

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΒΙΟΫΛΙΚΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ**

ΕΛΕΝΑ Ι. ΠΑΠΠΑ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2023

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ

ΕΛΕΝΑ Ι. ΠΑΠΠΑ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μέλη συμβουλευτικής επιτροπής

A.I. Σιδέρη	Επίκουρη καθηγήτρια	Επιβλέπουσα
B.Γ. Τσιώλη	Αναπληρώτρια καθηγήτρια	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Γ.Χ. Φθενάκης	Καθηγητής	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Λ.Β. Αθανασίου	Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας
Α.Δ. Γαλάτος	Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας
Μ.Σ. Μπαρμπαγιάννη	Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας
Ν.Ν. Πράσιнос	Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Παν. Θεσσαλονίκης
A.I. Σιδέρη	Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας
B.Γ. Τσιώλη	Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας
Γ.Χ. Φθενάκης	Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2023

Σε όλους όσους το πίστεψαν

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	16
ABSTRACT	20
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	26
1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	27
1.1. Ανατομία των οστών	27
1.2. Ιστολογία-Φυσιολογία των οστών	27
1.2.1. Οργανική ουσία και ανόργανα άλατα.....	28
1.2.2. Κύτταρα του οστίτη ιστού.....	29
1.2.3. Περίοστεο.....	30
1.2.4. Ειδή οστίτη ιστού	30
1.3. Οστεογένεση	31
1.4. Αντίδραση των οστών σε ορμονικά ερεθίσματα	33
1.5. Αιμάτωση των οστών.....	33
1.5.1. Φυσιολογική αιμάτωση	33
1.5.1.1. Το προσαγωγό αγγειακό σύστημα.....	33
1.5.1.2. Το ενδιάμεσο αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού	35
1.5.1.3 Το απαγωγό αγγειακό σύστημα.....	35
1.5.2. Αντίδραση της αιματικής κυκλοφορίας μετά από κατάγματα	35
2. ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΟΣΤΟΥ	35
2.1. Άμεση ή πρωτογενής πώρωση κατάγματος.....	36
2.1.1. Πώρωση επαφής.....	37
2.1.2. Πώρωση κενού	37
2.2. Έμμεση ή δευτερογενής πώρωση κατάγματος.....	37
2.2.1. Φλεγμονώδης φάση	38
2.2.2. Επανορθωτική φάση	39
2.2.3. Φάση ανακατασκευής.....	41
2.3. Μικροκίνηση.....	41
2.4. Βιολογική πώρωση κατάγματος.....	42
2.5. Αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν την πώρωση κατάγματος.....	42
2.6. Ρυθμός πώρωσης κατάγματος.....	45
2.7. Επιβράδυνση ή αποτυχία της πώρωσης κατάγματος.....	45
2.8. Μέθοδοι αξιολόγησης της πώρωσης κατάγματος	47

2.8.1. Ακτινολογική εξέταση	47
2.8.2. Αξονική τομογραφία	48
2.8.3. Υπερηχοτομογραφική εξέταση.....	48
2.8.3.1. Ασπρόμαυρη απεικόνιση (B-mode)	48
2.8.3.2 Απεικόνιση με χρήση Color Doppler	49
2.8.4. Μαγνητική τομογραφία.....	50
2.8.5. Σπινθηρογράφημα οστών.....	50
3. ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ.....	50
3.1. Ενδείξεις χρήσης των οστικών μοσχευμάτων	50
3.2. Ιστορικά στοιχεία.....	51
3.3. Ενσωμάτωση των οστικών μοσχευμάτων	51
3.4. Ιδιότητες των οστικών μοσχευμάτων.....	53
3.4.1. Οστεογένεση.....	53
3.4.2. Οστεοεπαγωγή	53
3.4.3. ΟΣΤΕΟΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ	53
3.5. Ταξινόμηση των οστικών μοσχευμάτων.....	54
3.5.1. Ταξινόμηση ανάλογα με το είδος του οστού προέλευσης	54
3.5.1.1. Σπογγώδες οστεομόσχευμα	54
3.5.1.2. Φλοιώδες οστεομόσχευμα	54
3.5.1.3. Φλοιοσπογγώδες οστεομόσχευμα.....	54
3.5.2. Ταξινόμηση ανάλογα με την αγγείωση	55
3.5.3. Ταξινόμηση ανάλογα με την προέλευση.....	55
3.5.3.1. Αυτογενή ή αυτομοσχεύματα.....	55
3.5.3.2. Ομοιογενή μοσχεύματα ή αλλομοσχεύματα.....	56
3.5.3.3. Ετερογενή μοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα.....	57
3.5.3.4. Συνθετικά υποκατάστατα οστών	58
3.6. Αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα (ο χρυσός κανόνας)	58
3.7. Συνθετικά οστικά υποκατάστατα.....	59
3.7.1. Θεικό ασβέστιο.....	60
3.7.2. Βιοενεργό γυαλί	60
3.7.3. Πολυμερή	61
3.7.4. Υποκατάστατα φωσφορικού ασβεστίου	61
3.7.4.1. Γενικά στοιχεία.....	61
3.7.4.2. Ιστορικά στοιχεία	63
3.7.4.3. Αρχιτεκτονική δομή υλικών φωσφορικού ασβεστίου.....	63
3.7.4.4. Οστεοεπαγωγική δράση υλικών φωσφορικού ασβεστίου	64
3.8. Υδροξυαπατίτης.....	64

3.9. Νανοκρυσταλλικός υδροξυαπατίτης	67
4. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (MSCs)	69
4.1. Ορισμός και βασική λειτουργία των MSCs	70
4.2. Ιστορικά στοιχεία.....	72
4.3. Θεραπευτική χρήση των MSCs	73
4.3.1. Χορήγηση των MSCs.....	73
4.3.2. Ιδιότητες και διαχείριση των MSCs.....	74
4.3.3. Υπεροχή των MSCs του λιπώδους ιστού (ASCs) έναντι των MSCs του μυελού των οστών (BMSCs)	75
4.3.4. Στρωματικά κλάσματα.....	76
4.4. Στρωματικό αγγειακό κλάσμα λιπώδους ιστού (SVF)	76
4.4.1. Τα κύτταρα του SVF και οι ιδιότητές τους	77
4.4.2. Η περιεκτικότητα ASCs στο SVF	78
4.4.3. Η θεμέλια ουσία του SVF	79
4.4.4. Η υπεροχή του SVF έναντι των ASCs.....	79
4.4.5. Η ασφάλεια του SVF	80
4.4.6. Προετοιμασία του SVF.....	81
4.4.6.1. Ενζυμική μέθοδος	81
4.4.6.2. Μη ενζυμικές μέθοδοι και αυτοματοποιημένες συσκευές.....	81
4.4.6.3. Καλλιέργεια των ASCs.....	82
4.5. Οι κλινικές εφαρμογές αυτόλογου SVF στον άνθρωπο	83
4.6. Οι κλινικές εφαρμογές αυτόλογου SVF στην κτηνιατρική ορθοπαιδική.....	84
4.7. Πειραματικές δοκιμές SVF σε οστικά ελλείμματα	85
4.8. Περιορισμοί και κανονισμοί στη χρήση των MSCs και του SVF	86
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	88
A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	89
1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	89
2. ΣΥΝΟΨΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ	90
3. ΥΛΙΚΑ	90
3.1. Υλικά οστεοσύνθεσης.....	90
3.2. Πάστα Νανοκρυσταλλικού Υδροξυαπατίτη	90
3.3. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του SVF	91
4. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΩΝ	91
4.1. Αναισθητικό πρωτόκολλο, προετοιμασία πειραματόζων, προεγχειρητική, διεγχειρητική και μετεγχειρητική αγωγή.....	92
4.2. Χειρουργικές επεμβάσεις.....	93
4.2.1. Λήψη αυτογενούς σπογγώδους οστεομοσχεύματος.....	93

4.2.2. Λήψη λιπώδους ιστού και απομόνωση Στρωματικού Αγγειακού Κλάσματος του Λιπώδους Ιστού (SVF).....	94
4.2.3. Χειρουργική διαδικασία πρόκλησης οστικού ελλείμματος	98
4.2.4. Πλήρωση οστικού ελλείμματος και ολοκλήρωση χειρουργείου	100
5. ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ	104
5.1. Εκτίμηση του βαθμού χωλότητας.....	104
5.2. Ακτινολογικός έλεγχος.....	105
5.3. Υπερηχοτομογραφικός έλεγχος.....	106
5.3.1. Υπερηχοτομογραφικός έλεγχος του μεταταρσίου.....	106
5.3.2. Καταγραφή και υπολογισμός των παραμέτρων της ροής του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία.....	107
5.4. Ιστοπαθολογική εξέταση	108
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	109
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	110
1. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ SVF	110
2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΧΩΛΟΤΗΤΑΣ	110
3. ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	111
4. ΥΠΕΡΗΧΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	114
4.1. Μήκος του ελλείμματος	114
4.2. Αγγείωση του ελλείμματος	118
4.3. Παράμετροι της ροής του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία.....	120
5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	127
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	132
1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΖΩΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ	132
2. ΗΛΙΚΙΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	133
3. ΜΕΤΑΤΑΡΣΙΟ.....	134
4. ΜΗΚΟΣ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	135
5. ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ	136
6. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ	137
7. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΟΣΤΕΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ	138
8. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ.....	140
9. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΧΩΛΟΤΗΤΑΣ	144
10. ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	145
11. ΥΠΕΡΗΧΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	146
11.1. Η χρήση της ασπρόμαυρης απεικόνισης (B-mode)	146
11.2. Η χρήση απεικόνισης με Color Doppler	147
11.3. Η ροή του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία.....	147

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	151
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης.	90
Πίνακας 2: Κλίμακα εκτίμησης χωλότητας προβάτου κατά Kaler <i>et al.</i> (2009).....	105
Πίνακας 3: Τροποποιημένη κλίμακα ακτινολογικής εκτίμησης της πώρωσης κατά Lane and Sandhu (1987).	106
Πίνακας 4: Κλίμακα εκτίμησης της αγγείωσης με Color Doppler.	107
Πίνακας 5: Κλίμακα αξιολόγησης των ιστολογικών μορφολογικών παραμέτρων (Santic <i>et al.</i> 2009).....	109
Πίνακας 6: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της κλίμακας χωλότητας κάθε ομάδας στις διάφορες χρονικές στιγμές παρακολούθησης ($1p < 0,009$ μεταξύ των ομάδων).....	111
Πίνακας 7: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της ακτινολογικής εικόνας κάθε ομάδας σε μηνιαία λήψη ακτινογραφημάτων($1p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων).....	112
Πίνακας 8: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) του μήκους του οστικού ελλείμματος (mm) κάθε ομάδας ανά μέτρηση μετεγχειρητικά ($1p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων).	114
Πίνακας 9: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της αξιολόγησης της αγγείωσης του ελλείμματος και των γύρω ιστών κάθε ομάδας ανά μέτρηση.	118
Πίνακας 10: Προεγχειρητικές τιμές (φυσιολογικές τιμές αναφοράς) για τις παραμέτρους της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του προβάτου.	120
Πίνακας 11: Διάμεση τιμή RI (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.	121
Πίνακας 12: Διάμεση τιμή PI (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.	122
Πίνακας 13: Διάμεση τιμή BF (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.	123
Πίνακας 14: Διάμεση τιμή SV/DV (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.....	125
Πίνακας 15: Ιστολογικό σκορ: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα πειραματισμού. ..	127

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Αντιδραστήρια για απομόνωση SVF.	91
Εικόνα 2: Προσπέλαση (α-β) και λήψη σπογγώδους οστεομοσχεύματος από τη λαγόνια ακρολοφία (γ-ε).	93
Εικόνα 3: Διαδικασία λήψης λιπώδους ιστού από την οσφυοϊερή χώρα (α-ε) και συρραφή τραύματος (στ).	94
Εικόνα 4: Προετοιμασία (α), φιλτράρισμα των διαλυμάτων πέψης (β) και εξουδετέρωση του διαλύματος (γ).	95
Εικόνα 5: Λιπώδης ιστός πριν (αριστερά) και μετά τη διατομή και τις πλύσεις με PBS (δεξιά). .	96
Εικόνα 6: Φυγοκέντρωση του υλικού, προσθήκη του διαλύματος κολλαγενάσης και επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.	97
Εικόνα 7: Το υλικό αμέσως μετά τη διάσπαση (α), την προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης DMEM (β) και μετά την επανάληψη των διαδικασιών εξουδετέρωσης και πλύσεων (γ).	97
Εικόνα 8: Τελικό αποτέλεσμα SVF.	98

Εικόνα 9: Προσπέλαση από την έσω πλάγια επιφάνεια του μεταταρσίου (α-β), τοποθέτηση μεταλλικής πλάκας και οριοθέτηση σημείου οστεκτομής (γ-δ).....	99
Εικόνα 10: 1 ^ο (α), 2 ^ο σημείο οστεκτομής (β) και τελικό αποτέλεσμα (γ-δ).....	100
Εικόνα 11: Πλήρωση οστικού ελλείμματος με HA (Ομάδα Α).	101
Εικόνα 12: Ανάμειξη OM με HA (α-β) και πλήρωση ελλείμματος (γ) (Ομάδα Β).....	101
Εικόνα 13: Ανάμειξη SVF με HA (α-β) και πλήρωση του οστικού ελλείμματος με διαδερμική έγχυση (γ) (Ομάδα Γ).....	102
Εικόνα 14: Ανάμειξη SVF με HA και OM (α) και πλήρωση του οστικού ελλείμματος με διαδερμική έγχυση (β) (Ομάδα Δ).	103
Εικόνα 15: Συρραφή του υποδόριου ιστού (α) και του δέρματος (β) και εξωτερική σταθεροποίηση (γ, αμέσως μετά την ανάνηψη του ζώου στο χώρο ενσταυλισμού).....	104
Εικόνα 16: Μεταβολές της κλίμακας χωλότητας μετεγχειρητικά σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα στις διάφορες ομάδες πειραματισμού (Ομάδα Α : γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	111
Εικόνα 17: Από αριστερά προς τα δεξιά ακτινογραφίες κατά την ημέρα 90 ενός ζώου από την ομάδα Α, τη Β, τη Γ και την ομάδα Δ.....	112
Εικόνα 18: Μεταβολές της διάμεσης τιμής της ακτινολογικής εικόνας σε ειδική κλίμακα σε μηνιαία βάση στις διάφορες ομάδες πειραματισμού και οι γραμμές τάσης (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).	113
Εικόνα 19: Εξέλιξη του μήκους του ελλείμματος από την 40 ^η έως την 90 ^η ημέρα πειραματισμού (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).	115
Εικόνα 20: Υπερηχοτομογραφική εικόνα την ημέρα 90 σε ζώο της ομάδας Α με μήκος ελλείμματος 7 mm (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Β με μήκος ελλείμματος 5 mm (δεξιά)...	116
Εικόνα 21: Υπερηχοτομογραφική εικόνα την ημέρα 90 σε ζώο της ομάδας Γ με μήκος ελλείμματος 1,8 mm (αριστερά) και της ομάδας Δ με μήκος ελλείμματος 4 mm (δεξιά).	116
Εικόνα 22: Υπερηχοτομογραφικό μήκος του οστικού ελλείμματος σε ζώο της ομάδας Γ, στις α) 10 (16 mm), β) 30 (6,5 mm), γ) 60 (5 mm) και δ) 90 (2 mm) ημέρες μετεγχειρητικά.	117
Εικόνα 23: Σταδιακή μείωση (D30, D60, D90) του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ του μήκους του οστικού ελλείμματος και των ευρημάτων της ακτινολογικής κλίμακας.....	117
Εικόνα 24:Υπερηχοτομογραφική εικόνα της αγγείωσης στο έλλειμμα την ημέρα 20 σε ζώο της ομάδας Α με βαθμολογία 2/3 (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Β με βαθμολογία 3/3 (δεξιά).	119
Εικόνα 25:Υπερηχοτομογραφική εικόνα της αγγείωσης στο έλλειμμα την ημέρα 20 σε ζώο της ομάδας Γ με βαθμολογία 3/3 (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Δ με βαθμολογία 3/3 (δεξιά).	119
Εικόνα 26: Βαθμολόγηση της αγγείωσης του ελλείμματος και των γύρω ιστών κάθε ομάδας ανά μέτρηση (Ομάδα Α : γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).	120

Εικόνα 27: Φυσιολογική κυματομορφή της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας προβάτου. Αριστερά φαίνονται οι τιμές των αιμοδυναμικών παραμέτρων του συγκεκριμένου ζώου.....	121
Εικόνα 28: Εξέλιξη RI κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	122
Εικόνα 29: Εξέλιξη PI κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	123
Εικόνα 30: Εξέλιξη BF κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	124
Εικόνα 31:Εξέλιξη SV/DV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).	125
Εικόνα 32:Εξέλιξη EDV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	126
Εικόνα 33: Εξέλιξη PSV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).....	127
Εικόνα 34: Ομάδα Α: απουσία κυτταρικής δραστηριότητας, το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί από ακυτταρικά συγκρίματα (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 40×, bar: 250 μm).....	128
Εικόνα 35: Ομάδα Β: το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί από ινώδη πώρο, παρατηρείται γεφύρωση από ινώδη και χόνδρινο ιστό (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 40×, bar: 250 μm).....	129
Εικόνα 36: Ομάδα Γ: το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί πλήρως από οστίτη ιστό (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 20×, bar: 500 μm).....	129
Εικόνα 37: Ομάδα Δ: κοντινή προβολή χόνδρινου ιστού που καλύπτει πλήρως το αρχικό έλλειμμα (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 100×, bar: 100 μm).....	130
Εικόνα 38: Διάμεση τιμή ιστολογικής πώρωσης ανά ομάδα ζώων (Ομάδα Α : γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).	130
Εικόνα 39: Συσχέτιση του συνολικού ιστοπαθολογικού σκορ (άξονας χ) με τη διάμεση τιμή (ημέρα 90) του υπερηχοτομογραφικού μήκους του ελλείμματος (ροζ στήλες) και της ακτινολογικής αξιολόγησης (γκρι στήλες) (με τις αντίστοιχες γραμμές τάσης).	131

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στη Χειρουργική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Οκτώβριο 2018 έως τον Δεκέμβριο 2023. Για την υλοποίηση και την ολοκλήρωσή της, ευχαριστώ τους παρακάτω.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσά μου, κ. Αικατερίνη Σιδέρη, η οποία με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω δίπλα της και να εκπαιδευτώ στη χειρουργική του μυοσκελετικού συστήματος των ζώων. Η πρόταση του θέματος της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε δική της ιδέα, καθώς εκείνη μερικά χρόνια πριν είχε ασχοληθεί με τη διερεύνηση της επίδρασης βλαστοκυττάρων στην αποκατάσταση τενόντιων ελλειμμάτων. Η καθοδήγηση στην αναζήτηση πληροφοριών, η εμφύσηση των αρχών της έρευνας, οι συμβουλές της και ο γόνιμος διάλογος ήδη από τον σχεδιασμό του πειραματικού πρωτοκόλλου έως και τη συγγραφή και ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής ήταν πολύτιμα εφόδια. Η καθημερινή πολύωρη, επώδυνη και ουσιαστική συμμετοχή της στους πειραματισμούς, καθώς και η γενναιοδωρία σε ψυχολογικό και υλικό επίπεδο ήταν ανεκτίμητες και καθοριστικές. Την ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη και την υπομονή της, τις καίριες παρατηρήσεις και τις στοχευμένες διορθώσεις της στο παρόν κείμενο. Την ευχαριστώ διπλά που πίστεψε στο όλο εγχείρημα και δεν αμφέβαλλε λεπτό για την υλοποίησή του παρά τις όποιες μικρές ή μεγάλες δυσκολίες που προέκυπταν. Είναι η Δασκάλα μου από τα πρώτα βήματα στη χειρουργική των μικρών ζώων, πάντοτε παρούσα, ενθαρρυντική και ενθουσιώδης, δίνοντάς μου τον χώρο να προσπαθήσω, να ερευνήσω και να γράψω και η βοήθειά της στη μέχρι τώρα πορεία μου είναι ανεκτίμητη και καθοριστική.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Βασιλική Τσιώλη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη συμβολή της στη διόρθωση του κειμένου της διδακτορικής διατριβής. Την ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές και γνώσεις, που απλόχερα μου προσέφερε καθόλη την πορεία μου ως μετεκπαιδευόμενη και υποψήφια διδάκτορα της Χειρουργικής Κλινικής.

Τον Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Χ. Φθενάκη, ο οποίος αποτέλεσε πολύτιμο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τον χρόνο που πάντα έβρισκε και αφιέρωνε στην παρούσα διατριβή. Η επιστημονική συμβολή του, οι γνώσεις του για τη φυσιολογία και την παθολογία των μικρών μηρυκαστικών και η αμεσότητα στην εύρεση λύσεων στα διάφορα προβλήματα υπήρξαν πολύτιμες. Οι παρατηρήσεις του σε σχέση με το επιστημονικό μέρος αυτής της διατριβής ήταν καθοριστικές. Ύψιστης σημασίας κρίνεται η συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στην ανάλυση των δεδομένων, στη διόρθωση του παρόντος κειμένου, αλλά και των εργασιών που προέκυψαν από τη διατριβή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες του οφείλω για την αδιάκοπη και πάντα πρόθυμη ενασχόλησή του με τη δημοσίευση των εργασιών σε επιστημονικά περιοδικά. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή

υποστήριξη, το ειλικρινές ενδιαφέρον και τη βοήθεια σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Την Καθηγήτρια κ. Λαμπρινή Αθανασίου, για τη σημαντικότερη συμβολή της στο εργαστηριακό μέρος της παρούσας διατριβής. Η βοήθεια της ήταν καθοριστική τόσο όσον αφορά στην παρασκευή του Στρωματικού Αγγειακού Κλάσματος του Λιπώδους Ιστού, όσο και στον τακτικό εργαστηριακό αιματολογικό έλεγχο της υγείας των πειραματόζώων. Την ευχαριστώ θερμά για την εύρεση και παραχώρηση μέρους των αντιβιοτικών φαρμάκων που χορηγήθηκαν προληπτικά στα ζώα. Η εμπλοκή της στους πειραματισμούς την έφερε εντός της πανδημίας και της εορταστικής περιόδου του Πάσχα του 2021 στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου στην Καρδίτσα, γεγονός το οποίο εκτιμώ αφάνταστα. Επίσης, την ευχαριστώ από καρδιάς για το γνήσιο ενδιαφέρον για την εκπαίδευση και εξέλιξή μου.

Τον Καθηγητή κ. Απόστολο Δ. Γαλάτο, ο οποίος από την αρχή με εμπιστεύτηκε και με παρότρυνε να εκπονήσω διδακτορική διατριβή. Τον ευχαριστώ θερμά για τις στοχευμένες παρατηρήσεις και διορθώσεις στο παρόν κείμενο, αλλά και την καθοδήγηση και υποστήριξη σε όλη την πορεία μου ως μετεκπαιδευόμενη και υποψήφια διδάκτορα της Χειρουργικής Κλινικής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα, που ως Διευθυντής της Χειρουργικής Κλινικής, έδωσε την άδεια για την πραγματοποίηση των πειραματισμών και την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαριάννα Μπαρμπαγιάννη, για την ανελλιπή, καθημερινή, πολύωρη και επίπονη συμμετοχή στην υπερηχοτομογραφική απεικόνιση του μεταταρσίου, των αγγείων και των δομών της περιοχής σε μια μακρά και δύσκολη περίοδο. Την ευγνωμονώ για την εκπαίδευσή μου στην υπερηχοτομογραφική απεικόνιση και τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που απλόχερα και ανιδιοτελώς μοιράστηκε. Την ευχαριστώ από καρδιάς για την προθυμία της, την αμέριστη συμπαράσταση και την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών, και για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις στο απεικονιστικό μέρος του παρόντος κειμένου.

Τον Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Νικήτα Πράσινο, για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του κατά τη διόρθωση του παρόντος κειμένου, αλλά και των εργασιών που προέκυψαν από τη διατριβή.

Τον αναντικατάστατο συνεργάτη και φίλο, συνάδελφο και Διδάκτορα κ. Στέφανο Γεωργίου, για τη συμμετοχή του στο επίπονο πειραματικό μέρος της διατριβής, αφιερώνοντας ανιδιοτελώς ατελείωτες ώρες από το ήδη επιβαρυνόμενο πρόγραμμά του. Τον ευχαριστώ, ακόμη, για την προετοιμασία του κατάλληλου αναισθητικού και αναλγητικού πρωτοκόλλου για τη διεγχειρητική και μετεγχειρητική παρακολούθηση των ζώων της μελέτης. Τέλος, τον ευγνωμονώ για την εξαιρετική συνεργασία, τη συμπαράσταση και την αστείρευτη ενέργειά του σε όλη τη διάρκεια των πειραματισμών.

Τις κτηνιάτρους και φίλες Άννα Νικολάντου και Αργυρώ Ολυμπίου, που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατριβής μου, για την ουσιαστική, καθημερινή, πολύωρη και πολύμηνη συμμετοχή τους στους πειραματισμούς. Τις ευγνωμονώ από τα βάθη της καρδιάς μου για την

ψυχολογική υποστήριξη κάθε φορά που η όλη διαδικασία φάνταζε «βουνό», για την προθυμία τους και για τη θετική ενέργειά τους. Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω ευχαριστίες προς τους μετεκπαιδευόμενους κτηνιάτρους Μάρθα Βάσιλα, Κωνσταντίνο Κιοπεκτζή και Νίκο Θώμο, των οποίων η εκπαίδευση στη Χειρουργική Κλινική συνέπεσε με τις περιόδους των πειραματισμών μου, οπότε και βοήθησαν ανιδιοτελώς.

Την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Κατσαρού και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Διονύσιο Βέκιο για τη συμμετοχή και συμβολή τους στους πειραματισμούς. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Βάϊο Φωτόπουλο, για τη βοήθεια και τη συμμετοχή του στο πειραματικό μέρος της διατριβής, ακόμα και όταν αυτό συνέπιπτε με τις γιορτινές ημέρες του Πάσχα.

Θερμότερες ευχαριστίες οφείλω στους διδάσκοντες και στο προσωπικό της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής κατά τα έτη 2016 - 2023 για όλη τη γνώση και τη στήριξη που μου παρείχαν στη διάρκεια της εκπαίδευσης μου. Τους θεωρώ όλους δασκάλους μου και τα εφόδια που μου προσέφεραν σχετικά με τη χειρουργική των μικρών ζώων είναι καθοριστικά και πολύτιμα για την επαγγελματική εξέλιξή μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής και όλο το προσωπικό της, για τη φιλοξενία και τις ιδανικές συνθήκες διαβίωσης των πειραματοζώων, καθώς και για την παραχώρηση κατάψυξης για την αποθήκευση μέρους των αντιδραστηρίων. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ναταλία Βασιλείου για τις πολύτιμες συμβουλές για την υγεία και την παθολογία των μικρών μηρυκαστικών και την ουσιαστική συμβολή στη διαχείριση προβλημάτων των ζώων, όταν αυτά προέκυπταν. Την ευγνωμονώ, επίσης, για την εύρεση της πρώτης ομάδας πειραματοζώων. Ευχαριστώ θερμά τον συνάδελφο και φίλο Γιάννη Νανά για την καθοδήγηση με τα ζώα και την άμεση και ανιδιοτελή ανταπόκριση κάθε φορά που χρειάστηκε τη βοήθειά του. Ιδιαίτερες και θερμότερες ευχαριστίες οφείλω στον ζωοκόμο κ. Θωμά Παπαδημητρίου για τη φροντίδα των πειραματοζώων και την καθημερινή βοήθειά του στις απεικονιστικές μετρήσεις.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την Παθολογική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής, για την προσφορά αφενός του εργαστηρίου για την φυγοκέντρωση των δειγμάτων αίματος για τον τακτικό έλεγχο της υγείας των ζώων, και αφετέρου των απαραίτητων υλικών για το εργαστηριακό μέρος της διατριβής.

Στο σημείο αυτό, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον καθηγητή κ. Γεώργιο Κοντοπίδη και τη χημικό Μαριλένα Μοσχοπούλου για την παραχώρηση μέρους του εξοπλισμού και υλικών του εργαστηρίου Βιοχημείας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ελευθέριο Τριανταφύλλου, εργαστηριακό κτηνίατρο, για την άψογη συνεργασία και την άμεση ανταπόκρισή του, κάθε φορά που απαιτούνταν εργαστηριακές εξετάσεις για τα πειραματόζωα.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Ψάλλα, καθώς και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του

Α.Π.Θ., για την προετοιμασία και την ανάγνωση των ιστολογικών παρασκευασμάτων του σημείου της οστεκτομής για τον έλεγχο της πώρωσης.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω στη φίλη μου και συνάδελφο Κατερίνα Παζαρακιώτη, για την άμεση παροχή αντιβιοτικών φαρμάκων για τα πειραματόζωα. Επίσης, ευχαριστώ από καρδιάς, τόσο την ίδια όσο και τον σύζυγό της, για την εύρεση της δεύτερης ομάδας πειραματόζωων.

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους Παναγιώτη Μπουντούρη και Βασιλική Σπυροπούλου, για τη δωρεάν παραχώρηση των αναισθητικών φαρμάκων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη συνάδελφο Μαρία Νταβάρα, για την παραχώρηση του ιδιωτικού κτηνιατρείου της για την τακτική φυγοκέντρηση δειγμάτων αίματος των ζώων της μελέτης. Ευχαριστώ επίσης θερμά τη Διδάκτορα κ. Κέλλυ Παυλίδου που με κατατόπισε σχετικά με πρόγραμμα βιβλιογραφίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τη Δομή Έρευνας και Καινοτομίας του Π.Θ. για τη χορήγηση μονοετούς υποτροφίας για υποψήφιους διδάκτορες, η οποία στήριξε οικονομικά το απαιτητικό έτος των πειραματισμών.

Τέλος, ευγνωμονώ, από τα βάθη της καρδιάς μου, τους γονείς μου, Ιωάννη και Βασιλική, οι οποίοι με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια υλικά και ψυχολογικά και μου έχουν προσφέρει τα πάντα, ώστε να κυνηγήσω τα όνειρα και τις φιλοδοξίες μου. Υπήρξαν πάντα πλάι μου, ενθαρρυντικοί υποστηρικτές σε κάθε βήμα. Παράλειψη θα ήταν να μην ευχαριστήσω το πιο αγαπημένο μου πρόσωπο στη γη, την αδερφή μου, Μάρθα, για την υπομονή, την επιμονή και την αμέριστη συμπαράσταση και αγάπη της στη διάρκεια όλων αυτών των ετών. Ένας άνθρωπος πάντοτε δίπλα μου, να χαίρεται με τα επιτεύγματα και να με εμψυχώνει στα δύσκολα. Το στήριγμά μου σε όλα.

Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε εκείνους τους ανθρώπους που ενθάρρυναν με κάθε τρόπο την έναρξη, αλλά δεν πρόλαβαν να χαρούν την ολοκλήρωση της διατριβής, και σε όσους εμφανίστηκαν στα τελευταία «μέτρα» του ταξιδιού και στάθηκαν πολύτιμοι συμπαραστάτες πλάι μου σε αυτά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αναγκαία στοιχεία για την επιτυχή πώρωση ενός κατάγματος είναι τα οστεογενετικά κύτταρα, ένα οστεοκαθοδηγητικό μέσο, ένα οστεοεπαγωγικό ερέθισμα, η μηχανική σταθερότητα και η επαρκής αιματική ροή. Έως σήμερα, το αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα θεωρείται ως το υλικό εκλογής. Ωστόσο, καθώς καταγράφονται κάποιες επιπλοκές από τη χρήση του, έχει προταθεί η εφαρμογή συνθετικών οστικών υποκατάστατων. Πρόκειται για υλικά με οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, καθώς παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον για νεοαγγειογένεση και οστική αναγέννηση, ενώ είναι ελάχιστα ή καθόλου οστεοεπαγωγικά. Οι έρευνες των τελευταίων ετών κατευθύνονται προς εναλλακτικές θεραπείες με βιοϋλικά, όπως συνδυασμούς οστεοπρογονικών μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) με οστεοκαθοδηγητικά ικρίωματα. Τα MSCs έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες και άλλα είδη κυττάρων και τη δυνατότητα έκκρισης βιομορίων με ανοσορρυθμιστική και αγγειογενετική δράση. Εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς αλλά η μεγαλύτερη αφθονία του λιπώδους ιστού, η ευκολότερη πρόσβαση και η ανώδυνη λήψη καθιστούν προτιμότερο το στρωματικό αγγειακό κλάσμα του λιπώδους ιστού (Stromal Vascular Fraction, SVF). Περαιτέρω πλεονεκτήματα αποτελούν η δυνατότητα για άμεση και διεγχειρητική προετοιμασία, καθώς και ο μεγάλος αριθμός MSCs. Πρόκειται για ένα υδάτινο ετερογενές μείγμα από MSCs λιπώδους ιστού (Adipose-derived Stem Cells, ASCs), ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα, λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα και προ-λιποκύτταρα με οστεογενετική και οστεοεπαγωγική ικανότητα, ανοσορρυθμιστική και αγγειογενετική δράση. Η αποτελεσματικότητα του νωπού αυτόλογου SVF σε έρευνες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί είναι ενθαρρυντική για την πώρωση σε πλατέα οστά και ελλείμματα μηριαίων κονδύλων, καταδεικνύοντας μεγαλύτερη οστεοεπαγωγική δραστηριότητα και σχηματισμό ογκωδέστερου πώρου σε σύγκριση με τα καλλιεργημένα ASCs.

Στην διεθνή βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν γνωστές μελέτες οι οποίες διερευνούν την επίδραση του συνδυασμού SVF με ικρίωμα υδροξυαπατίτη (HA) στην πώρωση ελλειμμάτων μακρών οστών. Σκοπός του παρόντος ερευνητικού ήταν η διερεύνηση της σκοπιμότητας της χρήσης SVF για την ενίσχυση της πώρωσης τμηματικού οστικού ελλείμματος στη διάφυση του μεταταρσίου στο πρόβατο. Στη διάρκεια της μελέτης, διερευνήθηκε και η χρήση της υπερηχοτομογραφίας (B-mode, Color Doppler και παλμικού Doppler ροής) για την αξιολόγηση της πώρωσης κατά τα αρχικά στάδιά της.

Χρησιμοποιήθηκαν υγιή, ενήλικα πρόβατα κατόπιν έγκρισης του πειραματικού πρωτοκόλλου. Υπό γενική και επισκληρίδια αναισθησία πραγματοποιήθηκε οστεκτομή στη διάφυση του δεξιού μεταταρσίου και τοποθετήθηκαν μεταλλική πλάκα και κοχλίες. Το οστικό έλλειμμα πληρώθηκε ως εξής: Πάστα Υδροξυαπατίτη (HA) (Ομάδα Α, 6 ζώα), συνδυασμός σπογγώδους οστεομοσχεύματος με HA (Ομάδα Β, 6 ζώα), συνδυασμός SVF με HA (Ομάδα Γ, 6

ζώα) και συνδυασμός όλων των βιοϋλικών (Ομάδα Δ, 6 ζώα). Το SVF συλλέχθηκε από το λιπώδη ιστό της οσφυοϊερής χώρας και προετοιμάστηκε διεγχειρητικά.

Μετεγχειρητικά διενεργήθηκε κλινικός (αξιολόγηση της χωλότητας) και ακτινολογικός έλεγχος (μηνιαίως, δύο ακτινογραφήματα με διαφορά 90°). Επιπλέον ανά δεκαήμερο έως την 60^η, κατόπιν την 75^η και τέλος την 90^η ημέρα γινόταν υπερηχομογραφική αξιολόγηση του μήκους του οστικού ελλείμματος και της αγγείωσής του (0-3). Επιπλέον, τις πρώτες 40 ημέρες του πειραματισμού ανά δεκαήμερο καταγράφονταν υπερηχοτομογραφικά οι αιμοδυναμικές παράμετροι της ροής του αίματος της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας των προβάτων. Κατά την τελευταία ημέρα του πειραματισμού (90^η), κατόπιν ευθανασίας, λαμβάνονταν οστεοτεμάχιο για ιστοπαθολογική εξέταση. Η στατιστική επεξεργασία περιελάμβανε συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών ομάδων (Kruskal-Wallis ή Pearson χ^2) και συσχετίσεις μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών (Spearman's analysis of correlation). Το επίπεδο σημαντικότητας είχε οριστεί στο $p < 0,05$.

Η απομόνωση του SVF από την οσφυοϊερή περιοχή των ζώων των ομάδων Γ και Δ ήταν επιτυχής και απέδωσε κατά μέσο όρο $1,77 \times 10^6$ ζωντανά κύτταρα ανά ml. Από την 1^η έως την 30^η ημέρα καταγράφονταν στατιστικώς σημαντική διαφορά στη χωλότητα μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ($p < 0,01$). Την 60^η και την τελευταία ημέρα του πειραματισμού (ημέρα 90) διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ακτινολογική εικόνα μεταξύ των ομάδων ($p = 0,049$ και $p = 0,006$, αντίστοιχα). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της κλινικής και της ακτινολογικής εικόνας των ζώων ($p < 0,0001$ για όλη τη διάρκεια της μελέτης). Υπερηχοτομογραφικά, καθ' όλη την πορεία της μελέτης η απόσταση των καταγματικών άκρων απεικονίζονταν πάντα μικρότερη στην ομάδα Γ. Την 75^η και 90^η ημέρα του πειραματισμού διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ($p = 0,006$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα) με το μήκος του οστικού ελλείμματος στο μετατάρσιο των ζώων της ομάδας Γ να είναι το μικρότερο. Καταγράφηκε, επιπλέον, ισχυρή συσχέτιση με τιμές $p \leq 0,037$ σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μεταξύ των υπερηχοτομογραφικών μετρήσεων του μήκους και της ακτινολογικής εξέλιξης της πώρωσης. Σε όλα τα ζώα της μελέτης η νεοαγγείωση στο σημείο της οστεκτομής κορυφώθηκε την 20^η ημέρα του πειραματισμού. Μετά την 20^η ημέρα του πειραματισμού η αιμάτωση στην περιοχή άρχισε να μειώνεται. Σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ζώων των ομάδων Β, Γ και Δ έλαβαν βαθμολόγηση 0 (ενδεικτικό απρόσκοπτης πορείας πώρωσης) την 75^η και 90^η ημέρα πειραματισμού (83% των περιπτώσεων), έναντι του 25% της ομάδας Α ($p = 0,0003$). Η προεγχειρητική μέτρηση της ροής της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας έδειξε ότι η ροή ήταν τριφασική με υψηλές αντιστάσεις. Μετεγχειρητικά οι δείκτες RI και PI μειώθηκαν, ενώ οι PSV και TBF αυξήθηκαν κατά το πρώτο εικοσαήμερο και ύστερα από αυτή τη χρονική στιγμή υποχώρησαν προς τις αρχικές τιμές, χωρίς ωστόσο, να τις προσεγγίσουν απόλυτα σε διάστημα 40 ημερών. Δεν κατεγράφησαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων πειραματισμού ως προς τις παραμέτρους ελέγχου της ροής του αίματος. Ιστολογικά, στο

τέλος της μελέτης, καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πώρωση μεταξύ των ομάδων ($p = 0,022$ μεταξύ των ομάδων).

Συμπερασματικά, η μελέτη μας ήταν η πρώτη που χρησιμοποίησε νωπό, αυτόλογο SVF που απομονώθηκε διεγχειρητικά για την ενίσχυση της πώρωσης οστικού ελλείμματος διάφυσης μακρού οστού σε μεγάλο ζωικό μοντέλο. Αποδείχθηκε ότι η διαδικασία απομόνωσης και η εφαρμογή SVF είναι μια εύκολη και αποτελεσματική τεχνική, ενώ στερείται ανεπιθύμητων παρενεργειών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το SVF διαθέτει οστεογενετική και οστεοεπαγωγική ιδιότητα ενισχύοντας την πώρωση τμηματικού ελλείμματος μακρού οστού, όταν συνδυάζεται με πάστα HA ή σπογγώδες οστεομόσχευμα. Στα ζώα των ομάδων Γ και Δ, όπου τοποθετήθηκαν αδιαφοροποίητα μη καλλιεργημένα βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού και στην ομάδα Β, που τοποθετήθηκε αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα, τα ακτινολογικά, υπερηχοτομογραφικά και ιστολογικά ευρήματα ήταν συμβατά με βελτιωμένο σχηματισμό νέου οστού. Φαίνεται ότι η προσθήκη SVF σε αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα ενισχύει τις οστεογενετικές και οστεοεπαγωγικές ιδιότητές του. Τέλος, υποστηρίζεται η χρήση της υπερηχοτομογραφίας, και η καταγραφή των αιμοδυναμικών παραμέτρων της ροής του αίματος του τροφοδοτούντος αγγείου, για την εκτίμηση της εξέλιξης της πώρωσης καταγμάτων στα αρχικά στάδια της.

Το κείμενο της διατριβής αποτελείται από δύο κύρια μέρη. Αρχικά παρατίθενται η ελληνική και η αγγλική περίληψη. Στη συνέχεια, στο πρώτο μέρος της γίνεται ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας ενώ, στο δεύτερο μέρος αναλύεται ο σχεδιασμός του πειραματικού πρωτοκόλλου, η μεθοδολογία και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, γίνεται παράθεση των αποτελεσμάτων και ακολουθούν η συζήτηση επ' αυτών και τα συμπεράσματα που προέκυψαν. Τέλος, παρατίθεται η βιβλιογραφία.

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY SCIENCE
DEPARTMENT OF SURGERY

**STUDY OF THE USE OF BIOMATERIALS IN THE HEALING
OF LONG BONE DEFECTS IN A SHEEP MODEL**

ELENA I. PAPPA
DVM

Ph.D. Thesis

KARDITSA, GREECE 2023

ABSTRACT

Necessary elements for fracture healing include osteogenic cells, an osteoconductive matrix, an osteoinductive stimulus, mechanical stability and adequate vascular supply. Currently, autogenous bone graft is considered to be the gold standard. However, since complications of its use have been reported, bone substitutes have been proposed as potential alternatives. These materials are osteoconductive, supporting vascular and cellular ingrowth, but they are minimally osteoinductive. Recent research has focused on biomaterials, including combinations of mesenchymal stem cells (MSCs) with bone substitutes. MSCs can differentiate into osteoblasts and other cell types and secrete anti-inflammatory and angiogenic molecules. They are located in all tissues, with adipose tissue serving as the best option (Adipose-derived Stem Cells, ASCs), due to its abundance in body, easier and safer collection and minimal morbidity in the patient. According to the literature, considerably larger amounts of MSCs can be identified in the Stromal Vascular Fraction (SVF) of adipose tissue compared with bone marrow aspirate. SVF is a heterogeneous combination of ASCs, endothelial cells, pericytes, lymphocytes, mast cells and pre-adipocytes, thus possessing osteogenic, osteoinductive and immunomodulatory properties, anti-inflammatory and angiogenic capacity. Another advantage of SVF is the easy acquisition, without need for cell separation or culturing conditions, thus, it can be performed intraoperatively. Research on the use of fresh autologous SVF for bone healing has produced encouraging results in flat bones and defects created on femoral condyles proving even better osteoinductive ability and larger callus formation of SVF than in vitro cultured ASCs.

In the international literature, no reports have been published regarding healing of long bone defects by using SVF on a Hydroxyapatite (HA) scaffold. The objective of this research was the evaluation of the feasibility of using SVF for the treatment or augmentation of the healing process of segmental bone defect in the metatarsus in an ovine model. Throughout the study period, the added value of ultrasonography (B-mode, Color and pulsed-wave Doppler) for early bone healing evaluation was assessed.

Healthy, skeletally mature sheep were used in the research project. A unilateral, segmental mid-diaphyseal bone defect was created on the right metatarsus of the animals, under general and epidural anesthesia (Day 0, D0). Osteotomy was stabilized with a bone plate and appropriate screws. Each defect was managed by means of one of the following: i) use of HA bone paste to fill the defect (Group A, $n = 6$), ii) use of autogenous bone graft mixed with HA bone paste and placed in the defect (Group B, $n = 6$), iii) use of SVF mixed with HA bone paste injected into the defect (Group C, $n = 6$), iv) use of bone graft and SVF mixed with HA bone paste prior to apposition in the bone defect (Group D, $n = 6$). SVF had been previously isolated and properly prepared from adipose tissue of the lumbosacral region intraoperatively.

Postoperatively each animal was evaluated by using clinical examination and imaging techniques (X-raying and ultrasonographic examination) of the defect on regular intervals for three months. Kaler scale (0-6 score) was employed to assess the severity of lameness in animals in the study. For the monthly quantitative assessment of the X-ray findings, Modified Lane and Sandhu radiological system (0-10 score) was used in two orthogonal views. Ultrasonographic assessment of longitudinal scans with a linear transducer along the length of the defect every ten days until D60, D75 and D90 included calculation of the length of the bone defect, as well as its vascularization (0-3 score). In addition, Doppler examination was used every ten days for a forty-day-period to investigate the changes in haemodynamic parameters of blood flow in the feeding artery of fractured metatarsus. After 90 days of ostectomy, the animals were euthanized and a segment of metatarsus (3 cm long) was excised and fixed in 10% neutral buffered formalin for histological analysis (0-15, Šantić scoring scale). Statistical analysis included comparisons among groups (Kruskal-Wallis or Pearson χ^2 test) and correlations between assessment techniques (Spearman's analysis of correlation). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

SVF was successfully isolated from the lumbosacral area of animals in Groups C and D and the mean yield was 1.77×10^6 mononuclear cells per milliliter. The comparison of clinical scores on each post-operative day indicated significant differences between the four groups on D1 to D30 ($p < 0.01$). On Day 60 and D90 postoperatively, animals in Group C were found with the best radiological score ($p = 0.049$ and $p = 0.006$ between groups, respectively). There was a correlation between the clinical and the X-ray findings ($p < 0.0001$ for all calculations throughout the study). Throughout the study period the bone defect was the shortest in animals of Group C. Ultrasonographic assessment on D75 and D90 confirmed that the length of the bone defect was the smallest in group C ($p = 0.006$ and $p = 0.002$ respectively, between groups). There was also a correlation between the length of the bone defect and the X-ray findings ($p \leq 0.037$ for all calculations throughout the study). Ultrasonographic assessment of vascularization of the bone defect indicated that, neoangiogenesis reached a peak in all animals on Day 20, with animals of Groups C and D showing best results, followed Group B and finally Group A. After 20th postoperative day, blood flow started to decline. A significantly higher proportion of animals in groups B, C and D achieved score '0' on D75 and D90 (in >83% of cases) than in group A (in 25% of cases) ($p = 0.0003$). The preoperative blood flow pattern of the cranial tibial artery was triphasic wave with high resistance and high systolic pattern examinations in all ewes. After ostectomy occurred RI and PI appeared a decrease and PSV and total volume increased for the first twenty days and after that point of time they returned towards normal values without statistical significant differences among Groups. On the last day of the study, histological analysis revealed the best healing score for sheep in Group C ($p = 0.022$ between groups).

Concluding, this was the first study using fresh, autologous SVF to enhance bone healing of a segmental diaphyseal bone defect in a one-step surgical procedure in a large animal model.

SVF isolation was found to be an easy, safe and effective technique. According to our results, SVF is osteogenic and osteoinductive and augments long bone healing. In the present study, SVF was found to enhance bone regeneration when combined with HA paste or cancellous bone. The animals in groups C and D, in which biomaterial inserted contained undifferentiated uncultured adipose-derived stem cells, were found to promote bone formation in terms of radiological, ultrasonographic and histological findings. In addition, it seems that the supplementation of autogenous cancellous bone graft with SVF enhances its bone regenerative properties. Finally, we support the use of ultrasonography for early bone healing evaluation.

The thesis is divided into two parts. First, the greek and english abstracts are listed. Then, in the first part, the international bibliography is reviewed while, in the second part, the experimental protocol, materials and methods are analysed, the results, discussion and conclusions remarks are listed. Finally, references used are recorded.

Δημοσιεύσεις προερχόμενες από την παρούσα διατριβή

- Pappa EI, Barbagianni MS, Georgiou SG, Athanasiou LV, Psalla D, Vekios D, Katsarou EI, Vasileiou NGC, Gouletsou PG, Galatos AD, Prassinou NN, Gougoulis DA, Angelidou M, Tsioli V, Fthenakis GC, Sideri AI (2023) The use of stromal vascular fraction in long bone defect healing in sheep. *Animals* 13, 2871.

Ανακοινώσεις σε πρακτικά συνεδριών

- Pappa EI, Athanasiou LV, Georgiou SG, Barbagianni M, Fthenakis GC, Tsioli V, Sideri AI (2022) The use of stromal vascular fraction in long bone defect. *Proceedings of the 21st Congress of the European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology (Nice, France)* pp. 474-476.
- Pappa EI, Barbagianni MS, Athanasiou LV, Georgiou SG, Vekios D., Katsarou EI, Nikolantou A, Olympiou A, Vasileiou NGC, Gouletsou PG, Galatos AD, Fthenakis GC, Tsioli V, Sideri AI (2023) The use of stromal vascular fraction in long bone defect healing in sheep. *Proceedings of the 10th International Sheep Veterinary Congress (Seville, Spain) – Animal Science Proceedings* 14, 1, pp. 251-252.
- Παππά Ε, Αθανασίου Λ, Γεωργίου Σ, Μπαρμπαγιάννη Μ, Ψάλλα Δ, Φθενάκης Γ, Τσιώλη Β, Σιδέρη ΑΙ (2023). Μελέτη της χρήσης βιοϋλικών στην πώρωση ελλειμμάτων μακρών οστών. *Πρακτικά του 12^{ου} Συνεδρίου – Forum Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς της Ελληνικής Εταιρείας Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς (Θεσσαλονίκη)* σελ. 175-177.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι τραυματισμοί των οστών είναι συχνοί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα συντροφιάς. Η πλειονότητα των καταγμάτων επουλώνεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες χάρη στην αναγεννητική ικανότητα των οστών. Αναγκαία στοιχεία για την επιτυχή πώρωση συνιστούν τα οστεογενετικά κύτταρα, ένα οστεοκαθοδηγητικό μέσο, ένα οστεοεπαγωγικό ερέθισμα, η μηχανική σταθερότητα της περιοχής και η επαρκής αιματική ροή (Calori and Giannoudis 2011, DeCamp *et al.* 2016). Ωστόσο, κάποιες καταστάσεις συνιστούν πρόκληση για τον ορθοπαιδικό χειρουργό. Σε περιπτώσεις αποτυχίας ή επιβράδυνσης της πώρωσης, συντριπτικών, μη ανατάξιμων καταγμάτων, οστικών ελλειμμάτων λόγω νέκρωσης, νεοπλασίας, λοίμωξης και αρθροδέσεων συστήνεται η ενίσχυση της πώρωσης με μόσχευμα ή οστικό υποκατάστατο. Το ιδανικό οστικό μόσχευμα πρέπει να προσφέρει οστεογενετικά κύτταρα, να διεγείρει τη διαφοροποίηση των επιτόπιων μεσεγχυματικών κυττάρων, να λειτουργεί ως ικρίωμα για τον νεοσχηματιζόμενο οστίτη ιστό και να ενισχύει τη νεοαγγειογένεση (Vertenten *et al.* 2010).

Η χρήση αυτόλογου οστεομοσχεύματος εξακολουθεί, προς το παρόν, να αποτελεί τη μέθοδο επιλογής λόγω των οστεογενετικών, οστεοεπαγωγικών, και οστεοκαθοδηγητικών ιδιοτήτων του, καθώς και της άμεσης οστεοενσωμάτωσής του (Martinez and Walker 1999, Griffon 2005, DeCamp *et al.* 2016). Ωστόσο, οι διαρκώς αυξανόμενες ανάγκες εξεύρεσής τους, οι επιπλοκές που καταγράφονται κατά τη λήψη και την εφαρμογή τους και η συχνά περιορισμένη δυνατότητα κάλυψης του οστικού ελλείμματος, έχουν τις τελευταίες δεκαετίες προκαλέσει το ενδιαφέρον ανεύρεσης υποκατάστατων των οστικών μοσχευμάτων (Martinez and Walker 1999, Cannada 2010). Τα υλικά αυτά είναι συνήθως οστεοκαθοδηγητικά, υποστηρίζοντας έτσι την ανάπτυξη τριχοειδών αγγείων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και, συνεπώς, ενισχύοντας την οστική ανάπτυξη (Autefage and Dejardin 2010, Kim *et al.* 2012). Μεταξύ των μειονεκτημάτων των παραπάνω επιλογών συγκαταλέγονται η πρόωρη απορρόφησή τους, η μόλυνση και η ανοσολογική αντίδραση του λήπτη, ενώ, ταυτόχρονα, δεν αποτελούν οστεογενετικά ή οστεοεπαγωγικά υλικά (Bucholz 2002). Στη μελέτη μας, ως ικρίωμα για την εναπόθεση του νέου οστίτη ιστού, χρησιμοποιήθηκε πάστα νανοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη (HA) καθώς παρουσιάζει βιοσυμβατότητα, άμεση ενσωμάτωση και ικανότητα για διέγερση της νεοαγγειογένεσης (Laschke *et al.* 2007, Huber *et al.* 2008, 2009).

Δεδομένων των ανωτέρω περιορισμών στην εφαρμογή συνθετικών οστικών υποκατάστατων, οι έρευνες των τελευταίων ετών επικεντρώνονται στη χρησιμοποίηση βιοϋλικών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται συνδυασμοί πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) με διάφορα ανόργανα οστικά υποκατάστατα.

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί εξαιρετη επιλογή για την απομόνωση MSCs, καθώς υπάρχει σε αφθονία στον οργανισμό, καθιστώντας εύκολη, σχετικά ανώδυνη και ασφαλή τη λήψη του και

περιέχει μεγάλο αριθμό MSCs (Zuk *et al.* 2001, 2002, Strioga *et al.* 2012, Torres-Torrillas *et al.* 2019). Τη λήψη του λίπους μπορεί να ακολουθήσει η διαδικασία της καλλιέργειας και της διαφοροποίησης των κυττάρων προς την επιθυμητή κατεύθυνση ή να απομονωθεί ένα φρέσκο κλάσμα μη καλλιεργημένων κυττάρων, γνωστό ως στρωματικό αγγειακό κλάσμα του λιπώδους ιστού (Stromal Vascular Fraction, SVF). Το SVF αποτελεί ένα ετερογενές μείγμα από μεσεγχυματικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα, λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα και προ-λιποκύτταρα, διαθέτοντας έτσι όχι μόνο οστεογενετική και οστεοεπαγωγική ικανότητα αλλά παράλληλα συμβάλλοντας, στην αναγέννηση των αιμοφόρων αγγείων (Bora and Majumdar 2017). Έρευνες που έχουν συγκρίνει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χρήσης SVF με αντίστοιχα καλλιεργημένων MSCs έχουν καταγράψει εξίσου ενθαρρυντικά ή και καλύτερα αποτελέσματα.

Από τη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχουν προκύψει δεδομένα αναφορικά με την ικανότητα προαγωγής της επούλωσης των οστικών ελλειμμάτων σε μακρά οστά μετά τη χρήση συνδυασμού νωπού κλάσματος SVF και ικριώματος υδροξυαπατίτη.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας διατριβής ήταν να διαπιστωθεί α) κατά πόσο είναι εφικτή η χρήση του συνδυασμού στρωματικού αγγειακού κλάσματος με πάστα υδροξυαπατίτη προκειμένου να καλυφθεί οστικό έλλειμμα μακρού οστού στο πρόβατο, β) η ποιότητα του παραγόμενου πώρου, γ) η ενδεχόμενη ενίσχυση της δράσης του αυτόλογου σπογγώδους οστεομοσχεύματος με την προσθήκη αυτόλογου SVF και δ) η άμεση σύγκριση της αποτελεσματικότητας του SVF με το αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα. Παράλληλα διερευνήθηκε το εφικτό της προετοιμασίας και της χρησιμοποίησης του παραπάνω συνδυασμού για την κάλυψη οστικού ελλείμματος σε ένα χειρουργικό χρόνο.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

1.1. Ανατομία των οστών

Οστά ορίζονται τα σκληρά όργανα του σώματος που συνδέονται μεταξύ τους μέσω των αρθρώσεις και σχηματίζουν το σκελετό, επιτελώντας την κίνηση του οργανισμού, στηρίζοντας και προφυλάσσοντας τα μαλακά όργανα (Μιχαήλ 1985, Yeadon 2016). Περιέχουν τον μυελό των οστών, που σχετίζεται με την παραγωγή και την αποθήκευση των αιμοποιητικών κυττάρων, και συμβάλλουν στη συστηματική οξεοβασική ισορροπία, στην απορρόφηση τοξινών, στην αποθήκευση λιπαρών οξέων και στην ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου (Denny and Butterworth 2000, Yeadon 2016). Ανάλογα με το σχήμα τους διακρίνονται σε επιμήκη ή μακρά, σε πλατέα και σε βραχέα οστά. Κάποιοι συγγραφείς αναγνωρίζουν δύο ακόμη κατηγορίες, τα σησαμοειδή οστά, που μπορούν να ομαδοποιηθούν μαζί με τα βραχέα, και τα ακανόνιστα, όπως οι σπόνδυλοι, το ζυγωματικό οστό και η κάτω γνάθος (Yeadon 2016). Τα επιμήκη οστά έχουν χαρακτηριστική μορφή. Διακρίνεται η διάφυση ή σώμα, που είναι το κεντρικό επίμηκες τμήμα του οστού, και τα ακραία τμήματα που καλούνται επιφύσεις. Οι επιφύσεις συνενώνονται στη νεαρή ηλικία με τη διάφυση μέσω του συζευκτικού χόνδρου ο οποίος χρησιμεύει για την κατά μήκος αύξηση των οστών. Μεταξύ επιφυσιακής γραμμής και διάφυσης εντοπίζεται η μετάφυση. Τα πλατέα οστά παρουσιάζουν δύο επιφάνειες, την κυρτή και την κοίλη, ενώ τα βραχέα ομοιάζουν με κύβο (Μιχαήλ 1985, Yeadon 2016).

Μακροσκοπικά, σε διατομή, φαίνεται ότι αποτελούνται από συμπαγή και σπογγώδη οστέινη ουσία. Η διάφυση των μακρών οστών σχηματίζεται από συμπαγή ουσία, πυκνή και ομοιομερή, στο κέντρο της οποίας εκτείνεται ο μυελικός αυλός, που εσωκλείει το μυελό των οστών. Η σπογγώδης ουσία είναι αραιότερη και συγκροτείται από οστέινες δοκίδες που διατάσσονται κατά τη φορά των τροχιών των μεγίστων τάσεων και χιάζονται, σχηματίζοντας μικρές κοιλότητες (μυελοκυψέλες) που περιέχουν το μυελό των οστών (Μιχαήλ 1985). Οι μεταφύσεις των μακρών οστών αποτελούνται από σπογγώδη ουσία και εκεί βρίσκονται τα περισσότερα αιμοποιητικά κύτταρα (Μιχαήλ 1985, Remedios 1999).

Η εξωτερική επιφάνεια των οστών, εκτός από τις αρθρικές επιφάνειες, καλύπτεται από έναν υμένα αποτελούμενο από πυκνό συνδετικό ιστό με υπόλευκη ή υποκίτρινη χροιά και πάχος 1-3 mm, το περίοστεο. Σε αυτό οδεύουν αρχικά τα αγγεία και τα νεύρα που προορίζονται για το οστό. Τα τελευταία συνοδεύουν τις αρτηρίες και προέρχονται από εγκεφαλικά και νωτιαία νεύρα, καθώς και από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (Μιχαήλ 1985).

1.2. Ιστολογία-Φυσιολογία των οστών

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από οργανική θεμέλια ουσία, ανόργανα άλατα και οστικά κύτταρα. Η οργανική ουσία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες και αποτελεί περίπου

το 1/3 της ξηράς ουσίας. Τα ανόργανα άλατα, που συνιστούν τα 2/3 του οστού, αποτελούνται κυρίως από ασβέστιο και φώσφορο σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (Fetter 1985)

1.2.1. Οργανική ουσία και ανόργανα άλατα

Ο οστίτης ιστός χαρακτηρίζεται από μεγάλη σκληρότητα και αντοχή χάρη στην περιεκτικότητα της μεσοκυττάριας ουσίας του σε ανόργανα συστατικά. Τα τελευταία υπάρχουν σε ποσοστό 60-65% επί του ξηρού βάρους στα τελειωμένα οστά (Μιχαήλ 1996). Τα ανόργανα στοιχεία είναι το φωσφορικό ασβέστιο (80-90%), που υπάρχει με τη μορφή μικροκρυστάλλων υδροξυαπατίτη (μήκους 20-40 nm και πάχους 2-3 nm), το ανθρακικό ασβέστιο, το φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο, το φωσφορικό μαγνήσιο και τα αλκαλικά άλατα σε μικρότερα ποσοστά (Μιχαήλ 1996). Το ασβέστιο αποτελεί το 37% των ανόργανων συστατικών, ενώ ο φώσφορος το 18,5% (Σμοκοβίτης 2007). Ο οστίτης ιστός, επομένως, αποτελεί πηγή προμήθειας του οργανισμού σε ασβέστιο σε περίπτωση ανάγκης, καθώς διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στο μεταβολισμό του. Η συγκέντρωση των ανόργανων αλάτων είναι φυσιολογικά μικρότερη σε νεαρή ηλικία, σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις (ραχιτισμός, οστεομαλάκυνση), καθώς και κατά την πολύ προχωρημένη ηλικία (οστεοπόρωση).

Η μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού αποτελείται από κολλαγόνες ίνες (κυρίως τύπου Ι), που συνιστούν το 90% της οργανικής ουσίας, μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες (πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφοπρωτεΐνες, οστεονεκτίνη, ινονεκτίνη, οστεοποντίνη και οστεοκαλσίνη), βλεννοπολυσακχαρίτες (θειική χονδροϊτίνη), λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, άλατα και νερό (Σμοκοβίτης 2007). Οι μικροσκοπικοί κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη κατανέμονται κατά μήκος των κολλαγόνων ινιδίων. Οι κολλαγόνες ίνες των οστών παρουσιάζουν μεγάλη δύναμη τάσης, ενώ τα άλατα ασβεστίου μεγάλη δύναμη συμπίεσης. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων, καθώς και η σύνδεση των κολλαγόνων ινών με τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, εξασφαλίζουν στα οστά μεγάλη αντοχή στην τάση και στη συμπίεση (Σμοκοβίτης 2007, Dorozhkin 2009). Στη μεσοκυττάρια ουσία βρίσκονται μικρές φακοειδείς κοιλότητες, οι οστικές κοιλότητες, όπου εντοπίζονται τα οστεοκύτταρα και από τις οποίες ξεκινούν πολυπληθή οστικά σωληνάκια. Τα τελευταία διακλαδίζονται και αναστομώνονται με τα σωληνάκια γειτονικών οστικών κοιλοτήτων, καθιστώντας εφικτή τη διάχυση και την ανταλλαγή ύλης μεταξύ των κυττάρων του οστίτη ιστού και του αίματος των τριχοειδών αγγείων (Μιχαήλ 1996).

Ο οστίτης ιστός υπόκειται κατά τη διάρκεια της ζωής σε σταθερές μεταβολές ανανέωσης και αρχιτεκτονικής προσαρμογής, όταν μεταβάλλονται για αρκετό χρονικό διάστημα οι μηχανικές συνθήκες της λειτουργίας των οστών (Μιχαήλ 1996). Η άποψη αυτή καθιερώθηκε από τον Wolff τη δεκαετία του 1867 (Wolff 1867). Με την αυξημένη μηχανική φόρτιση το οστό γίνεται πιο δυνατό και παχύ κατά τη φορά άσκησης της δύναμης, ενώ αν η φόρτιση είναι μειωμένη το οστό είναι πιο αδύναμο με μικρότερη πυκνότητα και ποσότητα θεμέλιας ουσίας (Yeadon 2016). Ο μετασχηματισμός της δομής αφορά την ανάπτυξη και τη διάταξη των οστέινων πεταλίων.

Παραδείγματα αποτελούν διάφορες καταστάσεις, όπως ραχίτιδα, κατάγματα ή αγκυλώσεις των αρθρώσεων και περιπτώσεις μεταβολής ενέργειας των μυών πάνω στα οστά που προσφύονται.

1.2.2. Κύτταρα του οστίτη ιστού

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από τρεις τύπους οστικών κυττάρων: τα οστεοκύτταρα, τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες, που αποτελούν διαφορετικά στάδια του ίδιου τύπου οστικού κυττάρου (Fetter 1985, Μιχαήλ 1996).

Τα οστεοκύτταρα είναι μονοπύρηννα κύτταρα με άφθονο, ελαφρά βασίφιλο κυτταρόπλασμα και ωοειδές, αποπλατυσμένο σχήμα, τα οποία καταλαμβάνουν τις οστικές κοιλότητες. Από αυτά αρχίζουν λεπτοφυείς αποφυάδες που εισδύουν μέσα στα οστικά σωληνάρια και έρχονται σε επαφή με τις αποφυάδες των γειτονικών οστεοκυττάρων και με χασματοσυνδέσεις καθίσταται δυνατή η επικοινωνία και η αντίδραση σε ορμονικά ερεθίσματα (Μιχαήλ 1996). Είναι ενεργά κύτταρα με σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οστέινης ουσίας, στην κινητοποίηση ασβεστίου από τον οστίτη ιστό προς την αιματική κυκλοφορία και στη μεταφορά ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου από το εξωκυττάριο υγρό στην αποτιτανωμένη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού (Remedios 1999).

Οι οστεοβλάστες συμβάλλουν στο σχηματισμό του οστίτη ιστού. Έχουν έντονα βασίφιλο κυτταρόπλασμα και κυβοειδές σχήμα. Διαθέτουν εκτεταμένο κοκκώδες ενδοπλασματικό δικτυωτό και αναπτυγμένη συσκευή Golgi, χαρακτηριστικά δηλαδή των κυττάρων που συνθέτουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες (Σμοκοβίτης 2007). Οι οστεοβλάστες εντοπίζονται στα σωληνάρια του Havers, όπου πραγματοποιείται ο σχηματισμός του οστού (Remedios 1999). Παράγουν τα οργανικά στοιχεία της μεσοκυττάριας ουσίας και, επιπλέον, συνθέτουν και εκκρίνουν ένζυμα που εναποθέτουν σε αυτή τα άλατα ασβεστίου, όπως οι όξινες, ουδέτερες και αλκαλικές φωσφατάσες, που απαντούν στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης τους. Στη διεργασία της εναπόθεσης αλάτων συμμετέχουν και πρωτεογλυκάνες και λιπίδια (Σμοκοβίτης 2007). Η πρόσφατη και μη ακόμη αποτιτανωμένη οστέινη ουσία που περιβάλλει τις οστεοβλάστες ονομάζεται οστεοειδής ουσία. Καθώς παράγεται οστεοειδής ουσία και εναποτίθεται σε σχισμές της επιφάνειας των οστών, περίπου 10% των οστεοβλαστών εγκλωβίζεται σε αυτή, αποτελώντας πλέον τα οστεοκύτταρα (Remedios 1999). Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα (οστεοπρογονικά κύτταρα), ελαφρώς διαφοροποιημένα που απαντούν στην εσωτερική στιβάδα του περιόστεου και στο ενδόστεο. Τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται στη διάρκεια διάπλασης και αύξησης των οστών, αλλά και μετέπειτα σε περιπτώσεις καταγμάτων ή μετασκευής του οστίτη ιστού, οπότε και πολλαπλασιάζονται και μετατρέπονται σε οστεοβλάστες ή οστεοκλάστες (Μιχαήλ 1996).

