουργικών τομών ήταν πλήρης και το τρίχωμα αναπτύχθηκε φυσιολογικά. Δεν παρατηρήθηκε καμιά μετεγχειρητική φλεγμονή ούτε λοίμωξη. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμιά μακροσκοπική ένδειξη τοπικής ή συστηματικής αντίδρασης από το μόσχευμα.



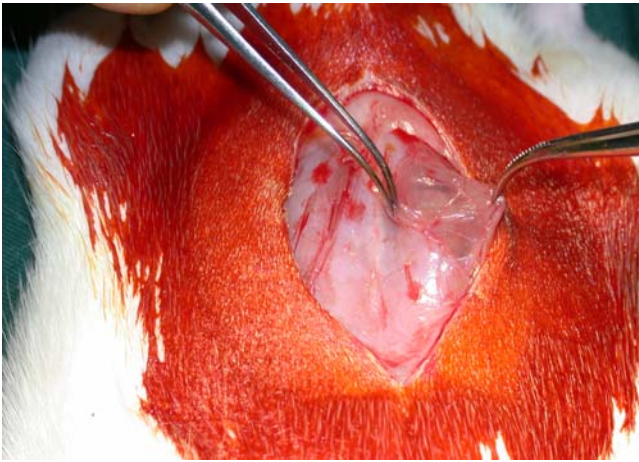
**Εικόνα 55.** Ευρισμένο κοιλιακό τοίχωμα. Το ψαλίδι δείχνει την μέση γραμμή.



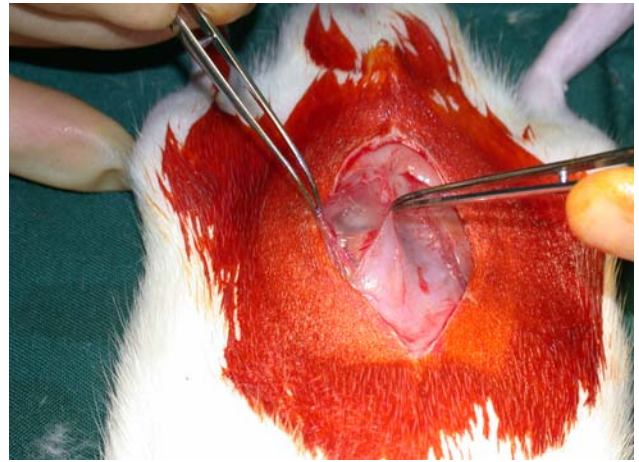
**Εικόνα 56.** Προετοιμασία του δέρματος με ιωδιούχο



**Εικόνα 57.** Τομή δέρματος μέσης γραμμής  
διάλυμα



**Εικόνα 58.** Δεξιά θήκη



**Εικόνα 59.** Αριστερή θήκη



**Εικόνα 60.** Πλάκα 96 εμβυθισμάτων με το πακτωμένο  
αλλομόσχευμα



**Εικόνα 61.** Αλλομόσχευμα μέσα στις θήκες

## **2. Μακροσκοπική παρατήρηση**

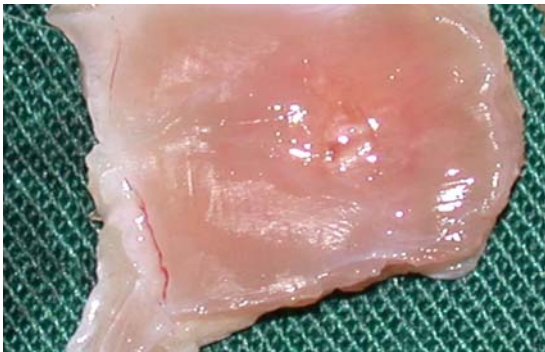
Κατά την αφαίρεση των μοσχευμάτων μετά από 28 ημέρες η μακροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων έδειξε εμφανή διαφορά στην εικόνα αλλά και την υφή των μοσχευμάτων. Τα δείγματα του DBM (εικόνα 66) και DBM+OP-1 (εικόνα 68) παρουσίασαν ψηλαφητά οστικά οζίδια και εκτεταμένη ασβεστοποίηση η οποία επεκτεινόταν και πέραν των ορίων του μοσχεύματος στον περιβάλλοντα μυ. Η οπτικά και ψηλαφητικά έκδηλη οστεοποίηση, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα του φρέσκου αλλομοσχεύματος (εικόνα 62, εικόνα 64). Τα δισκία του φρέσκου αλλομοσχεύματος που ενισχύθηκαν με OP-1 παρουσίασαν μέτριου βαθμού οστεοποίηση, σε καμιά όμως περίπτωση συγκρίσιμη με αυτή του DBM+OP-1 που σαφώς υπερείχε. Σε σύγκριση με το DBM, το φρέσκο αλλομόσχευμα με OP-1 παρουσίασε οπτικά συγκρίσιμη οστεοποίηση.

## **3. Ιστολογική παρατήρηση**

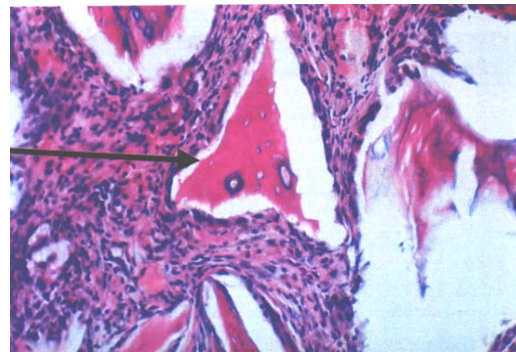
### *Φρέσκο Αλλομόσχευμα*

Κατά την ιστολογική χρώση των δειγμάτων των δισκίων του φρέσκου αλλομοσχεύματος, παρατηρήθηκε ότι στην πλειονότητά τους τα μικροτεμάχια του πακτωμένου αλλομοσχεύματος ήταν περιχαρακωμένα από ινώδη ιστό [άσπρο περίβλημα πέριξ του οστικού τεμαχίου του φρέσκου αλλομοσχεύματος, όπου επίσης παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχαν πλέον ζωντανά κύτταρα (εικόνα 63)]. Επίσης χαρακτηριστική ήταν η απουσία επαναγγείωσης των μικροτεμαχίων του φρέσκου αλλομοσχεύματος αλλά και η απώλεια ζωντανών κυττάρων ενώ ελάχιστο έως καθόλου νέο οστό παρατηρήθηκε σε αυτές τις ιστολογικές τομές όπως επιβεβαιώθηκε με την χρώση της αιματοξυλίνης - ηωσίνης. Στα ενισχυμένα με OP-1 δείγματα ωστόσο πέραν των περιχαρακωμένων με ινώδη ιστό μικροτεμαχίων του φρέσκου αλλομοσχεύματος, υπήρχαν περιοχές όπου εμφανίστηκε νέο οστό καθώς

και ελάχιστος μυελός των οστών καταδεικνύοντας την οστεοεπαγωγική δράση του OP-1 (εικόνα 65).  
Πάρα ταύτα η πλειονότητα των μικροτεμαχίων του αλλομοσχεύματος παρέμεινε νεκρή.



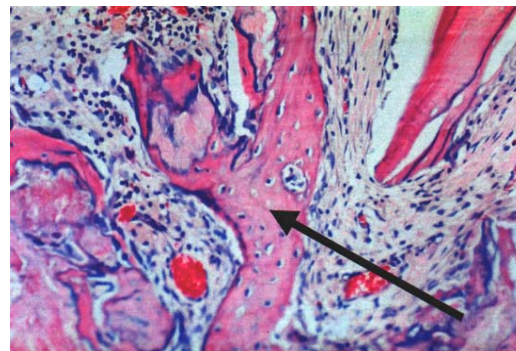
**Εικόνα 62.** Αλλομόσχευμα



**Εικόνα 63.** Μικροτεμάχιο αλλομοσχεύματος (χρώση H&E, x66)



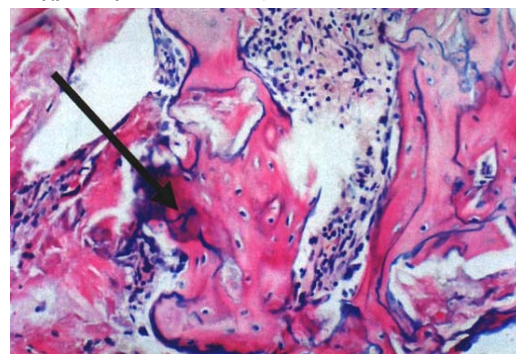
**Εικόνα 64.** Αλλομόσχευμα με OP-1



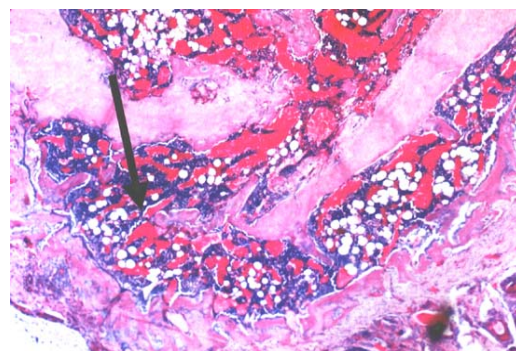
**Εικόνα 65.** Σχηματισμός νέου οστού (βέλος, χρώση H&E, x330)



**Εικόνα 66.** DBM



**Εικόνα 67.** Σχηματισμός νέου οστού (βέλος, χρώση H&E, x330)



#### **Εικόνα 68.** DBM + OP-1

##### *Αποασβεστοποιημένο οστό*

Όλα τα δισκία DBM παρουσίασαν επαναγγείωση και διατήρηση της βιωσιμότητας των μικροτεμαχίων του αλλομοσχεύματος. Επίσης νέο οστό δημιουργήθηκε εκτεταμένα σε ορισμένες περιοχές και αναμείχθηκε με το αλλομόσχευμα, με τη δημιουργία μικτών περιοχών παλαιού και νέου οστού και με την ανάπλαση αυτών των περιοχών (remodeling, εικόνα 67). Επιπρόσθετα το DBM με OP-1 παρουσίασε περισσότερο εκτεταμένη οστεοποίηση σε σχέση με το DBM. Το χαρακτηριστικό αυτής της τελευταίας ομάδας μοσχευμάτων, ήταν η έντονη παρουσία ώριμου μυελού των οστών, που καταδεικνύει την πληρότητα της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, με την ανάπλαση του νέου οστού και με τη δημιουργία αυτόνομης αγγείωσης (εικόνα 69).

#### **4. Ιστολογική ταξινόμηση**

Τα δείγματα μετά την επεξεργασία και την χρώση με αιματοξυλίνη -ηωσίνη ταξινομήθηκαν με βάση την κλίμακα Salkeld (Salkeld et al, 2001) από δύο διαφορετικούς παρατηρητές, οι οποίοι δεν γνώριζαν τη σύσταση των μοσχευμάτων. Δύο αντιπροσωπευτικά δείγματα του κάθε αλλομοσχεύματος εξετάστηκαν από τον κάθε παρατηρητή. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τεσσάρων παρατηρήσεων που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα είχαν αριθμηθεί πριν την ιστολογική τους αξιολόγηση, και έτσι κατόπιν αυτής, ο κάθε αριθμός συνδυάστηκε με το αντίστοιχο δείγμα. Στο σύνολο, 29×2 δείγματα ταξινομήθηκαν. Είκοσι-εννέα (29) από τα 32 μοσχεύματα, που αρχικά συνελέγησαν, αξιολογήθηκαν καθώς 3 μοσχεύματα θεωρήθηκαν ακατάλληλα για λόγους τεχνικούς. Η τελική βαθμολόγηση ανέδειξε 8 αποτελέσματα για το φρέσκο αλλομόσχευμα , 7 για το φρέσκο αλλομόσχευμα με OP-1, 7 για το DBM και 7 για το DBM+OP-1. Ο μέσος όρος της αξιολόγησης των

**Εικόνα 69.** Σχηματισμός νέου οστού και μυελού των οστών (βέλος, χρώση H&E με alcian blue και sirrus red, x66)

δύο κριτών για το κάθε δείγμα, καταγράφεται στη βάση δεδομένων. (Βλέπε βάση δεδομένων παράρτημα).

## **5. Αποτελέσματα**

Ο μέσος όρος  $\pm$  το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM, standard error of the mean) της αξιολόγησης της οστεογένεσης για το φρέσκο αλλομόσχευμα ήταν  $0.5 \pm 0.189$ , για το φρέσκο αλλομόσχευμα +OP-1 ήταν  $2.0721 \pm 0.45$ , για το DBM ήταν  $2.214 \pm 0.59$ , και για το DBM+OP-1 ήταν  $4.071 \pm 0.29$ .

## **6. Στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία one way ANOVA με ανάλυση της στατιστικής σχέσης μεταξύ των ομάδων με τη δοκιμασία post-hoc Tukey HSD και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p \leq 0.05$ . Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 11.0. Το DBM+OP-1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική υπεροχή ως προς την οστεογένεση σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα ( $p < 0.001$  95%CI: 2.029-5.114), σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα + OP-1 ( $p = 0.01$  95%CI: 0.5-3.59), και το DBM ( $p = 0.018$  95%CI: 0.264-3.45). Ωστόσο όπως είναι εμφανές από τα αποτελέσματα ειδικά για το αλλομόσχευμα + OP-1 και για το DBM η υπεροχή του DBM+OP-1 έναντι αυτών δεν ήταν ισχυρά στατιστικά σημαντική καθώς το 95% CI περνούσε από το 1. Αυτό αποδίδεται στον σχετικά περιορισμένο αριθμό δειγμάτων της μελέτης. Είναι αναμενόμενο, από τις ενδείξεις των πιο πάνω αποτελεσμάτων, ότι μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων θα ενίσχυε τη στατιστική υπεροχή του DBM+OP-1 έναντι των υπολοίπων. Επίσης το DBM παρουσίασε μεγαλύτερη οστεογενετική ικανότητα σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα ( $p = 0.025$  95%CI: 0.17-3.25), αλλά όχι στατιστικά σημαντική υπεροχή σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα + OP-1 αν και η απολυτή μέση τιμή του DBM (μέση τιμή =  $2.214 \pm 0.59$ ) ήταν ελαφρά υψηλότερη του αλλομοσχεύματος + OP-1 (μέση τιμή =  $2.0721 \pm 0.45$ ). Όπως αναμενόταν το φρέσκο



αλλομόσχευμα+OP-1 παρουσίασε μεγαλύτερη οστεογενετική ικανότητα σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα χωρίς OP-1 ( $p=0.045$  95%CI: 0.029-3.11). Η στατιστική σημαντικότητα στις παραπάνω συγκρίσεις ήταν ασθενής λόγω του περιορισμένου αριθμού των δειγμάτων αλλά επαρκώς ενδεικτική της διαφοράς μεταξύ των μοσχευμάτων, πλην φυσικά της διαφοράς μεταξύ του DBM+OP-1 και του φρέσκου αλλομοσχεύματος που ήταν ισχυρά στατιστικά σημαντική ( $p<0.001$  95%CI:2.03-5.11) (Βλέπε και βάση δεδομένων με ανάλυση όλων των συνδυασμών μοσχευμάτων στο παράρτημα).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η παρούσα διατριβή εξετάζει την οστεομεταμόσχευση στην επανορθωτική χειρουργική του ισχίου. Πιο συγκεκριμένα εξετάζει την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στην αναθεώρηση του μηριαίου οστού μετά από ένα περιπροσθετικό κάταγμα. Η διατριβή διαβαθμίζει τη βασική υπόθεση της βελτίωσης της ποιότητας του αλλομοσχεύματος σε τέσσερα επίπεδα. Στην πρώτη μελέτη η τεχνική περιγράφεται στον άνθρωπο. Το μόσχευμα που χρησιμοποιείται είναι το φρέσκο αλλομόσχευμα από υγιείς δότες. Η μελέτη αυτή οδηγεί στην διατύπωση της υπόθεσης της δεύτερης μελέτης όπου προτείνεται η ανοσολογική βελτίωση του αλλομοσχεύματος με τη μέθοδο της αποασβεστοποίησης, αλλά και η επαύξηση της οστεοεπαγωγικής του ικανότητας με την προσθήκη του OP-1 στο κυτταρικό επίπεδο. Η μελέτη αυτή γεννά και την παράλληλη υπόθεση της εναλλακτικής χρήσης ενός βιοϋλικού, του υδροξυαπατίτη, που αποτέλεσε την τρίτη μελέτη και αυτή στο κυτταρικό επίπεδο. Τέλος τα αποτελέσματα των μελετών I και II προκάλεσαν τη διατύπωση της υπόθεσης της τέταρτης μελέτης όπου τα εναλλακτικά μόσχευμα που προτείνονται στην μελέτη II συγκρίνονται με το φρέσκο αλλομόσχευμα που χρησιμοποιείται στη μελέτη I στο επίπεδο της πειραματικής χειρουργικής στο μοντέλο του αρουραίου τύπου Wistar. Έτσι ο κύκλος της αρχικής υπόθεσης της βελτίωσης του πακτωμένου αλλομοσχεύματος με τη χρήση της τεχνικής της αποασβεστοποίησης και της προσθήκης του OP-1, κλείνει με τη μελέτη IV, δημιουργώντας ένα σύνολο άλλων ερωτημάτων που οφείλουν να απαντηθούν πριν την μεταφορά των τεχνικών αυτών από τα πειραματόζωα στον άνθρωπο, όπως θα συζητηθεί επιμέρους παρακάτω.

## ΜΕΛΕΤΗ Ι. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΗΡΙΑΙΟΥ ΟΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ

Είναι σαφές ότι στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου, θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν η προσωπικότητα του κατάγματος, η σταθερότητα της πρόθεσης και η ποιότητα του περιβάλλοντος οστού (Brady et al, 1999; Tsiroidis et al, 2003b). Περιπροσθετικά κατάγματα γύρω από ασταθείς προθέσεις, με κακή ποιότητα περιβάλλοντος οστού απαιτούν αναθεώρηση της πρόθεσης και αντικατάσταση του εγγύς μηριαίου, είτε με μαζική μεταλλική πρόθεση όπως αυτή που χρησιμοποιείται στην ορθοπαιδική ογκολογία (εικόνα 10 και εικόνα 11) ή με οστική αναδόμηση-επανόρθωση του εγγύς μηριαίου (εικόνα 14 και εικόνα 15). Στην τελευταία περίπτωση η πρόσφατη βιβλιογραφία συνιστά αναδόμηση είτε με τη μαζική αντικατάσταση, με αλλομόσχευμα του εγγύς μηριαίου είτε με πλάκες φλοιώδους αλλομοσχεύματος που περιβάλλουν το ασθενές οστό. Τα μαζικά αλλομοσχεύματα έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και υπάρχει σαφής ένδειξη, σε μελέτες με μακρό χρόνο παρακολούθησης, ότι ενσωματώνονται τελικά με το δέκτη (Bethea et al, 1982; Head et al, 1999; Wong and Gross, 1999; Berry, 2000). Εξωμυελική ενίσχυση, με πλάκες φλοιώδους αλλομοσχεύματος, έχει επίσης εκτεταμένα δοκιμαστεί τα τελευταία χρόνια. Το βιολογικό και εμβιομηχανικό αποτέλεσμα καθώς και η ανοσολογική αντίδραση από την αλλομεταμόσχευση αυτών των πλακών έχει μελετηθεί σε *in vivo* πειράματα αλλά και στον άνθρωπο και είναι μια σαφώς αποδεκτή μέθοδος επανορθωτικής χειρουργικής του ισχίου στη βιβλιογραφία (Emerson, 2000; Haddad et al, 2002; Haddad and Duncan, 2003). Η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος έχει πρόσφατα εισαχθεί στην ορθοπαιδική βιβλιογραφία κυρίως για την αναθεώρηση του μηριαίου και της κοτύλης (Slooff et al, 1984). Αρχικά σχεδιάστηκε ως τεχνική της ανάπλασης της κοτύλης κατά την αναθεώρηση της πρόθεσης του ισχίου. Η τεχνική επεκτάθηκε στην αναθεώρηση του μηριαίου, και πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε με μηριαίο στέλεχος χωρίς τσιμέντο στο νοσοκομείο του Exeter της Αγγλίας (Gie et al, 2003). Αργότερα μηριαία πρόθεση με τσιμέντο αντικατέστησε την χωρίς τσιμέντο, καθώς

φάνηκε σχετικά νωρίς ότι η τελευταία προσέφερε μεγαλύτερη σταθερότητα στο ισχίο. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, φρέσκο παγωμένο αλλομοσχευμα, με μορφή μικρών τεμαχίων σπογγώδους ή φλοιοσπογγώδους οστού, ενσφηνώνονται στον μηριαίο αυλό και σχηματίζουν ένα νέο αυλό το "νέο-ενδόστεο". Μέσα στο "νέο-ενδόστεο" εισαγόταν με τσιμέντο η νέα πρόθεση. Τα πρώιμα αποτελέσματα της τεχνικής ήταν πολύ ενθαρρυντικά (Gie et al, 1993; Elting et al, 1995; Nelissen et al, 1995), αλλά πρόσφατα κάποιες σειρές παρουσίασαν επιπλοκές, όπως διεγχειρητικά και μετεγχειρητικά περιπροσθητικά κατάγματα καθώς και βύθιση της πρόθεσης (subsidence) λόγω απορρόφησης του αλλομοσχεύματος (Eldridge et al, 1997; Masterson et al, 1997; Meding et al, 1997; Pekkarinen et al, 2000). Η βιολογική και εμβιομηχανική επάρκεια της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος έχει εκτεταμένα μελετηθεί. Η ικανότητα του σπογγώδους αλλομοσχεύματος να επιβιώνει, να αναπλάθεται και να επαναγγειώνεται έχει δειχθεί και είναι βιολογικά κατανοητή (Roffman et al, 1982; Ling et al, 1993; Berzins et al, 1996; Brewster et al, 1999; Giesen et al, 1999; Ullmark and Nilsson, 1999; Callaghan et al, 2000; Linder, 2000; Bavadekar et al, 2001; Hostner et al, 2001; Weidenhielm et al, 2001; Ullmark and Obrant, 2002). Οι Roffman et al (1982) έδειξαν ότι το οστικό αλλομοσχευμα ακόμα και όταν είναι επενδυμένο με μεθυλμεθακρυλικό τσιμέντο, παραμένει ζωντανό και διατηρεί την οστεογενετική του ικανότητα. Οι Ling et al (1993) βρήκαν ότι το πακτωμένο αλλομοσχευμα οργανώνεται σε τρεις ζώνες. Η εξωτερική ζώνη αντικαθίσταται σε μεγάλο βαθμό από ζωντανό φλοιώδες οστό (Berzins et al, 1996; Ullmark and Obrant, 2002). Η μηχανική αντοχή και συμπεριφορά, των τεμαχίων του πακτωμένου αλλομοσχεύματος κατά την ενσφήνωση, έχει επίσης μελετηθεί και βελτίωση έχει επιτευχθεί τόσο στο μέγεθος, όσο και στις δυνάμεις ενσφήνωσης του οστού αλλά και της επακόλουθης συμπίεσης του τσιμέντου (Roffman et al, 1982; Giesen et al, 1999; Callaghan et al, 2000). Ωστόσο το μέγιστο πλεονέκτημα της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος είναι η βιολογική ικανότητα επαναγγείωσης και η πλαστικότητα του σπογγώδους οστού στην επανόρθωση της οστικής μάζας του δέκτη οστού, που τελικώς επιτρέπουν την χρήση συμβατικών προθέσεων με τσιμέντο. Η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος προτείνεται ως μέθοδος θεραπείας για τους ασθενείς με

σοβαρή απώλεια της οστικής μάζας του εγγύς μηριαίου από τους Leopold και Rosenberg (2000) σε έναν αλγόριθμο που πρόσφατα δημοσίευσαν, για την ανακατασκευή του μηριαίου, στην αναθεώρηση της αρθροπλαστικής του ισχίου. Πιο συγκεκριμένα οι δυο συγγραφείς συνέστησαν ότι, όταν η διάμετρος του μηριαίου αυλού είναι πάνω από 20mm και υπάρχουν λιγότερα από 4cm στο μήκος άθικτης διάφυσης, για την χρήση πρόθεσης χωρίς τσιμέντο που ενσφηνώνεται πιεστικά στο τοίχωμα του αυλού της διάφυσης (press-fit), τότε η μοναδική λύση για την αναδόμηση του αυλού είναι το πακτωμένο αλλομόσχευμα. Η περιγραφή αυτή αντικατοπτρίζει στο μεγαλύτερο βαθμό την εμπειρία από τα περιπροσθετικά κατάγματα, που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή. Η μελέτη της πρωτοποριακής αυτής τεχνικής παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία μέσω αυτής της διατριβής. Μετά από εκτεταμένη έρευνα σε βάσεις δεδομένων (PubMed, EmBase, Cochrane Library) και έρευνα σε περιοδικά σε όλες τις γλώσσες δεν βρέθηκε προηγούμενη κλινική μελέτη που να εξετάζει το πακτωμένο αλλομόσχευμα για τη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού. Αυτό σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό ασθενών της μελέτης (106 κατάγματα) και το γεγονός ότι η μελέτη προέρχεται από τους εισηγητές της αρχικής μεθόδου του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στη βιβλιογραφία, πριν 11 χρόνια, στο κέντρο αναφοράς για την αρθροπλαστική του ισχίου στο Exeter (Princess Elizabeth Orthopaedic Centre, Royal Devon and Exeter Hospital, UK), καθιστούν τη μελέτη αυτή σημαντική στο πεδίο της επανορθωτικής χειρουργικής του ισχίου.

Αρχικά, μέχρι το 1996, η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού περιελάμβανε τη χρήση τεμαχίων φρέσκου παγωμένου αλλομοσχεύματος από σπογγώδες οστό μεγέθους 2-4mm και λεπτό μεταλλικό πλέγμα για την επικάλυψη των οστεολυτικών κενών με τη συλλογή μέσα σε αυτό του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Το μηριαίο στέλεχος της αναθεώρησης σπάνια ξεπερνούσε την άπω γραμμή του κατάγματος, ώστε να παρέχει ενδομυελική σταθερότητα στην κατασκευή και, ως εκ τούτου, το κάταγμα συγκρατούνταν και παρέμενε αναταγμένο μόνο με το πλέγμα ή την πλάκα εσωτερικής

οστεοσύνθεσης που χρησιμοποιούνταν επικαλυπτικά (εικόνα 14). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η τεχνική αυτή απέτυχε τις περισσότερες φορές να προσφέρει ικανοποιητική πόρωση του κατάγματος. Έξι από τους δεκατέσσερις ασθενείς (42.85%) που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα, απέτυχαν να καταλήξουν σε πόρωση του κατάγματος (εικόνα 16γ και εικόνα 19γ), 4 λόγω επανάληψης του κατάγματος και 2 λόγω σήψης (πίνακας 10). Με βάση αυτήν την αρχική παρατήρηση και δεδομένα από πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες, η τεχνική τροποποιήθηκε και από το 1996 μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται διαφορετικού μεγέθους οστικά τεμάχια για το εγγύς μηριαίο και διαφορετικά για το άπω μηριαίο καθώς επίσης και μακρά στελέχη με τσιμέντο για την αναθεώρηση της μηριαίας πρόθεσης (Brewster et al, 1999; Giesen et al, 1999; Ullmark and Nilsson, 1999; Bavadekar et al, 2001; Hostner et al, 2001; Weidenhielm et al, 2001; Ullmark and Obrant, 2002). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται τεμάχια 2-4mm για το άπω μηριαίο και τεμάχια >4mm για τον εγγύς μηριαίο. Ειδικές τεχνικές, όπως πώμα τσιμέντου ή ειδικός πλαστικός αναστολέας τσιμέντου (cement restrictor) που πολλές φορές στερεώνεται στη θέση του και συγκρατείται κατά τη διάρκεια την ενσφήνωσης με δυο διασταυρούμενα σύρματα (K-wires), χρησιμοποιούνται για το φραγμό του μηριαίου αυλού, ώστε να επιτυγχάνεται η ενσφήνωση του μοσχεύματος και η είσοδος του στελέχους της αναθεώρησης με τσιμέντο. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η νέα αυτή τεχνική δίνει μεγαλύτερα ποσοστά πόρωσης του κατάγματος. Εξήντα έξι (66) από τους εβδομήντα πέντε (88%) ασθενείς που θεραπεύτηκαν με μακρά πρόθεση με τσιμέντο και πακτωμένο αλλομόσχευμα οδηγήθηκαν σε πόρωση σε μέσο χρόνο 7.44 μήνες. Συγκρίνοντας τις δυο διαφορετικές μεθόδους βρήκαμε ότι αυτοί, που θεραπεύτηκαν με μακρά πρόθεση και πακτωμένο αλλομόσχευμα, είχαν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάσουν πόρωση, σε σχέση με αυτούς, που θεραπεύτηκαν με βραχύ στέλεχος και πακτωμένο αλλομόσχευμα (odds ratio=5.5, 95% CI: 1.54-19.6 p=0.009). Από βιολογικής άποψης, όταν ένα περιπροσθετικό κάταγμα συμβαίνει γύρω από ένα ασταθές στέλεχος, με κακή ποιότητα περιβάλλοντος οστού, τότε η πόρωση αυτού του κατάγματος δυσχεραίνεται από δυο παράγοντες: από την κακή ποιότητα του οστού (έλλειψη διαθέσιμων οστεοκυττάρων) και από τη σχετική αστάθεια της πρόθεσης, που

εμποδίζει την πόρωση λόγω συνεχούς κίνησης μέσα στον αυλό του μηριαίου. Έτσι λοιπόν η βιολογική και εμβιομηχανική απάντηση για την αποτελεσματική θεραπεία αυτών των καταγμάτων βρίσκεται στην ενίσχυση του ασθενούς οστού με μόσχευμα, στην αποκατάσταση της σταθερότητας της πρόθεσης και στη διατήρηση της ανάταξης του κατάγματος. Η αντικατάσταση του εγγύς μηριαίου από μαζικό φλοιώδες αλλομόσχευμα ή η χρήση φλοιώδους αλλομοσχεύματος με τη μορφή πλακών για τη στήριξη του εγγύς μηριαίου, χρησιμοποιούνται με επιτυχία, αλλά είναι γνωστό ότι η είσοδος των νεοαγγείων είναι ιδιαίτερα δύσκολη και αργή μέσα στο συμπαγές αλλομόσχευμα και σε πολλές περιπτώσεις ημιτελής (Enneking and Mindell, 1991; Huo et al, 1992; Emerson, 2000). Εναλλακτική μορφή αλλομεταμόσχευσης αποτελεί η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Παρουσιάζει το συγκριτικό πλεονέκτημα της πλαστικότητας στην αναδόμηση του οστού από μέσα προς τα έξω, καθώς χρησιμοποιούμε το συγκριτικά μαλακό σπογγώδες οστό, το οποίο επίσης επιτρέπει την εύκολη διείσδυση των νεοαγγείων στη μάζα του που επιτρέπει την σταδιακή ανάπλαση και αναδόμηση του νέου οστού (Slooff et al, 1999; Callaghan et al, 2000). Έτσι όχι μόνο άμεσα συμπληρώνεται η οστική μάζα που λείπει, άλλα και μακροχρόνια βελτιώνεται η βιολογική οστεοεπαγωγική ικανότητα του οστού και η δυνατότητα πόρωσης του κατάγματος. Επιπρόσθετα είναι πολύ σημαντική η διαμεσολάβηση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος μεταξύ οστού και τσιμέντου, καθώς εμποδίζει την έξοδο του τσιμέντου μεταξύ των καταγματικών επιφανειών που, όπως είναι γνωστό, αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες μη πόρωσης. Η παρουσία πλακών (μεταλλικών ή βιολογικών-οστέινων) βοηθά στην ανάταξη του κατάγματος, στη σταθερότητα της όλης κατασκευής και, τελικώς, στην πόρωση του κατάγματος. Ακόμη η παρουσία των πλακών βοηθά, ώστε το πακτωμένο αλλομόσχευμα να διατηρείται στη θέση του και να καλύπτει τα οστικά κενά του οστού-δέκτη. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η χρήση διαφόρων πλακών αλλά είναι δύσκολο να καταλήξουμε σε στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα των επιμέρους πλακών λόγω του μικρού αριθμού αυτών κατά κατηγορία. Ωστόσο στον πίνακα 8β βλέπουμε όλα τα κατάγματα που θεραπεύτηκαν με μακρύ στέλεχος, με πακτωμένο αλλομόσχευμα και φλοιώδες αλλομόσχευμα με μορφή πλάκας

πωρώθηκαν, ενώ στις 2 περιπτώσεις, όπου χρησιμοποιήθηκε βραχύ στέλεχος και φλοιώδες αλλομόσχευμα, μόνο το ένα κατάγμα τελικώς πωρώθηκε. Η εμπειρία μας από τη θεραπεία αυτών των καταγμάτων συνιστά ότι η σταθερότητα της ανάταξης των περιπροσθετικών καταγμάτων με τη χρήση του πακτωμένου αλλομοσχεύματος θα πρέπει να βασίζεται σε ενδομυελική αλλά και σε εξωμυελική οστεοσύνθεση. Η εξωμυελική οστεοσύνθεση μπορεί να επιτευχθεί με βιολογικές (πχ. φλοιώδες αλλομόσχευμα) ή μη βιολογικές μεθόδους (πλάκες, βίδες και κυκλοτερή σύρματα). Η ενδομυελική οστεοσύνθεση από την άλλη επιτυγχάνεται και διατηρείται με μακρύ μηριαίο στέλεχος που θα πρέπει να ξεπερνά σε μήκος την άπω γραμμή του κατάγματος.

### **ι Συμπέρασμα και κλινική σημασία της μελέτης**

Κατά την αναθεώρηση του ισχίου με την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος για τη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων, είναι απαραίτητο να ξεπερνάμε την άπω γραμμή του κατάγματος. Τα βραχέα στελέχη δεν επιτυγχάνουν πώρωση λόγω αδυναμίας στήριξης του οστού και ως εκ τούτου αστάθειας. Απαιτείται τουλάχιστον ένας χρόνος, ώστε το πακτωμένο αλλομόσχευμα να ενσωματωθεί με το περιβάλλον οστό (Slooff et al, 1999; Callaghan et al, 2000; Leopold and Rosenberg, 2000). Κατά συνέπεια σε βραχύ χρονικό διάστημα μετά την επέμβαση το πακτωμένο αλλομόσχευμα προσφέρει σχετική μόνο σταθερότητα, συνήθως όχι αρκετή για την πώρωση του κατάγματος. Αντίθετα σε μακρό χρονικό διάστημα αναμένεται ενίσχυση του οστού και ανάπλαση της ελλειμματικής μάζας αυτού, που θα προσδώσει μεγαλύτερη σταθερότητα σε όλη την κατασκευή. Συνιστούμε λοιπόν τη χρήση της τεχνικής του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων τύπου B2 και B3, αλλά πάντοτε με την αναθεώρηση με μακρύ στέλεχος, που να ξεπερνά την άπω γραμμή του κατάγματος και εξωμυελική στήριξη με τη μορφή βιολογικής ή τεχνητής πλάκας, όπου αυτό είναι απαραίτητο.



## **ii Η γένεση της υπόθεσης της βελτίωσης της οστεοεπαγωγικής ικανότητας του πακτωμένου αλλομοσχεύματος**

Ακόμη και με τις ιδανικές τεχνικές λεπτομέρειες, που περιγράφηκαν με ακρίβεια πιο πάνω, το τελικό αποτέλεσμα σε ότι αφορά την πώρωση των καταγμάτων αυτών ήταν 88% και ο χρόνος πώρωσης έφτανε τις περισσότερες φορές τους 12 μήνες (Sloof et al, 1999; Callaghan et al, 2000; Leopold and Rosenberg, 2000). Καθώς λοιπόν εξαντλούνται οι τεχνικές μέθοδοι βελτίωσης της πώρωσης αυτών των καταγμάτων, το ενδιαφέρον μετατοπίζεται προς τις βιολογικές μεθόδους. Αναμφισβήτητα ένα μεγάλο μέρος της ευθύνης, για την υπολειπόμενη πώρωση των περιπροσθετικών καταγμάτων, που θεραπεύονται με τη μέθοδο του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, έχει το ίδιο το αλλομόσχευμα. Η ανοσολογική αντίδραση που αναμφίβολα προκαλεί ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αποτυχία ή και την καθυστέρηση της πώρωσης (Urist et al, 1975; Friedlaender et al, 1976, 1999; Friedlaender and Horowitz, 1992). Ασφαλώς σύντομα μετά την οστεομεταμόσχευση, νέο οστό παράγεται από το περιβάλλον οστικό υπόστρωμα (από το οστό-δέκτη) που προσανατολίζεται και ωριμάζει μέσα στο εκμαγείο του αλλομοσχεύματος. Έτσι το αλλομόσχευμα διατηρώντας την οστεοαγωγιμότητά του ως εκμαγείο, εξυπηρετεί την οστεογένεση μέχρι ενός βαθμού (Ling et al, 1993; Brewster et al, 1999; Giesen et al, 1999; Ullmark and Nilsson, 1999; Linder, 2000; Bavadekar et al, 2001; Hostner et al, 2001; Weidenhielm et al, 2001; Ullmark and Obrant, 2002). Είναι άγνωστο τι συμβαίνει στη λεπτή ισορροπία μεταξύ ανοσοποιητικής αντίδρασης και οστεοαγωγιμότητας του αλλομοσχεύματος (Friedlaender and Horowitz, 1992; Sun et al, 1998). Είναι όμως σαφές ότι ένας υγιής οστικός δέκτης παρουσιάζει ανεπτυγμένες ταυτόχρονα και τις δύο δραστηριότητες, δηλαδή την ικανότητα παραγωγής μακροφάγων για την απόρριψη του μοσχεύματος και την ικανότητα παραγωγής οστεοκυττάρων για την επένδυση του μοσχεύματος. Ο εύλογος βιολογικός χειρισμός για την βελτίωση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της πώρωσης θα ήταν η ελάττωση του αντιγονικού φορτίου του αλλομοσχεύματος (και άρα η ελάττωση της ανοσοποιητικής αντίδρασης εναντίον του) και η ενίσχυση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας του περιβάλλοντος οστού-δέκτη, ώστε, όχι μόνο να

βελτιωθεί η οστεοαγωγιμότητα του αλλομοσχεύματος αλλά, επιπρόσθετα, να επαυξηθεί με την προαγωγή της οστεοεπαγωγής. Τα δύο αυτά ερωτήματα τέθηκαν ως υπόθεση στη μελέτη II, όπου το αλλομόσχευμα αποασβεστοποιείται, ώστε να ελαττωθεί η αντιγονικότητα του αλλά και ταυτόχρονα να βελτιωθεί η οστεοεπαγωγική του ικανότητα. Επίσης ταυτόχρονα προστίθεται ανασυνδυασμένη ανθρώπινη μορφογενετική πρωτεΐνη - 7 (OP-1) για να επιτύχουμε ακόμα μεγαλύτερη επαύξηση της οστεοεπαγωγής. Χρησιμοποιήσαμε ένα εργαστηριακό μοντέλο πάκτωσης του μοσχεύματος για να επιτύχουμε εξομοίωση με την κλινική πραγματικότητα. Το σημαντικότερο όμως στοιχείο στη συζήτηση της *in vitro* μελέτης II, που ακολουθεί, είναι η χρήση ανθρωπίνων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών, υγιών δοτών και ανθρωπίνου οστού. Το ίδιο ερώτημα τέθηκε ως υπόθεση της μελέτης III, μόνο που αυτή τη φορά αντί αλλομοσχεύματος χρησιμοποιήσαμε υδροξυαπατίτη, που αποτελεί ένα αξιόπιστο βιοϋλικό, με συμβατότητα και αποδεδειγμένη ικανότητα οστεοαγωγής αλλά και ήπιας οστεοεπαγωγής. Τέλος το αμάλγαμα των πιο πάνω μελετών και συμπερασμάτων δοκιμάστηκε ως υπόθεση στη μελέτη IV στο ζωικό μοντέλο (*in vivo*).