Οι οστεοκλάστες είναι πολypύρηννα γιγαντοκύτταρα. Προέρχονται από τη συγχώνευση μονοπύρηννων κυττάρων, κυρίως οστεοβλαστών (Μιχαήλ 1996). Ο ρόλος τους έγκειται στη διάβρωση και απορρόφηση της οστέινης ουσίας κατά την ανακατασκευή των οστών, καθώς εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η κολλαγενάση. Απελευθερώνουν επίσης γαλακτικό,

κιτρικό και άλλα οξέα και προκαλούν διάλυση των αλάτων (Σμοκοβίτης 2007). Εκκρίνουν και ενεργοποιούν ακόμη τον β-μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (Remedios 1999). Οι οστεοκλάστες απαντούν σε περιοχές των οστών που γίνεται αποδόμηση και απομάκρυνση των συστατικών της μεσοκυττάριας ουσίας, μεταναστεύουν κατά μήκος της επιφάνειας του οστού που αποδομείται και μπορούν να εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία (Σμοκοβίτης 2007).

1.2.3. Περίοστεο

Η εξωτερική επιφάνεια των οστών καλύπτεται από το περίοστεο. Στο έμβρυο λειτουργεί ως οστεοπλαστικό όργανο, παράγοντας οστέινη ουσία. Το περίοστεο σχηματίζεται από δύο στιβάδες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική ή ινώδης αποτελείται από πυκνό, φτωχό σε κύτταρα συνδετικό ιστό, όπου οδεύουν τα αγγεία και τα νεύρα που προορίζονται για το οστό. Η εσωτερική ή οστεογόνος στιβάδα περιέχει πολλά κύτταρα, πρόδρομα των οστεοβλαστών και ελαστικές ίνες (Μιχαήλ 1996). Στην περίοδο της διάπλασης των οστών ή σε περίπτωση κατάγματος ενήλικου οργανισμού, τα κύτταρα της οστεογόνου στιβάδας πληθαίνουν με μιτωτικές διαιρέσεις και, παράλληλα, τα πιο επιφανειακά διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες που καλύπτουν όλη την εσωτερική επιφάνεια του περιόστεου. Συνεπώς, το περίοστεο είναι υπεύθυνο για την αύξηση της διαμέτρου του οστού και για τον λόγο αυτόν στα νεαρά ζώα είναι ενεργό, ιδιαίτερα παχυμένο και με πλούσια αγγείωση. Στον ενήλικο οργανισμό είναι πιο λεπτό, εκτός και αν διαταράσσεται από παθολογικές καταστάσεις ή κατάγματα (Remedios 1999).

1.2.4. Ειδή οστίτη ιστού

Ανάλογα με τη διάταξη των κολλαγόνων ινιδίων στη μεσοκυττάρια ουσία, ο οστίτης ιστός διακρίνεται σε ινώδη ή πεταλιώδη (Μιχαήλ 1996).

Στην ινώδη μορφή του, τα κολλαγόνα ινίδια σχηματίζουν αδρές δεσμίδες κατανεμημένες σε παράλληλες ή σε ποικίλες κατευθύνσεις. Η διάταξη αυτή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της διάπλασης των οστών, στις ραφές των οστών του κρανίου, στα οδοντικά φατνία και στις προσφύσεις ορισμένων τενόντων ή συνδέσμων. Η συγκέντρωση ανόργανων συστατικών είναι μικρή, ενώ ο αριθμός των οστεοκυττάρων μεγαλύτερος από την πεταλιώδη μορφή (Μιχαήλ 1996).

Η πεταλιώδης μορφή απαντά στα οστά του ενήλικου οργανισμού, όπου τα κολλαγόνα ινίδια συνδέονται στενά μεταξύ τους με θεμελιακή αποτιτανωμένη ουσία και σχηματίζουν δεσμίδες, τα οστέινα πετάλια. Στη σπογγώδη ουσία, τα οστέινα πετάλια σχηματίζουν πλατιές δοκίδες με ποικίλες κατευθύνσεις που χιάζονται και χωρίζονται με τις μυελοκυψέλες. Στη συμπαγή ουσία της διάφυσης των μακρών οστών, τα οστέινα πετάλια σχηματίζουν τέσσερα διαφορετικά συστήματα ομόκεντρων κύκλων ή κυλίνδρων: το περιφερικό σύστημα, το περιμυελικό, τα σωληνάρια του Havers και τα διάμεσα συστήματα (Μιχαήλ 1996). Μεταξύ τους και παράλληλα προς τα οστέινα πετάλια υπάρχουν οι οστικές κοιλότητες που περιέχουν τα οστεοκύτταρα και από τις οποίες ξεκινούν τα οστικά σωληνάρια. Μικροσκοπικά, το σύστημα του Havers ή οστεώνας αποτελεί τη βασική μονάδα ιστικής οργάνωσης του συμπαγούς οστού

(Remedios 1999). Κάθε σύστημα του Havers ή οστεώνας αποτελείται από ένα κεντρικό σωλήνα, το σωλήνα του Havers, και από 4-20 ομόκεντρα οστέινα πετάλια γύρω του με τη φορά του επιμήκους άξονα των οστών. Περιέχουν 1-2 αιμοφόρα αγγεία, λεμφικούς σωλήνες και νευρικές ίνες και επικοινωνούν μεταξύ τους, με την ελεύθερη επιφάνεια του οστού και με το μυελικό αυλό μέσω των σωλήνων του Volkmann. Οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι τα κολλαγόνα ινίδια κάθε πεταλίου πορεύονται σπειροειδώς γύρω από τον επιμήκη άξονα του σωλήνα του Havers με διαφορετική φορά από αυτά του προηγούμενου και επόμενου πεταλίου κατά 0° -90° (Μιχαήλ 1996, Remedios 1999). Η σωληνωτή διάταξη των οστέινων πεταλίων της συμπαγούς ουσίας και η λειτουργικά καθορισμένη φορά των οστέινων δοκίδων της σπογγώδους, που συμπίπτει με τη φορά και διάταξη των τροχιών των μεγίστων τάσεων, παρέχει στα οστά μεγάλη στηρικτική ικανότητα και αντοχή.

1.3. Οστεογένεση

Τα οστά πριν από την τελική διαμόρφωσή τους περνούν από το υμενώδες ή και από το χόνδρινο στάδιο. Κατά το υμενώδες στάδιο οι καταβολές των οστών αποτελούνται από μεσέγχυμα. Ακολουθεί το χόνδρινο στάδιο, όπου μέσα στο μεσέγχυμα αναπτύσσεται υαλοειδής χόνδριος ιστός. Έτσι, τα οστά γίνονται χόνδρινα και περιβάλλονται από μεσεγχυματικό αγγειοφόρο υμένα (περιχόνδριο). Αργότερα επέρχεται η διάλυση του χόνδρου και η αντικατάστασή του από οστίτη ιστό, που παράγουν οι οστεοβλάστες. Όταν η οστεογένεση τελείται πάνω σε μεσέγχυμα ονομάζεται υμενοστέωση, ενώ όταν τελείται πάνω σε χόνδρινο υπόθεμα ενδοχόνδριος οστέωση. Με υμενοστέωση διαπλάσσονται τα οστά του θόλου του κρανίου, του προσώπου και η κλείδα και αυξάνονται σε πάχος τα επιμήκη οστά (Μιχαήλ 1996, Yeadon 2016)

Η οστέωση αρχίζει από ορισμένες θέσεις, τους πυρήνες οστέωσης, οι οποίοι ανάλογα με το χρόνο εμφάνισής τους διακρίνονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς. Η οστέωση των επιμήκων οστών αρχίζει στη μέση μοίρα της διάφυσης. Τα κύτταρα του περιχονδρίου μεταπίπτουν σε οστεοβλάστες που παράγουν οστέινη ουσία σε μια λεπτή στιβάδα γύρω από τη διάφυση, το περίοστεο. Παράλληλα, το ενδοχόνδριο οστό που παράγεται από τον πρωτογενή πυρήνα οστέωσης επεκτείνεται μέσα στη διάφυση προς κάθε κατεύθυνση και κυρίως τις επιφύσεις. Οι δοκίδες του ενδοχόνδριου οστού διαλύονται βαθμιαία από τους οστεοκλάστες και σχηματίζεται ο μυελικός αυλός. Τους τελευταίους μήνες της εμβρυικής ζωής εμφανίζονται και οι δευτερογενείς πυρήνες οστέωσης στις επιφύσεις, καθώς και σε άλλα σημεία, όπως το ράμφος του ωλεκράνου και ο μείζων τροχαντήρας, από όπου και αρχίζει η οστέωσή τους (Denny and Butterworth 2000). Η οστέωση είναι ενδοχόνδριος και επεκτείνεται στην περιφέρεια, εκτός από τις αρθρικές επιφάνειες που παραμένει ως αρθρικός χόνδρος και τα όρια επίφυσης- διάφυσης όπου παρεμβάλλεται ο συζευκτικός χόνδρος (Μιχαήλ 1996).

Η κατά μήκος αύξηση των επιμήκων οστών τελείται μέσω του συζευκτικού χόνδρου. Τα κύτταρα του είναι διαταγμένα σε επιμήκεις και παράλληλους στίχους. Τα κύτταρα της στιβάδας

που συνορεύει με την επίφυση πολλαπλασιάζονται και αναγεννούν το χόνδρο και η προς τη διάφυση στιβάδα μεταπίπτει σε ενδοχόνδριο οστό. Το ενδοχόνδριο οστό προστίθεται στο άκρο της διάφυσης, αυξάνοντας το μήκος της. Όταν το οστό αποκτήσει το τελικό μήκος του τερματίζεται η παραγωγή χονδροκυττάρων και εξελίσσεται η οστέωση σε όλο το μήκος. Τέλος, συνοστεώνεται η διάφυση με την επίφυση, σχηματίζοντας τη ραφή της επίφυσης. Τα οστά μεταβάλλονται συνεχώς έως την τελική διαμόρφωσή τους. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με τη διάλυση του πρωτογενούς ινώδους οστίτη ιστού από τους οστεοκλάστες και την αντικατάσταση με δευτερογενή πεταλιώδη οστίτη ιστό από τους οστεοβλάστες του περιosteού και ενδοστεού (Μιχαήλ 1996).

Η ακριβής ηλικία ολοκλήρωσης της ανάπτυξης του οστίτη ιστού ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική εντόπιση, το είδος και, όσον αφορά τον σκύλο, τη φυλή. Ολοκληρώνεται περίπου στην ηλικία των 7-9 μηνών σε μικρόσωμες φυλές σκύλου και στην ηλικία των 12-18 μηνών σε μεγαλόσωμες φυλές (Yeadon 2016). Η γνώση αυτή έχει κλινικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση καταγμάτων σε νεαρά ζώα και σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων της ανάπτυξης. Τα πρόβατα, που αποτέλεσαν το πειραματικό μοντέλο στην παρούσα διατριβή, έως την ηλικία των 3-4 ετών έχουν δικτυωτή δομή οστίτη ιστού, που αποτελείται από συνδυασμό ινώδους και πεταλιώδους οστίτη ιστού, όπου πορεύονται τα αγγειακά πλέγματα, ενώ με την πάροδο της ηλικίας τελείται οστική αναδιαμόρφωση σε οστέινα πετάλια με τους σωλήνες του Havers, που ξεκινάει από την οπίσθια επιφάνεια του μηριαίου, τη διάφυση της κερκίδας και του βραχιονίου (Newman *et al* 1995). Η σύγκλειση των κέντρων οστέωσης του προβάτου σε κάποια οστά, όπως το κεντρικό άκρο του βραχιονίου και της ωλένης, το περιφερικό άκρο της κερκίδας και της ωλένης και η κορυφή της πτέρνας, απαιτεί τρία χρόνια, ενώ οι επιφύσεις του μηριαίου και της κνήμης χρειάζονται περίπου δύο χρόνια ως την πλήρη συνοστέωση. Τέλος, η σύγκλειση του πυρήνα οστέωσης του σώματος των σπονδύλων και της λαγόνιας ακρολοφίας επέρχεται σε ηλικία 4-5 ετών (Martini *et al.* 2001).

Τα οστά σε όλη τη διάρκεια της ζωής υφίστανται συνεχώς αποδόμηση και ανακατασκευή σε μια αλληλένδετη ομοιοστατική διαδικασία (Yeadon 2016). Κατά την οστεόλυση, που προκαλείται από τους οστεοκλάστες, διαλύονται τα ανόργανα άλατα και αποδομείται η οργανική μεσοκυττάρια ουσία, ενώ κατά τη δόμηση συντίθεται οργανική ουσία (οστεοειδές) και εναποτίθενται σε αυτή άλατα. Η συνεχής αποδόμηση - δόμηση του οστίτη ιστού καθιστά τα οστά ικανά για αναδόμηση ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης, επιτρέπει την περιοδική αντικατάσταση του οστίτη ιστού και τη συμμόρφωση του με το νόμο του Wolff, επισκευάζει μικροτραυματισμούς, εξασφαλίζει μια διαθέσιμη πηγή ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου και προστατεύει τον οργανισμό από την οξέωση (Denny and Butterworth 2000, Σμοκοβίτης 2007). Είναι γενικά αποδεκτό πως στον ενήλικο ανθρώπινο οργανισμό το 10% της μάζας του σκελετού ανανεώνεται ετησίως (Yeadon 2016)

1.4. Αντίδραση των οστών σε ορμονικά ερεθίσματα

Ο μεταβολισμός των οστών ρυθμίζεται από ορμόνες. Η αυξητική ορμόνη επιταχύνει την ανάπτυξη των επιμήκων οστών μέχρι την ολοκλήρωση της οστέωσης του συζευκτικού χόνδρου. Μέσω της παραγωγής του όμοιου με ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I διεγείρει τη λειτουργία των επιφυσιακών γραμμών, δρώντας στα οστεοπρογονικά κύτταρα (Denny and Butterworth 2000). Έχει άμεση και έμμεση επίδραση στους οστεοβλάστες (Millis 1999). Άμεσα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη δράση τους δοσοεξαρτώμενα, αυξάνοντας την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης, οστεοκαλσίνης και κολλαγόνου τύπου I. Η έμμεση δράση της έγκειται στην παραγωγή αυξητικών παραγόντων. Τέλος, διεγείρει την απορρόφηση του νεκρωμένου οστού από τους οστεοκλάστες, προάγοντας τη διαφοροποίηση και τη δράση τους (Millis 1999). Αντίθετα, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και επιταχύνουν την οστέωση των συζευκτικών χόνδρων μέσω της σύνθεσης πρωτεϊνών και της εναπόθεσης ασβεστίου (Denny and Butterworth 2000). Η παραθορμόνη, οι ορμόνες του θυρεοειδούς αδένος, η βιταμίνη D, τα γλυκοκορτικοειδή, το αγγειοκινητικό εντερικό πεπτίδιο, οι ιντερλευκίνες 1 και 6, ο ενεργοποιός παράγοντας των οστεοκλαστών και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αυξάνουν την οστεόλυση, ενώ τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, η καλσιτονίνη, η ιντερλευκίνη 4, η ιντερφερόνη γ και η βιταμίνη K τη μειώνουν (Σμοκοβίτης 2007). Σε περίπτωση υποθυρεοειδισμού τα επιμήκη οστά δεν αναπτύσσονται κανονικά και καθυστερεί η οστέωση του συζευκτικού χόνδρου. Στον υπερθυρεοειδισμό, αντίθετα, η ανάπτυξη των οστών επιταχύνεται αλλά ταυτόχρονα επέρχεται νωρίτερα και η οστέωση του συζευκτικού χόνδρου, με συνέπεια πάλι την καθυστέρηση της ανάπτυξης. Τέλος, η υπερέκκριση T3 και T4 προκαλεί αποδόμηση των πρωτεϊνών των οστών, ελευθέρωση αλάτων και απέκκριση ασβεστίου και φωσφόρου σε ούρο και κόπρανα (Σμοκοβίτης 2007).

1.5. Αιμάτωση των οστών

1.5.1. Φυσιολογική αιμάτωση

Η κυκλοφορία του αίματος στα μακρά οστά πραγματοποιείται από το προσαγωγό αγγειακό σύστημα, το ενδιάμεσο αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού και το απαγωγό αγγειακό σύστημα (Rhineland 1985, Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016).

1.5.1.1. Το προσαγωγό αγγειακό σύστημα

Το προσαγωγό σύστημα μεταφέρει το αρτηριακό αίμα και αποτελείται από την κύρια τροφοφόρο αρτηρία, τις αρτηρίες της μετάφυσης και τα αρτηρίδια του περιοστέου στα σημεία πρόσφυσης των μυών (DeCamp *et al.* 2016)

Η κύρια τροφοφόρος αρτηρία εισέρχεται στον φλοιό μέσω του τροφοφόρου τμήματος και εντός του αυλού διακλαδίζεται σε ανιόντες και κατιόντες κλάδους που είναι υπεύθυνοι για την αιμάτωση των 2/3 των εσωτερικών στοιβάδων της φλοιώδους μοίρας της διάφυσης. Για παράδειγμα, στην κνήμη του σκύλου, η κύρια τροφοφόρος αρτηρία παρέχει το 70% της

αιμάτωσης της διάφυσης και το 30% της συνολικής αιμάτωσης του οστού (Remedios 1999). Πέραν του φλοιού, η τροφοφόρος αρτηρία αιματώνει και τον μυελικό αυλό με κλάδους αρτηριδίων που εισέρχονται στις μυελικές κοιλότητες. Περίπου το 70% της αιματικής ροής κατευθύνεται στον φλοιό και 30% στον μυελό (Rhineland 1985, Remedios 1999).

Οι αρτηρίες της μετάφυσης είναι πολλαπλές και διασχίζουν τον φλοιό των μεταφύσεων, ενώ εντός του αυλού αναστομώνονται με τελικούς κλάδους ενδομυελικών αρτηριδίων και συντελούν στην αιμάτωση (Remedios 1999). Σε περίπτωση κάκωσης, τραυματικής ή χειρουργικής αιτιολογίας, της κύριας τροφοφόρου αρτηρίας, οι αρτηρίες της μετάφυσης αναλαμβάνουν την αιμάτωση του φλοιού του οστού (Remedios 1999). Η αγγείωση που αναπτύσσεται λόγω υπερπλασίας των αρτηριδίων της μετάφυσης δύο εβδομάδες μετά τη διάνοιξη του μυελικού αυλού και τη ρήξη της κύριας τροφοφόρου αρτηρίας στο κεντρικό μηριαίο οστό είναι συγκρίσιμη με τη φυσιολογική αιμάτωσή του (Rhineland 1985)

Στα νεαρά ζώα το περιοστικό αρτηριακό σύστημα είναι πολύ αναπτυγμένο καθ' όλο το μήκος του περιοστέου, τροφοδοτώντας κάθε επιφάνεια του μακρού οστού, εκτός από τις αρθρικές επιφάνειες. Στον ενήλικο οργανισμό, αυτά τα αρτηρίδια ατροφούν και συνιστούν μικροσκοπικά αγγεία του προσαγωγού συστήματος (Remedios 1999). Τα περιοστικά αγγεία ξεκινούν από το αγγειώδες δίκτυο του περιοστέου, εισδύουν στους σωλήνες του Volkmann, κατόπιν του Havers και διανέμονται στις επιφανειακές στιβάδες του οστού (Μιχαήλ 1996). Εισέρχονται στο φλοιό της διάφυσης σε σημεία κατάφυσης μυών ή ισχυρής περιτονίας και τροφοδοτούν το επιφανειακό 1/3 του φλοιού (Remedios 1999, Denny and Butterworth 2000). Η κατανομή των περιοστικών αρτηριδίων ποικίλλει από οστό σε οστό εξαιτίας της ανομοιομορφίας σε μυϊκές προσφύσεις και προσφύσεις ισχυρών περιτονιών. Οι περιτονίες, για μηχανικούς λόγους, προσφύονται κυρίως κατά μήκος προεξοχών ή γωνιών. Για παράδειγμα, η διάφυση του μηριαίου, που σε εγκάρσια διατομή εμφανίζεται στρογγυλή, δέχεται περιοστικά αρτηρίδια κυρίως κατά μήκος της τραχείας γραμμής, ενώ η διάφυση της κνήμης, που είναι τριγωνική σε εγκάρσια διατομή, δέχεται περιοστικά αρτηρίδια στις ισχυρές μυϊκές καταφύσεις προσθίως και οπισθίως. Η γνώση των παραπάνω παρουσιάζει ιδιαίτερο χειρουργικό ενδιαφέρον, καθώς η αποκόλληση των προσφύσεων αυτών επιφέρει μείωση της περιοστικής αιματικής ροής και, επομένως, πρέπει να αποφεύγεται (Rhineland 1985)

Η ενδοαγγειακή πίεση σε ένα μακρύ οστό που προέρχεται από την κύρια τροφοφόρο αρτηρία είναι μεγαλύτερη στον μυελικό αυλό παρά στο περίοστεο όπου απαντούν φλεβίδια και τριχοειδή. Συνεπώς, η κυκλοφορία του αίματος στη διάφυση των επιμήκων οστών είναι φυγόκεντρη, δηλαδή από τον μυελικό αυλό προς το περίοστεο (Rhineland 1985). Επιπλέον, φαίνεται ότι η δραστηριότητα του προσαγωγού αγγειακού συστήματος, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, ποικίλλει μεταξύ ανάπαυσης και διέγερσης. Για παράδειγμα, η παρουσία κατάγματος σε ένα άκρο και η απουσία φόρτισής του και η αντισταθμιστική υπέρμετρη χρήση του

ετερόπλευρου άκρου έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση της αιμάτωσης του τελευταίου (Rhineland 1985).

1.5.1.2. Το ενδιάμεσο αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού

Το ενδιάμεσο αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού παρεμβάλλεται μεταξύ προσαγωγού και απαγωγού συστήματος και λειτουργεί ως ένα αγγειακό πλέγμα μέσω του οποίου γίνονται ανταλλαγές ανάμεσα στα τριχοειδή και τους περιβάλλοντες ιστούς. Αποτελείται από τους σωλήνες του Havers και του Volkmann, καθώς και από τα μικροσκοπικά σωληνάκια που προσάγουν οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες στα οστεοκύτταρα (DeCamp *et al.* 2016).

1.5.1.3 Το απαγωγό αγγειακό σύστημα

Η φλεβική αιματική ροή είναι φυγόκεντρος από τον αυλό προς το περίοστεο (DeCamp *et al.* 2016). Η φλεβική παροχέτευση του φλοιού και του μυελού τελείται ξεχωριστά (Remedios 1999). Το αίμα από τον φλοιό ρέει προς την επιφάνεια του περιostίου και παροχετεύεται σε φλεβίδια, τα οποία αναστομώνονται με περιostικές φλέβες, πριν καταλήξει στη συστηματική κυκλοφορία. Μέσα στο μυελικό αυλό, οι φλεβικοί κλάδοι εκβάλλουν σε μικροκοιλότητες που παροχετεύονται σε μια κεντρική μυελική κοιλότητα. Από εκεί, με ειδικά φλεβίδια και την τροφοφόρο φλέβα, διαπερνούν τον φλοιό και το αίμα επιστρέφει στην κυκλοφορία (Rhineland 1985, Remedios 1999, DeCamp *et al.* 2016). Με τη φλεβική κυκλοφορία παροχετεύεται και ο μυελός από την αιμοποιητική δραστηριότητά του (DeCamp *et al.* 2016).

1.5.2. Αντίδραση της αιματικής κυκλοφορίας μετά από κατάγματα

Η διαταραχή της αιμάτωσης σχετίζεται με την πολυπλοκότητα του κατάγματος. Τόσο η εξω-οστική όσο και η ενδομυελική αιμάτωση κρίνονται απαραίτητες για την επιτυχή πώρωση (DeCamp *et al.* 2016). Τα στοιχεία του προσαγωγού συστήματος διεγείρονται και αυξάνονται σε διάμετρο και σε αριθμό (DeCamp *et al.* 2016). Οι γύρω ιστοί συμμετέχουν στην αύξηση της αιμάτωσης του οστού, ειδικότερα των οστικών θραυσμάτων, του φλοιού και του νεοσχηματιζόμενου πώρου. Μετά τη σταθεροποίηση του κατάγματος και την αποκατάσταση της ενδομυελικής κυκλοφορίας, η εξω-οστική παροχή μειώνεται (DeCamp *et al.* 2016). Παράγοντες που μπορούν να μειώσουν την κυκλοφορική αντίδραση και να καθυστερήσουν την πώρωση είναι: 1) η ύπαρξη ανοιχτού τραύματος από ατύχημα, 2) η ακατάλληλη διαχείριση των μαλακών ιστών, 3) η ανεπαρκής ανάταξη του κατάγματος και 4) η ανεπαρκής σταθεροποίηση των καταγματικών τεμαχίων.

2. ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΟΣΤΟΥ

Ο όρος «οστική αποκατάσταση» ή «πώρωση» αναφέρεται στην πλήρη αναγέννηση του οστίτη ιστού μετά από κάκωση και περιλαμβάνει το σύνολο των τοπικών και γενικών φαινομένων που συμβαίνουν από τη στιγμή της πρόκλησης ενός κατάγματος μέχρι την πλήρη και οριστική

συνένωση των τμημάτων του οστού. Αναπτύσσεται νεόπλαστος οστίτης ιστός όμοιος με την αρχική μορφή, χωρίς τη δημιουργία ουλώδους ιστού (Griffon 2005, Houlton 2016).

Σε γενικές γραμμές, η αλληλουχία των γεγονότων περιλαμβάνει την αιμορραγία και το σχηματισμό αιματώματος στην περιοχή, τη φλεγμονή και το οίδημα, ακολουθούμενα από τη διαφοροποίηση πολύτροπων μεσεγχυματικών κυττάρων, το σχηματισμό χόνδρινου και κατόπιν οστέινου πώρου και, τέλος, την ανακατασκευή σε υγιές φυσιολογικό οστό (DeCamp *et al.* 2016). Συνεπώς, πρόκειται για την προοδευτική αντικατάσταση του ιστού της καταγματικής εστίας με πιο πυκνό και ισχυρό ιστό, δηλαδή από κοκκιωματώδη σε συνδετικό ιστό, κατόπιν σε ινώδη, σε χόνδρο που έπειτα ασβεστοποιείται, σε πεταλιώδες οστό και, τελικά, σε φλοιώδες οστό. Η όλη διαδικασία τελείται υπό την επίδραση παραγόντων, όπως χημειοϋποδοχείς και αγγειογενετικοί και αυξητικοί παράγοντες. Ο σχηματισμός του πώρου ανάλογα με την περιοχή εντόπισής του διακρίνεται σε: 1) μυελικό, 2) περιοστικό ή 3) ενδοφλοιικό πώρο (DeCamp *et al.* 2016).

Η διαδικασία της οστικής αποκατάστασης διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στην εστία του κατάγματος μετά την ανάταξη και τη σταθεροποίησή του, όπως η αιμάτωση της περιοχής, η επιτυχής ανάταξη των καταγματικών τεμαχίων καθώς και ο βαθμός σταθεροποίησής τους (DeCamp *et al.* 2016). Εάν παρέχεται επαρκής ποσότητα αίματος, η πώρωση του κατάγματος εξαρτάται από τη βιομηχανική σταθερότητά του (Griffon 2005, Houlton 2016). Η απόλυτη σταθερότητα, η διακαταγματική συμπίεση και η επαφή των οστικών τεμαχίων οδηγούν σε άμεση πώρωση, ενώ μια ελαστική οστεοσύνθεση θα οδηγήσει σε έμμεση πώρωση (Remedios 1999, Denny and Butterworth 2000). Η πρώτη, που ονομάζεται και πρωτογενής πώρωση, χαρακτηρίζεται από την έλλειψη πώρου και το σχηματισμό πεταλιώδους οστίτη ιστού. Αντιθέτως, σε ασταθή κατάγματα σχηματίζεται πώρος πριν από την παραγωγή οστού (δευτερογενής πώρωση) (Houlton 2016).

2.1. Άμεση ή πρωτογενής πώρωση κατάγματος

Η πρωτογενής πώρωση δεν αποτελεί φυσική μορφή οστικής αποκατάστασης, καθώς τελείται μόνο κάτω από συνθήκες απόλυτης ανάταξης και διακαταγματικής συμπίεσης, όπως σε περίπτωση συμπιεστικής κοχλίωσης, με ή χωρίς πλάκα εξουδετέρωσης, ή στην περίπτωση πλάκας δυναμικής αξονικής συμπίεσης (Marsell and Einhorn 2012, Houlton 2016). Πρώτος ο Danis (1949) παρατήρησε ότι δύο οστικά τεμάχια ακινητοποιημένα με ισχυρή πλάκα συνενώθηκαν χωρίς το σχηματισμό περιοστικού ή ενδοστικού πώρου (Danis 1949). Τα κατάγματα που πωρώνονται με πρωτογενή μηχανισμό είναι αρχικά πιο αδύναμα από εκείνα στα οποία σχηματίζεται πώρος. Ο σχηματισμός ώριμου φλοιώδους οστού με φυσιολογική εσωτερική αρχιτεκτονική δομή και η πλήρης αναδιαμόρφωση μπορεί να διαρκέσουν μήνες ή και χρόνια (Denny and Butterworth 2000, Griffon 2005, Houlton 2016). Το πλεονέκτημα έγκειται στην ταχύτερη φόρτιση του άκρου λόγω της μεγάλης σταθερότητάς και, επομένως, την αποφυγή της νόσου του κατάγματος (Denny and Butterworth 2000).

Η άμεση πώρωση διακρίνεται σε «επαφής», όταν το διάκενο μεταξύ των οστικών τεμαχίων είναι $< 0,01 \text{ mm}$ και η διακαταγματική σχετική παραμόρφωση $< 2\%$, και σε «κενού», όταν το έλλειμμα είναι $< 0,8-1 \text{ mm}$ και η σχετική παραμόρφωση $< 2\%$ (Houlton 2016). Στην πρώτη περίπτωση η πώρωση και η αναδιαμόρφωση συμβαίνουν ταυτόχρονα, ενώ στη δεύτερη διαδοχικά (Marsell and Einhorn 2012, Houlton 2016).

Σε πραγματικές κλινικές συνθήκες δεν είναι ποτέ απόλυτη η επαφή μεταξύ των καταγματικών επιφανειών. Σε ορισμένες περιοχές υπάρχουν σημεία επαφής, ενώ σε άλλες μικροσκοπικά κενά. Συνεπώς, η πρωτογενής πώρωση πάντοτε προκύπτει από το συνδυασμό πώρωσης άμεσης επαφής και κενού (Houlton 2016).

2.1.1. Πώρωση επαφής

Οι οστεοκλάστες αφαιρούν μικρές επιμήκεις εστίες νεκρού οστού κατά μήκος της επιφάνειας του κατάγματος, ενώ οι οστεοβλάστες που ακολουθούν προσθέτουν νέο πεταλιώδες οστό αναδημιουργώντας το σύστημα του Havers (Remedios 1999, Griffon 2005). Σχηματίζονται, έτσι, επιμήκεις κοιλότητες που άμεσα πληρώνονται με οστεοειδές. Τα συστήματα του Havers σχηματίζονται κατά τον επιμήκη άξονα του οστού και σε αυτά διεισδύουν αιμοφόρα αγγεία, μεταφέροντας οστεογενετικά κύτταρα (Marsell and Einhorn, 2012). Οι οστεώνες ωριμάζουν σε πεταλιώδη οστίτη ιστό χωρίς το σχηματισμό περισστικού πώρου και σταδιακά η καταγματική γραμμή είναι ακτινολογικά μη εμφανής (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012, Houlton 2016).

2.1.2. Πώρωση κενού

Στην πώρωση κενού στην καταγματική γραμμή τελείται αρχικά υμενοστέωση και, στη συνέχεια, αναδιαμόρφωση (Griffon 2005, Houlton 2016). Ο νεοσχηματιζόμενος πεταλιώδης οστίτης ιστός έχει, αρχικά, φορά κάθετη στον επιμήκη άξονα του οστού. Συνεπώς, το νεοσχηματισθέν οστό δεν είναι σταθερά συνδεδεμένο στο γειτονικό άθικτο φλοιό και απαιτείται δευτερογενής αναδιαμόρφωση, που ξεκινάει περίπου τρεις με οκτώ εβδομάδες αργότερα (Denny and Butterworth 2000, Marsell and Einhorn 2012, Houlton 2016). Τροποποιημένα οστεο-προγονικά κύτταρα, κοπτώμενοι κώνοι, ξεκινούν από το υγιές οστό και κάποιοι σχηματίζονται στο διάκενο του κατάγματος, και με διεργασίες απορρόφησης και αναδιαμόρφωσης σχηματίζουν οστικές κοιλότητες παράλληλου προσανατολισμού στον επιμήκη άξονα του οστού μερικές εβδομάδες αργότερα (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012, Houlton 2016).

2.2. Έμμεση ή δευτερογενής πώρωση κατάγματος

Η έμμεση πώρωση είναι πιο κοινή μορφή και συνδυάζει την ενδοχόνδρια οστεοποίηση και την υμενοστέωση (Marsell and Einhorn 2012). Δεν απαιτείται ισχυρή ανάταξη και οστεοσύνθεση, αλλά αντίθετα ενισχύεται από τη μικροκίνηση στην καταγματική εστία και από την άμεση φόρτιση του άκρου. Παρατηρείται, συνεπώς, σε σταθερά κατάγματα που ανατάσσονται με κλειστή τεχνική και εξωτερική σταθεροποίηση, καθώς και σε χειρουργικές τεχνικές, όπου υπάρχει μικρού βαθμού κίνηση στην καταγματική εστία, όπως στην ενδομυελική ήλωση, στην

εξωτερική οστεοσύνθεση ή και στην οστεοσύνθεση των συντριπτικών καταγμάτων (Denny and Butterworth 2000, Marsell and Einhorn 2012). Η διακαταγματική σχετική παραμόρφωση, ώστε να επέλθει πώρωση, πρέπει σε κάθε περίπτωση να είναι <2% και σε αυτό συμβάλλουν η άμεση σύσπαση των μυών της περιοχής, η απορρόφηση των καταγματικών άκρων και ο σταδιακός σχηματισμός εξωτερικού πώρου (Griffon 2005). Η αποκατάσταση ασταθών καταγμάτων χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ευμεγέθους χόνδρινου πώρου πριν από το σχηματισμό οστίτη ιστού (Houlton 2016). Η ποσότητα του πώρου εξαρτάται από τη σταθερότητα του κατάγματος και είναι αντιστρόφως ανάλογο μέγεθος αυτής, ούτως ώστε σε πιο ασταθές κάταγμα να κατανέμονται οι δυνάμεις σε περισσότερο όγκο ιστού (Denny and Butterworth 2000, Griffon 2005). Τις πρώτες εβδομάδες πραγματοποιείται απορρόφηση του νεκρού οστού στα καταγματικά άκρα από τη δράση των οστεοκλαστών. Έτσι αυξάνεται η διακαταγματική απόσταση και μειώνεται η τάση. Υπό αυτές τις συνθήκες σχηματίζεται κοκκιώδης ιστός. Η έμμεση πώρωση ενός κατάγματος μακρού οστού διακρίνεται σε τρεις φάσεις: τη φλεγμονώδη, την επανορθωτική και τη φάση ανακατασκευής. Τα διαδοχικά αυτά γεγονότα λαμβάνουν χώρα σε κατάγματα χαμηλής ενέργειας, όπου οι γύρω μαλακοί ιστοί διατηρούνται υγιείς (Houlton 2016).

2.2.1. Φλεγμονώδης φάση

Η φάση αυτή ξεκινάει αμέσως μετά την πρόκληση του κατάγματος και διαρκεί από 3-4 ημέρες έως και 2-3 εβδομάδες, μέχρι την έναρξη δημιουργίας χόνδρινου ιστού (Remedios 1999, Griffon 2005). Οι μαλακοί ιστοί, το περίοστεο και τα ενδομυελικά αγγεία έχουν υποστεί τραυματισμό. Η διάσπαση των οστικών κοιλοτήτων και η επακόλουθη απόπτωση των οστεοκυττάρων, προκαλούν την απελευθέρωση ενζύμων που διασπούν τη μεσοκυττάρια ουσία (Remedios 1999). Προκαλείται έτσι φλεγμονώδης αντίδραση οξείας φάσης, όπου πρωτεΐνες συρρέουν στο σημείο της φλεγμονής, προάγοντάς την περαιτέρω και δημιουργώντας αιμάτωμα. Το αιμάτωμα σχηματίζεται πέριξ των καταγματικών άκρων, αλλά και μέσα στο μυελικό αυλό, αποτελώντας τη βάση για τη δημιουργία του πώρου, καθώς απελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες, που διεγείρουν την αγγειογένεση και την οστεογένεση (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012). Το αιμάτωμα παίζει τον ρόλο προσωρινού ικρίωματος για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε ινοβλάστες, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες. Το αιμάτωμα περιέχει αιμοπετάλια, ινική, κινίνες, προσταγλανδίνες και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες του οστού (Millis 1999). Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), που αποτελεί έναν από τους πρώτους αυξητικούς παράγοντες που φθάνουν στην καταγματική εστία (Millis 1999, Remedios 1999). Πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, μακροφάγα και ινοβλάστες συρρέουν στην περιοχή εντός είκοσι τεσσάρων ωρών λόγω χημειοταξίας (Millis 1999). Τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα απελευθερώνουν τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β1 (Transforming Growth Factor beta 1, TGF-β1) και τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast growth factor, FGF) που διεγείρουν την

οστεογένεση και έχουν ρόλο ενορχηστρωτή, καθώς ορίζουν τη σειρά αποκατάστασης των ιστών (Millis 1999, Remedios 1999, Griffon 2005). Επιπλέον, εκκρίνουν ιντερλευκίνη 1 (interleukin-1, IL-1), που διεγείρει την παραγωγή ιντερλευκίνης 6 από τους οστεοβλάστες, την ανάπτυξη χόνδρινου πώρου και τη νεοαγγειογένεση. Η IL-6 διεγείρει την αγγειογένεση, την παραγωγή αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth factor, VEGF) και τη διαφοροποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών (Marsell and Einhorn, 2012). Παράλληλα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα εντοπίζονται στο αιμάτωμα και διεγείρουν τη διαδικασία φαγοκυττάρωσης των νεκρωμένων ιστών. Οι οστεοκλάστες απορροφούν το νεκρό οστίτη ιστό και απελευθερώνουν τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού του, καθώς και κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, που με τη σειρά τους προάγουν την αγγειογένεση (Millis 1999). Η οστική απορρόφηση στα καταγματικά άκρα αυξάνει το κενό, μειώνει τη διακαταγματική τάση και ελαχιστοποιεί την παραμόρφωση των γύρω ιστών (Denny and Butterworth 2000, Griffon 2005).

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την οστεογένεση, καθώς παρέχει απαιτούμενα κύτταρα, θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και αυξητικούς παράγοντες. Η αγγειογένεση εξαρτάται από την αιμάτωση των ιστών πέριξ της καταγματικής εστίας και την κατάλληλη σταθεροποίηση του κατάγματος, ώστε τα νέα τριχοειδή να μπορούν να επιβιώσουν (Houlton 2016). Εντός λίγων ωρών και εφόσον υπάρχει κατάλληλη σταθερότητα στην περιοχή αναπτύσσεται αιματική παροχή από τους γύρω ιστούς στην υποξική καταγματική εστία. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), το χαμηλό pH τοπικά και οι κυτταροκίνες του αιματώματος προωθούν την αγγειογένεση, ενώ υποστηρίζονται και από τις προσταγλανδίνες E1 και E2 (Griffon 2005, Houlton 2016). Η κινητοποίηση των κυτταροκινών διεγείρει τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών και τον τροπισμό, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση οστεοπρογονικών κυττάρων από μεσεγχυματικά κύτταρα άλλων ιστών (όπως του μυϊκού και του μυελού των οστών) στην καταγματική εστία (Millis 1999, Houlton 2016).

2.2.2. Επανορθωτική φάση

Η μείωση του οιδήματος των μαλακών ιστών σηματοδοτεί το τέλος της φλεγμονώδους φάσης και την έναρξη της επανορθωτικής, που χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό αρχικά μαλακού και έπειτα σκληρού πώρου (Houlton 2016). Στη διάρκεια των πρώτων ημερών από το κάταγμα, ινοβλάστες και τριχοειδή μεταναστεύουν στην εστία και εναποθέτουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Millis 1999, Griffon 2005). Έτσι, το αιμάτωμα μετατρέπεται σε κοκκιώδη ιστό πλούσιο σε ινική που προσφέρει σταθερότητα για την αγγειογένεση (Denny and Butterworth 2000). Ακολουθεί ενδοχόνδριος οστεογένεση ανάμεσα στα καταγματικά άκρα και περιοστικά, σχηματίζοντας ένα μαλακό χόνδρινο πώρο που προσφέρει μικρού βαθμού σταθερότητα. Η κορύφωση παρατηρείται 7-9 ημέρες μετά το τραύμα, ενώ την ίδια στιγμή παρατηρείται υμενοστέωση υποπεριοστικά στα καταγματικά άκρα. Δημιουργείται, συνεπώς, σκληρός πώρος, γεφυρώνοντας και προσφέροντας μια πιο ισχυρή δομή που επιτρέπει τη φόρτιση του άκρου (Marsell and Einhorn 2012).

Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF- β) και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins, BMPs) συμβάλλουν στη μετατροπή του ινώδους ιστού σε χόνδρο μέσω της χημειοταξίας, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων (Griffon 2005). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τους γύρω μαλακούς ιστούς, το ενδόστεο, τη μυελική κοιλότητα και την οστεογόνο στιβάδα του περιostίου, καθώς και μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας από απομακρυσμένες εστίες αιμοποίησης (Remedios 1999, Griffon 2005, Marsell and Einhorn, 2012). Ο περιοστικός πώρος, στη συνέχεια, διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Τα πολύτροπα μεσεγχυματικά κύτταρα σε συνθήκες χαμηλής πίεσης οξυγόνου διαφοροποιούνται σε χονδροβλάστες που παράγουν υαλοειδή χόνδρο ή, αντίθετα, σε οστεοβλάστες, αν η μερική πίεση του οξυγόνου είναι υψηλή (Remedios 1999, Denny and Butterworth 2000). Αν επικρατεί μεγάλη τάση παρεκτόπισης στην περιοχή, όπως λόγω χάριν σε περίπτωση αποσπαστικού κατάγματος, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μετατρέπονται σε ινοβλάστες και παράγεται ινώδης ιστός. Ο ιστός αυτός δεν προσφέρει σταθερότητα, είναι αφιλόξενος για οστεογενετικά κύτταρα και δεν ασβεστοποιείται, οπότε το κάταγμα οδηγείται σε αποτυχία πώρωσης (Denny and Butterworth 2000). Τα χονδροκύτταρα, που σχηματίζονται από μεσεγχυματικά κύτταρα, εντός των πρώτων τριών εβδομάδων, δημιουργούν ένα μαλακό πώρο, ικανό να αντισταθεί σε δυνάμεις συμπίεσης αλλά με δύναμη τάσης όμοια με τον ινώδη ιστό που αντικαθιστά (Griffon 2005, Houlton 2016). Κολλαγόνες ίνες, αρχικά τύπου I, II και III εναποτίθενται αλλά σταδιακά κυριαρχούν οι τύπου I, που αποτελούν τη βασική δομική πρωτεΐνη των οστών και ξεκινά η εναπόθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (Remedios 1999). Στο στάδιο αυτό, η δύναμη τάσης του οστού αυξάνεται από το διαγώνιο σχηματισμό των ινιδίων (Houlton 2016). Εάν η τάση είναι χαμηλή, πρωτογενής οστίτης ιστός μπορεί να σχηματιστεί απευθείας από οστεοβλάστες μέσα σε μεσέγχυμα με υμενοστέωση (Denny and Butterworth 2000, Houlton 2016). Στην περίπτωση αυτή, το οστό είναι, από άποψη εμβιομηχανικής, πιο αδύναμο.

Γενικά ο πώρος αποτελείται από την εξωτερική και την εσωτερική μοίρα του και καθώς αυξάνεται στα δύο καταγματικά άκρα, τα γεφυρώνει περίπου δύο εβδομάδες μετά το τραύμα (Denny and Butterworth 2000). Ο πρώτος σχηματίζεται από το περίοστεο κατόπιν πάχυνσής του στην καταγματική εστία και αιματώνεται από εξωστικά αγγεία, ενώ ο εσωτερικός από το ενδόστεο κατόπιν αιμάτωσης από ενδομυελικά αρτηρίδια (Griffon 2005, Houlton 2016). Εξωτερικός πώρος εμφανίζεται κυρίως σε ασταθή κατάγματα νεαρών ζώων, που έχουν υψηλότερη οστεογενετική ικανότητα. Καθώς αυξάνεται η διάμετρος του οστού με τη δημιουργία του πώρου, αυξάνεται η αντίσταση σε δυνάμεις στροφής και κάμψης.

Η δυναμική του μαλακού πώρου αυξάνεται, καθώς ασβεστοποιείται. Η ασβεστοποίηση ξεκινά από τα καταγματικά άκρα προς το κέντρο της εστίας και, τελικά, ο ασβεστοποιημένος ινοχόνδρινος ιστός γίνεται ινώδης οστίτης ιστός (Houlton 2016). Στην ασβεστοποίηση συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια, καθώς συσσωρεύουν κοκκία ασβεστίου που έχουν δημιουργηθεί

στην υποξική καταγματική εστία από αναερόβιο μεταβολισμό (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012). Τα κοκκία ελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων του πώρου και μεταφέρονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, όπου ενώνονται με φώσφορο και σχηματίζουν κρυστάλλους απατίτη. Στο τέλος της επανορθωτικής φάσης, η γεφύρωση έχει ολοκληρωθεί, αλλά η δομή του οστού διαφέρει από την αρχική. Το χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί η γεφύρωση ποικίλλει και εξαρτάται από παράγοντες, όπως το είδος του κατάγματος, το είδος του οστού και το σημείο εντόπισης, η κατάσταση των μαλακών ιστών πέριξ της καταγματικής εστίας, καθώς και τα χαρακτηριστικά του ασθενούς (είδος, φύλο, ηλικία, κατάσταση υγείας και άλλες παθήσεις). Στο τέλος της φάσης αυτής, το οστό μπορεί να ανεχτεί μικρής έντασης άσκηση φορτίων (Griffon 2005).

2.2.3. Φάση ανακατασκευής

Παρ' όλο που η γεφύρωση επέρχεται στο τέλος της επανορθωτικής φάσης, η αποκατάσταση δεν έχει ολοκληρωθεί (Houlton 2016). Στον άνθρωπο η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει 6-9 χρόνια και αποτελεί το 70% του συνολικού χρόνου πώρωσης ενός κατάγματος (Griffon 2005). Το ινώδες οστό πρέπει να αντικατασταθεί από φλοιώδες από τη συνέργεια της απορροφητικής δράσης των οστεοκλαστών και της οστεογενετικής δραστηριότητας των οστεοβλαστών και η μυελική κοιλότητα να αναγεννηθεί (Millis 1999, Marsell and Einhorn, 2012). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από το νόμο του Wolff, σύμφωνα με τον οποίο τα οστά ενός υγιούς ζώου προσαρμόζονται στις συνθήκες μηχανικής φόρτισης. Η φάση αυτή καθοδηγείται από την επίδραση των ηλεκτρικών δυναμικών στη δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών κατά την αξονική φόρτιση και, τελικά, επιτρέπει στο οστό να επανέλθει στην αρχική μορφή (Houlton 2016). Έτσι, ο εξωτερικός πώρος αντικαθίσταται από πεταλιώδες οστό, ενώ ο εσωτερικός ανακατασκευάζεται σε διαφυσιακή μυελική κοιλότητα (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012).

Στο στάδιο αυτό, όπως και στα προηγούμενα, η επαρκής αιματική παροχή και η μηχανική σταθερότητα είναι αναγκαίες. Σε περίπτωση που λείπουν και τα δυο θα προκληθεί αποτυχία πώρωσης με ατροφικό ινώδη ιστό, ενώ, αν η ροή είναι ικανοποιητική αλλά όχι η σταθερότητα, παραμένει υπερτροφικός χόνδρινος ιστός, δημιουργώντας ψευδοάρθρωση (Griffon 2005, Marsell and Einhorn 2012).

2.3. Μικροκίνηση

Στην περίπτωση της έμμεσης πώρωσης, η μικροκίνηση μεταξύ των τεμαχίων φαίνεται ότι διεγείρει το σχηματισμό πώρου (Remedios 1999). Αυτό συμβαίνει διότι παρατείνεται η φλεγμονώδης φάση και αυξάνεται η αγγειογένεση (Millis 1999). Έχει αποδειχθεί ότι η διακαταγματική κίνηση προάγει περισσότερο τη δευτερογενή πώρωση από ό,τι η ισχυρή οστεοσύνθεση (Goodship and Kenwright 1985). Σε τέτοιες συνθήκες, διεγείρεται η αιματική ροή στην καταγματική εστία και επιταχύνεται η παραγωγή περιοστικού πώρου, χωρίς, ωστόσο, να δημιουργείται και ενδοστικός πώρος (Houlton 2016). Παράγονται ηλεκτρικά δυναμικά,

απελευθερώνοντας αυξητικούς παράγοντες και προσταγλανδίνες E2, που επιταχύνουν την οστική αποκατάσταση (Remedios 1999). Η μειωμένη φόρτιση της καταγματικής εστίας, όπως σε περιπτώσεις ογκώδους μεταλλικής πλάκας ή ισχυρής εξωτερικής οστεοσύνθεσης, θα καθυστερήσει την πώρωση. Αντίθετα, η υπέρμετρα αυξημένη διακαταγματική κίνηση εμποδίζει το σχηματισμό νέων εύθραυστων τριχοειδών αγγείων στο κενό και μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση και χαλάρωση των υλικών (Houlton 2016).

2.4. Βιολογική πώρωση κατάγματος

Η βιολογική οστεοσύνθεση βασίζεται στην ακεραιότητα των μαλακών ιστών και στην έμμεση ανάταξη και γεφύρωση του κατάγματος. Στόχοι της είναι η διατήρηση του μήκους και της ευθυγράμμισης του οστού με μικρή αποκάλυψη της καταγματικής εστίας και ελάχιστους χειρισμούς των οστικών τεμαχίων, ώστε να μη διαταραχθεί το αιμάτωμα και η αιμάτωση των γύρω μαλακών ιστών (Denny and Butterworth 2000, Griffon 2005). Έτσι, είναι προτιμότεροι οι μικρής διαμέτρου ήλοι εξωτερικής οστεοσύνθεσης, με ή χωρίς ενδομυελικό ήλο, και οι μεταλλικές πλάκες που τοποθετούνται με ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους χωρίς τη διατάραξη της καταγματικής εστίας (Denny and Butterworth 2000). Σε οστά, όπως το βραχιόνιο και το μηριαίο, μπορεί να χρησιμοποιηθούν πλάκες βιολογικής οστεοσύνθεσης, που γεφυρώνουν το οστό και μεταφέρουν τα φορτία σε όλο το μήκος, καθώς και πλάκες μειωμένης επαφής, που δε διαταράσσουν την εξοστική αιματική παροχή (Griffon 2005). Η βιολογική οστεοσύνθεση επιταχύνει την πώρωση στα συντριπτικά κατάγματα, όπου το μέγεθος των οστικών τεμαχίων δεν επιτρέπει την ανάταξη και οι μαλακοί ιστοί έχουν τραυματιστεί. Γενικά, η βιολογική οστεοσύνθεση σχετίζεται με άμεση αύξηση της δύναμης του οστού, άμεση φόρτιση και μειωμένο ενδεχόμενο ανάπτυξης νόσου του κατάγματος (Denny and Butterworth 2000).

2.5. Αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν την πώρωση κατάγματος

Η οστική πώρωση είναι μια δυναμική και πλήρως ενορχηστρωμένη ακολουθία γεγονότων και περιλαμβάνει τη δράση τοπικώς και κεντρικώς παραγόμενων αυξητικών παραγόντων. Πρόκειται για πεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες που οργανώνουν και διεγείρουν τη μίτωση, τη χημειοταξία, τη διαφοροποίηση, την αύξηση και την παραγωγή κυττάρων και θεμέλιας ουσίας (Millis 1999). Η δράση τους μπορεί να είναι αυτοκρινής, παρακρινής ή ενδοκρινής. Οι αυξητικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα οστά παράγονται από αυτά τα ίδια ή από άλλους ιστούς και μεταφέρονται στο οστό-στόχο μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Ο ρόλος τους μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των οστών (Millis 1999). Η εξωγενής χορήγησή τους μπορεί να ενισχύσει την επιτυχή πώρωση και να μειώσει την πιθανότητα αστοχίας των υλικών και τη δημιουργία εκ νέου κατάγματος.

Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων: Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) παράγεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά

κύτταρα και αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων (Remedios 1999). Μετά την πρόκληση του κατάγματος, απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια του αιματώματος, προάγει τη χημειοταξία μονοκύτταρων, ουδετερόφιλων, ινοβλαστών και μεσεγχυματικών κυττάρων και ενισχύει το σχηματισμό κολλαγόνου και χόνδρου (Millis 1999). Διεγείρει την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και οστεοβλαστών (Remedios 1999). Ενισχύει τη σύνθεση προσταγλανδινών και την απορρόφηση του νεκρωμένου οστού. Η θετική εξωγενής επίδρασή του στην οστική αναγέννηση έχει αποδειχθεί τόσο κατόπιν τοπικής έγχυσης σε σημεία οστεοτομών, όσο και μέσω συστηματικής χορήγησης (Millis 1999).

Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β: Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (Transforming Growth Factor beta, TGF-β) έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των οστών και βρίσκεται κυρίως στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Remedios 1999). Τα αιμοπετάλια είναι η δεύτερη μεγαλύτερη πηγή TGF-β (Martinez and Walker 1999). Ενδοκυτταρικά, εντοπίζεται σε οστεοβλάστες που πολλαπλασιάζονται περιοστικά στην καταγματική εστία (Millis 1999). Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις τύποι του (1-4) με διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. (Martinez and Walker 1999, Millis 1999, Remedios 1999).

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας: Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth factor, VEGF) θεωρείται ο ρυθμιστής της αγγειογένεσης και της αιμάτωσης στην καταγματική εστία. Οι οστεοβλάστες και τα χονδροκύτταρα τον παράγουν σε υψηλά επίπεδα, διεγείροντας έτσι την παραγωγή τριχοειδών αγγείων και μετατρέποντας τον στερούμενο αγγείων χόνδρινο ιστό σε αγγειούμενο οστίτη ιστό. Ο VEGF προάγει τη συγκέντρωση και τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών μεσεγχυματικών κυττάρων σε σχηματισμό αγγειακού πλέγματος και τη δημιουργία νέων αγγείων από τον ήδη υπάρχοντα (Marsell and Einhorn 2012).

Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών: Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF) απελευθερώνεται από ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα στον πόρο του κατάγματος και παραμένει στη θεμέλια ουσία (Remedios 1999). Προάγει την αγγειογένεση και το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, την άμεση αναδιοργάνωση των κολλαγόνων ινιδίων και το σχηματισμό πόρου στην καταγματική εστία. Διεγείρει τη δράση των χονδροκυττάρων και έχει μιτογόνο επίδραση στα χονδροκύτταρα και στους οστεοβλάστες.

Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες: Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins, BMPs) σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεογόνα κύτταρα (Remedios 1999). Οστεοεπαγωγή ονομάζεται η διαδικασία που προάγει τη μίτωση αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων, οδηγώντας στο σχηματισμό οστεοπρογονικών κυττάρων και χονδροβλαστών και τελικά στο σχηματισμό νέου οστού (Martinez and Walker 1999, Millis 1999). Η οστεοεπαγωγή κρίνεται πολύτιμη για τον άμεσο σχηματισμό μαλακού

πώρου, τη μετέπειτα μετατροπή του σε σκληρό, και, τέλος, την αντικατάστασή του από πεταλιώδες οστό.

Οι BMPs εντοπίζονται στο μη κολλαγονούχο μέρος της θεμέλιας ουσίας και, μετά την πρόκληση του κατάγματος, εκκρίνονται και διεγείρουν τη δράση οστεοπρογονικών κυττάρων (Millis 1999). Η διαφορά τους από τους άλλους αυξητικούς παράγοντες είναι ότι έχουν επαγωγική και όχι μιτωτική επίδραση. Ασκούν χημειοτακτική δράση στα μεσεγχυματικά κύτταρα, καθώς τα προσελκύουν και κατόπιν βοηθούν στη διαφοροποίησή τους προς οστεοβλάστες ή χονδροβλάστες (Millis 1999, Cannada 2010).

Έχουν αναγνωριστεί είκοσι τύποι (1-20) και επάγουν την οστεογένεση σε καταγματικές αλλά και σε απομακρυσμένες εστίες (Millis 1999, Gautschi *et al* 2007).

Πιθανές κλινικές χρήσεις τους είναι ο συνδυασμός τους με οστικά μοσχεύματα, η επικάλυψη των υλικών οστεοσύνθεσης, καθώς και η ταχύτερη επούλωση και η ενίσχυση των συρραφών οστού με τένοντα ή σύνδεσμο (Martinez and Walker 1999, Denny and Butterworth 2000). Ανασυνδυασμένες μορφές τους, κυρίως των BMP-2, BMP-4 and BMP-7, έχουν την ικανότητα πλήρωσης οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους όταν συνδυαστούν με ικρίωμα (Gautschi *et al.* 2007). Δύο ανασυνδυασμένες μορφές, οι rhBMP-2 και rhBMP-7, έχουν αποδειχθεί οστεοεπαγωγικές σε μελέτες που αφορούσαν σκύλους, ωστόσο η χρήση τους στην κτηνιατρική δεν έχει καθιερωθεί ευρέως (Cook *et al.* 1994, Faria *et al.* 2007). Διερευνάται, ακόμη, ο συνδυασμός τους με οστεοκαθοδηγητικά συνθετικά οστικά υποκατάστατα.

Προσομοιάζοντες με ινσουλίνη αυξητικοί παράγοντες I και II: Οι προσομοιάζοντες με ινσουλίνη αυξητικοί παράγοντες I και II (Insulin-like Growth Factor, IGF-I και IGF-II) ρυθμίζουν τη δράση της αυξητικής ορμόνης και ενισχύουν την αύξηση του σκελετού (Remedios 1999). Η δράση τους μπορεί να είναι αυτοκρινής ή παρακρινής. Διεγείρουν την ενδοχόνδριο οστεοποίηση. Εκκρίνονται από οστεοβλάστες και ενισχύουν τη δραστηριότητά τους, αυξάνοντας την παραγωγή οστεοκαλσίνης. Η οστεοκαλσίνη είναι η περισσότερο άφθονη μη κολλαγονούχος πρωτεΐνη του οργανισμού και αποτελεί δείκτη της οστεοκλαστικής δραστηριότητας. Η κύρια λειτουργία της στο οστό σχετίζεται με την ωρίμανση και ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας του (Martinez and Walker 1999). Ο IGF-I ή σωματομεδίνη C, αποθηκεύεται στη θεμέλια ουσία και συμβάλλει στην έκφραση BMP-2 και BMP-4 και, μέσω αυτών, στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και οστεοβλαστών και στη σύνθεση κολλαγόνου από τους οστεοβλάστες (Martinez and Walker 1999, Yeadon 2016). Κατά τα πρώτα στάδια της οστικής αποκατάστασης εκφράζεται ο IGF-I, ενεργοποιώντας τα επιχώρια μεσεγχυματικά κύτταρα και ύστερα ο IGF-II που σχετίζεται με την ασβεστοποίηση (Millis 1999).

Προσταγλανδίνες: Στην αρχή της φλεγμονώδους φάσης απελευθερώνονται προσταγλανδίνες (Remedios 1999). Οι προσταγλανδίνες E1 και E2 σηματοδοτούν την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες, διεγείρουν τη διαφοροποίησή τους καθώς και τον πολλαπλασιασμό των οστεογόνων κυττάρων (Millis 1999). Έχουν μιτωτική επίδραση στα μονοκύτταρα και διεγείρουν

την αγγειογένεση (Remedios 1999). Συνεισφέρουν επιπλέον στο σχηματισμό περιοστικού πώρου, καθώς αυξημένη σύνθεση προσταγλανδίνης E2 φάνηκε να αυξάνει τη σύνθεση IGF-I από τις οστεοβλάστες και την παραγωγή πώρου (Millis 1999).

Ιντερλευκίνες: Η ιντερλευκίνη 1 (Interleukin-1, IL-1) επηρεάζει την παραγωγή κολλαγενάσης και IL-6 και διεγείρει την προσταγλανδίνη E2, την ανάπτυξη χόνδρινου πώρου και τη νεοαγγειογένεση στην οξεία φάση. Η IL-6 διεγείρει, επίσης, την αγγειογένεση και τη διαφοροποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών (Remedios 1999, Marsell and Einhorn 2012).

2.6. Ρυθμός πώρωσης κατάγματος

Η ταχύτητα πώρωσης ενός κατάγματος εξαρτάται από παράγοντες, όπως το είδος του οστού, το είδος του κατάγματος, η ηλικία του ασθενούς, το είδος της θεραπευτικής αντιμετώπισης και η τυχόν παρουσία συστηματικών νοσημάτων (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016). Αναλυτικότερα, ένα κάταγμα μετάφυσης ή επίφυσης οστού, λόγω της σπογγώδους σύστασης, που εγγυάται μεγαλύτερη αιματική και κυτταρική παροχή, επουλώνεται ταχύτερα από ό,τι ένα κάταγμα διάφυσης. Συμπιεσμένα, μακρά σπειροειδή ή λοξά κατάγματα, όπου τα τεμάχια είναι σε άμεση επαφή, πωρώνονται ταχύτερα από ό,τι τα συντριπτικά, λόγω της αστάθειας και της διακοπής της αγγείωσης στα τελευταία. Αντιθέτως, ένα εγκάρσιο κάταγμα μπορεί να έχει αργή επούλωση λόγω των μεγάλων δυνάμεων που ασκούνται σε μικρή εστία που προκαλούν σχετική αστάθεια. Επίσης, σε περίπτωση μόλυνσης, όπως σε ένα ανοικτό κάταγμα, η πώρωση καθυστερεί. Επιπλέον, η διαταραχή της αιμάτωσης λόγω κακού χειρισμού των γύρω ιστών είναι δυσμενής για τη γρήγορη αποκατάσταση. Στα νεαρά ζώα η πώρωση είναι ταχύτερη από τον ενήλικο οργανισμό. Η αποκατάσταση του οστίτη ιστού επηρεάζεται και από συστηματικά νοσήματα, όπως ο υπερφλοιοεπινεφριδισμός, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή οι διατροφικές ελλείψεις. Επιπλέον, η λήψη φαρμακευτικών ουσιών, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, επηρεάζει τη φλεγμονώδη φάση, και φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς την πώρωση (Cannada 2010). Τέλος, η μέθοδος οστεοσύνθεσης είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ταχύτητα ανάλογα με το είδος της πώρωσης που προάγει.

2.7. Επιβράδυνση ή αποτυχία της πώρωσης κατάγματος

Ο Brinker (1978) όρισε ως χρόνο κλινικής ίασης ενός κατάγματος τη χρονική στιγμή, κατά την οποία η πώρωσή του είναι πλέον επαρκής για την αφαίρεση των υλικών σταθεροποίησης (υλικά οστεοσύνθεσης, νάρθηκας, εκμαγείο) (Brinker 1978). Ο χρόνος αυτός εξαρτάται συνήθως από την ποσότητα και όχι από την ποιότητα του παραγόμενου πώρου. Γενικά, η αφαίρεση των υλικών συνιστάται όταν η εστία του κατάγματος είναι σταθερή κλινικώς και υπάρχει συνέχεια των τριών από τους τέσσερις φλοιούς του οστού, όπως απεικονίζονται σε δύο ακτινογραφήματα με διαφορά 90° μεταξύ τους.

Όταν ο χρόνος κλινικής ίασης ενός κατάγματος έχει υπερβεί αυτόν που θεωρείται φυσιολογικός για το συγκεκριμένο κάταγμα, η κατάσταση ονομάζεται επιβράδυνση της πώρωσης. Η ίαση του κατάγματος μπορεί να ολοκληρωθεί με την πάροδο του χρόνου ή να επέλθει αποτυχία της πώρωσης, κατά την οποία θεωρείται ότι η ίαση του κατάγματος δεν θα ολοκληρωθεί ανεξαρτήτως του χρόνου αναμονής (Remedios 1999, Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016). Οι καταστάσεις αυτές μπορεί να είναι συνέπεια ανεπαρκούς σταθεροποίησης, κακής αιμάτωσης, μεγάλου κενού μεταξύ των καταγματικών άκρων με ή χωρίς διείσδυση μαλακών ιστών, χαλαρωμένων υλικών οστεοσύνθεσης ή νεκρωμένων τεμαχίων οστού, μόλυνσης και συστηματικής, τοπικής ή ιδιοπαθούς νόσου (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016). Η κακή σταθεροποίηση αυξάνει τη διακαταγματική τάση, ενώ δεν ευνοεί τη νεοαγγειογένεση. Ταυτόχρονα, η καταστροφή των μαλακών ιστών μειώνει την αιματική παροχή, τον αριθμό, την επαγωγή και την ικανότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και τα ηλεκτρικά δυναμικά, ωθώντας το οστό σε νέκρωση (Remedios 1999, Rovesti 2005). Επιβράδυνση ή αποτυχία πώρωσης παρατηρούνται σε κατάγματα του περιφερικού αντιβραχίου σε μικρόσωμους σκύλους και γάτες και αυτό οφείλεται στη μειωμένη αιμάτωση του συζευκτικού χόνδρου μετάφυσης-διάφυσης στα ζώα αυτά (Welch *et al.* 1997).

Η διάγνωση τίθεται και για τις δύο περιπτώσεις κλινικά και ακτινολογικά (Rovesti 2005). Χωλότητα, μυϊκή ατροφία, πόνος και αστάθεια στην καταγματική εστία καταδεικνύουν παθολογική κατάσταση στη διαδικασία της πώρωσης. Συστήνεται τακτικός ακτινολογικός επανέλεγχος, καθώς απεικονίζει το ρυθμό της επούλωσης. Η ποσότητα του πώρου, η ύπαρξη ή η απουσία γεφύρωσης και η παρουσία κενού στην καταγματική εστία, η χαλάρωση των υλικών και πιθανά η παρουσία απολύματος αποτελούν ευρήματα που δηλώνουν επιβράδυνση ή και αποτυχία πώρωσης. Επιπλέον, η υπερηχοτομογραφική απεικόνιση Doppler παρέχει πληροφορίες για την αιματική κυκλοφορία στην καταγματική εστία (Rovesti 2005).

Όσον αφορά στη θεραπεία στην περίπτωση επιβράδυνσης της πώρωσης πρέπει να αποφασιστεί αν θα δοθεί περισσότερος χρόνος ή αν θα αντιμετωπιστεί άμεσα χειρουργικά. Συγκεκριμένα, εάν στην εστία του κατάγματος διαπιστώνεται κλινικώς σταθερότητα, δίνεται περισσότερος χρόνος για την πώρωση. Αντίθετα, αν διαπιστωθεί αστάθεια, η αναθεώρηση της τεχνικής κρίνεται σκόπιμη (Denny and Butterworth 2000). Στα περιστατικά με αποτυχία πώρωσης, πρέπει να αναγνωριστεί η αιτία και να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία. Στην περίπτωση αστάθειας ή εμποδίου μεταξύ των καταγματικών άκρων συστήνεται αφαίρεση του εμποδίου και των νεκρωμένων ιστών, αναθεώρηση της οστεοσύνθεσης με πιο συμπιεστικές τεχνικές, διάγνωση και αντιμετώπιση τυχόν οστεομυελίτιδας και προσθήκη σπογγώδους αυτομοσχεύματος. Αν οφείλεται σε τοπική ισχαιμία, κατά την αναθεώρηση της τεχνικής πρέπει να αποφευχθεί η περαιτέρω κάκωση των μαλακών ιστών, ενώ στην περίπτωση συστηματικού νοσήματος που δυσχεραίνει την οστική αποκατάσταση πρέπει να αντιμετωπιστεί πρώτα αυτό

και δευτερευόντως το κατάγμα (Denny and Butterworth 2000). Εάν ο πώρος, που έχει δημιουργηθεί, δεν επηρεάζει την ευθυγράμμιση του άκρου, πρέπει να μη διαταραχτεί παρά στο ελάχιστο εφικτό. Αντιθέτως, ο σκληρός ουλώδης ιστός αφαιρείται έως το όριο του υγιούς οστού και η μυελική κοιλότητα πρέπει να διανοιχθεί, ώστε να ενισχυθεί η ενδομυελική κυκλοφορία και η οστεογένεση (DeCamp *et al.* 2016). Σε κάθε περίπτωση η προσπέλαση γίνεται από το σημείο της προηγούμενης επέμβασης για νεαροποίηση των ιστών και προκειμένου να αποφευχθεί επιπλέον κάκωση των μαλακών ιστών (Rovesti 2005).

2.8. Μέθοδοι αξιολόγησης της πώρωσης κατάγματος

Η δυνατότητα εκτίμησης της πώρωσης ενός κατάγματος σε πρώιμο στάδιο είναι ζωτικής σημασίας, τόσο για την πρόγνωση της εξέλιξης της οστικής επούλωσης όσο και για την αναγνώριση πιθανών επιπλοκών και την έγκαιρη αλλαγή θεραπευτικής στρατηγικής (Su *et al.* 2013, Hammond 2016). Ο χρόνος που απαιτείται για την πώρωση ενός κατάγματος ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών οστών, χάρη, μεταξύ άλλων, στην ετερογένεια της μυϊκής κάλυψης και αιμάτωσης, καθώς και των διαφορετικών τύπων καταγμάτων και μεθόδων σταθεροποίησης (DeCamp *et al.* 2016, Fisher *et al.* 2019), καθιστώντας έτσι δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου που απαιτείται για την πλήρη ίαση. Μεγάλο εύρος απεικονιστικών τεχνικών μπορεί να επιστρατευθεί για την αξιολόγηση της πώρωσης, με κύριους εκπροσώπους την ακτινολογική εξέταση, την υπερηχοτομογραφία, την αξονική και τη μαγνητική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα οστών, χωρίς κάποια από αυτές να θεωρείται ο χρυσός κανόνας (Hammond 2016, Fisher *et al.* 2019).

2.8.1. Ακτινολογική εξέταση

Ο ακτινολογικός έλεγχος αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκτίμησης της πώρωσης καταγμάτων, χάρη στην ευρέως διαδεδομένη και εύκολη χρήση του, καθώς και στην εξαιρετική απεικόνιση των οστέινων δομών. Οι πιο συχνές ακτινολογικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για να ορίσουν την πώρωση είναι η γεφύρωση της καταγματικής εστίας με ώριμο οστό ή πώρο, η γεφύρωση σε τουλάχιστον τρεις ακτινολογικούς φλοιούς και η εξάλειψη της καταγματικής γραμμής (Dijkman *et al.* 2010). Στην κτηνιατρική ορθοπαιδική η ακτινογραφία ήταν το πρώτο μέσο που χρησιμοποιήθηκε για αξιολόγηση της πώρωσης καταγμάτων (Braden and Brinker 1976). Είναι το πρωταρχικό μέσο εκτίμησης της οστικής αποκατάστασης, όπως απέδειξε και συστηματική μελέτη του 2008, όπου σε σύνολο 122 μελετών απεικόνισης της πώρωσης, στο 98% αυτών χρησιμοποιήθηκαν ακτινογραφήματα, ενώ μόλις στο 1% η αξιολόγηση έγινε με αξονική τομογραφία ή με χρήση υπερήχου, χωρίς, ωστόσο, να έχουν θεσπιστεί αντικειμενικοί και αξιόπιστοι ακτινολογικοί δείκτες (Corrales *et al.* 2008). Επικρατεί δε η άποψη ότι οι ακτινογραφίες ως αποκλειστικό μέσο εκτίμησης της πώρωσης είναι επισφαλείς, καθώς δε συσχετίζεται απόλυτα η ακτινολογική πώρωση με τη μηχανική σταθερότητα του κατάγματος και, συνεπώς, απαιτείται και συσχέτιση τουλάχιστον με την

κλινική εικόνα του ασθενούς (McClelland *et al.* 2007, Dijkman *et al.* 2010). Επιπλέον, η απεικόνιση του αρθρικού χόνδρου και των μαλακών ιστών πέριξ της καταγματικής εστίας, όπως και του χόνδρινου (προ ασβεστοποιήσεως) πώρου, είναι εξαιρετικά περιορισμένη (Hammond 2016).

2.8.2. Αξονική τομογραφία

Η αξονική τομογραφία, διαθέσιμη κυρίως σε μεγάλες κτηνιατρικές κλινικές, αποτελεί εξαιρετική εναλλακτική απεικονιστική διαγνωστική τεχνική, χάρη στην υψηλή ανάλυση (τάξης του 1 mm), στην έλλειψη συμπίεσης και στην παροχή υψηλής ανάλυσης πολυεπίπεδων τομών (Alstrup and Winterdahl 2009, Hammond 2016, Fisher *et al.* 2019). Χρησιμοποιείται κυρίως για κατάγματα κρανίου, σπονδυλικής στήλης και πυέλου, όπως επίσης για ενδοαρθρικά κατάγματα σε καρπό και ταρσό, και μπορεί να αναπαράγει τρισδιάστατα μοντέλα για βέλτιστο σχεδιασμό της θεραπευτικής στρατηγικής (Hammond 2016). Μελέτες σε κατοικίδια ζώα έχουν αποδείξει θετική συσχέτιση των ευρημάτων της αξονικής τομογραφίας με τον όγκο, την οστική πυκνότητα και την αντοχή του παραγόμενου πώρου ήδη από τα αρχικά στάδια της πώρωσης (Markel *et al.* 1991, Sigurdson *et al.* 2011). Επιπλέον, συγκριτική μελέτη μεταξύ αξονικής τομογραφίας και ακτινογραφίας σε κλειστά κατάγματα άκρων απέδειξε αμεσότερη απεικόνιση του πώρου με την πρώτη τεχνική (Grigoryan *et al.* 2003). Ωστόσο, πρόκειται για μέθοδο με υψηλό κόστος και αυξημένη έκθεση σε ακτινοβολία, οπότε η χρήση της είναι σπάνια και επιστρατεύεται κυρίως σε περιστατικά όπου τα ευρήματα των ακτινογραφιών είναι αμφιλεγόμενα (Fisher *et al.* 2019).

2.8.3. Υπερηχοτομογραφική εξέταση

2.8.3.1. Ασπρόμαυρη απεικόνιση (B-mode)

Μελέτες σε κλινικά περιστατικά στην ιατρική του ανθρώπου και στην κτηνιατρική έχουν διαπιστώσει ότι η ακτινογραφία και η αξονική τομογραφία αποκαλύπτουν την πώρωση ενός κατάγματος μόνο κατόπιν ασβεστοποίησης, υστερώντας σε δυνατότητα εκτίμησης του μαλακού χόνδρινου πώρου, και προτείνουν την υπερηχοτομογραφία ως μια πιο ευαίσθητη και ακριβής τεχνική για την ανίχνευση των πρώιμων ευρημάτων πώρωσης και της εξέλιξης της γεφύρωσης έως το σχηματισμό του πώρου (Maffulli and Thornton 1995, Risselada *et al.* 2005, 2007, 2018). Επιπλέον, και οι δύο προαναφερθείσες τεχνικές εκθέτουν τον ασθενή σε ακτινοβολία, ενώ ο υπέρηχος είναι μια ασφαλής, μη επεμβατική και οικονομικά προσιτή για τον ασθενή απεικονιστική τεχνική. Η χρήση της υπερηχοτομογραφίας για τη διάγνωση καταγμάτων αναφέρεται πρώτη φορά το 1990 για την εκτίμηση καταγμάτων των πλευρών σε παιδιά (Smeets *et al.* 1990) και, ακολούθως, σε άλλες μελέτες (Rathfelder and Paar 1995), που την ανάγουν σε ένα αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο στην ορθοπαιδική, το οποίο ελαχιστοποιεί την έκθεση των αναπτυσσόμενων οργανισμών σε περιττή ακτινοβολία. Με βάση την υπερηχοτομογραφική αξιολόγηση, η οστική πώρωση θεωρείται ότι έχει επέλθει όταν υπερηχογενές υλικό πληρώνει την καταγματική εστία, εμποδίζοντας την απεικόνιση ενδομυελικού ήλου τοποθετημένου σε κατάγματα κνήμης και μάλιστα νωρίτερα από την ακτινολογική επιβεβαίωση της πώρωσης (Moed *et al.* 1995, 1998). Στην κτηνιατρική, έχει θεσπιστεί ειδική κλίμακα B-mode απεικόνισης

για την εκτίμηση της οστικής αποκατάστασης στον σκύλο και τη γάτα που περιγράφει πέντε διαφορετικά στάδια ανάλογα με την ηχογένεια του πώρου (από το ανηχογενές αιμάτωμα (Στάδιο 1) έως και την απεικόνιση υπερηχογενούς γραμμής του φλοιού που δημιουργεί ακουστική σκιά (Στάδιο 5) σε συνδυασμό με το κατά πόσο απεικονίζονται τα ενδομυελικά εμφυτεύματα ή όχι (Risselada *et al.* 2005).

2.8.3.2 Απεικόνιση με χρήση Color Doppler

Η χρήση Color Doppler για την εκτίμηση της πώρωσης καταγμάτων στηρίζεται στην παραδοχή ότι, στα πρώτα στάδια της πώρωσης, αναπτύσσεται στην καταγματική εστία ένα ευρύ δίκτυο τριχοειδών αγγείων για τη μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών ουσιών, χημικών μεταβιβαστών και μεσεγχυματικών κυττάρων (Remedios 1999, Griffon 2005, Marsell and Einhorn, 2012. Μελέτες προτείνουν την τεχνική αυτή ως ένα σημαντικό εργαλείο άμεσης πρόβλεψης της επιτυχίας ή αποτυχίας της πώρωσης, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αγγειογένεση στην καταγματική εστία, όπως είναι οι μεταβολές στον αριθμό και τη διάμετρο των αγγείων και στην ένταση των φωτεινών ενδείξεων. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση με κορύφωση τις πρώτες 20 ημέρες μετά τον τραυματισμό και, στη συνέχεια, μείωση της αγγείωσης στη διάρκεια της πώρωσης. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφεται ανάπτυξη και αύξηση της αγγείωσης στην αρχική φάση της πώρωσης μεταξύ της 10^{ης} και της 20^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας και σταδιακή μείωση από την 3^η-4^η εβδομάδα έως περίπου την 60^η ημέρα, που εξαλείφεται πλήρως, εάν έχει επέλθει επιτυχημένα ασβεστοποίηση (Caruso *et al.* 2000, Risselada *et al.* 2006, Pozzi *et al.* 2012, Su *et al.* 2013, Wawrzyk *et al.* 2015). Όταν η τεχνική Color Doppler καταγράφει ήπιες ενδείξεις αγγείωσης, υποδεικνύει δημιουργία χόνδρινου πώρου και εάν αυτές παραμένουν ορατές για μεγάλο χρονικό διάστημα, συνεπάγεται επιβράδυνση ή αποτυχία πώρωσης, καθώς δεν εξελίσσεται στο στάδιο της ασβεστοποίησης (Su *et al.* 2013). Η εκτίμηση της αγγείωσης στην καταγματική εστία με χρήση Color Doppler ως δείκτη πώρωσης έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστη και αντικειμενική μέθοδος κατόπιν σύγκρισής της με την αξονική αγγειογραφία (Jerome and Venkatachalam 2020). Υπερτερεί, δε, της ασπρόμαυρης υπερηχοτομογραφίας, που δίνει τη δυνατότητα για ανίχνευση του μαλακού χόνδρινου πώρου μετά τις τρεις εβδομάδες, και των ακτινογραφιών, που απαιτούν τριάντα με σαράντα ημέρες έως την ασβεστοποίηση του πώρου (Caruso *et al.* 2000, Rawool *et al.* 2003, Risselada *et al.* 2006, Pozzi *et al.* 2012).

Η απεικόνιση με παλμικό Doppler ροής (Pulsed-wave Doppler) χρησιμοποιείται στην ιατρική του ανθρώπου για την διάγνωση αγγειακών παθήσεων και δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη ή απουσία ροής αίματος, την κατεύθυνση και το προφίλ της ροής (Hussain 1997, Mahé *et al.* 2017). Κατά τη ροή του αίματος μέσα σε ένα αγγείο αναπτύσσονται φαινόμενα τριβής των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τα τοιχώματα του αγγείου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ροή κοντά στα τοιχώματα. Σε αρτηρίες που τροφοδοτούν δίκτυα υψηλής περιφερικής αντίστασης, όπως είναι οι αρτηρίες στο περιφερικό τμήμα των άκρων (Dhanoo *et al.* 2016, Gupta *et al.* 2019),

παρατηρείται ταυτόχρονη κίνηση του αίματος και προς τις δύο κατευθύνσεις και η ροή απεικονίζεται τριφασική (Γιαννούκας και Λαμπρόπουλος 2013). Από τους δείκτες που χαρακτηρίζουν την κυματομορφή της ροής μιας αρτηρίας στον άνθρωπο σχετικά με την πώρωση καταγμάτων έχει μελετηθεί ο δείκτης αντίστασης (Resistance Index, RI). Πρώτος ο Bottinelli και οι συνεργάτες του (1996) χρησιμοποίησαν την έγχρωμη υπερηχοτομογραφία (Color Doppler και Pulsed-wave Doppler) για την εκτίμηση της ποιοτικής παρουσίας αγγείων και κατέγραψαν το RI στη διάρκεια της πώρωσης καταγμάτων (Bottinelli *et al.* 1996). Καθώς το RI αποτελεί δείκτη της αντίστασης της ροής του αίματος, συμπεραίνεται ότι όσο χαμηλότερος είναι, τόσο περισσότερο αίμα παρέχεται περιφερικά στο νεοσχηματιζόμενο πόρο και, συνεπώς, ποιοτικά καταγράφονται περισσότερες ενδείξεις αγγείων στην καταγματική εστία, ενώ τελικά αυξάνεται κατά την ολοκλήρωση της πώρωσης (Su *et al.* 2013, Wawrzyk *et al.* 2015).

2.8.4. Μαγνητική τομογραφία

Η χρήση της περιορίζεται σε μεγάλες κλινικές ζώνες και αφορά κυρίως σε κατάγματα σπονδυλικής στήλης (Hammond 2016).

2.8.5. Σπινθηρογράφημα οστών

Ως τεχνική χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στον εντοπισμό αυξημένης δραστηριότητας, όπως στην πώρωση καταγμάτων, ωστόσο σχετίζεται με αυξημένη έκθεση σε ακτινοβολία και έχει εφαρμογή κυρίως στην έγκαιρη διάγνωση καταγμάτων χωρίς παρεκτόπιση σε άλογα ιπποδρόμου (Hammond 2016).

3. ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ

Στόχος της θεραπευτικής αντιμετώπισης ενός κατάγματος είναι η επιτυχής και λειτουργική πώρωση. Ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι το επιθυμητό, υπάρχουν περιστατικά όπου τα μοσχεύματα οστού ή τα οστικά υποκατάστατα είναι απαραίτητα για την ενίσχυση της επουλωτικής διαδικασίας. Για να είναι επιτυχής η χρήση οστεομοσχεύματος απαιτείται ένα περιβάλλον που συνδυάζει ιδανικά βιολογικά στοιχεία και μηχανική σταθερότητα (DeCamp *et al.* 2016). Για χρόνια, το οστικό μόσχευμα αφορούσε σε σπογγώδη και φλοιώδη αυτομοσχεύματα ή αλλομοσχεύματα, αλλά πλέον υπάρχουν και τα οστικά υποκατάστατα με ή χωρίς την προσθήκη αυξητικών παραγόντων ή οστεοπρογονικών κυττάρων (DeCamp *et al.* 2016).

3.1. Ενδείξεις χρήσης των οστικών μοσχευμάτων

Η χρήση οστεομοσχεύματος συστήνεται στις εξής περιπτώσεις:

1) για την ενίσχυση της επουλωτικής διαδικασίας σε οστεοσύνθεση καταγμάτων με μικρό προσδόκιμο πώρωσης, καθώς και σε συντριπτικά και ανοικτά κατάγματα, προάγοντας την

αιμάτωση, παρέχοντας συνέχεια ανάμεσα στα οστικά τεμάχια και ενεργοποιώντας τη δημιουργία πώρου

2) σε περιστατικά με επιβράδυνση ή αποτυχία πώρωσης,

3) σε περιστατικά αρθρόδεσης και σπονδυλοδεσίας, διεγείροντας το σχηματισμό πώρου γεφύρωσης,

4) για αντικατάσταση φλοιικών τεμαχίων, που απολέσθηκαν λόγω καταγμάτων ή αφαιρέθηκαν λόγω νεοπλάσματος,

5) στην πλήρωση οστικών κοιλοτήτων λόγω οστεομυελίτιδας, νεοπλασίας ή αφαίρεσης κύστεων και

6) σε διορθωτικές οστεοτομές, όπως στην προώθηση του κνημιαίου κυρτώματος (TTA) για την αντιμετώπιση της ρήξης του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου (Ragetyly and Griffon 2010, Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016, James *et al.* 2017).

3.2. Ιστορικά στοιχεία

Το μόσχευμα οστού εισήχθη στη χειρουργική πρακτική στα τέλη του 17^{ου} αιώνα. Στο σύγγραμμα του Albee (*Bone-Graft Surgery*, 1915) καταγράφονται οι πρώτες προσπάθειες, οι κανόνες τοποθέτησης και οι εφαρμογές των οστικών μοσχευμάτων. Πειραματικά η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση οστίτη ιστού πραγματοποιήθηκε από τον Merrem το 1809 σε οστικά ελλείμματα κρανίων ζώων, ενώ ακολούθησε ο Walther το 1820 που την εφάρμοσε στον άνθρωπο και διαπίστωσε μερική πώρωση παρά την ανάπτυξη μόλυνσης. Το 1858 ο Ollier, κατόπιν πειραματισμών σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, κατέληξε στη διαπίστωση ότι ο φρέσκος οστίτης ιστός με περίοστεο διατηρείται ζωντανός και ότι τα αυτογενή μοσχεύματα είναι τα περισσότερο ασφαλή. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η πρωτογενής πώρωση με χρήση αυτόλογου μοσχεύματος πραγματοποιείται τόσο απουσία όσο και παρουσία μόλυνσης. Ο συγγραφέας κατέληξε στο ότι το ιδανικό μόσχευμα είναι το αυτόλογο οστό με όλα τα στοιχεία του, δηλαδή το περίοστεο, τον φλοιό, το ενδόστεο και τον μυελό (Albee 1915). Το διατηρημένο μόσχευμα, είτε κατεψυγμένο είτε ακτινοβολημένο, άρχισε να χρησιμοποιείται στα τέλη του 1940. Έως το 2002 καταγράφηκαν ετησίως 500.000 με 600.000 μεταμοσχεύσεις οστού στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής από τις οποίες οι μισές αφορούσαν σε σπονδυλοδεσίες και οι υπόλοιπες σε διάφορες ορθοπαιδικές παθήσεις (Bucholz 2002). Το 10% αυτών αφορούσε σε οστικά υποκατάστατα.

3.3. Ενσωμάτωση των οστικών μοσχευμάτων

Η διαδικασία ενσωμάτωσης ενός μοσχεύματος αναφέρεται στις βιολογικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο αυτό και τον δέκτη ιστό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οστού με επαρκείς μηχανικές ιδιότητες, χωρίς το σχηματισμό ουλώδους ιστού ανάμεσά τους (Wang and Yeung 2017). Κάθε φορά που ένα μόσχευμα εμφυτεύεται χειρουργικά, υπάρχει μια στερεότυπη ακολουθία γεγονότων στην περιοχή: σχηματισμός αιματώματος και φλεγμονή, χημειοταξία, διαφοροποίηση

κυττάρων και επαναγγείωση, που οδηγούν στο σχηματισμό νέου οστού και γεφύρωση ανάμεσα σε δέκτη και μόσχευμα (Bauer and Muschler 2000).

Την αρχική τοποθέτηση ενός μοσχεύματος στον δέκτη ιστό, ακολουθεί η δημιουργία αιματώματος. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στις τραυματικές επιφάνειες και αποκοκκιώνονται, απελευθερώνοντας μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων (FGF-2, TGF- β , PDGF) στο ινώδες δίκτυο που σχηματίζεται γύρω από το μόσχευμα, από αίμα και εξωκυττάριο υγρό. Ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα μεταναστεύουν στο οργανοποιημένο αιμάτωμα. Τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν κινίνες και προσταγλανδίνες, οι οποίες προάγουν την αγγειογένεση. Ο ιστός που σχηματίζεται είναι πλούσιος σε κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεογενετικά κύτταρα. Οι ινοβλάστες παράγουν κολλαγόνο και τα διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά κύτταρα και οι οστεοβλάστες, που επιβίωσαν της μεταφοράς του μοσχεύματος, παράγουν οστεοειδές. Τα αγγεία εισδύουν στο μόσχευμα μέσω των σωλήνων του Havers και του Volkmann. Στις επιφάνειες του μοσχεύματος παρατηρείται εστιακή οστεοκλαστική απορρόφηση και κατόπιν μετατροπή του οστεοειδούς σε νέο οστό με υμενοστέωση ή ενδοχόνδριο οστέωση. Τελικά, το νέο οστό υφίσταται τη διαδικασία της ανακατασκευής, ανάλογα με τη μηχανική φόρτιση που δέχεται, όπως ορίζει ο νόμος του Wolff (Bauer and Muschler 2000). Το αγγειούμενο αυτομόσχευμα ενσωματώνεται ταχύτερα από τα υπόλοιπα, καθώς δεν υφίσταται ισχαιμική νέκρωση ούτε ανοσολογική αντίδραση και το 90% των οστεοκυττάρων επιβιώνει της μεταφοράς (Martinez and Walker 1999). Στα σπογγώδη αυτομοσχεύματα τα κύτταρα που επιβιώνουν και προάγουν την οστεογένεση είναι τα άφθονα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών και οι πρόδρομες μορφές ενδοθηλιακών κυττάρων (Bauer and Muschler 2000, Wang and Yeung 2017). Το 15% των οστεοβλαστών και οστεοκυττάρων του φρέσκου σπογγώδους αυτομοσχεύματος επιβιώνει και είναι ικανό να παράγει νέο οστό (Cannada 2010).

Ως επιτυχής ενσωμάτωση του μοσχεύματος ορίζεται η εκδήλωση της ικανότητας του μεταμοσχευμένου ιστού να λειτουργήσει το ίδιο καλά με τον αρχικό, δηλαδή να εξασφαλίσει τη μηχανική ακεραιότητα και λειτουργία του, κάτι που εξαρτάται όχι μόνο από τη βιολογία του μεταμοσχευμένου ιστού, αλλά και από τη χειρουργική τεχνική, τη σταθερότητα, τη μετεγχειρητική αποκατάσταση και τη γενική κατάσταση του ασθενούς, όπως η ηλικία και τα ενδεχόμενα μεταβολικά νοσήματα. Το μηχανικό περιβάλλον και η σταθερότητα του μοσχεύματος ή συνθετικού εμφυτεύματος μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό οστού μέσα σε αυτά. Για να εμφανιστεί διείδυση του γύρω ιστού, τα εμφυτεύματα πρέπει να σταθεροποιηθούν απόλυτα και να έλθουν σε στενή επαφή με το οστό του ξενιστή. Πολύ μικρές κινήσεις ή αστάθεια αποτρέπουν την οστική ενσωμάτωση του εμφυτεύματος και οδηγούν στο σχηματισμό ινώδους ιστού παρά τη βιοδραστικότητα του υλικού (Cornell 1999, Autefage and Dejardin 2010). Ο όγκος και το μέγεθος του μοσχεύματος, η αιμάτωση στο σημείο τοποθέτησης, καθώς και η παροχή πρόδρομων μορφών κυττάρων (ενδοθηλιακών και συνδετικού ιστού) είναι σημαντικές, καθώς η

έλλειψή τους θα έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση των ιδιοτήτων του μοσχεύματος. Σημεία εκτεταμένου ουλώδους ιστού ή μειωμένης αγγείωσης, μεγάλα οστικά ελλείμματα, προηγούμενη μόλυνση της δέκτριας περιοχής, ανοσοκαταστολή ή ακτινοβολία και ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες προκαλούν μείωση της παροχής μεσεγχυματικών κυττάρων (Bauer and Muschler 2000).

3.4. Ιδιότητες των οστικών μοσχευμάτων

Τα αναγκαία στοιχεία για την επιτυχή πώρωση ενός κατάγματος είναι τα οστεογενετικά κύτταρα, ένα οστεοκαθηγητικό μέσο, ένα οστεοεπαγωγικό ερέθισμα, η μηχανική σταθερότητα και η επαρκής αιματική ροή. Έτσι, τα οστικά μοσχεύματα πρέπει να διαθέτουν τρεις ιδιότητες για να έχουν αποτελεσματική δράση: οστεογένεση, οστεοεπαγωγή και οστεοκαθοδήγηση (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016).

3.4.1. Οστεογένεση

Οστεογένεση είναι η ικανότητα σχηματισμού νέου οστού από ζωντανά κύτταρα του μοσχεύματος. Αφορά μεσεγχυματικά και πρόδρομα κύτταρα ικανά να μετατραπούν σε προ-οστεοβλάστες, έπειτα σε οστεοβλάστες και κατόπιν σε οστεοκύτταρα και να συνθέσουν νέο οστό (Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016). Η οστεογένεση ξεκινάει περίπου πέντε ημέρες μετά την εμφύτευση και μεγιστοποιείται στις οκτώ εβδομάδες. Η διεργασία αυτή παρατηρείται κυρίως στα φρέσκα σπογγώδη μοσχεύματα, επειδή αγγειώνονται ταχύτερα και περιέχουν το μεγαλύτερο αριθμό αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων από τα υπόλοιπα είδη μοσχευμάτων (Martinez and Walker 1999).

3.4.2. Οστεοεπαγωγή

Οστεοεπαγωγή είναι η προσέλκυση μεσεγχυματικών ή πολυδύναμων οστεοπρογονικών κυττάρων του λήπτη οργανισμού στην περιοχή τοποθέτησης του μοσχεύματος, ώστε να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα (Martinez and Walker 1999, Millis 1999). Οι αυξητικοί παράγοντες και ειδικότερα οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή (Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016). Τόσο το σπογγώδες όσο και το φλοιώδες μόσχευμα περιέχουν BMPs, αλλά το σπογγώδες διαθέτει μεγαλύτερη αναλογία σε πρωτεΐνες θεμέλιας ουσίας χάρη στη δοκιδωτή αρχιτεκτονική δομή του (Martinez and Walker 1999).

3.4.3. Οστεοκαθοδήγηση

Κατά την οστεοκαθοδήγηση το μόσχευμα λειτουργεί ως ικρίωμα για την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστικών κυττάρων, το σχηματισμό νέων αγγείων και, τελικά, νέου οστού. Αφορά στην τρισδιάστατη διεργασία ανάπτυξης νέων αγγείων, περιαγγειακού ιστού, ινώδους, χόνδρινου και τελικά οστίτη ιστού και οστεογενετικών κυττάρων επάνω και γύρω από το μόσχευμα (Cornell 1999, Martinez and Walker 1999). Το νεοσχηματισθέν οστό περνάει από

διάφορα στάδια οστεοκλαστικής απορρόφησης και αναδιαμόρφωσης (Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016).

Τα μοσχεύματα που χρησιμοποιούνται στην ορθοπαιδική διαθέτουν μία ή περισσότερες από αυτές τις ιδιότητες σε ποικίλο βαθμό.

3.5. Ταξινόμηση των οστικών μοσχευμάτων

3.5.1. Ταξινόμηση ανάλογα με το είδος του οστού προέλευσης

Τα οστεομοσχεύματα χρησιμοποιούνται συχνά στην ορθοπαιδική των μικρών ζώων και ταξινομούνται σύμφωνα με το είδος του οστού σε φλοιώδη, σπογγώδη και φλοιοσπογγώδη ή μεικτά.

3.5.1.1. Σπογγώδες οστεομόσχευμα

Τα σπογγώδη οστεομοσχεύματα προέρχονται κυρίως από τις μεταφύσεις των οστών και χρησιμοποιούνται νωπά. Επειδή το σπογγώδες οστό είναι αρκετά πορώδες, αγγεία του λήπτη, οστεοβλάστες και μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διηθήσουν το μόσχευμα από την περιφέρειά του προς το κέντρο μέσα στις πέντε πρώτες ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση. Η αγγείωση αυξάνεται στο επόμενο δεκαήμερο και ολοκληρώνεται περίπου στις είκοσι ημέρες. Η περίοδος της οστεοκαθοδήγησης και της πρώιμης αναδιαμόρφωσης μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες στα σπογγώδη αυτομοσχεύματα. Η ένταξη του μοσχεύματος σε μια μηχανικά άριστη υποστηρικτική δομή έχει δρομολογηθεί πλήρως μέσα σε έξι μήνες και έχει συνήθως ολοκληρωθεί μέσα στο πρώτο έτος μετεγχειρητικά (Martinez and Walker 1999).

3.5.1.2. Φλοιώδες οστεομόσχευμα

Τα φλοιώδη οστικά μοσχεύματα στον άνθρωπο χρησιμοποιούνται συνήθως κατεψυγμένα ή κατεψυγμένα-αποξηραμένα (ωλένη). Κυλινδρικό φλοιώδες μόσχευμα ολικού πάχους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γεφυρώσει μεγάλα οστικά ελλείμματα με τη βοήθεια μεταλλικής πλάκας συμπίεσης, προσφέροντας οστεοκαθοδηγητική δράση. Το φλοιώδες μόσχευμα στην αρχή υφίσταται μια φάση απορρόφησης και η αγγείωσή του αρχίζει ένα με δύο μήνες μετά την τοποθέτησή του (Martinez and Walker 1999). Συνεπώς, συστήνεται η προσθήκη σπογγώδους οστού στα άκρα του για να επιταχύνει την αιμάτωση και την ενσωμάτωσή του (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016).

3.5.1.3. Φλοιοσπογγώδες οστεομόσχευμα

Τα μεικτά μοσχεύματα λαμβάνονται κυρίως από τη λαγόνια ακρολοφία ή τις πλευρές και όσον αφορά στη διατήρησή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νωπά ή συντηρημένα. Το μόσχευμα από το λαγόνιο μπορεί να είναι μονοφλοιικό ή ολικού πάχους. Πριν από την τοποθέτησή του τέμνεται σε μικρά οστικά τεμάχια διαμέτρου 2-5 mm για να αυξηθεί ο όγκος του (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016).

3.5.2. Ταξινόμηση ανάλογα με την αγγείωση

Ανάλογα με τη διατήρηση της αγγείωσής του, ένα μόσχευμα χαρακτηρίζεται ως αγγειούμενο, όταν κατά τη λήψη από τη δότρια χώρα διατηρεί την αγγείωσή του και αναστομώνεται στα αγγεία του δέκτη ιστού, και ως μη αγγειούμενο ή ελεύθερο, όταν μεταφέρεται χωρίς τα αγγεία του και η επαναιμάτωσή του γίνεται από τα κύτταρα του τελευταίου. Στα αγγειούμενα μοσχεύματα εντάσσονται η περιφερική ωλένη όταν μεταφέρεται με την οπίσθια μεσόστεη αρτηρία και φλέβα, η περόνη και ο έσω πλάγιος φλοιός της κνήμης που μεταφέρονται με την περιостική πρόσφυση της έσω σαφηνούς και οι κοκκυγικοί σπόνδυλοι (Bebchuk *et al.* 2000, Séguin *et al.* 2003). Το πλεονέκτημα των αγγειούμενων μοσχευμάτων είναι η διατήρηση της αιματικής παροχής και η άμεση ενσωμάτωσή τους εντός είκοσι εβδομάδων, οπότε παρατηρείται ορατή γεφύρωση. Αντίθετα, το μη αγγειούμενο μόσχευμα απαιτεί τουλάχιστον ένα έτος έως την πλήρη ενσωμάτωση και μπορεί να λειτουργήσει ως εστία μόλυνσης (Arthurs 2016).

3.5.3. Ταξινόμηση ανάλογα με την προέλευση

3.5.3.1. Αυτογενή ή αυτομοσχεύματα

Ο οστίτης ιστός προέρχεται και τοποθετείται στον ίδιο οργανισμό. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ο μυελός των οστών, το σπογγώδες οστεομόσχευμα, το αγγειούμενο και μη φλοιώδες οστό ή μείγμα αυτών όταν προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό (Bauer and Muschler 2000, Arthurs 2016). Είναι απόλυτα ιστοσυμβατά και η χρήση τους δεν εμπεριέχει τον κίνδυνο μετάδοσης νοσημάτων (Martinez and Walker 1999). Όταν τοποθετηθούν στην εστία του δέκτη είναι άμεσα οστεογενετικά, καθώς περιέχουν οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, οστεοεπαγωγικά, αφού περιέχουν FGF-2, TGF- β , PDGF, BMPs και VEGF και οστεοκαθοδηγητικά, εφόσον περιέχουν υδροξυαπατίτη και κολλαγόνο (Arthurs 2016). Παρόλο που μια μικρή μόνο μερίδα των κυττάρων επιβιώνει, συμβάλλουν καθοριστικά στην πώρωση (Bauer and Muschler 2000). Έχουν τη μέγιστη οστεογενετική δράση και διεγείρουν την αμεσότερη αντίδραση, ωστόσο αυξάνεται ο εγχειρητικός χρόνος, η έκταση του χειρουργικού τραύματος και ο πόνος στον ασθενή, ενώ η ποιότητα και ποσότητά τους ίσως να είναι ανεπαρκής (Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016).

Για περισσότερα από 100 χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί ο μυελός των οστών για την ενίσχυση της οστικής αποκατάστασης. Πρώτος ο Goujon το 1869 διαπίστωσε την οστεογενετική ικανότητά του σε κουνέλια (Goujon E. 1869). Ο Friedenstone με τους συνεργάτες του έδειξαν ότι, κατόπιν μεταμόσχευσης μυελού των οστών, ινοβλάστες και μεσεγχυματικά κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και παρήγαγαν οστό (Friedenstone *et al.* 1968). Το 1980 οι Lindholm και Urist ήταν οι πρώτοι που, προσθέτοντας μυελό των οστών σε αφαλατωμένη οστική θεμέλια ουσία, διαπίστωσαν αύξηση στην ποσότητα οστικής παραγωγής (Lindholm and Urist 1980). Ο μυελός των οστών αποτελεί πηγή οστεοπρογονικών κυττάρων που μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν, ώστε να σχηματίσουν οστό. Αποτελείται από το στρώμα, το οποίο περιλαμβάνει τα κύτταρα, και μια υγρή φάση, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες,

λιπίδια και κύτταρα. Το στρώμα αποτελείται από τρεις κατηγορίες κυττάρων, που είναι τα αιμοποιητικά, τα ενδοθηλιακά και τα στρωματικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης. Η τελευταία κατηγορία κυττάρων περιλαμβάνει μεσεγχυματικά κύτταρα και τους απογόνους τους, όπως οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, τενοκύτταρα, καθώς και κύτταρα λιπώδους και λείου μυϊκού ιστού (Tshamala and Van Bree 2006). Έχει διαπιστωθεί στον άνθρωπο ότι αναρρόφηση μυελού των οστών όγκου 1 ml από το λαγόνιο περιέχει κατά προσέγγιση 40×10^6 εμπύρνηνα κύτταρα, εκ των οποίων τα 1500 είναι πρόδρομα κύτταρα συνδετικού ιστού (Muschler *et al.* 1997, Hernigou *et al.* 2005). Παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των οστεοπρογονικών μεσεγχυματικών κυττάρων, ο όγκος και η τεχνική λήψης του μυελού, η υγεία και ηλικία του δότη και το σημείο λήψης, επηρεάζουν το αποτέλεσμα (Tshamala and Van Bree 2006). Μυελός των οστών μπορεί να ληφθεί παράλληλα με τη λήψη σπογγώδους οστεομοσχεύματος ή με αναρρόφηση. Ο όγκος του υλικού της αναρρόφησης σχετίζεται με την ποσότητα περιφερικού αίματος που περιέχεται στο δείγμα. Συνεπώς, μεγαλύτερος όγκος αναρρόφησης συνεπάγεται αυξημένη αραίωση των προγονικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και συστήνεται ο εκάστοτε όγκος λήψης να ελαχιστοποιείται σε 2 ml ή λιγότερο (Muschler *et al.* 1997). Ο μεγαλύτερος όγκος ζωντανού μυελού των οστών συνεπάγεται αυξημένη οστεογένεση και αναδιαμόρφωση. Στον άνθρωπο συστήνεται διαδερμική έγχυση 100-150 ml, ενώ σε ζωικά μοντέλα προτείνεται όγκος ίσος με τον όγκο του οστικού ελλείμματος κατόπιν ισχυρής σταθεροποίησης (Connolly *et al.* 1991, Werntz *et al.* 1996). Επιπλέον, συστήνεται, κατόπιν της λήψης και της φυγοκέντρωσης, απομόνωση και καλλιέργεια των οστεοπρογονικών κυττάρων και των ινοβλαστών για αύξηση της οστεοεπαγωγικής ικανότητας.

3.5.3.2. Ομοιογενή μοσχεύματα ή αλλομοσχεύματα

Τα αλλομοσχεύματα προέρχονται από άλλο ζώο του ίδιου είδους, το οποίο καλείται δότης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε φρέσκα ή συντηρημένα. Το φρέσκο αλλομόσχευμα έχει οστεοεπαγωγική και οστεοκαθοδηγητική δράση. Όταν είναι σπογγώδες μπορεί να διαθέτει και οστεογενετική ικανότητα, αλλά είναι πιθανή η απόρριψή του από το δέκτη. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι δε συνδέεται με άμεση οστεογένεση και η αντίδραση καθυστερεί κατά δύο εβδομάδες συγκριτικά με το αυτομόσχευμα (DeCamp *et al.* 2016). Η χρήση του φρέσκου αλλομοσχεύματος είναι περιορισμένη, γιατί συνοδεύεται από τον κίνδυνο μετάδοσης βακτηριακών ή ιογενών νοσημάτων. Τα αλλομοσχεύματα πρέπει να λαμβάνονται κάτω από συνθήκες υψηλής ασηψίας και να διατηρούνται κατεψυγμένα ή μπορούν και να αποστειρώνονται με γ-ακτινοβολία. Παλαιότερα αποστειρώνονταν με οξείδιο του αιθυλενίου αλλά διαπιστώθηκε πως είναι τοξικό και διακόπηκε η χρήση του (DeCamp *et al.* 2016). Διατηρούνται σε στείρους περιέκτες στους -20°C έως -60°C και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσα σε χρονικό διάστημα από τέσσερις εβδομάδες έως δύο χρόνια από τη συλλογή τους. Η καθυστέρηση των τεσσάρων εβδομάδων μειώνει την αντιγονικότητα του αλλομοσχεύματος, αδρανοποιώντας τις πρωτεΐνες του (Denny and Butterworth 2000). Οι διαδικασίες κατάψυξης,

κατάψυξης-ξήρανσης και ακτινοβόλησης μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης και ανοσολογικής αντίδρασης και απόρριψης, ωστόσο καταστρέφουν τα κύτταρα και, συνεπώς, την οστεογενετική δράση (Arthurs 2016). Μετά την κατάψυξη και πριν από την εμφύτευση πρέπει να διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για τριάντα λεπτά (Denny and Butterworth 2000). Στον άνθρωπο, στα αλλομοσχεύματα έχουν προηγηθεί διεργασίες αφαίρεσης των κυττάρων προς μείωση της ανοσολογικής αντίδρασης του δέκτη και εξάλειψη πιθανών ενδοκυτταρικών ιών. Ελλείψει ζωντανών κυττάρων μόνο οστεοεπαγωγική και οστεοκαθοδηγητική δράση μπορούν να έχουν (Bauer and Muschler 2000). Σπογγώδη οστικά θραύσματα και φλοιώδη μοσχεύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατόπιν επεξεργασίας, ωστόσο η αργή και ατελής ενσωμάτωσή τους μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία και μόλυνση (Griffon 2005). Το πλεονέκτημά τους έναντι των αυτόλογων μοσχευμάτων σχετίζεται με τη διαθεσιμότητα σε μεγάλες ποσότητες και διαφορετικά μεγέθη. Πιθανές χρήσεις τους αφορούν την αναδιαμόρφωση οστικών ελλειμμάτων, την ενίσχυση της πώρωσης καταγμάτων και την αντιμετώπιση της αποτυχίας πώρωσης. Η κυριότερη εφαρμογή τους στον άνθρωπο εντοπίζεται στην πλήρωση οστικών ελλειμμάτων σε μεταφύσεις, όπως σε κατάγματα του κνημιαίου πλατώ (De Long *et al.* 2007).

Η αφαλατωμένη θεμέλια ουσία των οστών (Demineralized Bone Matrix, DBM) είναι ένα αλλομόσχευμα φλοιώδους οστού. Η εκχύλιση του οστού με υδροχλωρικό οξύ αφαιρεί τα ανόργανα συστατικά του, καταλείποντας κολλαγόνο, αυξητικούς παράγοντες και οξεάντοχες πρωτεΐνες (Martinez and Walker 1999, Arthurs 2016, Wang and Yeung 2017). Απαιτείται έλεγχος στο βαθμό της απομετάλλωσης για να μην επηρεαστεί αρνητικά η ικανότητα της οστεοεπαγωγής. Παρέχει οστεοεπαγωγή μέσω των αυξητικών παραγόντων, κυρίως των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών, και οστεοκαθοδήγηση με το δίκτυο ινών κολλαγόνου τύπου I που περιέχονται στο οστό (Ragety and Griffon 2010, Arthurs 2016). Ο σχηματισμός οστού πάνω στην DBM ξεκινάει ήδη από τη φλεγμονώδη φάση, καταδεικνύοντας άμεση διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων και οστεοβλαστική δραστηριότητα. Ένα ακόμη πλεονέκτημα είναι ο γρήγορος ρυθμός απορρόφησης (Autefage and Dejardin 2010). Στην κτηνιατρική διατίθεται σε μορφή σκόνης, κοκκίων, γέλης, πάστας και σε λωρίδες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή συνδυαστικά με αυτομοσχεύματα, σπογγώδη οστικά θραύσματα ή άλλα οστικά υποκατάστατα. Καθώς δεν διαθέτει μηχανικές δομικές ιδιότητες, συστήνεται η χρήση της κυρίως για την πλήρωση οστικών κοιλοτήτων σε σημεία μειωμένης φόρτισης. Παρατηρείται αυξημένη τάση χρήσης της με θετικά αποτελέσματα σε αρθροδέσεις, για ενίσχυση της πώρωσης καταγμάτων και στην πλήρωση ελλείμματος κατόπιν οστεοτομής (Arthurs 2016).

3.5.3.3. Ετερογενή μοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα

Προέρχονται από οργανισμό άλλου ζωικού είδους, έχουν τη μικρότερη οστεογενετική ικανότητα και μπορεί να προκαλέσουν αντίδραση ξένου σώματος. Δεν χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική ορθοπαιδική.

3.5.3.4. Συνθετικά υποκατάστατα οστών

Τα συνθετικά υποκατάστατα χρησιμοποιούνται για τις οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητές τους, καθώς παρέχουν πλαίσιο στήριξης για τα οστεοκύτταρα και για την αγγειογένεση, και αποτελούν μέσο μεταφοράς οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων και οστεοπρογονικών κύτταρων. Αναλύονται λεπτομερώς στην υποενότητα 3.7.

Γενικά το είδος του μοσχεύματος επιλέγεται ανάλογα με την εκάστοτε ανάγκη. Για παράδειγμα, σε ένα οστικό έλλειμμα μετάφυσης υγιούς οστού, που είναι πλούσια σε οστεογενετικά κύτταρα, ένα οστεοκαθοδηγητικό υλικό είναι αρκετό. Αντίθετα, σε ένα εκτεταμένο οστικό έλλειμμα, σε αποτυχία πώρωσης με σχηματισμό ουλώδους ιστού, και σε μολυσμένες περιοχές απαιτείται ο συνδυασμός οστεογενετικών κυττάρων, οστεοκαθοδηγητικού υλικού και οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων (Hernigou and Homma 2012).

3.6. Αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα (ο χρυσός κανόνας)

Το αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα είναι το υλικό εκλογής χάρη στις οστεογενετικές του ιδιότητες (οστεοπρογονικά κύτταρα), τους οστεοεπαγωγικούς αυξητικούς παράγοντες που περιέχει, τη θεμέλια ουσία του που προάγει την αγγειογένεση και την οστεοκαθοδήγηση, καθώς και την άμεση οστεοενσωμάτωσή του (Martinez and Walker 1999, Griffon 2005, DeCamp *et al.* 2016). Η βιολογική δραστηριότητά του είναι αποτέλεσμα της ιστοσυμβατότητάς του, του μεγάλου εμβαδού επιφανείας του, που καλύπτεται με οστεοβλάστες και πρόδρομες μορφές αυτών, και της δοκιδωτής αρχιτεκτονικής δομής του. Μελέτη μετά-ανάλυσης του 2010 για τα μοσχεύματα, που ενισχύουν την οστική ανάπτυξη στη γναθοχειρουργική, συνέκρινε το συνολικό όγκο οστού που σχηματίστηκε κατόπιν χρήσης σπογγώδους οστεομοσχεύματος, αλλομοσχεύματος, ξενομοσχευμάτων και συνθετικών υποκατάστατων οστού και συνδυασμών τους κατέδειξε το σπογγώδες αυτομόσχευμα ως το βιοϋλικό με τη μεγαλύτερη παραγωγή οστού, αποδεικνύοντας το ως πρότυπο αναφοράς (Klijn *et al.* 2010).

Το σπογγώδες αυτομόσχευμα είναι το μοναδικό οστικό μόσχευμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μολυσμένες περιοχές χωρίς να προκαλέσει πρόβλημα, ωστόσο η ικανότητά του μειώνεται. Στα φλοιώδη μοσχεύματα η αγγείωση και η οστεοκαθοδήγηση αναπτύσσονται πιο αργά και μπορεί να καταλήξουν ως απόλυμα σε μια μολυσμένη εστία. Η χρήση του σπογγώδους μοσχεύματος ενδείκνυται σε ανοικτά κατάγματα μετά τη νεαροποίηση, ανάταξη και σταθεροποίηση. Ωστόσο εάν η αιμάτωση είναι αμφιλεγόμενη είναι προτιμότερη η τοποθέτησή του σε δεύτερο χρόνο μετά την αντιμετώπιση της μόλυνσης και την ανάπτυξη υγιούς κοκκιώδους ιστού (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016). Σε κάθε περίπτωση, κρίνεται πολύτιμη η κάλυψη του μοσχεύματος με μαλακούς ιστούς που θα αυξήσουν την αιματική παροχή.

Στην κτηνιατρική πρακτική, η συλλογή σπογγώδους αυτομοσχεύματος πρέπει να γίνεται υπό συνθήκες αυστηρής ασηψίας για να προστατευτεί τόσο ο δότης όσο και ο δέκτης ιστός. Τα σημεία συλλογής στα ζώα συντροφιάς είναι η κεντρική μετάφυση του βραχιόνιου οστού στο

ύψος του μείζονος βραχιόνιου ογκώματος (κατόπιν πρόσθιας-έξω πλάγιας προσπέλασης), η κεντρική μετάφυση του μηριαίου οστού (έξω πλάγια επιφάνεια) ή ο έσω κόνδυλός του (έσω πλάγια επιφάνεια), η κεντρική έσω επιφάνεια της κνήμης και το πρόσθιο ραχιαίο χείλος της λαγόνιας ακρολοφίας (Denny and Butterworth 2000, DeCamp *et al.* 2016). Το μείζον βραχιόνιο όγκωμα και η κνήμη είναι τα σημεία εκλογής χάρη στην εύκολη προσβασιμότητα και το μεγαλύτερο όγκο διαθέσιμου σπογγώδους οστού και προτείνεται να προετοιμάζονται προεγχειρητικά σε κάθε χειρουργική επέμβαση που πιθανόν να απαιτηθεί μόσχευμα. Επισημαίνεται πως η μετάφυση του βραχιόνιου παρέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα από τα δύο. Για τη λήψη απαιτείται αλλαγή γαντιών και διαφορετικό αποστειρωμένο σετ εργαλείων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που ο δέκτης ιστός, όπου ήδη έχει επέμβει ο χειρουργός, είναι εστία λοίμωξης ή νεοπλάσματος. Στο επιλεγμένο σημείο πραγματοποιείται τομή μήκους 2-3 cm στο δέρμα και τους υποδόριους ιστούς, ο φλοιός διανοίγεται με τρυπάνι ή ήλο Steinmann και το σπογγώδες οστό λαμβάνεται με κοχλιάριο. Το μόσχευμα συγκρατείται είτε σε σύριγγα καλυμμένο με γάζα εμποτισμένη με φυσιολογικό ορό ή αίμα είτε σε φιαλίδιο σε σπόγγο μέχρι τη μεταμόσχευση, ενώ απαγορεύεται η τοποθέτηση αντιβιοτικού. Μια δεύτερη επέμβαση λήψης αυτογενούς σπογγώδους οστεομοσχεύματος από το βραχιόνιο και την κνήμη μπορεί να γίνει στις οκτώ και δώδεκα εβδομάδες αντίστοιχα (Penwick *et al.* 1991). Η ζωτικότητα των κυττάρων ανέρχεται σε ποσοστά 85 με 100% και μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, μελέτη σε κουνέλια έδειξε ότι σε σπογγώδες αυτομόσχευμα τοποθετημένο σε εμποτισμένη με αίμα γάζα τα ζώντα κύτταρα μέσα σε τρεις ώρες μειώθηκαν στο 57% (McAnulty 1999). Για το λόγο αυτό κρίνεται πολύτιμο το σπογγώδες αυτομόσχευμα να λαμβάνεται και να τοποθετείται αμέσως πριν από την ολοκλήρωση της χειρουργικής επέμβασης και, επιπλέον, να καλύπτεται με μαλακούς ιστούς που θα του προσφέρουν αιμάτωση.

Ωστόσο, η διαδικασία λήψης αυτομοσχεύματος συνδέεται με κάποια μειονεκτήματα που στον άνθρωπο καταγράφονται σε ποσοστό έως 40% των περιστατικών (Cannada 2010). Έχει συσχετιστεί με πόνο στο δότη και αυξημένο διεγχειρητικό και αναισθητικό χρόνο, ενώ έχουν καταγραφεί επιπλοκές, όπως η μόλυνση, η μεγάλη απώλεια αίματος και η απώλεια της αισθητικότητας τοπικά, καθώς και ορώδεις συλλογές και κατάγματα σε σκύλους (Martinez and Walker 1999, Ragetly and Griffon 2010, James *et al.* 2017). Η ποσότητά του είναι μειωμένη σε μικρόσωμους σκύλους και γάτες (Dorea *et al.* 2005, Ragetly and Griffon 2010), η ποιότητά του είναι χαμηλή σε περιστατικά με οστεοπόρωση (Saxer *et al.* 2016) και δε συμβάλλει στην άμεση βιομηχανική σταθεροποίηση σε φλοιώδη ελλείμματα μεγαλύτερα από 4-5 cm και 3 cm στον άνθρωπο και στο σκύλο, αντίστοιχα (Martinez and Walker 1999, Autefage and Dejardin 2010).

3.7. Συνθετικά οστικά υποκατάστατα

Το ιδανικό οστικό μόσχευμα πρέπει να είναι βιοσυμβατό, οστεογενετικό, οστεοεπαγωγικό και οστεοκαθοδηγητικό, να ενσωματώνεται εύκολα, να είναι εύκολα, άμεσα και οικονομικά

διαθέσιμο και ασφαλές, μη τοξικό και μη καρκινογόνο για το δέκτη. Η ανάγκη για αποφυγή των επιπλοκών του σπογγώδους αυτομοσχεύματος οδήγησε στην αναζήτηση και ανάπτυξη συνθετικών οστικών υποκατάστατων. Οι έρευνες κατευθύνονται στην εφαρμογή οστικών υποκατάστατων και στο συνδυασμό τους με αυξητικούς παράγοντες ή πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα.

Ο σκοπός τους είναι να προσφέρουν φιλικό βιολογικό περιβάλλον, ώστε ο ιστός να αποκατασταθεί φυσιολογικά. Πρόκειται για ανόργανα συνθετικά υλικά που χρησιμοποιούνται για τις οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητές τους, ενώ είναι ελάχιστα ή καθόλου οστεοεπαγωγικά. Έχουν ζωτική σημασία στη μηχανική των οστών, καθώς παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για μετανάστευση και διαφοροποίηση των οστεογενετικών κυττάρων, ένα τρισδιάστατο πλαίσιο στήριξης για τη νεοαγγειογένεσης και μηχανική επάρκεια για την οστική αναγέννηση (Autefage and Dejardin 2010, Kim *et al.* 2012). Τα πλεονεκτήματά τους υπέρ των αυτο- και αλλομοσχευμάτων περιλαμβάνουν τη μεγάλη διαθεσιμότητα, την ευκολία στην αποστείρωση και την ικανότητα συντήρησης, ενώ σχετίζονται και με μειονεκτήματα, όπως ευθραυστότητα, ποικίλοι ρυθμοί απορρόφησης και μειωμένη απόδοση σε οστικά ελλείμματα διάφυσης μακρών οστών (Bucholz 2002).

Τα παραπάνω μπορεί να είναι φυσικής προέλευσης κεραμικά, που περιλαμβάνουν το φωσφορικό ασβέστιο, το θειικό ασβέστιο και το βιοενεργό γυαλί, πάστες και τσιμέντα, πολυμερή και συνδυασμοί τους (Ragety and Griffon 2010, Oliveira *et al.* 2017). Τα κεραμικά είναι κρυσταλλικές δομές που δημιουργούνται από τη θέρμανση αλάτων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 1000°C με μια διαδικασία συσσωμάτωσης (De Long *et al.* 2007). Μπορεί να είναι στερεά, πορώδη υλικά, ή σε μορφή τσιμέντου, το οποίο είναι μείγμα φωσφορικού ή θειικού ασβεστίου σε υδάτινη μορφή πάστας που σκληραίνει (DeCamp *et al.* 2016). Με τη μορφή πάστας επιτυγχάνεται καλύτερη συνένωση των πόρων, αυξάνοντας την αντοχή του υλικού σε δυνάμεις συμπίεσης, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η βιοσυμβατότητα και η οστεοενσωμάτωση (De Long *et al.* 2007). Τα πολυμερή μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά, διασπώμενα ή μη και χρησιμοποιούνται πιο σπάνια από τα κεραμικά.

3.7.1. Θειικό ασβέστιο

Το θειικό ασβέστιο μελετήθηκε αρχικά ως οστικό υποκατάστατο, καθώς ήταν εύκολο στη χρήση, φθηνό, εύκολα διαθέσιμο και σταθερό στην πλήρωση οστικών κοιλοτήτων στο σκύλο. Ωστόσο, η γρήγορη μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων του και η αποδόμησή του περιόρισε την κλινική εφαρμογή του (Ragety and Griffon 2010).

3.7.2. Βιοενεργό γυαλί

Το βιοενεργό γυαλί είναι ένα σκληρό και εύθραυστο συνθετικό υλικό από ασβέστιο, φώσφορο και διοξείδιο του πυριτίου που είναι οστεοκαθοδηγητικό. Το νέο οστό συνδέεται πάνω στο γυαλί επιτυχώς, ωστόσο η σκληρότητά του το καθιστά δύσκολο στη χρήση και στην προσαρμογή

(Arthurs 2016). Ο χρόνος ενσωμάτωσης και οστικής αποκατάστασης σε μελέτη σε γάτες αποδείχθηκε μεγαλύτερος σε σχέση με το σπογγώδες μόσχευμα (Dorea *et al.* 2005).

3.7.3. Πολυμερή

Όσον αφορά τα πολυμερή, μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά, αποδομήσιμα ή όχι και έχουν οστεοκαθοδηγητική δράση. Στα φυσικά πολυμερή περιλαμβάνονται πολυπεπτίδια και πολυσακχαρίτες, όπως το κολλαγόνο και το υαλουρονικό οξύ. Διευκολύνουν την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων, αλλά είναι άμεσα αποδομήσιμα με μικρή μηχανική δύναμη. Τα συνθετικά προσφέρουν το πλεονέκτημα ότι συντίθενται με ποικιλία μηχανικών ιδιοτήτων και ρυθμών απορρόφησης. Έχει διερευνηθεί η χρήση πολυλακτικού (PLA) και πολυγλυκολικού οξέος (PGA), κυρίως όσον αφορά στη μεταφορά ουσιών και αυξητικών παραγόντων. Στην κτηνιατρική έχει προταθεί η χρήση του κολλαγόνου, που εντοπίζεται φυσιολογικά στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των οστών και σε τένοντες. Είναι ακτινοσκιερό υλικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μορφή σκόνης ή κατόπιν ανάμειξης με ορό ή αίμα και να τοποθετηθεί στην εστία-στόχο ή να εγχυθεί (Ragety and Griffon 2010). Δεν προσφέρει μηχανική δράση, ωστόσο, όταν συνδέεται με μορφογενετικές πρωτεΐνες, πρόδρομες μορφές οστεοκυττάρων ή υδροξυαπατίτη, ενισχύει σημαντικά τη διαδικασία ενσωμάτωσης. Επιπλέον, παρέχει μια ιδανική θεμέλια ουσία για αγγειακή διείσδυση, εναπόθεση άλατος και κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και έναρξη της ενεργού αναδιαμόρφωσης (Cornell 1999).

3.7.4. Υποκατάστατα φωσφορικού ασβεστίου

3.7.4.1. Γενικά στοιχεία

Τα υποκατάστατα φωσφορικού ασβεστίου έχουν σύσταση παρόμοια με αυτήν του οστού και σε αυτό οφείλεται η βιοσυμβατότητά τους. Είναι ανόργανα συνθετικά υλικά χωρίς έμφυτες οστεογενετικές ή οστεοεπαγωγικές ιδιότητες. Ωστόσο, έχουν οστεοκαθοδηγητική συμπεριφορά *in vivo* και διεγείρουν βιολογική αντίδραση όμοια με τον οστίτη ιστό και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως βιοϋλικά. Όταν τοποθετηθούν σε υγιές οστό, αναπτύσσεται άμεσα οστεοειδής γύρω τους, προάγοντας την οστεοκαθοδήγηση και οστεοενσωμάτωση, χωρίς τη μεσολάβηση μαλακών ιστών. Είναι ανθεκτικά στη συμπίεση αλλά εύθραυστα και χωρίς μεγάλη αντοχή στην τάση, και συνεπώς πρέπει να τοποθετούνται σε ισχυρά σταθεροποιημένο περιβάλλον (Autefage and Dejardin 2010).

Τα κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου μπορούν να παραχθούν από πολλές πηγές, πρέπει να είναι βιοσυμβατά, σταθερά, βιοενεργά και βιοαπορροφήσιμα. Ένα βιοενεργό υλικό θα διαλυθεί αργά και θα προάγει το σχηματισμό βιολογικού απατίτη σε ισχυρή σύνδεση με τον οστίτη ιστό (Dorozhkin 2009). Διεγείρεται, συνεπώς, η ασβεστοποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ο σχηματισμός οστού (LeGeros 2002). Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη: κυτταρική θεμέλια ουσία που αποτελείται από διαφοροποιημένες οστεοβλάστες εμφανίζεται στην επιφάνεια του κεραμικού και σχηματίζει μια πυκνή άμορφη ζώνη 3-5 μm αυξημένης ηλεκτρικής πυκνότητας με υψηλή συγκέντρωση ιόντων φωσφόρου και

ασβεστίου. Κατόπιν, σχηματίζονται κρύσταλλοι και η συνδετική ζώνη συρρικνώνεται σε πάχος 0,05-0,2 μm . Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση της κρυσταλλικής δομής του δεσμού οστού-ΗΑ δείχνει ότι έχει τελεστεί ανάπτυξη και αναπαραγωγή των κρυστάλλων ΗΑ του οστού στην κατεύθυνση των κρυστάλλων απατίτη στην επιφάνεια του εμφυτεύματος (Dubok 2000). Πρώτος ο Hench παρατήρησε ότι ένα στρώμα φωσφορικού ασβεστίου σχηματίζεται ανάμεσα σε γυαλί πυριτίου (βιοενεργό) και τον οστίτη ιστό (Hench *et al.* 1971). Αυτά τα υλικά προσφέρουν ικανοποιητική σταθεροποίηση και αντοχή στη μηχανική φόρτιση. Ένα βιοαπορροφήσιμο υλικό θα απορροφηθεί άμεσα και επιτρέπει στο νεοσχηματιζόμενο οστό να αναπτυχθεί χωρίς την επαφή με το υλικό. Η βιοαπορρόφηση είναι αναγκαία, καθώς το ικρίωμα πρέπει να ενσωματωθεί στους γύρω ιστούς και να αποδομηθεί χωρίς την ανάγκη χειρουργικής αφαίρεσης. Έτσι, πρέπει να παρέχει πλαίσιο στήριξης για τα κύτταρα και τελικά να απορροφηθεί, αφήνοντας το νεοσχηματισθέν οστό να αναλάβει τη μηχανική στήριξη. Η απορρόφηση εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, την κρυσταλλικότητα, τη σύνθεση του υλικού και τις συνθήκες περιβάλλοντος στην εστία του δέκτη. Τα βιοϋλικά που αποτελούνται από πυκνό ΗΑ αποτελούν παράδειγμα βιοενεργού, αλλά όχι απορροφήσιμου υλικού, ενώ το φωσφορικό τριασβέστιο (TCP) και διφασικά υλικά (πχ TCP+ HA) είναι βιοαπορροφήσιμα (Dorozhkin 2009). Τα κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου σε ποικιλία συνθέσεων και μορφών συστήνονται για εφαρμογή στην οδοντιατρική και ορθοπαιδική και το εκάστοτε είδος επιλέγεται ανάλογα με τις συνθήκες χρήσης. Για παράδειγμα για ανύψωση του ιγμόρειου άντρου, άμεση αντικατάσταση δοντιού, σπονδυλοδεσίες και οστικά ελλείμματα συστήνεται η χρήση πυκνών υλικών. Για την πλήρωση οστικών κολοτήτων προτιμάται η χρήση βιοαπορροφήσιμων υλικών.

Τουλάχιστον έντεκα στοιχεία υπάρχουν στην ομάδα των υποκατάστατων φωσφορικού ασβεστίου με το λόγο Ca/P να κυμαίνεται από 0,5 έως 2. Όσο χαμηλότερος είναι ο λόγος αυτός τόσο πιο όξινο και υδατοδιαλυτό είναι το κεραμικό. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο υδροξυαπατίτης ($(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2))$, HA) και το β-φωσφορικό τριασβέστιο ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β-TCP), στα οποία ο λόγος Ca/P είναι 1,67 και 1,5, αντίστοιχα (Dorozhkin 2009). Το φωσφορικό τριασβέστιο (TCP) απορροφάται 10-20 φορές ταχύτερα από τον υδροξυαπατίτη, καθώς είναι περισσότερο υδατοδιαλυτό (Cornell 1999, Griffon 2005, Arthurs 2016). Η απορρόφηση του HA είναι αργή και μπορεί να διαρκέσει χρόνια και είναι ανάλογη της πυκνότητας και του μεγέθους των πόρων του (Griffon 2005). Ο HA σε σχέση με το α- και β-TCP, είναι περισσότερο σταθερός σε φυσιολογικές συνθήκες φόρτισης, καθώς έχει μικρότερη διαλυτότητα και απορροφητικότητα (Dorozhkin 2009, Kattimani *et al.* 2016). Λόγω της αργής απορρόφησης του HA συστήνεται ο συνδυασμός του με το TCP σε ένα διφασικό υλικό (Biphasic Calcium Phosphate, BCP) και ο λόγος HA/β-TCP του υλικού αυτού θα καθορίσει το ρυθμό απορρόφησης του (LeGeros 2002, De Long *et al.* 2007). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι η μορφή του κεραμικού επηρεάζει την απορροφητικότητά του περισσότερο από το είδος του και συνεπώς ένας πυκνός χωρίς πόρους HA μπορεί να παραμείνει αδιάλυτος στον οργανισμό για πέντε έως επτά χρόνια, ενώ ένας υψηλά πορώδης HA θα

απορροφηθεί μέσα σε ένα έτος (Dubok 2000). Ούτε το TCP ούτε ο HA διεγείρουν ανοσολογικά το δέκτη μετά την εμφύτευσή τους. Αντίθετα, το TCP διεγείρει την εναπόθεση οστού τρεις με έξι εβδομάδες μετεγχειρητικά, ενώ τρεις εβδομάδες μετά την τοποθέτηση HA ινοβλάστες και οστεοβλάστες εναποθέτουν οστεοειδές στην επιφάνειά του (Bucholz 2002, Autefage and Dejardin 2010). Το 95% του φωσφορικού ασβεστίου έχει απορροφηθεί μέσα σε 26 με 86 εβδομάδες (De Long *et al.* 2007. Εντός του οργανισμού, το TCP μετατρέπεται μερικώς σε HA, ο οποίος αποδομείται πιο αργά και τμήματα αυτού μπορεί να παραμείνουν για χρόνια.

3.7.4.2. Ιστορικά στοιχεία

Η πρώτη απόπειρα χρήσης συνθετικού TCP καταγράφηκε το 1920 σε οστικά ελλείμματα σε πρόσθια άκρα κουνελιών (Albee 1920). Μια δεύτερη αναφορά δημοσιεύτηκε τριάντα χρόνια αργότερα (Ray and Ward 1951). Κατόπιν, ο Levitt και οι συνεργάτες του και ο Monroe με την ομάδα του πρότειναν τον HA και τον φθοροαπατίτη ως κεραμικά υλικά για οστικά και οδοντικά εμφυτεύματα (Levitt *et al.* 1969, Monroe *et al.* 1971). Περίπου 60 χρόνια μετά την πρώτη αναφορά του Albee αναφέρεται η χρήση υλικών φωσφορικού ασβεστίου σε οδοντικά ελλείμματα σε σκύλους και σε μια πιλοτική μελέτη για την ανύψωση του ιγμόρειου άντρου, όπου δε διαπιστώθηκαν ανεπιθύμητες αντιδράσεις ξένου σώματος και ενισχύθηκε η οστική ανάπτυξη (Nery *et al.* 1975, 1980).