## **ΜΕΛΕΤΗ II. ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ. *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ rhOP-1 ΣΤΟ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΣΤΟ**

Ο κύριος σκοπός του πρώτου εργαστηριακού πειράματος ήταν να καταδείξει κατά ποσό είναι εφικτό να βελτιωθούν οι οστεοεπαγωγικές ικανότητες του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, που χρησιμοποιείται στην επανορθωτική χειρουργική του ισχίου. Η φιλοσοφία της υπόθεσης βασίζεται στην προσπάθεια ανατροπής της βιολογικής αρχής της απόρριψης του φρέσκου αλλομοσχεύματος από το οστό-δέκτη, δραστηριότητα που είναι αναμενόμενη, καθώς το αλλομόσχευμα διαθέτει όλα τα αντιγονικά στοιχεία του γενετικά ξένου δοτή (ερυθρά αιμοσφαίρια, λιποκύτταρα, πρωτεΐνες)

(Tagil, 2000; Swenson and Arnoczky, 2003). Οι Sun et al (1998) σε μια μελέτη, όπου χρησιμοποίησαν αποασβεστοποιημένο οστό ποντικών, έδειξαν ότι η ανοσολογική απόρριψη του αλλομοσχεύματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της αποασβεστοποίησης του. Η τρέχουσα υπόθεση της μελέτης II είναι ότι μέθοδοι ελάττωσης του αντιγονικού φορτίου του φρέσκου αλλομοσχεύματος, όπως η αποασβεστοποίηση με το υδροχλωρικό οξύ και η προσθήκη οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων, όπως η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη -7, μπορεί να προσφέρουν μια βιολογικά πληρέστερη και ανοσολογικά πιο αποδεκτή λύση στο πρόβλημα της βιοσυμβατότητας του πακτωμένου φρέσκου οστικού αλλομοσχεύματος, στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του ισχίου, αλλά και γενικότερα. Η μοναδικότητα της μελέτης αυτής βρίσκεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούνται κύτταρα του ανθρώπινου μυελού των οστών και ανθρώπινο αλλομόσχευμα. Ο συνδυασμός των πιο πάνω με την ανθρώπινη ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη - 7 (OP-1) στο *in vitro* αυτό πείραμα, προσφέρει ένα μοντέλο παρόμοιο των πραγματικών συνθηκών που ισχύουν στον άνθρωπο, αλλά, βέβαια, σε διαφορετική κλίμακα. Υπάρχει μία πληθώρα πρόσφατων μελετών αναφορικά με την δυνατότητα της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών σε μοντέλα ζώων, όπως του αρουραίου (Cheifetz et al 1996; Ohgushi et al 1996; Asahina et al 1993; Noshi et al 2000; Yoshikawa et al, 2000a; Andrades et al, 2001), του ποντικού (Chen et al, 2001), του προβάτου (Klein-Nulend et al, 1998), του χοίρου (Thomson et al, 1993), του κουνελιού (Green et al, 1986; Johnstone et al 1998) και του σκύλου (Cook et al, 1994) και επίσης σε διάφορες εμπορικά διαθέσιμες σειρές πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων (Cheng et al, 2003). Ελάχιστες ωστόσο μελέτες έχουν παρουσιάσει αποτελέσματα από την χρήση πρώιμων ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων και προέρχονται κυρίως από την Ευρώπη και την Ιαπωνία καθώς η νομοθεσία στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής έχει πρόσφατα περιορίσει την έρευνα σε ανθρώπινα κύτταρα του μυελού των οστών. Έτσι οι Klein-Nulend et al (1998) από την Ολλανδία διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός πρώιμων ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιostίου και OP-1 ενίσχυσε την χονδρογένεση *in vitro*, ενώ οι Oreffo et al (1997) από την Οξφόρδη έδειξαν *in vitro* ότι το

BMP-2 και το BMP-7 ενισχύουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των πρώιμων ανθρωπίνων μεσεγχοματικών κυττάρων όταν συνδυαστούν με τη δεξαμεθαζόνη και τη βιταμίνη D3. Επίσης οι Liu et al (1999) πρόσθεσαν ότι το TFG-β με τη βιταμίνη D3 ενισχύουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Το αποτέλεσμα της μελέτης II δείχνει ότι το DBM και το ICBM μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οστικά μοσχεύματα-εκμαγεία-φορείς καθώς διαθέτουν ικανότητες οστεοαγωγιμότητας. Επιπρόσθετα η επεξεργασία τους με υδροχλωρικό οξύ ελαττώνει αναμφισβήτητα το αντιγονικό τους φορτίο, ενώ στην περίπτωση του DBM επαυξάνει την οστεοεπαγωγή, καθώς αποκαλύπτει τις φυσικές οστεογενετικές πρωτεΐνες στον κολλαγονικό σκελετό του. Επιπρόσθετα στη μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε η εγγενής ικανότητα του DBM και του OP-1 από μόνα τους να προκαλούν οστεογένεση σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία (Togawa et al, 2004; Chen et al, 2001). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι το DBM+OP-1 προκαλεί οστεοβλαστική φαινοτυπική διαφοροποίηση των οστεοπρογενετικών κυττάρων του ανθρώπινου μυελού των οστών. Το εύλογο συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι η χρήση του DBM+OP-1 μπορεί, ενδεχομένως, να αντικαταστήσει το φρέσκο πακτωμένο αλλομόσχευμα στην θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων. Το συμπέρασμα αυτό θα αποτελέσει αργότερα την υπόθεση στην μελέτη IV, όπου απευθείας συγκρίνεται το DBM+OP-1 με το φρέσκο αλλομόσχευμα σε *in vivo* μοντέλο στους αρουραίους. Στη μελέτη II η οστεοαγωγιμότητα του DBM και του ICBM καταδείχθηκαν ποιοτικά με τη χρήση του SEM. Είναι απαραίτητη προϋπόθεση κάθε οστικού υποκαταστάτου να διαθέτει αυτή την βασική ικανότητα, δηλαδή του να φιλοξενεί αλλά και να διευκολύνει την προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια του. Οι Peel et al (2003) έδειξαν ότι το DBM είναι ο ιδανικός φορέας MSCs (C2C12 κυτταρική σειρά), ενώ οι Han et al (2003) έδειξαν ότι το DBM προκαλεί οστεογένεση όταν συνδυαστεί *in vitro* με την κυτταρική σειρά C2C12. Το DBM επίσης παρουσίασε καλύτερη οστεοαγωγιμότητα σε σχέση με τον H/A και το τριφωσφορικό ασβέστιο (Kasten et al, 2003). Ένα σύνολο μελετών παρουσιάζουν επίσης αποτελέσματα από τη χρήση του ICBM ως εκμαγείου-φορέα πρώιμων μεσεγχοματικών κυττάρων (Sampath and Reddi, 1981; Ripamonti and Reddi,

1994; Cunningham et al, 1999; Geesink et al, 1999). Στη μελέτη II, MSCs παρατηρήθηκαν προσκολλημένα και στους δυο τύπους μοσχεύματος από τις πρώτες 24 ώρες. Επίσης οι εικόνες από τη σαρωτική ηλεκτρονική μικροσκοπία (SEM) έδειξαν ότι η προσθήκη του OP-1 αύξησε τον αριθμό των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στα μοσχεύματα τις ημέρες 7 και 14. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιβραδύνθηκε στα μη ενισχυμένα με OP-1 μοσχεύματα κατά τη 14<sup>η</sup> ημέρα. Αντίθετα παρέμεινε υψηλός στα ενισχυμένα με OP-1 μοσχεύματα, όπως θα συζητηθεί διεξοδικά πιο κάτω. Η διεγερτική δράση του OP-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αξιολογήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με τις μεθόδους Alamar Blue και <sup>3</sup>H-TdR. Σε όλα τα χρονικά σημεία (ημέρα 1,7, 14 και 21) η δοκιμασία Alamar Blue έδειξε ότι τα μοσχεύματα που είχαν ενισχυθεί με OP-1 είχαν στατιστικά σημαντική υπεροχή ( $p \leq 0.05$ ) σε σχέση με τα μη ενισχυμένα μοσχεύματα. Η ίδια στατιστικά σημαντική υπεροχή παρατηρήθηκε και με τη δοκιμασία <sup>3</sup>H-TdR για το DBM, σε όλα τα χρονικά σημεία, ενώ για το ICBM παρατηρήθηκε διαφορά μόνο στις απόλυτες τιμές με υπεροχή των ενισχυμένων με OP-1 δειγμάτων, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Η σημαντικότερη παρατήρηση, όμως, ήταν ότι η προσθήκη του OP-1 ανέτρεψε την αναμενόμενη καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού προς όφελος της διαφοροποίησης, όπως συμβαίνει στα μη ενισχυμένα με OP-1 δείγματα. Η ανατροπή του φυσιολογικού αυτού φαινομένου είναι ιδιαίτερης κλινικής αξίας καθώς μπορεί να σημαίνει επιτάχυνση της οστεογένεσης. Ωστόσο εγείρει και ένα σύνολο εύλογων ερωτημάτων που θα πρέπει να απαντηθούν, όπως αυτά της θετικής ή αρνητικής ανατροφοδότησης των ομοιοστατικών μηχανισμών του κυττάρου, με επίκεντρο τη νεοπλασματική δράση του OP-1.

Μετά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η μελέτη εξέτασε την ικανότητα διαφοροποίησης των MSCs σε οστεοβλάστες πάνω στην επιφάνεια του DBM και ICBM υπό την επίδραση ή όχι του OP-1. Ως δείκτης της διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία της δραστηριότητας της ALP. Κατά την έναρξη της μελέτης τα MSCs χαρακτηρίστηκαν επιτυχώς ως προς την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ιστολογικής χρώσης των

κυττάρων για την ALP. Υπενθυμίζουμε ότι όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε οστεογενετικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, αποδείχθηκαν θετικά για τη χρώση της ALP. Αντίθετα, όταν τα MSC καλλιεργήθηκαν στο κλασικό-μη οστεογενετικό μέσο καλλιέργειας, τα κύτταρα αποδείχθηκαν αρνητικά για τη χρώση της ALP. Η δοκιμασία αυτή δείχνει ότι τα MSC έχουν την δυνατότητα κάτω από ειδικές συνθήκες (οστεογενετικό μέσο) να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες. Σε όλη τη διάρκεια της μελέτης II χρησιμοποιήθηκε κλασικό-μη οστεογενετικό μέσο για τη καλλιέργεια των κυττάρων, και έτσι η διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλαστικό φαινότυπο αποδίδεται αποκλειστικά στις άλλες παραμέτρους της κυτταρικής καλλιέργειας, δηλαδή στο μόσχευμα (DBM, ICBM) ή στο OP-1. Τα δείγματα του DBM προκάλεσαν κυτταρική διαφοροποίηση σε όλα τα χρονικά σημεία (ημέρα 1, 7, 14) ανεξάρτητα με την προσθήκη ή όχι του OP-1. Αυτό αποδεικνύει την εγγενή οστεοεπαγωγική ικανότητα του DBM αλλά και την επιτυχή μερική αποασβεστοποίηση του αρχικού αλλομοσχεύματος που αποτέλεσε κυρίαρχη μέθοδο της μελέτης αυτής. Αυτό έχει πολλαπλά καταδειχθεί στην βιβλιογραφία (Berven et al, 2001; Chakkalakal et al, 2001; Sandhu et al, 2001; Gamradt et al 2003, Takikawa et al 2003) και ιδιαίτερα στην πειραματική σπονδυλοδεσία με τη χρήση του DBM μόνου ή σε συνδυασμό με αυτομόσχευμα (Juang Ming Yee et al, 2003) ή υδροξυαπατίτη (Thalgott et al, 2001, 2002). Οι Price et al (2003) από τη Φλόριδα των ΗΠΑ, έδειξαν την ικανότητα του DBM σε συνδυασμό με αναρρόφημα από τον ανθρώπινο μυελό των οστών να προάγει την οπίσθια σπονδυλοδεσία κατά τη διόρθωση της ιδιοπαθούς σκολίωσης 40 ασθενών, ενώ οι Rougraff and Kling (2002) θεράπευσαν 23 οστικές κύστες του εγγύς βραχιονίου με DBM και μυελό των οστών. Με την προσθήκη του OP-1 στο DBM η δραστηριότητα της ALP αυξήθηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ( $p \leq 0.05$ ) τις ημέρες 7 και 14 καταδεικνύοντας την διεγερτική δράση του OP-1 στη κυτταρική διαφοροποίηση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο ICBM+OP-1. Μόνο του το ICBM δεν έχει καμιά οστεοεπαγωγική δραστηριότητα λόγω της παντελούς έλλειψης αυξητικών πρωτεϊνών στην επιφάνεια του (πλήρης αποασβεστοποίηση). Έτσι, ενώ κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του ICBM, η διαφοροποίηση των MSC σε οστεοβλαστικό φαινότυπο δεν αποδείχθηκε με τη δοκιμασία

της αλκαλικής φωσφατάσης. Με την προσθήκη του OP-1 στο ICBM ωστόσο, η κυτταρική διαφοροποίηση πυροδοτήθηκε σε όλες τις ημέρες (1, 7, 14). Αυτό καταδεικνύει ακόμη μια φορά τη διεγερτική δράση του OP-1 στην διαφοροποίηση των κυττάρων. Συνολικά η ισχυρότερη ποσοτικά κυτταρική διαφοροποίηση, παρατηρήθηκε με τον συνδυασμό του DBM+OP-1, ενισχύοντας την υπόθεση της μελέτης ότι ο συνδυασμός των δύο μπορεί να οδηγήσει σε οστεοεπαγωγικό και οστεοπαραγωγικό εναλλακτικό αλλομόσχευμα. Το OP-1 έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Η χρήση του έχει δείχθει *in vitro* (Yeh et al, 2002), ενώ η έρευνα έχει πρόσφατα επικεντρωθεί στο μοντέλο της σπονυλοδεσίας (Grauer et al, 2001; Jenis et al, 2002), στη θεραπεία καταγμάτων και οστικών κενών κριτικού μεγέθους σε πειραματικό επίπεδο (Blokhuys et al, 2001; Salkeld et al, 2001; den Boer et al, 2002) και στη θεραπεία μη-πώρωσης της κνήμης στον άνθρωπο (Friedlaender et al, 2001). Πρόσφατα οι Vaccaro et al (2002) παρουσίασαν 12 ασθενείς, όπου χρησιμοποίησαν OP-1 και αυτομόσχευμα για την οπίσθια σπονδυλοδεσία χωρίς εσωτερική οστεοσύνθεση με διφορούμενα αποτελέσματα, ενώ κατέληξαν στο συμπέρασμα της βιοασφάλειας του OP-1. Το μείζων θέμα της βιοασφάλειας το επιβεβαίωσαν σε μια εμπειρισταωμένη μετα-ανάλυση, οι Roynton και Lane (2002). Οι Johnsson et al (2002) αντίθετα, υποστήριζαν ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ αυτομοσχεύματος και OP-1 σε μια προοπτική, τυχαιοποιημένη μελέτη οπίσθιας σπονδυλοδεσίας 20 ασθενών. Μόνο η ομάδα του Aspenberg από τη Σουηδία έχει επεκτείνει την πειραματική χρήση του OP-1 στην σκελετική αναδόμηση με ένα *in vivo* μοντέλο πακτωμένου αλλομοσχεύματος σε τρεις πρόσφατες μελέτες (Tagil, 2000; Tagil et al, 2000; Jerpsson et al, 2003). Η μελέτη II ανέπτυξε την ίδια υπόθεση χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό *in vitro* μοντέλο αλλά κυρίως με τη χρήση ανθρωπίνων κυττάρων και ανθρωπίνου αλλομοσχεύματος. Η ίδια υπόθεση εξετάστηκε αργότερα στην μελέτη III με τον υδροξυαπατίτη και στην μελέτη IV σε ένα διαφορετικό *in vivo* μοντέλο στους αρουραίους.

Αφού μελετήσαμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ξεχωριστά, ήταν σημαντικό να παρατηρήσουμε και τη σχέση μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων στα δύο

διαφορετικά μοσχεύματα. Έτσι για το DBM παρατηρήθηκε αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, ενώ ασφαλώς για το ICBM η διαφοροποίηση ήταν μηδενική. Η παρατήρηση της αντιστρόφως ανάλογης σχέσης, είναι συμβατή με τη φυσιολογία του κυττάρου κατά τρόπο ώστε οι δυο δραστηριότητες να μη συμβαίνουν ταυτόχρονα (Lian and Stein, 1992). Ωστόσο με την προσθήκη του OP-1 στο ICBM και στο DBM παρατηρήθηκε μια εντυπωσιακή αλλαγή στην δραστηριότητα των κυττάρων κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση αυξήθηκαν ταυτόχρονα και παράλληλα και στα δυο μοσχεύματα. Οι Chen et al (2001) έδειξαν την ταυτόχρονη ανατροφοδότηση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης με την προσθήκη του OP-1 σε μία πρόσφατη *in vitro* μελέτη χρησιμοποιώντας όμως κύτταρα ποντικού. Ακόμη, όπως αναμενόταν, ο συνδυασμός του DBM+OP-1 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική υπεροχή στην διαφοροποίηση σε σχέση με το συνδυασμό του ICBM+OP-1 σε όλα τα χρονικά σημεία (ημέρα 1:  $p=0.07$ , ημέρα 7:  $p<0.001$ , ημέρα 14:  $p=0.006$ ). Αυτό πιθανότατα αποδίδεται στις εγγενείς οστεοεπαγωγικές ιδιότητες του DBM και οφείλεται στη παρουσία φυσικών αυξητικών παραγόντων στην επιφάνειά του. Είναι πιθανόν λοιπόν ότι, το OP-1 προκαλεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση ταυτόχρονα, παρακάμπτοντας την πιθανή αρνητική ανατροφοδότηση που φυσιολογικά συμβαίνει μεταξύ των δύο φαινομένων. Αυτή βέβαια η παρατήρηση, πάρα το εντυπωσιακό στοιχείο της διέγερσης και της υπερδραστηριότητας των κυττάρων, ενέχει και το στοιχείο της παραβίασης της φυσιολογίας του κυττάρου με συνέπειες άγνωστες για τον οργανισμό. Στην τελευταία αυτή παρατήρηση πιθανόν να βασίζεται και ο σκεπτικισμός αναφορικά με τη νεοπλασματική δράση των αυξητικών παραγόντων στον ανθρώπινο οργανισμό με την αποδιοργάνωση των ελεγκτικών μηχανισμών της αρνητικής ανατροφοδότησης, την αντίδραση του ανοσοποιητικού μηχανισμού, την τοξικότητα, την οστεοκλαστική δραστηριοποίηση και τη δράση σε άλλα πλην του οστού όργανα (Poynton and Lane, 2002; Vaccaro et al, 2003). Επιπρόσθετα η χρώση Von Kossa των μοσχευμάτων κατά τη 14<sup>η</sup> μέρα επιβεβαίωσαν έμμεσα την οστεοβλαστική φαινοτυπική διαφοροποίηση καθώς μόνον οι ώριμοι οστεοβλάστες είναι σε θέση να προκαλέσουν ασβεστοποίηση. Με τη χρώση Von Kossa,



έγινε επίσης αντιληπτό ότι με την προσθήκη OP-1 στο DBM η ασβεστοποίηση ποιοτικά ενισχύθηκε σε σχέση με το DBM μόνο του. Επιπρόσθετα ο συνδυασμός του ICBM+OP-1 έδειξε εκτεταμένη ασβεστοποίηση παρόμοιας έκτασης με αυτή του DBM αλλά μικρότερης σε σχέση με αυτή του DBM+OP-1. Η χρώση ήταν αρνητική για το ICBM μόνο. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν τα πιο πάνω ευρήματα και επιβεβαιώνουν ότι το OP-1 διεγείρει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα ιδιαίτερα χαρακτηριστικές ήταν και οι ακτινολογικές εικόνες στις οποίες το πλήρως αποασβεστοποιημένο ICBM διακρίνεται μόνο αμυδρά (μόνο το περίγραμμα του οστικού μικροτεμαχίου) (εικόνα 41), ενώ με την προσθήκη του OP-1 το ICBM επανακτά σε σημαντικό βαθμό την ασβεστοποίηση (εικόνα 40) που παρατηρούμε στα άλλα μοσχεύματα (εικόνα 38 και εικόνα 39). Το DBM και το DBM+OP-1, αντίθετα, παρουσιάζουν εκσεσημασμένη ασβεστοποίηση.

Η μελέτη II παρουσιάζει την πρωτοτυπία ότι συνδυάζει ανθρώπινο αλλομόσχευμα με ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Το αλλομόσχευμα παρασκευάστηκε με ειδική τεχνική συμπίεσης ώστε να εξομοιώνεται η τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, που χρησιμοποιείται στην επανορθωτική χειρουργική του ισχίου. Η κλίμακα μεταξύ αυτής της *in vitro* μελέτης και του ανθρώπου είναι δυσανάλογη και πολλά ερωτήματα ανακύπτουν και αφορούν την δοσολογία του OP-1 (Ripamonti et al, 1996; Yeh et al, 2002) αλλά και την επίδραση του στα γονίδια που συμμετέχουν στην χονδρογένεση και οστεογένεση. Εύλογα ερωτήματα προκύπτουν, όπως αυτά της νεοπλασματικής διαφοροποίησης των κυττάρων καθώς και της αρνητικής ανατροφοδότησης, της αλληλοεπίδρασης μεταξύ διαφόρων αυξητικών παραγόντων και της συστηματικής επίδρασης στον υπόλοιπο οργανισμό. Ωστόσο το κυρίαρχο εύρημα της μελέτης II είναι ότι ένα νέο μοντέλο πακτωμένου αλλομοσχεύματος (DBM και ICBM) προτείνεται, με ισχυρή ένδειξη ότι αποτελεί μια συμβατή βιολογική λύση. Επιπρόσθετα η ενίσχυση του μοσχεύματος με OP-1 φαίνεται ότι επαυξάνει την επαγωγιμότητα και αγωγιμότητα του. Το επόμενο επίπεδο αναζήτησης είναι ασφαλώς το ποια είναι η διαφορά σε σχέση με το φρέσκο αλλομόσχευμα που

χρησιμοποιείται στην τρέχουσα ορθοπαιδική πρακτική. Η ερώτηση αυτή αποτελεί την υπόθεση της μελέτης IV, όπου η απάντηση εξετάζεται με τη σύγκριση των δύο μοντέλων σε *in vivo* πείραμα στους αρουραίους. Προ της τελικής αυτής μελέτης θα εξετάσουμε με τις ίδιες βιολογικές μεθόδους, που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη II, τη δεύτερη εναλλακτική λύση μοσχεύματος, που εξετάζεται σε αυτήν τη διατριβή, τον υδροξυαπατίτη, στη μελέτη III, που ακολουθεί.