3.7.4.3. Αρχιτεκτονική δομή υλικών φωσφορικού ασβεστίου

Τα υποκατάστατα φωσφορικού ασβεστίου διατίθενται σε διάφορες μορφές, όπως σωματιδιακή μορφή ή σκόνη, κύβοι συμπαγείς ή πορώδεις, ενέσιμα, πάστες ή τσιμέντα, ως επικαλύμματα για μεταλλικά εμφυτεύματα, σε συνδυασμούς με πολυμερή, κλπ. Ποικίλλουν, δε, ως προς τη σύνθεση, τη μικρό-αρχιτεκτονική δομή, το μέγεθος των κόκκων και των πόρων, την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων, τον ρυθμό απορρόφησης και τον τρόπο διαχείρισης (Dorozhkin 2009, DeCamp *et al.* 2016). Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί αυξημένη δράση των οστεοβλαστών σε δομές από νανοΐνες σε σχέση με νανοσφαιρίδια, καθώς οι πρώτες μοιάζουν περισσότερο με το σχήμα του βιολογικού απατίτη και των κολλαγόνων ινιδίων των οστών (Liu and Webster 2007). Οι πόροι είναι απαραίτητοι για τον σχηματισμό οστού, καθώς επιτρέπουν τη μεταφορά και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και των μεσεγχυματικών κυττάρων καθώς και την ανάπτυξη της αγγείωσης μέσω μικροσκοπικών διαύλων (Autefage and Dejardin 2010). Είναι δύσκολο να οριστεί το ιδανικό υλικό φωσφορικού ασβεστίου, ωστόσο καλό είναι να υπάρχει ένα ελάχιστο μέγεθος πόρων 100 μm με ιδεατό τα 300-500 μm, ενώ 60% πορώδης σύνθεση είναι ιδανική για τη διάχυση οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, την αγγείωση και την οστική αύξηση (De Long *et al.* 2007, Ragetly and Griffon 2010, Guda *et al.* 2014). Ένα ελάχιστο μέγεθος πόρων 50 μm είναι αναγκαίο για το σχηματισμό αγγείων και περίπου 200 μm για την ανάπτυξη οστεοειδούς (LeGeros 2002). Η επίδραση του πόρου σε συνάρτηση με το μέγεθος του έχει ως εξής: < 1 μm είναι υπεύθυνος για τη βιολογική δράση του HA, την αντίδραση με πρωτεΐνες και την προσέλκυση κυττάρων, 1-20 μm καθοδηγεί την κατεύθυνση και τον προσανατολισμό της

κυτταρικής και οστικής ανάπτυξης, 100-1000 μm προσφέρει μηχανική στήριξη και $>1000 \mu\text{m}$ καθορίζει το σχήμα του υλικού. Ο βαθμός σύνθεσης σε πόρους ρυθμίζει τη βιοδραστικότητα του οστικού υποκατάστατου, και κατά συνέπεια το ρυθμό οστικής αναγέννησης και την ισορροπία του με το νέο οστό (Kattimani *et al.* 2016).

Η αυξανόμενη τάση για ελάχιστα επεμβατικά χειρουργεία και βιολογικές τεχνικές δημιουργεί την ανάγκη για ενέσιμα και εύπλαστα υλικά σε μορφή πάστας ή τσιμέντου που σκληραίνει μετά την τοποθέτηση. Αυτό μπορεί να γίνει όταν δύο κεραμικά διαφορετικής οξύτητας (ένα όξινο και ένα βασικό) τοποθετηθούν μαζί σε υγρό περιβάλλον κατόπιν οξεοβασικής αντίδρασης. Ένας δεύτερος τρόπος αφορά στη χρήση ενός μόνο υλικού με αναλογία Ca/P μεταξύ 1,50-1,67 κατόπιν ανάμειξης με ένα υδατικό διάλυμα. Με την αντίδραση αυτή δημιουργούνται νέοι μεγαλύτεροι κρύσταλλοι, προσφέροντας μηχανική σταθερότητα. Το πλεονέκτημα της μορφής αυτής είναι η καλύτερη προσαρμογή στο έλλειμμα, σε αντίθεση με τα πορώδη κεραμικά και ικριώματα (Dorozhkin 2009). Τα κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οστικό τσιμέντο που είναι σωματίδια διφασικού φωσφορικού ασβεστίου (BCP) ενσωματωμένα σε μια γέλη μεθυλοκυτταρίνης. Αν και η οστική ανάπτυξη είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τους κύβους BCP το βασικό μειονέκτημά του είναι η έλλειψη μηχανικών ιδιοτήτων και η δυσκολία διατήρησής του εντός του ελλείμματος. Για το λόγο αυτό εισήχθη η χρήση κεραμικής πάστας που μετά την τοποθέτηση σε λίγα λεπτά μέσω μιας μη-εξώθερμης αντίδρασης σχηματίζει ένα υλικό υψηλής μηχανικής συμπίεσης (Autefage and Dejardin 2010).

3.7.4.4. Οστεοεπαγωγική δράση υλικών φωσφορικού ασβεστίου

Κάτω από κάποιες συνθήκες, τα κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου μπορεί να εμφανίσουν και οστεοεπαγωγικές ιδιότητες. Αυτό σχετίζεται με την ικανότητα πρόσδεσης μεγάλου αριθμού BMPs στο υλικό, το οποίο εξαρτάται από το είδος του κεραμικού, τη σύνθεση, τη γεωμετρία και τη μικρο-αρχιτεκτονική δομή του (LeGeros 2002). Η οστεοεπαγωγική ικανότητα διαπιστώθηκε κατόπιν εμφύτευσης ενός ικριώματος BCP ενδομυϊκά και υποδόρια, το οποίο προκάλεσε έκτοπη ανάπτυξη οστίτη ιστού σε σκύλους και γουρούνια, αν και δε διαπιστώθηκε το ίδιο σε κουνέλια, αίγες και αρουραίους (Yang *et al.* 1996).

3.8. Υδροξυαπατίτης

Ο υδροξυαπατίτης (HA), είτε υδροθερμικά εξαγόμενος από τα κοράλλια είτε συνθετικά κατασκευασμένος, έχει κρυσταλλική δομή στο χώρο όμοια με του φλοιώδους οστού και θεωρείται οστεοκαθοδηγητικός. Πρόκειται για ένα βιοενεργό, βιοσυμβατό και οστεοκαθοδηγητικό υλικό που ενισχύει την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων. Διατίθεται σε σωματιδιακή μορφή σκόνης ή πιο πυκνούς κύβους, πάστα, τσιμέντο και ως επικάλυψη για μεταλλικά ορθοπαιδικά ή οδοντιατρικά εμφυτεύματα. Οι μηχανικές ιδιότητές του εξαρτώνται από τη μικρο-αρχιτεκτονική δομή, την πυκνότητα, το

μέγεθος των κρυστάλλων και τη σύνθεσή του (Kattimani *et al.* 2016, Oliveira *et al.* 2017). Για παράδειγμα, η δύναμη τάσης για τον πυκνό HA είναι 79 με 106 MPa, για τον πορώδη 42 MPa, ενώ η αντίστοιχη του φλοιώδους οστού 69 με 110 MPa (LeGeros 2002). Μελέτη μετανάλυσης που συνέκρινε τα ιστολογικά αποτελέσματα από τη χρήση HA κάθε μορφής σε οστικά ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους συγκριτικά με την πλήρη απουσία μοσχεύματος ή υποκατάστατου ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο του στην ενίσχυση της οστικής αποκατάστασης (Oliveira *et al.* 2017).

Πρώτοι ο Chiroff και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι τα κοράλλια που δημιουργούνται από θαλάσσια ασπόνδυλα έχουν δομή όμοια με τη φλοιώδη ή τη σπογγώδη ουσία των οστών ανάλογα με το είδος και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μόσχευμα οστού (Chiroff *et al.* 1975). Μια επεξεργασία υδροθερμικής ανταλλαγής (260°C, 15.000 psi) μετατρέπει το εύθραυστο ανθρακικό άλας των κοραλλιών σε, υπερέχοντα μηχανικά, κρυσταλλικό υδροξυαπατίτη χωρίς την αλλαγή της εσωτερικής δομής του (Cornell 1999, LeGeros 2002). Ο κοραλλοειδής HA έχει μια τρισδιάστατη δομή με μεγάλου βαθμού ομοιομορφία σε πόρους μακροσκοπικού και μικροσκοπικού επιπέδου (200-500 μm), προσφέρει επαρκή μηχανική στήριξη και επιτρέπει την ανάπτυξη νέου οστού και δεν αποδομείται άμεσα (Autefage and Dejardin 2010, Dutta *et al.* 2015). Ο κοραλλοειδής HA περιέχει μαγνήσιο, στρόντιο, φθόριο και ανθρακικό ανιόν (LeGeros 2002).

Απατίτης φυσικής προέλευσης μπορεί να ληφθεί και από βόειο οστίτη ιστό και ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής διακρίνεται σε απατίτη 1) με οργανική ουσία, χωρίς διαδικασία συσσωμάτωσης, 2) χωρίς οργανική ουσία, χωρίς διαδικασία συσσωμάτωσης και 3) χωρίς οργανική ουσία κατόπιν συσσωμάτωσης. Οι δύο πρώτες μορφές αποτελούνται από μικρούς κρυστάλλους ανθρακικού HA, ενώ η τελευταία από μεγαλύτερους κρυστάλλους απατίτη χωρίς το ανθρακικό ανιόν εάν θερμανθεί πάνω από 1000°C (LeGeros 2002). Ο βόειος HA περιέχει μαγνήσιο, νάτριο και ανθρακικό ιόν καθώς και άλλα ιχνοστοιχεία που φυσιολογικά υπάρχουν στα οστά.

Ο συνθετικός HA είναι ένα κρυσταλλικό υλικό φωσφορικού ασβεστίου που κατασκευάζεται ως κεραμικό μέσω της θερμικής διαδικασίας συσσωμάτωσης (De Long *et al.* 2007). Χρησιμοποιείται ως οστικό υποκατάστατο, καθώς προάγει την αναγέννηση οστικών κοιλοτήτων χωρίς επιπλοκές, μειώνει το νεκρό χώρο και τη δημιουργία ινώδους ιστού. Πειραματικές μελέτες σε ζώα έχουν προτείνει τον HA ως οστεοεπαγωγικό υλικό πέραν της οστεοκαθοδηγητικής ικανότητάς του (Ripamonti 1996, Gosain *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2010). Η οστεοεπαγωγή επιτυγχάνεται καθώς προκαλείται διέγερση των μεσεγχυματικών κυττάρων, ώστε να διαφοροποιηθούν προς οστεογόνα κύτταρα. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνει οστεοεπαγωγή ένα συνθετικό υλικό δεν είναι γνωστός, ωστόσο φαίνεται πως παράγοντες, όπως η μικρο-αρχιτεκτονική δομή του υλικού, η επιφάνειά του, η γεωμετρία και η τοπογραφία του, συμβάλλουν σε αυτό (Kuboki *et al.* 1998). Στο νάνο-κατασκευασμένο HA, οι περισσότερο τραχιές επιφάνειές του φαίνεται να προκαλούν ασύμμετρη διαίρεση των

μεσεγχυματικών κυττάρων και διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες, γεγονός που ευνοεί την οστεοεπαγωγή (Kattimani *et al.* 2016).

Εκτενείς πειραματισμοί σε ζωικά μοντέλα και κλινικές μελέτες με πορώδη εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη έδειξαν πως το υλικό αυτό διηθείται εύκολα από ινοαγγειακό ιστό, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε ώριμο πεταλιώδες οστό. Η οστεοενσωμάτωση είναι σχεδόν ταυτόσημη με αυτήν που παρατηρείται με τα αυτομοσχεύματα (Cornell 1999). Μόλις εμφυτευτεί, το νεοσχηματιζόμενο οστό προσδένεται με ειδικές οστικές πρωτεΐνες άμεσα στον HA μέσω ενός στρώματος απατίτη πτωχού σε ασβέστιο, ο οποίος σχηματίζεται στην επιφάνεια σύνδεσης μεταξύ οστού-εμφυτεύματος (Kattimani *et al.* 2016). Ο δεσμός μεταξύ εμφυτεύματος και οστού είναι πολύ ισχυρός και μηχανικές δοκιμές έχουν αποδείξει ότι τέσσερις εβδομάδες μετά την εμφύτευση παρατηρήθηκαν ρωγμές μέσα στον κεραμικό HA και όχι στην ένωση εμφυτεύματος-οστού (Hong *et al.* 1992). Η επιφάνεια του HA υποστηρίζει την προσκόλληση οστεοβλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους (Dorozhkin 2009, Kattimani *et al.* 2016). Ιστολογικά, εμφανίζονται γέφυρες οστεοειδούς με βιώσιμους οστεοβλάστες και πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, υποδηλώνοντας μια ενεργό διαδικασία αναδιαμόρφωσης του νεοσχηματιζόμενου οστού. Αυτά τα πολυπύρρηνα κύτταρα που μοιάζουν με οστεοκλάστες φαίνεται πως αποδομούν την επιφάνεια του μοσχεύματος. Ωστόσο, η επιφανειακή απορρόφηση που συμβαίνει, δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικού βαθμού, λόγω της αδιάλυτης, αδρανούς δομής του κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη. Καμία ανοσοαντίδραση δε σημειώνεται γύρω του (Cornell 1999). Επιπλέον, δεν παρατηρείται δημιουργία ινώδους ιστού μεταξύ οστού και HA (Dubok 2000). Το εμφύτευμα, αρχικά, είναι ασθενέστερο μηχανικά, από το οστό του ξενιστή, αλλά με τη διείσδυση τοπικών ιστών η ισχύς του αυξάνεται ανάλογα με το ποσοστό της ενσωμάτωσης. Έξι μήνες μετά την τοποθέτηση στο ζώντα οργανισμό, η μέγιστη ισχύς του εμφυτεύματος υπερβαίνει αυτήν του σπογγώδους οστού του ξενιστή (Cornell 1999). Ωστόσο, για να εμφανιστεί διείσδυση του γύρω ιστού, απαιτείται απόλυτη σταθεροποίηση και άμεση επαφή με το οστό του ξενιστή. Πολύ μικρές κινήσεις ή αστάθεια αποτρέπουν την οστική ενσωμάτωσή του (Cornell 1999).

Η χρήση του HA για την επικάλυψη ορθοπαιδικών και οδοντιατρικών εμφυτευμάτων είναι γνωστή από τη δεκαετία του 1980 (Hench and Wilson 1984). Συνδυάζονται έτσι οι βιονεργές ιδιότητες του HA με τη δύναμη του μετάλλου, συνηθέστερα τιτανίου. Ο HA βελτιώνει την ενσωμάτωση του εμφυτεύματος στο οστό, μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης και χαλάρωσης των υλικών και αυξάνει τη διάρκεια ζωής τους (LeGeros 2002, Pommer *et al.* 2002). Μελέτες *in vivo* και *in vitro* σε υποειδή έδειξαν αυξημένη σταθερότητα και οστεοενσωμάτωση των επικαλυμμένων με HA υλικών οστεοσύνθεσης (ήλοι εξωτερικής με γύψο, κοχλίες φλοιώδους οστού μειωμένης επαφής) (Lescun *et al.* 2012, Durham *et al.* 2015). Αυξάνεται επιπλέον η βιοσυμβατότητα και βιο-δραστικότητα των οδοντικών εμφυτευμάτων. Λεπτότερα στρωματά HA σε επίπεδο νανόμετρων διεγείρουν μεγαλύτερη κυτταρική απόκριση από παχύτερα (Ward and Webster 2006, De Oliveira *et al.* 2007).

Μια επιπλέον χρήση του HA είναι αυτή του φορέα αντιμικροβιακών ουσιών για την αντιμετώπιση της οστεομυελίτιδας (Lalidou *et al.* 2014). Ο HA μπορεί να μεταφέρει μεγάλες ποσότητες οποιουδήποτε αντιβιοτικού στο σημείο μόλυνσης με τη συγκέντρωσή του στη συστηματική κυκλοφορία να διατηρείται εντός φυσιολογικών ορίων. Το πλεονέκτημά του έναντι του έως τώρα ευρέως χρησιμοποιούμενου τσιμέντου από πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA) είναι ότι δε χρειάζεται αφαίρεση και επιπλέον διαθέτει οστεοκαθοδηγητική ικανότητα στην πλήρωση της κοιλότητας του απολύματος.

Στην κτηνιατρική δεν υπάρχουν πολλές κλινικές μελέτες για την εφαρμογή του HA. Ωστόσο, κλινική μελέτη σε τέσσερις γάτες και δεκαεπτά σκύλους, στην οποία κοκκώδης HA χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο του αυτόλογου σπογγώδους οστεομοσχεύματος σε διάφορες αρθροδέσεις με ήλους, κοχλίες και μεταλλικά ράμματα, έδειξε θετικά κλινικά και ακτινολογικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η οστική συνένωση είχε πραγματοποιηθεί σε όλα τα περιστατικά, εκτός από ένα, μέσα σε διάστημα εξήντα ημερών, όσο περίπου απαιτείται και με το φρέσκο σπογγώδες μόσχευμα και ιστολογικά παρατηρήθηκε ενεργός οστική αναδιαμόρφωση σε δείγμα από αρθρόδεση της ταρσοκνημικής (Dórea Neto *et al.* 2007).

3.9. Νανοκρυσταλλικός υδροξυαπατίτης

Η πιο πρόσφατη και πολλά υποσχόμενη χρήση του HA προέκυψε με τη συμβολή της νανοτεχνολογίας. Ο νανοκρυσταλλικός HA φαίνεται να έχει καλύτερη βίο-δραστικότητα και διαλυτότητα, καλύτερες μηχανικές ιδιότητες, και αυξημένη οστική ανάπτυξη συγκριτικά με πιο χονδροειδείς κρυστάλλους και σε αυτό συμβάλλει η αυξημένη αναλογία επιφάνειας προς όγκο (Abd El-Fattah *et al.* 2010, Wang and Yeung 2017). Η νανοτεχνολογία αφορά στη δημιουργία υλικών, συσκευών, και συστημάτων σε μέγεθος της κλίμακας νανόμετρου (1-100 nm) και τη χρήση των φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων αυτής της κλίμακας. Τα βιοϋλικά νανοτεχνολογίας σε οστική εφαρμογή προάγουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών, την οστεοενσωμάτωση, την πρωτεϊνοσύνθεση (του κολλαγόνου και της αλκαλικής φωσφατάσης) και την εναπόθεση αλάτων ασβεστίου (Kattimani *et al.* 2016). Η ιδιότητα αυτή διαπιστώθηκε πρώτη φορά το 1999, αλλά και σε μεταγενέστερες μελέτες (Webster *et al.* 1999, Webster *et al.* 2000, Webster and Eijffors 2004). Επιπλέον της αύξησης των οστεοβλαστών διπλασιάζεται και η σύνθεση και απορροφητική δράση των οστεοκλαστών στο νάνο-HA σε σχέση με το συμβατικό, προάγοντας έτσι την αναδιαμόρφωση του νεοσυντιθέμενου οστού (Webster *et al.* 2001). Το ίδιο ισχύει *in vivo* για την επικάλυψη εμφυτευμάτων και υλικών οστεοσύνθεσης με νανοφασικό έναντι του συμβατικού απατίτη, ενώ σημαντική κρίνεται η αρνητική επίδραση των νανοϋλικών ενάντια σε ανταγωνιστικούς ινοβλάστες (Liu and Webster 2007). Τα υποκατάστατα νανοτεχνολογίας συντίθενται με τρόπο, ώστε η αντοχή σε στρόφη, βράχυνση και κάμψη και η σκληρότητα να είναι μεγαλύτερα από τα συμβατικά και να μοιάζουν περισσότερο με εκείνα του υγιούς οστού. Το μειωμένο μέγεθος κόκκων και πόρων οδηγεί σε

μεγαλύτερη τραχύτητα επιφάνειας και καλύτερη διαβατότητα. Η μεγαλύτερη επιφάνεια και η τραχύτητά της, το αυξημένο ποσοστό σε ελλείμματα στην επιφάνεια και τα διαφορετικά ηλεκτρικά δυναμικά αυξάνουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών, όπως η βιτρονεκτίνη, η ιννεκτίνη και η λαμινίνη, που διεγείρουν ή σταματούν την κυτταρική προσκόλληση και αύξηση. Η βιτρονεκτίνη είναι μια γραμμική πρωτεΐνη μήκους 15 nm, η οποία προσκολλάται περισσότερο στους πόρους των νανο-κεραμικών σε σχέση με τα συμβατικά και διεγείρει την προσκόλληση των οστεοβλαστών (Liu and Webster 2007, Matsui *et al.* 2015).

Πειραματικά έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με τη χρήση πάστας νανοκρυσταλλικού HA στην αναγεννητική των οστών. Έχει διερευνηθεί η χρήση της για την ενίσχυση της αποκατάστασης των ελλειμμάτων της κοτύλης κατά την ολική αρθροπλαστική. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της σε σπογγώδες αλλομόσχευμα και σε BCP έδειξε να βελτιώνει τις ιδιότητές τους, καθώς επέφερε καλύτερα αποτελέσματα από την ανεξάρτητη χρήση τους, όσον αφορά στην ποσότητα του νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού, την οστεοενσωμάτωση, τη μηχανική σταθερότητα και τη βιοαπορρόφηση σε οστικά ελλείμματα του μηριαίου κονδύλου σε κουνέλια. Το υλικό αποδείχθηκε βιοσυμβατό, δεν παρατηρήθηκε δημιουργία ινώδους ιστού και στις οκτώ εβδομάδες από την εμφύτευση, εντοπίστηκαν υπολείμματα του υλικού της πάστας με ενεργές οστεοκλάστες (Chris Arts *et al.* 2006). Έρευνα μετά τη χρήση πάστας νανοκρυσταλλικού HA *in vivo*, απέδειξε την υπεροχή του υλικού αυτού έναντι συμβατικού κεραμικού HA όσον αφορά στην ευκολία στη διαχείριση, τη νεοαγγειογένεση και το βαθμό απορρόφησης. Ωστόσο, υστερούσε σε σύγκριση με το σπογγώδες οστεομόσχευμα που οδήγησε σε ανάπτυξη περισσότερων τριχοειδών αγγείων (Laschke *et al.* 2007). Σε μονοφλοιικά οστικά ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους στην κεντρική μετάφυση της ωλένης κουνελιού, η πλήρωση με πάστα νανοκρυσταλλικού HA επέφερε άμεση οστική αναγέννηση και ενσωμάτωση. Η οστική κάλυψη του ελλείμματος ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από του συνδυασμού με συμβατικό HA, ενώ ο τελευταίος, όταν εμφυτεύτηκε μόνος του, ακολουθούσε με μικρότερο ποσοστό οστικής ανάπτυξης (Huber *et al.* 2008). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε οστικά ελλείμματα της περιφερικής επίφυσης του μηριαίου σε πρόβατα που πληρώθηκαν, είτε με πάστα νανοκρυσταλλικού HA είτε με τσιμέντο φωσφορικού ασβεστίου, έδειξε καλύτερη οστική αναγέννηση, μεγαλύτερη εναπόθεση οστού και αμεσότερη ενσωμάτωση και αποδόμηση του πρώτου εμφυτεύματος. Οι τελευταίες οφείλονται στην περισσότερο όμοια δομή του με το οστό (Ca/P = 1,675) και στην ιδιότητα των κρυστάλλων HA να συσσωματώνονται, επιταχύνοντας την οστική ανάπτυξη (Huber *et al.* 2009). Επιπλέον, συγκριτική μελέτη ανάμεσα σε νανοκρυσταλλικό HA και β-TCP για την πλήρωση περιοδοντικών ενδοοστικών ελλειμμάτων έδειξε αμεσότερη κλινική και ακτινολογική βελτίωση, με τον πρώτο σε διάστημα τριών και έξι μηνών, ενώ ύστερα από την πάροδο έξι μηνών δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Αμφότερα τα υλικά θεωρούνται αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση περιοδοντικών ελλειμμάτων (Jain 2014). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και συγκριτική έρευνα ανάμεσα σε γέλη νανοκρυσταλλικού HA με

πυρίτιο, υδάτινη πάστα νανοκρυσταλλικού HA και αποπρωτεϊνοποιημένο υποκατάστατο HA βόειας προέλευσης σε μονοφλοιικά οστικά ελλείμματα γνάθου σε χοιρίδια, όπου στις πέντε εβδομάδες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του οστικού ελλείμματος με την πάστα, ενώ στους οκτώ μήνες δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα τρία υλικά. Ο βαθμός απορρόφησης της πάστας HA και η συμπίεση ήταν μεγαλύτερη και στα δύο χρονικά διαστήματα (Dau *et al.* 2016). Η βραδύτερος ρυθμός απορρόφησης ενός οστικού υποκατάστατου συνεπάγεται τη μεγαλύτερη σταθερότητά του και συστήνεται σε μεγάλα οστικά ελλείμματα. Όσον αφορά στη βιοαπορρόφηση, το μικρότερο μέγεθος κρυστάλλων την ενισχύει, ωστόσο μελέτη σε κουνέλια έδειξε ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό του νανοκρυσταλλικού HA είχε απορροφηθεί σε τρεις μήνες (Brandt *et al.* 2010). Ο νανοκρυσταλλικός HA είναι ένα βιοσυμβατό υλικό ικανό να υποστηρίξει τη οστική ανάπτυξη και διατίθεται σε μορφή πάστας με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μελέτη σε οστικό έλλειμμα ωμοπλάτης προβάτου υπέδειξε ως βέλτιστη τη συγκέντρωση 38% σε υδατικό διάλυμα καθώς παρατηρήθηκε μεγαλύτερος ρυθμός γεφύρωσης (Hruschka *et al.* 2017). Συγκέντρωση HA 35% σχημάτισε μικρότερα συσσωματώματα και παρουσίασε γρηγορότερη αποδόμηση με αποτέλεσμα το μειωμένο ρυθμό γεφύρωσης, ενώ, αντίθετα, 48% HA σχημάτισε μεγάλα συσσωματώματα που γεφύρωσαν το έλλειμμα αλλά δεν άφησαν επαρκή χώρο για το νεοσυντιθέμενο οστικό ιστό. Οστεοκαθοδηγητική επίδραση είχαν και τα τρία υλικά, καθώς στην επιφάνεια όλων αναπτύχθηκε ένα λεπτό στρώμα νέου οστού, καταδεικνύοντας την ικανότητά τους για ενίσχυση της οστικής αναγέννησης, χωρίς να παρατηρηθεί φλεγμονώδης αντίδραση, ίνωση ή οστεονέκρωση. Ιστολογικά, παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των συσσωματωμάτων HA, αποδεικνύοντας την ενεργό απορρόφησης του με την πάροδο του χρόνου.

Η εμβιομηχανική είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο που συνδυάζει ζωντανά κύτταρα, συνθετικά υλικά και βιολογικούς παράγοντες με ποικίλους τρόπους, ώστε να βελτιώσει, αντικαταστήσει, αναγεννήσει, διατηρήσει ή ενισχύσει ζωντανούς ιστούς ή και όργανα. Με βάση αυτή κύτταρα εμφυτεύονται σε ένα ικρίωμα ικανό να υποστηρίξει την τρισδιάστατη ιστική ανάπτυξη. Τα ικρίωματα πρέπει να εξυπηρετούν κάποιους σκοπούς, όπως να είναι βιοσυμβατά, βιοενεργά και βιοαπορροφήσιμα, μη τοξικά και μη καρκινογόνα, να επιτρέπουν την προσκόλληση, μεταφορά και μετανάστευση κυττάρων και βιοχημικών παραγόντων, να διευκολύνουν τη διάχυση θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου και προϊόντων μεταβολισμού, και να προσφέρουν την απαραίτητη μηχανική και βιολογική στήριξη ανάλογα με τις ανάγκες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Autefage and Dejardin 2010, Kim *et al.* 2012).

4. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (MSCs)

Οι τραυματισμοί και οι παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος τόσο στην ιατρική του ανθρώπου όσο και στην κτηνιατρική, αφορούν σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού κάθε ηλικιακής

ομάδας. Οι έρευνες των τελευταίων ετών στον άνθρωπο κατευθύνονται προς εναλλακτικές θεραπείες, όπως η εμβιομηχανική των ιστών, και όσον αφορά στην οστική αναγέννηση εστιάζουν σε οστεοκαθοδηγητικά ικριώματα σε συνδυασμό με αυξητικούς παράγοντες ή οστεοπρογονικά μεσεγχυματικά κύτταρα. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) αποτελούν μια πρωτοποριακή θεραπευτική προσέγγιση στην αναγέννηση των ιστών που εφαρμόζεται στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα συντροφιάς και προσφέρουν τόσο οστεογενετικά κύτταρα, όσο και οστεοεπαγωγική επίδραση για την κινητοποίηση των επιχώριων κυττάρων, καθώς και αγγειογενετική και ανοσορρυθμιστική δράση.

4.1. Ορισμός και βασική λειτουργία των MSCs

Τα MSCs είναι ένας πληθυσμός κυττάρων, που σχηματίζουν ατρακτοειδείς αποικίες, με μεγάλο προσδόκιμο επιβίωσης, ικανότητα αυτό-ανανέωσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε οστό, χόνδρο και λίπος. Προέρχονται από το μεσόδερμα, εντοπίζονται στον περιαγγειακό χώρο και κατανέμονται σε όλους τους αγγειούμενους ιστούς (Markoski 2016, Kulus *et al.* 2018, Ayala-Cuellar *et al.* 2019) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, ωστόσο ο αριθμός τους εξαρτάται από την κατάσταση της υγείας του οργανισμού, την ηλικία και τον ιστό προέλευσης (Arnhold and Wenisch 2015). Ο μυελός των οστών και το περιόστεο είναι περισσότερο ενεργά στα νεαρά άτομα, οπότε διαθέτουν περισσότερα MSCs, ενώ ο αριθμός τους και η ικανότητα πολλαπλασιασμού μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας (οστεοπώρωση), ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν (Kraus and Kirker-Head 2006, Ayala-Cuellar *et al.* 2019). Αντίστοιχα, στις μεταφύσεις των οστών και στο παχυμένο περιόστεο ο πληθυσμός τους είναι αυξημένος και για το λόγο αυτό η πώρωση είναι αμεσότερη (Kraus and Kirker-Head 2006).

Η βασική τους λειτουργία είναι η αντικατάσταση των νεκρών κυττάρων και η αναγέννηση των ιστών που έχουν καταστραφεί από ισχαιμία, φλεγμονή ή τραύμα. Αυτό προκύπτει, τόσο από την ικανότητα διαφοροποίησής τους, όσο και από την ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων και βιομορίων με αντί-αποπτωτική, ανοσορρυθμιστική και αγγειογενετική δράση (Marx *et al.* 2015, Torres-Torrillas *et al.* 2019). Τα MSCs αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα T και B λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Βρίσκονται σε μια κατάσταση αδράνειας έως ότου δραστηριοποιηθούν από βιοχημικά σήματα (αυτοκρινή, παρακρινή ενδοκρινή ή και ενδοκυτταρικά), ώστε να διαιρεθούν και να διαφοροποιηθούν. Επιπλέον, η μεταβίβαση των βιοχημικών σημάτων μπορεί να γίνει με την απελευθέρωση χημοκινών και την πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των MSCs και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αμέσως μετά τον τραυματισμό διεγείρεται μηχανισμός του ανοσοποιητικού συστήματος για την κινητοποίηση και προσέλκυση των MSCs και άλλων προγονικών κυττάρων προς την εστία του τραύματος. Συνεπώς, τα MSCs που απομονώνονται και χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση των ιστών έχουν την ικανότητα

τροπισμού προς την εστία της βλάβης και αποκατάστασής της, είτε με διαφοροποίηση προς την επιθυμητή κατεύθυνση ή με την έκκριση άφθονων αυξητικών παραγόντων (Markoski 2016). Έτσι, κατόπιν πειραματικής ενδοφλέβιας έγχυσης MSCs στην ωτική αρτηρία κουνελιών με υπερτροφικά δερματικά έλκη, εκείνα μετανάστευσαν στο σημείο της βλάβης και μείωσαν την εναπόθεση κολλαγόνου και τον ουλώδη ιστό (Liu *et al.* 2014). Παρά την ικανότητα απόκρισης και κατεύθυνσης στο σημείο ανάγκης, κατόπιν εξωγενούς χορήγησης, ένα μικρό ποσοστό τους μεταναστεύει μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Αυτό αποδείχθηκε σε μελέτη που προκλήθηκε τεχνητή βλάβη στον τένοντα του επιπολής καμπτήρα των δακτύλων αμφοτερόπλευρα σε ιπποειδή με τοπική έγχυση κολλαγενάσης και ακολούθησε έγχυση αυτόλογων MSCs λιπώδους ιστού σε ένα από τα δύο άκρα. Η κυτταρομετρία ροής των κυττάρων του περιφερικού αίματος και η ιστοπαθολογική εξέταση ιστοτεμαχίων και των δύο άκρων, έδειξε παρουσία των MSCs στην τραυματισμένη εστία που τοποθετηθήκαν και μικρή μετανάστευση των MSCs στην αιματική κυκλοφορία, χωρίς να τα εντοπίζει στην εστία του άλλου άκρου (Carvalho *et al.* 2014).

Από τη διαίρεση ενός MSC προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα που δεν είναι όμοια μεταξύ τους. Το ένα από τα δύο επιστρέφει στην αρχική κατάσταση του μητρικού έως το επόμενο σήμα δραστηριοποίησης και το δεύτερο πολλαπλασιάζεται συμμετρικά, παράγοντας άφθονες πρόδρομες κυτταρικές σειρές, οι οποίες στη συνέχεια μεταναστεύουν και διαφοροποιούνται σε ώριμες μορφές (Muschler and Midura 2002, Marcucio *et al.* 2015). Η διαφοροποίησή τους εξαρτάται από το βιολογικό περιβάλλον και επηρεάζεται από παράγοντες, όπως είναι η μερική πίεση του οξυγόνου, το pH και η συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα των γειτονικών ιστών, οι μηχανικές συνθήκες και η χημική σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η διαφοροποίηση προς οστεοβλάστες ρυθμίζεται από ποικιλία αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF- β , ο IGF-I και ο IGF-II, οι ιντερλευκίνες, το ρετινοϊκό οξύ, τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα, η παραθορμόνη, η βιταμίνη D3, η θυροξίνη, καθώς και τα μέλη της οικογένειας των BMPs (Muschler and Midura 2002).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα εμβρυικά (Embryonic Stem Cells, ESCs), τα οποία προέρχονται από εμβρυικά κύτταρα, και τα ενήλικα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), που προέρχονται από τον ίδιο τον ενήλικο οργανισμό και αποτελούν πηγή πολλών μεσοδερμικών κυτταρικών γραμμών, όπως οι οστεοβλάστες, οι μυοβλάστες, οι ινοβλάστες, οι χονδροβλάστες, οι λιποβλάστες και οι νευροβλάστες. Μετά τη λήψη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε κατόπιν καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού ή ως μη καλλιεργημένα κλάσματα. Όπως, προαναφέρθηκε τα MSCs εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, ωστόσο, ικανοποιητική ποσότητα για κλινική εφαρμογή μπορεί να ληφθεί από το μυελό των οστών (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ή Bone Marrow Stromal Cells, BMSCs) ή το λιπώδη ιστό (Adipose-derived Stromal Cells ή Adipose-derived Stem Cells, ASCs) (Pak *et al.* 2017). Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που προέρχονται από ωάρια που γονιμοποιήθηκαν *in vitro* και διατέθηκαν για την

έρευνα μετά από έγγραφη συγκατάθεση. Μπορούν να καλλιεργούνται θεωρητικά επ' άοριστον, πρακτικά όμως για μήνες, αυτο-ανανεώνονται και τελικά μπορούν να δώσουν κάθε είδος κυττάρου. Παρά τη μεγάλη ικανότητα αναγέννησης και διαφοροποίησης, έχουν περιορισμένη χρήση για ηθικούς και θρησκευτικούς λόγους, καθώς και για τη μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας τερατωμάτων και καρκινογένεσης (Kulus *et al.* 2018).

Σύμφωνα με τη Διεθνή Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας (International Society of Cellular Therapy, ISCT) ως MSCs ορίζονται αυτά που πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Εκτός από την ικανότητα προσκόλλησης σε πιάτα καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού όταν διατηρούνται σε κυτταρικές καλλιέργειες, πρέπει να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες και, επίσης, να εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD73, CD90, CD105, αλλά όχι τους δείκτες CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 και CD79a (Dominici *et al.* 2006). Σε κοινή δήλωση με τη Διεθνή Ομοσπονδία για τη Θεραπευτική και Επιστήμη του Λιπώδους Ιστού (International Federation for Adipose Therapeutics and Science, IFATS), τα κύτταρα του στρωματικού αγγειακού κλάσματος του λιπώδους ιστού πρέπει να έχουν ζωτικότητα >70% και τα ASCs εντός του χαρακτηρίζονται φαινοτυπικά ως CD34+, CD45-, CD235a-, CD31-. Τα καλλιεργημένα ASCs αναγνωρίζονται ως CD13+, 73+, CD90+, CD105+, CD31-, CD45- και CD235a- (Bourin *et al.* 2013). Στην κτηνιατρική, ωστόσο, το κριτήριο του ανοσοφαινοτύπου έχει περιορισμένη μόνο εφαρμογή εξαιτίας της έλλειψης των αναγκαίων αντισωμάτων. Τα βιομόρια επιφανείας, όπως οι ομάδες διαφοροποίησης (Clusters of Differentiation, CD), είναι απαραίτητα για τις διασυνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, αλλά και μεταξύ κυττάρου-περιβάλλοντος. Χρησιμοποιούνται, επιπροσθέτως, και για την αναγνώριση των κυττάρων του πληθυσμού.

4.2. Ιστορικά στοιχεία

Ιστορικά, η ικανότητα απομόνωσης στρωματικών κυττάρων από τον μυελό των οστών διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1968, ενώ στη δεκαετία του 1990 χρησιμοποιήθηκε ο όρος μεσεγχυματικά κύτταρα για πρώτη φορά κατόπιν διαπίστωσης της ικανότητας των κυττάρων αυτών για αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση προς τριπλή κατεύθυνση (λιπογένεση, οστεογένεση και χονδρογένεση) (Friedenstein *et al.* 1968, Caplan 1991). Συγκεκριμένα, ο όρος μεσεγχυματικός προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και είναι σύνθετη λέξη από τους όρους «μέσο» και «έγχυμα» και δηλώνει την ικανότητα των κυττάρων αυτών να εξαπλώνονται και να μεταναστεύουν μεταξύ εξωδέρματος και ενδοδέρματος κατά τα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης. Αυτή η ικανότητα μετανάστευσης και πλήρωσης κενών αποτελεί το ρόλο κλειδί των MSCs στην επούλωση τραυμάτων (του δέρματος, των οστών και των μυών) στον ενήλικο οργανισμό (Caplan 1991). Το 1991 γίνεται η πρώτη έγχυση αυτόλογου μυελού των οστών για την ενίσχυση της οστικής αποκατάστασης σε κατάγματα κνήμης με αποτυχία πώρωσης και λίγο αργότερα αρχίζει να διερευνάται η χρήση των MSCs για την οστική αναγέννηση (Connolly *et al.*

1991, Bruder *et al.* 1994). Ο Thomson (1998) απομόνωσε εμβρυικά μεσεγχυματικά κύτταρα από ανθρώπινη βλαστοκύστη, ωστόσο έως σήμερα τα εμβρυικά κύτταρα μόνο του ποντικού έχουν μελετηθεί σε βάθος (Thomson, 1998). Το 2001 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η παρουσία MSCs στον λιπώδη ιστό, ο οποίος έκτοτε αποτελεί εναλλακτική πηγή, καθώς προσφέρεται σε μεγαλύτερη ποσότητα και η λήψη του γίνεται κατόπιν τοπικής αναισθησίας με μειωμένο πόνο στο δότη (Zuk *et al.* 2001). Η επεξεργασία των δύο ιστών είναι διαφορετική· ο μυελός των οστών φυγοκεντρείται σε κλίση φικόλης (Ficoll) και μετριζιμίδης (Hydraque) και καταλείπει ένα στρώμα μονοπύρηνων κυττάρων, ενώ ο λιπώδης ιστός επεξεργάζεται με κολλαγενάση, καταλείποντας το στρωματικό αγγειακό κλάσμα (Stromal Vascular Fraction, SVF) (Marx *et al.* 2015). Τέλος, το 2006 επιτυγχάνεται για πρώτη φορά με την υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων OCT4, SOX2, KLF4 και c-MYC η δημιουργία πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων από ινοβλάστες δέρματος ενήλικου ποντικού, τα οποία πληρούν όλα τα κριτήρια ορισμού των εμβρυικών μεσεγχυματικών κυττάρων (Takahashi and Yamanaka 2006). Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem cells, iPS) και ως πλειοτροπικά πλέον κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε διάφορα είδη κυττάρων, χωρίς το ηθικό δίλημμα της χρησιμοποίησης ενός εμβρύου.

4.3. Θεραπευτική χρήση των MSCs

4.3.1. Χορήγηση των MSCs

Τα MSCs μπορούν να χορηγηθούν στον ίδιο οργανισμό από τον οποίο λήφθηκαν (αυτόλογη θεραπεία) ή ο δότης και ο λήπτης να είναι διαφορετικά άτομα (αλλογενής χορήγηση). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα MSCs στερούνται έκφρασης αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (Major Histocompatibility Complex, MHC), γεγονός πολύ σημαντικό, καθώς δεν αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα, δε διεγείρεται ανοσολογική αντίδραση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε αλλογενείς θεραπείες χωρίς τον κίνδυνο απόρριψης (De Becker and Van Riet 2016, Ayala-Cuellar *et al.* 2019). Ωστόσο, έρευνα σχετική με τα BMSCs ιπποειδών έδειξε πως τα αρνητικά MSCs για αντιγόνο MHC σε συνθήκες φλεγμονώδους εξεργασίας μπορούν να το εκφράσουν· σε αυτό συνηγορεί και η ακόλουθη μελέτη, στην οποία δεύτερη ενδοαρθρική έγχυση αλλογενών MSCs σε ιπποειδή έγειρε ανεπιθύμητη παρενέργεια, καθώς αναγνωρίστηκαν ανοσολογικά ως ξένο σώμα (Schnabel *et al.* 2014, Joswig *et al.* 2017). Η αυτόλογη χορήγηση είναι προτιμητέα γιατί δεν ενέχει τον κίνδυνο απόρριψης, ωστόσο σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα, με εκτεταμένες αλλοιώσεις ή με συστηματικά νοσήματα, ο ενδογενής πληθυσμός MSCs είναι ανεπαρκής και συστήνεται εξωγενής χορήγηση (Kulus *et al.* 2018). Στην κλινική πράξη τα MSCs μπορούν να χορηγηθούν συστηματικά, δηλαδή, με ενδοφλέβια ή ενδοαρθρική έγχυση, και τοπικά, είτε με έγχυση είτε με εμφύτευση στην εστία στόχο. Η ενδοφλέβια έγχυση συχνά προτιμάται λόγω της ευκολίας και της επαναληψιμότητας, αλλά και της εντόπισης των κυττάρων μέσα σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και

οξυγόνο. Ωστόσο, αναφέρεται ότι τα MSCs, λόγω μεγέθους, εγκλωβίζονται στους πνεύμονες και ένα πολύ μικρό ποσοστό τους ελκύεται τελικά στην εστία-στόχο. Για τον λόγο αυτόν, έχουν προταθεί προσεγγίσεις για την αύξηση του αριθμού που τελικά φθάνει, όπως είναι η τροποποίηση στη χορήγηση (σε συνδυασμό με αγγειοδιασταλτικά ή ηπαρίνη), στις συνθήκες καλλιέργειας, ώστε να εκφράζονται περισσότερα βιομόρια έλκυσης (προσθήκη κυτταροκινών, καλλιέργεια σε υποξικές συνθήκες ή μικρότερη πυκνότητα MSCs, γονιδιακή τροποποίηση) και στον ιστό-στόχο, όπου αυξάνεται η χημειοταξία με μεθόδους χημειοθεραπευτικές, ακτινοθεραπευτικές, υπερήχους, και μαγνητικά ή ηλεκτρικά πεδία (De Becker and Van Riet 2016).

.

4.3.2. Ιδιότητες και διαχείριση των MSCs

Γίνονται μελέτες σχετικά με τις ιδιότητες και τις κλινικές εφαρμογές των MSCs, ώστε τα δεδομένα που προκύπτουν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της χρήσης τους. Έτσι γνωρίζουμε την επίδραση της ηλικίας του δότη σε αυτά. Ο μυελός των οστών υπερήλικων σκύλων φέρει MSCs με 40% μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και μειωμένη οστεογενετική διαφοροποίηση (Volk *et al.* 2012), ενώ αντίθετα τα ASCs νεαρών σκύλων έχουν μεγαλύτερο ρυθμό διπλασιασμού, περισσότερο αυξημένη έκφραση επιφανειακών δεικτών και μεγαλύτερη ικανότητα διαφοροποίησης συγκριτικά με ηλικιωμένους ασθενείς (J. Lee *et al.* 2017). Ενώ η ικανότητα προσκόλλησης, πολλαπλασιασμού και λιπογενετικής διαφοροποίησης των ASCs είναι μεγαλύτερη στα νεαρά, η οστεογενετική τους ικανότητα διατηρείται με την πάροδο της ηλικίας όσον αφορά *in vitro* διερεύνηση με μέτρηση της ALP και της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας σε πιάτα καλλιέργειας (Shi *et al.* 2005). Ο Chung (2012) παρατήρησε ότι η καλλιέργεια MSCs σκύλου σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και καθυστερεί την οστεογενετική διαφοροποίηση των ASCs. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε μεγαλύτερος ρυθμός πολλαπλασιασμού των ASCs έναντι BMSCs, ωστόσο και οι δύο μορφές διαφοροποιήθηκαν άμεσα προς οστεογενετική κατεύθυνση (Chung *et al.* 2012). Η διατήρηση υπό ψύξη έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει τη μορφολογία, τον ανοσο-φαινότυπο και την ικανότητα για διαφοροποίηση των ASCs του σκύλου, ωστόσο μειώνει ελαφρώς το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (Martinello *et al.* 2011). Αντίστοιχα αποτελέσματα έδειξε και μεταγενέστερη μελέτη όπου MSCs που είχαν καταψυχθεί στους -80°C και στους -196°C μετά την απόψυξη διατήρησαν τη ζωτικότητα, καθώς και την χονδρογενετική και οστεογενετική ικανότητά τους (Roato *et al.* 2016). Επιπροσθέτως, το SVF μπορεί να συντηρηθεί σε υγρό άζωτο και να διατηρήσει την ικανότητα για λιπογενετική και οστεογενετική διαφοροποίηση όταν καταψύχεται σε κρύο-προστατευτικό διάλυμα 10% πολυβινυλ-πυρολιδόνης σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Thirumala *et al.* 2010). Συγκρίνοντας τους κρύο-προστατευτικούς παράγοντες διμεθυλ-σουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) και τρεχαλόζη, διαπιστώθηκε πως ενώ και οι δύο διαφυλάσσουν τη ζωτικότητα των κυττάρων, ο πρώτος συνδέεται με περισσότερο αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (Roato *et al.* 2016). Ένας ακόμη

παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα και τη ζωτικότητα των ASCs είναι η ποσότητα και το είδος της κολλαγενάσης. Υψηλές δόσεις ή παρατεταμένη έκθεση στο ένζυμο αυτό ενέχουν τοξικότητα για τα MSCs, ενώ αντίθετα ανεπαρκής ποσότητα οδηγεί σε μειωμένο πληθυσμό MSCs. Η κολλαγενάση παράγεται από δύο διαφορετικά γονίδια του βακτηρίου *Clostridium histolyticum*, εκ των οποίων το *colG* εκφράζει την κολλαγενάση τύπου I και το *colH* την τύπου II (Pak *et al.* 2017). Επιπλέον, ο συνδυασμός ενζύμων φαίνεται να καταλείπει περισσότερα μονοπύρρηνα κύτταρα από τη χρήση ενός μόνου στη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας και, συνεπώς, είναι περισσότερο αποτελεσματικός (Aronowitz *et al.* 2015). Όσον αφορά στις συνθήκες της μεταφοράς των MSCs, κρίνεται αναγκαίο αυτή να γίνεται σε φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (Phosphate-Buffered Saline, PBS), σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα σε εννέα με δώδεκα ώρες (Marx *et al.* 2015). Το υλικό του σκεύους μεταφοράς έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει τα κύτταρα (Espina *et al.* 2016). Ωστόσο, η ζωτικότητά τους επηρεάζεται από τη διάμετρο της βελόνας κατά την αναρρόφηση, λόγω της αρνητικής πίεσης, και κατά τη χορήγηση. Συστήνεται να χρησιμοποιείται βελόνα μεγαλύτερη από 25 G, και ειδικά για την αναρρόφηση μεγαλύτερη από 18 G (Williams *et al.* 2016, Lang *et al.* 2017). Ένα σημαντικό ερώτημα είναι κατά πόσο επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα των MSCs από τη χρήση τοπικού αναισθητικού, όπως με τη λιποαναρρόφηση για τη λήψη ASCs. Η Roato και συν. (2016) αναφέρουν ότι δεν επηρεάζεται μορφολογικά το δείγμα ούτε παρατηρείται εκφύλιση ή νέκρωση του λιπώδους ιστού, όμως μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων, καθώς και ο ρυθμός αύξησής τους σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro* (Roato *et al.* 2016).

4.3.3. Υπεροχή των MSCs του λιπώδους ιστού (ASCs) έναντι των MSCs του μυελού των οστών (BMSCs)

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα MSCs είναι του μυελού των οστών και του λιπώδους ιστού. Έχουν παρόμοιες ιδιότητες, όμως τα ASCs συνδέονται με περισσότερα πλεονεκτήματα. Η λήψη βλαστοκυττάρων από τον μυελό των οστών είναι μια μέθοδος επεμβατική που ενέχει τον κίνδυνο της μόλυνσης και της αιμορραγίας, και επιπλέον, συνοδεύεται από πόνο στο δότη και μειωμένο πληθυσμό κυττάρων με την πάροδο της ηλικίας. Αντίθετα, ο λιπώδης ιστός είναι εύκολα διαθέσιμος, καθώς καλύπτει μεγάλη επιφάνεια του σώματος, και μπορεί να ληφθεί άφθονα και ανώδυνα (Torres-Torrillas *et al.* 2019). Από μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι τα βλαστοκύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό είναι περίπου 300 με 500 φορές πιο άφθονα στον λιπώδη ιστό από τον μυελό των οστών (Strioga *et al.* 2012, Behfar *et al.* 2014, Marx *et al.* 2015, Sullivan *et al.* 2016, Bateman *et al.* 2018). Τα ASCs, κατόπιν σύγκρισης με άλλα MSCs, έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι ο VEGF, ο PDGF, ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (Hepatocyte Growth Factor, HGF), η IL-6 και ο TGF-β1, διεγείροντας την αγγειογένεση με έναν παρακρινή μηχανισμό (Kwon *et al.* 2014). Εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τον IGF και την IL-8, την BMP-2 και τον FGF-2, καθιστώντας τα ιδανικά για την αναγέννηση οστών (Paduano *et al.* 2017). Κατόπιν σύγκρισης με BMSCs εκφράζουν μεγαλύτερες ποσότητες BMP-2, κολλαγόνου τύπου I

και οστεονεκτίνης, καθώς και πληθώρα αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών που εμπλέκονται στην οστική αναδιαμόρφωση. Επίσης, τα ASCs μπορούν να επιβιώνουν σε περιβάλλον χαμηλής πίεσης οξυγόνου και στις συνθήκες αυτές να αυξήσουν την έκκριση VEGF, ώστε να διεγερθεί η απαραίτητη νεοαγγειογένεση για την οστεογένεση (Paduano *et al.* 2017). Τέλος, μελέτες υποστηρίζουν την ανοσορρυθμιστική υπεροχή των ASCs έναντι των BMSCs (Strioga *et al.* 2012).

4.3.4. Στρωματικά κλάσματα

Η διαδικασία παραγωγής καλλιεργημένων βλαστοκυττάρων εμπεριέχει τη λήψη και απομόνωση, την καλλιέργεια και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίησή τους προς την επιθυμητή κατεύθυνση, την τοποθέτησή τους σε κατάλληλο ικρίωμα και τελικά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος στο έλλειμμα σε δεύτερη χειρουργική επέμβαση. Πρόκειται, συνεπώς, για μια διαδικασία χρονοβόρα (απαιτείται τουλάχιστον ένα δεκαήμερο), επίπονη και ακριβή. Εναλλακτικά συστήνεται η χρήση κλάσματος μονοπύρηνων κυττάρων που μπορεί να εφαρμοστεί διεγχειρητικά, αφού η προετοιμασία έως την εμφύτευση διαρκεί λίγες ώρες (περίπου από ενενήντα λεπτά έως τέσσερις ώρες), και είναι πιο απλή, πρακτική και οικονομική μέθοδος (Markoski 2016, Zhang *et al.* 2018). Η ελάχιστη επεξεργασία του δείγματος, επιπλέον, ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο επιμόλυνσης και καρκινογένεσης.

Οι δύο μορφές στρωματικών αγγειακών κλασμάτων που έως πρόσφατα χρησιμοποιούνται και δίνουν ικανοποιητικό αριθμό MSCs είναι του μυελού των οστών και του λιπώδους ιστού (Pak *et al.* 2017). Η μελέτη μας αφορά στο τελευταίο λόγω των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων των ASCs έναντι των BMSCs.

4.4. Στρωματικό αγγειακό κλάσμα λιπώδους ιστού (SVF)

Η μεγαλύτερη αφθονία λιπώδους ιστού στο σώμα, η ευκολότερη πρόσβαση και η ανώδυνη λήψη, η άμεση και διεγχειρητική προετοιμασία, καθώς και η μεγαλύτερη αναλογία MSCs προς όγκο ιστού καθιστούν, με τα ως τώρα δεδομένα, καλύτερο κλινικά το στρωματικό αγγειακό κλάσμα του λιπώδους ιστού (SVF) (Prins *et al.* 2016, Sullivan *et al.* 2016). Το SVF είναι ένα υδάτινο ετερογενές μείγμα από ASCs, πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs), ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), μονοκύτταρα, μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, λεία μυϊκά κύτταρα, περικύτταρα, σιτευτικά κύτταρα και προ-λιποκύτταρα (Bora and Majumdar 2017, Pak *et al.* 2017), καθώς και βιομόρια, όπως κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (VEGF και αγγειοποιητίνες), που προάγουν τη μετανάστευση κυττάρων, επιταχύνουν την αναγεννητική διαδικασία, έχουν αντιφλεγμονώδη και ανοσορρυθμιστική δράση, αλλά συμβάλλουν παράλληλα στην αναγέννηση των αιμοφόρων αγγείων και στην ανάρρωση των ισχυαμικών ιστών, διαθέτοντας έτσι όχι μόνο οστεογενετική αλλά και οστεοεπαγωγική ικανότητα (Markoski 2016, Dykstra *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2018).

Η IFATS και η ISCT δεν έχουν θεσπίσει ειδικό πλαίσιο για τον χαρακτηρισμό κατά CD των κυττάρων που απαρτίζουν το στρωματικό αγγειακό κλάσμα (Guo *et al.* 2016).

4.4.1. Τα κύτταρα του SVF και οι ιδιότητές τους

Τα πολύτροπα κύτταρα του SVF προσκολλώνται τάχιστα στα συνθετικά ικρίωματα, πολλαπλασιάζονται άμεσα και διαφοροποιούνται στην οστεογενετική κατεύθυνση ή δρουν ασκώντας παρακρινή επίδραση στα επιχώρια κύτταρα προς πολλαπλασιασμό και οστεογενετική διαφοροποίηση (Prins *et al.* 2016). Το 2-10% των κυττάρων του SVF είναι τα ASCs (Yoshimura *et al.* 2006). Ο υπόλοιπος πληθυσμός αφορά σε πρόδρομες μορφές ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων, ο ρόλος των οποίων δε σχετίζεται με τον αντίστοιχο των MSCs, όμως εκφράζουν από κοινού σε ποσοστό 63% του συνόλου των κυττάρων του SVF τον επιφανειακό δείκτη CD34 (Scherberich 2013). Ο δείκτης αυτός εκφράζεται στα ASCs του λιπώδους ιστού κατά τη λήψη τους, όμως κατά την καλλιέργειά τους *in vitro* σταδιακά εξαφανίζεται. Το SVF περιέχει EPCs και ενδοθηλιακά κύτταρα σε ποσοστό που κυμαίνονται από 7-30%, καθιστώντας το μεγαλύτερη πηγή των κυττάρων αυτών συγκριτικά με το πλήρες αίμα και μια αποτελεσματική θεραπεία στις παθολογικές καταστάσεις του κυκλοφορικού συστήματος (Yoshimura *et al.* 2006, Dykstra *et al.* 2017). Τα EPCs του SVF συνεισφέρουν στην αναγέννηση των αγγείων με την έκφραση VEGF και IGF-1 (Guo *et al.* 2016) και με δυναμική επανασυναρμολόγηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του αίματος στην εστία της εφαρμογής (Koh *et al.* 2011). Συνεπώς, συμβάλλουν και στην οστεογένεση, καθώς σε προκλινικές δοκιμές έχει αποδειχτεί η ικανότητά τους στην επούλωση μεγάλων οστικών ελλειμμάτων (Rozen *et al.* 2009, Atesok *et al.* 2010). Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει τη συνέργεια EPCs και MSCs στην νεοαγγειογένεση *in vitro* και *in vivo*, καθώς και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αγγειογένεση και οστεογένεση του συνδυασμού αυτού σε σχέση με την ανεξάρτητη τοποθέτησή τους σε έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους σε μηριαίο αρουραίων (Traktuev *et al.* 2009, Seebach *et al.* 2010). Μελέτη όπου συγκρίθηκε η μεταμόσχευση SVF με κλάσμα μονοκυττάρων του μυελού των οστών σε ισχαιμικό μυοκάρδιο ποντικών, απέδειξε την αγγειογενετική και αντιφλεγμονώδη δράση και των δύο, με πυκνότερο αγγειακό δίκτυο να σχηματίζεται με το SVF (Premaratne *et al.* 2011). Συνεπώς, το SVF που είναι δεξαμενή τόσο MSCs όσο και EPCs πιστεύουμε να έχει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην οστική αναγέννηση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα σχετίζονται με το σχηματισμό, τη σταθεροποίηση και την αναδιαμόρφωση των αγγείων (Guo *et al.* 2016). Ο λόγος ενδοθηλιακά κύτταρα προς περικύτταρα στο λιπώδη ιστό κυμαίνεται μεταξύ 1:1 έως 10:1. Τα περικύτταρα διαθέτουν ιδιότητες των MSCs, όπως ικανότητα πολλαπλής διαφοροποίησης και παρόμοιους δείκτες επιφάνειας (Mills *et al.* 2013). Ο Zimmerlin (2013) μέσω ανοσοϊστοχημείας και κυτταρομετρίας ροής υποστήριξε ότι τα EPCs έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πολλαπλασιασμού και έκφραση δεικτών MSCs από τα περικύτταρα (Zimmerlin *et al.* 2013). Επιπλέον, στο SVF περιλαμβάνονται αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) σε ποσοστό 0,004±0,001% με ικανότητα πολλαπλής διαφοροποίησης (Han *et al.* 2010). Το SVF,

επιπροσθέτως, διαθέτει μεγάλο αριθμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς υπολογίζεται ότι η ομάδα μονοκυττάρων/μακροφάγων αποτελεί περίπου το 5-15% του και εκφράζει το CD14 (Bourin *et al.* 2013). Τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη αιμάτωση των ιστών μέσω της έκκρισης κυτταροκινών, όπως ο VEGF και ο FGF (Navarro *et al.* 2014). Τα μονοκύτταρα του SVF εκφράζουν δείκτες των M2 μακροφάγων σε ποσοστό πάνω από 90%, που έχουν αντιφλεγμονώδη και, κατά συνέπεια, θεραπευτική δράση και επιπλέον χαρακτηριστικά των MSCs, πλαστικότητα, μορφολογία και πολυδυναμία (Eto *et al.* 2013). Ωστόσο, το είδος των μακροφάγων του λιπώδους ιστού εξαρτάται από την παχυσαρκία, καθώς σε αυτή την περίπτωση συσσωρεύονται μακροφάγα φαινοτύπου M1 που εκκρίνουν βιομόρια φλεγμονής (Dykstra *et al.* 2017). Εκτός από τα μακροφάγα, στο SVF εντοπίζονται και λεμφοκύτταρα (10-15%), κυρίως T-ρυθμιστικά κύτταρα, που εκφράζουν κατασταλτικές του ανοσοποιητικού κυτταροκίνες, ιδίως IL-10, και συμβάλλουν στη διατήρηση του M2 φαινοτύπου των μακροφάγων (Bourin *et al.* 2013, Guo *et al.* 2016). Επομένως, το SVF είναι ένα μείγμα από τα προαναφερθέντα κύτταρα, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον από το οποίο επηρεάζονται αμφίδρομα, και δρουν είτε μέσω διαφοροποίησης προς την επιθυμητή κατεύθυνση ή ασκώντας παρακρινή επαγωγική επίδραση, αφού εκκρίνουν χημικούς μεταβιβαστές και διεγείρουν την παραγωγή νέων κυττάρων. Η αγγειογένεση, η διαφοροποίηση και η ανοσοτροποποίηση αποτελούν ένα σύνολο ιδιοτήτων που συνεισφέρουν στην επιβίωση των κυττάρων του SVF.

4.4.2. Η περιεκτικότητα ASCs στο SVF

Σύμφωνα με μελέτες, 1 g λιπώδους ιστού περιέχει περίπου $0,5-2 \times 10^6$ ζωντανά μονοπύρηννα κύτταρα και ειδικότερα, 100 g ανθρώπινου λιπώδους ιστού περιέχουν $0,5-20 \times 10^6$ ASCs σε SVF (Pak *et al.* 2017). Στο πρόβατο το 1 g λιπώδους ιστού περιέχει περίπου $1,88 \times 10^6$ μονοπύρηννα κύτταρα (Lv *et al.* 2018), ενώ στον σκύλο $4,2 \times 10^5$ ($\pm 0,46 \times 10^5$) ζωντανά κύτταρα (Marx *et al.* 2014).

Η συγκέντρωση των ASCs στο SVF στον άνθρωπο υπολογίζεται περίπου 2-10% των μονοπύρηννων κυττάρων, ενώ τα BMSCs στο μυελό των οστών είναι 0,001-0,01% (Oedayrajsingh-Varma *et al.* 2006, Yoshimura *et al.* 2006, Prins *et al.* 2016). Στον σκύλο περίπου $17 \pm 3,2\%$ των κυττάρων του SVF είναι ASCs (Astor *et al.* 2013).

Το προαναφερθέν εύρος στην περιεκτικότητα των ASCs στο SVF συσχετίζεται με τις ατομικές διαφορές σε σύνθεση και πυκνότητα λιπώδους ιστού. Ωστόσο, ο δότης ιστός δε φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα και ζωτικότητα τους, όπως έδειξε μελέτη στον άνθρωπο όπου συγκρίθηκαν ο λιπώδης ιστός της κοιλιάς, των μηρών, των γλουτών και του μαστού, με εξαίρεση ίσως να αποτελεί ο τελευταίος λόγω παρουσίας αδενικών κυττάρων (Oedayrajsingh-Varma *et al.* 2006). Στην ίδια έρευνα, συγκρίθηκαν και οι τεχνικές λήψης του λιπώδους ιστού, δηλαδή η en-block εκτομή, η tumescent λιποαναρρόφηση, στην οποία γίνεται έγχυση μέσω κάνουλας μίγματος αδρεναλίνης-λιδοκαΐνης για αγγειοσύσπαση και τοπική αναισθησία, και η λιποαναρρόφηση με τη βοήθεια υπερήχου, που προκαλεί επιλεκτική καταστροφή του λιπώδους

ιστού. Καμία από τις τρεις τεχνικές δεν επιδρά στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων, ωστόσο η χρήση υπερήχου μείωσε τη συχνότητα πολλαπλασιασμού των ASCs και αύξησε το χρόνο διπλασιασμού τους και, επομένως, δε συστήνεται για τη λήψη λίπους για εμβιομηχανική χρήση. Αναδρομική μελέτη σε σκύλους προσπάθησε να εντοπίσει τυχόν διαφορές στα ζωντανά κύτταρα ανά γραμμάριο λιπώδους ιστού εξαρτώμενες από την ηλικία, τον δότη ιστό, τη θρεπτική κατάσταση του ζώου και το αν ήταν στερημένο ή ακέραιο. Η θρεπτική κατάσταση και το μέγεθος της φυλής δε φαίνεται να επηρεάζουν το αποτέλεσμα, ενώ τα νεαρότερα ζώα είχαν αυξημένο αριθμό ζωντανών κυττάρων. Ο αριθμός των κυττάρων ήταν χαμηλότερος στον δρεπανοειδή σύνδεσμο σε σχέση με τη βουβωνική χώρα και τον λιπώδη ιστό οπισθίως της ωμοπλάτης. Ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι σε ζώα που έχει πραγματοποιηθεί μέση λαπαροτομή, συνήθως αφαιρείται τμήμα του δρεπανοειδούς. Επιπλέον, στους στερημένους σκύλους βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός ζωντανών κυττάρων ανά γραμμάριο λιπώδους ιστού (Astor *et al.* 2013). Παράλληλα, φαίνεται ότι η ποσότητα λήψης λιπώδους ιστού δε συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητά του.

4.4.3. Η θεμέλια ουσία του SVF

Η υγρή φάση του κλάσματος αποτελείται από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, κυρίως γλυκοζαμινογλυκάνες. Οι τελευταίες προσφέρουν αντοχή στη συμπίεση, στη στήριξη των ιστών και στην λίπανση των αρθρώσεων και τενόντων. Μπορεί να λειτουργήσει ως ικρίωμα για τη βέλτιστη προσκόλληση των ASCs στην εστία της βλάβης. Επιπλέον αποτελείται από δομικές πρωτεΐνες, όπως είναι το κολλαγόνο, η λαμινίνη, η ινονεκτίνη και η ελαστίνη, και διαθέτει την ικανότητα σύνδεσης και αλληλεπίδρασης με υποδοχείς των επιχώριων κυττάρων με δυνατότητα τροποποίησης της δράσης τους, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην αναγέννηση των νευρικών κυττάρων Schwann (Chernousov *et al.* 2008). Επιπλέον, η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία εκκρίνει κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες και, επομένως, ρυθμίζει τη μεταφορά βιομορίων, καθοδηγώντας τη χημειοταξία και τη μεταφορά κυττάρων, συμβάλλοντας στην αναγεννητική λειτουργία των MSCs (Markoski 2016, Pak *et al.* 2017).

4.4.4. Η υπεροχή του SVF έναντι των ASCs

Τα πλεονεκτήματα του SVF έναντι των καλλιεργημένων ASCs στην αναγεννητική των ιστών εντοπίζονται σε δύο πεδία. Πρώτον, παρόλο που και τα δύο φέρουν ανοσορρυθμιστικές, αντιφλεγμονώδεις και αγγειογενετικές ιδιότητες, το ετερογενές μίγμα κυττάρων του SVF δείχνει καλύτερα αποτελέσματα σε συγκριτικές μελέτες, μερικές από τις οποίες παρατίθενται στη συνέχεια. Για παράδειγμα, το SVF αποδείχθηκε καλύτερο στην αντιμετώπιση και διακοπή της εξέλιξης της χρόνιας αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε πειραματικό μοντέλο ποντικού, καθώς μείωσε τους δείκτες φλεγμονής, την ιντερφερόνη-γ και την IL-12 (Semon *et al.* 2013). Άλλη μελέτη που αφορούσε στη βελτίωση της στυτικής δυσλειτουργίας ύστερα από αποκατάσταση του σηραγγώδους νεύρου σε κουνέλια έδειξε ότι και τα δύο βιοϊλικά είναι αποτελεσματικά, ωστόσο καταγράφηκε μεγαλύτερη έκφραση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού

οξειδίου, μεγαλύτερη αναλογία λείων μυών/κολλαγόνου και αύξηση του παράγοντα von Willebrand στην ομάδα του SVF (You *et al.* 2015). Συγκριτική μελέτη έδειξε αμεσότερη επούλωση σε τραύματα του δέρματος με το SVF και αυτό αποδόθηκε στη μεγαλύτερη ικανότητα διαφοροποίησης, το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης των κυττάρων του, καθώς και έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, όπως ο VEGF, ο FGF και ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (Connective tissue Growth Factor- CTGF) (Chae *et al.* 2017). Αντίστοιχα, στη χειρουργική του μυοσκελετικού συστήματος, καλύτερα αποτελέσματα είχε το SVF στη χονδρογένεση και την αναγέννηση του υποχόνδριου οστού συγκριτικά με τα ASCs σε συγκριτικές μελέτες (Jurgens *et al.* 2013, Wu *et al.* 2016). Έρευνες που έχουν συγκρίνει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χρήσης SVF με αντίστοιχα καλλιεργημένων ASCs στην οστική αναγέννηση έχουν καταγράψει μεγαλύτερη παραγωγή πώρου σε οστικό έλλειμμα με τη χρήση SVF, συγκριτικά με τα καλλιεργημένα ASCs και τα ακυτταρικά ικρίωματα, και το αποδίδουν στην κυτταρική ετερογένειά του (Roato *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2018). Επιπλέον, η χρήση SVF είναι πιο άμεση και απλή από την εργαστηριακή καλλιέργεια ASCs και μπορεί να εφαρμοστεί διεγχειρητικά, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα ειδικά σε επείγουσες καταστάσεις, καθώς δεν απαιτείται διαχωρισμός και καλλιέργεια των κυττάρων. Η μικρότερη επεξεργασία με διάφορα αντιδραστήρια το καθιστά ασφαλέστερο βιοϋλικό και λιγότερο επιρρεπές σε λοιμώξεις, ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο καρκινογένεσης και η χρήση του δεν υπόκειται σε αυστηρούς περιορισμούς. Ακόμη έχει αποδειχθεί πως η αύξηση των κύκλων καλλιέργειας των MSCs, έχει αρνητική επίδραση στις ικανότητές τους, μειώνοντας τη δραστηριότητα της τελομεράσης που οδηγεί σε κυτταρική γήρανση και, συνεπώς, συστήνεται άμεση χρήση (Bonab *et al.* 2006).

Ωστόσο, η χρήση του συνδέεται και με ένα μειονέκτημα, καθώς η ετερογένεια στον πληθυσμό των κυττάρων του SVF επιτρέπει μόνο την αυτογενή χρήση, σε αντίθεση με τα καλλιεργημένα MSCs που εφαρμόζονται και σε αλλογενείς θεραπείες (Bora and Majumdar 2017). Αυτό συνιστά μειονέκτημα σε επείγουσες περιπτώσεις, όπως η έμφραξη του μυοκαρδίου, όπου η διαδικασία λιποαναρρόφησης και η ελάχιστη επεξεργασία κρίνονται χρονοβόρες, και σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα, στα οποία ο αυτογενής πληθυσμός των κυττάρων είναι μειωμένος και συνίσταται αλλογενής χορήγηση.

4.4.5. Η ασφάλεια του SVF

Σε κλινική μελέτη όπου ελέγχθηκε η ασφάλεια της χρήσης SVF, δε διαπιστώθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες από την χρήση ενζυμικά απομονωμένου SVF, καθώς σε διάστημα 20 μηνών από την εφαρμογή του σε επεμβάσεις κοσμητικής χειρουργικής δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη λοιμώδους ή νεοπλασματικής εξεργασίας (Aronowitz *et al.* 2015). Επιπλέον, σε άλλη έρευνα που διερεύνησε την εφαρμογή SVF σε ηλικιωμένους ασθενείς (άνω των 80 ετών) για τη θεραπεία οστεοαρθρίτιδας, πέραν της άμεσης και αποτελεσματικής βελτίωσης της κλινικής εικόνας, σε χρονικό διάστημα 36 μηνών δεν καταγράφηκαν παρενέργειες σε αυτή την ευάλωτη ηλικιακή ομάδα του πληθυσμού (Michalek *et al.* 2019). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται από τις

περισσότερες έρευνες, στις οποίες κατόπιν χρήσης του SVF δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές, όπως ανάπτυξη φλεγμονώδους ή νεοπλασματικής εξεργασίας.

4.4.6. Προετοιμασία του SVF

Ο λιπώδης ιστός είναι ένας χαλαρός συνδετικός ιστός, η δομή και στήριξη του οποίου οφείλεται στα ινίδια κολλαγόνου. Η πρώτη μέθοδος απομόνωσης κυττάρων του λιπώδη ιστού σχεδιάστηκε από τον Rodbell (δεκαετία 1960) που χρησιμοποίησε λιπώδη ιστό αρουραίου. Κατόπιν θρυμματισμού, ακολούθησε ενζυμική πέψη με κολλαγενάση τύπου II και ύστερα από φυγοκέντρηση δημιουργήθηκε ένα πλατό κυττάρων που αποτελεί το στρωματικό αγγειακό κλάσμα (Rodbell 1966, Rodbell and Jones 1966).

4.4.6.1. Ενζυμική μέθοδος

Γενικά, ο λιπώδης ιστός αποτελείται από ώριμα λιποκύτταρα μέσα σε εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, όπου εντοπίζονται και δεκάδες άλλα κύτταρα. Η μηχανική θραύση (με χειρουργικά εργαλεία ή λεπίδα νυστεριού) και κατόπιν η χημική με κολλαγενάση και, στη συνέχεια, η επώαση σε φυσιολογική θερμοκρασία, ώστε να δράσει το ένζυμο, έχουν ως αποτέλεσμα την πέψη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την απελευθέρωση των κυττάρων. Αναλυτικότερα, ο λιπώδης ιστός ξεπλένεται δύο-τρεις φορές με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αίματος, και διατέμνεται σε μικρότερα τεμάχια με τη χρήση αποστειρωμένων λεπίδων. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος πέψης και θα ακολουθήσει επώαση στους 37°C. Η ενζυμική πέψη εξουδετερώνεται με την προσθήκη ίσου όγκου ειδικού διαλύματος Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) συμπληρωμένο με 10-20% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS). Το εναιώρημα κατόπιν φυγοκεντρείται συνήθως στα 400 g για πέντε λεπτά, με μεγάλη ποικιλία σε στροφές και χρόνο να αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Διαχωρίζεται, έτσι, σε τρία στρώματα, το λιπώδες περισσότερο επιφανειακά, το υδάτινο και το ίζημα. Ο υπερκείμενος πληθυσμός των ώριμων λιποκυττάρων αφαιρείται και το κυτταρικό ίζημα είναι το SVF, το οποίο μπορεί να τοποθετηθεί άμεσα σε σύριγγες και να εγχυθεί άμεσα στον ασθενή (Aronowitz *et al.* 2015, Marx *et al.* 2015, Markoski 2016, Pak *et al.* 2017).

4.4.6.2. Μη ενζυμικές μέθοδοι και αυτοματοποιημένες συσκευές

Το SVF μπορεί να απομονωθεί και χωρίς τη μεσολάβηση ενζύμων, αλλά με μηχανική θραύση του λιπώδους ιστού, ώστε να απελευθερωθούν τα στρωματικά κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή το SVF ονομάζεται ιστικό SVF (tissue SVF, tSVF) ενώ, κατόπιν ενζυμικής πέψης καλείται κυτταρικό SVF (cellular SVF, cSVF). Η ενζυμική μέθοδος με τη χρήση κολλαγενάσης αποτελεί το χρυσό κανόνα, όμως η δυσκολία στη μεθοδολογία και η ανάγκη για εργαστηριακό προσωπικό, καθώς και οι οδηγίες για ελάχιστη επεμβατικότητα από τους υπεύθυνους φορείς στρέφουν την αναζήτηση σε μηχανικές μεθόδους. Ωστόσο, η μη ενζυμική διαδικασία δεν αποδίδει έναν αμιγή κυτταρικό πληθυσμό, αλλά περισσότερο κυτταρικά συγκρίματα, ερυθρά αιμοσφαίρια και θραύσματα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Trivisonno *et al.* 2019). Αναφέρεται έως και 1000 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ζωντανών κυττάρων και ποσοστού ASCs στην ενζυμική μέθοδο και

αυτό οφείλεται στη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ενώ, εάν δε διασπαστεί, οι διάφορες πρόδρομες κυτταρικές μορφές εγκλωβίζονται στον περιαγγειακό χώρο στα μεγάλα θραύσματα του λιπώδους ιστού που απορρίπτεται (Aronowitz *et al.* 2015, Aronowitz *et al.* 2015). Οι μη ενζυμικές μέθοδοι, στοχεύουν στην ανάδευση και φυγοκέντρωση και, τελικά, τη διάσπαση του λιπώδους ιστού. Οι διαδικασίες αυτές, περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση και τη γαλακτωματοποίηση. Η συμπύκνωση, μπορεί να επιτευχθεί με διαχωρισμό λόγω βαρύτητας, φιλτράρισμα και φυγοκέντρωση και στοχεύει στην απομάκρυνση του περιττού νερού, λίπους και ερυθρών κυττάρων, ώστε να αυξηθεί η αναλογία των κυττάρων του SVF και το υλικό να μεταμοσχευθεί άμεσα (Kuno and Yoshimura 2015). Μια εναλλακτική μέθοδος προτάθηκε από τον Tonnard και συν. (2013) και αφορά στη συνεχή γαλακτωματοποίηση και το φιλτράρισμα του λιπώδους ιστού τουλάχιστον 30 φορές μεταξύ δύο συνδεδεμένων συρίγγων, ώστε να διαρραγούν τα ώριμα λιποκύτταρα. Το υλικό που προέκυψε από την παραπάνω τεχνική αποδείχθηκε πλούσιο σε CD34- ASCs και είναι αποτελεσματικό στην ανανέωση του δέρματος και στην επούλωση τραυμάτων και ουλών (Tonnard *et al.* 2013). Ο Tonnard εισήγαγε την έννοια του «νανο-λίπους». Το πρόθεμα «νάνο» δεν αφορά στις διαστάσεις του, αλλά χρησιμοποιείται συγκριτικά με το «μικρο-λίπος» που λαμβάνεται με μικροκάνουλες λιποαναρρόφησης διαμέτρου 14-21 G και χρησιμοποιείται στην αναγέννηση του δέρματος. Αρκετές παραλλαγές και συνδυασμοί των μεθόδων γαλακτωματοποίησης έχουν αναφερθεί, όπως και kit μιας χρήσης, με περιορισμένα δεδομένα (Trivisonno *et al.* 2019). Με την πάροδο των ετών έχουν δημιουργηθεί και αυτοματοποιημένες συσκευές που παράγουν αποτελεσματικά ενέσιμο SVF από το λιπώδη ιστό είτε με ενζυμική ή μηχανική διάσπασή του (Doi *et al.* 2013). Στα πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγεται η τυποποιημένη διαδικασία με σταθερό αποτέλεσμα χωρίς τον παράγοντα του ανθρώπινου λάθους, η εξάλειψη της ανάγκης για εξειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό, οι αποστειρωμένες συνθήκες του κλειστού περιβάλλοντος, με βασικό μειονέκτημα να είναι το υψηλό κόστος (Aronowitz *et al.* 2015).

4.4.6.3. Καλλιέργεια των ASCs

Για την περαιτέρω απομόνωση ASCs, το SVF τοποθετείται σε υπόστρωμα καλλιέργειας συμπληρωμένο με FBS και επωάζεται στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% διοξείδιο του άνθρακα. Τα δισκία καλλιέργειας ύστερα από 48 ώρες ξεπλένονται με PBS και τα κύτταρα που δεν προσκολλώνται απορρίπτονται. Το στρώμα που έχει προσκολληθεί θα συνεχίσει να καλλιεργείται και να πολλαπλασιάζεται σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά προς την επιθυμητή κατεύθυνση και, τελικά, καταλείπει τα ASCs (Marx *et al.* 2015). Για να επιτευχθεί οστεογενετική διαφοροποίηση εργαστηριακά, συστήνεται ενίσχυση του υποστρώματος με ασκορβικό οξύ, β-γλυκεροφωσφορικά, δεξαμεθαζόνη, 1,25 βιταμίνη D3 ή BMP-2. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητη η οστεογενετική διαφοροποίηση, καθώς όταν εμφυτευθούν σε οστίτη ιστό διαθέτουν την ικανότητα για προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και την επιθυμητή διαφοροποίηση (Torres-Torrillas *et al.* 2019).

4.5. Οι κλινικές εφαρμογές αυτόλογου SVF στον άνθρωπο

Η πρώτη κλινική χρήση αυτόλογου SVF στον άνθρωπο πραγματοποιήθηκε μόλις το 2004. Αφορούσε την εφαρμογή του σε ένα επτάχρονο παιδί με εκτεταμένα κρανιακά οστικά ελλείμματα όπου το SVF με κόλλα ινικής και αυτογενές σπογγώδες οστεομόσχευμα εφαρμόστηκε επιτυχώς (Lendeckel *et al.* 2004). Συγκεκριμένα, αφορούσε ένα κορίτσι με πολυσυντριπτικά κατάγματα των οστών του κρανίου και ενδοκρανιακή υπέρταση που αντιμετωπίστηκε αρχικά με αποσυμπίεστική κρανιεκτομή και σε δεύτερο χρόνο οστεοσύνθεση με μεταλλικές πλάκες τιτανίου. Ωστόσο, λόγω επίμονης οστεομυελίτιδας τα υλικά χαλάρωσαν και η οστεοποίηση δεν επετεύχθη, οπότε τα υλικά και ο ουλώδης ιστός αφαιρέθηκαν. Τοποθετήθηκαν μέσα σε ένα χειρουργικό χρόνο πορώδη φύλλα σταθεροποίησης, ως φραγμός για τους μαλακούς ιστούς και για μηχανική σταθερότητα, μαζί με σπογγώδες αυτομόσχευμα από τη λαγόνια ακρολοφία και SVF, που λήφθηκε από τη γλουτιαία χώρα και χρησιμοποιήθηκε μέσα σε δύο ώρες από τη λήψη του, σε συνδυασμό με κόλλα ινικής. Στις δύο και στις έξι εβδομάδες μετεγχειρητικά έγινε υπερηχοτομογραφικός έλεγχος όπου και διαπιστώθηκε η απουσία παθολογικών ευρημάτων και η σταθερότητα των υλικών. Στους τρεις μήνες μετεγχειρητικά διαπιστώθηκε με αξονική τομογραφία οστεοποίηση των ελλειμμάτων και συνέχεια ανάμεσά τους. Διαπιστώθηκε έτσι η ενίσχυση της δράσης του σπογγώδους μοσχεύματος από μη καλλιεργημένα ASCs. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι οι αυξητικοί παράγοντες του σπογγώδους οστεομοσχεύματος ενδεχομένως πυροδοτούν τη διαφοροποίηση των MSCs προς οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα (Lendeckel *et al.* 2004).

Το 2007-2008 το SVF χρησιμοποιήθηκε επιτυχημένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ασθενείς που λάμβαναν ακτινοθεραπεία (Rigotti *et al.* 2007, Yoshimura *et al.* 2008). Έκτοτε, εφαρμόστηκε στην ιατρική του ανθρώπου στην πολλαπλή σκλήρυνση ή σκλήρυνση κατά πλάκας (Riordan *et al.* 2009), στο νευροπαθητικό έλκος του διαβητικού άκρος ποδιού (Han *et al.* 2010), στην αποκατάσταση της λειτουργίας του μυοκαρδίου και τη μείωση του μεγέθους των εμφράκτων (Van Dijk *et al.* 2011, Khalpey *et al.* 2014, Comella *et al.* 2016), σε πρωκτικά συρίγγια (Borowski *et al.* 2012, Andjelkov *et al.* 2017), στη νόσο Crohn (Dalal *et al.* 2012), στην ιδιοπαθή ίνωση των πνευμόνων (Tzouveleakis *et al.* 2013), σε εγκαύματα, τραύματα και στην αναγέννηση του δέρματος (Tonnard *et al.* 2013, Atalay *et al.* 2014, Charles-De-Sá *et al.* 2015, Rigotti *et al.* 2016), σε ισχαιμία των άκρων (Parcero *et al.* 2014), στη βελτίωση της κινητικότητας των χεριών και του πόνου σε ασθενείς με σκληρόδερμα (Granel *et al.* 2015), στην αναγέννηση νεύρων (Mohammadi *et al.* 2015) και σε ασθενείς με εκφυλιστική δισκοπάθεια (Comella *et al.* 2017), στη στυτική δυσλειτουργία μετά από προστατεκτομή (Haahr *et al.* 2016) και στη γναθοχειρουργική σε συνδυασμό με οστικό υποκατάστατο φωσφορικού ασβεστίου (Prins 2016).

Ειδικότερα στην ορθοπαιδική του ανθρώπου το SVF βρίσκει εφαρμογή με ενθαρρυντικά αποτελέσματα, χωρίς παρενέργειες, στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου στις

οστεοαρθρίτιδες είτε κατόπιν έγχυσης είτε με χειρουργική εμφύτευση (Koh *et al.* 2013, 2014, 2015, Fodor and Paulseth 2016, Pak *et al.* 2017, 2018, Yokota *et al.* 2017, Michalek *et al.* 2019), στην αναγέννηση του οστίτη ιστού στην οστεονέκρωση της κεφαλής του μηριαίου (Pak 2011, 2012, Pak *et al.* 2014), στην αποκατάσταση καταγμάτων σε συνδυασμό με γέλη ινικής σε κοκκία κεραμικών (Saxer *et al.* 2016) και στην τενοντοπάθεια του αχίλλειου τένοντα, όπου συγκριτικά με τη χρήση PRP είχε ταχύτερα αποτελέσματα (DeGirolamo *et al.* 2016, Usulli *et al.* 2018). Η πρώτη εφαρμογή SVF σε οστεοαρθρικούς ασθενείς ήταν το 2011 σε συνδυασμό με υαλουρονικό οξύ, στους οποίους παρατηρήθηκε κλινική βελτίωση στο εύρος της κίνησης της παθολογικής άρθρωσης και αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου στη μαγνητική τομογραφία σε διάστημα παρακολούθησης τριών μηνών (Pak 2011).

4.6. Οι κλινικές εφαρμογές αυτόλογου SVF στην κτηνιατρική ορθοπαιδική

Η ευκολία στη λήψη, η εξοικονόμηση χρόνου, η ελάττωση των παρενεργειών των πολλαπλών χειρουργικών επεμβάσεων κατευθύνει την έρευνα και στην κτηνιατρική ορθοπαιδική στη χρήση SVF αντί για καλλιεργημένα κύτταρα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε παθήσεις των τενόντων και οστεοαρθρίτιδα.

Αναδρομική μελέτη σε σκύλους με τενοντίτιδα του υπερακάνθιου που αντιμετωπίστηκαν με συνδυασμό SVF και PRP έδειξε σημαντική βελτίωση στην ανάλυση της βάδισης και στη δομή του τένοντα του υπερακάνθιου (Canapp *et al.* 2016). Επίσης, σε πειραματικό επίπεδο, ο συνδυασμός SVF με κόλλα ινικής για αποκατάσταση ρήξης της κατάφυσης του τένοντα του υπερακάνθιου στο οστό επέφερε καλύτερα βιομηχανικά και ιστοπαθολογικά αποτελέσματα και ταχύτερη ανάρρωση από αποκλειστική χρήση κόλλας ινικής σε κουνέλια (Lu *et al.* 2018).

Μελέτες που έχουν γίνει σε σκύλους με χρόνια οστεοαρθρίτιδα του αγκώνα και του ισχίου σημείωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη θεραπευτική ικανότητα του SVF κατόπιν ενδοαρθρικής έγχυσης του (Black *et al.* 2007, 2008). Επιπλέον, η χρήση ικρίωματος κολλαγόνου με SVF και ASCs για την πλήρωση οστεοχόνδρινων ελλειμμάτων σε τροχίλια και μηριαίους κονδύλους αιγών διαπίστωσε ότι πρόκειται για ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο (Jurgens *et al.* 2013). Μια κλινική μελέτη σε σκύλους με δυσπλασία των ισχίων, όπου έγινε λήψη βουβωνικού λίπους και έγχυση στα σημεία βελονισμού περίξ των παθολογικών αρθρώσεων SVF (2×10^6 - 5×10^6 κύτταρα) και καλλιεργημένων ASCs (2×10^5 - 8×10^5 κύτταρα), διαπίστωσε αμεσότερα και καλύτερα αποτελέσματα στους σκύλους που χορηγήθηκε το SVF (Marx *et al.* 2014). Ωστόσο, ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πρόβατα κατόπιν διατομής του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου και εκτομής του έσω μηνίσκου, όπου ακολούθησε έγχυση SVF (1×10^7 μονοπύρηνια κύτταρα) και ASCs σε μεγάλη συγκέντρωση (5×10^7 κύτταρα) σε συνδυασμό με υαλουρονικό οξύ έδειξε καλύτερα αποτελέσματα στη διακοπή της εξέλιξης της οστεοαρθρίτιδας και στην αναγέννηση του χόνδρου με τη χρήση των καλλιεργημένων κυττάρων, αν και με τις δύο μεθόδους διαπιστώθηκαν θετικά αποτελέσματα (Lv *et al.* 2018).

4.7. Πειραματικές δοκιμές SVF σε οστικά ελλείμματα

Έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικές μελέτες για τη χρήση του αυτόλογου SVF στην αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων σε ζωικά πειραματικά μοντέλα και κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο.

Η χρήση SVF σε πειραματικό κρανιακό οστικό έλλειμμα μαζί με DBM (Rhee *et al.* 2010) και σε οστικό έλλειμμα του ζυγωματικού οστού (Toplu *et al.* 2017) σε αρουραίους ανέδειξε την οστεογενετική υπεροχή του έναντι ακυτταρικού ικρίωματος. Επιπλέον, η τοποθέτηση SVF σε ικρίωμα πολυλακτικού γλυκολικού οξέος (PLGA) σε οστικό έλλειμμα μακρού οστού (διάφυση ωλένης) σε κουνέλι είχε καλύτερο αποτέλεσμα από τη χρήση κενού ικρίωματος, όμως χειρότερο αποτέλεσμα από την χρήση οστεογενετικά διαφοροποιημένου SVF (Kim *et al.* 2012). Θετικό αποτέλεσμα διαπιστώθηκε και κατά την εφαρμογή του σε ικρίωμα χιτοζάνης για τοποθέτηση σε κυκλικό έλλειμμα γνάθου αρουραίων (Mohammadi and Amini 2015). Η τοποθέτηση φρέσκου αυτόλογου SVF σε πόρους HA με υδρογέλη ινικής σε καταγματική εστία φάνηκε επίσης να είναι μια διαδικασία ασφαλής που έχει ως αποτέλεσμα την αγγειογένεση και την οστεογένεση χωρίς την προσθήκη οστεοεπαγωγικού μέσου (Saxer *et al.* 2016). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση του συνδυασμού αυτού (SVF ανθρώπινης προέλευσης και HA) σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με οστικό έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους στη διάφυση του μηριαίου, όπου και παρατηρήθηκε γεφύρωση, ασβεστοποίηση και πάρος, ενώ στην ομάδα των μαρτύρων η δημιουργία ψευδοάρθρωσης. Κατόπιν, ο συνδυασμός αυτός (αυτόλογο SVF - HA) χρησιμοποιήθηκε σε ηλικιωμένους ασθενείς με κατάγματα κεντρικού βραχιονίου και οι ετήσιες βιοψίες έδειξαν σχηματισμό νέου οστού, καταδεικνύοντας την οστεογενετική ικανότητα του SVF, χωρίς να παρατηρηθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις ή επιπλοκές. Επιπλέον, η τοποθέτηση SVF σε νεκρή εξωκυττάρια θεμέλια ουσία χόνδρου αύξησε την οστεογενετική ικανότητά της τόσο σε έκτοπη τοποθέτηση όσο και κατά την τοποθέτηση σε οστικά ελλείμματα (Todorov *et al.* 2016). Μελέτη του 2018, στην οποία έγινε συγκριτική μελέτη του συνδυασμού SVF και κόκκων TCP με τον συνδυασμό ASCs σε TCP με την προσθήκη ή όχι μονοκυττάρων του αίματος σε οστικό έλλειμμα του μηριαίου κονδύλου αρουραίου, διαπιστώθηκε μεγαλύτερη οστική παραγωγή με το SVF στις τέσσερις και δέκα εβδομάδες από την τοποθέτηση και πλήρης κάλυψη του ελλείμματος. Η οστική ανάπτυξη στην ομάδα με τα ASCs ήταν μερική και κεντρομόλος από τα όρια του ελλείματος προς το κέντρο του, χωρίς ωστόσο να αναπτύσσεται οστεοειδές στο κέντρο, αν και σαφώς από την ομάδα των μαρτύρων. Η διαδικασία της ασβεστοποίησης των παραπάνω συνδυασμών *in vitro* οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει διαφορετικές ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις στα μακροφάγα του ζωντανού οργανισμού (Zhang *et al.* 2018). Βέβαια, σε άλλη μελέτη, η χρήση SVF και ASCs με κόλλα ινικής σε οστεοεπαγωγικό ικρίωμα ακυτταρικής θεμέλιας ουσίας οστών και πολυκαπρολακτόνης για την πλήρωση

κρανιακών οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους σε ποντικούς κατέγραψε καλύτερη κάλυψη του ελλείμματος από τα καλλιεργημένα MSCs (Nyberg *et al.* 2019).

Η πρώτη πειραματική εφαρμογή στον άνθρωπο ήταν σε συνδυασμό με κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου (BCP και β -TCP) για την ανύψωση του εδάφους του ιγμόρειου άντρου. Διαπιστώθηκε ότι η χρήση SVF του λιπώδους ιστού που λαμβάνεται και τοποθετείται με κεραμικά σε οστικό έλλειμμα σε ένα διεγχειρητικό χρόνο είναι μια διαδικασία που κρίνεται σκόπιμη, ασφαλής και αποτελεσματική για την οστική αναγέννηση, καθώς δημιουργήθηκε μεγαλύτερος όγκος νέου οστού στα ελλείμματα που προστέθηκε (Prins *et al.* 2016). Αυτό αποδόθηκε στη διαφοροποίηση των ASCs του SVF προς οστεοκύτταρα ή στην αυξημένη παρακρινή και οστεοεπαγωγική δράση των πρόδρομων κυτταρικών μορφών που περιέχονται στο SVF. Αντίστοιχη αποτελέσματα προέκυψαν και από άλλη μελέτη όπου συσχετίστηκε ο βαθμός οστεογένεσης με την αγγειογένεση, οι οποίες διεγείρονται από την προσθήκη SVF σε κεραμικά φωσφορικού ασβεστίου (Farré-Guasch *et al.* 2018). Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε η υπεροχή του SVF σε σχέση με τα ASCs όταν τοποθετήθηκε σε ξενομόσχευμα γεγονός που αποδόθηκε στην ετερογένεια και τη συνεργασία των κυτταρικών πληθυσμών και τη συνέργεια μεταξύ MSCs και μικροπεριβάλλοντος (Roato *et al.* 2018). Ο Hivernaud *και συν.* (2019) σύγκριναν τη χρήση ανθρώπινου σπογγώδους οστεομοσχεύματος, το συνδυασμό BCP με ανθρώπινο κλάσμα μυελού των οστών, το συνδυασμό BCP με ανθρώπινο SVF και το συνδυασμό μυελού των οστών αρουραίων με BCP για την πλήρωση κρανιακών οστικών ελλειμμάτων σε αρουραίους, ώστε να διερευνήσουν τυχόν καλύτερη διεγχειρητική επιλογή για οστική αναγέννηση. Το σπογγώδες οστό αποδείχτηκε το βιοϊλικό επιλογής, καθώς στις οκτώ εβδομάδες μετεγχειρητικά είχε πληρωθεί το 43,2% του ελλείμματος, ενώ εστίες οστεοποίησης ήταν ορατές γύρω από τα μικροσφαιρίδια του BCP σε κάθε τεχνική. Διαπιστώθηκε οστεογενετική ικανότητα και στο SVF και στον μυελό των οστών από τη χρήση τους ως ξενομόσχευμα που αποδόθηκε στην πληθώρα MSCs και τις αγγειογενετικές ιδιότητές τους, ωστόσο το σπογγώδες ξενομόσχευμα είχε το καλύτερο αποτέλεσμα στην πλήρωση του κρανιακού ελλείμματος (Hivernaud *et al.* 2019).

4.8. Περιορισμοί και κανονισμοί στη χρήση των MSCs και του SVF

Η χρήση SVF στις ΗΠΑ ρυθμίζεται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA). Χαρακτηρίζεται ως φάρμακο ή ως βιολογικό προϊόν ή συσκευή. Ο παραπάνω διαχωρισμός εξαρτάται από τον τρόπο παραγωγής (εάν συμβαίνει ταυτοχρόνως λήψη και εφαρμογή) και υπόκειται σε διαφορετικό κάθε φορά κανονισμό. Συγκεκριμένα, τα ASCs και το ενζυμικά απομονωμένο SVF υπόκεινται στους περιορισμούς για τα βιολογικά προϊόντα, καθώς η χρήση της κολλαγενάσης ξεπερνάει το όριο της ελάχιστης τροποποίησης (FDA 2017). Στην Ιαπωνία, το SVF χαρακτηρίζεται ως χαμηλού ρίσκου προϊόν και η χρήση του πρέπει να αναφέρεται στο Υπουργείο Υγείας, Εργασίας και Πρόνοιας, ενώ στην Αυστραλία η αυτόλογη χρήση του δεν υπόκειται σε περιορισμούς (Dykstra *et al.* 2017).

Η χρήση των MSCs στον άνθρωπο στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης υπόκειται σε περιορισμούς από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA), ο οποίος παρακολουθεί τις επιστημονικές εξελίξεις και είναι υπεύθυνος για την πιστοποίηση της χρήσης τους. Τα MSCs κατατάσσονται ως προϊόν προηγμένης φαρμακευτικής θεραπείας (Advanced Therapy Medicine Products, ATMPs). Ωστόσο, σύμφωνα με την Οδηγία 2004/23/EC και 1394/2007, όταν το SVF χρησιμοποιείται αυτόλογο, η λήψη και χορήγησή του γίνεται στον ίδιο χειρουργικό χρόνο και η λειτουργία των κυττάρων δεν τροποποιείται, τότε η κυτταρική θεραπεία δε θεωρείται ATMP. Ωστόσο, είναι ATMP σε ετερόλογη εφαρμογή ή όταν συνδυαστεί με άλλα κύτταρα, όπως τα MSCs (Dykstra *et al.* 2017).

Στην κτηνιατρική, τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική δεν έχουν θεσπιστεί περιορισμοί όσον αφορά στη χρήση MSCs (Arnhold and Wenisch 2015).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Χειρουργική Κλινική, σε συνεργασία με την Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατόπιν έγκρισης του ερευνητικού πρωτοκόλλου από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας (Αρ. πρωτ: 273378/12.07.21).

1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 24 ενήλικα, θηλυκά, πρόβατα μιγάδες, διάφορων ελληνικών φυλών, τα οποία με τυχαίο τρόπο εντάχθηκαν σε 4 ομάδες των 6 ζώων η καθεμιά. Η ηλικία των ζώων ήταν 4-5 ετών και το σωματικό βάρος τους $67,83 \pm 3,14$ κιλά. Τα ζώα φιλοξενούνταν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών στις εγκαταστάσεις της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κατά την άφιξή τους πραγματοποιήθηκε ενδελεχής έλεγχος της κατάστασης της υγείας τους και τους χορηγήθηκε αντιπαρασιτική αγωγή. Πριν από την έναρξη των πειραματισμών παρέμειναν στο χώρο ενσταυλισμού, εμβαδού περίπου 6 με 7m² ανά ζώο, για ένα μήνα με σκοπό την προσαρμογή τους. Διαβιούσαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες με φυσικό φωτισμό, συνεχή αερισμό και σταθερή υγρασία και θερμοκρασία ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), μακριά από εστίες ηχορύπανσης και καταπόνησης. Σε κάθε ζώο αναλογούσε 1 kg αποξηραμένου τριφυλίου και 800 g συμπυκνωμένης ζωοτροφής εμπορικής παραγωγής (Ζωοτροφές Κόκκας, Βελεστίνο, Ελλάδα) δύο φορές την ημέρα ενώ είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό.

Πριν από την έναρξη των πειραματισμών και προκειμένου να διαπιστωθεί η καλή υγεία των ζώων πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξετάσεις: γενική κλινική εξέταση (Lovatt 2010), ορθοπαιδική εξέταση (Kaler *et al* 2009), έλεγχος των χηλών και ποδοκομία (Hodgkinson 2010), γενική εξέταση αίματος (προσδιορισμός αιματοκρίτη, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, λευκοκυτταρικός τύπος) (Polizopoulou 2010). Τα ζώα βρέθηκαν υγιή, χωρίς προβλήματα στα άκρα ή αιματολογικές διαταραχές. Στη συνέχεια ακτινογραφήθηκε το μετατόρσιό τους, σε δύο λήψεις με διαφορά 90° μεταξύ τους (προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια) και έγινε υπερηχοτομογραφικός έλεγχος του οστού αλλά και της αγγείωσης της περιοχής, για να επιβεβαιωθεί η σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών, να διερευνηθούν τυχόν δυσμορφίες στη μορφολογία του οστού και των εκατέρωθεν αρθρώσεων ή τυχόν μεταβολή της αιμάτωσης που να υποδεικνύει φλεγμονή ή άλλη παθολογική κατάσταση του περιφερικού άκρου.

2. Σύνοψη πειραματικού πρωτοκόλλου

Υπό γενική αναισθησία και επισκληρίδια αναλγησία δημιουργήθηκε οστικό έλλειμμα ολικού πάχους στη μεσότητα της διάφυσης του δεξιού μεταταρσίου και στα 24 πρόβατα. Η επιλογή του δεξιού άκρου ήταν τυχαία. Μετά την οστεκτομή το μετατάρσιο σταθεροποιήθηκε με μεταλλική πλάκα και κοχλίες διαμέτρου 3,5 mm κατάλληλου μήκους. Τα ζώα τυχαία τοποθετήθηκαν στις 4 ομάδες και το κάθε οστικό έλλειμμα πληρώθηκε με ένα από τα βιοϋλικά. Συγκεκριμένα, στην ομάδα Α (ομάδα μαρτύρων) τοποθετήθηκε πάστα νανοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη (HA), στην ομάδα Β η πάστα HA αναμίχθηκε με φρέσκο αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα, στην ομάδα Γ αυτόλογο στρωματικό αγγειακό κλάσμα λιπώδους ιστού (SVF) τοποθετήθηκε στο έλλειμμα ενώ έπειτα από ανάμειξή του με το ικρίωμα HA και, τέλος, στην ομάδα Δ το ικρίωμα HA αναμείχθηκε τόσο με οστεομόσχευμα όσο και με SVF πριν από την εφαρμογή του στο σημείο του ελλείμματος (Πίνακας 1). Ακολούθησε συρραφή του τραύματος και τοποθέτηση εκμαγείου με το άκρο σε στηρικτική στάση. Κατόπιν, για χρονικό διάστημα τριών μηνών, κάθε ζώο υποβάλλονταν σε κλινικό, ακτινολογικό και υπερηχοτομογραφικό έλεγχο του μεταταρσίου του δεξιού άκρου, και τελικά πραγματοποιήθηκε ευθανασία και λήψη οστού για ιστοπαθολογική εκτίμηση.

Ομάδα	Διεγχειρητική λήψη λιπώδους ιστού για απομόνωση SVF	Διεγχειρητική συλλογή σπογγώδους οστεομοσχεύματος	Υλικό πλήρωσης του οστικού ελλείμματος
A (6 ζώα)	Όχι	Όχι	Πάστα HA
B (6 ζώα)	Όχι	Ναι	Αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα με πάστα HA
Γ (6 ζώα)	Ναι	Όχι	Αυτόλογο SVF με πάστα HA
Δ (6 ζώα)	Ναι	Ναι	Συνδυασμός αυτόλογου σπογγώδους οστεομοσχεύματος, με SVF και πάστα HA

Πίνακας 1: Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης.

3. Υλικά

3.1. Υλικά οστεοσύνθεσης

Επιλέχθηκε κτηνιατρική μεταλλική πλάκα από ανοξείδωτο ατσάλι 3,5 mm δυναμικής συμπίεσης 10 οπών (DCP 3,5 mm10-hole, Veterinary Instrumentation, Sheffield, United Kingdom).

3.2. Πάστα Νανοκρυσταλλικού Υδροξυαπατίτη

Χρησιμοποιήθηκε συνθετικό υποκατάστατο οστού από υδροξυαπατίτη σε μορφή πάστας (Nano HA Bone Paste, Veterinary Instrumentation) ως διάλυμα 38% νανοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη σε φυσιολογικό ορό. Διατίθεται σε αποστειρωμένη συσκευασία, σε σωληνάριο των 2,5 ml.

3.3. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του SVF

- Κολλαγενάση Τύπου I (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA)
- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) (Roche Diagnostics GmbH, Germany)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2), $\geq 96\%$ άνυδρο (Honeywell Fluka, Germany)
- Θρεπτικό υπόστρωμα Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Sigma-Aldrich, UK)
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS) (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA)
- Χρωστική Trypan blue 0,4% (Gibco™, Life Technologies Corporation NY, USA)
- Φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA)
- Φιαλίδια φυγοκέντρησης 50 ml (Thermo Fischer Scientific, NY) (Εικόνα1).



Εικόνα 1: Αντιδραστήρια για απομόνωση SVF.

4. Εκτέλεση των πειραματισμών

4.1. Αναισθητικό πρωτόκολλο, προετοιμασία πειραματόζων, προεγχειρητική, διεγχειρητική και μετεγχειρητική αγωγή

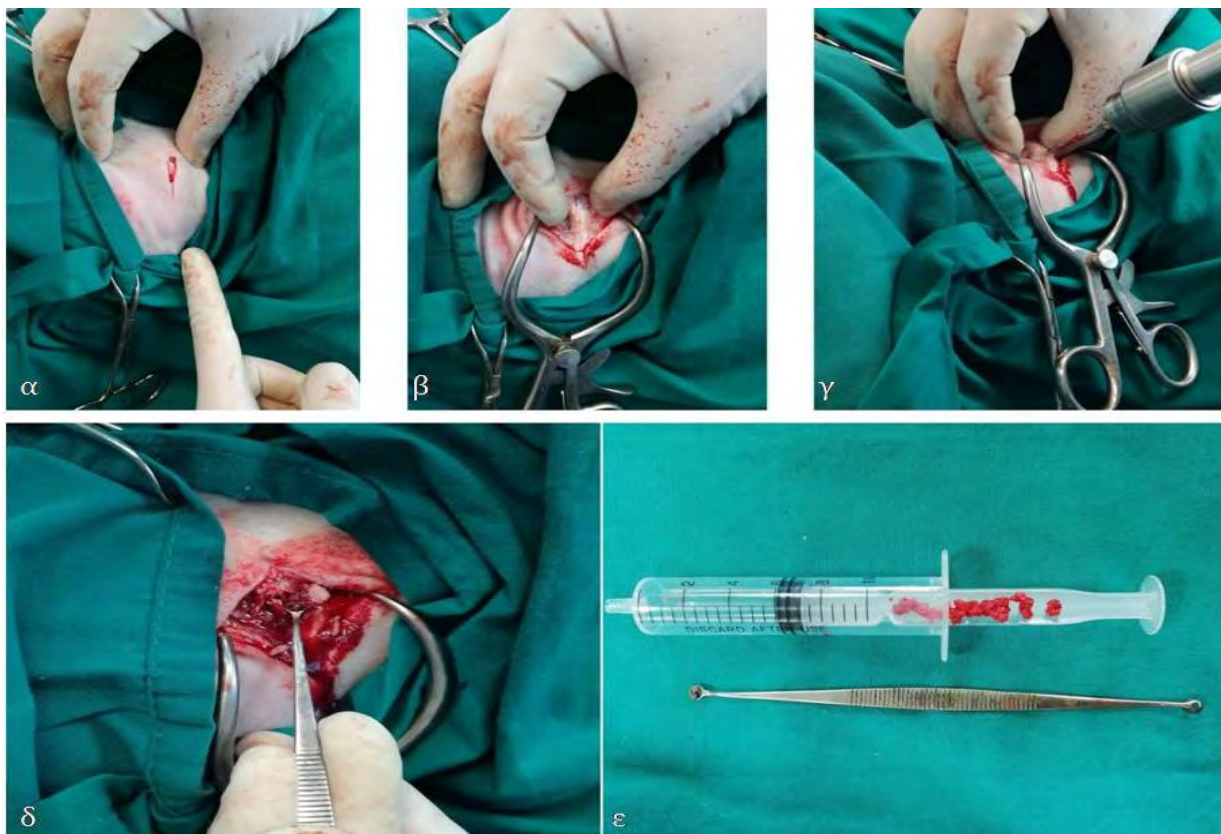
Όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις και οι μετεγχειρητικοί χειρισμοί στα ζώα της μελέτης πραγματοποιήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Προεγχειρητικά το κάθε ζώο υποβλήθηκε σε δωδεκάωρη στέρηση τροφής (Seddighi and Doherty 2016). Την ημέρα της εκτέλεσης της χειρουργικής επέμβασης πραγματοποιούνταν προνάρκωση με ενδομυϊκή έγχυση συνδυασμού μεδετομιδίνης (Sedator, Eurovet, Animal Health BV, Netherlands), σε δόση 10μg/kg σωματικού βάρους (Σ.Β.), μιδαζολάμης (Dormicum, Roche Pharma, Basel, Switzerland), σε δόση 0,2 mg/kg Σ.Β. και μορφίνης (Morfina cloridrato, Molteni Pharmaceutici, Scandicci, Italy), σε δόση 0,3 mg/kg Σ.Β. Με το ζώο υπό ηρέμηση και αναλγησία, ήταν δυνατή η ανώδυνη λήψη του λιπώδους ιστού (ομάδες Γ και Δ, Βλέπε Τμήμα 4.2.2), ώστε η εργαστηριακή απομόνωση SVF να τελεστεί παράλληλα με τη δημιουργία οστικού ελλείμματος σε ένα χειρουργικό χρόνο. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν φλεβοκαθετήρας στην κεφαλική φλέβα για ενυδάτωση των ζώων με ισότονο κρυσταλλοειδές διάλυμα (Lactated Ringer's solution, ΒΙΟΣΕΡ ΑΕ, Greece) και ακολουθούσε ενδοφλέβια χορήγηση προποφόλης (Propofol/Lipuro inj.em.in 1%, 20 ml, B. Braun Melsungen, Germany), σε δόση 1-2 mg/kg Σ.Β., και υδροχλωρικής κεταμίνης (Ketaset, Zoetis, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA), σε δόση 1,5 mg/kg Σ.Β., για την εγκατάσταση της γενικής αναισθησίας. Έπειτα, γινόταν η τοποθέτηση τραχειοσωλήνα κατάλληλης διαμέτρου με τη βοήθεια λαρυγγοσκοπίου, με τα πειραματόζωα τοποθετημένα σε στερνική κατάκλιση με ανυψωμένη την κεφαλή και τον τράχηλο σε πλήρη έκταση. Ο τραχειοσωλήνας συνδεόταν με κυκλικό ημίκλειστο αναπνευστικό κύκλωμα επανεισπνοής για τη διατήρηση της γενικής αναισθησίας με μίγμα ισοφλουρανίου 1,5-2% (Vetflurane, Virbac, Carros, France) και οξυγόνου με ροή 1-1,5 l/min. Για πρόσθετη αναλγησία εφαρμόζονταν πρόσθια επισκληρίδια αναλγησία στο μεσοσπονδύλιο διάστημα μεταξύ του τελευταίου οσφυϊκού και του πρώτου ιερού σπονδύλου, χρησιμοποιώντας διάλυμα υδροχλωρικής λιδοκαΐνης (Xylozan 2%w/v Demo SA, Greece), σε δόση 2 mg/kg Σ.Β., και μορφίνης (Morfina cloridrato, Molteni Pharmaceutici), σε δόση 0,1 mg/kg Σ.Β. Επιπλέον έγινε ενδοφλέβια έγχυση μελοξικάμης (Metacam 20 mg/ ml, Boehringer Ingelheim, Auckland, New Zealand), σε δόση 0,3 mg/kg Σ.Β., 30 λεπτά πριν από τη λήξη της χειρουργικής επέμβασης και επανάληψή της υποδορίως στην ίδια δόση μετά από 72 ώρες.

Πριν από την έναρξη της επέμβασης χορηγήθηκε ενέσιμα οξυτετρακυκλίνη μακράς δράσης (Tenaline LA 20%, Ceva, Libourne, France), σε δόση 20 mg/kg Σ.Β., ενδομυϊκά και επαναλήφθηκε μετά τις 72 ώρες, καθώς και λικνομυκίνη-σπεκτινομυκίνη (Linco-Spectinomycin, Alfasan, Agroseed Candilidis SA, Attiki, Greece), σε δόσεις 5 mg/kg Σ.Β. και 10 mg/kg Σ.Β. αντιστοίχως, για επτά συνεχείς ημέρες μετεγχειρητικά.

4.2. Χειρουργικές επεμβάσεις

4.2.1. Λήψη αυτογενούς σπογγώδους οστεομοσχεύματος

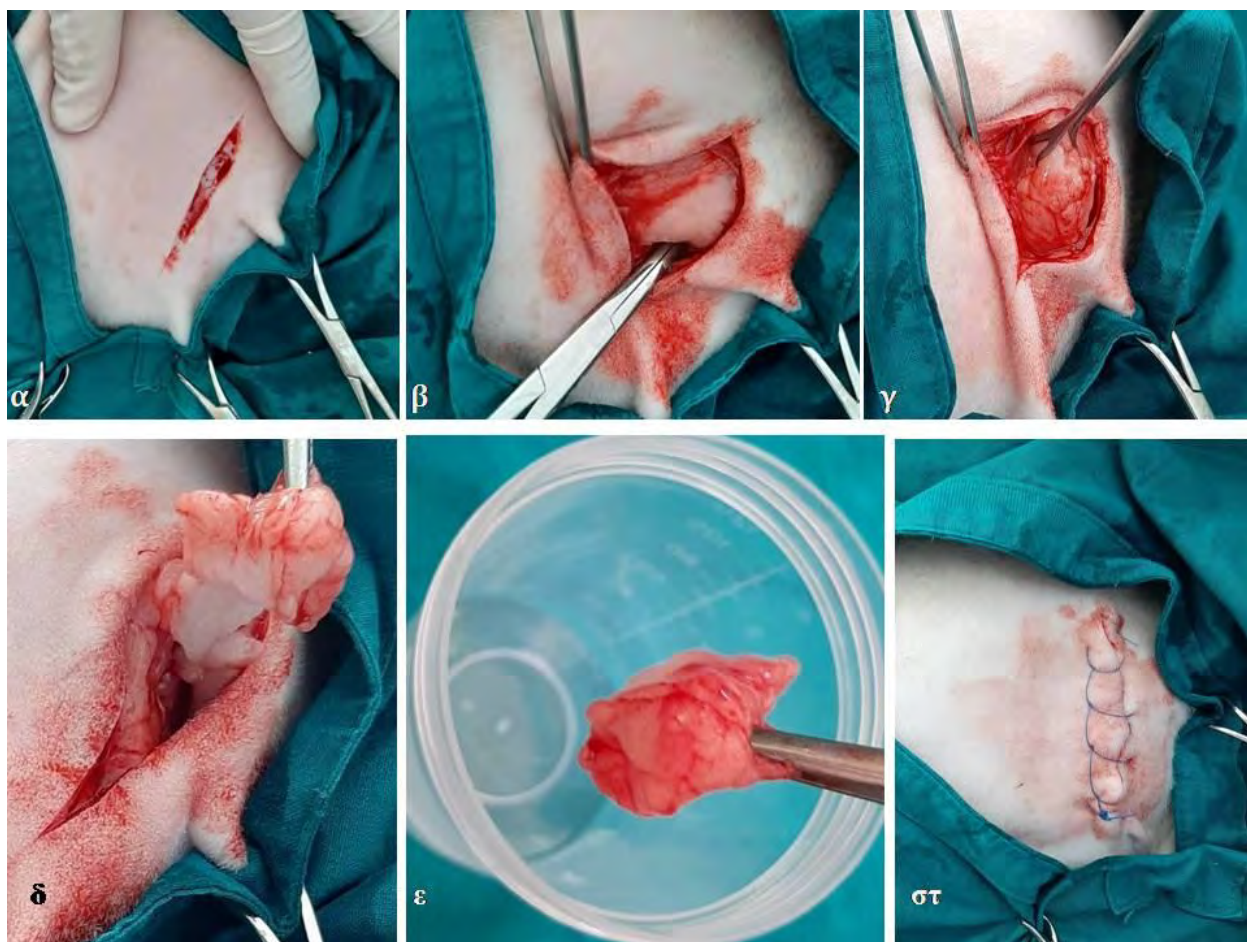
Στα ζώα των ομάδων Β και Δ, αμέσως μετά την εγκατάσταση της γενικής και της επισκληρίδιας αναισθησίας πραγματοποιήθηκε η λήψη αυτόλογου σπογγώδους οστεομοσχεύματος από την ετεροπλάγια λαγόνια ακρολοφία, με το ζώο τοποθετημένο σε δεξιά πλάγια κατάκλιση (Εικόνα 2). Για την αντισηψία του χειρουργικού πεδίου, κατόπιν κουρέματος της προβλεπόμενης περιοχής, χρησιμοποιήθηκε αντισηπτικό σαπούνι γλυκονικής χλωρεξιδίνης (VetScrub CHX, Medimark Scientific, Kent) και αλκοολικό διάλυμα χλωρεξιδίνης 1% (Hibitane cut.sol 5%, Cana AE, Greece). Πραγματοποιήθηκε ελλειπτική τομή του δέρματος και των υποδόριων ιστών κατά μήκος της λαγόνιας ακρολοφίας. Με οστεοτρύπανο (drill bit, Veterinary Instrumentation) διανοίχθηκαν τρεις οπές με απόσταση μερικών χιλιοστών μεταξύ τους στο φλοιό της πτέρυγας του λαγονίου οστού, οι οποίες διευρύνθηκαν με οστεοτόμο Ronguer και με ορθοπαιδικό κοχλιάριο απόξεσης λήφθηκε σπογγώδες οστεομόσχευμα. Το μόσχευμα διατηρούνταν εντός αποστειρωμένης σύριγγας έως ότου χρησιμοποιηθεί στο έλλειμμα. Ακολουθούσε συρραφή του χειρουργικού τραύματος με υποδόρια συνεχή ραφή με απορροφήσιμο μονόκλωνο ράμμα πολυγλυκαπρόνης (Monocryl 2-0, Ethicon, Johnson & Johnson International, Belgium) και, κατόπιν, με συνεχή interlocking ραφή στο δέρμα με μη απορροφήσιμο μονόκλωνο ράμμα πολυαμιδίου (Ethilon 0, Ethicon, Johnson & Johnson International, Belgium).



Εικόνα 2: Προσπέλαση (α-β) και λήψη σπογγώδους οστεομοσχεύματος από τη λαγόνια ακρολοφία (γ-ε).

4.2.2. Λήψη λιπώδους ιστού και απομόνωση Στρωματικού Αγγειακού Κλάσματος του Λιπώδους Ιστού (SVF)

Στα ζώα των ομάδων Γ και Δ (υπό ηρέμηση και αναλγησία) κουρεύτηκε η οσφυοϊερή χώρα έως και τη βάση της ουράς και ακολούθησε η ενδεδειγμένη αντισηψία του χειρουργικού πεδίου με σαπούνι και αλκοολικό διάλυμα χλωρεξιδίνης. Πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος (μήκους ~ 5 cm) και διαχωρισμός των υποδόριων ιστών. Στην περιοχή υπήρχε άφθονο υποδόριο λίπος, οπότε παρασκευάστηκε και συλλέχθηκε τμήμα λιπώδους ιστού που άσηπτα τοποθετήθηκε σε στείρο ουροσυλλέκτη (Εικόνα 3). Ακολούθησε συρραφή του υποδόριου ιστού και του δέρματος.



Εικόνα 3: Διαδικασία λήψης λιπώδους ιστού από την οσφυοϊερή χώρα (α-ε) και συρραφή τραύματος (στ).

Υπό συνθήκες αυστηρής ασηψίας πραγματοποιήθηκε η σύνθλιψη του λίπους προκειμένου να απομονωθεί το στρωματικό αγγειακό κλάσμα (SVF). Τα σκεύη και οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί.

Τα διαλύματα πέψης και εξουδετέρωσης είχαν παρασκευαστεί πριν την λήψη του λιπώδους ιστού ως ακολούθως και πέρασαν από φίλτρο 0,2 μm για τη συγκράτηση τυχόν μικροσκοπικών μολυσματικών παραγόντων (Εικόνα 4):

Διάλυμα πέψης:

100 ml Φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA)

0,1 g Κολλαγενάση Τύπου I (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA)

1 g Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

200 μl από 200 mM Χλωριούχο ασβέστιο (Honeywell Fluka, Germany)

Τα ανωτέρω υλικά ανακινήθηκαν σχολαστικά μέχρι ομογενοποίησής τους και στη συνέχεια πέρασαν από φίλτρο αναρρόφησης.

Διάλυμα εξουδετέρωσης:

900 ml Θρεπτικό υπόστρωμα DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, UK)

100 ml Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS) (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA).



Εικόνα 4: Προετοιμασία (α), φιλτράρισμα των διαλυμάτων πέψης (β) και εξουδετέρωση του διαλύματος (γ).

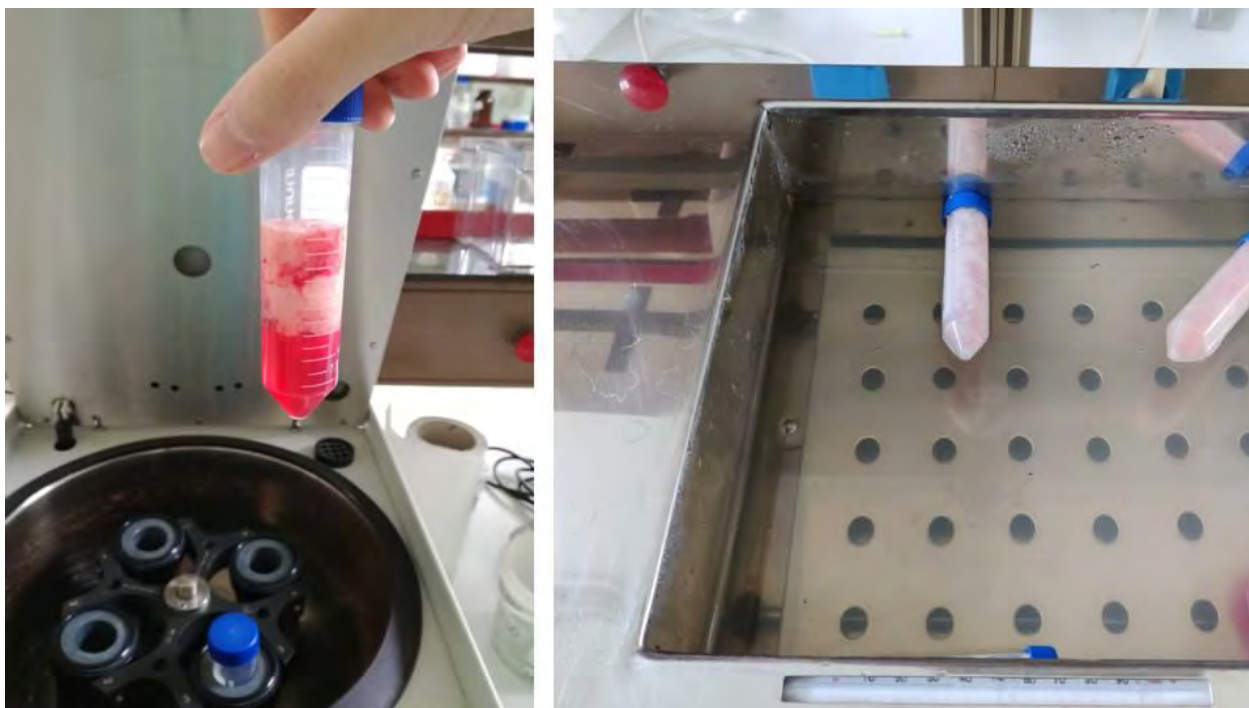
Από το τεμάχιο του λίπους που συλλέχθηκε από κάθε ζώο, λήφθηκαν 15 ml και τοποθετήθηκαν σε στείρο φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 50 ml (Thermo Fischer Scientific, NY). Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις του λιπώδους ιστού τρεις συνεχόμενες φορές με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) (Gibco™, Life Technologies Corporation, NY, USA) ίσου όγκου, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αίματος και, ακολούθως, πραγματοποιήθηκε διατομή του σε μικρότερα τεμάχια με τη χρήση αποστειρωμένης λεπίδας (Εικόνα 5). Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $300 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διαχωριστεί το λιπώδες στρώμα που επέπλεε, το έκπλυμα (μεσαία φάση) και το κυτταρικό ίζημα στον πυθμένα του φιαλιδίου. Το έκπλυμα αναρροφήθηκε και απορρίφθηκε, ενώ, στο υλικό που απέμεινε, προστέθηκε διάλυμα πέψης 0,1% κολλαγενάση τύπου I (Gibco™,

Life Technologies Corporation, NY, USA) ίσου όγκου με τον αρχικό του λιπώδους ιστού (15 ml) και ακολούθησε επώαση στους 37 ° C για 1 ώρα σε υδατόλουτρο (Εικόνα 6). Ανά δεκάλεπτο του χρόνου επώασης πραγματοποιούνταν έντονη ανάδυσή του για ένα λεπτό, προκειμένου να διευκολυνθεί η πέψη του διαλύματος. Η ενζυμική πέψη τερματίστηκε με την προσθήκη ίσου όγκου ειδικού διαλύματος εξουδετέρωσης Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12, Sigma-Aldrich, UK) συμπληρωμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS, GibcoTM, Life Technologies Corporation, NY, USA) και την επακόλουθη φυγοκέντρωση στα 300 × g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 7). Το υπερκείμενο κλάσμα αναρροφήθηκε και απορρίφθηκε οπότε και προέκυψαν 5 ml διαλύματος και κυτταρικό ίζημα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10 ml PBS και επαναλήφθηκαν οι διαδικασίες εξουδετέρωσης και έκπλυσης με PBS τουλάχιστον δύο φορές, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ερυθροκύτταρα καθώς και άλλα συστατικά του υπερκείμενου κλάσματος. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε αποτελεί το SVF. Τέλος, πριν από τη χρήση του, από το τελικό προϊόν κάθε ζώου λήφθηκε δείγμα 10 μl, όπου προστέθηκαν 10 μl χρωστικής Trypan blue 0,4% (GibcoTM, Life Technologies Corporation, NY, USA) και τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση του αριθμού των ζωντανών μονοκυττάρων του SVF (Εικόνα 8). Ο συνολικός αριθμός μονοκυττάρων ανά ml SVF προέκυψε από τον τύπο:

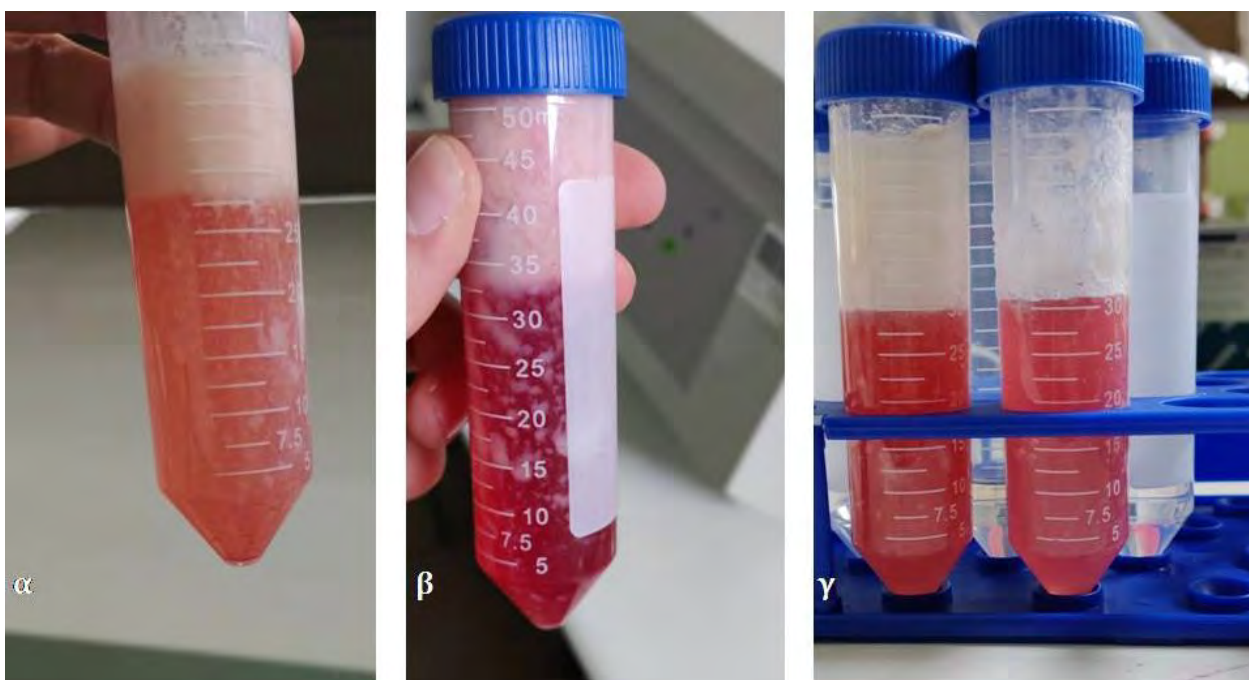
$$\frac{\text{αριθμός των κυττάρων}}{4} \times 2 \times 10000$$



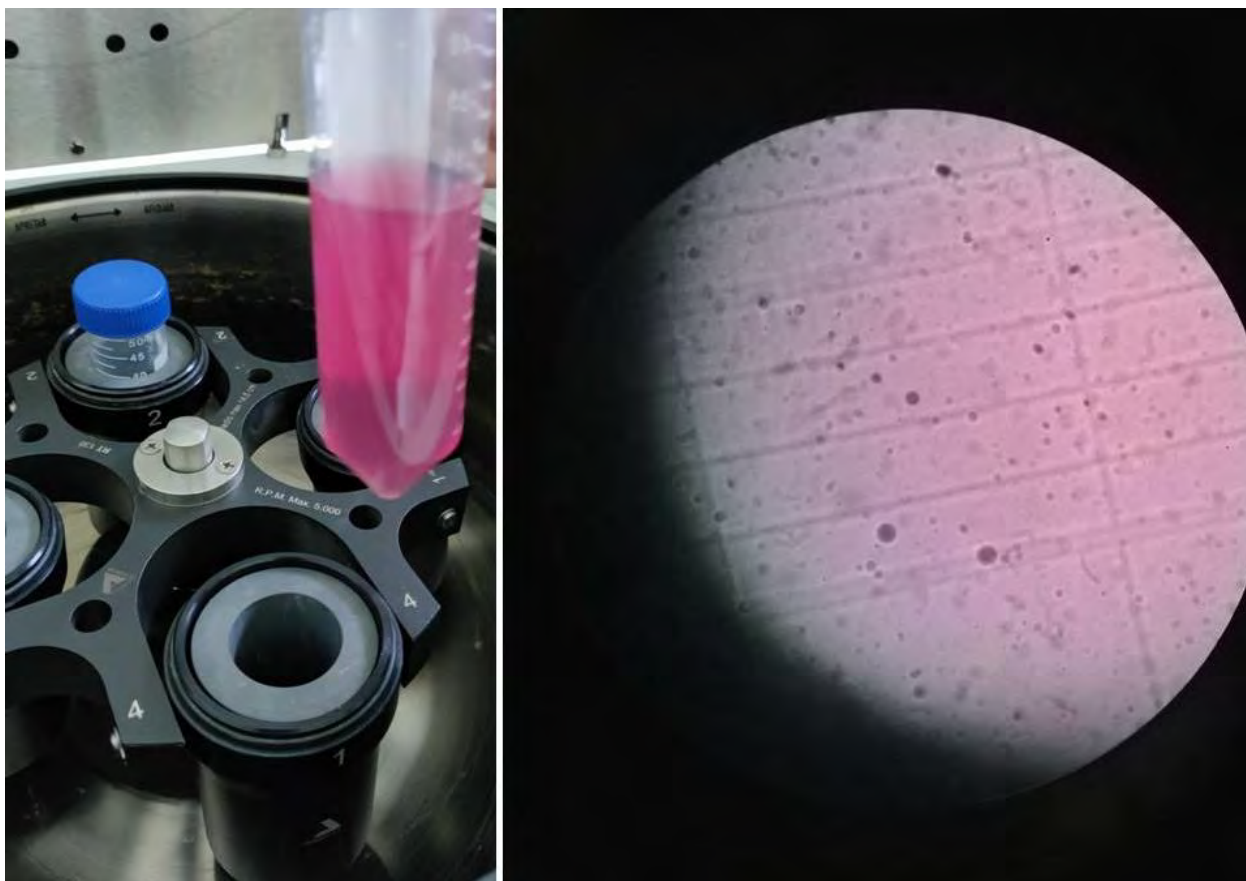
Εικόνα 5: Λιπώδης ιστός πριν (αριστερά) και μετά τη διατομή και τις πλύσεις με PBS (δεξιά).



Εικόνα 6: Φυγοκέντρωση του υλικού, προσθήκη του διαλύματος κολλαγενάσης και επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.



Εικόνα 7: Το υλικό αμέσως μετά τη διάσπαση (α), την προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης DMEM (β) και μετά την επανάληψη των διαδικασιών εξουδετέρωσης και πλύσεων (γ).

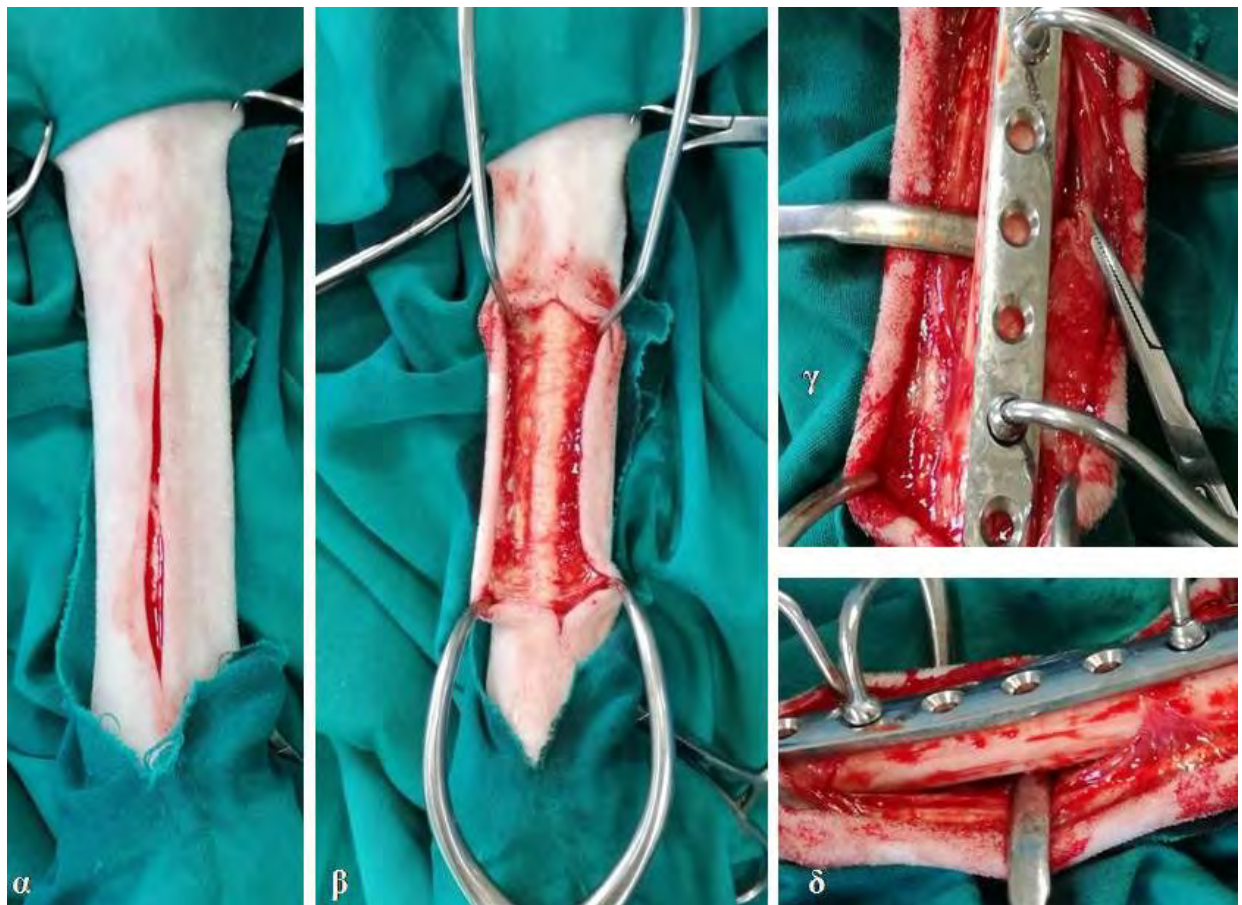


Εικόνα 8: Τελικό αποτέλεσμα SVF.