### **ΜΕΛΕΤΗ ΙΙΙ. ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΣ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ ΜΕ ΠΡΩΙΜΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 1. *IN VITRO* ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ**

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν προκαλέσει διάφορα βιοϋλικά που τρόπον τινά μπορεί να αποτελέσουν οστικά υποκατάστατα. Καθώς οι ανάγκες για οστικό μόσχευμα αυξάνονται και η δυνατότητα αυτομεταμόσχευσης και αλλομεταμόσχευσης έχει σαφή προβλήματα όπως εκτεταμένα αναφέρεται στην εισαγωγή, το ερώτημα της χρήσης βιοϋλικών προκύπτει εμφαντικά (Chu et al, 2002; Wilson et al, 2004). Ο υδροξυαπατίτης είναι ένα βιοαπορροφήσιμο βιοϋλικό συμβατό με τον οργανισμό, που αποδεδειγμένα προκαλεί οστεοαγωγή (Stephenson, 1991; Soballe et al, 1992a, 1992b, 1992c) αλλά και ελαφρά οστεοεπαγωγή (Ripamonti et al, 2001). Η μορφολογία του και ιδιαίτερα η πορώδης μορφή του είναι σημαντικά χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την οστεογενετική του ικανότητα (Le Huec, 1995; Magan and Ripamonti, 1996; Gauthier et al, 1998). Βέβαια ο υδροξυαπατίτης παρουσιάζει πολύ μικρότερη αντοχή σε σχέση με το οστό και ως εκ τούτου η εφαρμογή του περιορίζεται σε μη φορτιζόμενες οστικές περιοχές (Geesink and de Groot, 1988). Ωστόσο είναι ενδιαφέρον να εξετάσουμε κατά πόσο μπορούμε να τροποποιήσουμε τις εγγενείς δυνατότητες του υδροξυαπατίτη και να επαυξήσουμε την οστεογενετική του ικανότητα. Πρόσφατα οι Yoshikawa et al (2000b) έδειξαν ότι ο υδροξυαπατίτης προκαλεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγχυματικών

κυττάρων του αρουραίου και ότι τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να προκαλέσουν οστεογένεση ετεροτοπικά όταν μεταμοσχευθούν στους κοιλιακούς μυς αρουραίων. Οι Noshi et al (2000), έδειξαν ότι ο συνδυασμός φυσικού BMPs με τον υδροξυαπατίτη και πρώιμα μεσεγχευματικά κύτταρα του μυελού των οστών του αρουραίου προκαλούν *de novo* οστεογένεση. Ασφαλώς τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν στο πολυχρησιμοποιημένο πειραματικό μοντέλο της οπίσθιας σπονδυλοδεσίας (Blatter et al, 2002, 2003) και στην πλήρωση κριτικών κενών (Lind et al, 2001; Jensen et al, 2002) αλλά σε περιορισμένη έκταση στον άνθρωπο όπου ο υδροξυαπατίτης έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με DBM ή αυτομόσχευμα στην πρόσθια και οπίσθια σπονδυλοδεσία με διαφορετικά αποτελέσματα (Thalgott et al, 2001, 2002). Στην περίπτωση της μελέτης III της παρούσας διατριβής, η αύξηση της οστεογενετικής ικανότητας του πακτωμένου υδροξυαπατίτη θα οδηγήσει στη παραγωγή περισσότερου και ωριμότερου οστού και θα δώσει απάντηση στην ελαττωμένη μηχανική αντοχή του βιοϋλικού αυτού που θα αποτελούσε μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση έναντι του αλλομοσχεύματος για εφαρμογές σε φορτιζόμενες οστικές περιοχές. Υπ' αυτήν την γενική έννοια στην *in vitro* μελέτη III επιλέξαμε τον υδροξυαπατίτη ως υποψήφιο βιοϋλικό, για να εξετάσουμε την υπόθεση της βελτιωμένης οστεογένεσης με την προσθήκη ανθρώπινων μεσεγχευματικών κυττάρων του μυελού των οστών και OP-1. Η μελέτη αυτή έχει την πρωτοτυπία του συνδυασμού ενός βιοϋλικού με ανθρώπινα κύτταρα και ανθρώπινο ανασυνδισμένο αυξητικό παράγοντα. Έτσι το μοντέλο του μοσχεύματος, που μελετούμε εδώ προσομοιάζει στο σενάριο της μεταμόσχευσης του βιοϋλικού στο ανθρώπινο μοντέλο ασφαλώς σε μικρότερη κλίμακα. Στην περίπτωση αυτή και σε αντίθεση με την *in vitro* μελέτη II η προετοιμασία των δισκίων έγινε με πολύ μεγαλύτερη δυσκολία λόγω της ευθρυπτότητας του υδροξυαπατίτη. Εδώ εφαρμόστηκε μικρότερη δύναμη συμπίεσης, ενώ τα δισκία πολλές φορές θρυμματιζόταν κατά τη μεταφορά τους στις κυτταρικές καλλιέργειες. Η προσομοίωση όμως αυτή είναι ευτυχώς αντιστρόφως ανάλογη της πραγματικότητας. Η ενσφήνωση υδροξυαπατίτη έχει δοκιμασθεί στην κλινική πράξη με επιτυχία μέχρι σήμερα, καθώς ο υδροξυαπατίτης συμπιέζεται εύκολα μέσα στις κοιλότητες των οστικών ελλειμμάτων και μάλιστα παρουσιάζει το συγκριτικό

πλεονέκτημα της πλαστικότητας λόγω ευθρυπτότητας. Έτσι στη μελέτη αυτή αποδεχθήκαμε την ανεπαρκή ενσφήνωση του πακτωμένου υδροξυαπατίτη στις πλάκες 96 εμβυθισμάτων και αγνοήσαμε την ευθρηπτότητα που παρουσιάζει. Όπως και στην προηγούμενη μελέτη εξετάσαμε τη βελτίωση της οστεοαγωγής και οστεοεπαγωγής ποιοτικά και ποσοτικά. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής καταδεικνύουν βελτίωση της οστεογενετικής ικανότητας του υδροξυαπατίτη (H/A) με την προσθήκη του OP-1 σε σύγκριση με τον H/A μόνο. Ο υδροξυαπατίτης απέδειξε την αξιοπιστία του ως βιοϋλικό επιτρέποντας πρώτα απ' όλα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην επιφάνειά του. Η δοκιμασία του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως έδειξε η δοκιμασία Alamar Blue και  $^3\text{HTdR}$ , ενισχύθηκε με την παρουσία του OP-1. Η διαφορά έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα την ημέρα 7 και 14 για τη δοκιμασία Alamar Blue (ημέρα 7:  $p=0.014$ , ημέρα 14:  $p=0.004$ ) και για τη δοκιμασία  $^3\text{H-TdR}$  σε όλες τις ημέρες (ημέρα 1:  $p=0.021$ , ημέρα 7:  $p=0.008$ , ημέρα 14:  $p=0.015$ ). Ο H/A μόνος του προκάλεσε κυτταρικό πολλαπλασιασμό σχεδόν εφάμιλλο του OP-1 μόνου του (H/A+MSCs σε σύγκριση με TMX+MSCs+OP-1), ωστόσο η ενίσχυσή του με OP-1 μόνο (H/A+ MSCs+OP-1) ξεπέρασε στατιστικά και τους δυο προηγούμενους συνδυασμούς. Η διαφοροποίηση επίσης των κυττάρων προς οστεοβλαστικό φαινότυπο ενισχύθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στα δείγματα του H/A με OP-1. Η παραγωγή ALP αυξήθηκε με το χρόνο (διαφοροποίηση), με μεγαλύτερη τιμή δραστηριότητας την 14<sup>η</sup> μέρα στα δείγματα του H/A με OP-1. Ωστόσο στατιστικά σημαντική υπεροχή επιβεβαιώθηκε στα δείγματα του H/A+OP-1 σε σχέση με τον H/A τις ημέρες 7 ( $p=0.001$ ) και 14 ( $p=0.004$ ). Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων εξελίσσονται με μορφή αντιστρόφως ανάλογη κατά το πρότυπο του DBM στη μελέτη II, ακόμη και κάτω από την επίδραση του OP-1. Έτσι, καθώς ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιβραδύνεται, η διαφοροποίηση επιταχύνεται, πράγμα που καταδείχθηκε και για το DBM. Στην εύλογη σύγκριση μεταξύ του DBM και του H/A σε ότι αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως θα σχολιάσουμε με λεπτομέρεια πιο κάτω στη συνολική αποτίμηση των υπό μελέτη μοσχευμάτων. Αντίθετα σε ότι αφορά την κυτταρική διαφοροποίηση στατιστικά σημαντική

διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ του DBM και του H/A τις ημέρες 1 και 14 με υπεροχή του DBM. Σε αντίθεση με την μελέτη II, όπου η προσθήκη του OP-1 στο DBM και ICBM είχε ανατρέψει τη φυσιολογική, αντιστρόφως ανάλογη έκφραση πολλαπλασιασμού/διαφοροποίησης, επαυξάνοντας και τις δυο δραστηριότητες από την 7<sup>η</sup> έως τη 14<sup>η</sup> μέρα, το ίδιο δεν παρατηρήθηκε με τον H/A. Εδώ η αντιστρόφως ανάλογη σχέση παρέμεινε κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν του DBM. Η πιθανή ερμηνεία της διαφοράς αυτής βρίσκεται στην απουσία του βιολογικού υποστρώματος. Ενώ στην προηγούμενη μελέτη είχαμε οστικό αλλομόσχευμα (DBM και ICBM), στην παρούσα έχουμε βιοϋλικό (H/A). Υποθέτουμε ότι η αλληλεπίδραση του υποστρώματος-εκμαγείου με τον αυξητικό παράγοντα αλλά και με τα κύτταρα είναι κριτικής σημασίας για την οστεοβλαστογένεση. Επίσης υποθέτουμε ότι, καθώς το DBM διαθέτει φυσικούς αυξητικούς παράγοντες στην επιφάνειά του, αυτοί αλληλοεπιδρούν με το OP-1 και πιθανόν λειτουργούν επαυξητικά στη δράση του ή και αντιστρόφως ότι το OP-1 δρα επαυξητικά στη δράση των φυσικών αυξητικών παραγόντων που βρίσκονται πάνω στο DBM. Επιπρόσθετα η ποιοτική αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά και η μορφολογική επιβεβαίωση της ικανότητας τους να προσκολλώνται και να επενδύουν τον H/A αποδείχθηκε κατά την ηλεκτρονική μικροσκόπηση (SEM). Η ανάλυση SEM έδειξε στις 24 ώρες ήδη, προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του H/A. Με την προσθήκη του OP-1 παρατηρήθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης μορφολογικές διαφορές παρατηρήθηκαν την 7<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα, καθώς τα κύτταρα ανέπτυξαν φιλοπόδια και συνδέθηκαν μεταξύ τους σε ένα δίκτυο κυττάρων στην είσοδο των πόρων του H/A [φαινόμενο σχηματισμού κυπελλοειδών κοιλάνσεων (cupping)]. Το εύλογο συμπέρασμα της πιο πάνω μελέτης είναι ότι ο H/A αποτελεί ένα αξιόπιστο βιοϋλικό που μπορεί να υποκαταστήσει το αλλομόσχευμα σε διάφορες κλινικές εφαρμογές. Το μέγιστο πλεονέκτημα του υδροξυαπατίτη είναι ότι παρασκευάζεται με ευκολία και είναι διαθέσιμος για κλινική χρήση σε διάφορα μεγέθη, σχήματα και με διαφορετική πάρωση, ανάλογα με τη χρήση. Η μελέτη III προσθέτει ένα ακόμη αποδεικτικό στοιχείο της βιοσυμβατότητας και οστεοαγωγιμότητας του H/A. Επιπρόσθετα καταδεικνύει ότι οι πιο πάνω ιδιότητες μπορεί να επαυξηθούν με την προσθήκη του OP-1. Έτσι αναβαθμίζεται

ποιοτικά η οστεογενετική ικανότητα του H/A. Η παρατήρηση αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη για το μοντέλο του πακτωμένου αλλομοσχεύματος, καθώς η ανάγκη σε μόσχευμα είναι μεγάλη και πολλαπλή, αφού ο αριθμός των αναθεωρήσεων του ισχίου μεγαλώνει με την αύξηση των αρθροπλαστικών του ισχίου αλλά και με την επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών. Ο H/A μπορεί μελλοντικά να υποκαταστήσει τελείως το αλλομόσχευμα και να δώσει μια πιο μόνιμη λύση στο μείζων ζήτημα της μεταμόσχευσης οστού. Σε μία *in vivo* μελέτη σε 8 σκύλους Labrador, οι Jensen et al (2002) έδειξαν ότι ο H/A+OP-1 έχει ισοδύναμη οστεογενετική ικανότητα με το αλλομόσχευμα +OP-1 και ότι είναι ισχυρότερος από τον H/A χωρίς OP-1, ενώ οι Lind et al (2001) έδειξαν ότι η προσθήκη OP-1 γύρω από προθέσεις επενδυμένες με υδροξυαπατίτη αύξησαν αλλά πολύ λίγο την οστεοεπαγωγή στο μοντέλο του σκύλου. Είναι αναμενόμενο ότι πριν την εκτεταμένη χρήση του υδροξυαπατίτη στον άνθρωπο, ένα σύνολο από εμβιομηχανικά αλλά και βιολογικά ερωτήματα θα πρέπει να απαντηθούν. Παρά την κατάδειξη της συμβατότητας του βιοϋλικού με τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, την επαύξηση της παρουσίας τους και τη φαινοτυπική τους διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες με την προσθήκη του OP-1, το κυρίαρχο ζήτημα της εμβιομηχανικής σταθερότητας του υδροξυαπατίτη πρέπει να απαντηθεί. Μελέτες *in vivo* είναι απαραίτητες για να εξετάσουν την αντοχή του μοσχεύματος H/A+MSCs+OP-1 καθώς και την βιοαπορροφησιμότητα και τη σταδιακή αντικατάσταση του H/A από το παραγόμενο οστό. Τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης μας οδηγούν στο να υποθέσουμε ότι η ενίσχυση με OP-1 έχει διπλό αποτέλεσμα διότι από τη μια βοηθά στην επιστράτευση και από την άλλη στη διαφοροποίηση των πρώιμων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών με αποτέλεσμα την ταχύτερη και πληρέστερη εναπόθεση ώριμου οστού στον H/A και ασφαλώς στην επαρκέστερη αλλά και ταχύτερη αντικατάστασή του από αυτό. Με τον τρόπο αυτό υποθέτουμε περαιτέρω ότι ενώ η εμβιομηχανική αντοχή του H/A δεν μεταβάλλεται, η οστεογένεση επιταχύνεται ποιοτικά και ποσοτικά, πράγμα που αποτελεί τον τελικό σκοπό της οστεομεταμόσχευσης. Έτσι παρά την αδυναμία του H/A να χρησιμοποιηθεί σε φορτιζόμενες περιοχές του σκελετού μόνος του επί του παρόντος, με την προσθήκη του OP-1 ίσως αυτό γίνει εμβιομηχανικά δυνατό, καθώς ώριμο οστό θα

υποκαταστήσει σύντομα τον Η/Α υπό την αυξητική επίδραση του OP-1. Η γεωμετρία του υδροξυαπατίτη (Magan and Ripamonti, 1996; Jin et al, 2000; Ripamonti et al, 2001) και ο συνδυασμός με μεσεγχυματικά κύτταρα (Kon et al, 2000) και μορφογενετικές πρωτεΐνες (Ripamonti et al, 2001) προβλέπεται ότι θα είναι ο στόχος της εργαστηριακής και κλινικής έρευνας κατά τη διάρκεια της επόμενης δεκαετίας.

### **ι Σχέση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης μεταξύ όλων των μοσχευμάτων στις μελέτες II και III**

Η ενδιαφέρουσα στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο one way ANOVA και τη δοκιμασία post-hoc Tukey, για την κάθε ημέρα του πειράματος, οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 αποτελεί από την άποψη του πολλαπλασιασμού αλλά και της διαφοροποίησης, το περισσότερο οστεογενετικό μόσχευμα σε όλα τα χρονικά σημεία. Ο συνδυασμός του Η/Α με το OP-1 ακολουθεί το DBM+OP-1 σε ότι αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ το DBM και το ICBM+OP-1 ακολουθεί το DBM+OP-1 σε ότι αφορά τη διαφοροποίηση, σε συμφωνία με την πολύ πρόσφατη βιβλιογραφία όπου όμως δεν χρησιμοποιήθηκε OP-1 (Kasten et al, 2003).

### **ΜΕΛΕΤΗ IV. *IN VIVO* ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΚΤΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟΑΣΒΕΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ rhOP-1**

Η *in vitro* μελέτη II εξέτασε την οστεογενετική ικανότητα του αποασβεστοποιημένου οστού (DBM και ICBM) με την προσθήκη του OP-1 και των ανθρώπινων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Το εύλογο επόμενο στάδιο διερεύνησης της υπόθεσης είναι η σύγκριση του προτεινόμενου αυτού μοντέλου με το φρέσκο αλλομόσχευμα που χρησιμοποιείται στη τρέχουσα

ορθοπαιδική πρακτική στην τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στη μελέτη I. Πακτωμένο φρέσκο αλλά και αποασβεστοποιημένο αλλομόσχευμα (DBM) αρουραίου του ίδιου τύπου (Wistar) παρασκευάστηκε με εξομοίωση της τεχνικής ενσφήνωσης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο του πακτωμένου αλλομοσχεύματος. Το μόσχευμα ενισχύθηκε με OP-1 και εισήλθε στους κοιλιακούς μυς των αρουραίων σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία (Takikawa et al, 2003). Η επιλογή της θέσης έγινε για δυο λόγους. Ο πρώτος λόγος ήταν ότι η αιματική ροή είναι πλούσια και, όπως είναι γνωστό, οι μύες αποτελούν άριστη πηγή προέλευσης οστεοπρογενετικών κυττάρων του μυελού των οστών (Friedlaender et al, 1999). Ο δεύτερος και κυρίαρχος λόγος ήταν ότι η οστεογένεση είναι ευκολότερο να καταδειχθεί σε εξωσκελετικές εστίες, καθώς η αλλομεταμόσχευση σε εστίες πέριξ ή εντός των οστών ενέχει την πιθανότητα να προκαλέσει τη φυσιολογική ανταπόκριση του περιβάλλοντος οστού να παράγει οστό (Urist, 1965). Έτσι είναι δύσκολο ή και πολλές φορές αδύνατο να ξεκαθαρίσουμε εάν το οστό προέρχεται από την αμιγή δράση του αλλομοσχεύματος ή από το περιβάλλον οστό. Βεβαίως η διευκρίνιση αυτή ίσως έχει μόνο φιλολογικό ενδιαφέρον και δεν αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη χρήση του αλλομοσχεύματος στον άνθρωπο, καθώς όλες οι εστίες αλλομεταμόσχευσης είναι οστικές, ωστόσο σε επίπεδο ερευνητικό προσφέρει μία ασφαλή αντικειμενοποίηση του πειράματος. Άλλωστε ας μη ξεχνούμε ότι είναι εξ ορισμού προσδιορισμένο από τον Marsall Urist (1965) ότι οστεοεπαγωγή είναι η παραγωγή ώριμου οστού σε εξωσκελετικές εστίες. Έτσι ο σχεδιασμός της μελέτης αυτής επέβαλλε την εμφύτευση του αλλομοσχεύματος σε εξωσκελετικές εστίες κατά το πρότυπο των αρχικών μελετών του Urist. Ένα διαφορετικό μοντέλο πάκτωσης του αλλομοσχεύματος χρησιμοποίησαν οι Tagil et al (2000) στη μία από τις τρεις μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με το συνδυασμό πακτωμένου αλλομοσχεύματος και OP-1 και προέρχονται από το ίδιο ερευνητικό κέντρο. Οι συγγραφείς συνέκριναν το πακτωμένο αλλομόσχευμα με ή χωρίς OP-1 σε ένα βιδωτό μεταλλικό διαμέρισμα στη κνήμη των αρουραίων και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ενισχυμένο με OP-1 αλλομόσχευμα παρουσίασε δραματικά αυξημένη οστεογένεση σε σχέση με το μη ενισχυμένο. Ο ίδιος συγγραφέας διαπίστωσε στη δεύτερη μελέτη, που έγινε στα πλαίσια της διδακτορικής του



διατριβής στο Πανεπιστήμιο Lund της Σουηδίας, ότι το πακτωμένο αλλομόσχευμα ενσωματώνεται αργά από το οστό-δέκτη και ότι η παρουσία του OP-1 επιταχύνει την οστεοενσωμάτωσή του (Tagil, 2000). Η ίδια ομάδα σε μία ακόμη μελέτη έδειξε ότι η οστεοεπαγωγική ικανότητα του OP-1 μπορεί να ενισχυθεί με τη προσθήκη διφωσφονικών στο ίδιο μοντέλο πάκτωσης του αλλομοσχεύματος (Jeppsson et al, 2003). Το κυρίαρχο ερώτημα που θελήσαμε να απαντήσουμε ήταν εάν η μερική αποασβεστοποίηση του αλλομοσχεύματος με ή χωρίς την προσθήκη του OP-1 καθώς επίσης και η ενίσχυση του φρέσκου αλλομοσχεύματος με OP-1 βελτιώνουν την οστεογένεση (Heliotis and Tsiridis, 2001). Συγκρίναμε λοιπόν το φρέσκο πακτωμένο αλλομόσχευμα με ή χωρίς OP-1, με το πακτωμένο DBM με ή χωρίς OP-1 στην ίδια εξωσκελετική εστία. Επιλέξαμε τη σύγκριση του DBM με το φρέσκο αλλομόσχευμα και όχι του ICBM ενώ και τα δύο εξετάστηκαν στη μελέτη II για δυο λόγους. Πρώτον, διότι το DBM ως μερικώς αποασβεστοποιημένο μόσχευμα είναι εμβιομηχανικά σταθερότερο του ICBM. Δεύτερον, διότι, όπως καταδείχθηκε μετά τις μελέτες II και III, το DBM+OP-1 είναι το μόσχευμα με την καλύτερη επίδοση στην οστεογένεση. Η μελέτη IV, έδειξε ότι η αποασβεστοποίηση και επιπρόσθετα η ενίσχυση με το OP-1 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, όπως αποδείχθηκε με τη μακροσκοπική αλλά κυρίως την ιστολογική επιβεβαίωση της οστεογένεσης. Το αλλομόσχευμα μόνο του είναι ασφαλώς αντιγονικό και έχει λίγες έως ανύπαρκτες οστεοεπαγωγικές ιδιότητες, όπως κατέδειξε η μέση ιστολογική ταξινόμηση των δειγμάτων στο 0.5 με βάση την κλίμακα Salkeld. Η ταξινόμηση αυτή καταδεικνύει την σχεδόν πλήρη απουσία νέου οστού στα δισκία του αλλομοσχεύματος μετά από 28 μέρες παραμονής στους κοιλιακούς μύες των αρουραίων. Η μέση ιστολογική ταξινόμηση στις άλλες ομάδες μόσχευμάτων εμφαιτικά κατέδειξε την αυξανόμενη οστεοεπαγωγικότητα των άλλων συνδυασμών. Έτσι η μέση τιμή για το φρέσκο αλλομόσχευμα με την προσθήκη του OP-1 έφτασε στο 2.071 πολύ κοντά στο 2.214 του DBM χωρίς την προσθήκη του OP-1. Τέλος το DBM+OP-1 έδειξε την υψηλότερη μέση τιμή οστεοεπαγωγής που έφτασε στο 4.071. Σε αυτήν την τελευταία περίπτωση ώριμο νέο οστό άλλα και μυελός των οστών κατέκλυσαν το αλλομόσχευμα και ενσωματώθηκαν με αυτό σε 28 ημέρες παραμονής μέσα στους κοιλιακούς μύες των αρουραίων.

Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε τη μακροσκοπική αλλά και την ιστολογική διαφορά των μοσχευμάτων μεταξύ τους. Ο συνδυασμός του DBM με το OP-1 έδειξε στατιστικά σημαντική υπεροχή σε σχέση με όλους τους άλλους συνδυασμούς (αλλομόσχευμα  $p < 0.01$ , αλλομόσχευμα και OP-1  $p = 0.01$ , DBM  $p = 0.018$ ). Παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μοσχευμάτων, όπως περιγράφηκε πιο πάνω, η διαφορά αυτή ήταν ασθενής για τη σύγκριση του DBM+OP-1 με το DBM αλλά και με το φρέσκο αλλομόσχευμα +OP-1. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων καθώς η ένδειξη είναι πολύ ισχυρή. Αξιοσημείωτη ήταν και η σχέση φρέσκου αλλομοσχεύματος με το DBM που αναδεικνύει την οστεοεπαγωγική αναβάθμιση του φρέσκου αλλομοσχεύματος με την αποασβεστοποίηση και μόνο ( $p = 0.025$ ). Αντίθετα όταν το OP-1 προστέθηκε στο φρέσκο αλλομόσχευμα, η διαφορά με το DBM έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική ( $p = 0.99$ ). Η μελέτη IV επιβεβαίωσε τις παρατηρήσεις που έγιναν στις μελέτες I-III. Η παρατήρηση ότι το πακτωμένο φρέσκο αλλομόσχευμα είναι σε θέση να αναδομήσει το οστεολυτικό μηριαίο στην περίπτωση που απαιτείται αναθεώρηση για τη θεραπεία ενός περιπροσθετικού κατάγματος του μηριαίου αλλά με τη βοήθεια ενδομυελικής και εξωμυελικής στήριξης καταδείχθηκε στην μελέτη I της διατριβής. Ωστόσο η μελέτη I έδειξε ότι με τη μέθοδο αυτή το ποσοστό τελικής πώρωσης των καταγμάτων ήταν 57.15% χωρίς ενδομυελική στήριξη και 88% με ενδομυελική στήριξη, ποσοστά που θεωρήθηκαν μη ικανοποιητικά και ανέδειξαν το ερώτημα της βιολογικής συμβατότητας του φρέσκου αλλομοσχεύματος. Η μελέτη II εξέτασε την υπόθεση ότι η αποασβεστοποίηση και η προσθήκη του OP-1 θα βελτίωνε τη βιολογική συμβατότητα του αλλομοσχεύματος και θα ενίσχυε την οστεογενετική του ικανότητα. Η τρίτη μελέτη εξέτασε την εναλλακτική λύση ενός βιοϋλικού, του υδροξυαπατίτη, που τρόπον τινά μπορεί να υποκαταστήσει το φρέσκο αλλομόσχευμα. Η μελέτη II έδειξε ενίσχυση της οστεογενετικής ικανότητας του υδροξυαπατίτη με την προσθήκη του OP-1. Το εύλογο ερώτημα της μεταφοράς της υπόθεσης από το *in vitro* κυτταρικό επίπεδο στο *in vivo* ζωικό επίπεδο κλήθηκε να απαντηθεί. Η υπόθεση επικεντρώθηκε σε τρία σενάρια που μπορεί να έχουν άμεση εφαρμογή στην κλινική πράξη. Το πρώτο σενάριο ήταν ότι το DBM είναι περισσότερο οστεοεπαγωγικό από το φρέσκο

αλλομόσχευμα. Το δεύτερο σενάριο ήταν ότι η προσθήκη OP-1 στο φρέσκο αλλομόσχευμα προάγει την οστεογένεση σε βαθμό συγκρίσιμο με αυτόν του DBM. Το τρίτο σενάριο ότι το DBM με το OP-1 αποτελούν τον ιδανικότερο συνδυασμό για την κλινική χρήση. Με επιτυχία καταδείξαμε ότι ο συνδυασμός DBM και OP-1 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά στην οστεογενετική ικανότητα του φρέσκου αλλομοσχεύματος. Είναι γνωστό βέβαια ότι η μεταφορά συμπερασμάτων από το επίπεδο των τρωκτικών στον άνθρωπο είναι ένα τεράστιο βιολογικό άλμα. Επίσης η δοσολογία του OP-1 καθώς και η πιθανή νεοπλασματική δράση του είναι ακόμη άγνωστες. Ακόμη η εμβιομηχανική αντοχή και η βιοαπορροφησιμότητα του αλλομοσχεύματος είναι παράμετροι που απομένει να διερευνηθούν. Πάρα τους περιορισμούς της κάθε εργαστηριακής μελέτης στη μελέτη IV καταδείξαμε ότι υπάρχει βιολογικά καλύτερη λύση για την τεχνική του πακτωμένου αλλομοσχεύματος στην αναθεώρηση του ισχίου. Η κλινική επίπτωση της παρατήρησης αυτής είναι σημαντικής αξίας για δυο λόγους. Πρώτον, διότι γεφυρώνει την βιολογία του οστού με τη ορθοπαιδική χειρουργική, δυο περιοχές φυσικά συγγενείς άλλα μέχρι σήμερα όχι υποχρεωτικά αλληλοεπικαλυπτόμενες. Και δεύτερον, διότι προσφέρει μια άμεσα βιώσιμη και βιολογικά παραδεκτή πρόταση σε ένα πολύπλοκο χειρουργικό ζήτημα προκαλώντας συγχρόνως ερωτήματα για περαιτέρω έρευνα με σκοπό την αναγέννηση του οστού.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνική του πακτωμένου φρέσκου αλλομοσχεύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη θεραπεία των περιπροσθετικών καταγμάτων του μηριαίου οστού. Ωστόσο η επιτυχία της τεχνικής βασίζεται στην εμβιομηχανική, ενδομυελική στήριξη της αναθεώρησης με μακρύ στέλεχος και όχι στην βιολογική ικανότητα του πακτωμένου φρέσκου αλλομοσχεύματος να παράγει οστό. Αυτό εγείρει το ερώτημα της βελτίωσης της βιολογικής ικανότητας του πακτωμένου φρέσκου αλλομοσχεύματος.

Στο κυτταρικό επίπεδο η αποασβεστοποίηση του φρέσκου ανθρώπινου αλλομοσχεύματος, που αναμφίβολα ελαττώνει το αντιγονικό του φορτίο και κατ' επέκταση την ανοσολογική αντίδραση του οστού-δέκτη προς αυτό, και η προσθήκη του rh-OP-1 βελτιώνουν την οστεογενετική ικανότητα του πακτωμένου αλλομοσχεύματος.

Στο κυτταρικό επίπεδο ο πακτωμένος υδροξυαπατίτης αποτελεί ένα αξιόπιστο υποκατάστατο του πακτωμένου φρέσκου αλλομοσχεύματος και με την προσθήκη rh-OP-1 επαυξάνει την οστεογενετική του ικανότητα. Σε κάθε περίπτωση η οστεογενετική ικανότητα του υδροξυαπατίτη είναι συγκρίσιμη με αυτήν του DBM αλλά κατώτερη αυτής του DBM με OP-1.

Στο ζωικό επίπεδο τα κυρίαρχα κλινικά ερωτήματα αποτυπώθηκαν με την αναπαραγωγή τεσσάρων μοντέλων. Φρέσκο πακτωμένο αλλομόσχευμα με και χωρίς OP-1 και πακτωμένο DBM με και χωρίς OP-1. Με σειρά αυξανόμενης στατιστικής σημαντικότητας το φρέσκο αλλομόσχευμα, που επί του παρόντος χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη είναι το λιγότερο οστεογενετικό μόσχευμα, ενώ το DBM με OP-1 είναι το περισσότερο οστεογενετικό.

Η οστεομορφογένεση είναι πολυσυλλεκτική διαδικασία. Οφείλεται στη συμπληρωματική δράση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και μορφογενετικών πρωτεϊνών και φυσικά όχι στη παρουσία

και δράση μίας από αυτές. Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-7 (rh-OP-1) αναμφισβήτητα παίζει ρόλο επαυξητικό στην οστεομορφογένεση.

Δεδομένων των βιολογικών αναλογιών μεταξύ των ειδών (τροφκτικών και ανθρώπου), των πιθανών νεοπλασματικών επίπλοκων από τη χρήση του OP-1, της ιστοσυμβατότητας και των εμβιομηχανικών ερωτημάτων, που είναι απαραίτητο να απαντηθούν για τη χρήση του αποασβεστοποιημένου αλλομοσχεύματος, περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητο να ακολουθήσει πριν την εισαγωγή των τεχνικών αυτών στον άνθρωπο.

## **Η ΑΠΟΨΗ ΤΟΥ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ**

Η ορθοπαιδική χειρουργική τα τελευταία 100 χρόνια έχει περάσει από την εποχή του ακρωτηριασμού, στην εποχή της αντικατάστασης, στη συνέχεια στην εποχή της ανάπλασης και πρόσφατα στην εποχή της αναγέννησης του μυσκελετικού συστήματος. Η αναγέννηση του μυσκελετικού συστήματος προϋποθέτει τη γνώση της εμβρυολογικής και ακόμα βαθύτερα της γενετικής διαδικασίας της οστεοχονδρογένεσης. Η σύγχρονη μοριακή βιολογία διαθέτει τα εργαλεία για τη διερεύνηση της πιο πάνω διαδικασίας κάτω από φυσιολογικές (οστική εμβρυομορφογένεση) αλλά και τραυματικές συνθήκες (μυσκελετικό τραύμα). Οι δυο διαδικασίες μοιράζονται πολλά κοινά στάδια και αναμφισβήτητα αναφέρονται στην ενεργοποίηση κοινών γονιδίων. Αναμφίβολα ο επόμενος αιώνας θα μετατρέψει το ορθοπαιδικό χειρουργείο από αδρό εργαστήριο μετάλλου σε βιολογικό εργαστήριο αυξητικών παραγόντων και μυσκελετικών μοσχευμάτων και θα απαιτεί από τον ορθοπαιδικό χειρουργό πέραν των χειρουργικών ικανοτήτων και σαφή γνώση της μυοσκελετικής βιολογίας.

## **ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΜΕΛΕΤΗ**

Πέραν των επιμέρους ερωτημάτων, που προκύπτουν και αναφέρονται περιληπτικά στην πιο πάνω συζήτηση, κυρίαρχο ενδιαφέρον στην τρέχουσα έρευνα του συγγραφέα στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Βοστώνης έχουν τα ακόλουθα ζητήματα:

1. Ποια είναι η δράση της μορφογενετικής πρωτεΐνης 2 στα πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (Fiedler et al, 2002; Diefenderfer et al, 2003)
2. Ποια είναι η συμμετοχή των δορυφορικών μυοβλαστών στην επούλωση των καταγμάτων (Young et al, 2002; Brazelton et al, 2003)
3. Ποιος είναι ο ρόλος της αγγειογένεσης και πιο συγκεκριμένα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) στην επούλωση των καταγμάτων και πιο συγκεκριμένα στο μοντέλο της διατακτικής οστεογένεσης (Hansen-Algenstaedt et al, 2003; Pacicca et al, 2003).

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adolphson, P., Jonsson, U. and Kalen, R. Fractures of the ipsilateral femur after total hip arthroplasty. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 106 (6):353-357, 1987.
- Ahmed, S. A., Gogal, Jr., R. M. and Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *J Immunol.Methods* 170 (2):211-224, 1994.
- Alper, G., Bernick, S., Yazdi, M. and Nimni, M. E. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *Am.J Med.Sci.* 298 (6):371-376, 1989.
- Alsberg, E., Kong, H. J., Hirano, Y., Smith, M. K., Albeiruti, A. and Mooney, D. J. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent.Res.* 82 (11):903-908, 2003.
- Andrades, J. A., Santamaria, J. A., Nimni, M. E. and Becerra, J. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int J Dev.Biol.* 45 (4):689-693, 2001.
- Andriano, K. P., Tabata, Y., Ikada, Y. and Heller, J. In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffolds for tissue engineering. *J Biomed.Mater.Res.* 48 (5):602-612, 1999.
- Aronow, M. A., Gerstenfeld, L. C., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Stein, G. S. and Lian, J. B. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143 (2):213-221, 1990.
- Asahara, T., Kalka, C. and Isner, J. M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* 7 (6):451-457, 2000.

Asahina, I., Sampath, T. K. and Hauschka, P. V. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp. Cell Res.* 222 (1):38-47, 1996.

Bain, B. J. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol.* 54 (9):657-663, 2001.

Balaburski G. and O'Connor J. P. Determination of variations in gene expression during fracture healing. *Acta Orthop.Scand* 74 (1):22-30, 2003.

Baltzer, W., Whalen, J. D., Stefanovic-Racic, M., Ziran, B., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Adenoviral transduction of human osteoblastic cell cultures: a new perspective for gene therapy of bone diseases. *Acta Orthop.Scand* 70 (5):419-424, 1999a.

Baltzer, W., Lattermann, C., Whalen, J. D., Braunstein, S., Robbins, P. D. and Evans, C. H. A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a New Zealand white rabbit model. *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* 7 (3):197-202, 1999b.

Baltzer, W., Lattermann, C., Whalen, J. D., Ghivizzani, S., Wooley, P., Krauspe, R., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. *Clin Orthop.* (379 Suppl):S120-S125, 2000a.

Baltzer, W., Lattermann, C., Whalen, J. D., Wooley, P., Weiss, K., Grimm, M., Ghivizzani, S. C., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 7 (9):734-739, 2000b.

Bavadekar, A., Cornu, O., Godts, B., Delloye, C., Van Tomme, J. and Banse, X. Stiffness and compactness of morselized grafts during impaction: an in vitro study with human femoral heads. *Acta Orthop.Scand* 72 (5):470-476, 2001.



- Beals, R. K. and Tower, S. S. Periprosthetic fractures of the femur. An analysis of 93 fractures. *Clin Orthop.* (327):238-246, 1996.
- Becker, W., Becker, B. E. and Caffesse, R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol.* 65 (12):1128-1133, 1994.
- Becker, W., Urist, M. R., Tucker, L. M., Becker, B. E. and Ochsenbein, C. Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice. A preliminary report. *J Periodontol.* 66 (9):822-828, 1995.
- Beresford, J. N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop.* (240):270-280, 1989.
- Berman, T. and Zamarin, R. The use of Dall-Miles cables in total hip arthroplasty. *Orthopedics* 16 (7):833-835, 1993.
- Berry, D. J., Harmsen, W. S., Ilstrup, D., Lewallen, D. G. and Cabanela, M. E. Survivorship of uncemented proximally porous-coated femoral components. *Clin Orthop.* (319):168-177, 1995.
- Berry, D. J. Management of periprosthetic fractures: the hip. *J Arthroplasty* 17 (4 Suppl 1):11-13, 2002.
- Berry, D. J., Garvin, K. L., Sang-Hong, L., Maloney, W. J., Paprosky, W. G., Steinberg, M. E. and Wasielewski, R. C. Total Hip Arthroplasty Complications. In: *Orthopaedic Knowledge Update 6*, edited by J J CALLAGHAN, C D HARNER, K J KOVAL, R T LODER, and B J SANGEORZAN, Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1999, p. 474-475.

Berven, S., Tay, B. K., Kleinstueck, F. S. and Bradford, D. S. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *Eur.Spine J* 10 Suppl 2:S169-S177, 2001.

Berzins, A., Sumner, D. R., Wasielewski, R. C. and Galante, J. O. Impacted particulate allograft for femoral revision total hip arthroplasty. In vitro mechanical stability and effects of cement pressurization. *J Arthroplasty* 11 (5):500-506, 1996.

Bethea, III, J. S., DeAndrade, J. R., Fleming, L. L., Lindenbaum, S. D. and Welch, R. B. Proximal femoral fractures following total hip arthroplasty. *Clin Orthop.* (170):95-106, 1982.

Bianco, P., Riminucci, M., Kuznetsov, S. and Robey, P. G. Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 9 (2):159-173, 1999.

Bills, E., Eisenberg, H. and Pallante, S. L. Complexes of organic acids with calcium phosphate: the Von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns.Hopkins.Med.J* 128 (4):194-207, 1974.

Blatter, T. R., Delling, G., Dalal, P. S., Toth, C. A., Balling, H. and Weckbach, A. Successful transpedicular lumbar interbody fusion by means of a composite of osteogenic protein-1 (rhBMP-7) and hydroxyapatite carrier: a comparison with autograft and hydroxyapatite in the sheep spine. *Spine* 27 (23):2697-2705, 2002.

Blatter, T. R., Delling, G. and Weckbach, A. Evaluation of an injectable calcium phosphate cement as an autograft substitute for transpedicular lumbar interbody fusion: a controlled, prospective study in the sheep model. *Eur.Spine J* 12 (2):216-223, 2003.

Blau, H. M., Brazelton, T. R. and Weimann, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105 (7):829-841, 2001.

- Bloemers, F. W., Blokhuis, T. J., Patka, P., Bakker, F. C., Wippermann, B. W. and Haarman, H. J. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed.Mater.Res.* 66B (2):526-531, 2003.
- Blokhuis, T. J., den Boer, C., Bramer, J. A., Jenner, J. M., Bakker, F. C., Patka, P. and Haarman, H. J. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials* 22 (7):725-730, 2001.
- Boden, S. D., Martin, Jr., G. J., Morone, M., Ugbo, J. L., Titus, L. and Hutton, W. C. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine* 24 (4):320-327, 1999.
- Boden, S. D., Hair, G. A., Viggewarapu, M., Liu, Y. and Titus, L. Gene therapy for spine fusion. *Clin Orthop.* (379 Suppl):S225-S233, 2000a.
- Boden, S. D., Zdeblick, T. A., Sandhu, H. S. and Heim, S. E. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine* 25 (3):376-381, 2000b.
- Bonnet, D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp.Med.* 3 (3):140-149, 2003.
- Bostrom, M., Lane, J. M., Tomin, E., Browne, M., Berberian, W., Turek, T., Smith, J., Wozney, J. and Schildhauer, T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop.* (327):272-282, 1996.
- Brady, O. H., Garbuz, D. S., Masri, B. A. and Duncan, C. P. Classification of the hip. *Orthop.Clin North Am.* 30 (2):215-220, 1999.
- Brady, O. H., Garbuz, D. S., Masri, B. A. and Duncan, C. P. The reliability and validity of the Vancouver classification of femoral fractures after hip replacement. *J Arthroplasty* 15 (1):59-62, 2000.

- Brazelton, T. R., Nystrom, M. and Blau, H. M. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev.Biol.* 262 (1):64-74, 2003.
- Breitbart, S., Mason, J. M., Urmacher, C., Barcia, M., Grant, R. T., Pergolizzi, R. G. and Grande, D. A. Gene-enhanced tissue engineering: applications for wound healing using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with the PDGF-B gene. *Ann.Plast.Surg.* 43 (6):632-639, 1999.
- Brewster, N. T., Gillespie, W. J., Howie, C. R., Madabhushi, S. P., Usmani, A. S. and Fairbairn, D. R. Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg.Br.* 81 (1):118-124, 1999.
- Bucholz, R. W., Carlton, A. and Holmes, R. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop.* (240):53-62, 1989.
- Burchardt, H. Biology of bone transplantation. *Orthop.Clin North Am.* 18 (2):187-196, 1987.
- Burg, K. J., Porter, S. and Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21 (23):2347-2359, 2000.
- Burkus, J. K., Transfeldt, E. E., Kitchel, S. H., Watkins, R. G. and Balderston, R. A. Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 27 (21):2396-2408, 2002.
- Callaghan, J. J., Heiner, A. D. and Brown, T. D. The basic science of impaction allografting in revision hip surgery. *Instr.Course Lect.* 49:103-110, 2000.
- Calvert, J. W., Weiss, L. E. and Sundine, M. J. New frontiers in bone tissue engineering. *Clin Plast.Surg.* 30 (4):641-8, x, 2003.

Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P. and Quarto, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 22 (1):81-91, 2003.

Chakkalakal, D., Strates, B. S., Garvin, K. L., Novak, J. R., Fritz, E. D., Mollner, T. J. and McGuire, M. H. Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair. *Tissue Eng* 7 (2):161-177, 2001.

Chandler, H. P. Reconstruction of major segmental loss of the proximal femur in revision total hip replacement. *Orthopedics* 20 (9):801-803, 1997.

Chandler, H. P. and Tigges, R. G. The role of allografts in the treatment of periprosthetic femoral fractures. *Instr. Course Lect.* 47:257-264, 1998.

Cheifetz, S., Li, I. W., McCulloch, C. A., Sampath, K. and Sodek, J. Influence of osteogenic protein-1 (OP-1;BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. *Connect. Tissue Res.* 35 (1-4):71-78, 1996.

Chen, T. L., Shen, W. J. and Kraemer, F. B. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem.* 82 (2):187-199, 2001.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y. and He, T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg.Am.* 85-A (8):1544-1552, 2003.

Cheng, S. L., Lou, J., Wright, N. M., Lai, C. F., Avioli, L. V. and Riew, K. D. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif. Tissue Int* 68 (2):87-94, 2001.