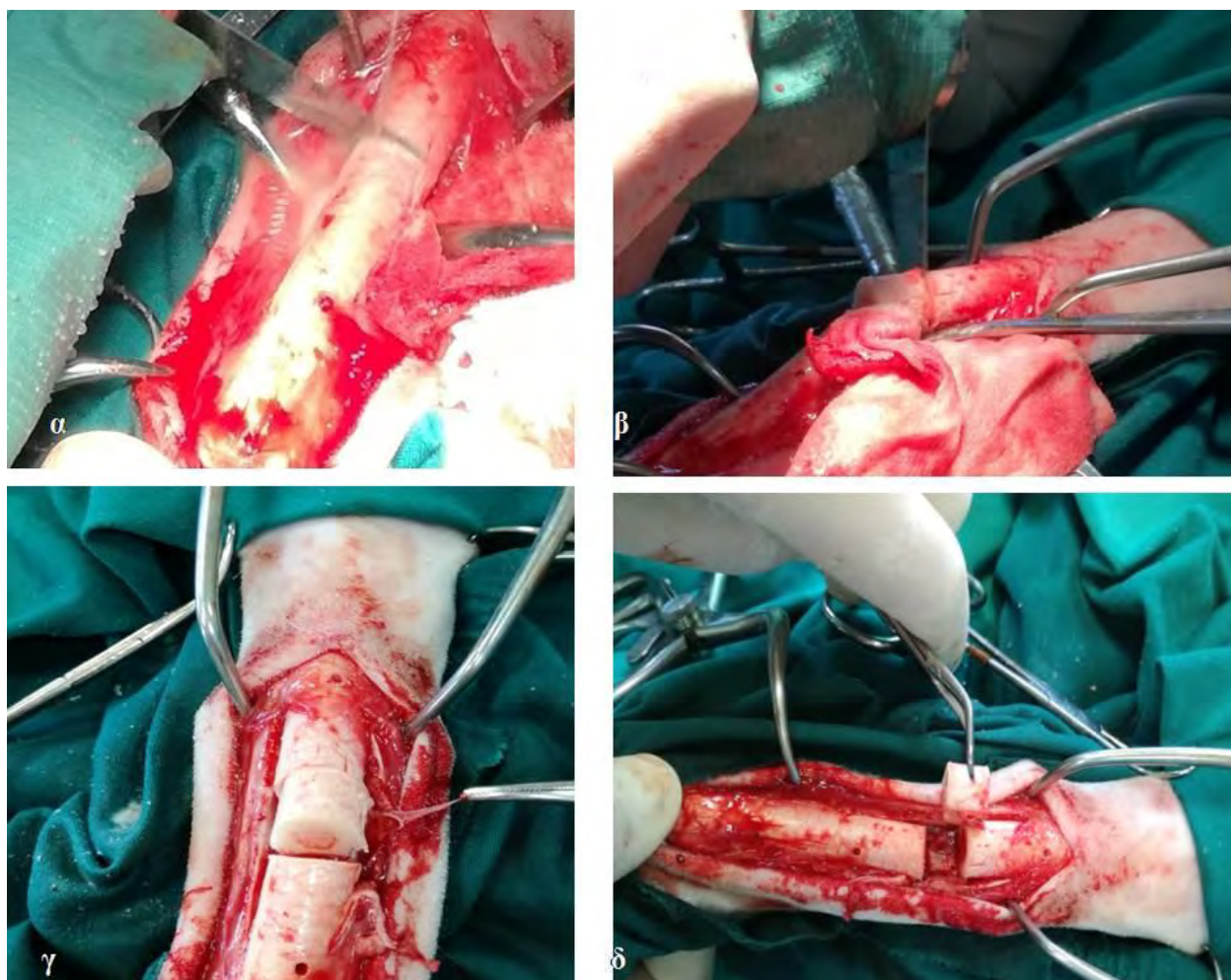
4.2.3. Χειρουργική διαδικασία πρόκλησης οστικού ελλείμματος

Στα ζώα των ομάδων Γ και Δ, η δημιουργία του οστικού ελλείμματος πραγματοποιήθηκε παράλληλα με την προετοιμασία του SVF. Όλα τα ζώα, υπό γενική και επισκληρίδια αναισθησία, τοποθετήθηκαν σε δεξιά πλάγια κατάκλιση, με το οπίσθιο αριστερό άκρο ανυψωμένο προς τα πίσω και σε απαγωγή. Πραγματοποιήθηκε σχολαστική απομάκρυνση του τριχώματος του οπίσθιου δεξιού άκρου από τη μεσότητα της διάφυσης της κνήμης και περιφερικά και ακολούθησε η ενδεδειγμένη άσηπτη προετοιμασία του χειρουργικού πεδίου με αντισηπτικό σαπούνι γλυκονικής χλωρεξιδίνης (VetScrub CHX, Medimark Scientific, Kent) και αλκοολικό διάλυμα χλωρεξιδίνης 1% (Hibitane cut.sol 5%, Cana AE, Greece). Τοποθετήθηκαν δύο στρώματα αποστειρωμένων οθονών. Στη συνέχεια διενεργήθηκε τομή του δέρματος σε όλο το μήκος του μεταταρσίου (~15 cm) στην έσω επιφάνειά του, διαχωρισμός του υποδόριου ιστού και διατομή της περιτονίας. Διαχωρίστηκαν οι ιστοί στις πλάγιες επιφάνειες του οστού και απομακρύνθηκαν περίξ του οστού με ανυψωτές Hohmann, ώστε να προστατευθούν κατά την οστεκτομή. Στην έσω πλάγια επιφάνεια του οστού τοποθετήθηκε μεταλλική πλάκα δυναμικής συμπίεσης (Veterinary Instrumentation) 10 οπών πάχους 3,5 mm, αφού προηγουμένως είχε καμφθεί έτσι, ώστε να εφάπτεται απόλυτα με το οστό. Η μεσότητα της μεταλλικής πλάκας αντιστοιχούσε στη μεσότητα της διάφυσης του μεταταρσίου, όπου και επρόκειτο να δημιουργηθεί το έλλειμμα, και στις θέσεις αυτές δεν τοποθετήθηκαν κοχλίες. Με οστεοτρύπανο διαμέτρου 3 mm (drillbit, Veterinary

Instrumentation), διανοίχθηκαν οπές στις θέσεις της πλάκας που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν, ώστε να οριοθετηθεί και το σημείο της οστεκτομής, συνολικού μήκους 1,5 cm (Εικόνα 9). Για τη δημιουργία του ελλείμματος ολικού πάχους χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρικό παλίνδρομο πριόνι και κατάλληλη λεπίδα κοπής (Veterinary Instrumentation) με ταυτόχρονο συνεχές καταιονισμό φυσιολογικού ορού (NaCl 0,9%, inj. Iv infusion, ΒΙΟΣΕΡ ΑΕ, Greece) (Εικόνα 10). Μετά την αφαίρεση του τμήματος του μεταταρσίου, μετρήθηκε το μήκος του ελλείμματος και επιβεβαιώθηκε ότι σε όλα τα ζώα ήταν 1,5 cm. Ακολούθησαν πλύσεις της περιοχής με θερμό φυσιολογικό ορό, προκειμένου να απομακρυνθούν τα τεμάχια οστού και αίματος που προέκυψαν κατά τη δημιουργία του ελλείμματος. Τα καταγματικά άκρα σταθεροποιήθηκαν με την προεπιλεγμένη πλάκα οστεοσύνθεσης που τοποθετήθηκε στην έσω πλάγια επιφάνεια του μεταταρσίου και, κατόπιν δημιουργίας σπειρώματος με κολαούζο 3,5 mm, σταθεροποιήθηκε με κοχλίες διαμέτρου 3,5 mm κατάλληλου μήκους σε 4 οπές εκατέρωθεν του ελλείμματος.



Εικόνα 9: Προσπέλαση από την έσω πλάγια επιφάνεια του μεταταρσίου (α-β), τοποθέτηση μεταλλικής πλάκας και οριοθέτηση σημείου οστεκτομής (γ-δ).

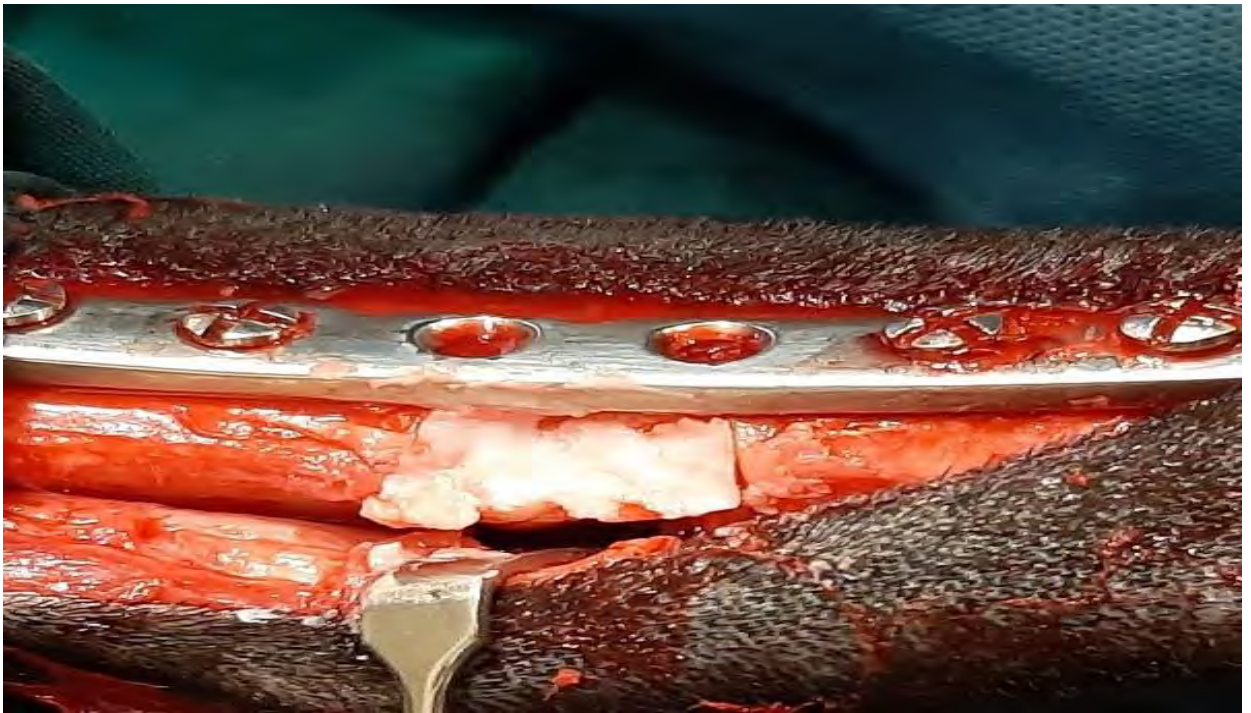


Εικόνα 10: 1^ο(α), 2^ο σημείο οστεκτομής (β) και τελικό αποτέλεσμα (γ-δ).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η τοποθέτηση του διαφορετικού για κάθε ομάδα ζώων βιοϋλικού (Πίνακας 1, Τμήμα 4.2.4).

4.2.4. Πλήρωση οστικού ελλείμματος και ολοκλήρωση χειρουργείου

Ομάδα Α. Η ομάδα αυτή συνιστά την ομάδα των μαρτύρων και το έλλειμμα πληρώθηκε μόνο με την πάστα νανοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη (Nano HA Bone Paste, Veterinary Instrumentation) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Πλήρωση οστικού ελλείμματος με HA (Ομάδα Α).

Ομάδα Β. Στη δεύτερη ομάδα πειραματόζων το οστικό έλλειμμα καλύφθηκε με αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα, που λήφθηκε, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, κατόπιν ανάμειξης του με την πάστα HA σε αναλογία 1:1 (Corre *et al.* 2013). Η ανάμειξη των δύο υλικών σε ομοιογενές ημιστερεό υλικό κάλυψε απόλυτα το οστικό έλλειμμα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Ανάμειξη OM με HA (α-β) και πλήρωση ελλείμματος (γ) (Ομάδα Β).

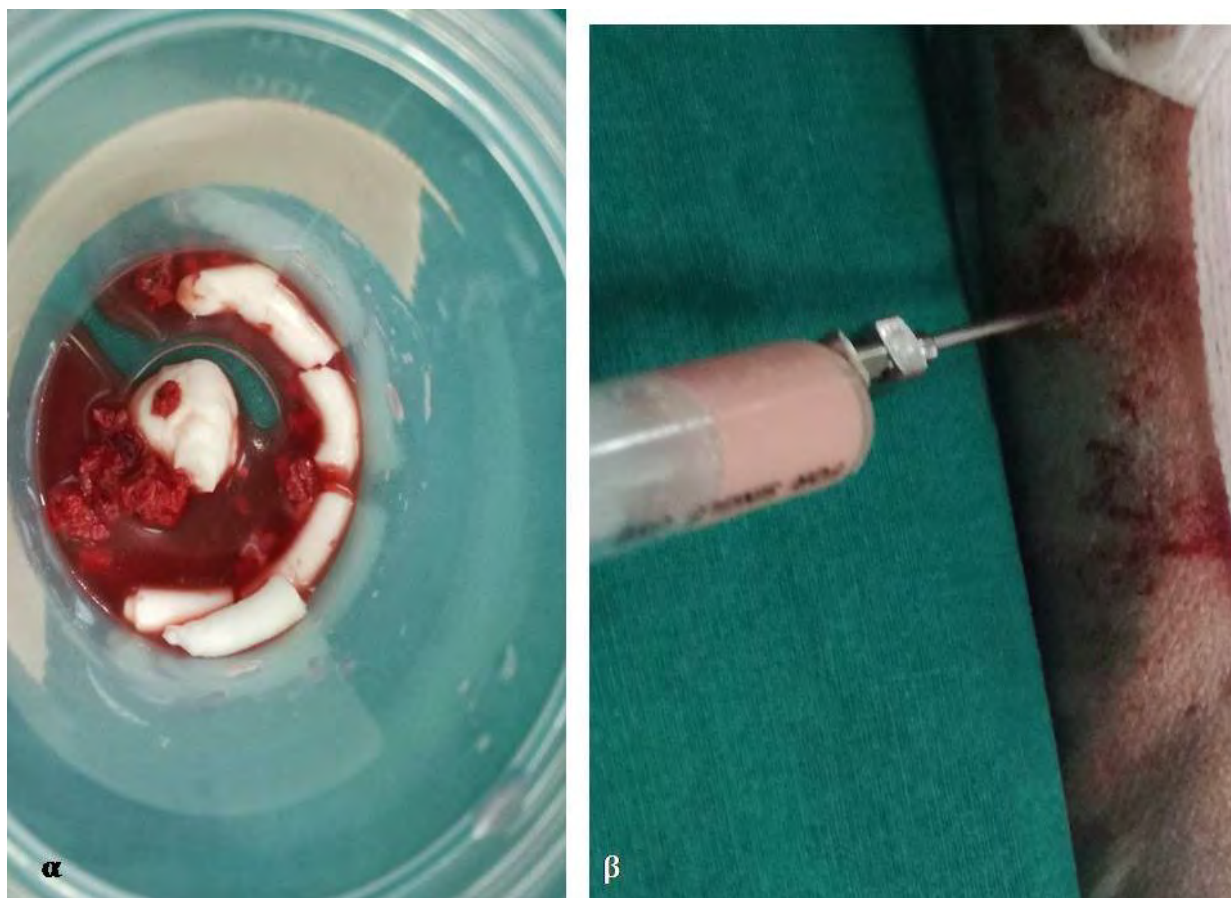
Ομάδα Γ. Στην ομάδα αυτή το έλλειμμα πληρώθηκε με το νωπό αυτόλογο SVF ύστερα από ανάμειξή του με την πάστα νανοκρυσταλλικού HA. Έπειτα από καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων, 1,5 ml SVF τοποθετήθηκε άσηπτα σε στείρο ουροσυλλέκτη. Στον ίδιο περιέκτη τοποθετήθηκε και 1,5 ml πάστας HA και αφέθηκαν σε επαφή σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά πριν από την εμφύτευση στο έλλειμμα, ώστε τα κύτταρα του SVF να προσκολληθούν στο ικρίωμα HA (Corre *et al.* 2013, Farré-Guasch *et al.* 2018, Hivernaud *et al.* 2019) (Εικόνα 13). Καθώς, το τελικό προϊόν ήταν ημίρρευστο και θα διαχέονταν και πέρα από τα όρια του ελλείμματος με ανοικτό το χειρουργικό τραύμα, αποφασίστηκε να προηγηθεί η σύγκλειση του τραύματος και έπειτα να εγχυθεί το υλικό διαδερμικά με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα διαμέτρου 16 G στην εστία του ελλείμματος, καθώς πλέον οι μαλακοί ιστοί θα το συγκρατούσαν στο επιθυμητό σημείο.



Εικόνα 13: Ανάμειξη SVF με HA (α-β) και πλήρωση του οστικού ελλείμματος με διαδερμική έγχυση (γ) (Ομάδα Γ).

Ομάδα Δ. Στην τελευταία ομάδα, το έλλειμμα καλύφθηκε με συνδυασμό σπογγώδους οστεομοσχεύματος, SVF και HA (Εικόνα 14). Οι αναλογίες των βιοϋλικών και ο χρόνος επώασης ήταν όπως στις προηγούμενες ομάδες.

Σε όλα τα ζώα, ο συνολικός απαιτούμενος όγκος βιοϋλικού για την πλήρη κάλυψη του ελλείμματος κυμάνθηκε από 2,2-2,4 ml.



Εικόνα 14: Ανάμειξη SVF με HA και OM (α) και πλήρωση του οστικού ελλείμματος με διαδερμική έγχυση (β) (Ομάδα Δ).

Η συρραφή του τραύματος πραγματοποιήθηκε με συνεχή ραφή του υποδόριου ιστού με απορροφήσιμο μονόκλωνο ράμμα πολυγλυκαπρόνης (Monocryl 2-0, Ethicon, Johnson & Johnson International, Belgium) και ακολούθησε συνεχής interlocking ραφή στο δέρμα με μη απορροφήσιμο μονόκλωνο ράμμα πολυαμιδίου (Ethilon 0, Ethicon, Johnson & Johnson International, Belgium) (Εικόνα 15). Τέλος, τοποθετήθηκε αυτοκόλλητη απορροφητική γάζα (Cosmopor E, Paul Hartmann AG, Germany) και πραγματοποιήθηκε επίδεση με βαμβακοφόρο επίδεσμο (RoltaSoft, PaulHartmannAG, Germany) και ειδικό εκμαγείο (Orthopaedic Casting Tape, Henry Schein, Gillingham, United Kingdom) που εκτεινόταν από το περιφερικό άκρο της κνήμης έως τις φάλαγγες με το άκρο σε στηρικτική στάση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επιμήκης διατομή του στην οπίσθια επιφάνειά του, ώστε να είναι δυνατή η επαναλαμβανόμενη αφαίρεση και τοποθέτησή του ώστε να διευκολύνονται μετεγχειρητικά οι αλλαγές επίδεσης, ο κλινικός έλεγχος και οι τακτικές απεικονιστικές διαγνωστικές εξετάσεις.



Εικόνα 15: Συρραφή του υποδόριου ιστού (α) και του δέρματος (β) και εξωτερική σταθεροποίηση (γ, αμέσως μετά την ανάνηψη του ζώου στο χώρο ενσταυλισμού).

5. Μετεγχειρητική παρακολούθηση

Τα ζώα διατηρήθηκαν για 13 εβδομάδες και μπορούσαν να κινούνται ελεύθερα εντός του χώρου ενσταυλισμού τους. Καθημερινά ως την 3^η και, ακολούθως, τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα και έκτοτε ανά δεκαήμερο, πραγματοποιούνταν γενική κλινική εξέταση, αλλαγή της επίδεσης, έλεγχος της στάσης και της φόρτισης του άκρου, μακροσκοπικός έλεγχος του τραύματος για ενδείξεις λοίμωξης ή τυχόν διάσπασης, αλλά και ψηλάφηση του μεταταρσίου για ενδείξεις τυχόν χαλάρωσης ή θραύσης των υλικών οστεοσύνθεσης. Η αφαίρεση των ραμμάτων πραγματοποιούνταν την 15^η μετεγχειρητική ημέρα.

5.1. Εκτίμηση του βαθμού χωλότητας

Καθημερινά, για τις τρεις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες, κατόπιν τη 10^η ημέρα μετά την οστεκτομή και έκτοτε ανά δεκαήμερο αξιολογούνταν η φόρτιση του οπίσθιου δεξιού άκρου κατά τη στάση και βάδιση των ζώων βάσει κλίμακας χωλότητας (Kaler *et al.* 2009). Για την αντικειμενικότερη κρίση, ήταν απαραίτητη κάθε φορά η απομάκρυνση του εκμαγείου, η διατήρηση των ζώων χωρίς αυτό για μερικά λεπτά και έπειτα η αξιολόγηση της φόρτισης του πάσχοντος άκρου σε στάση και βάδιση (Πίνακας 2).

Κλίμακα χωλότητας (στάση και βάδιση)	0	1	2	3	4	5	6
Ομοιόμορφη κατανομή βάρους και στα τέσσερα άκρα							
Ανομοιόμορφη στάση σώματος, αλλά όχι εμφανής μείωση βηματισμού							
Μειωμένη φόρτιση του ενός άκρου στη βάδιση συγκριτικά με τα άλλα							
Εμφανής κίνηση της κεφαλής ταυτόχρονα με τη μειωμένη φόρτιση του πάσχοντος άκρου							
Υπερβολικό τίναγμα της κεφαλής, περισσότερο από απλή κίνηση, κατά τη μειωμένη φόρτιση του πάσχοντος άκρου							
Απουσία φόρτισης του πάσχοντος άκρου κατά τη στάση							
Δυσφορία κατά τη βάδιση							
Απουσία φόρτισης στο πάσχον άκρο κατά τη βάδιση							
Έντονη δυσκολία ανέγερσης							
Απροθυμία μετακίνησης ενόσον στέκεται							
Προσβολή περισσότερων του ενός άκρων							
Αδυναμία στάσης ή μετακίνησης							

Πίνακας 2: Κλίμακα εκτίμησης χωλότητας προβάτου κατά Kaler *et al.* (2009).

5.2. Ακτινολογικός έλεγχος

Μετά την ανάνηψη και με τα ζώα σε όρθια στάση, λήφθηκαν προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια ακτινογραφήματα του οπίσθιου δεξιού μεταταρσίου (Agfa, CR 30-X) για τον έλεγχο της ευθυγράμμισης του άκρου, της ακεραιότητας και της ορθής τοποθέτησης των υλικών. Ο ακτινολογικός έλεγχος της εξέλιξης της πώρωσης, του σχηματισμού νέου οστού και της ακεραιότητας των υλικών τελούνταν σε μηνιαία βάση με τη λήψη δύο ακτινογραφιών κάθε φορά με διαφορά 90° μεταξύ τους, έως το τέλος του πειραματισμού. Η αξιολόγηση των ακτινογραφημάτων έγινε με την τροποποιημένη κλίμακα Lane and Sandhu από δύο ανεξάρτητους εκτιμητές (Lane and Sandhu 1987). Οι μετρήσεις αφορούσαν το ποσοστό κάλυψης του ελλείμματος, την εκτίμηση της τάσης προς γεφύρωση τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά και την αναδιαμόρφωση του οστού. Συνολικά κάθε ζώο βαθμολογούνταν με μία τιμή από 0 έως 10 (Πίνακας 3).

Σχηματισμός οστού	
0	Απουσία ένδειξης σχηματισμού νέου οστού
1	Ο νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός καλύπτει το 25% του ελλείμματος
2	Ο νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός καλύπτει το 50% του ελλείμματος
3	Ο νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός καλύπτει το 75% του ελλείμματος
4	Ο νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός καλύπτει το 100% του ελλείμματος
Τάση προς γεφύρωση (κεντρικά και περιφερικά εκτιμώμενα χωριστά)	
0	Απουσία ένδειξης γεφύρωσης
1	Πιθανή γεφύρωση
2	Ακτινολογικά ορατή γεφύρωση
Αναδιαμόρφωση	
0	Απουσία ενδείξεων αναδιαμόρφωσης
1	Αναδιαμόρφωση του μυελικού αυλού
2	Πλήρης αναδιαμόρφωση του φλοιού

Πίνακας 3: Τροποποιημένη κλίμακα ακτινολογικής εκτίμησης της πώρωσης κατά Lane and Sandhu (1987).

5.3. Υπερηχοτομογραφικός έλεγχος

Με τα πειραματόζωα σε όρθια στάση και με ήπια συγκράτηση από έναν βοηθό πραγματοποιήθηκε προεγχειρητικά, μία ημέρα μετά τη χειρουργική επέμβαση, τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα και, στη συνέχεια, ανά δεκαήμερο έως την 60^η και στη συνέχεια την 75^η και την 90^η ημέρα του πειραματισμού, υπερηχοτομογραφικός έλεγχος του χειρουργημένου άκρου. Για τον σκοπό αυτόν, κουρευόταν η έξω πλάγια επιφάνεια του οπίσθιου δεξιού άκρου από τη μεσότητα της κνήμης και περιφερικά αυτής. Ο συνολικός χρόνος εξέτασης διαρκούσε περίπου δέκα λεπτά για κάθε ζώο. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με υπερηχογράφο (MyLab® 30, ESAOTE SpA, Genova, Italy) και γραμμικό ηχοβολέα (Linear L415) και αποτελούνταν από σπρόμαυρες απεικονίσεις (Brightness mode, B-mode) αλλά και έγχρωμες απεικονίσεις Doppler (Color Doppler).

5.3.1. Υπερηχοτομογραφικός έλεγχος του μεταταρσίου

Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις αφορούσαν τα καταγματικά άκρα του μεταταρσίου και το σημείο του οστικού ελλείμματος. Η προεγχειρητική εκτίμηση αφορούσε την ακεραιότητα και την απουσία παραμορφώσεων του μεταταρσίου. Άφθονη γέλη υπερήχου (SonicGel, Lazos Biolabs, Greece) απλώνονταν στο δέρμα για τη σωστή μετάδοση της ακουστικής δέσμης. Ο ηχοβολέας τοποθετούνταν στο δέρμα της έξω πλάγιας επιφάνειας του μεταταρσίου, παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του οστού. Η συχνότητα που επέτρεψε τη βέλτιστη εικόνα και χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραματισμών ήταν τα 10 MHz ενώ το βάθος κυμάνθηκε από 3 έως 5 cm. Λαμβάνονταν εικόνες B-mode του ελλείμματος και των καταγματικών άκρων για να πραγματοποιηθούν ανά δεκαήμερο μετρήσεις σχετικές με το μήκος του ελλείμματος. Από κάθε σημείο λαμβάνονταν πολλαπλές εικόνες. Ο υπολογισμός του μήκους του ελλείμματος έγινε με ειδικό λογισμικό (MyLab, ESAOTE SpA, Genova, Italy) κατόπιν υπόδειξης των ορίων του σε κάθε μέτρηση.

Ακολουθώντας με χρήση Color Doppler αξιολογήθηκε η αιμάτωση στο έλλειμμα και στους παρακείμενους μαλακούς ιστούς, με βαθμολόγηση από 0 έως 3 (Risselada *et al.* 2006, Jeon *et al.* 2020), που αφορούσε τον αριθμό φωτεινών ενδείξεων αγγείων καθώς και την έντασή τους (Πίνακας 4):

Κλίμακα	Αριθμός ενδείξεων αγγείων	Ένταση του σήματος
0	Απουσία ένδειξης αιμάτωσης	Απουσία ένδειξης αιμάτωσης
1	1-5	Κόκκινο/μωβ χρώμα
2	6-10	Πορτοκαλί χρώμα
3	>10	Κίτρινο χρώμα

Πίνακας 4: Κλίμακα εκτίμησης της αγγείωσης με Color Doppler.

Η συχνότητα ορίστηκε στα 6,6 MHz και η συχνότητα επανάληψης του παλμού (Pulse Repetition Frequency, PRF) στο 1,4 kHz και διατηρήθηκαν καθ' όλο το διάστημα του πειραματισμού.

5.3.2. Καταγραφή και υπολογισμός των παραμέτρων της ροής του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία

Στον ίδιο χρόνο με τις μετρήσεις των παραπάνω παραμέτρων και έως την 40^η ημέρα του πειραματισμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη χρήση του Pulsed-wave Doppler της ροής της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας, που αποτελεί το κύριο αγγείο αιμάτωσης του μεταταρσίου στο πρόβατο. Η προεγχειρητική μέτρηση επιβεβαίωνε την απουσία αγγειακής πάθησης ή φλεγμονής του περιφερικού άκρου. Ο ηχοβολέας τοποθετούνταν στην πρόσθια έξω πλάγια επιφάνεια του περιφερικού 1/3 της κνήμης με κατεύθυνση από πρόσθιο-κεντρικά προς έξω πλάγια-περιφερικά, ακριβώς πάνω στο αγγείο. Για τη διερεύνηση του αγγείου, η συχνότητα ορίστηκε στα 6.6 MHz, το βάθος στα 3-4 cm και το PRF στο 1,4 kHz. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε παλμικό Doppler ροής (Pulsed wave Doppler) με PRF 2,8-4,2 kHz, φίλτρο συχνοτήτων 1 kHz, baseline στο 0 και μέγεθος (sample gate) 1, ρυθμίσεις οι οποίες διατηρήθηκαν σε όλο το διάστημα του πειραματισμού. Ένας κατάλληλα εκπαιδευμένος βοηθός τοποθετούσε το sample gate ορθά στο προς διερεύνηση αγγείο, ώστε να είναι στο κέντρο του χωρίς να περιλαμβάνονται τα τοιχώματά του. Η γωνία πρόπτωσης των υπερήχων κυμαίνονταν από 50° έως 60°. Προκειμένου να γίνει αποδεκτή μια μέτρηση έπρεπε να καταγράφονται τρεις ολοκληρωμένοι καρδιακοί κύκλοι. Η ανάλυση της κυματομορφής κάθε ζώου πραγματοποιήθηκε με ειδικό λογισμικό (MyLab, ESAOTE SpA, Genova, Italy), όπου και καταγράφηκαν οι εξής αιμοδυναμικές παράμετροι:

- *Δείκτης Αντίστασης (Resistance Index, RI)*: ο λόγος (Μέγιστη συστολική ταχύτητα-Τελοδιαστολική ταχύτητα)/Μέγιστη συστολική ταχύτητα
- *Δείκτης Σφυγμικότητας (Pulsatility Index, PI)*: ο λόγος (Μέγιστη συστολική ταχύτητα-Τελοδιαστολική ταχύτητα) /Μέγιστη Μέση Ταχύτητα
- *Συνολική ροή (Total blood flow, BF)* (ml/min): ο συνολικός όγκος του αίματος στη μονάδα του χρόνου

- Λόγος συστολικής προς διαστολική ταχύτητα (Systolic:diastolic velocity ratio)
- Τελοδιαστολική ταχύτητα (*End Diastolic Velocity, EDV*) (cm/s)
- Μέγιστη συστολική ταχύτητα (*Peak Velocity, PSV*) (cm/s)
- Διάμετρος του αγγείου (cm)
- Επιτάχυνση (*Acceleration, A*) (m/s²)

5.4. Ιστοπαθολογική εξέταση

Στις 13 εβδομάδες γινόταν ευθανασία των πειραματόζων με ενδοφλέβια έγχυση συνδυασμού προποφόλης (Propofol/Lipuro inj.em.in 1%, 20 ml, B. Braun Melsungen AG) και χλωριούχου καλίου (Potassium chloride 10%, Demo S.A., Greece). Ακολουθούσε προσπέλαση του μεταταρσίου, απομάκρυνση των μαλακών ιστών και αφαίρεση των μεταλλικών υλικών από το οστό. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν οστεκτομή στη μεσότητα της διάφυσής του μήκους ~ 3 cm, ώστε να περιλαμβάνεται η περιοχή του αρχικού ελλείμματος αλλά και υγιές οστό στα άκρα του. Στη συνέχεια, γινόταν πλύση του με άφθονο φυσιολογικό ορό και τοποθέτησή του σε ατομικό περιέκτη με διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%. Μετά το πρώτο εικοσιτετράωρο κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε νέο διάλυμα φορμαλδεΰδης ίδιας πυκνότητας για ακόμη 48-72 ώρες. Ακολούθησε η αποστολή των ιστοτεμαχίων για ιστοπαθολογική εξέταση. Τα οστεοτεμάχια αφαλατώθηκαν σε διάλυμα νιτρικού οξέος 10% για 5 ημέρες και, έπειτα, λήφθηκαν ιστοτεμάχια πάχους 3-5 mm με επιμήκη διατομή του τμήματος του οστού που είχε μονιμοποιηθεί και τα οποία υπέστησαν αφυδάτωση με εμβάπτιση σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης και διαύγαση με εμβάπτιση σε σειρά λουτρών ξυλόλης και εγκλείστηκαν σε παραφίνη (Paraplast Plus®, Kendall, England). Μετά την εγκλείσή τους σε παραφίνη, λήφθηκαν τομές πάχους 4-6 μm. Οι τομές χρωματίστηκαν με χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (H&E). Οι τομές εκτιμήθηκαν τυφλά και έλαβαν βαθμολογία από 0 έως 15 με βάση την κλίμακα των Šantić και συν. (Šantić *et al.* 2009) (Πίνακας 5).

Μορφολογικές παράμετροι		Βαθμολόγηση
Ενσωμάτωση του μοσχεύματος	Ακέραιο, απουσία κυτταρικής δραστηριότητας	0
	Διεργασία απορρόφησης	1
	Σχηματισμός νέου οστού	2
	Πλήρης ενσωμάτωση σε νέο οστό	3
Φλοιός	Απουσία κυτταρικής δραστηριότητας	0
	Διεργασία απορρόφησης	1
	Σχηματισμός νέου οστού	2
	Γεφύρωση με το γειτονικό οστό	3
Πώρος	Ινώδης	0
	Χόνδρινος	1
	Οστέινος	2
Γεφύρωση του οστικού ελλείμματος	Απουσία γεφύρωσης του ελλείμματος	0
	Γεφύρωση με ινώδη ιστό	1
	Γεφύρωση με ινώδη και χόνδρινο ιστό	2
	Πλήρης γεφύρωση του ελλείμματος	3
Νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός	Απουσία νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού	0
	Συσώρευση οστεοβλαστών	1
	Πλεγματοδής / Ινώδης οστίτης ιστός	2
	Πεταλιώδης οστίτης ιστός	3
Περίοστεο	Άνευ αγγείωσης	0
	Αγγειούμενο	1

Πίνακας 5: Κλίμακα αξιολόγησης των ιστολογικών μορφολογικών παραμέτρων (Santic et al. 2009).

6. Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την κάθε παράμετρο της μετεγχειρητικής παρακολούθησης εισήχθησαν σε βιβλίο εργασίας του Microsoft Excel και αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS v. 21 (IBM Analyt-310 ics, Armonk, NY, USA). Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις περιγράφονται με τη διάμεση τιμή ενώ αναφέρονται και οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές. Οι συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών ομάδων έγιναν με τη δοκιμή Kruskal-Wallis ή Pearson χ^2 . Οι δυνητικές συσχετίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών έγιναν με Spearman's analysis of correlation. Το επίπεδο σημαντικότητας p τέθηκε στο 5%.

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Απόδοση κυττάρων SVF

Από το τελικό προϊόν SVF κάθε ζώου των ομάδων Γ και Δ, λήφθηκε δείγμα 10 μl, το οποίο, αφού του προστέθηκαν 10 μl χρωστικής Trypan blue 0,4%, τοποθετήθηκε στο αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση του αριθμού των ζωντανών μονοκυττάρων του SVF. Σε δείγματα συνολικά 12 ζώων, ο αριθμός μονοκυττάρων SVF κυμάνθηκε από $1,23 \times 10^6$ έως $2,28 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml, με μέση τιμή $1,77 \times 10^6$ και τυπικό σφάλμα $0,09 \times 10^6$.

2. Εκτίμηση του βαθμού χωλότητας

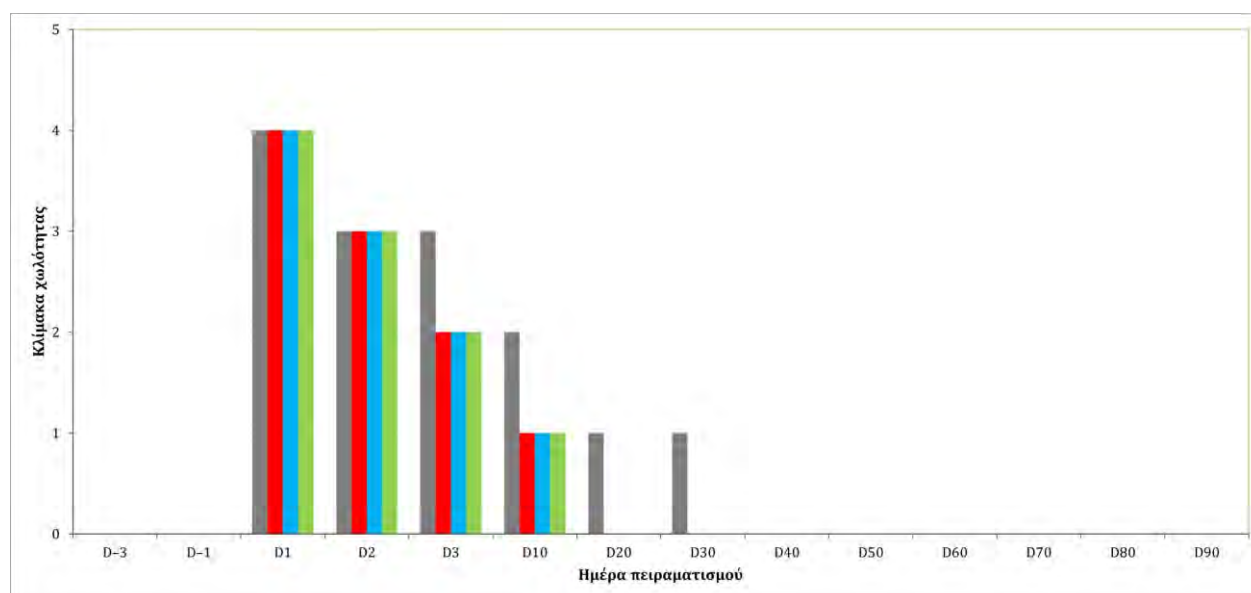
Τις τρεις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες, τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα και έκτοτε ανά δεκαήμερο αξιολογούνταν η φόρτιση του οπίσθιου δεξιού άκρου κατά τη στάση και βάδιση των ζώων βάσει της επταβάθμιας κλίμακας χωλότητας του Kaler (Kaler *et al.* 2009). Η κλίμακα εκτείνεται από κατά φύσιν κινητικότητα (τιμή 0) έως αδυναμία στάσης ή βάδισης (τιμή 6). Στις προεγχειρητικές κλινικές μετρήσεις της βάδισης και στην ορθοπαιδική εξέταση τα ζώα βρέθηκαν υγιή και έλαβαν τιμή 0 στην κλίμακα χωλότητας.

Την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα όλα τα ζώα εμφάνιζαν απουσία φόρτισης στο χειρουργημένο άκρο ενώ, όταν σποραδικά το φόρτιζαν, ήταν έντονη η δυσφορία τους. Συνεπώς, όλα τα ζώα είχαν βαθμό χωλότητας 4/6. Την επόμενη ημέρα, η κλινική εικόνα τους ήταν σαφώς βελτιωμένη, καθώς, εκτός από μία προβατίνα της ομάδας Α που εξακολουθούσε να μη φορτίζει το οπίσθιο δεξί άκρο, όλες οι άλλες φόρτιζαν ικανοποιητικά το δεξί άκρο με εμφανή κλίση της κεφαλής σε κάθε βήμα. Έτσι, τα ζώα όλων των ομάδων είχαν διάμεση τιμή σκορ χωλότητας 3/6 (Πίνακας 6, Εικόνα 16). Στατιστικώς σημαντική διαφορά καταγράφεται από την 3^η μετεγχειρητική ημέρα ($p = 0,009$), όποτε τα ζώα των ομάδων Β, Γ και Δ έχουν διάμεση τιμή χωλότητας 2/6, ενώ τα ζώα της ομάδας Α 3/6. Αντίστοιχη είναι η βελτίωση της κλινικής εικόνας στον επανέλεγχο κατά τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα, όπου τα ζώα των ομάδων Β, Γ και Δ δεν παρουσίαζαν έντονη χωλότητα (σκορ 1/6), ενώ στην ομάδα Α εξακολουθούσαν να ανασηκώνουν την κεφαλή κατά τη φόρτιση του πάσχοντος άκρου (2/6) ($p = 0,005$). Ανάλογα ευρήματα καταγράφονται την 20^η και την 30^η μετεγχειρητική ημέρα, όπου τα ζώα των ομάδων Β, Γ και Δ στέκονται και βαδίζουν φυσιολογικά (0/6), ενώ στην ομάδα Α παρατηρείται ήπια χωλότητα (1/6) ($p = 0,005$). Στη συνέχεια, στους ανά δεκαήμερο επανελέγχους κανένα ζώο δεν εμφανίζει χωλότητα, πέραν ενός ζώου της ομάδας Α το οποίο συνέχιζε να μη φορτίζει το άκρο. Συνοψίζοντας, τα ζώα της ομάδας Α στις επανεξετάσεις έως και την ημέρα 30 εμφάνιζαν ήπια

χωλότητα (1/6), αντίθετα με τα ζώα των υπόλοιπων ομάδων που η στάση και βάδιση επανήλθε πριν από την 20^ή ημέρα, υποδεικνύοντας ταχύτερη κινητική αποκατάσταση.

Ημέρα μελέτης (D)														
Ομάδα	D-3	D-1	D1	D2	D3 ¹	D10 ¹	D20 ¹	D30 ¹	D40	D50	D60	D70	D80	D90
A	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (4-4)	3 (3-4)	3 (3-3)	2 (2-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)
B	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (4-4)	3 (3-3)	2 (2-3)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Γ	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (4-4)	3 (3-3)	2 (2-2)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Δ	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (4-4)	3 (3-3)	2 (2-2)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Πίνακας 6: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της κλίμακας χωλότητας κάθε ομάδας στις διάφορες χρονικές στιγμές παρακολούθησης ($^1p < 0,009$ μεταξύ των ομάδων).



Εικόνα 16: Μεταβολές της κλίμακας χωλότητας μετεγχειρητικά σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα στις διάφορες ομάδες πειραματισμού (Ομάδα A : γκρι χρώμα, B: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

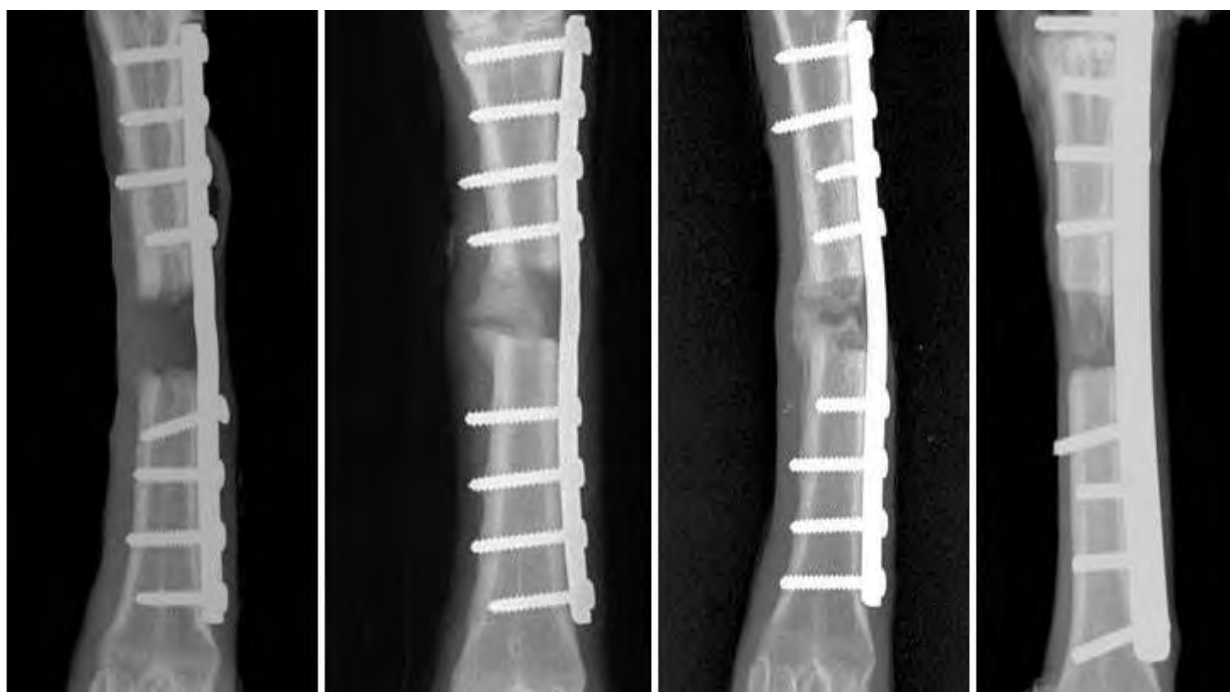
3. Ακτινολογική εικόνα

Η ακτινολογική εκτίμηση της ακεραιότητας των υλικών, της εξέλιξης της πώρωσης και του σχηματισμού νέου οστού τελούνταν σε μηνιαία βάση με δύο ακτινογραφίες (λήψη πλαγιοπλάγια και προσθιοπίσθια) σε κάθε ζώο έως το τέλος του πειραματισμού και στηρίχθηκε στην τροποποιημένη κλίμακα Lane and Sandhu (Lane and Sandhu 1987). Οι μετρήσεις αφορούσαν το

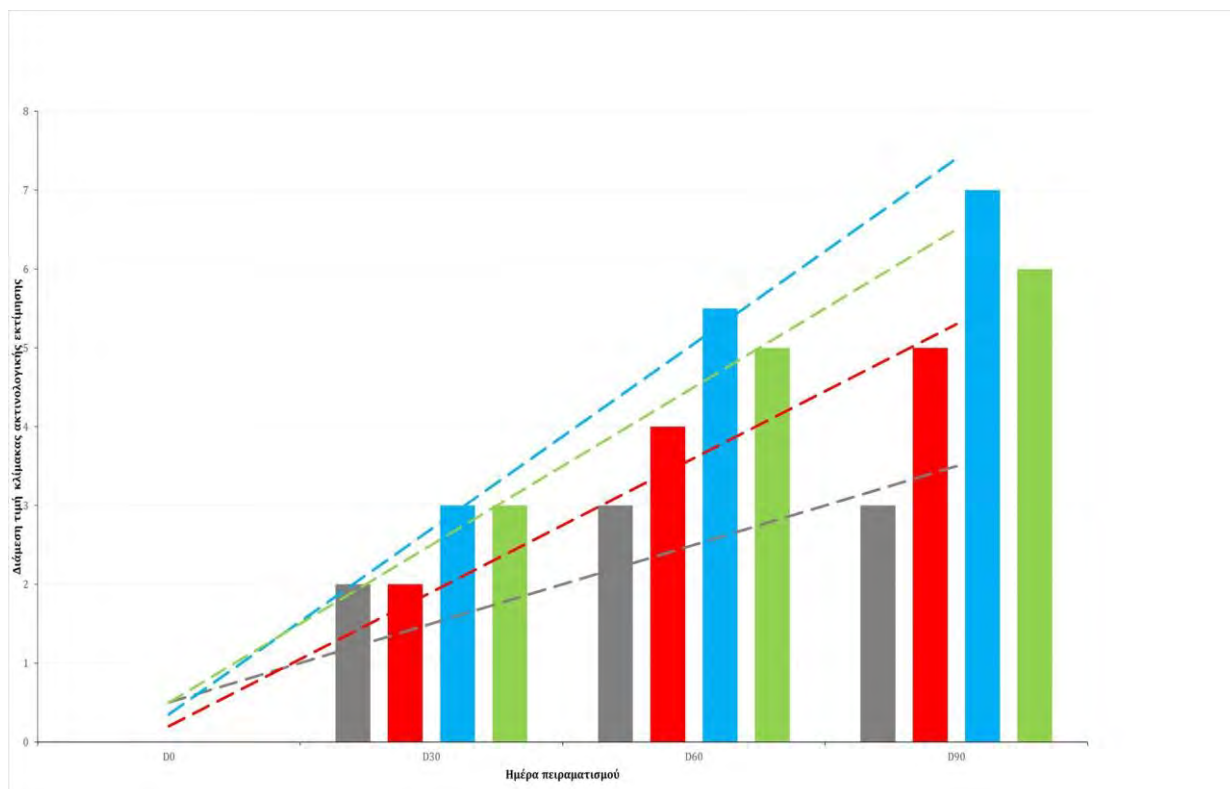
ποσοστό κάλυψης του ελλείμματος (εύρος 0-4), την εκτίμηση της τάσης προς γεφύρωση τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά (εύρος 0-2) και την αναδιαμόρφωση του οστού (εύρος 0-2). Συνολικά κάθε ζώο βαθμολογούνταν με τιμή από 0 έως 10 (Πίνακας 7, Εικόνες 17, 18).

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)			
	D0	D30	D60 ¹	D90 ¹
Α	0	2	3	3
	(0-0)	(1-2)	(2-4)	(2-5)
Β	0	2	4	5
	(0-0)	(1-6)	(3-7)	(3-7)
Γ	0	3	5.5	7
	(0-0)	(2-5)	(3-7)	(5-8)
Δ	0	3	5	6
	(0-0)	(2-5)	(3-6)	(5-8)

Πίνακας 7: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της ακτινολογικής εικόνας κάθε ομάδας σε μηνιαία λήψη ακτινογραφημάτων (¹ $p < 0,0$ 5μεταξύ των ομάδων).



Εικόνα 17: Από αριστερά προς τα δεξιά ακτινογραφίες κατά την ημέρα 90 ενός ζώου από την ομάδα Α, τη Β, τη Γ και την ομάδα Δ.



Εικόνα 18: Μεταβολές της διάμεσης τιμής της ακτινολογικής εικόνας σε ειδική κλίμακα σε μηνιαία βάση στις διάφορες ομάδες πειραματισμού και οι γραμμές τάσης (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Αμέσως μετεγχειρητικά η ακτινολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της ευθυγράμμισης του άκρου, ενώ όλα τα ζώα λάμβαναν τιμή ακτινολογικής πώρωσης 0/10. Την ημέρα 30 η διάμεση τιμή της ακτινολογικής εικόνας των ζώων των ομάδων Α και Β ήταν ίδια και ίση με 2/10, ενώ των ομάδων Γ και Δ 3/10. Την ημέρα 60 οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ήταν στατιστικώς σημαντικές με βαθμολογία 3/10 για την ομάδα Α, 4/10 για την ομάδα Β, 5,5/10 για την ομάδα Γ και 5/10 για την ομάδα Δ ($p = 0,049$). Την ημέρα 90 καταγράφηκαν, επίσης, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p = 0,006$). Οι διάμεσες τιμές ήταν 3/10 για την ομάδα Α, 5/10 για την ομάδα Β, 7/10 για την ομάδα Γ και, τέλος, 6/10 για την ομάδα Δ.

Στην πορεία του χρόνου από την 1^η έως την 90^η ημέρα η γραμμή τάσης των ζώων της ομάδας Γ έχει μεγαλύτερη κλίση σε σχέση με τις άλλες ομάδες και ακολουθεί η ομάδα Δ, η ομάδα Β και, τέλος η ομάδα Α, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 18. Συγκεκριμένα η κλίση έχει ως εξής: ομάδα Α: $0,033 \pm 0,01$, Β: $0,057 \pm 0,006$, Γ: $0,078 \pm 0,008$, Δ: $0,067 \pm 0,01$, $p = 0,030$ μεταξύ των ομάδων Α και Γ, $p > 0,06$ για όλες τις υπόλοιπες συγκρίσεις. Καταγράφεται, συνεπώς, στατιστικώς σημαντική βελτίωση της διάμεσης τιμής των ζώων της ομάδας Γ ως προς την ομάδα Α στην πορεία του χρόνου, ενώ παρατηρείται, επίσης, τάση βελτίωσης της διάμεσης τιμής μεταξύ των ομάδων Α-Δ και Β-Γ χωρίς, ωστόσο, σημαντικές διαφορές στη μονάδα του χρόνου.

Από τα παραπάνω, φαίνεται πως σε όλο το διάστημα παρακολούθησης, τα ζώα της ομάδας Γ είχαν καλύτερα ακτινολογικά ευρήματα από εκείνα των ομάδων Α, Β και Δ. Τα ζώα της

ομάδας Β είχαν καλύτερα ακτινολογικά ευρήματα πώρωσης από εκείνα της ομάδας Α και τα ζώα της ομάδας Δ είχαν καλύτερη ακτινολογική εικόνα από τα ζώα της ομάδας Α και Β.

Επισημαίνεται ότι μόνο δύο ζώα της ομάδας Γ και ένα της ομάδας Δ, βαθμολογήθηκαν με 8/10 στην τροποποιημένη κλίμακα Lane and Sandhu, που αντιστοιχεί σε πλήρη κάλυψη του ελλείμματος και γεφύρωση των καταγματικών άκρων με απουσία ανακατασκευής.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε δοκιμή συσχέτισης μεταξύ του συνόλου των μετρήσεων της κλίμακας χωλότητας κατά Kaler και της τροποποιημένης κλίμακας ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης κατά Lane and Sandhu και διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση με τιμές $r = -0,477$, $p < 0,0001$. Προκύπτει, λοιπόν, ότι εφόσον τα αποτελέσματα της επισκόπησης και των ακτινογραφημάτων συσχετίζονται απόλυτα, η κλίμακα χωλότητας αποτελεί ένα αξιόπιστο μέτρο αξιολόγησης της πώρωσης, όπως είναι η ακτινολογική εξέταση.

4. Υπερηχοτομογραφική εκτίμηση

4.1. Μήκος του ελλείμματος

Ανά δεκαήμερο κατά τη διάρκεια του πειραματισμού έως την ημέρα 60 και, κατόπιν, την 75^η και 90^η ημέρα γινόταν υπερηχοτομογραφική μέτρηση του μήκους του οστικού ελλείμματος. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε υπολογίζει την απόσταση σε εκατοστόμετρα (cm) ωστόσο, για τη διευκόλυνση των υπολογισμών, έγινε αναγωγή της σε χιλιοστόμετρα (mm).

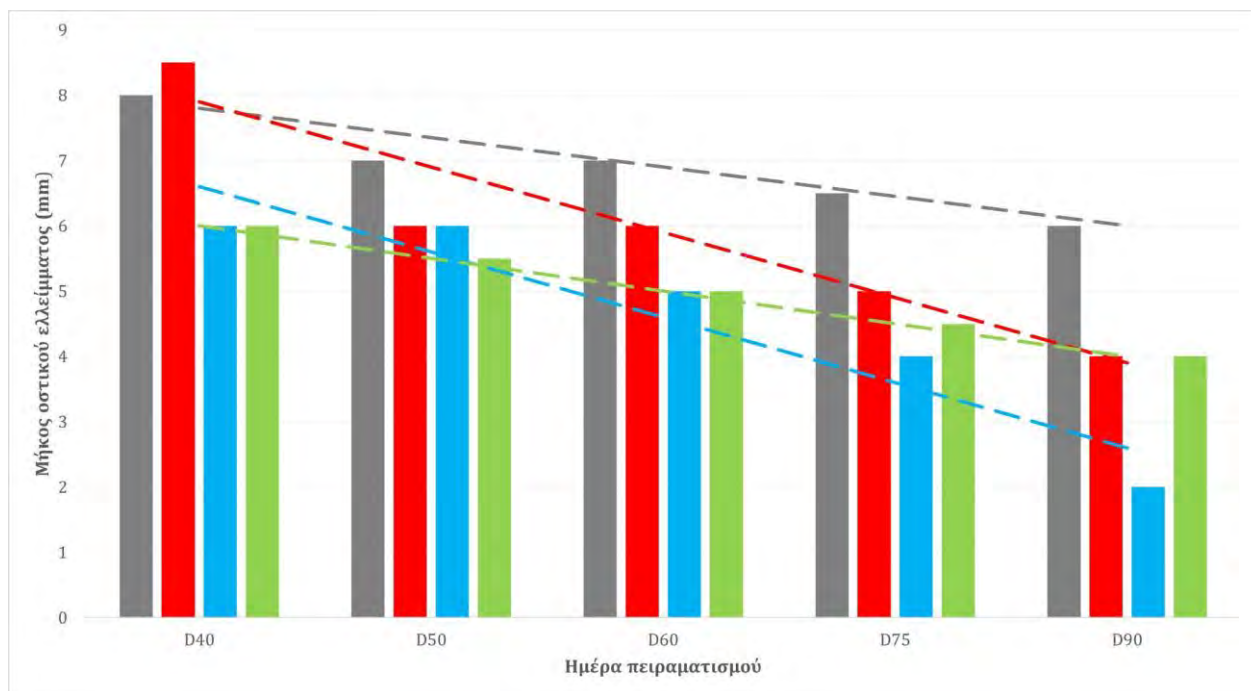
Υπολογίστηκε η διάμεση τιμή του μήκους κάθε ομάδας μελέτης ανά μέτρηση. Τα αποτελέσματα με την ελάχιστη και την μέγιστη τιμή ανά ομάδα και ανά μέτρηση καταγράφονται στον Πίνακα 8.

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)								
	D1	D10	D20	D30	D40	D50	D60	D75 ¹	D90 ¹
Α	15	17	11	10	8,5	7	7	6,5	6
	(15-15)	(15-17)	(8-16)	(8-11)	(7-10)	(6-9)	(6-8)	(6-7)	(6-7)
Β	15	15,5	13	10,5	8,5	6	6	5	4,5
	(15-15)	(14-18)	(10-17)	(8-12)	(6-11)	(5-9)	(5-7)	(4-6)	(3-6)
Γ	15	16	8,5	7	6	6	5	4	2
	(15-15)	(15-17)	(7-11)	(6-9)	(4-8)	(3-6)	(2-6)	(2-5)	(2-5)
Δ	15	14,5	12	9	6	5,5	5	4,5	4
	(15-15)	(14-17)	(8-13)	(5-11)	(4-10)	(3-10)	(3-9)	(3-7)	(3-6)

Πίνακας 8: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) του μήκους του οστικού ελλείμματος (mm) κάθε ομάδας ανά μέτρηση μετεγχειρητικά ($1p < 0,05$ μεταξύ των ομάδων).

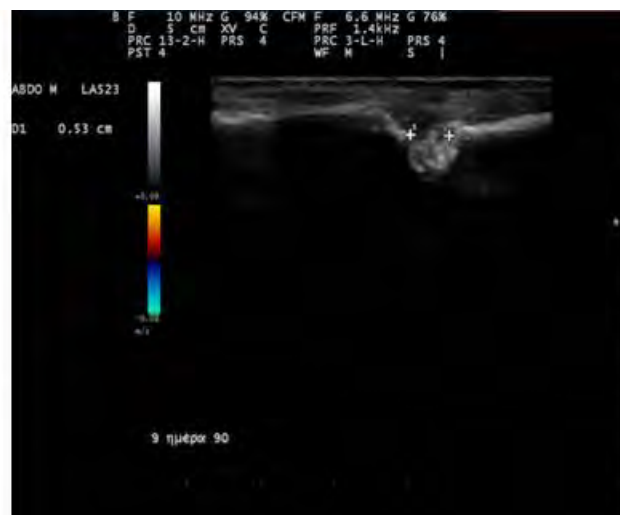
Το αρχικό μήκος του οστικού ελλείμματος ήταν 15 mm σε όλα τα ζώα της μελέτης. Στο πρώτο δεκαήμερο, το μήκος αυτό αυξήθηκε ή μειώθηκε ήπια σε όλα τα ζώα της μελέτης ανεξάρτητα από το εισαχθέν βιοϋλικό. Όπως φαίνεται, από την 20^η ημέρα άρχισε να μειώνεται

σε όλες τις ομάδες με διαφορετικό ρυθμό. Διαπιστώθηκε ότι στην πορεία της μελέτης η απόσταση των καταγματικών άκρων ήταν πάντα μικρότερη στην ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα Α και Β. Από τη 40^η ημέρα το μήκος του οστικού ελλείμματος των ζώων της ομάδας Γ είχε σημαντική τάση για μείωση έναντι των υπόλοιπων ομάδων (Εικόνα 19). Γωνία κλίσης για την ομάδα Α: $-0,035 \pm 0,007$, Β: $-0,078 \pm 0,018$, Γ: $-0,082 \pm 0,012$, Δ: $-0,040 \pm 0,002$ ($p = 0,011$ μεταξύ των Α και Γ, $p > 0,06$ για τις υπόλοιπες συγκρίσεις).



Εικόνα 19: Εξέλιξη του μήκους του ελλείμματος από την 40^η έως την 90^η ημέρα πειραματισμού (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Την 75^η ημέρα από την ανάλυση Kruskal-Wallis καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μεταβολή του μήκους του ελλείμματος μεταξύ των ομάδων ($p = 0,006$). Ομοίως, την 90^η και τελευταία ημέρα του πειραματισμού καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μεταβολή του μήκους του ελλείμματος μεταξύ των ομάδων ($p = 0,002$) (Εικόνες 20, 21, 22). Επίσης, το σύνολο των μετρήσεων μεταξύ των ομάδων συνοδεύεται από στατιστικώς σημαντικές διαφορές, όπου οι διάμεσες τιμές (ελάχιστη-μέγιστη) που καταγράφονται είναι 8 (6-17) mm, 8,5 (3-18) mm, 6 (2-17) mm και 8 (3-17) mm για τις ομάδες Α, Β, Γ και Δ, αντίστοιχα ($p = 0,008$).

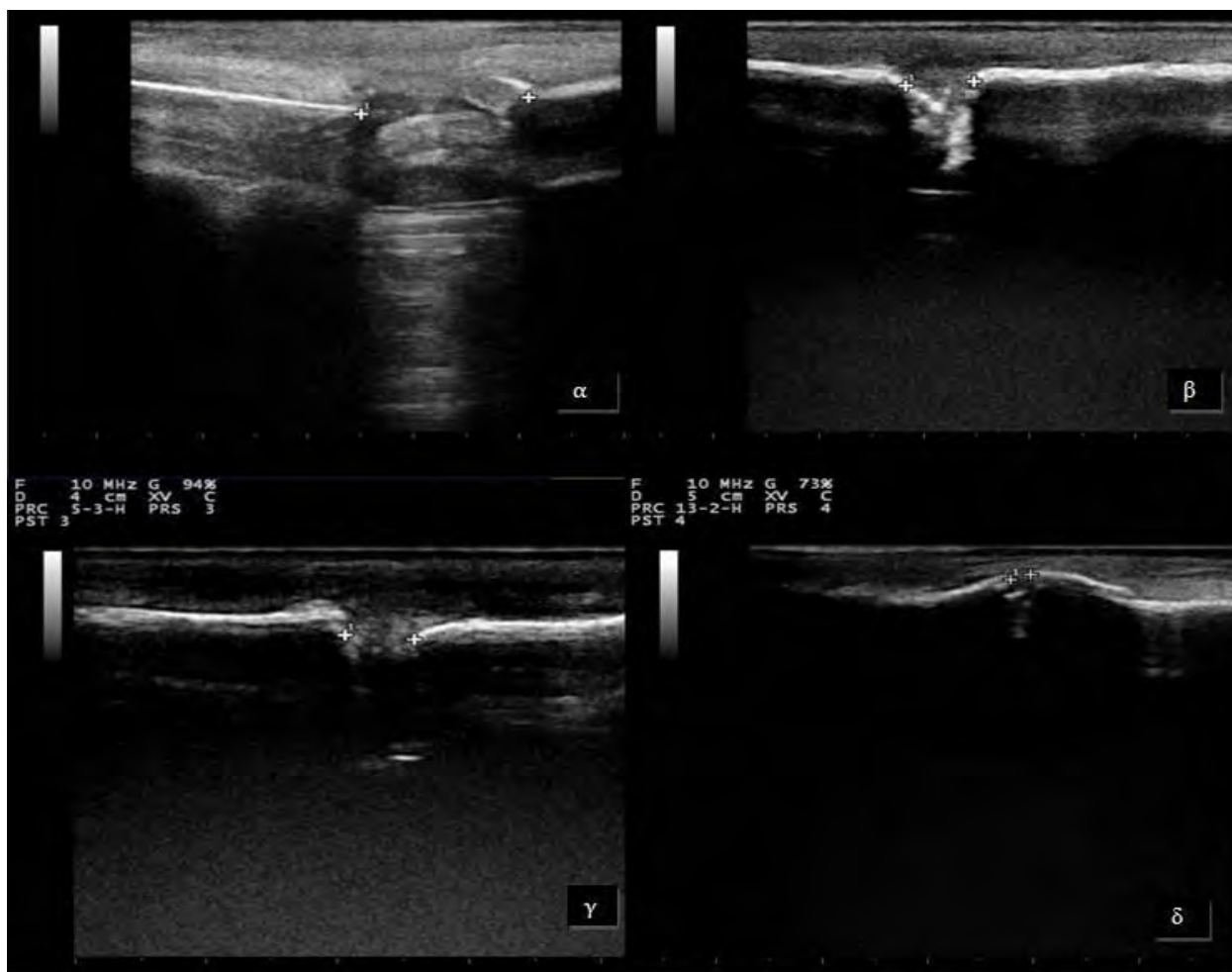


Εικόνα 20: Υπερηχοτομογραφική εικόνα την ημέρα 90 σε ζώο της ομάδας Α με μήκος ελλείμματος 7 mm (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Β με μήκος ελλείμματος 5 mm (δεξιά).