- Chien, H. H., Lin, W. L. and Cho, M. I. Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. *Calcif.Tissue Int* 67 (2):141-150, 2000.
- Christensen, M., Seger, B. M. and Schultz, R. B. Management of intraoperative femur fractures associated with revision hip arthroplasty. *Clin Orthop.* (248):177-180, 1989.
- Chu, T. M., Hollister, S. J., Halloran, J. W., Feinberg, S. E. and Orton, D. G. Manufacturing and characterization of 3-d hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 961:114-117, 2002.
- Claase, M. B., Grijpma, D. W., Mendes, S. C., de Bruijn, J. D. and Feijen, J. Porous PEOT/PBT scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro bone marrow cell culturing. *J Biomed.Mater.Res.* 64A (2):291-300, 2003.
- Connolly, J. F. and Shindell, R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr.Med.J* 71 (4):105-107, 1986.
- Connolly, J. F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop.* (313):8-18, 1995.
- Connolly, J. F. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop.* (355 Suppl):S257-S266, 1998.
- Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C. and Whitecloud, III, T. S. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg.Am.* 76 (6):827-838, 1994.
- Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K. and Rueger, D. C. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop.* (301):302-312, 1994.

- Cooke, P. H. and Newman, J. H. Fractures of the femur in relation to cemented hip prostheses. *J Bone Joint Surg.Br.* 70 (3):386-389, 1988.
- Crane, G. M., Ishaug, S. L. and Mikos, A. G. Bone tissue engineering. *Nat.Med.* 1 (12):1322-1324, 1995.
- Critchlow, M. A., Bland, Y. S. and Ashhurst, D. E. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16 (5):521-527, 1995.
- Cunningham, W., Kanayama, M., Parker, L. M., Weis, J. C., Seftor, J. C., Fedder, I. L. and McAfee, P. C. Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine. A comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device. *Spine* 24 (6):509-518, 1999.
- Cypher, T. J. and Grossman, J. P. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 35 (5):413-417, 1996.
- Daculsi, G., Weiss, P., Bouler, J. M., Gauthier, O., Millot, F. and Aguado, E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone* 25 (2 Suppl):59S-61S, 1999.
- Dalby, M. J., Riehle, M. O., Johnstone, H., Affrossman, S. and Curtis, A. S. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials* 23 (14):2945-2954, 2002.
- Dall, M. and Miles, A. W. Re-attachment of the greater trochanter. The use of the trochanter cable-grip system. *J Bone Joint Surg.Br.* 65 (1):55-59, 1983.
- Dave, J., Koka, S. R. and James, S. E. Mennen plate fixation for fracture of the femoral shaft with ipsilateral total hip and knee arthroplasties. *J Arthroplasty* 10 (1):113-115, 1995.

den Boer, C., Bramer, J. A., Blokhuis, T. J., Van Soest, E. J., Jenner, J. M., Patka, P., Bakker, F. C., Burger, E. H. and Haarman, H. J. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone* 31 (1):158-164, 2002.

Derynck, R., Gelbart, W. M., Harland, R. M., Heldin, C. H., Kern, S. E., Massague, J., Melton, D. A., Mlodzik, M., Padgett, R. W., Roberts, A. B., Smith, J., Thomsen, G. H., Vogelstein, B. and Wang, X. F. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87 (2):173, 1996.

Deschamps, A., Claase, M. B., Sleijster, W. J., de Bruijn, J. D., Grijpma, D. W. and Feijen, J. Design of segmented poly(ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone. *J Control Release* 78 (1-3):175-186, 2002.

Diefenderfer, L., Osyczka, A. M., Reilly, G. C. and Leboy, P. S. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tissue Res.* 44 Suppl 1:305-311, 2003.

DiFazio, F. A., Incavo, S. J and Howe, J. G. Prevention of longitudinal crack propagation around the femoral prosthesis: a study of circlage wire fixation. *Clinical Biomechanics* 8:274-276, 1993.

Duncan P. and Masri, B. A. Fractures of the femur after hip replacement. *Instr. Course Lect.* 44:293-304, 1995.

Dunn, K. and Hess, W. E. Total hip reconstruction in chronically dislocated hips. *J Bone Joint Surg. Am.* 58 (6):838-845, 1976.

Dysart, S. H., Savory, C. G. and Callaghan, J. J. Nonoperative treatment of a postoperative fracture around an uncemented porous-coated femoral component. *J Arthroplasty* 4 (2):187-190, 1989.



Edwards, J. T., Diegmann, M. H. and Scarborough, N. L. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop.* (357):219-228, 1998.

Egan, K. J. and Di Cesare, P. E. Intraoperative complications of revision hip arthroplasty using a fully porous-coated straight cobalt-chrome femoral stem. *J Arthroplasty* 10 Suppl:S45-S51, 1995.

Einhorn, T. A., Lane, J. M., Burstein, A. H., Kopman, C. R. and Vigorita, V. J. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg.Am.* 66 (2):274-279, 1984.

Einhorn, T. A. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop.* (367 Suppl):S59-S67, 1999.

Eldridge, J. D., Smith, E. J., Hubble, M. J., Whitehouse, S. L. and Learmonth, I. D. Massive early subsidence following femoral impaction grafting. *J Arthroplasty* 12 (5):535-540, 1997.

Elting, J. J., Mikhail, W. E., Zicat, B. A., Hubbell, J. C., Lane, L. E. and House, B. Preliminary report of impaction grafting for exchange femoral arthroplasty. *Clin Orthop.* (319):159-167, 1995.

Emerson, Jr., R. H., Malinin, T. I., Cuellar, A. D., Head, W. C. and Peters, P. C. Cortical strut allografts in the reconstruction of the femur in revision total hip arthroplasty. A basic science and clinical study. *Clin Orthop.* (285):35-44, 1992.

Emerson, Jr, R. H. Basic science of onlay allografts: a review. *Instr.Course Lect.* 49:97-102, 2000.

Emery, S. E., Fuller, D. A. and Stevenson, S. Ceramic anterior spinal fusion. Biologic and biomechanical comparison in a canine model. *Spine* 21 (23):2713-2719, 1996.

- Enneking, W. F. and Mindell, E. R. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg.Am.* 73 (8):1123-1142, 1991.
- Eschenroeder, Jr., C. and Krackow, K. A. Late onset femoral stress fracture associated with extruded cement following hip arthroplasty. A case report. *Clin Orthop.* (236):210-213, 1988.
- Evans H. and Robbins, P. D. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg.Am.* 77 (7):1103-1114, 1995.
- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K. P. and Brenner, R. E. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem.* 87 (3):305-312, 2002.
- Fitzgerald, Jr., R. H., Brindley, G. W. and Kavanagh, B. F. The uncemented total hip arthroplasty. Intraoperative femoral fractures. *Clin Orthop.* (235):61-66, 1988.
- Fleming, Jr., E., Cornell, C. N. and Muschler, G. F. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop.Clin North Am.* 31 (3):357-374, 2000.
- Franceschi, R. T., Wang, D., Krebsbach, P. H. and Rutherford, R. B. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem.* 78 (3):476-486, 2000.
- Frassica, J., Inoue, N., Virolainen, P. and Chao, E. Y. Skeletal system: biomechanical concepts and relationships to normal and abnormal conditions. *Semin.Nucl.Med.* 27 (4):321-327, 1997.
- Fredin, H. Late fracture of the femur following perforation during hip arthroplasty. A report of 2 cases. *Acta Orthop.Scand* 59 (3):331-332, 1988.
- Friedlaender, G. E., Strong, D. M. and Sell, K. W. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg.Am.* 58 (6):854-858, 1976.

- Friedlaender, G. E. and Horowitz, M. C. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 15 (10):1171-1175, 1992.
- Friedlaender, G. E., Strong, D. M., Tomford, W. W. and Mankin, H. J. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop.Clin North Am.* 30 (4):583-588, 1999.
- Friedlaender, G. E. OP-1 clinical studies. *J Bone Joint Surg.Am.* 83-A Suppl 1 (Pt 2):S160-S161, 2001.
- Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Cole, J. D., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., Zych, G. A., Calhoun, J. H., LaForte, A. J. and Yin, S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg.Am.* 83-A Suppl 1 (Pt 2):S151-S158, 2001.
- Friedman, D. and Costantino, P. D. Hydroxyapatite Cement, a Smart Biomaterial for Craniofacial Skeletal Tissue Engineering. *Surg.Technol.Int* VII:421-423, 1998.
- Fuller, D. A., Stevenson, S. and Emery, S. E. The effects of internal fixation on calcium carbonate. Ceramic anterior spinal fusion in dogs. *Spine* 21 (18):2131-2136, 1996.
- Gamradt, S. C. and Lieberman, J. R. Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop.* (417):183-194, 2003.
- Garbuz, D. S., Masri, B. A. and Duncan, C. P. Periprosthetic fractures of the femur: principles of prevention and management. *Instr.Course Lect.* 47:237-242, 1998.
- Garcia-Cimbrelo, E., Munuera, L. and Gil-Garay, E. Femoral shaft fractures after cemented total hip arthroplasty. *Int Orthop.* 16 (1):97-100, 1992.

Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P. and Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19 (1-3):133-139, 1998.

Gauthier, O., Khairoun, I., Bosco, J., Obadia, L., Bourges, X., Rau, C., Magne, D., Bouler, J. M., Aguado, E., Daculsi, G. and Weiss, P. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed.Mater.Res.* 66A (1):47-54, 2003.

Gazzerro, E., Gangji, V. and Canalis, E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102 (12):2106-2114, 1998.

Gebhart, M. and Lane, J. A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop.Belg.* 57 (2):130-143, 1991.

Geesink, R. G., de Groot, K. and Klein, C. P. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg.Br.* 70 (1):17-22, 1988.

Geesink, R. G., Hoefnagels, N. H. and Bulstra, S. K. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg.Br.* 81 (4):710-718, 1999.

Gepstein, R., Weiss, R. E. and Hallel, T. Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. A radiographic, histological, and radioisotope-uptake study in rats. *J Bone Joint Surg.Am.* 69 (7):984-992, 1987.

Gerhart, T. N., Kirker-Head, C. A., Kriz, M. J., Holtrop, M. E., Hennig, G. E., Hipp, J., Schelling, S. H. and Wang, E. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* (293):317-326, 1993.

Gerstenfeld, L. C., Kelly, C. M., Von Deck, M. and Lian, J. B. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on induction of chondrocyte maturation in culture: extracellular matrix gene expression and morphology. *Endocrinology* 126 (3):1599-1609, 1990.

Gerstenfeld, L. C., Cho, T. J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G. L., Graves, D. T. and Einhorn, T. A. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner.Res.* 18 (9):1584-1592, 2003.

Gie, G.A., Linder, L., Ling, R. S., Simon, J. P., Slooff, T. J. and Timperley, A. J. Impacted cancellous allografts and cement for revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg.Br.* 75 (1):14-21, 1993.

Giesen, E. B., Lamerigts, N. M., Verdonchot, N., Buma, P., Schreurs, B. W. and Huiskes, R. Mechanical characteristics of impacted morsellised bone grafts used in revision of total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg.Br.* 81 (6):1052-1057, 1999.

Gittens, S. A. and Uludag, H. Growth factor delivery for bone tissue engineering. *J Drug Target* 9 (6):407-429, 2001.

Glowacki, J., Kaban, L. B., Murray, J. E., Folkman, J. and Mulliken, J. B. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 1 (8227):959-962, 1981a.

Glowacki, J., Altobelli, D. and Mulliken, J. B. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif.Tissue Int* 33 (1):71-76, 1981b.

Goldstein, S. A., Patil, P. V. and Moalli, M. R. Perspectives on tissue engineering of bone. *Clin Orthop.* (367 Suppl):S419-S423, 1999.

Goodman, S. B., Bauer, T. W., Carter, D., Casteleyn, P. P., Goldstein, S. A., Kyle, R. F., Larsson, S., Stankewich, J., Swiontkowski, M. F., Tencer, A. F., Yetkinler, D. N. and Poser, R.

D. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results. *Clin Orthop.* (348):42-50, 1998.

Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M. G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, der van, E., Hardy, V, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R. L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P. M., Rondia, J., Rossouw, W. C., Daneel, P. J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T. A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R. B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A. and Wisniewski, T. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg.Am.* 84-A (12):2123-2134, 2002.

Grauer, N., Patel, T. C., Erulkar, J. S., Troiano, N. W., Panjabi, M. M. and Friedlaender, G. E. 2000 Young Investigator Research Award winner. Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. *Spine* 26 (2):127-133, 2001.

Green, D., Walsh, D., Mann, S. and Oreffo, R. O. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 30 (6):810-815, 2002.

Green, E., Hinton, C. and Triffitt, J. T. The effect of decalcified bone matrix on the osteogenic potential of bone marrow. *Clin Orthop.* (205):292-298, 1986.

Groeneveld, E. H., van den Bergh, J. P., Holzmann, P., ten Bruggenkate, C. M., Tuinzing, D. B. and Burger, E. H. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed.Mater.Res.* 48 (4):393-402, 1999.

- Haddad, F. S., Marston, R. A. and Muirhead-Allwood, S. K. The Dall-Miles cable and plate system for periprosthetic femoral fractures. *Injury* 28 (7):445-447, 1997.
- Haddad, F. S., Garbuz, D. S., Masri, B. A. and Duncan, C. P. Structural proximal femoral allografts for failed total hip replacements: a minimum review of five years. *J Bone Joint Surg.Br.* 82 (6):830-836, 2000.
- Haddad, F. S., Duncan, C. P., Berry, D. J., Lewallen, D. G., Gross, A. E. and Chandler, H. P. Periprosthetic femoral fractures around well-fixed implants: use of cortical onlay allografts with or without a plate. *J Bone Joint Surg.Am.* 84-A (6):945-950, 2002.
- Haddad, F. S. and Duncan, C. P. Cortical onlay allograft struts in the treatment of periprosthetic femoral fractures. *Instr.Course Lect.* 52:291-300, 2003.
- Hadjipavlou, A. G., Simmons, J. W., Tzermiadianos, M. N., Katonis, P. G. and Simmons, D. J. Plaster of Paris as bone substitute in spinal surgery. *Eur.Spine J* 10 Suppl 2:S189-S196, 2001.
- Hahn, G. V., Cohen, R. B., Wozney, J. M., Levitz, C. L., Shore, E. M., Zasloff, M. A. and Kaplan, F. S. A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics* 14 (3):759-762, 1992.
- Hammerle, C. H., Olah, A. J., Schmid, J., Fluckiger, L., Gogolewski, S., Winkler, J. R. and Lang, N. P. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants.Res.* 8 (3):198-207, 1997.
- Han, B., Tang, B. and Nimni, M. E. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop.Res.* 21 (4):648-654, 2003.
- Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J. R., Fu, F. H. and Huard, J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr.Course Lect.* 52:753-768, 2003.

Hansen-Algenstaedt, N., Algenstaedt, P., Bottcher, A., Joscheck, C., Schwarzloh, B., Schaefer, C., Muller, I., Koike, C., Ruther, W. and Fink, B. Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction. *J Orthop.Res.* 21 (5):805-812, 2003.

Hardy, C., Frayssinet, P., Bonel, G., Authom, T., Le Naelou, S. A. and Delince, P. E. Two-year outcome of hydroxyapatite-coated prostheses. Two femoral prostheses retrieved at autopsy. *Acta Orthop.Scand* 65 (3):253-257, 1994.

Hauschka, P. V., Chen, T. L. and Mavrakos, A. E. Polypeptide growth factors in bone matrix. *Ciba Found.Symp.* 136:207-225, 1988.

Havelin, L. I., Engesaeter, L. B., Espehaug, B., Furnes, O., Lie, S. A. and Vollset, S. E. The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthop.Scand* 71 (4):337-353, 2000.

Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13 (1):81-88, 1992.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (5):2509-2514, 1998.

Head, W. C., Wagner, R. A., Emerson, Jr., R. H. and Malinin, T. I. Restoration of femoral bone stock in revision total hip arthroplasty. *Orthop.Clin North Am.* 24 (4):697-703, 1993.

Head, W. C., Malinin, T. I., Mallory, T. H. and Emerson, Jr, R. H. Onlay cortical allografting for the femur. *Orthop.Clin North Am.* 29 (2):307-312, 1998.

Head, W. C., Emerson, Jr., R. H. and Malinin, T. I. Structural bone grafting for femoral reconstruction. *Clin Orthop.* (369):223-229, 1999.



Head, W. C., Malinin, T. I., Emerson, Jr., R. H. and Mallory, T. H. Restoration of bone stock in revision surgery of the femur. *Int Orthop.* 24 (1):9-14, 2000.

Head, W. C. and Malinin, T. I. Results of onlay allografts. *Clin Orthop.* (371):108-112, 2000.

Heliotis M. and Tsiridis, E. E. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Med.Hypotheses* 57 (6):675-678, 2001.

Hench, L. L. and Wilson, J. Surface-active biomaterials. *Science* 226 (4675):630-636, 1984.

Hidaka, C., Goshi, K., Rawlins, B., Boachie-Adjei, O. and Crystal, R. G. Enhancement of Spine Fusion Using Combined Gene Therapy and Tissue Engineering BMP-7-Expressing Bone Marrow Cells and Allograft Bone. *Spine* 28 (18):2049-2057, 2003.

Hollinger, O. and Winn, S. R. Tissue engineering of bone in the craniofacial complex. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 875:379-385, 1999.

Holmes, R., Mooney, V., Bucholz, R. and Tencer, A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clin Orthop.* (188):252-262, 1984.

Holmes, R. E. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast.Reconstr.Surg.* 63 (5):626-633, 1979.

Holmes, R. E., Bucholz, R. W. and Mooney, V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. *J Bone Joint Surg.Am.* 68 (6):904-911, 1986.

Holmes, R. E. and Hagler, H. K. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: a histometric study. *Plast.Reconstr.Surg.* 81 (5):662-671, 1988.

Hostner, J., Hultmark, P., Karrholm, J., Malchau, H. and Tveit, M. Impaction technique and graft treatment in revisions of the femoral component: laboratory studies and clinical validation. *J Arthroplasty* 16 (1):76-82, 2001.

- Hunziker, B. Tissue engineering of bone and cartilage. From the preclinical model to the patient. *Novartis.Found.Symp.* 249:70-78, 2003.
- Huo, H., Friedlaender, G. E. and Salvati, E. A. Bone graft and total hip arthroplasty. A review. *J Arthroplasty* 7 (2):109-120, 1992.
- Hutmacher, W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (24):2529-2543, 2000.
- Hutmacher, W. and Sittinger, M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9 Suppl 1:S45-S64, 2003.
- Incavo, S. J., DiFazio, F. A. and Wilder, D. Strength of circlage fixation systems, a biomechanical study. *Clinical Biomechanics* 5:236-253, 1990.
- Incavo, S. J., DiFazio, F., Wilder, D., Howe, J. G. and Pope, M. Longitudinal crack propagation in bone around femoral prosthesis. *Clin Orthop.* (272):175-180, 1991.
- Incavo, S. J., Beard, D. M., Puppato, F., Ries, M. and Wiedel, J. One-stage revision of periprosthetic fractures around loose cemented total hip arthroplasty. *Am.J Orthop.* 27 (1):35-41, 1998.
- Jadlowiec, J.A., Celil, A. B. and Hollinger, J. O. Bone tissue engineering:recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin.Biol.Ther.* 3 (3):409-423, 2003.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 64 (2):295-312, 1997.

Jamali, A., Hilpert, A., Debes, J., Afshar, P., Rahban, S. and Holmes, R.

Hydroxyapatite/calcium carbonate (HA/CC) vs. plaster of Paris: a histomorphometric and radiographic study in a rabbit tibial defect model. *Calcif.Tissue Int* 71 (2):172-178, 2002.

Jenis, G., Wheeler, D., Parazin, S. J. and Connolly, R. J. The effect of osteogenic protein-1 in instrumented and noninstrumented posterolateral fusion in rabbits. *Spine J* 2 (3):173-178, 2002.

Jensen, S., Barfod, G., Hansen, D., Larsen, E., Linde, F., Menck, H. and Olsen, B. Femoral shaft fracture after hip arthroplasty. *Acta Orthop.Scand* 59 (1):9-13, 1988.

Jensen, T. B., Overgaard, S., Lind, M., Rahbek, O., Bunger, C. and Soballe, K. Osteogenic protein 1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants. *Acta Orthop.Scand* 73 (1):31-39, 2002.

Jensen, T. T., Overgaard, S. and Mossing, N. B. Partridge Cerclene system for femoral fractures in osteoporotic bones with ipsilateral hemi/total arthroplasty. *J Arthroplasty* 5 (2):123-126, 1990.

Jeppsson, C., Astrand, J., Tagil, M. and Aspenberg, P. A combination of bisphosphonate and BMP additives in impacted bone allografts. *Acta Orthop.Scand* 74 (4):483-489, 2003.

Jin, M., Takita, H., Kohgo, T., Atsumi, K., Itoh, H. and Kuboki, Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed.Mater.Res.* 52 (4):491-499, 2000.

Jin, M., Anusaksathien, O., Webb, S. A., Rutherford, R. B. and Giannobile, W. V. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol.* 74 (2):202-213, 2003.

Johansson, E., McBroom, R., Barrington, T. W. and Hunter, G. A. Fracture of the ipsilateral femur in patients with total hip replacement. *J Bone Joint Surg.Am.* 63 (9):1435-1442, 1981.

Johnson, E. E., Urist, M. R. and Finerman, G. A. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop.* (230):257-265, 1988.

Johnson, E. E., Urist, M. R. and Finerman, G. A. Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). *Clin Orthop.* (250):234-240, 1990.

Johnson, E. E. and Urist, M. R. One-stage lengthening of femoral nonunion augmented with human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* (347):105-116, 1998.

Johnson, K. D., Johnston, D. W. and Parker, B. Comminuted femoral-shaft fractures: treatment by roller traction, cerclage wires and an intramedullary nail, or an interlocking intramedullary nail. *J Bone Joint Surg.Am.* 66 (8):1222-1235, 1984.

Johnsson, R., Stromqvist, B. and Aspenberg, P. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 27 (23):2654-2661, 2002.

Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. and Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp.Cell Res.* 238 (1):265-272, 1998.

Juang Ming, Yee A., Bae, H. W., Friess, D., Robbin, M., Johnstone, B. and Yoo, J. U. Augmentation of rabbit posterolateral spondylodesis using a novel demineralized bone matrix-hyaluronan putty. *Spine* 28 (21):2435-2440, 2003.

Jukkala-Partio, K., Partio, E. K., Solovieva, S., Paavilainen, T., Hirvensalo, E. and Alho, A. Treatment of periprosthetic fractures in association with total hip arthroplasty--a retrospective comparison between revision stem and plate fixation. *Ann.Chir Gynaecol.* 87 (3):229-235, 1998.

- Kaban, B., Mulliken, J. B. and Glowacki, J. Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac.Surg.* 40 (10):623-626, 1982.
- Kamineni, S. and Ware, H. E. The Mennen plate: unsuitable for elderly femoral peri-prosthetic fractures. *Injury* 30 (4):257-260, 1999.
- Kamineni, S., Vindlacheruvu, R. and Ware, H. E. Peri-prosthetic femoral shaft fractures treated with plate and cable fixation. *Injury* 30 (4):261-268, 1999.
- Karp, J. M., Shoichet, M. S. and Davies, J. E. Bone formation on two-dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. *J Biomed.Mater.Res.* 64A (2):388-396, 2003.
- Kasten, P., Luginbuhl, R., van Griensven, M., Barkhausen, T., Krettek, C., Bohner, M., and Bosch, U. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials* 24 (15):2593-2603, 2003.
- Kato, T., Kawaguchi, H., Hanada, K., Aoyama, I., Hiyama, Y., Nakamura, T., Kuzutani, K., Tamura, M., Kurokawa, T. and Nakamura, K. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop.Res.* 16 (6):654-659, 1998.
- Kavanagh, B.F. Femoral fractures associated with total hip arthroplasty. *Orthop.Clin North Am.* 23 (2):249-257, 1992.
- Keller, G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7 (6):862-869, 1995.
- Kelley, S. S. Periprosthetic Femoral Fractures. *J Am.Acad.Orthop.Surg.* 2 (3):164-172, 1994.

- Killian, J. T., Wilkinson, L., White, S. and Brassard, M. Treatment of unicameral bone cyst with demineralized bone matrix. *J Pediatr.Orthop.* 18 (5):621-624, 1998.
- Kim, H., Kim, H. W. and Suh, H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 24 (25):4671-4679, 2003.
- Kingsley, D. M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8 (2):133-146, 1994.
- Kirker-Head, C.A., Gerhart, T. N., Armstrong, R., Schelling, S. H. and Carmel, L. A. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop.* (349):205-217, 1998.
- Klein-Nulend, J., Louwse, R. T., Heyligers, I. C., Wuisman, P. I., Semeins, C. M., Goei, S. W. and Burger, E. H. Osteogenic protein (OP-1, BMP-7) stimulates cartilage differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro. *J Biomed.Mater.Res.* 40 (4):614-620, 1998.
- Klein, C. P., Driessen, A. A., de Groot, K. and van den Hooff, A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed.Mater.Res.* 17 (5):769-784, 1983.
- Kofron, D., Zhang, J. X., Lieberman, J. R. and Laurencin, C. T. Genetically modified mesodermal-derived cells for bone tissue engineering. *IEEE Eng Med.Biol.Mag.* 22 (5):57-64, 2003.
- Kolstad, K. Revision THR after periprosthetic femoral fractures. An analysis of 23 cases. *Acta Orthop.Scand* 65 (5):505-508, 1994.
- Kompella, B. and Koushik, K. Preparation of drug delivery systems using supercritical fluid technology. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 18 (2):173-199, 2001.

Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspanini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R. and Quarto, R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed.Mater.Res.* 49 (3):328-337, 2000.

Kopylov, P., Runnqvist, K., Jonsson, K. and Aspenberg, P. Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop.Scand* 70 (1):1-5, 1999.

Kotobuki, N., Hirose, M., Takakura, Y. and Ohgushi, H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif.Organs* 28 (1):33-39, 2004.

Krebsbach, H., Gu, K., Franceschi, R. T. and Rutherford, R. B. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum.Gene Ther.* 11 (8):1201-1210, 2000.

Kruyt, M. C., van Gaalen, S. M., Oner, F. C., Verbout, A. J., de Bruijn, J. D. and Dhert, W. J. Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds. *Biomaterials* 25 (9):1463-1473, 2004.

Kuehnle, I. and Goodell, M. A. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ* 325 (7360):372-376, 2002.

Kurz, T., Garfin, S. R. and Booth, Jr, R. E. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 14 (12):1324-1331, 1989.

Labarca, C. and Paigen, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal.Biochem.* 102 (2):344-352, 1980.

- Lane, J. M., Yasko, A. W., Tomin, E., Cole, B. J., Waller, S., Browne, M., Turek, T. and Gross, J. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop.* (361):216-227, 1999.
- Larson, J. E., Chao, E. Y. and Fitzgerald, R. H. Bypassing femoral cortical defects with cemented intramedullary stems. *J Orthop.Res.* 9 (3):414-421, 1991.
- Lavernia, J. Cost-effectiveness of early surgical intervention in silent osteolysis. *J Arthroplasty* 13 (3):277-279, 1998.
- Le Huec, J. C., Schaeferbeke, T., Clement, D., Faber, J. and Le Rebeller, A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials* 16 (2):113-118, 1995.
- Leopold, S. S. and Rosenberg, A. G. Current status of impaction allografting for revision of a femoral component. *Instr.Course Lect.* 49:111-118, 2000.
- Lewallen, G. and Berry, D. J. Periprosthetic fracture of the femur after total hip arthroplasty: treatment and results to date. *Instr.Course Lect.* 47:243-249, 1998.
- Lewandrowski, U., Rebmann, V., Passler, M., Schollmeier, G., Ekkernkamp, A., Grosse-Wilde, H. and Tomford, W. W. Immune response to perforated and partially demineralized bone allografts. *J Orthop.Sci.* 6 (6):545-555, 2001.
- Li, S. H., De Wijn, J. R., Layrolle, P. and de Groot, K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed.Mater.Res.* 61 (1):109-120, 2002.
- Lian, J. B. and Stein, G. S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 3 (3):269-305, 1992.



- Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L. and van Wijnen, A. J. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem.Suppl* 30-31:62-72, 1998.
- Liang, T., Barnes, J., Seedor, J. G., Quartuccio, H. A., Bolander, M., Jeffrey, J. J. and Rodan, G. A. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone* 13 (6):435-441, 1992.
- Lieberman, J. R., Daluiski, A., Stevenson, S., Wu, L., McAllister, P., Lee, Y. P., Kabo, J. M., Finerman, G. A., Berk, A. J. and Witte, O. N. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg.Am.* 81 (7):905-917, 1999.
- Lieberman, J. R., Daluiski, A. and Einhorn, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg.Am.* 84-A (6):1032-1044, 2002.
- Lin, S., Barrows, T. H., Cartmell, S. H. and Guldberg, R. E. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials* 24 (3):481-489, 2003.
- Lind, M., Overgaard, S., Jensen, T. B., Song, Y., Goodman, S. B., Bunger, C. and Soballe, K. Effect of osteogenic protein 1/collagen composite combined with impacted allograft around hydroxyapatite-coated titanium alloy implants is moderate. *J Biomed.Mater.Res.* 55 (1):89-95, 2001.
- Linder, L. Cancellous impaction grafting in the human femur: histological and radiographic observations in 6 autopsy femurs and 8 biopsies. *Acta Orthop.Scand* 71 (6):543-552, 2000.
- Ling, R. S., Timperley, A. J. and Linder, L. Histology of cancellous impaction grafting in the femur. A case report. *J Bone Joint Surg.Br.* 75 (5):693-696, 1993.

Liu, P., Oyajobi, B. O., Russell, R. G. and Scutt, A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> In vitro. *Calcif.Tissue Int* 65 (2):173-180, 1999.

Liu, Z., Luyten, F. P., Lammens, J. and Dequeker, J. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol.Histopathol.* 14 (2):587-595, 1999.

Lowenhielm, G., Hansson, L. I. and Karrholm, J. Fracture of the lower extremity after total hip replacement. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 108 (3):141-143, 1989.

Lu, H., Kofron, M. D., El Amin, S. F., Attawia, M. A. and Laurencin, C. T. In vitro bone formation using muscle-derived cells: a new paradigm for bone tissue engineering using polymer-bone morphogenetic protein matrices. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 305 (4):882-889, 2003.

Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B., Woods, W. I. and Reddi, A. H. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol.Chem.* 264 (23):13377-13380, 1989.

Magan, A. and Ripamonti, U. Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (*Papio ursinus*). *J Craniofac.Surg.* 7 (1):71-78, 1996.

Mahr, M. A., Bartley, G. B., Bite, U., Clay, R. P., Kasperbauer, J. L. and Holmes, J. M. Norian craniofacial repair system bone cement for the repair of craniofacial skeletal defects. *Ophthal.Plast.Reconstr.Surg.* 16 (5):393-398, 2000.

Malinin, T., Latta, L. L., Wagner, J. L. and Brown, M. D. Healing of fractures with freeze-dried cortical bone plates. Comparison with compression plating. *Clin Orthop.* (190):281-286, 1984.

- Malkani, L., Lewallen, D. G., Cabanela, M. E. and Wallrichs, S. L. Femoral component revision using an uncemented, proximally coated, long-stem prosthesis. *J Arthroplasty* 11 (4):411-418, 1996.
- Mallory, T. H., Kraus, T. J. and Vaughn, B. K. Intraoperative femoral fractures associated with cementless total hip arthroplasty. *Orthopedics* 12 (2):231-239, 1989.
- J. Mankin, M. C. Gebhardt, L. C. Jennings, D. S. Springfield, and W. W. Tomford. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop.* (324):86-97, 1996.
- Marcacci, M., Kon, E., Zaffagnini, S., Vascellari, A., Neri, M. P. and Iacono, F. New cell-based technologies in bone and cartilage tissue engineering. I. Bone reconstruction. *Chir Organi Mov* 88 (1):33-42, 2003.
- Marra, K. G., Szem, J. W., Kumta, P. N., DiMilla, P. A. and Weiss, L. E. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed.Mater.Res.* 47 (3):324-335, 1999.
- Martin, Jr., J., Boden, S. D., Titus, L. and Scarborough, N. L. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine* 24 (7):637-645, 1999.
- Masterson, L., Masri, B. A. and Duncan, C. P. The cement mantle in the Exeter impaction allografting technique. A cause for concern. *J Arthroplasty* 12 (7):759-764, 1997.
- McElfresh, C. and Coventry, M. B. Femoral and pelvic fractures after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg.Am.* 56 (3):483-492, 1974.
- McLaren, A. Important differences between sources of embryonic stem cells. *Nature* 408 (6812):513, 2000.

- McLaren, A.. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414 (6859):129-131, 2001.
- Meding, J. B., Ritter, M. A., Keating, E. M. and Faris, P. M. Impaction bone-grafting before insertion of a femoral stem with cement in revision total hip arthroplasty. A minimum two-year follow-up study. *J Bone Joint Surg.Am.* 79 (12):1834-1841, 1997.
- Mendes, S. C., Bezemer, J., Claase, M. B., Grijpma, D. W., Bellia, G., Degli-Innocenti, F., Reis, R. L., de Groot, K., van Blitterswijk, C. A. and de Bruijn, J. D. Evaluation of two biodegradable polymeric systems as substrates for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9 Suppl 1:S91-101, 2003.
- Mennen, U. A new bone-holding clamp for use during internal fixation of fractures. *S.Afr.Med.J* 60 (15):580-581, 1981.
- Mennen, U. The paraskeletal clamp-on plate. Part I. A new alternative for retaining the surgically reduced position of bone fractures. *S.Afr.Med.J* 66 (5):167-170, 1984.
- Mennen, U. The use of a clamp-on plate for forearm fractures. *Orthopedics* 12 (1):39-43, 1989.
- Michelson D. and Curl, L. A. Use of demineralized bone matrix in hindfoot arthrodesis. *Clin Orthop.* (325):203-208, 1996.
- Mihalko, M., Beaudoin, A. J., Cardea, J. A. and Krause, W. R. Finite-element modelling of femoral shaft fracture fixation techniques post total hip arthroplasty. *J Biomech.* 25 (5):469-476, 1992.
- Missakian, M. L. and Rand, J. A. Fractures of the femoral shaft adjacent to long stem femoral components of total hip arthroplasty: report of seven cases. *Orthopedics* 16 (2):149-152, 1993.

Miyazono, F., Kusanagi, K. and Inoue, H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187 (3):265-276, 2001.

Monchau, F., Lefevre, A., Descamps, M., Belquin-myrdycz, A., Laffargue, P. and Hildebrand, H. F. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomol.Eng* 19 (2-6):143-152, 2002.

Mont, M.A., Maar, D. C., Krackow, K. A. and Hungerford, D. S. Hoop-stress fractures of the proximal femur during hip arthroplasty. Management and results in 19 cases. *J Bone Joint Surg.Br.* 74 (2):257-260, 1992.

Mont, M.A. and Maar, D. C. Fractures of the ipsilateral femur after hip arthroplasty. A statistical analysis of outcome based on 487 patients. *J Arthroplasty* 9 (5):511-519, 1994.

Montijo, H., Ebert, F. R. and Lennox, D. A. Treatment of proximal femur fractures associated with total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 4 (2):115-123, 1989.

Moran, M.C. Treatment of periprosthetic fractures around total hip arthroplasty with an extensively coated femoral component. *J Arthroplasty* 11 (8):981-988, 1996.

Morone, M. A. and Boden, S. D. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. *Spine* 23 (2):159-167, 1998.

Morrey, F. and Kavanagh, B. F. Complications with revision of the femoral component of total hip arthroplasty. Comparison between cemented and uncemented techniques. *J Arthroplasty* 7 (1):71-79, 1992.

Mulliken, B. D., Rorabeck, C. H. and Bourne, R. B. Uncemented revision total hip arthroplasty: a 4-to-6-year review. *Clin Orthop.* (325):156-162, 1996.

Mulliken, J. B. and Glowacki, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast.Reconstr.Surg.* 65 (5):553-560, 1980.

Mulliken, B., Glowacki, J., Kaban, L. B., Folkman, J. and Murray, J. E. Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann.Surg.* 194 (3):366-372, 1981.

Murashima, Y., Yoshikawa, G., Wadachi, R., Sawada, N. and Suda, H. Calcium sulphate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. *Int Endod.J* 35 (9):768-774, 2002.

Muschler, G. F., Negami, S., Hyodo, A., Gaisser, D., Easley, K. and Kambic, H. Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop.* (328):250-260, 1996.

Musgrave, S., Bosch, P., Ghivizzani, S., Robbins, P. D., Evans, C. H. and Huard, J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24 (6):541-547, 1999.

Musgrave, S., Bosch, P., Lee, J. Y., Pelinkovic, D., Ghivizzani, S. C., Whalen, J., Niyibizi, C. and Huard, J. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin Orthop.* (378):290-305, 2000.

Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. and Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol.Methods* 204 (2):205-208, 1997.

Nash, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K. A. and Hicklin, D. J. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15 (2):203-208, 1994.

Nelissen, R. G., Bauer, T. W., Weidenhielm, L. R., LeGolvan, D. P. and Mikhail, W. E.

Revision hip arthroplasty with the use of cement and impaction grafting. Histological analysis of four cases. *J Bone Joint Surg.Am.* 77 (3):412-422, 1995.

Niyibizi, C., Baltzer, A., Lattermann, C., Oyama, M., Whalen, J. D., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop.* (355 Suppl):S148-S153, 1998.

Noshi, T., Yoshikawa, T., Ikeuchi, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Horiuchi, K., Sugimura, M., Ichijima, K. and Yonemasu, K. Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed.Mater.Res.* 52 (4):621-630, 2000.

Ohgushi, H., Dohi, Y., Katuda, T., Tamai, S., Tabata, S. and Suwa, Y. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed.Mater.Res.* 32 (3):333-340, 1996.

Oonishi, H., Iwaki, Y., Kin, N., Kushitani, S., Murata, N., Wakitani, S. and Imoto, K.

Hydroxyapatite in revision of total hip replacements with massive acetabular defects: 4- to 10-year clinical results. *J Bone Joint Surg.Br.* 79 (1):87-92, 1997a.

Oonishi, H., Kushitani, S., Yasukawa, E., Iwaki, H., Hench, L. L., Wilson, J., Tsuji, E. and Sugihara, T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop.* (334):316-325, 1997b.

Oreffo, O., Viridi, A. S. and Triffitt, J. T. Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur.J Cell Biol.* 74 (3):251-261, 1997.

Oreffo, O. and Triffitt, J. T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 25 (2 Suppl):5S-9S, 1999.

Otto, F. and Tsou, K. C. A comparative study of DAPI, DIPI, and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains. *Stain Technol.* 60 (1):7-11, 1985.

Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B. and Stein, G. S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143 (3):420-430, 1990.

Pacicca, M., Patel, N., Lee, C., Salisbury, K., Lehmann, W., Carvalho, R., Gerstenfeld, L. C. and Einhorn, T. A. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 33 (6):889-898, 2003.

Pak, H., Paprosky, W. G., Jablonsky, W. S. and Lawrence, J. M. Femoral strut allografts in cementless revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop.* (295):172-178, 1993.

Paley, D., Young, M. C., Wiley, A. M., Fornasier, V. L. and Jackson, R. W. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop.* (208):300-312, 1986.

Partridge, A. J. and Evans, P. E. The treatment of fractures of the shaft of the femur using nylon cerclage. *J Bone Joint Surg.Br.* 64 (2):210-214, 1982.

Passuti, N., Daculsi, G., Rogez, J. M., Martin, S. and Bainvel, J. V. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin Orthop.* (248):169-176, 1989.

Pazzaglia, U. and Byers, P. D. Fractured femoral shaft through an osteolytic lesion resulting from the reaction to a prosthesis. A case report. *J Bone Joint Surg.Br.* 66 (3):337-339, 1984.

Pecina, M., Giltaij, L. R. and Vukicevic, S. Orthopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). *Int Orthop.* 25 (4):203-208, 2001.



- Peel, S. A., Hu, M. and Clokie, C. M. In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: in vitro studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac.Surg.* 14 (3):284-291, 2003.
- Pekkarinen, J., Alho, A., Lepisto, J., Ylikoski, M., Ylinen, P. and Paavilainen, T. Impaction bone grafting in revision hip surgery. A high incidence of complications. *J Bone Joint Surg.Br.* 82 (1):103-107, 2000.
- Pelker, R. R. and Friedlaender, G. E. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop.Clin North Am.* 18 (2):235-239, 1987.
- Pelled, G., Aslan, G. T. H., Gazit, Z. and Gazit, D. Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering. *Curr.Pharm.Des* 8 (21):1917-1928, 2002.
- Pellicci, P. M., Inglis, A. E. and Salvati, E. A. Perforation of the femoral shaft during total hip replacement. *J Bone Joint Surg.Am.* 62 (2):234-240, 1980.
- Peters, C. L., Rivero, D. P., Kull, L. R., Jacobs, J. J., Rosenberg, A. G. and Galante, J. O. Revision total hip arthroplasty without cement: subsidence of proximally porous-coated femoral components. *J Bone Joint Surg.Am.* 77 (8):1217-1226, 1995.
- Petersen, V.S. Problems with the Mennen plate when used for femoral fractures associated with implants. A report of 5 patients. *Int Orthop.* 22 (3):169-170, 1998.
- Pineda, L. M., Busing, M., Meinig, R. P. and Gogolewski, S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed.Mater.Res.* 31 (3):385-394, 1996.
- Poss, R., Ewald, F. C., Thomas, W. H. and Sledge, C. B. Complications of total hip-replacement arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg.Am.* 58 (8):1130-1133, 1976.

- Poynton, A. R. and Lane, J. M. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* 27 (16 Suppl 1):S40-S48, 2002.
- Preidler, K. W., Lemperle, S. M., Holmes, R. E., Calhoun, C. J., Shors, E. C., Brossmann, J. and Sartoris, D. J. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes. Evaluation of bone density with dual energy x-ray absorptiometry. *Invest Radiol.* 31 (11):716-723, 1996.
- Price, C. T., Connolly, J. F., Carantzas, A. C. and Ilyas, I.. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 28 (8):793-798, 2003.
- Prockop, D. J., Gregory, C. A. and Spees, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 Suppl 1:11917-11923, 2003.
- Pruss, A., Kao, M., Gohs, U., Koscielny, J., von Versen, R. and Pauli, G. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals* 30 (2):125-133, 2002.
- Quarto, R., Thomas, D. and Liang, C. T. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif.Tissue Int* 56 (2):123-129, 1995.
- Quirk, R. A., Chan, W. C., Davies, M. C., Tendler, S. J. and Shakesheff, K. M. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials* 22 (8):865-872, 2001.
- Radcliffe, S. N. and Smith, D. N. The Mennen plate in periprosthetic hip fractures. *Injury* 27 (1):27-30, 1996.
- Rago, R., Mitchen, J. and Wilding, G. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal.Biochem.* 191 (1):31-34, 1990.