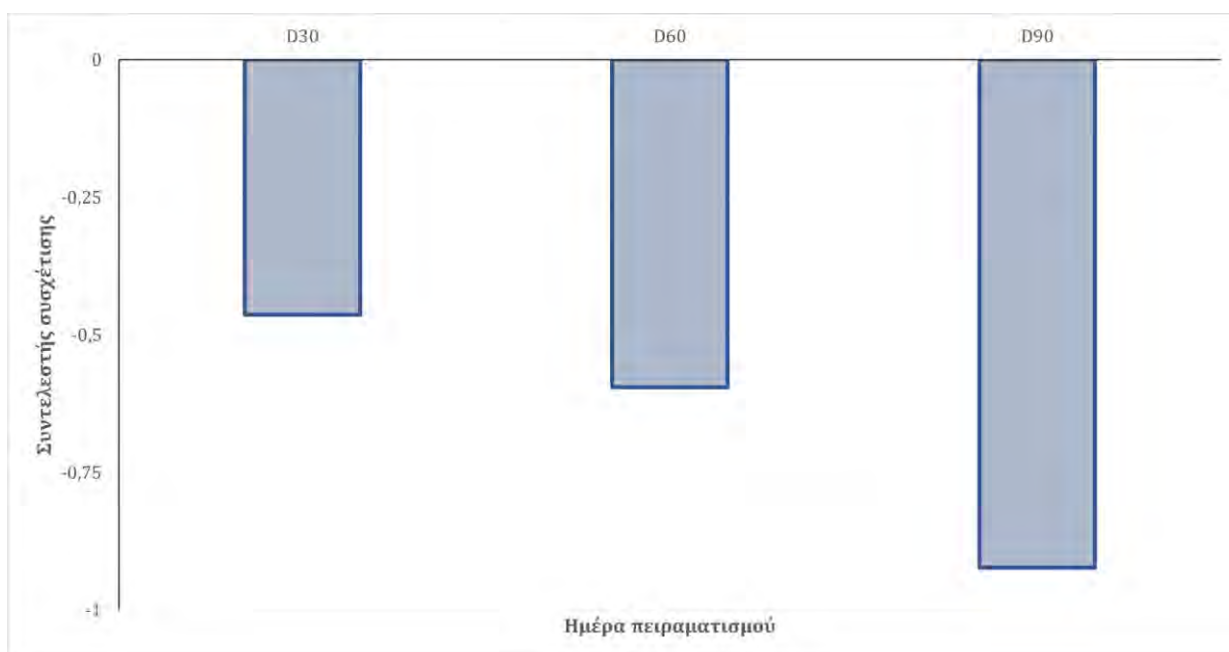


Εικόνα 21: Υπερηχοτομογραφική εικόνα την ημέρα 90 σε ζώο της ομάδας Γ με μήκος ελλείμματος 1,8 mm (αριστερά) και της ομάδας Δ με μήκος ελλείμματος 4 mm (δεξιά).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δοκιμή συσχέτισης μεταξύ της ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης και της υπερηχοτομογραφικής αξιολόγησης του μήκους του οστικού ελλείμματος και διαπιστώθηκε ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση με τιμές $r = -0,783$, $p < 0,0001$ σε όλη τη διάρκεια της μελέτης και στο σύνολο των μετρήσεων. Παρατηρείται σημαντική μείωση του συντελεστή συσχέτισης στη μονάδα του χρόνου και συγκεκριμένα $r = -0,463$ ($p = 0,037$), $r = -0,595$ ($p = 0,002$) και $r = -0,923$ ($p < 0,001$) στις ημέρες 30, 60 και 90, αντίστοιχα (Εικόνα 23). Φαίνεται, συνεπώς, πως την 60^η και 90^η ημέρα του πειραματισμού καταγράφεται απόλυτη συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων. Συνεπάγεται έτσι ότι το αποτέλεσμα των δύο αυτών μεθόδων είναι αξιόπιστο και η ταύτιση των ευρημάτων ενισχύει την αξιοπιστία της καθημιάς.



Εικόνα 22: Υπερηχοτομογραφικό μήκος του οστικού ελλείμματος σε ζώο της ομάδας Γ, στις α) 10 (16 mm), β) 30 (6,5 mm), γ) 60 (5 mm) και δ) 90 (2 mm) ημέρες μετεγχειρητικά.



Εικόνα 23: Σταδιακή μείωση (D30, D60, D90) του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ του μήκους του οστικού ελλείμματος και των ευρημάτων της ακτινολογικής κλίμακας.

Πραγματοποιήθηκε τεστ συσχέτισης μεταξύ της κλίμακας χωλότητας και της υπερηχοτομογραφικής αξιολόγησης του μήκους του οστικού ελλείμματος και στο σύνολο των μετρήσεων σημειώθηκε θετική συσχέτιση με τιμές $r = 0,664$, $p < 0,0001$.

4.2. Αγγείωση του ελλείμματος

Στα ίδια χρονικά διαστήματα με την χρήση του Color Doppler πραγματοποιήθηκε και ποιοτική αξιολόγηση της αγγείωσης του ελλείμματος και των παρακείμενων ιστών με κλίμακα αξιολόγησης από 0 (πλήρης απουσία ένδειξης αιμάτωσης) έως 3 (έντονου χρώματος έως κίτρινο, πολυπληθή αγγεία). Για την αντικειμενική αξιολόγηση της αγγείωσης μελετήθηκε η αιμάτωση σε ίδιο αριθμό υπερηχοτομογραφικών εικόνων σε κάθε ζώο ανά μέτρηση. Τα αποτελέσματα παραθέτονται στον Πίνακα 9.

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)							
	D10	D20	D30	D40	D50	D60	D75	D90
Α	1	2	2	1	1	1	1	0,5
	(1-2)	(2-3)	(1-2)	(1-2)	(1-1)	(1-1)	(1-1)	(0-1)
Β	1	2,5	1,5	1	1	1	0	0
	(1-2)	(2-3)	(1-2)	(1-2)	(0-2)	(0-1)	(0-1)	(0-0)
Γ	2	3	2	1	1	1	0	0
	(1-2)	(2-3)	(1-2)	(1-2)	(0-1)	(0-1)	(0-1)	(0-0)
Δ	1	3	2	1	1	1	0	0
	(1-1)	(2-3)	(1-2)	(1-2)	(1-1)	(0-1)	(0-1)	(0-0)

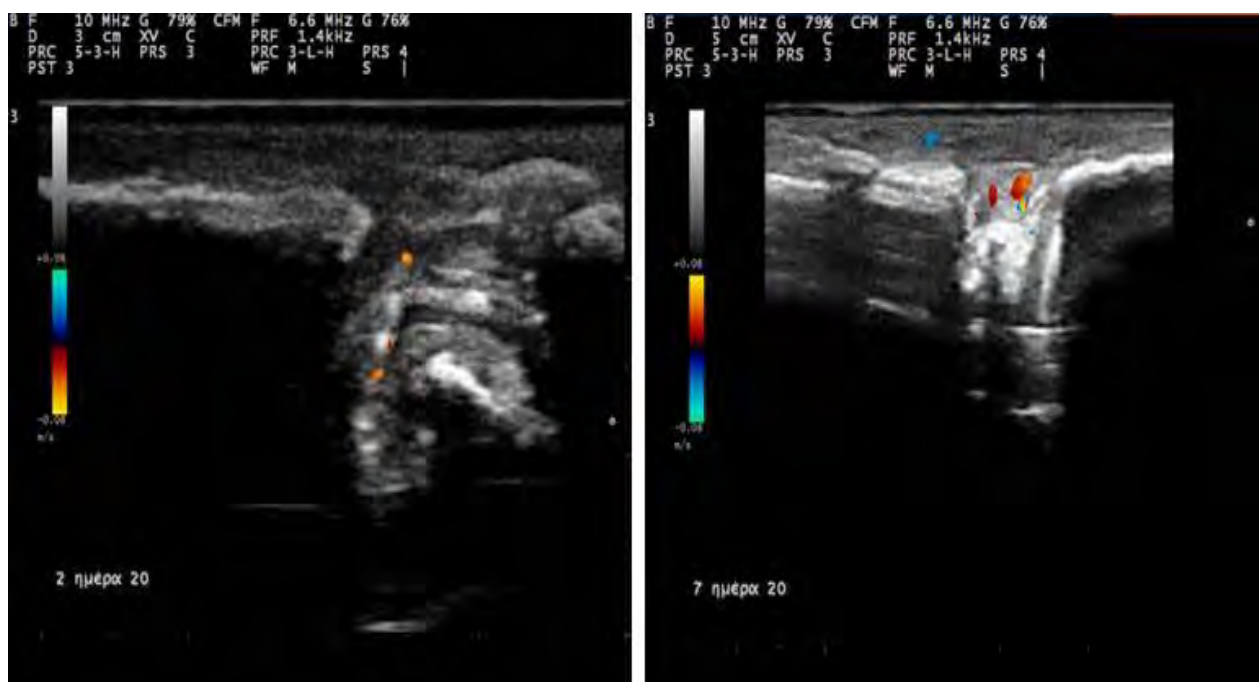
Πίνακας 9: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) της αξιολόγησης της αγγείωσης του ελλείμματος και των γύρω ιστών κάθε ομάδας ανά μέτρηση.

Σε όλα τα ζώα της μελέτης η αγγείωση κορυφώθηκε την 20^η ημέρα του πειραματισμού. Καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν στα ζώα της ομάδας Γ και Δ με διάμεση τιμή 3/3 και, ακολούθως στα ζώα της ομάδας Β (2,5/3) και στα ζώα της Α ομάδας με σκορ 2 /3 (Εικόνες 24, 25).

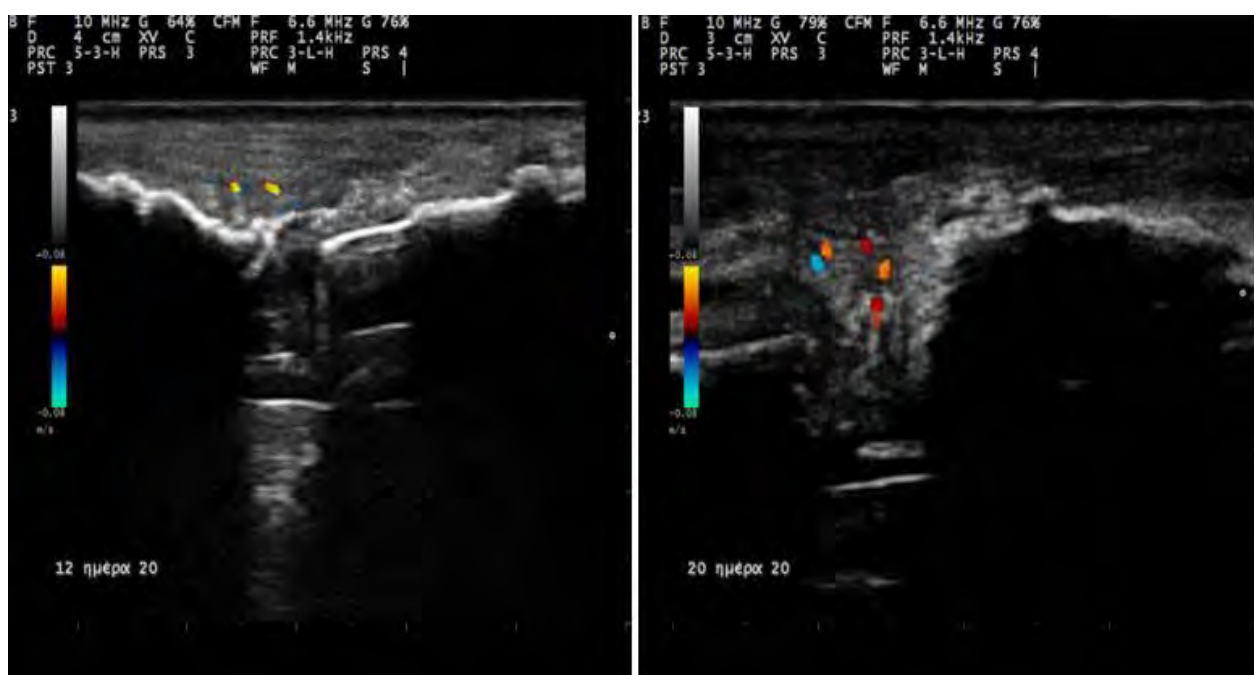
Μετά την 20^η ημέρα του πειραματισμού η αιμάτωση στην περιοχή άρχισε να μειώνεται, όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 26).

Συνολικά, δεν κατεγράφησαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την αγγείωση του σημείου της οστεκτομής μεταξύ των τεσσάρων ομάδων πειραματισμού, ούτε στο σύνολο των μετρήσεων ($p = 0,44$), ούτε σε κάποια συγκεκριμένη ημέρα μελέτης ($p > 0,09$). Ωστόσο, σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ζώων των ομάδων Β, Γ και Δ έλαβαν τιμή 0 την 75^η και 90^η ημέρα πειραματισμού (83% των περιπτώσεων), έναντι 25% της ομάδας Α ($p = 0,0003$).

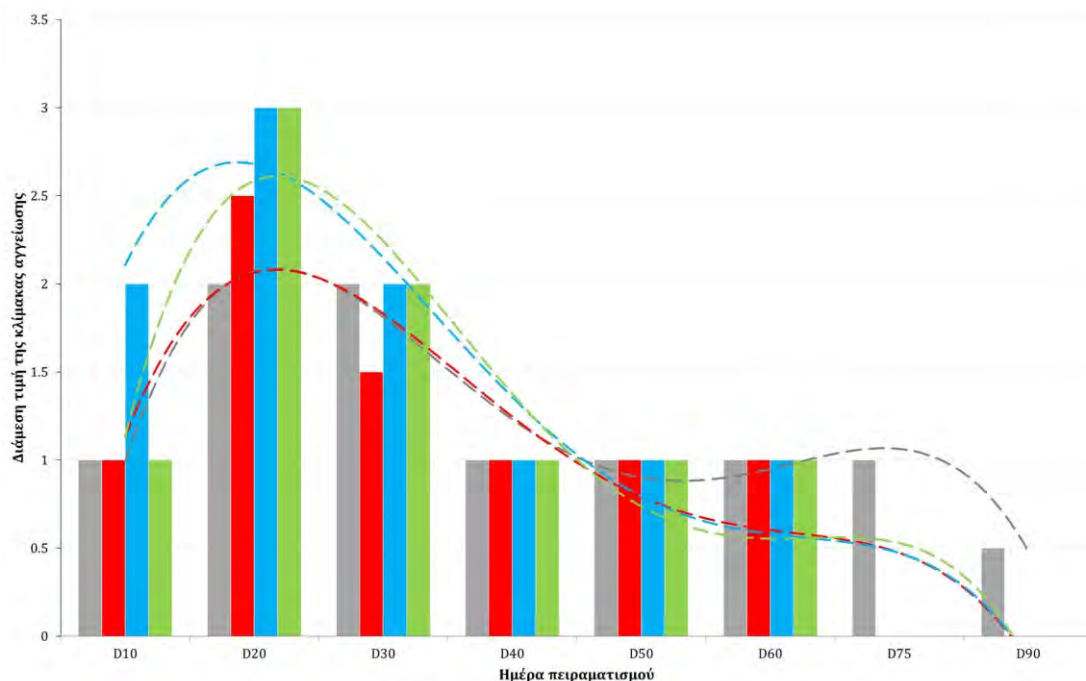
Τέλος, στο σύνολο των μετρήσεων παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ των υπερηχοτομογραφικών ευρημάτων που αφορούν το μήκος του οστικού ελλείμματος και την αιμάτωσή του ($r = 0,675$, $p < 0,0001$).



Εικόνα 24:Υπερηχοτομογραφική εικόνα της αγγείωσης στο έλλειμμα την ημέρα 20 σε ζώο της ομάδας Α με βαθμολογία 2/3 (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Β με βαθμολογία 3/3 (δεξιά).



Εικόνα 25:Υπερηχοτομογραφική εικόνα της αγγείωσης στο έλλειμμα την ημέρα 20 σε ζώο της ομάδας Γ με βαθμολογία 3/3 (αριστερά) και σε ζώο της ομάδας Δ με βαθμολογία 3/3 (δεξιά).



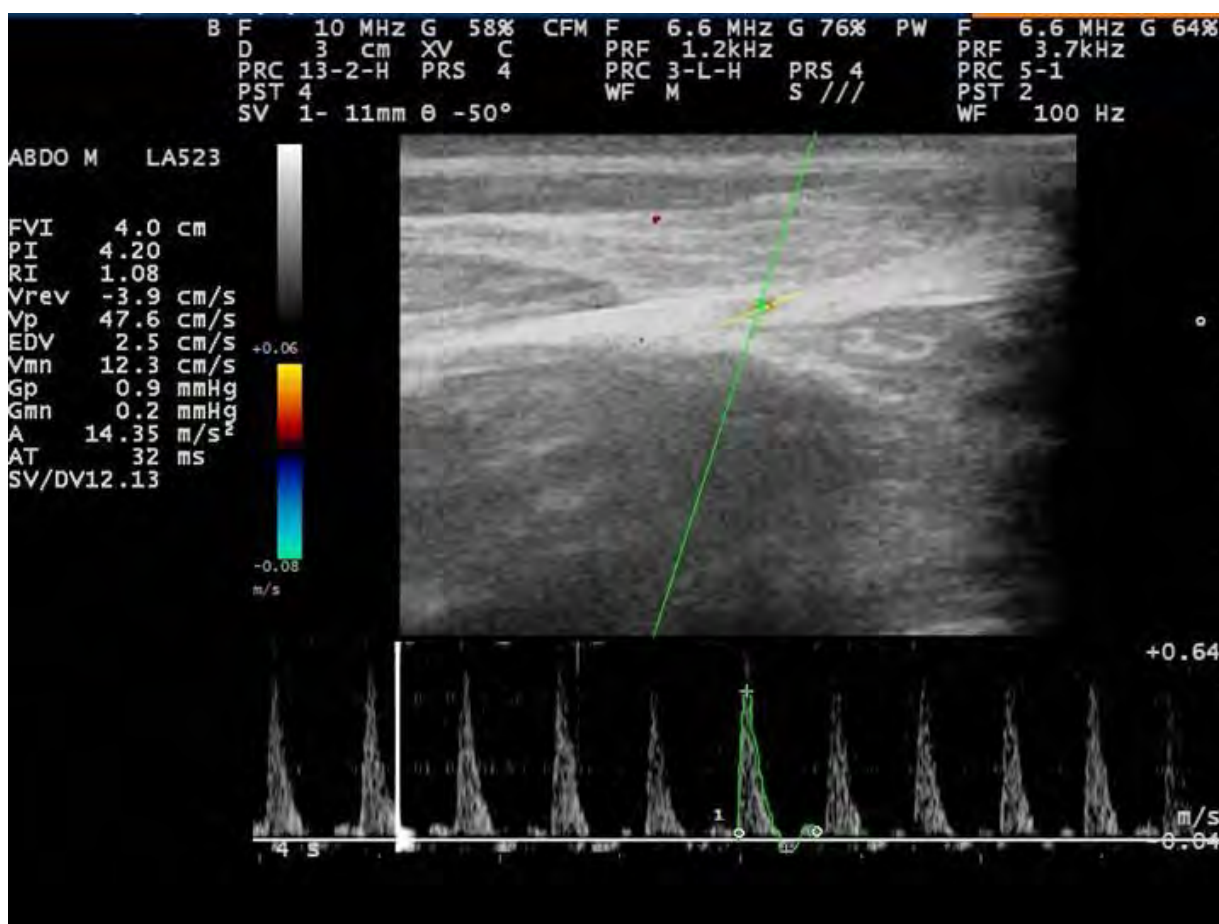
Εικόνα 26: Βαθμολόγηση της αγγείωσης του ελλείμματος και των γύρω ιστών κάθε ομάδας ανά μέτρηση (Ομάδα Α : γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

4.3. Παράμετροι της ροής του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία

Ανά δεκαήμερο έως την 40^η ημέρα του πειραματισμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ροής της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας. Προεγχειρητικά, έγινε καταγραφή των φυσιολογικών παραμέτρων της (Πίνακας 10), που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση παθολογικών καταστάσεων του περιφερικού τμήματος των άκρων των μικρών μηρυκαστικών της μελέτης μας αλλά και γενικότερα μελλοντικά στην κλινική πράξη. Η προεγχειρητική μέτρηση επιβεβαίωσε την απουσία αγγειακής πάθησης ή φλεγμονής του περιφερικού άκρου, καθώς η ροή ήταν τριφασική (Εικόνα 27), όπως αναμενόταν με βάση μελέτες στον άνθρωπο (Γιαννούκας και Λαμπρόπουλος 2013). Οι μετρήσεις μας αφορούσαν τόσο τις μεταβολές της αγγείωσης στη μονάδα του χρόνου όσο και τις τυχόν διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες πειραματισμού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των αιμοδυναμικών παραμέτρων παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 10).

	Διάμεση τιμή	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
RI	1,07	0,78	1,13
PI	4,36	2,18	6,53
BF (ml/min)	37	11	102
SV/DV	9,9	4,48	16,14
EDV (cm/s)	2,9	0,8	9,9
PSV (cm/s)	41,6	15,5	56,3
A (m/s ²)	7,35	2,14	12,54
D (cm)	0,3	0,16	0,39

Πίνακας 10: Προεγχειρητικές τιμές (φυσιολογικές τιμές αναφοράς) για τις παραμέτρους της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του προβάτου.



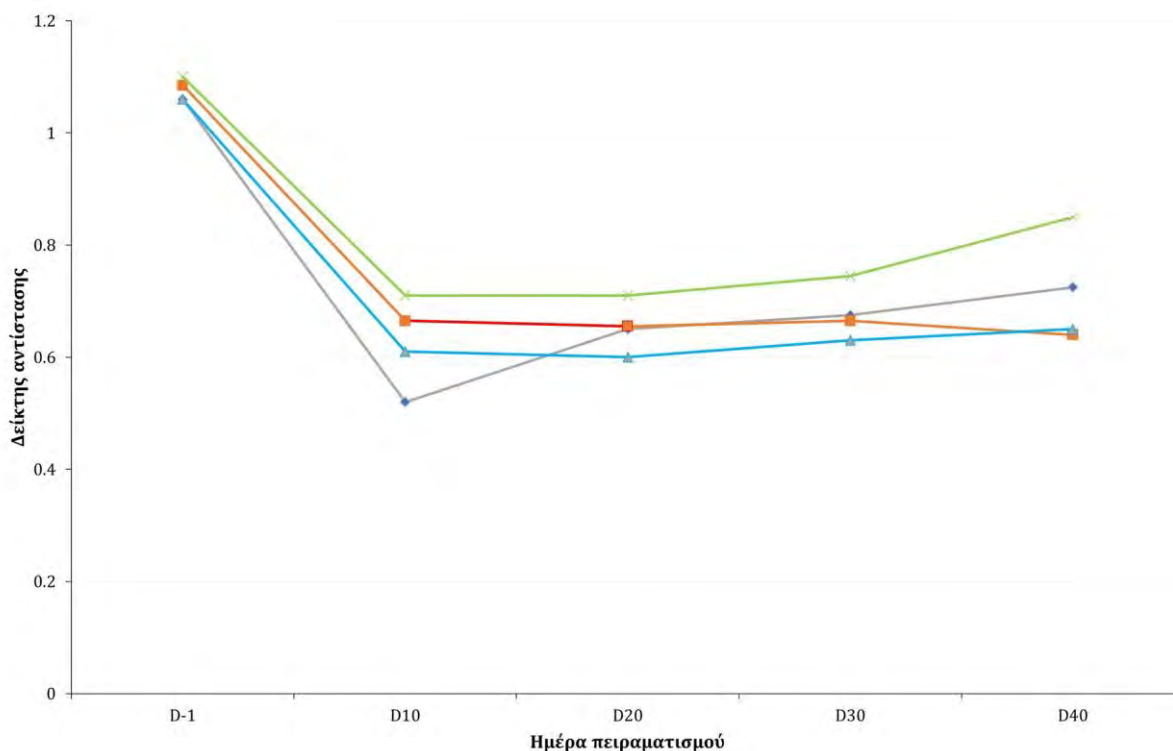
Εικόνα 27: Φυσιολογική κυματομορφή της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας προβάτου. Αριστερά φαίνονται οι τιμές των αιμοδυναμικών παραμέτρων του συγκεκριμένου ζώου.

Ακολουθούν αναλυτικά στη διάρκεια σαράντα ημερών τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ανά παράμετρο.

Οι διάμεσες τιμές ανά δεκαήμερο, καθώς και οι ελάχιστες-μέγιστες τιμές του δείκτη αντίστασης (RI) ανά ομάδα αναγράφονται παρακάτω (Πίνακας 11, Εικόνα 28).

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)				
	D-1	D10	D20	D30	D40
A	1,06	0,52	0,65	0,68	0,73
	(0,78-1,07)	(0,41-0,78)	(0,56-0,76)	(0,65-0,8)	(0,66-0,86)
B	1,09	0,665	0,655	0,665	0,64
	(0,94-1,13)	(0,56-0,77)	(0,52-0,85)	(0,52-0,88)	(0,59-0,9)
Γ	1,06	0,61	0,6	0,63	0,65
	(0,88-1,1)	(0,48-0,7)	(0,55-0,66)	(0,55-0,76)	(0,59-0,77)
Δ	1,1	0,71	0,71	0,75	0,85
	(0,9-1,12)	(0,68-0,78)	(0,6-0,71)	(0,73-0,76)	(0,78-0,88)

Πίνακας 11: Διάμεση τιμή RI (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.



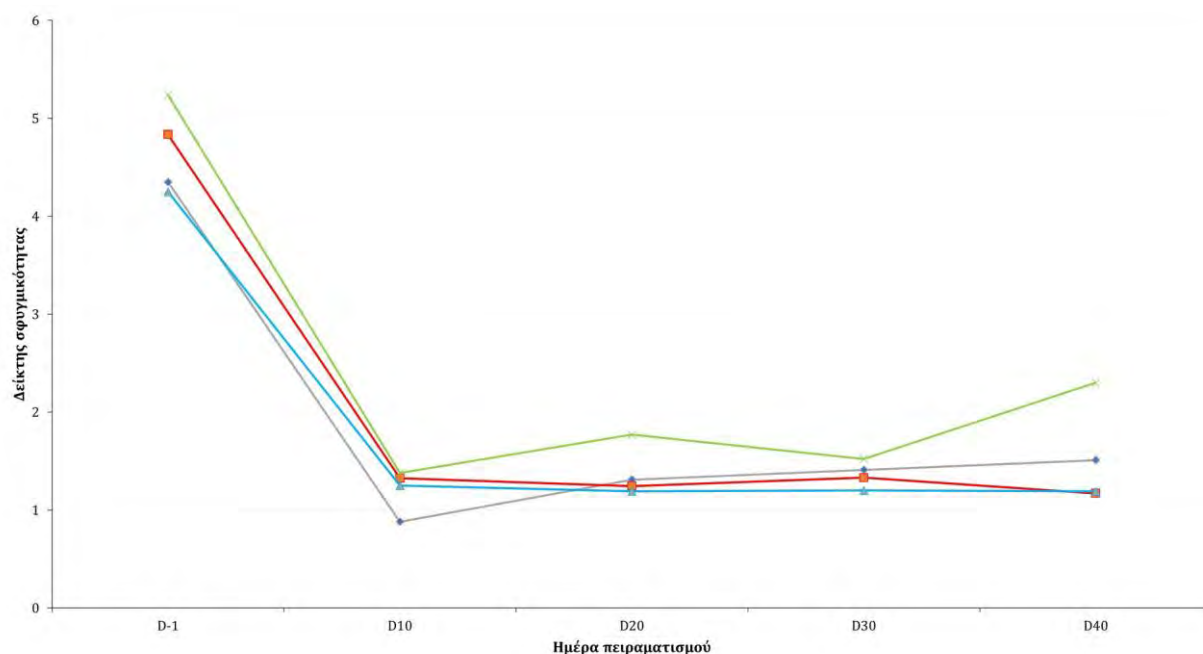
Εικόνα 28: Εξέλιξη RI κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Η διάμεση τιμή RI μεταξύ των ζώων της μελέτης προεγχειρητικά ήταν 1,07 ενώ αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση και έως το πρώτο δεκαήμερο μειώθηκε κατά περίπου 40% (RI = 0,64). Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά σε καμία από τις ανά δεκαήμερο μετρήσεις. Από την 20^η ημέρα στην ομάδα Α καταγράφεται σταδιακή αύξηση που συνεχίζεται ως το τέλος των μετρήσεων. Αντίθετα, στις ομάδες Β, Γ και Δ συνεχίζει να μειώνεται και στην 20^η ημέρα, ενώ αύξηση παρατηρείται από την 30^η ημέρα του πειραματισμού. Την 40^η ημέρα του πειραματισμού, φαίνεται ότι οι ομάδες Β και Γ έχουν χαμηλότερη τιμή RI σε σχέση με τις άλλες δύο.

Οι διάμεσες τιμές για τον δείκτη σφυγμικότητας (PI) ανά δεκαήμερο αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 12, Εικόνα 29).

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)				
	D-1	D10	D20	D30	D40
A	4,35 (2,18-6,53)	0,88 (0,6-1,86)	1,31 (0,93-1,82)	1,41 (1,03-1,5)	1,51 (1,29-2,77)
B	4,84 (3,89-5,4)	1,33 (0,97-1,76)	1,25 (0,81-3,25)	1,33 (0,82-1,5)	1,17 (1-3,02)
Γ	4,25 (3,01-4,37)	1,25 (0,75-1,5)	1,19 (0,91-1,41)	1,2 (0,91-1,77)	1,19 (0,98-1,56)
Δ	5,24 (3,26-6,49)	1,38 (1,34-2,11)	1,77 (1,13-1,79)	1,52 (1,3-1,74)	2,3 (2,29-2,57)

Πίνακας 12: Διάμεση τιμή PI (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.



Εικόνα 29: Εξέλιξη PI κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

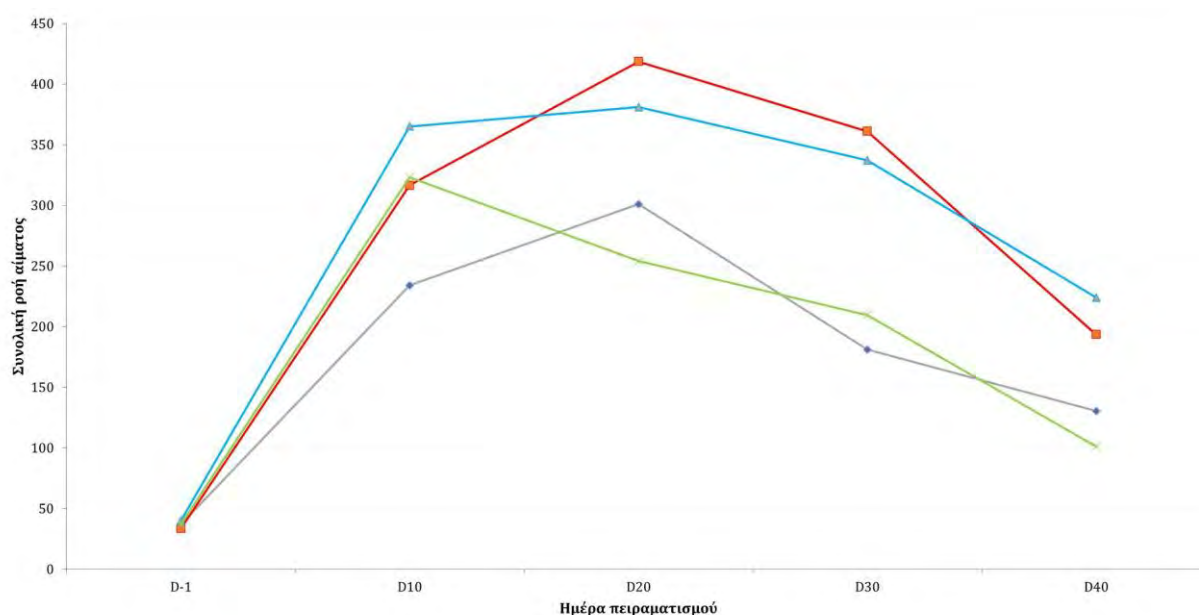
Προεγχειρητικά καταγράφεται διάμεση τιμή $PI = 4,36$. Παρατηρείται ότι η τιμή PI την ημέρα 10 έχει υποτετραπλασιαστεί σε όλα τα ζώα της μελέτης κάτι που αποτελεί ένδειξη αυξημένης αγγείωσης περιφερικά του σημείου μέτρησης. Μεταξύ των ομάδων δεν καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά. Φαίνεται ότι οι ομάδες Α και Δ σημειώνουν ελάχιστη τιμή PI τη 10^η ημέρα του πειραματισμού και στη συνέχεια αυξάνεται, ενώ τα ζώα των ομάδων Β και Γ σημειώνουν μόνιμα χαμηλές τιμές έως τη 40^η ημέρα του πειραματισμού χωρίς, ωστόσο, να καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά. Έχουν δηλαδή χαμηλότερη παλμικότητα, άρα υπάρχει τάση ανάπτυξης μεγαλύτερης αγγείωσης περιφερικά του σημείου ελέγχου σε όλο το διάστημα της μελέτης.

Τα δεδομένα από τα πρόβατα της μελέτης μας για το συνολικό όγκο ροής (BF) στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία καταγράφονται παρακάτω (Πίνακας 13) και περιγράφονται ως ml/min

Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)				
	D-1	D10	D20	D30	D40
Α	37	234	301	181	130,5
	(11-69)	(54-1097)	(87-436)	(68-379)	(45-191)
Β	33,5	316,5	418,5	361	193,5
	(22-51)	(242-437)	(163-501)	(132-426)	(86-403)
Γ	40	365	381	337	224
	(30-78)	(233-415)	(296-656)	(266-507)	(178-324)
Δ	37	323	254	209,5	101
	(31-71)	(216-330)	(143-303)	(205-214)	(99-159)

Πίνακας 13: Διάμεση τιμή BF (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.

Προεγχειρητικά, η διάμεση τιμή του συνολικού όγκου της ροής του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία ισοδυναμούσε με 37 ml/min. Την ημέρα 10 είναι 323 ml/min, δηλαδή αυξημένη κατά 8,7 φορές. Την 20^η ημέρα του πειραματισμού, η διάμεση τιμή του συνολικού όγκου ροής του αίματος εξακολουθεί να δείχνει αυξητική τάση και είναι 381 ml/min. Τα ζώα των ομάδων Β και Γ έχουν τις μεγαλύτερες τιμές, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικώς σημαντικές, ενώ στην ομάδα Δ καταγράφεται μείωση της ροής. Από την 30^η ημέρα του πειραματισμού η ροή δείχνει μειωμένη σε όλα τα ζώα ανεξαρτήτως ομάδας και παρέμβασης, όπως και τη 40^η ημέρα, χωρίς στατιστικώς σημαντικές επιμέρους διαφορές μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 30).

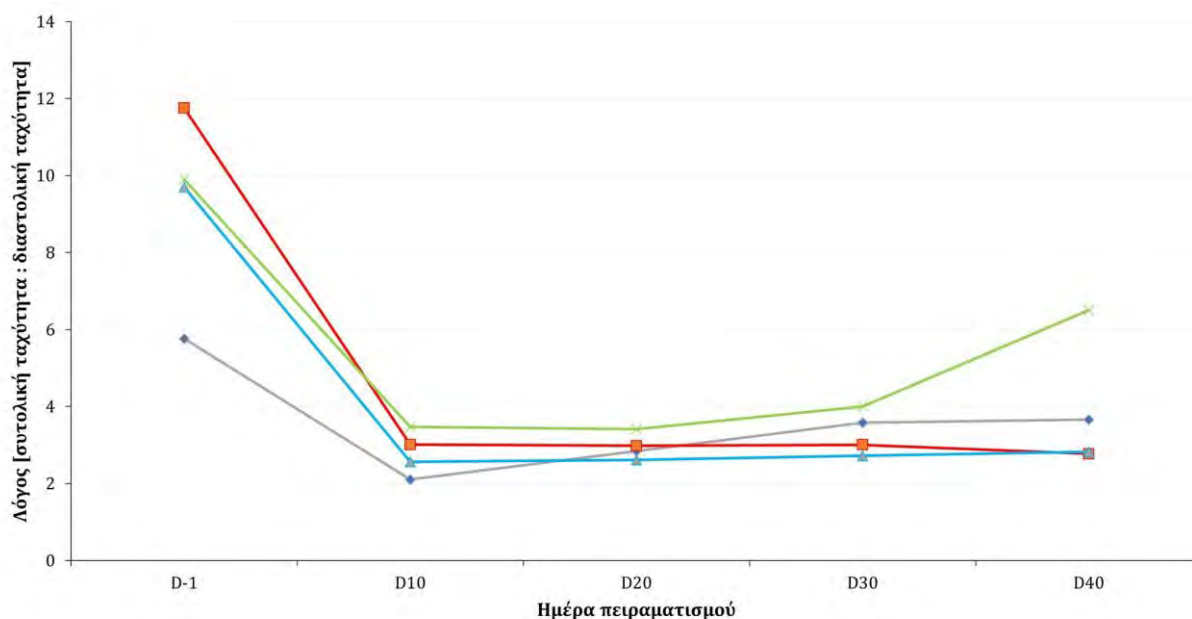


Εικόνα 30: Εξέλιξη BF κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Προεγχειρητικά η διάμεση τιμή του λόγου συστολικής προς διαστολική ταχύτητα (SV/DV) του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία ισοδυναμούσε με 9,9. Σε όλα τα ζώα στις δέκα πρώτες ημέρες της μελέτης καταγράφηκε έντονη μείωση, η οποία διατηρήθηκε χαμηλά έως και την 40^η ημέρα του πειραματισμού χωρίς ωστόσο, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 14, Εικόνα 31). Στην ομάδα Γ φαίνεται τάση για σημαντικότερη αγγειοδιαστολή περιφερικά του σημείου μέτρησης, άρα, ενδεχομένως να αναπτύσσονται περισσότερα τριχοειδή αγγεία.

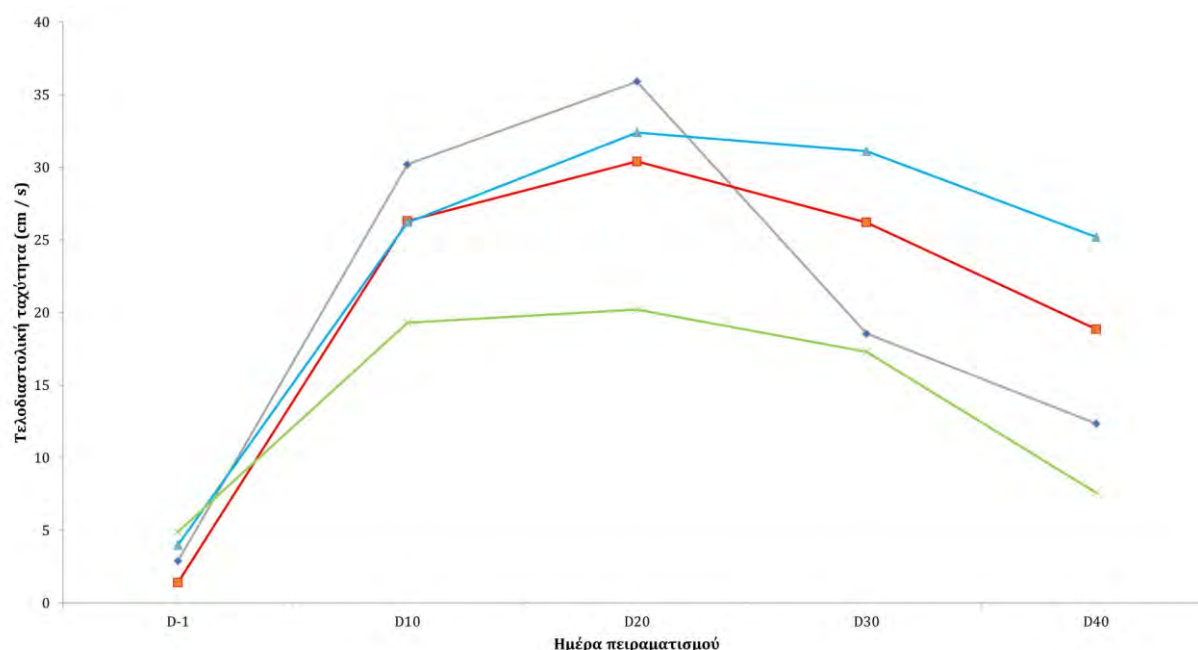
Ομάδα	Ημέρα μελέτης (D)				
	D-1	D10	D20	D30	D40
A	5,76	2,1	2,84	3,58	3,66
	(4,48-15,88)	(1,68-4,63)	(2,29-4,14)	(2,89-5,05)	(2,93-7,35)
B	11,76	3,01	2,98	3	2,77
	(7,75-13,38)	(2,29-4,31)	(2,06-6,74)	(2,06-8,5)	(2,46-9,8)
Γ	9,7	2,56	2,61	2,72	2,82
	(8-16,14)	(1,91-3,33)	(2,21-2,91)	(2,25-4,12)	(2,42-4,29)
Δ	9,9	3,47	3,41	4	6,5
	(8,38-10,13)	(3,08-4,56)	(2,78-4,23)	(3,76-4,24)	(4,63-8,21)

Πίνακας 14: Διάμεση τιμή SV/DV (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα ανά δεκαήμερο μελέτης.



Εικόνα 31:Εξέλιξη SV/DV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα A: γκρι χρώμα, B: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Προεγχειρητικά, στα ζώα της μελέτης καταγράφεται διάμεση τιμή τελοδοιαστολικής ταχύτητας (EDV) 2,9 cm/s ενώ αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση και έως την 10^η ημέρα καταγράφεται αύξηση έως και δέκα φορές (διάμεση τιμή EDV = 25,9 cm/s). Από το ακόλουθο διάγραμμα, η μέτρηση της EDV δείχνει, με εξαίρεση την ομάδα A, όπου μειώνεται απότομα μετά την 20^η ημέρα, είτε αγγειοδιαστολή είτε αυξημένο αριθμό τριχοειδών αγγείων περιφερικά του σημείου μέτρησης στα ζώα των υπόλοιπων ομάδων, χωρίς, ωστόσο, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, αλλά με καλύτερη τάση στην ομάδα Γ (Εικόνα 32).

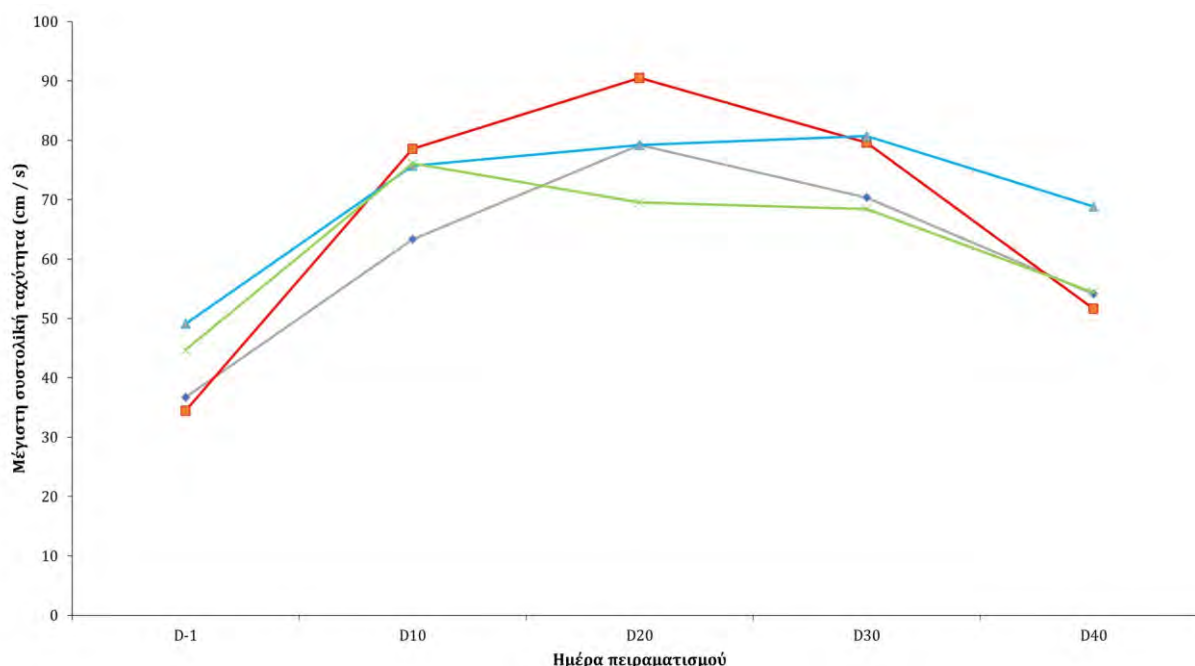


Εικόνα 32:Εξέλιξη EDV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Προεγχειρητικά καταγράφεται στο σύνολο των ζώων διάμεση τιμή μέγιστης συστολικής ταχύτητας (PSV) 41,6 cm/s ενώ, αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση, παρατηρείται αύξηση. Αν και δεν καταγράφονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων πειραματισμού, οι μέγιστες τιμές παρατηρούνται στα ζώα των ομάδων Α και Β κατά την 20^η ημέρα του πειραματισμού ενώ στη συνέχεια μειώνονται. Στα ζώα της ομάδας Δ οι μέγιστες τιμές σημειώνονται τη 10^η ημέρα, ενώ στα ζώα της ομάδας Γ παραμένουν σταθερά ψηλά έως και την 30^η ημέρα του πειραματισμού οπότε και στη συνέχεια μειώνονται (Εικόνα 33).

Η διάμεση τιμή της επιτάχυνσης προεγχειρητικά ήταν 7,35m/s² για να διπλασιαστεί στο δεκαήμερο. Την 20^η και 30^η ημέρα της μελέτης παρέμεινε υψηλή, ενώ τη 40^η ημέρα διαπιστώθηκε μείωση, χωρίς ωστόσο, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων των ζώων.

Παρόμοια τάση καταγράφηκε στην εξέλιξη της διάμεσης τιμής της διαμέτρου της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας, που σε υγιή ζώα ήταν 0,3 cm και αυξήθηκε από το πρώτο δεκαήμερο και για ένα μήνα μετεγχειρητικά. Τη 40^η ημέρα του πειραματισμού είχε μειωθεί (διάμεση τιμή 0,36 cm), χωρίς, ωστόσο, να φτάσει τις αρχικές τιμές σε καμία ομάδα πειραματισμού.



Εικόνα 33: Εξέλιξη PSV κάθε ομάδας στην πορεία του χρόνου (Ομάδα Α: γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

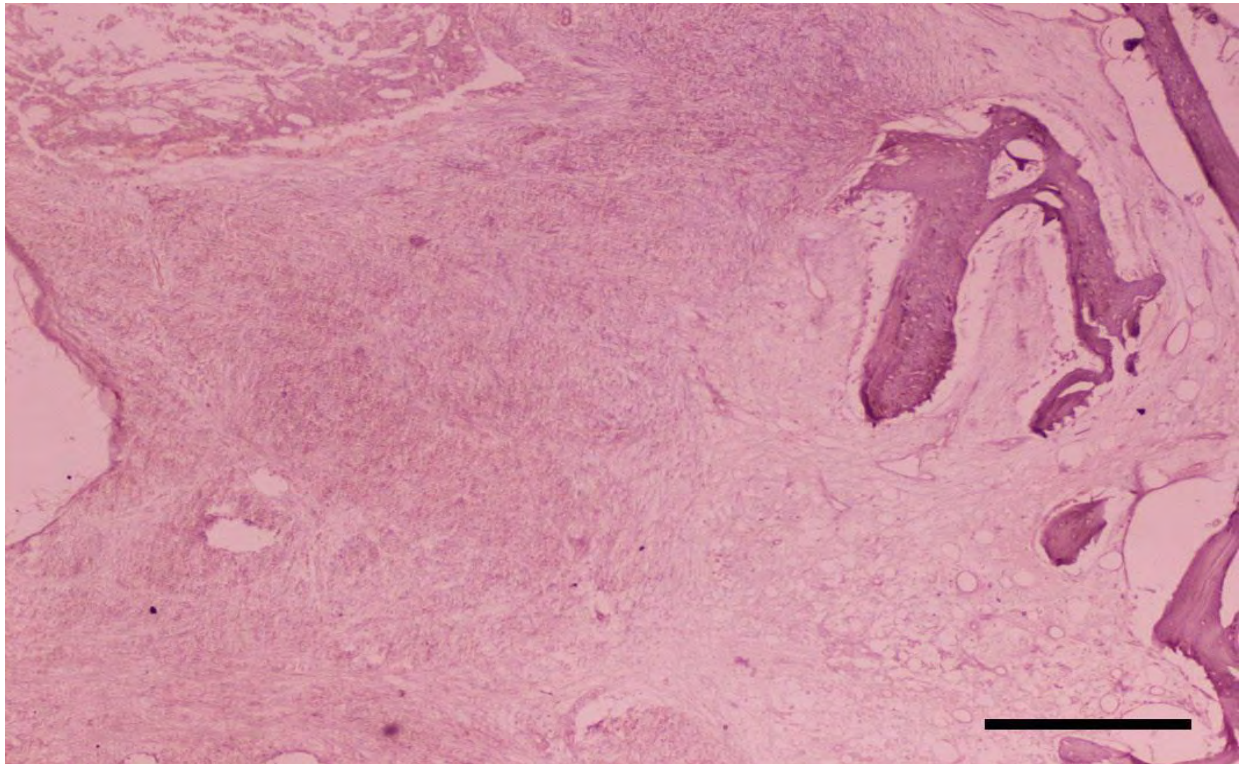
5. Ιστολογικά αποτελέσματα

Την 90^η και τελευταία ημέρα της μελέτης πραγματοποιήθηκε ευθανασία των πειραματόζώων. Το τμήμα του μεταταρσίου που λήφθηκε περιελάμβανε το σημείο του αρχικού ελλείμματος, το νεοσχηματιζόμενο πόρο και, εκατέρωθεν, τμήματα υγιούς οστού. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και απεστάλησαν σε ιστοπαθολογικό εργαστήριο για κατάλληλη προετοιμασία και αξιολόγηση. Η τελευταία διενεργήθηκε τυφλά από τον ιστοπαθολόγο ως προς το βιοϋλικό που είχε εμφυτευθεί και την ομάδα στην οποία ανήκε το κάθε δείγμα. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν με βάση κλίμακα που αξιολογούσε την οστεοενσωμάτωση του υλικού, τη γεφύρωση των καταγματικών άκρων, το είδος του πόρου και του νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού, την κυτταρική δραστηριότητα στον φλοιό του και την αγγείωση στο περίοστεο (Šantić *et al.* 2009). Οι τιμές που έλαβαν κυμαίνονταν από 0 έως 15 (Πίνακας 15).

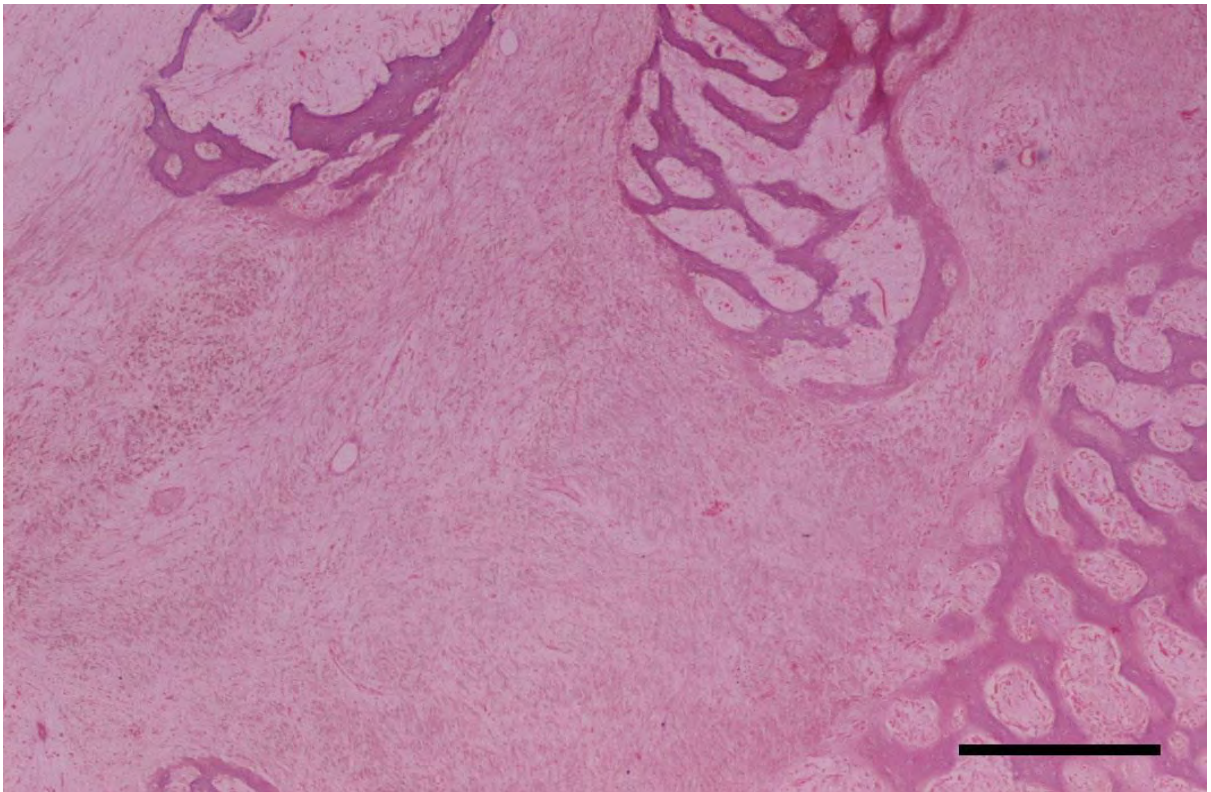
Ομάδα	Βαθμός επούλωσης
A	2 (0-4)
B	11 (4-14)
Γ	13,5 (6-14)
Δ	12 (4-14)

Πίνακας 15: Ιστολογικό σκορ: Διάμεση τιμή (ελάχιστη-μέγιστη) ανά ομάδα πειραματισμού.

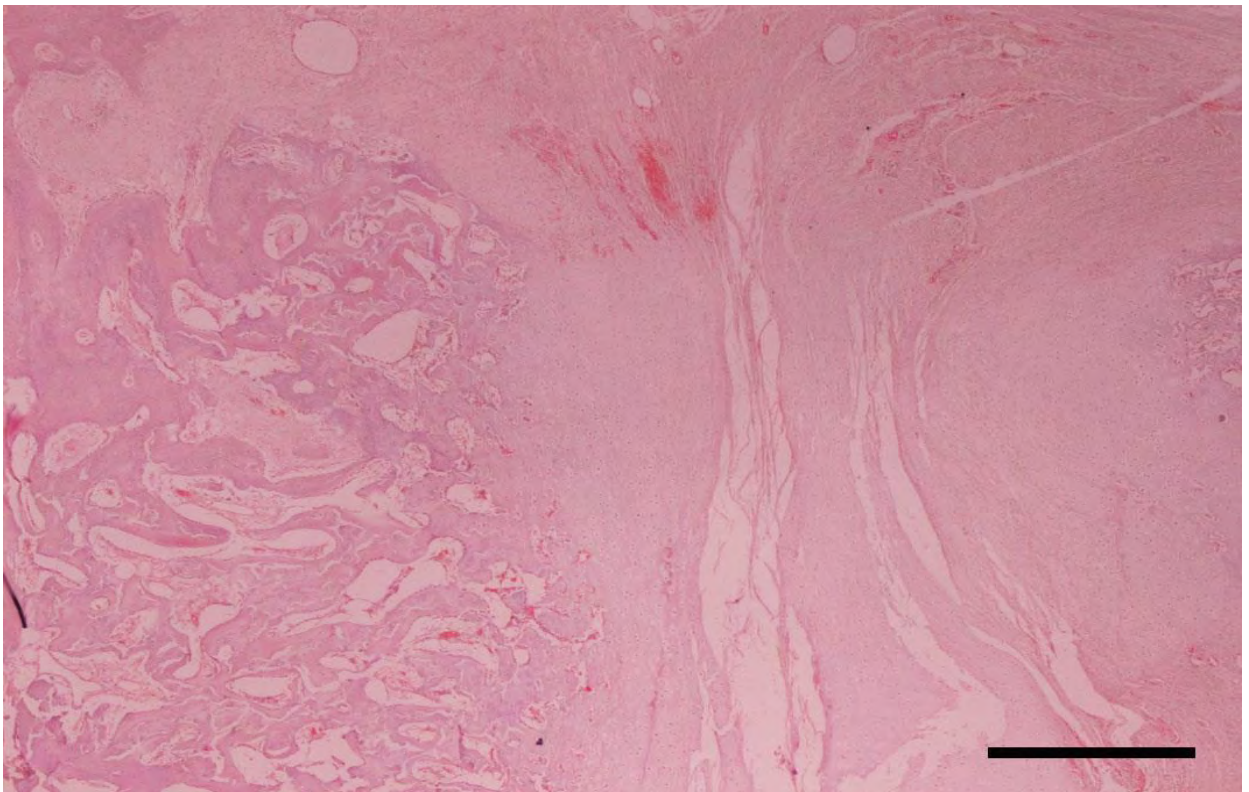
Τα ζώα της ομάδας Α έλαβαν διάμεση ιστολογική τιμή επούλωσης 2/15, ενώ τα ζώα της ομάδας Β βαθμολογήθηκαν με καλύτερη διάμεση τιμή 11/15. Τα πρόβατα της ομάδας Δ είχαν διάμεση τιμή 12/15, ενώ εκείνα της ομάδας Γ 13,5/15. Η ανάλυση Kruskal-Wallis του συνόλου των μετρήσεων την ημέρα αυτή καταγράφει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην πώρωση, όπως φαίνεται ιστολογικά, μεταξύ των ομάδων ($p = 0,022$). Παρακάτω παρατίθενται ιστολογικές εικόνες παρασκευασμάτων μεταταρσίου προβάτων 90 ημέρες μετά την οστεκτομή και την εμφύτευση του κάθε βιοϋλικού (Εικόνες 34, 35, 36, 37).



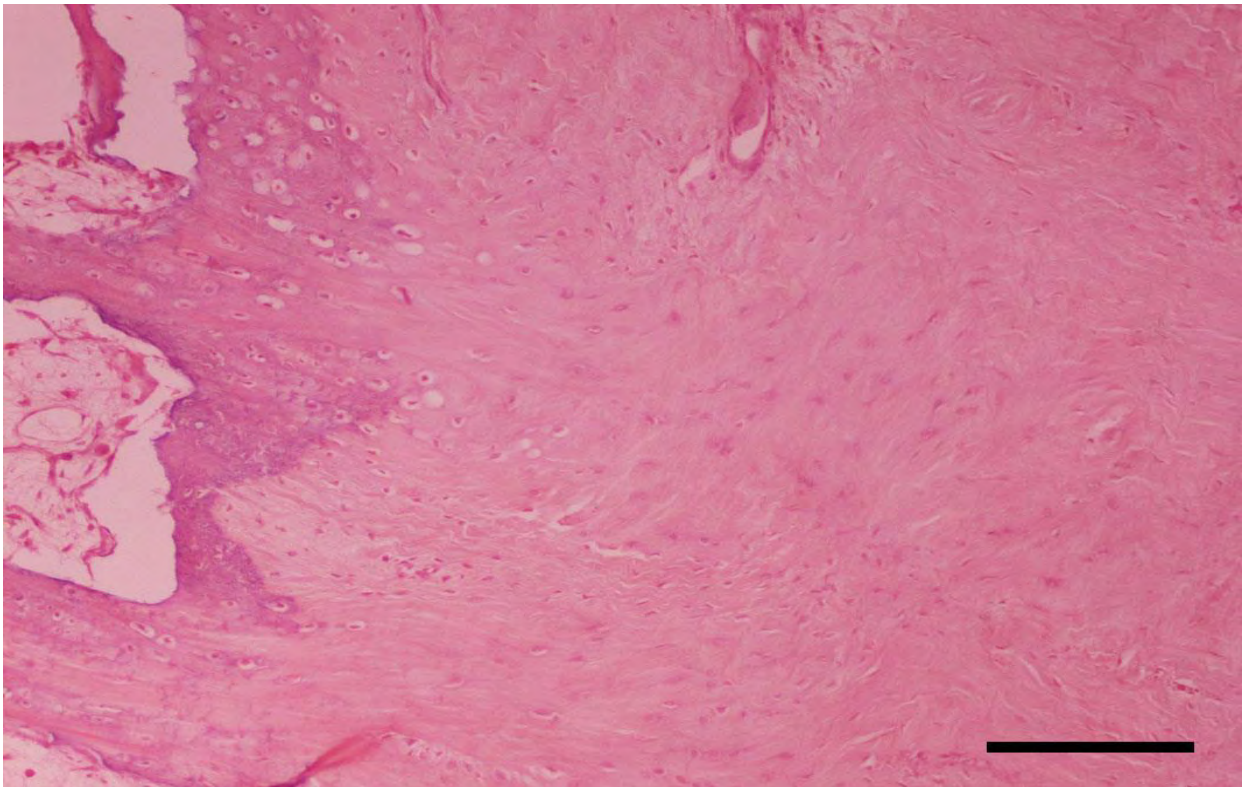
Εικόνα 34: Ομάδα Α: απουσία κυτταρικής δραστηριότητας, το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί από ακυτταρικά συγκρίματα (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 40×, bar: 250 μm).



Εικόνα 35: Ομάδα Β: το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί από ινώδη πύρο, παρατηρείται γεφύρωση από ινώδη και χόνδρινο ιστό (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 40×, bar: 250 μm).

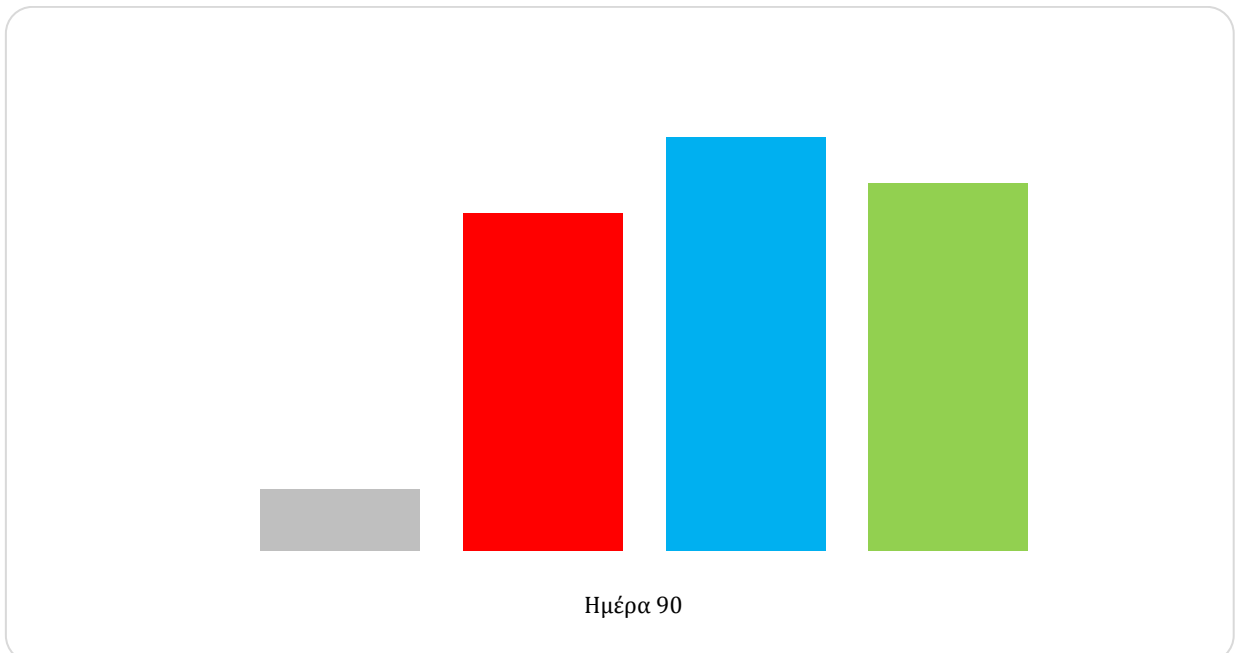


Εικόνα 36: Ομάδα Γ: το σημείο της οστεκτομής έχει καλυφθεί πλήρως από οστίτη ιστό (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 20×, bar: 500 μm).



Εικόνα 37: Ομάδα Δ: κοντινή προβολή χόνδρινου ιστού που καλύπτει πλήρως το αρχικό έλλειμμα (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση 100×, bar: 100 μm).

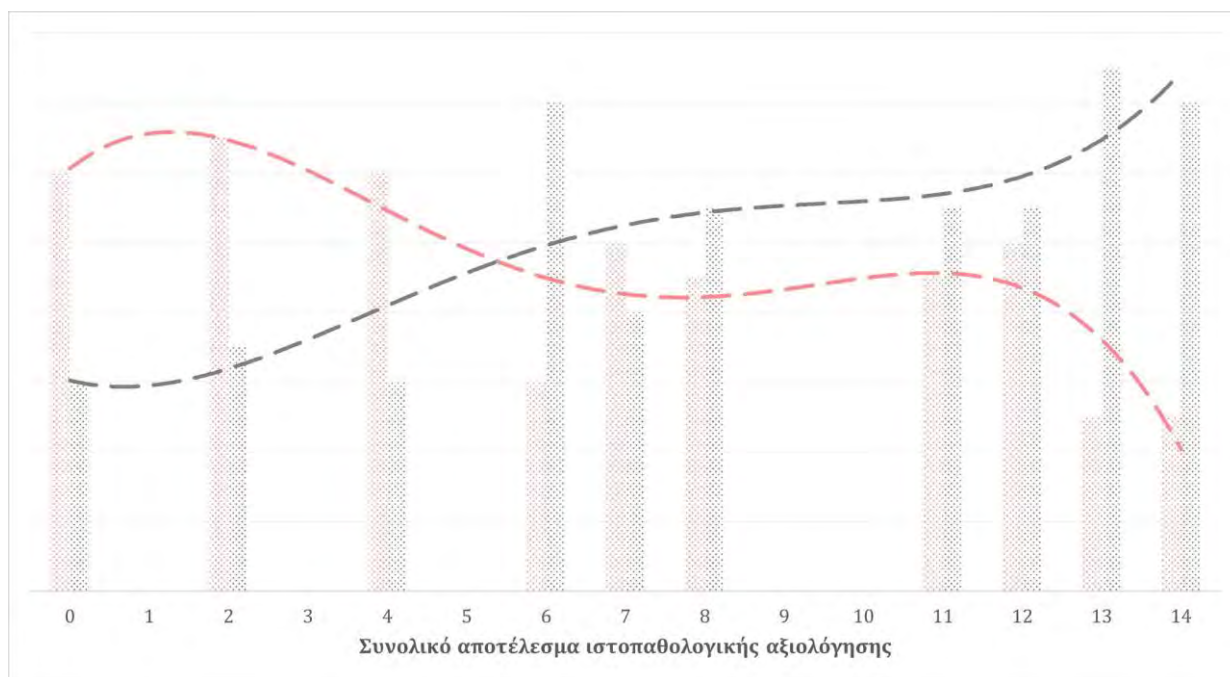
Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 38, επισημαίνεται ότι στο τέλος του πειραματισμού τα ζώα της ομάδας Δ, όπου ενισχύθηκε το σπογγώδες οστεομόσχευμα με SVF, είχαν καλύτερη, αν και όχι στατιστικώς σημαντική, πώρωση από τα ζώα της ομάδας Β.



Εικόνα 38: Διάμεση τιμή ιστολογικής πώρωσης ανά ομάδα ζώων (Ομάδα Α : γκρι χρώμα, Β: κόκκινο χρώμα, Γ: μπλε χρώμα, Δ: πράσινο χρώμα).

Τέλος, καταγράφεται ότι τρία ζώα της ομάδας Γ, δύο ζώα της ομάδας Δ και ένα ζώο της ομάδας Β βαθμολογήθηκαν με 14/15. Και τα 6 αυτά ζώα είχαν τη μέγιστη τιμή που θα μπορούσαν τη δεδομένη χρονική στιγμή, καθώς στην παράμετρο είδος οστίτη ιστού έλαβαν τιμή 2/3 δηλαδή ινώδης οστίτης ιστός, αφού δε θα μπορούσε να είναι πεταλιώδης οστίτης ιστός.

Κατά τη συνολική εκτίμηση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων ανεξαρτήτως ομάδας, διαπιστώθηκε ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση με το μήκος του οστικού ελλείμματος, όπως καταγράφηκε υπερηχοτομογραφικά, την 90^η ημέρα με τιμές $r = -0,784$, $p < 0,0001$. Πραγματοποιήθηκε, δε, τεστ συσχέτισης μεταξύ του συνόλου των ιστοπαθολογικών ευρημάτων και των αποτελεσμάτων της ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης κατά την 90^η ημέρα και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων με $r = 0,783$, $p < 0,0001$. Φαίνεται, έτσι, ότι βελτιωμένο ιστοπαθολογικό αποτέλεσμα συνεπάγεται μειωμένο υπερηχολογικό μήκος του αρχικού οστικού ελλείμματος και ταυτόχρονα αυξημένη βαθμολογική ακτινολογική εκτίμηση της πώρωσης (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Συσχέτιση του συνολικού ιστοπαθολογικού σκορ (άξονας χ) με τη διάμεση τιμή (ημέρα 90) του υπερηχοτομογραφικού μήκους του ελλείμματος (ροζ στήλες) και της ακτινολογικής αξιολόγησης (γκρι στήλες) (με τις αντίστοιχες γραμμές τάσης).