- Ramoshebi, L. N., Matsaba, T. N., Teare, J., Renton, L., Patton, J. and Ripamonti, U. Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev.Mol.Med.* 4:1-11, 2002.
- Reddi, A. H. and Huggins, C. B. Citrate and alkaline phosphatase during transformation of fibroblasts by the matrix and minerals of bone. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 140 (3):807-810, 1972.
- Reddi, A. H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll.Relat Res.* 1 (2):209-226, 1981.
- Reddi, A. H. and Cunningham, N. S. Recent progress in bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins: challenges for biomechanical and tissue engineering. *J Biomech.Eng* 113 (2):189-190, 1991.
- Reddi, A. H. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. *J Cell Biochem.* 56 (2):192-195, 1994.
- Reddi, A. H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6 (4):351-359, 2000.
- Reddi, A. H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg.Am.* 83-A Suppl 1 (Pt 1):S1-S6, 2001.
- Reich, S. M. and Jaffe, W. L. Femoral fractures associated with loose cemented total hip arthroplasty. *Orthopedics* 17 (2):185-189, 1994.
- Richards, M., Goulet, J. A., Weiss, J. A., Waanders, N. A., Schaffler, M. B. and Goldstein, S. A. Bone regeneration and fracture healing. Experience with distraction osteogenesis model. *Clin Orthop.* (355 Suppl):S191-S204, 1998.

Rickard, D. J., Hofbauer, L. C., Bonde, S. K., Gori, F., Spelsberg, T. C. and Riggs, B. L. Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest* 101 (2):413-422, 1998.

Ries, M. D. Periprosthetic fractures: early and late. *Orthopedics* 20 (9):798-800, 1997.

Ripamonti, U. Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clin Orthop.* (269):284-294, 1991a.

Ripamonti, U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg.Am.* 73 (5):692-703, 1991b.

Ripamonti, U. Calvarial regeneration in primates with autolyzed antigen-extracted allogeneic bone. *Clin Orthop.* (282):293-303, 1992a.

Ripamonti, U. Calvarial reconstruction in baboons with porous hydroxyapatite. *J Craniofac.Surg.* 3 (3):149-159, 1992b.

Ripamonti, U., Ma, S. and Reddi, A. H. The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* 12 (3):202-212, 1992a.

Ripamonti, U., Ma, S., Cunningham, N. S., Yeates, L. and Reddi, A. H. Initiation of bone regeneration in adult baboons by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* 12 (5):369-380, 1992b.

Ripamonti, U., van den Heever B., and Van Wyk, J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskelentially in baboons. *Matrix* 13 (6):491-502, 1993.

Ripamonti, U., Heliotis, M., van den Heever B., and Reddi, A. H. Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (*Papio ursinus*). *J Periodontal Res.* 29 (6):439-445, 1994.

Ripamonti, U. and Reddi, A. H. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res.* 29 (4):225-235, 1994.

Ripamonti, U., van den Heever B., Sampath, T. K., Tucker, M. M., Rueger, D. C. and Reddi, A. H. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13 (3-4):273-89,color, 1996.

Ripamonti, U., Duneas, N., van den Heever B., Bosch, C. and Crooks, J. Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner.Res.* 12 (10):1584-1595, 1997.

Ripamonti, U. Tissue morphogenesis and tissue engineering by bone morphogenetic proteins. *SADJ.* 54 (6):257-262, 1999.

Ripamonti, U. and Tasker, J. R. Advances in biotechnology for tissue engineering of bone. *Curr.Pharm.Biotechnol.* 1 (1):47-55, 2000.

Ripamonti, U., Crooks, J. and Rueger, D. C. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast.Reconstr.Surg.* 107 (4):977-988, 2001.

Roffman, M., Silbermann, M. and Mendes, D. G. Viability and osteogenicity of bone graft coated with methylmethacrylate cement. *Acta Orthop.Scand* 53 (4):513-519, 1982.

Roffman, M. and Mendes, D. G. Fracture of the femur after total hip arthroplasty. *Orthopedics* 12 (8):1067-1070, 1989.

Rose, F. R. and Oreffo, R. O. Bone tissue engineering: hope vs hype.

*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292 (1):1-7, 2002.

Rose, T., Peng, H., Usas, A., Kuroda, R., Lill, H., Fu, F. H. and Huard, J. Gene therapy to improve osteogenesis in bone lesions with severe soft tissue damage. *Langenbecks Arch.Surg.* 388 (5):356-365, 2003.

Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Miyazono, K. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (17):7632-7636, 1995.

Rougraff, B. T. and Kling, T. J. Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow. *J Bone Joint Surg.Am.* 84-A (6):921-929, 2002.

Sabokbar, A., Millett, P. J., Myer, B. and Rushton, N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 27 (1):57-67, 1994.

Saito, N. and Takaoka, K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24 (13):2287-2293, 2003.

Sakou, T., Onishi, T., Yamamoto, T., Nagamine, T., Sampath, T. and ten Dijke, P. Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner.Res.* 14 (7):1145-1152, 1999.

Salkeld, S. L., Patron, L. P., Barrack, R. L. and Cook, S. D. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg.Am.* 83-A (6):803-816, 2001.

Sampath, T. K. and Reddi, A. H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (12):7599-7603, 1981.

Sampath, T. K. and Reddi, A. H. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80 (21):6591-6595, 1983.

Sampath, T. K. and Reddi, A. H. Distribution of bone inductive proteins in mineralized and demineralized extracellular matrix. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 119 (3):949-954, 1984.

Sampath, T. K., Coughlin, J. E., Whetstone, R. M., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R. J., Ozkaynak, E., Oppermann, H. and Rueger, D. C. Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol.Chem.* 265 (22):13198-13205, 1990.

Sandhu, S., Khan, S. N., Suh, D. Y. and Boden, S. D. Demineralized bone matrix, bone morphogenetic proteins, and animal models of spine fusion: an overview. *Eur.Spine J* 10 Suppl 2:S122-S131, 2001.

Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E. and Padgett, R. W. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (2):790-794, 1996.

Scaduto, A. A. and Lieberman, J. R. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop.Clin North Am.* 30 (4):625-633, 1999.

Schildhauer, T. A., Bauer, T. W., Josten, C. and Muhr, G. Open reduction and augmentation of internal fixation with an injectable skeletal cement for the treatment of complex calcaneal fractures. *J Orthop.Trauma* 14 (5):309-317, 2000.

Schulte, M., Schultheiss, M., Hartwig, E., Wilke, H. J., Wolf, S., Sokiranski, R., Fleiter, T., Kinzl, L. and Claes, L. Vertebral body replacement with a bioglass-polyurethane composite in spine metastases--clinical, radiological and biomechanical results. *Eur.Spine J* 9 (5):437-444, 2000.

Schwartz, Jr., J. T., Mayer, J. G. and Engh, C. A. Femoral fracture during non-cemented total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg.Am.* 71 (8):1135-1142, 1989.

Scott, R. D., Turner, R. H., Leitzes, S. M. and Aufranc, O. E. Femoral fractures in conjunction with total hip replacement. *J Bone Joint Surg.Am.* 57 (4):494-501, 1975.

Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. and Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139 (3):1347-1358, 1995.

Serocki, J. H., Chandler, R. W. and Dorr, L. D. Treatment of fractures about hip prostheses with compression plating. *J Arthroplasty* 7 (2):129-135, 1992.

Shea, C. M., Edgar, C. M., Einhorn, T. A. and Gerstenfeld, L. C. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 90 (6):1112-1127, 2003.

Siegmeth, A., Menth-Chiari, W., Wozasek, G. E. and Vecsei, V. [Periprosthetic femur shaft fracture. Indications and outcome in 51 patients]. *Unfallchirurg* 101 (12):901-906, 1998.

Simonds, R. J., Holmberg, S. D., Hurwitz, R. L., Coleman, T. R., Bottenfield, S., Conley, L. J., Kohlenberg, S. H., Castro, K. G., Dahan, B. A. and Schable, C. A. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl.J Med.* 326 (11):726-732, 1992.



- Skerry, T. M. and Suva, L. J. Investigation of the regulation of bone mass by mechanical loading: from quantitative cytochemistry to gene array. *Cell Biochem.Funct.* 21 (3):223-229, 2003.
- Slooff, T. J., Huiskes, R., van Horn, J. and Lemmens, A. J. Bone grafting in total hip replacement for acetabular protrusion. *Acta Orthop.Scand* 55 (6):593-596, 1984.
- Slooff, T. J., Buma, P., Schreurs, B. W., Schimmel, J. W., Huiskes, R. and Gardeniers, J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clin Orthop.* (324):108-115, 1996.
- Slooff, T. J., Schreurs, B. W., Buma, P. and Gardeniers, J. W. Impaction morcellized allografting and cement. *Instr.Course Lect.* 48:79-89, 1999.
- Soballe, K., Hansen, E. S., Brockstedt-Rasmussen, H., Pedersen, C. M. and Bunger, C. Bone graft incorporation around titanium-alloy- and hydroxyapatite-coated implants in dogs. *Clin Orthop.* (274):282-293, 1992.
- Solchaga, L. A., Gao, J., Dennis, J. E., Awadallah, A., Lundberg, M., Caplan, A. I. and Goldberg, V. M. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng* 8 (2):333-347, 2002.
- Sonis, S. T., Kaban, L. B. and Glowacki, J. Clinical trial of demineralized bone powder in the treatment of periodontal defects. *J Oral Med.* 38 (3):117-122, 1983.
- Stein, R. A. and Staros, J. V. Thermal inactivation of the protein tyrosine kinase of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 35 (9):2878-2884, 1996.
- Stephenson, P. K., Freeman, M. A., Revell, P. A., Germain, J., Tuke, M. and Pirie, C. J. The effect of hydroxyapatite coating on ingrowth of bone into cavities in an implant. *J Arthroplasty* 6 (1):51-58, 1991.

- Stern, R. E., Harwin, S. F. and Kulick, R. G. Management of ipsilateral femoral shaft fractures following hip arthroplasty. *Orthop.Rev.* 20 (9):779-784, 1991.
- Strong, D. M., Friedlaender, G. E., Tomford, W. W., Springfield, D. S., Shives, T. C., Burchardt, H., Enneking, W. F. and Mankin, H. J. Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clin Orthop.* (326):107-114, 1996.
- Stuchin, S. A. Femoral shaft fracture in porous and press-fit total hip arthroplasty. *Orthop.Rev.* 19 (2):153-159, 1990.
- Sun, L., Hu, Y., Ning, Z. and Liang, Z. The correlation between immune rejection and osteoinduction of allogeneic bone grafting. *Chin Med.J (Engl.)* 111 (9):818-822, 1998.
- Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, N., Miyazono, K., Matsumoto, T. and Fujita, T. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 140 (5):2125-2133, 1999.
- Swenson, C. L. and Arnoczky, S. P. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg.Am.* 85-A (2):323-332, 2003.
- Sydney, S. V. and Mallory, T. H. Controlled perforation. A safe method of cement removal from the femoral canal. *Clin Orthop.* (253):168-172, 1990.
- Tadross, T. S., Nanu, A. M., Buchanan, M. J. and Checketts, R. G. Dall-Miles plating for periprosthetic B1 fractures of the femur. *J Arthroplasty* 15 (1):47-51, 2000.
- Tagil, M. The morselized and impacted bone graft. Animal experiments on proteins, impaction and load. *Acta Orthop.Scand Suppl* 290:1-40, 2000.

Tagil, M., Jeppsson, C. and Aspenberg, P. Bone graft incorporation. Effects of osteogenic protein-1 and impaction. *Clin Orthop.* (371):240-245, 2000.

Takahashi, T., Tominaga, T., Watabe, N., Yokobori, Jr., A. T., Sasada, H. and Yoshimoto, T. Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model. *J Neurosurg.* 90 (4 Suppl):224-230, 1999.

Takikawa, S., Bauer, T. W., Kambic, H. and Togawa, D. Comparative evaluation of the osteoinductivity of two formulations of human demineralized bone matrix. *J Biomed.Mater.Res.* 65A (1):37-42, 2003.

Talab, Y. A., States, J. D. and Evarts, C. M. Femoral shaft perforation: a complication of total hip reconstruction. *Clin Orthop.* (141):158-165, 1979.

Taylor, M. M., Meyers, M. H. and Harvey, Jr, J. P. Intraoperative femur fractures during total hip replacement. *Clin Orthop.* (137):96-103, 1978.

ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H. and Miyazono, K. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol.Chem.* 269 (25):16985-16988, 1994.

Thalgott, J. S., Giuffre, J. M., Fritts, K., Timlin, M. and Klezl, Z. Instrumented posterolateral lumbar fusion using coralline hydroxyapatite with or without demineralized bone matrix, as an adjunct to autologous bone. *Spine J* 1 (2):131-137, 2001.

Thalgott, J. S., Giuffre, J. M., Klezl, Z. and Timlin, M. Anterior lumbar interbody fusion with titanium mesh cages, coralline hydroxyapatite, and demineralized bone matrix as part of a circumferential fusion. *Spine J* 2 (1):63-69, 2002.

Thomson, B. M., Bennett, J., Dean, V., Triffitt, J., Meikle, M. C. and Loveridge, N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming

activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor beta, and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner.Res.* 8 (10):1173-1183, 1993.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391):1145-1147, 1998.

Tiedeman, J. J., Connolly, J. F., Strates, B. S. and Lippiello, L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop.* (268):294-302, 1991.

Tiedeman, J. J., Garvin, K. L., Kile, T. A. and Connolly, J. F. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* 18 (12):1153-1158, 1995.

Togawa, D., Bauer, T. W., Lieberman, I. H. and Sakai, H. Lumbar intervertebral body fusion cages: histological evaluation of clinically failed cages retrieved from humans. *J Bone Joint Surg.Am.* 86-A (1):70-79, 2004.

Tower, S. S. and Beals, R. K. Fractures of the femur after hip replacement: the Oregon experience. *Orthop.Clin North Am.* 30 (2):235-247, 1999.

Trippel, S. B. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop.* (355 Suppl):S301-S313, 1998.

Tsiridis, E. and Gie, G. A. Mal-united femoral fractures adjacent to loose total hip arthroplasties. Salvage with impaction grafting. A case report. *Injury* 33 (1):81-83, 2002.

Tsiridis, E. The Mennen femoral plate for fixation of periprosthetic femoral fractures following hip arthroplasty [Injury 33 (2002) 47-50]. *Injury* 34 (10):799, 2003.

Tsiridis, E. and Narvani, A. Mennen plate fixation for the treatment of periprosthetic femoral fractures. *J Bone Joint Surg.Am.* 85-A (9):1851, 2003.

Tsiridis, E., Haddad, F. S. and Gie, G. A. Dall-Miles plates for periprosthetic femoral fractures. A critical review of 16 cases. *Injury* 34 (2):107-110, 2003a.

Tsiridis, E., Haddad, F. S. and Gie, G. A. The management of periprosthetic femoral fractures around hip replacements. *Injury* 34 (2):95-105, 2003b.

Uchio, Y., Shu, N., Nishikawa, U., Takata, K. and Ochi, M. Mennen plate fixation for fractures of the femoral shaft after ipsilateral hip arthroplasty. *J Trauma* 42 (6):1157-1160, 1997.

Ullmark, U. and Nilsson, O. Impacted corticocancellous allografts: recoil and strength. *J Arthroplasty* 14 (8):1019-1023, 1999.

Ullmark, U. and Obrant, K. J. Histology of impacted bone-graft incorporation. *J Arthroplasty* 17 (2):150-157, 2002.

Urist, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (698):893-899, 1965.

Urist, M. R., Wallace, T. H. and Adams, T. The function of fibrocartilaginous fracture callus. Observations on transplants labelled with tritiated thymide. *J Bone Joint Surg.Br.* 47:304-318, 1965.

Urist, M. R., Silverman, B. F., Buring, K., Dubuc, F. L. and Rosenberg, J. M. The bone induction principle. *Clin Orthop.* 53:243-283, 1967.

Urist, M. R. Osteoinduction in undemineralized bone implants modified by chemical inhibitors of endogenous matrix enzymes. A preliminary report. *Clin Orthop.* 87:132-137, 1972.

Urist, M. R., Mikulski, A. and Boyd, S. D. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch.Surg.* 110 (4):416-428, 1975.

Urist, M. R. Bone transplants and implants. In: *Fundamental and clinical bone physiology*, edited by M. R. Urist, Philadelphia:JB Lippincott, 1980, p. 331.

Urist, M. R. Bone morphogenetic protein, bone regeneration, heterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. In: *Bone and mineral research*, edited by W. A Peck, Amsterdam:Elsevier Science Publishers, 1989, p. 27.

Vacanti, C. A. and Vacanti, J. P. Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaryngol.Clin North Am.* 27 (1):263-276, 1994.

Vaccaro, A. R. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 25 (5 Suppl):s571-s578, 2002.

Vaccaro, A. R., Patel, T., Fischgrund, J., Anderson, D. G., Truumees, E., Herkowitz, H., Phillips, F., Hilibrand, A. and Albert, T. J. A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur.Spine J* 12 (5):495-500, 2003.

Van de Putte, K. A. and Urist, M. R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop.* 43:257-270, 1965.

van Eeden, S. P. and Ripamonti, U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plast.Reconstr.Surg.* 93 (5):959-966, 1994.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M. and Buttery, L. D. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol.* 27 (4):227-232, 2002.

Wang, G. J., Miller, T. O. and Stamp, W. G. Femoral fracture following hip arthroplasty. Brief note on treatment. *J Bone Joint Surg.Am.* 67 (6):956-958, 1985.

Warren, S. M., Nacamuli, R. K., Song, H. M. and Longaker, M. T. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac.Surg.* 15 (1):34-37, 2004.

Weidenhielm, L. R., Mikhail, W. E., Wretenberg, P., Fow, J., Simpson, J. and Bauer, T. W. Analysis of the retrieved hip after revision with impaction grafting. *Acta Orthop.Scand* 72 (6):609-614, 2001.

Whittaker, R. P., Sotos, L. N. and Ralston, E. L. Fractures of the femur about femoral endoprotheses. *J Trauma* 14 (8):675-694, 1974.

Wildemann, B., Schmidmaier, G., Brenner, N., Huning, M., Stange, R., Haas, N. P. and Raschke, M. Quantification, Localization, and Expression of IGF-I and TGF-beta1 During Growth Factor-Stimulated Fracture Healing. *Calcif.Tissue Int*, 2004.

Wilson, C. E., de Bruijn, J. D., van Blitterswijk, C. A., Verbout, A. J. and Dhert, W. J. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *J Biomed.Mater.Res.* 68A (1):123-132, 2004.

Wlodarski, K. H. and Reddi, A. H. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif.Tissue Int* 39 (6):382-385, 1986.

Wolfe, S. W., Pike, L., Slade, III, J. F. and Katz, L. D. Augmentation of distal radius fracture fixation with coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *J Hand Surg.[Am.]* 24 (4):816-827, 1999.

Wong, P. and Gross, A. E. The use of structural allografts for treating periprosthetic fractures about the hip and knee. *Orthop.Clin North Am.* 30 (2):259-264, 1999.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242 (4885):1528-1534, 1988.

Wozney, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol.Reprod.Dev.* 32 (2):160-167, 1992.

Xu, H. H., Quinn, J. B., Takagi, S. and Chow, L. C. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25 (6):1029-1037, 2004.

Xynos, I. D., Hukkanen, M. V., Batten, J. J., Buttery, L. D., Hench, L. L. and Polak, J. M. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif.Tissue Int* 67 (4):321-329, 2000.

Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K. and Heldin, C. H. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol.Chem.* 269 (31):20172-20178, 1994.

Yang, X., Tare, R. S., Partridge, K. A., Roach, H. I., Clarke, N. M., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M. and Oreffo, R. O. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner.Res.* 18 (1):47-57, 2003.

Yang, Y., Magnay, J. L., Cooling, L. and El, H. A. Development of a 'mechano-active' scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 23 (10):2119-2126, 2002.

Yeh, L. C., Tsai, A. D. and Lee, J. C. Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. *J Cell Biochem.* 87 (3):292-304, 2002.



Yin, Y., Ye, F., Cui, J., Zhang, F., Li, X. and Yao, K. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed.Mater.Res.* 67A (3):844-855, 2003.

Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Nakajima, H., Yamada, E., Ichijima, K., Tamai, S. and Ohta, T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69 (1):128-134, 2000.

Yoshikawa, T., Nakajima, H., Yamada, E., Akahane, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Tamai, S. and Ichijima, K. In vivo osteogenic capability of cultured allogeneic bone in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of FK506 in vivo. *J Bone Miner.Res.* 15 (6):1147-1157, 2000.

Young, B. H., Peng, H. and Huard, J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering to improve bone healing. *Clin Orthop.* (403 Suppl):S243-S251, 2002.

Young, B. H., Peng, H. and Huard, J. Muscle-based gene therapy and tissue engineering to improve bone healing. *Clin Orthop.* (403 Suppl):S243-S251, 2002.

Younger, E. M. and Chapman, M. W. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop.Trauma* 3 (3):192-195, 1989.

Younger, T. I., Bradford, M. S., Magnus, R. E. and Paprosky, W. G. Extended proximal femoral osteotomy. A new technique for femoral revision arthroplasty. *J Arthroplasty* 10 (3):329-338, 1995.

Zenni, Jr., E. J., Pomeroy, D. L. and Caudle, R. J. Ogden plate and other fixations for fractures complicating femoral endoprostheses. *Clin Orthop.* (231):83-90, 1988.

Zhang, Y., Ni, M., Zhang, M. and Ratner, B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9 (2):337-345, 2003.