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Επιλογή πειραματικού ζωικού μοντέλου

Η επιλογή ενός ζωικού είδους ως πειραματικό μοντέλο για ερευνητικούς σκοπούς γίνεται με γνώμονα τους παρακάτω παράγοντες: 1) την καταλληλότητά του ως ανάλογο του ανθρώπινου ή του ζωικού είδους το οποίο ενδιαφέρει τον ερευνητή, 2) τη δυνατότητα μεταφοράς των πληροφοριών από το ένα είδος στο άλλο, 3) τη γενετική ομοιομορφία των οργανισμών, 4) τη βασική γνώση των βιολογικών ιδιοτήτων του πειραματόζωου, 5) το κόστος και τη διαθεσιμότητα, 6) τη δυνατότητα γενίκευσης των αποτελεσμάτων, 7) την ευκολία και τη δυνατότητα προσαρμογής των πειραματικών χειρισμών, 8) τις οικολογικές συνέπειες και 9) τους ηθικούς περιορισμούς (Davidson *et al.* 1987).

Ειδικότερα, η επιλογή πειραματικού μοντέλου για τη μελέτη της επούλωσης οστικών ελλειμμάτων των μακρών οστών πρέπει να λαμβάνει υπόψη τόσο προεγχειρητικούς, όσο και διεγχειρητικούς και μετεγχειρητικούς παράγοντες. Προεγχειρητικά, πρέπει να διερευνώνται η ομοιότητα στη δομή του οστού (σύσταση και αρχιτεκτονική ιστολογική δομή) με το ζωικό είδος ενδιαφέροντος, η φυσιολογία και η εμβιομηχανική του οστού, η διάρκεια ζωής του πειραματόζωου, η δυνατότητα χορήγησης αναισθησίας και διεξαγωγής χειρουργικών επεμβάσεων με ασφάλεια, η αντοχή του σε λοιμώξεις, οι διατροφικές απαιτήσεις και, τέλος, η κοινωνική και ηθική αποδοχή. Όσον αφορά στη χειρουργική επέμβαση πρόκλησης του οστικού ελλείμματος, το ανατομικό σημείο και οι μαλακοί ιστοί πέριξ αυτού, η ευκολία στην προσπέλαση, καθώς και η διαθεσιμότητα και καταλληλότητα των εργαλείων και των υλικών οστεοσύνθεσης, η ανοχή των ζώων αυτών σε υλικά εξωτερικής σταθεροποίησης ή εσωτερικής οστεοσύνθεσης φαίνεται ότι επηρεάζουν καθοριστικά την επιλογή του ζωικού είδους. Τέλος, η διαθεσιμότητα των πειραματοζώων, το κόστος αγοράς, διαβίωσης και διατροφής, η παροχή των ειδικά διαμορφωμένων χώρων διαμονής, η ύπαρξη καταρτισμένου για το συγκεκριμένο ζωικό είδος υποστηρικτικού προσωπικού και η δυνατότητα χειρισμών κατά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση αποτελούν σημαντικές παραμέτρους στην επιλογή είδους πειραματόζωου (Pearce *et al.* 2007, McGovern *et al.* 2018).

Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή του προβάτου ως πειραματικό μοντέλο βασίστηκε κυρίως στη διαθεσιμότητα, στην ευκολία διαχείρισης και διαβίωσης, στο χαμηλό κόστος καθώς και στην αποδοχή του από την κοινωνία ως πειραματόζωο. Τα πρόβατα εκτρέφονται με σκοπό κυρίως την κατανάλωση από τον άνθρωπο, οπότε η χρήση τους για ερευνητικούς σκοπούς έχει ευρύτερη αποδοχή. Επιπλέον, καθώς διαβιούν σε ομάδες, στρεσάρονται λιγότερο όταν συστεγάζονται σε ομάδες μεγαλύτερες των δύο ατόμων (Newman *et al.* 1995). Επιπλέον, στην ορθοπαιδική έρευνα που αφορά στη δοκιμή μεθόδων και υλικών, το πρόβατο αποτελεί αποδεκτό

μοντέλο για *in vivo* μελέτες καθώς οι εμβιομηχανικές, βιοχημικές και ιστολογικές μεταβολές των οστών είναι παρόμοιες τόσο με εκείνες του ανθρώπου όσο και του σκύλου. Επίσης, παρουσιάζουν ομοιότητες με το σωματικό βάρος, το μέγεθος, τη δομή και τη μορφολογία, τον μεταβολισμό και τις διαδικασίες της αναγέννησης και της αναδιαμόρφωσης του οστού και του χόνδρου (Viateau *et al.* 2004, Potes *et al.* 2008, McGovern *et al.* 2018).

Πριν από την έναρξη των πειραματισμών για τη διατήρηση της ευζωίας των ζώων λήφθηκε υπόψη η συνθήκη των 3 Rs, όπως αυτή ορίζεται από τα άρθρα 3 & 12 του ΠΔ 56/2013. Στην αγγλική γλώσσα αντιστοιχούν στην αντικατάσταση (Replacement), τη μείωση ((Reduction) και τη βελτίωση (Refinement). Αφορούν στη χρήση των ελάχιστων ζωντανών οργανισμών και στη βελτίωση των συνθηκών του πειραματισμού, δηλαδή της διαβίωσης και της διάρκειάς του και της άσκησης της ελάχιστης δριμύτητας επώδυνων ερεθισμάτων (Russell and Burch 1959). Έτσι, εφαρμόστηκε ο μικρότερος δυνατός αριθμός ζώων προκειμένου να εξαχθούν στατιστικώς αξιόπιστα αποτελέσματα από την παρούσα έρευνα, καθώς και πρωτόκολλα πολυμορφικής αναισθησίας και αναλγησίας, τόσο διεγχειρητικά όσο και μετεγχειρητικά για τη μείωση του πόνου.

Τα ζώα που συμμετείχαν στο πειραματικό πρωτόκολλο έπρεπε να είναι υγιή, χωρίς παθολογικές ή τραυματικές καταστάσεις των άκρων. Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκε γενική κλινική και ορθοπαιδική εξέταση, έλεγχος των χηλών και ποδοκομία. Επιπλέον, διενεργήθηκε ακτινολογικός και υπερηχοτομογραφικός έλεγχος του οστού και της περιοχής πέριξ του μεταταρσίου, κατά τη διάρκεια των οποίων επιβεβαιώθηκε η σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών, αποκλείστηκαν τυχόν δυσμορφίες στη μορφολογία του οστού και στις εκατέρωθεν αρθρώσεις ή τυχόν μεταβολή της αιμάτωσης ενδεικτικής φλεγμονής ή άλλης παθολογικής κατάστασης του περιφερικού άκρου. Έτσι λοιπόν, μόνο όσα ζώα βρέθηκαν υγιή και χωρίς προβλήματα στα άκρα χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

2. Ηλικία των πειραματόζωνων

Καθώς ο ρυθμός της πώρωσης των καταγμάτων είναι ταχύτερος στα νεαρά ζώα και προκειμένου να μπορούν να εξαχθούν αντικειμενικά συμπεράσματα για την πώρωση ως αποκλειστικό αποτέλεσμα της εφαρμογής του εκάστοτε βιοϋλικού, επιλέχθηκαν για τη μελέτη μας ζώα ηλικίας 4-5 ετών, έτσι ώστε να έχει ολοκληρωθεί η σκελετική ανάπτυξή τους. Ο σκελετός του προβάτου, έως την ηλικία των 3-4 ετών, παρουσιάζει δικτυωτή δομή οστίτη ιστού, που αποτελείται από συνδυασμό ινώδους και πεταλιώδους οστίτη ιστού, ενώ με την πάροδο της ηλικίας τελείται η οστική αναδιαμόρφωση σε οστέινα πετάλια (Newman *et al.* 1995). Η σύγκλειση των κέντρων οστέωσης του προβάτου σε κάποια οστά, όπως το κεντρικό άκρο του βραχιονίου και της ωλένης, το περιφερικό άκρο της κερκίδας και της ωλένης και η κορυφή της πτέρνας, ολοκληρώνεται στο

τρίτο έτος, ενώ οι επιφύσεις του μηριαίου και της κνήμης περίπου στο δεύτερο έτος. Τέλος, η σύγκλειση του πυρήνα οστέωσης του σώματος των σπονδύλων και της λαγόνιας ακρολοφίας επέρχεται σε ηλικία 4-5 ετών (Martini *et al.* 2001). Συνεπώς, προκειμένου να είμαστε βέβαιοι για την σκελετική ωρίμανση των ζώων που θα συμπεριλαμβανόταν στη μελέτη, αφενός επιλέχθηκαν ζώα αυτής της ηλικίας και, αφετέρου, πριν από την έναρξη των πειραματισμών, λήφθηκαν δύο ακτινογραφήματα του μεταταρσίου τους με διαφορά 90° ώστε να επιβεβαιωθεί η σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών. Πράγματι, οι λήψεις αυτές έδειξαν την πλήρη σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών και την πλήρη οστική αναδιαμόρφωση του μεταταρσίου γεγονός που έρχεται σε συμφωνία και με προγενέστερες μελέτες που υποστηρίζουν την ολοκλήρωση της σκελετικής ωρίμανσης του προβάτου έως την ηλικία των 48 μηνών (Walker 1987, Popkin *et al.* 2012, Youssef *et al.* 2016).

3. Μετατάρσιο

Στην παρούσα μελέτη, η αρχική επιλογή για μελέτη της οστικής αναγέννησης σε οστό του οπίσθιου άκρου έγινε με γνώμονα την ευζωία των ζώων, καθώς προσέφερε το πλεονέκτημα της πρόσθετης επισκληρίδιας αναλγησίας. Το μετατάρσιο επιλέχθηκε καθώς είναι ευθύ, ομοιόμορφα κυλινδρικό οστό στη μεσότητά του (Viateau *et al.* 2004). Προέρχεται από τη συνοστέωση του 3^{ου} και του 4^{ου} μεταταρσικού οστού και στερείται μυϊκής κάλυψης. Ο ποδικός ή βραχύς εκτείνων τα δάκτυλα μυς, είναι ένας ελάχιστα αναπτυγμένος μυς που εκφύεται από την πρόσθια μοίρα του περιφερικού άκρου της πτέρνας και κατευθύνεται στην πρόσθια επιφάνεια του μεταταρσίου, ενώ ο καταφυτικός τένοντάς του, ενώνεται με εκείνον του πρόσθιου εκτείνοντος τα δάκτυλα μυός και μαζί πορεύονται στη ραχιαία επιφάνεια του μεταταρσίου (Μιχαήλ 1985). Το κύριο τροφοφόρο αγγείο του μεταταρσίου των μηρυκαστικών είναι η πρόσθια κνημιαία αρτηρία και η συνέχειά της, η ραχιαία αρτηρία του ποδός. Κατά την προσπέλαση στο οστό, είναι δυνατός ο εντοπισμός της 3^{ης} ραχιαίας μετατάρσιας αρτηρίας, που πορεύεται κατά μήκος της πρόσθιας μέσης αύλακας του μεταταρσίου μαζί με δύο φλέβες. Χορηγεί έναν κλάδο που διαπερνά τον κάτω μετατάρσιο πόρο και αναστομώνεται με τις πελματιαίες μετατάρσιες αρτηρίες, συνεχίζοντας την πορεία της περιφερικά ως 3^η κοινή ραχιαία δακτυλική αρτηρία (Μιχαήλ 1985).

Η πρόκληση κυλινδρικού οστικού ελλείμματος και η τοποθέτηση υλικών οστεοσύνθεσης στο μετατάρσιο του προβάτου έχει μελετηθεί εκτενώς και μπορεί να αναπαραχθεί εύκολα, όπως διαπιστώθηκε και κατά τη διάρκεια των πειραματισμών της παρούσας μελέτης. Στις περισσότερες μελέτες όπου έγινε τμηματικό οστικό έλλειμμα της διάφυσης του μεταταρσίου σε πρόβατο τοποθετήθηκε μεταλλική πλάκα δυναμικής συμπίεσης 8 οπών με τοποθέτηση κοχλιών κατάλληλου μήκους και διαμέτρου 3,5 mm για τη σταθεροποίηση των καταγματικών άκρων (Petite *et al.* 2000, Viateau *et al.* 2004, Li *et al.* 2005, Wieding *et al.* 2015). Η εσωτερική

οστεοσύνθεση ενισχύθηκε με την τοποθέτηση γυψεπίδεσμου. Στην παρούσα μελέτη, σε όλα τα ζώα επιλέχθηκε μεταλλική πλάκα δυναμικής συμπίεσης 10 οπών για μεγαλύτερη εσωτερική σταθερότητα, και ενίσχυσή της με εξωτερική σταθεροποίηση.

Το μετατάρσιο του προβάτου χαρακτηρίζεται από την πλήρη απουσία μυϊκής κάλυψης και την περιφερική εντόπισή του. Αυτό αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη της πώρωσης, καθώς η μυϊκή κάλυψη του τραυματισμένου οστού έχει διττό ευεργετικό ρόλο. Πρώτον, εξασφαλίζει την αιματική παροχή και τους οστεογενετικούς παράγοντες στο περίοστεο, με καθοριστική επίδραση στην αιμάτωση του οστού κυρίως κατά τις πρώτες δύο εβδομάδες από τον τραυματισμό. Δεύτερον, η μηχανική διέγερση του οστού από τις καταφύσεις των μυών συμβάλλει στην άμεση λειτουργική πώρωση του κατάγματος, κατά τα τελικά στάδια δημιουργίας του πώρου και της αναδιαμόρφωσης, προσφέροντας βέλτιστη εμβιομηχανική σταθερότητα (Calori *et al.* 2007). Επιλέγοντας, λοιπόν, το οστό αυτό για τον έλεγχο των διαφορετικών βιοϋλικών στην παρούσα μελέτη και, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μειονεκτήματα, θεωρήθηκε ότι μπορούν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα για το ρόλο τους στην ενίσχυση της πώρωσης σε κατάγματα οποιουδήποτε μακρού οστού.

Για την προσπέλαση στο μετατάρσιο, πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος στην έσω πλάγια επιφάνειά του. Βιβλιογραφικά προτείνεται τόσο η έξω πλάγια όσο και η έσω πλάγια προσπέλαση για την τοποθέτηση μεταλλικής πλάκας στο μετατάρσιο του προβάτου (Petite *et al.* 2000, Viateau *et al.* 2004, 2007, Li *et al.* 2005, Wieding *et al.* 2015). Καθώς δεν υπάρχουν σημαντικές ανατομικές δομές να προσπελαστούν σε καμία από τις δύο επιφάνειές του, προτιμήθηκε η τοποθέτηση της μεταλλικής πλάκας στην έσω πλάγια επιφάνεια, προκειμένου να διευκολυνθούν οι υπερηχοτομογραφικές μετρήσεις τοποθετώντας τον ηχοβολέα στην έξω πλάγια επιφάνεια του οστού παράλληλα με τον επιμήκη άξονά του.

4. Μήκος ελλείμματος

Το μήκος του οστικού ελλείμματος που επιλέγεται προκειμένου να δοκιμαστούν διάφορα υλικά αποτελεί ένα αμφιλεγόμενο θέμα ανάμεσα στις διάφορες μελέτες. Στις περισσότερες από αυτές χρησιμοποιείται ο όρος κρίσιμο οστικό έλλειμμα για να εκφράσει το μικρότερο έλλειμμα το οποίο δεν αναμένεται να πωρωθεί αυτόματα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ζώου και συνεπώς θα οδηγήσει σε αποτυχία πώρωσης (Li *et al.* 2015, Schemitsch 2017). Αναφέρεται ότι αν δεν παρατηρηθεί οστεοποιημένη περιοχή στο 30% του ελλείμματος ύστερα από 52 εβδομάδες, τότε δε θα παρατηρηθεί ποτέ γεφύρωση του ελλείμματος (Li *et al.* 2015).

Ο Key το 1934 όρισε ως κρίσιμο οστικό έλλειμμα της κερκίδας σκύλου το μήκος οστεκτομής μεγαλύτερο από 1,5 φορά τη διάμετρο του οστού (Key 1934). Ωστόσο, οι Toombs και συν. θεώρησαν πως η υπόθεση αυτή δεν ισχύει, καθώς στη γάτα διαπίστωσαν ότι και μικρότερο

οστικό έλλειμμα στην κνήμη δεν πωρώθηκε (Toombs *et al.* 1985). Αναφέρεται ότι έλλειμμα μήκους 30 mm σε διάφυση μηριαίου σκύλου καθώς και έλλειμμα μήκους 40 mm σε κνήμη προβάτου είναι αρκετά μεγάλο, ώστε να χαρακτηρίζεται ως κρίσιμο οστικό έλλειμμα (Gugala *et al.* 2007). Ωστόσο, το ερώτημα που δεν απαντάται στις παραπάνω μελέτες είναι εάν τα μήκη αυτά είναι και τα ελάχιστα δυνατά. Έτσι, για παράδειγμα, υπάρχει αναφορά για οστικό έλλειμμα μήκους μόλις 18 mm σε κνήμη προβάτου, το οποίο δεν αποκαταστάθηκε με χρήση οστικών υποκατάστατων παρά μόνο στην ομάδα που τοποθετήθηκε αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα (Li *et al.* 2015). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το απόλυτα καθορισμένο μήκος οστικού ελλείμματος δεν ταυτίζεται πάντοτε με επιτυχία ή αποτυχία πώρωσης, καθώς αυτή εξαρτάται και από πλήθος άλλων παραγόντων. Για παράδειγμα, η οστική αναγέννηση μπορεί να καθυστερήσει λόγω μειωμένης αιματικής παροχής, εξαιτίας φτωχής μυϊκής κάλυψης, εκτεταμένης αποκόλλησης των μυών και του περισστέου διεγχειρητικά ή κάκωσης του τροφοδοτούντος αγγείου. Επιπλέον, τα ανοικτά κατάγματα ή, η ιατρογενής επιμόλυνση της καταγματικής εστίας, διάφοροι μεταβολικοί ή ορμονικοί παράγοντες, η κακή διατροφή και η καταπόνηση του οργανισμού επηρεάζουν δυσμενώς την εξέλιξη της πώρωσης (Li *et al.* 2015). Τέλος, η ηλικία του ζώου θα πρέπει να ληφθεί και αυτήν υπόψη, καθώς στα νεαρά η οστική αναγέννηση επέρχεται γρηγορότερα, οπότε το έλλειμμα οφείλει να έχει μεγαλύτερο μέγεθος (Aalami *et al.* 2004).

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε οστικό έλλειμμα ίσο με τη διάμετρο του οστού, δηλαδή 15 mm, μήκος το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως κρίσιμο σε προγενέστερη μελέτη (Viateau *et al.* 2004). Με βάση τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν, τα ζώα της ομάδας A, στα οποία το ικρίωμα HA δεν ενισχύθηκε με οστεογενετικό ή οστεοεπαγωγικό υλικό, είχαν βραδύτερο ρυθμό πώρωσης. Τα ζώα αυτά στις 12 εβδομάδες παρακολούθησης είχαν διάμεση τιμή ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης 3/10 με βάση την τροποποιημένη Κλίμακα Lane and Sandhu, που υποδεικνύει ότι το νεοσχηματισθέν οστό καλύπτει περίπου το 25% του ελλείμματος (1/4 στην κλίμακα) και η τάση προς γεφύρωση αξιολογείται με 1/2 στο κεντρικό άκρο και 1/2 στο περιφερικό καταγματικό άκρο. Συνεπώς προκύπτει ότι στις 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά δεν έχει καλυφθεί το 30% του ελλείμματος και το αποτέλεσμα αυτό τείνει να συμφωνεί με τη διαπίστωση των Li και συν. (Li *et al.* 2015) και να ενισχύει την επιλογή ότι οστικό έλλειμμα 15 mm σε μετατάρσιο προβάτου μπορεί να χαρακτηριστεί ως κρίσιμο. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν και με εκείνα των Viateau και συν. όπου διαπιστώθηκε αποτυχία πώρωσης σε ελλείμματα μεταταρσίου μήκους 6 mm, 13 mm και 25 mm χωρίς τη χρήση οστεομοσχεύματος (Viateau *et al.* 2004).

5. Χρονικό διάστημα μετεγχειρητικής παρακολούθησης

Στις περισσότερες ερευνητικές μελέτες ο χρόνος παρακολούθησης για την πώρωση ενός κατάγματος είναι 16 εβδομάδες, καθώς φαίνεται ότι ξεπερνάει το προσδοκώμενο διάστημα για επιτυχή πώρωση (Mills and Simpson 2012). Οι περισσότερες διαθέσιμες δημοσιεύσεις που αφορούν την αποκατάσταση οστικού ελλείμματος σε μετατάρσιο προβάτου ολοκληρώνονται στις 16 εβδομάδες με εικόνα οστικής αποκατάστασης (Petite *et al.* 2000, Viateau *et al.* 2004) ή στις 24 εβδομάδες (Li *et al.* 2005). Καθώς το προσδοκώμενο χρονικό διάστημα για την πώρωση ενός απλού κατάγματος στο πρόβατο αναφέρεται να είναι 10-14 εβδομάδες (Mills and Simpson 2012), επιλέχθηκε η μετεγχειρητική περίοδος ελέγχου διάρκειας 13 εβδομάδων, όπου στο τέλος της πραγματοποιήθηκε και η λήψη του οστεοτεμαχίου προκειμένου να διενεργηθεί ιστοπαθολογική διερεύνηση. Η συντόμευση της μετεγχειρητικής παρακολούθησης αφορούσε περιορισμούς σχετικούς με το κόστος διατροφής και διαβίωσης των ζώων. Παρ' όλα αυτά δεν θεωρήθηκε ότι αυτό θα επηρεάσει τη σημαντικότητα των αποτελεσμάτων, καθώς πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ των ομάδων στα ίδια χρονικά διαστήματα για την ίδια χρονική διάρκεια.

6. Επιλογή ακυτταρικού ικριώματος

Ο υδροξυαπατίτης ($(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2))$, HA) είναι ένα συχνά χρησιμοποιούμενο οστικό υποκατάστατο. Έχει κρυσταλλική δομή όμοια με το φλοιώδες οστό και αποτελεί ένα βιοενεργό, βιοσυμβατό και οστεοκαθοδηγητικό υλικό. Ενισχύει την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της οστικής αποκατάστασης ακόμη και σε κρίσιμου μεγέθους οστικά ελλείμματα (Oliveira *et al.* 2017). Έχει παρατηρηθεί ότι ήδη τρεις εβδομάδες μετά την εμφύτευση HA σε έλλειμμα οστού, στην επιφάνειά του ανευρίσκονται ινοβλάστες και οστεοβλάστες οι οποίοι εναποθέτουν ασβεστοποιημένο οστεοειδές (Autefage and Dejardin 2010). Μάλιστα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ορισμένων μελετών φαίνεται ότι ο HA διαθέτει ίσως και μικρή οστεοεπαγωγική πέραν της οστεοκαθοδηγητικής ιδιότητάς του (Ripamonti 1996, Gosain *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2010). Επιπλέον, στον σκύλο και στη γάτα, η χρήση HA σε 17 περιστατικά αρθροδέσεων, επέφερε την γεφύρωση των τραυματικών επιφανειών των οστών σε διάστημα εξήντα ημερών και σε ένα εξ' αυτών, όπου και διεξάχθηκε ιστοπαθολογική εξέταση, διαπιστώθηκε ενεργή οστική αναδιαμόρφωση (Dórea Neto *et al.* 2007). Στην παρούσα μελέτη, τα ευρήματα φαίνεται να συμφωνούν με τις παραπάνω διαπιστώσεις, καθώς καταγράφηκε μείωση του μήκους του ελλείμματος και στα ζώα που έλαβαν μόνο HA. Σημειώνεται δε, ότι κατά την χρήση του δεν διαπιστώθηκε κάποιου είδους ανεπιθύμητη ενέργεια, τοπική ή συστηματική, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με τις προηγούμενες έρευνες (Cornell 1999).

Στη μελέτη μας επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση HA με τη μορφή πάστας, η οποία μέσα σε λίγα λεπτά από την τοποθέτησή της σχηματίζει ένα υλικό υψηλής αντοχής στη σύνθλιψη μέσω μιας μη-εξώθερμης αντίδρασης. Για την πλήρωση του οστικού ελλείμματος χρησιμοποιήθηκε πάστα συγκέντρωσης 38%, καθώς σε πρόσφατη μελέτη δοκιμής της σε οστικό έλλειμμα ωμοπλάτης προβάτου διαπιστώθηκε μεγαλύτερος ρυθμός γεφύρωσης όταν χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση αυτή (Hruschka *et al.* 2017). Η νανοκρυσταλλική δομή του HA σχετίζεται με καλύτερη βιο-δραστικότητα και διαλυτότητα, καλύτερες μηχανικές ιδιότητες και αυξημένη οστική ανάπτυξη καθώς, οι περισσότεροι τραχιές επιφάνειες των νανο-υλικών και η αυξημένη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, διεγείρουν μεγαλύτερη κυτταρική απόκριση, ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των μεσεγχυματικών κυττάρων και διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες και, συνεπώς, καλύτερη οστεοεπαγωγή συγκριτικά με τους πιο χονδροειδείς κρυστάλλους (Ward and Webster 2006, De Oliveira *et al.* 2007, Abd El-Fattah *et al.* 2010, Kattimani *et al.* 2016, Wang and Yeung 2017).

Σύμφωνα με τα ευρήματα που προέκυψαν από την ακτινολογική, υπερηχοτομογραφική και ιστολογική εξέταση, η οστική κάλυψη του ελλείμματος ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα B του συνδυασμού HA με το σπογγώδες αυτομόσχευμα σε σχέση με την ομάδα A του ακυτταρικού ικρίωματος HA. Τα ευρήματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με εκείνα άλλης μελέτης, όπου η προσθήκη πάστας νανοκρυσταλλικού HA σε σπογγώδες αλλομόσχευμα επέφερε μεγαλύτερη, αν και όχι στατιστικώς σημαντική, ποσότητα νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού από την ανεξάρτητη εμφύτευση κάθε υλικού και βελτίωσε τη μηχανική σταθερότητά τους σε οστικά ελλείμματα μηριαίου κονδύλου σε κουνέλια (Chris Arts *et al.* 2006).

7. Η επιλογή του σπογγώδους οστεομοσχεύματος

Το αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα είναι το οστικό μόσχευμα εκλογής χάρη στην άμεση οστεογενετική ιδιότητά του (πληθώρα από οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα), στους οστεοεπαγωγικούς αυξητικούς παράγοντες που περιέχει, τη θεμέλια ουσία του (υδροξυαπατίτης και κολλαγόνο), στην ικανότητα που παρουσιάζει να προάγει την αγγειογένεση, στην οστεοκαθοδήγηση, και την άμεση οστεοενσωμάτωσή του (Martinez and Walker 1999, Griffon 2005, Klijn *et al.* 2010, Arthurs 2016, DeCamp *et al.* 2016). Στην παρούσα έρευνα, η επιλογή της χρήσης σπογγώδους οστεομοσχεύματος, της «χρυσής σταθεράς» της κλασικής ορθοπαιδικής χειρουργικής στον άνθρωπο και τα ζώα συντροφιάς, έγινε προκειμένου να γίνει μια άμεση σύγκρισή του με μια εναλλακτική επιλογή με παρόμοιες ιδιότητες με αυτό.

Το σπογγώδες οστό στη μελέτη μας λήφθηκε από την ετερόπλευρη λαγόνια ακρολοφία. Η επιλογή του σημείου λήψης από οπίσθιο άκρο έγινε καθώς υπήρχε η πρόσθετη αναλγησία χάρη

στην επισκληρίδια αναισθησία. Σε προ-πειραματικό επίπεδο, παρατηρήθηκε πως η κεντρική μετάφυση της κνήμης και η περιφερική του μηριαίου του προβάτου δεν προσέφεραν μεγάλη ποσότητα σπογγώδους οστού και, συνεπώς, απορρίφθηκαν από ενδεχόμενες εστίες λήψης. Αντίθετα, η λαγόνια ακρολοφία διέθετε άφθονο σπογγώδη οστίτη ιστό. Το ετερόπλευρο άκρο επιλέχθηκε για τη λήψη του προκειμένου τυχόν επιπλοκή που θα μπορούσε να προκύψει τοπικά, όπως φλεγμονή, μόλυνση ή ιατρογενές κάταγμα της πτέρυγας του λαγονίου, να μην επηρεάσει την αξιολόγηση της χωλότητας του οπίσθιου δεξιού άκρου, αλλά και την εξέλιξη της πώρωσης σε αυτό, λόγω πιθανής μειωμένης φόρτισης. Ωστόσο, επισημαίνεται ότι τελικά σε κανένα από τα ζώα των ομάδων Β και Δ δεν διαπιστώθηκαν επιπλοκές στο σημείο λήψης του σπογγώδους οστεομοσχεύματος.

Η οστεογενετική ικανότητα του σπογγώδους οστεομοσχεύματος βελτιστοποιείται όταν, κατά την τοποθέτησή του, καλύπτει τελείως το οστικό έλλειμμα χωρίς, ωστόσο, να έχει αποδειχθεί ότι η τοποθέτησή του «συμπιεστικά» επιταχύνει την πώρωση συγκριτικά με ένα «χαλαρά» τοποθετημένο σπογγώδες μόσχευμα (Martinez *et al.* 1992). Στους πειραματισμούς μας, όσον αφορά στην ποσότητα του σπογγώδους οστού που χρησιμοποιήθηκε, αυτή βασίστηκε σε μια συγκριτική μελέτη δοκιμής διαφορετικών ποσοτήτων αυτόλογου σπογγώδους μοσχεύματος και διαπιστώθηκε ότι όγκος μοσχεύματος ικανός να καλύψει το οστικό έλλειμμα επαρκεί για κλινικά οστεογενετικό αποτέλεσμα (DeVries *et al.* 1996). Έτσι, η ποσότητα του σπογγώδους οστού που λήφθηκε από τη λαγόνια ακρολοφία, αναμείχθηκε στη συνέχεια με την πάστα ΗΑ σύμφωνα με προτεινόμενη αναλογία 1:1 (Corre *et al.* 2013) και το μείγμα αυτό κάλυψε πλήρως το σημείο του ελλείμματος.

Χάρη στην πορώδη δομή του σπογγώδους οστεομοσχεύματος, τα μεσεγχυματικά κύτταρα και οι οστεοβλάστες που εντοπίζονται σε αυτό, διεγείρουν την αγγειογένεση και την οστεοεπαγωγή και, συνεπώς, τα αγγεία της λήπτριας περιοχής φαίνεται να το διηθούν από την περιφέρεια προς το κέντρο μέσα στις πέντε πρώτες ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η αγγείωση αυξάνεται στο επόμενο δεκαήμερο και μεγιστοποιείται στις είκοσι ημέρες (Martinez and Walker 1999). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας από τον υπερηχοτομογραφικό έλεγχο με τη χρήση Color Doppler της αιμάτωσης του ελλείμματος συμφωνούν με την παραπάνω θεωρία, καθώς όλα τα ζώα της ομάδας Β έφτασαν στη μέγιστη βαθμολογία νεοαγγειογένεσης την 20^η ημέρα του πειραματισμού και, στη συνέχεια, σταδιακά ο αριθμός των αγγείων άρχισε να μειώνεται. Αντίθετα, στην περίπτωση του φλοιώδους μοσχεύματος η αγγείωσή του φαίνεται να αρχίζει ένα με δύο μήνες μετά την τοποθέτησή του (Martinez and Walker 1999). Για τον λόγο αυτό δεν επιλέχθηκε στη μελέτη μας η εφαρμογή φλοιώδους οστεομοσχεύματος, όπου το μεγάλο μήκος του ελλείμματος και η ανεπαρκής μηχανική σταθερότητα θα μπορούσαν και να δικαιολογήσουν τη χρήση του. Όσον αφορά στον προβληματισμό αυτόν, επιλέχθηκε η χρήση του ίδιου όγκου παρόμοιας σύστασης ικριώματος ΗΑ σε όλα τα ζώα της μελέτης ανεξαρτήτως ομάδας, ώστε να παρέχεται σε όλα τα ζώα το ίδιο πλαίσιο

στήριξης, ενώ, αντιθέτως, εάν είχε επιλεγεί φλοιώδες ή μικτό μόσχευμα, τότε τα ζώα των αντίστοιχων ομάδων θα υπερτερούσαν μηχανικά.

Τα αποτελέσματα από όλες τις μετρήσεις (έλεγχος χωλότητας, απεικονιστικές τεχνικές και ιστολογική εξέταση) των ομάδων Β και Δ, όπου χρησιμοποιήθηκε σπογγώδες οστεομόσχευμα είναι σαφώς καλύτερα από εκείνα της ομάδας Α. Τα ευρήματα αυτά ήταν αναμενόμενα, καθώς το σπογγώδες οστό είναι οστεογενετικό, οστεοεπαγωγικό και οστεοκαθοδηγητικό και η εφαρμογή του διεγείρει την ανάπτυξη περισσότερων τριχοειδών, σε αντίθεση με τον οστεοκαθοδηγητικό αλλά ελάχιστα οστεοεπαγωγικό HA (Laschke *et al.* 2007).

8. Η επιλογή του Στρωματικού Αγγειακού Κλάσματος Λιπώδους Ιστού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η χρησιμοποίηση στην κλινική πράξη των μεσεγχυματικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) αποτελεί μια εξαιρετική θεραπευτική επιλογή για την αναγέννηση των οστών αφού προσφέρει οστεογενετικά κύτταρα και παρουσιάζει οστεοεπαγωγική, αγγειογενετική και ανοσορρυθμιστική δράση. Ωστόσο, προκειμένου να καθιερωθεί η χρήση τους, πρέπει η διαδικασία παραγωγής τους να είναι εύκολη, ταχεία, να μην συνοδεύεται από πόνο και να είναι οικονομικά εφικτή. Επιπλέον, πρέπει να ακολουθείται η ελάχιστη δυνατή επεξεργασία τους, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος μόλυνσης, καρκινογένεσης ή οποιαδήποτε άλλη αρνητική επίδραση στη λειτουργικότητα και στις ιδιότητές τους (Rombouts and Ploemacher 2003, Bonab *et al.* 2006). Για τον σκοπό αυτόν, επιλέχθηκε η χρήση νωπού κλάσματος κυττάρων καθώς είναι δυνατή η διεγχειρητική λήψη του, η προετοιμασία και εφαρμογή του, πρόκειται για σχετικά απλή και οικονομική μέθοδο, ενώ ο χρόνος προετοιμασίας του είναι ελάχιστος (Markoski 2016, Zhang *et al.* 2018). Με τον τρόπο αυτόν, εξαλείφεται η ανάγκη για δεύτερη χειρουργική επέμβαση και χορήγηση αναισθησίας, μειώνοντας έτσι τους κινδύνους, το κόστος και τη νοσηρότητα που αυτές συνεπάγονται και, επιπλέον, προσφέρει το πλεονέκτημα της άμεσης εφαρμογής σε επείγουσες καταστάσεις. Εξάλλου, η χρήση του φρέσκου κλάσματος κυττάρων δεν υπόκειται στους αυστηρούς περιορισμούς που συνοδεύουν τη χρήση καλλιεργημένων βλαστοκυττάρων (Arnhold and Wenisch 2015, Dykstra *et al.* 2017).

Στη μελέτη μας επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στρωματικό αγγειακό κλάσμα του λιπώδους ιστού (SVF) χάρη στη μεγαλύτερη αφθονία του, στην ευκολότερη πρόσβαση σε διαθέσιμο ιστό και στην ανώδυνη λήψη, καθώς και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση MSCs προς όγκο λιπώδους ιστού σε σχέση με εκείνη στον μυελό των οστών (Strioga *et al.* 2012, Behfar *et al.* 2014, Marx *et al.* 2015, Prins *et al.* 2016, Sullivan *et al.* 2016, Bateman *et al.* 2018). Ένα από τα ερωτήματα της παρούσας έρευνας ήταν αρχικά η διερεύνηση του εφικτού της απομόνωσης SVF από λίπος σε συνθήκες κλινικής καθώς και της άμεσης διεγχειρητικής εφαρμογής. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε από κλινικούς κτηνιάτρους υπό άσηπτες συνθήκες, χωρίς την ανάγκη

εξειδικευμένου εργαστηριακού προσωπικού, με εργαλεία και αναλώσιμα που υπάρχουν σε κάθε σύγχρονο ιατρείο ζώων συντροφιάς (φυγόκεντρος, πιπέτες και μικροσκόπιο), σε αντίθεση με το ανθρώπινο δυναμικό και την υποδομή που απαιτείται για την παραγωγή καλλιεργημένων βλαστοκυττάρων. Η διαδικασία προετοιμασίας SVF από τη λήψη του λιπώδους ιστού έως την εμφύτευση στο οστικό έλλειμμα διήρκησε 90 λεπτά και επιτεύχθηκε σε έναν χειρουργικό και αναισθησιολογικό χρόνο. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι σύμφωνο με το ελάχιστο δυνατό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για την απομόνωση SVF (Doi *et al.* 2013). Η λήψη του λιπώδους ιστού με τα ζώα υπό ηρέμηση, αναλγησία και επισκληρίδια αναισθησία προσέφερε τη δυνατότητα παρασκευής του εργαστηριακά καθ' όσο χρόνο εκτελούνταν η εγκατάσταση γενικής αναισθησίας, η οστεκτομή και η οστεοσύνθεση του ελλείμματος. Δίνεται έτσι η δυνατότητα, στην καθημερινή κλινική πράξη για διεγχειρητική προετοιμασία του βιοϋλικού αυτού ταυτόχρονα με την οστεοσύνθεση πιθανού κατάγματος και την άμεση εμφύτευσή του στην καταγματική εστία πριν από τη συρραφή του χειρουργικού τραύματος. Πλεονέκτημα έναντι του σπογγώδους οστεομοσχεύματος αποτελεί η αφθονία λιπώδους ιστού στον οργανισμό, ανεξαρτήτως σωματικού βάρους και ηλικίας, σε αντίθεση με τη μειωμένη και, συχνά, ελλιπή ποσότητα σπογγώδους οστεομοσχεύματος σε μικρόσωμους σκύλους και γάτες (Dorea *et al.* 2005, Ragetly and Griffon 2010) ή, την υποβαθμισμένη ποιότητά του σε οστεοπορωτικούς ασθενείς (Saxer *et al.* 2016). Η διαδικασία από τη λήψη και απομόνωση έως και την εμφύτευση αποδείχθηκε ασφαλής για τα ζώα της μελέτης μας, καθώς σε διάστημα τριών μηνών δεν καταγράφηκε καμία επιπλοκή, ούτε τοπική (λοίμωξη, αιμάτωμα ή οίδημα) ούτε συστηματική. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που προτείνουν το SVF ως ασφαλές υλικό στην κλινική πράξη (Pak *et al.* 2013, Aronowitz *et al.* 2015, Granel *et al.* 2015, Saxer *et al.* 2016).

Το νωπό αυτόλογο SVF που χρησιμοποιήθηκε στα ζώα των ομάδων Γ και Δ προέκυψε εργαστηριακά κατόπιν διαδικασίας πέψης και εξουδετέρωσης του λιπώδους ιστού που συλλέχθηκε από κάθε ζώο. Προηγήθηκε της χρησιμοποίησης του καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων του και σε δείγματα συνολικά 12 ζώων, ο μέσος αριθμός μονοκυττάρων του SVF ήταν $1,77 \times 10^6$ ανά ml λιπώδους ιστού. Η συγκέντρωση αυτή είναι ανάλογη με εκείνη που απομονώθηκε με την ίδια διαδικασία στον άνθρωπο [$0,5 \times 10^6$ - $2,0 \times 10^6$ κύτταρα ανά γραμμάριο (Yoshimura *et al.* 2006, Pak *et al.* 2017)] και μεγαλύτερη από εκείνη του σκύλου [$4,2 \times 10^5$ κύτταρα ανά γραμμάριο (Marx *et al.* 2014)]. Όσον αφορά στο πρόβατο, υπάρχει μία μελέτη μόνο, όπου πραγματοποιήθηκε λήψη λιπώδους ιστού από την αυχενοθωρακική χώρα του προβάτου όπου και απομονώθηκε SVF με συγκέντρωση της τάξης $1,88 \times 10^6$ κύτταρα ανά γραμμάριο (Lv *et al.* 2018). Στη μελέτη μας, απομονώθηκε ανάλογος αριθμός ζωντανών μονοκυττάρων κάτω από παρόμοιες συνθήκες για πρώτη φορά από την οσφυοϊερή χώρα και τη βάση της ουράς. Η περιοχή αυτή προσφέρει το πλεονέκτημα της εύκολης και ανώδυνης λήψης υπό επισκληρίδια αναλγησία, χωρίς να απαιτείται γενική ή τοπική αναισθησία, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η τελευταία ασκεί αρνητική επίδραση στη ζωτικότητα και στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των ASCs in vitro (Roato

et al. 2016). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η οσφυοϊερή περιοχή αναφέρεται για πρώτη φορά ως σημείο λήψης λιπώδους ιστού προκειμένου να απομονωθούν ASCs. Επιπλέον, η περιοχή αυτή είναι εύκολα προσπελάσιμη και η λήψη λιπώδους ιστού είναι λιγότερο επεμβατική σε σχέση με τη λήψη υποεπιγονατιδικού λίπους και λίπους του δρεπανοειδούς συνδέσμου, που αναφέρονται ως εστίες λήψης ASCs (Koh and Choi 2012, Astor *et al.* 2013, Sullivan *et al.* 2016).

Με βάση τα ευρήματα που προέκυψαν από τον ακτινολογικό έλεγχο, την υπερηχοτομογραφική μέτρηση του οστικού ελλείμματος και την ιστοπαθολογική εξέταση, τα ζώα της ομάδας Γ παρουσίασαν σημαντικά ταχύτερη και μεγαλύτερη εναπόθεση νέου οστού σε σχέση με τα ζώα της ομάδας Α, υποδεικνύοντας θετική επίδραση του SVF στην οστική αποκατάσταση. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με εκείνα άλλης μελέτης όπου διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό οστεογένεσης κατόπιν προσθήκης SVF σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό αγγειογένεσης και είναι μεγαλύτερο από εκείνο που παρατηρήθηκε σε ακυτταρικό ικρίωμα (Farré-Guasch *et al.* 2018). Το SVF, ως ένα ετερογενές διάλυμα αποτελείται από μονοπύρρηνα κύτταρα, ASCs, πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, λεία μυϊκά κύτταρα, περικύτταρα, σιτευτικά κύτταρα και προ-λιποκύτταρα (Bora and Majumdar 2017, Pak *et al.* 2017). Τα διαφορετικά αυτά κύτταρα, πέραν της διακριτής συμβολής με τον πολλαπλασιασμό και την καθορισμένη δράση τους, ασκούν και συνεργική δράση με το περιβάλλον του δέκτη, διεγείροντας τη δράση των επιχώριων μεσεγχυματικών κυττάρων, μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται με την οστική αποκατάσταση και τη νεοαγγειογένεση (Guo *et al.* 2016, Kemilew *et al.* 2019). Ενδιαφέρον είναι ότι συγκριτικές μελέτες του SVF με ASCs προτείνουν την κυτταρική ετερογένεια του πρώτου ως υπεύθυνη για τα καλύτερα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου και του υποχόνδριου οστού (Jurgens *et al.* 2013, Wu *et al.* 2016). Εξάλλου, σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες για την επίδραση του SVF στην οστική αναγέννηση έχει διαπιστωθεί καλύτερη οστεοεπαγωγική συμπεριφορά, μεγαλύτερη έκκριση αυξητικών παραγόντων, που διεγείρουν τη δράση οστεοβλαστών, καθώς και μεγαλύτερο ποσοστό αβεστοποίησης και παραγωγής πώρου συγκριτικά με τα εργαστηριακά καλλιεργημένα ASCs (Roato *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2018). Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη SVF διεγείρει την νεοαγγειογένεση και την επιτάχυνση της μικροκυκλοφορίας *in vitro* και *in vivo* κατόπιν έγχυσης στον ιστό-στόχο (Madonna and De Caterina 2008, Carstens *et al.* 2017, Zakhari *et al.* 2018, Moon *et al.* 2019).

Στην ορθοπαιδική, η πρώτη κλινική εφαρμογή του SVF πραγματοποιήθηκε σε ένα επτάχρονο παιδί με εκτεταμένη απώλεια οστού στο κρανίο σε συνδυασμό με κόλλα ινικής και αυτόλογο σπογγώδες οστεομόσχευμα (Lendeckel *et al.* 2004). Τρεις μήνες μετά διαπιστώθηκε οστεοποίηση των ελλειμμάτων και γεφύρωσή τους. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι οι αυξητικοί παράγοντες του σπογγώδους οστεομοσχεύματος ενδεχομένως να πυροδοτούν τη διαφοροποίηση των MSCs του SVF προς οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα. Επιπλέον,

διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η ενίσχυση της δράσης του σπογγώδους μοσχεύματος από μη καλλιεργημένα ASCs. Με την παραπάνω θεωρία φαίνεται να συγκλίνουν και τα δικά μας αποτελέσματα, καθώς τα ζώα της ομάδας Δ εμφάνιζαν πάντα καλύτερη, αν και όχι στατιστικώς σημαντική, πώρωση από τα ζώα της ομάδας Β. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές πειραματικές μελέτες για τη χρήση αυτόλογου SVF στην αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων σε διάφορα ζωικά μοντέλα. Η χρήση του σε κρανιακό οστικό έλλειμμα, σε οστικό έλλειμμα του ζυγωματικού οστού και σε κυκλικό έλλειμμα γνάθου αρουραίων επέφερε θετικό αποτέλεσμα στην πώρωση (Rhee *et al.* 2010, Mohammadi and Amini 2015, Todorov *et al.* 2016, Toplu *et al.* 2017). Σε μακρό οστό το SVF χρησιμοποιήθηκε σε έλλειμμα ωλένης κουνελιού και ήταν κρυσταλλωμένο. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι, είχε μεν καλύτερο αποτέλεσμα από τη χρήση κενού ικρίωματος, χειρότερο όμως αποτέλεσμα από τη χρήση οστεογενετικά διαφοροποιημένου SVF (Kim *et al.* 2012). Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι η κρυσταλλωμένη φάση φαίνεται να μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε σχέση με φρέσκο SVF (Martinello *et al.* 2011). Επιπλέον, η ωλένη δεν αποτελεί κύριο οστό φόρτισης. Τέσσερα χρόνια μετά τη μελέτη των Kim *et al.* (2012), διερευνήθηκε η επίδραση του συνδυασμού φρέσκου αυτόλογου SVF με HA υπό μορφή κόκκων σε ποντίκια με οστικό έλλειμμα στη διάφυση του μηριαίου, όπου και παρατηρήθηκε γεφύρωση, ασβεστοποίηση και πώρος, ενώ στην ομάδα των μαρτύρων η δημιουργία ψευδοάρθρωσης (Saxer *et al.* 2016). Όταν, στα πλαίσια της ίδιας μελέτης, ο συνδυασμός αυτός χρησιμοποιήθηκε κλινικά σε ηλικιωμένους ασθενείς στην κεντρική μετάφυση του βραχιονίου, διαπιστώθηκε και πάλι δημιουργία νέου οστού, χωρίς να παρατηρηθούν παρενέργειες ή επιπλοκές. Για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής SVF σε στηρικτικό μακρό οστό μεγάλου ζωικού προτύπου, κατόπιν εμφύτευσης σε ικρίωμα ναοκρυσταλλικού HA και έγινε σύγκριση με το αυτόλογο σπογγώδες οστό με πιθανή εφαρμογή τόσο σε κτηνιατρικούς ασθενείς όσο και στον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Πράγματι, το SVF και στις δύο ομάδες που χρησιμοποιήθηκε οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής οστού σε ποσοστό ανάλογο με εκείνο του σπογγώδους οστεομοσχεύματος.

Τέλος, αξίζει να σημειωθούν και οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα ζώα της μελέτης το ένα από τα δύο άκρα για τη δοκιμή των διαφορετικών βιοϋλικών. Αρχικά η επιλογή του δεξιού έναντι του αριστερού οπισθίου άκρου ήταν τυχαία. Όμως, η επιλογή της ετερόπλευρης εφαρμογής έγινε με γνώμονα το γεγονός ότι τα MSCs έχουν την ικανότητα τροπισμού στην εστία της βλάβης (Liu *et al.* 2014, Markoski 2016). Συνεπώς, ενδεχόμενη εφαρμογή στο ένα άκρο δε θα απέκλειε τη μετανάστευσή τους στο ετερόπλευρο (Carvalho *et al.* 2014). Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό θα ήταν περισσότερο αξιόπιστες οι μετρήσεις που αφορούσαν την αξιολόγηση της βάδισης.

9. Εκτίμηση χωλότητας

Τις τρεις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες, τη 10^η μετεγχειρητική ημέρα και έκτοτε ανά δεκαήμερο αξιολογούνταν η φόρτιση του οπίσθιου δεξιού άκρου κατά τη στάση και βάδιση των ζώων με βάση την επταβάθμια κλίμακα χωλότητας των Kaler και συν. Η συγκεκριμένη κλίμακα έχει αποδειχθεί αξιόπιστη, εύκολα αναπαράξιμη και αντικειμενική (Kaler *et al.* 2009). Για την ορθή αξιολόγηση, ήταν αναγκαία κάθε φορά η απομάκρυνση των υλικών της εξωτερικής σταθεροποίησης, η διατήρηση των ζώων χωρίς αυτήν για μερικά λεπτά και, στη συνέχεια, η αξιολόγηση της φόρτισης του πάσχοντος άκρου σε στάση και βάδιση. Από την 3^η μετεγχειρητική ημέρα έως την 30^η καταγράφηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, στα ζώα των ομάδων Β, Γ και Δ, έναντι των ζώων της ομάδας Α, υποδεικνύοντας ταχύτερη κινητική αποκατάσταση. Το παραπάνω εύρημα αποτελεί πολύ σημαντικό δείκτη της βελτίωσης της κινητικότητας στα ζώα που έλαβαν SVF, σπογγώδες οστεομόσχευμα ή τον συνδυασμό τους και φαίνεται να συμφωνεί με τα αποτελέσματα από τη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη θετική επίδραση του SVF στη βελτίωση της αποκατάστασης ασθενών με οστεοαρθρίτιδα. Τα ASCs έχουν θετική επίδραση στην κινητική δραστηριότητα και στη λειτουργικότητα σκύλων με οστεοαρθρίτιδα των αρθρώσεων των ισχίων ή του αγκώνα χάρη στην ικανότητά τους για διαφοροποίηση, έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και ανοσοτροποποίηση (Cuervo *et al.* 2014, Vilar *et al.* 2014, Olsen *et al.* 2019). Στον άνθρωπο, για πρώτη φορά το 2011, πραγματοποιήθηκε έγχυση μη καλλιεργημένων ASCs στην άρθρωση του γόνατος ασθενών με χρόνια οστεοαρθρίτιδα και στην κατ' ισχίον άρθρωση ασθενών με οστεονέκρωση της κεφαλής του μηριαίου και καταγράφηκε σταδιακή εξάλειψη των συμπτωμάτων, βελτίωση της κινητικότητας, αύξηση του εύρους κίνησης των αρθρώσεων και της λειτουργικότητας, ευρήματα που συνοδεύτηκαν και από τη βελτίωση εκείνων της μαγνητικής τομογραφίας (Pak 2011). Έκτοτε, έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες η θετική επίδραση της εφαρμογής SVF στην εξάλειψη των συμπτωμάτων της οστεοαρθρίτιδας και στη βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών (Koh and Choi 2012, Pak *et al.* 2013, Koh *et al.* 2014, 2015, Fodor and Paulseth 2016, Yokota *et al.* 2017, Michalek *et al.* 2019). Παρόμοια βελτίωση παρατηρήθηκε στην κινητικότητα και στην ανάλυση της βάδισης σε σκύλους με δυσπλασία των ισχίων, κατόπιν έγχυσης SVF, έναντι της ομάδας που δέχτηκε έγχυση με εικονικό φάρμακο (placebo) (Urchurch *et al.* 2016). Ως μηχανισμός για τη δράση αυτή προτείνεται η μείωση του πόνου χάρη στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των κυττάρων του SVF, η πιθανώς ρυθμιστική επίδραση στα Τ και Β λεμφοκύτταρα και η έκκριση αντιφλεγμονωδών παραγόντων, όπως HGF, VEGF, EGF, FGF και TGF-β1 (Salgado *et al.* 2010, Kemilew *et al.* 2019, Torres-Torrillas *et al.* 2019). Τα ευρήματα της μελέτης μας από τα ζώα που έλαβαν SVF συμφωνούν με τα παραπάνω, καθώς παρουσίαζαν πάντα καλύτερους δείκτες στην κλίμακα χωλότητας και γρηγορότερη αποκατάσταση από τα ζώα της ομάδας Α. Είναι, ωστόσο, η πρώτη μελέτη που αποδεικνύει βελτίωση της κινητικότητας μετά από έγχυση σε καταγματική εστία και ταχύτερη

αποκατάσταση, ενώ οι προηγούμενες αφορούσαν αρθροπάθειες. Αντίστοιχη κλινική εικόνα είχαν τα ζώα της ομάδας Β, όπου το οστικό έλλειμμα πληρώθηκε με ΗΑ και σπογγώδες οστεομόσχευμα. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς το σπογγώδες οστικό μόσχευμα περιέχει και αυτό οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, πρόδρομες κυτταρικές μορφές και πληθώρα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που έχουν, επίσης, αντιφλεγμονώδη και ανοσορρυθμιστική επίδραση (Arthurs 2016).

10. Ακτινολογικός έλεγχος

Στη μελέτη μας, για την ακτινολογική εκτίμηση της πώρωσης χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη κλίμακα των Lane and Sandhu, καθώς θεωρήθηκε ως η πιο αξιόπιστη και αντικειμενική, αφού λαμβάνει υπόψη της πολλές παραμέτρους (το συνολικό ποσοστό κάλυψης του ελλείμματος, την τάση προς γεφύρωση, τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό καταγματικό άκρο, και την αναδιαμόρφωση του οστού) (Lane and Sandhu 1987). Αμέσως μετεγχειρητικά η ακτινολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της ορθής τοποθέτησης και ακεραιότητας των υλικών οστεοσύνθεσης και της ευθυγράμμισης του άκρου, ενώ όλα τα ζώα έλαβαν τιμή ακτινολογικής πώρωσης 0/10, όπως και ήταν αναμενόμενο. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων κατεγράφησαν τις ημέρες 60 και 90 της μελέτης με τις ομάδες Β, Γ και Δ να παρουσιάζουν στατιστικώς καλύτερη βαθμολογία από την ομάδα Α, ενισχύοντας την υπόθεση της μελέτης μας για οστεογενετική και οστεοεπαγωγική δράση του SVF και επιτυχή ενσωμάτωσή του με την πάστα ΗΑ. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε δύο ζώα της ομάδας Γ και ένα της ομάδας Δ διαπιστώθηκε πλήρης κάλυψη του ελλείμματος και γεφύρωση των καταγματικών άκρων κατά το τέλος του πειραματισμού. Την τελευταία ημέρα των μετρήσεων, τα ζώα της Ομάδας Δ, όπου το σπογγώδες οστεομόσχευμα ενισχύθηκε με SVF, παρουσίασαν καλύτερη, αν και όχι στατιστικώς σημαντική, ακτινολογική εικόνα από τα ζώα της Ομάδας Β. Παρόμοια ήταν τα υπερηχοτομογραφικά και ιστολογικά αποτελέσματα. Αυτή η τάση που διαπιστώθηκε φαίνεται να συμφωνεί με άλλη μελέτη, όπου αναφέρεται η θετική επίδραση που ασκεί το SVF στο σπογγώδες οστεομόσχευμα (Lendeckel *et al.* 2004).

Όπως ήταν αναμενόμενο, στην τρίμηνη διάρκεια παρακολούθησης των πειραματοζώων, κανένα από αυτά δεν παρουσίασε εικόνα οστικής αναδιαμόρφωσης (βαθμολογία $\geq 9/10$), καθώς ο αναμενόμενος χρόνος για πλήρη πώρωση ενός απλού κατάγματος στα πρόβατα αναφέρεται να είναι 10-14 εβδομάδες, πόσο μάλλον για την πλήρη αποκατάσταση ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος (Mills and Simpson 2012). Άλλωστε, ο σχηματισμός ώριμου φλοιώδους οστού με φυσιολογική εσωτερική και εξωτερική αρχιτεκτονική δομή και η πλήρης αναδιαμόρφωσή του μπορεί να διαρκέσουν μήνες ή χρόνια (Denny and Butterworth 2000, Griffon 2005, Houlton 2016).

Τέλος πραγματοποιήθηκε και διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της κλίμακας χωλότητας του Kaler και της τροποποιημένης κλίμακας ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης κατά Lane και Sandhu και διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση σε κάθε χρονική στιγμή μέτρησης. Ενισχύεται έτσι η αξιοπιστία και των δύο μεθόδων αξιολόγησης στο πρόβατο, γεγονός που συμφωνεί και με τα ευρήματα αντίστοιχων μελετών στον άνθρωπο (McClelland *et al.* 2007, Dijkman *et al.* 2010).

11. Υπερηχοτομογραφικός έλεγχος

11.1. Η χρήση της ασπρόμαυρης απεικόνισης (B-mode)

Η χρήση της υπερηχοτομογραφικής εξέτασης στην εκτίμηση της οστικής πώρωσης, κυρίως στα αρχικά στάδια, έχει προταθεί ως ευαίσθητη και αξιόπιστη διαγνωστική τεχνική (Maffulli and Thornton 1995, Risselada *et al.* 2005, 2007, 2018). Όπως προαναφέρθηκε, στην κτηνιατρική απεικονιστική υπάρχει ειδική κλίμακα για την εκτίμηση της οστικής αποκατάστασης με χρήση ασπρόμαυρης απεικόνισης (B-mode), ορίζοντας πέντε διαφορετικά στάδια, ανάλογα με την ηχογένεια του πώρου και το κατά πόσον απεικονίζονται τα ενδομυελικά εμφυτεύματα (Risselada *et al.* 2005). Δυστυχώς στη μελέτη μας θεωρήθηκε ανέφικτη η εφαρμογή της κλίμακας αυτής, καθώς σε κάθε οστικό έλλειμμα είχε τοποθετηθεί διαφορετικής ηχογένειας υλικό, οπότε και τα ευρήματά μας δε θα ήταν συγκρίσιμα. Ωστόσο, η υπερηχοτομογραφία έδωσε τη δυνατότητα να υπολογιστεί με ακρίβεια ανά πάσα χρονική στιγμή το μήκος του οστικού ελλείμματος, ώστε να καταστεί δυνατή η σύγκριση μεταξύ των ομάδων για την εναπόθεση οστεοειδούς στα καταγματικά άκρα και, επομένως, για τη γεφύρωση του ελλείμματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν ανά δεκαήμερο έως την 60^η ημέρα, στη συνέχεια την 75^η ημέρα και έπειτα την τελευταία ημέρα του πειραματισμού. Στο πρώτο δεκαήμερο, το μήκος του ελλείμματος αυξήθηκε ή μειώθηκε στα ζώα της μελέτης, ανεξάρτητα από το εισαχθέν βιοϋλικό, εξαιτίας του πολλαπλασιασμού οστεοβλαστών και οστεοκλαστών και της οστικής απορρόφησης στα καταγματικά άκρα. Κατόπιν, η απόσταση των καταγματικών άκρων μειωνόταν με διαφορετικό ρυθμό σε κάθε ομάδα λόγω εναπόθεσης οστεοειδούς. Την 75^η και την 90^η ημέρα του πειραματισμού το διάμεσο μήκος του οστικού ελλείμματος παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ($p = 0,006$ και $p = 0,002$, αντίστοιχα). Στην πορεία της μελέτης φάνηκε, ότι, από την 20^η ημέρα και έπειτα, η διάμεση τιμή της απόστασης των καταγματικών άκρων ήταν μικρότερη στις ομάδες Γ και Δ από ό,τι στην Α και στη Β, υποδηλώνοντας περισσότερη και ταχύτερη εναπόθεση οστεοειδούς στις ομάδες αυτές. Επίσης, μετά την 40^η ημέρα, τα ζώα της ομάδας Α παρουσίαζαν πάντα μεγαλύτερο μήκος ελλείμματος από τα ζώα των υπόλοιπων ομάδων. Η διαπίστωση αυτή ήταν αναμενόμενη, καθώς τόσο το σπογγώδες

οστεομόσχευμα όσο και το SVF υπερτερούν από οστεογενετικής και οστεοεπαγωγικής άποψης του ακυτταρικού ΗΑ.

Η δοκιμή συσχέτισης μεταξύ της κλίμακας Lane and Sandhu και της υπερηχοτομογραφικής αξιολόγησης του μήκους του οστικού ελλείμματος έδειξε ισχυρή συσχέτιση με τιμή $p < 0,0001$ καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης στο σύνολο των μετρήσεων και, συγκεκριμένα, τιμές $p = 0,037$, $p = 0,002$ και $p < 0,001$ στις ημέρες 30, 60 και 90, αντίστοιχα. Η συμφωνία των ευρημάτων των δύο μεθόδων αποδεικνύει και την αξιοπιστία της καθεμιάς και ενισχύει την ορθότητα των ευρημάτων. Ειδικότερα, η προοδευτική μείωση του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ του μήκους του ελλείμματος και των αποτελεσμάτων της ακτινολογικής εξέτασης συνηγορεί υπέρ της υπεροχής της υπερηχοτομογραφικής εξέτασης ως μιας ευαίσθητης και αξιόπιστης διαγνωστικής τεχνικής στα αρχικά στάδια της πώρωσης ενώ, η ακτινολογική εξέταση αποδεικνύεται περισσότερο αξιόπιστη κατά τα τελευταία στάδια της πώρωσης.

11.2. Η χρήση απεικόνισης με Color Doppler

Στα αρχικά στάδια της πώρωσης, η αγγειογένεση είναι ζωτικής σημασίας μεταξύ άλλων για τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στην καταγματική εστία. Η χρήση Color Doppler προτείνεται ως εργαλείο άμεσης πρόβλεψης της επιτυχημένης ή αποτυχημένης πώρωσης, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ύπαρξη αγγείωσης στην καταγματική εστία, η οποία θα πρέπει να μεγιστοποιηθεί στις 20 πρώτες ημέρες μετά τον τραυματισμό, ενώ, στη συνέχεια και όσο εξελίσσεται επιτυχημένα η πώρωση, θα πρέπει να μειώνεται (Caruso *et al.* 2000, Risselada *et al.* 2006, Pozzi *et al.* 2012, Su *et al.* 2013, Wawrzyk *et al.* 2015). Στη μελέτη μας, τόσο η ανάπτυξη των αγγείων όσο και ο αριθμός τους στη περιοχή του οστικού ελλείμματος έδειξαν ότι τα βιοϋλικά που επιλέχθηκαν ευνόησαν την αγγειογένεση σε όλες τις ομάδες. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι σε όλα τα ζώα της ομάδας Α η υπερηχοτομογραφία με Color Doppler ανίχνευσε φωτεινές ενδείξεις αγγείωσης έως και την 75^η ημέρα του πειραματισμού και σε δύο ζώα και την 90^η, ενώ είχαν εξαλειφθεί στις άλλες ομάδες. Καθώς, κατά την ομαλή εξέλιξη της πώρωσης, η αιμάτωση στην καταγματική εστία εμφανίζει ένα καθορισμένο προφίλ με εξάλειψη φωτεινών ενδείξεων μετά τις 70-80 ημέρες (Risselada *et al.* 2006), η υπερηχοτομογραφική εξέταση μας υπέδειξε ότι στην ομάδα Α υπήρχε σοβαρή ένδειξη επιβράδυνσης της πώρωσης, κάτι που επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και από την ιστοπαθολογική εξέταση.

11.3. Η ροή του αίματος στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία

Η απεικόνιση με παλμικό Doppler ροής (Pulsed-wave Doppler) χρησιμοποιείται στην ιατρική του ανθρώπου για τη διάγνωση φλεβικών ή αρτηριακών παθήσεων και δίνει πληροφορίες για την παρουσία ή απουσία ροής αίματος, την κατεύθυνση και το προφίλ της (Hussain 1997, Mahé *et al.* 2017). Είναι γνωστό ότι κατά τη ροή του αίματος μέσα σε ένα αγγείο αναπτύσσονται φαινόμενα τριβής με τα τοιχώματα του αγγείου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ροή κοντά στα τοιχώματα.

Κατά τη φάση της διαστολής, η παρουσία των τριβών αυτών φέρει μεγαλύτερη μείωση της ταχύτητας κοντά στα τοιχώματα και μεταβολή του προφίλ της ροής του αίματος. Συνεπώς, σε αρτηρίες που τροφοδοτούν δίκτυα υψηλής περιφερικής αντίστασης παρατηρείται ταυτόχρονη κίνηση του αίματος και προς τις δύο κατευθύνσεις και η ροή απεικονίζεται τριφασική (Γιαννούκας και Λαμπρόπουλος 2013). Τέτοιες αρτηρίες είναι και οι αρτηρίες στο περιφερικό τμήμα των άκρων (Dhanoo *et al.* 2016, Gupta *et al.* 2019), όπου το πρώτο τμήμα της κυματομορφής αντιπροσωπεύει την αρχική εξώθηση του αίματος κατά την καρδιακή συστολή. Στη δεύτερη φάση της κυματομορφής παρατηρείται σύντομη αναστροφή της ροής λόγω της πτώσης της πίεσης στην αριστερή κοιλία πριν από τη σύγκλειση της αορτικής βαλβίδας, ενώ η τρίτη φάση χαρακτηρίζεται από χαμηλή θετική ροή που δημιουργείται από την ελαστικότητα του αρτηριακού τοιχώματος (Γιαννούκας και Λαμπρόπουλος 2013, Montorfano *et al.* 2017). Η κλίση κάτω από το επίπεδο αναφοράς αποτελεί ένδειξη υψηλής αντίστασης και χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των φυσιολογικών αρτηριών του περιφερικού τμήματος των άκρων και τις διαφοροποιεί από την κλασική κυματομορφή χαμηλών αντιστάσεων που καταγράφεται στην έσω καρωτιδική αρτηρία (Γιαννούκας και Λαμπρόπουλος 2013, Dhanoo *et al.* 2016, Hwang 2017, Gupta *et al.* 2019). Στον άνθρωπο σε ήπια φλεγμονώδη κατάσταση των άκρων, η κυματομορφή είναι διφασική, ενώ σε έντονη παθολογική κατάσταση είναι μονοφασική (Dhanoo *et al.* 2016). Στα ζώα της μελέτης μας προεγχειρητικά η ροή ήταν τριφασική, υποδηλώνοντας απουσία φλεγμονής ή παθολογικής κατάστασης, ενώ μετά τη χειρουργική επέμβαση πρόκλησης οστικού ελλείμματος και για το χρονικό διάστημα παρακολούθησης που εξελίσσονταν οι διεργασίες της πώρωσης η ροή ήταν διφασική. Κατόπιν ανασκόπησης της διεθνούς βιβλιογραφίας, στην παρούσα μελέτη έγινε για πρώτη φορά καταγραφή των παραμέτρων της ροής στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία του προβάτου, η οποία φυσιολογικά είναι τριφασική, και μελετήθηκε η εξέλιξη τους τόσο στη μονάδα του χρόνου κατά την εξέλιξη της πώρωσης του ελλείμματος, όσο και σύγκρισή τους μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη έγινε προεγχειρητικά καταγραφή των φυσιολογικών αιμοδυναμικών παραμέτρων και περιγραφή της κυματομορφής της ροής της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του προβάτου. Η πρόσθια κνημιαία αρτηρία αποτελεί τον ογκωδέστερο από τους δύο κλάδους της ιγνυακής αρτηρίας και στην πορεία της τροφοδοτεί τους μυς της πρόσθιας κνημιαίας χώρας και τον ταρσό (Μιχαήλ 1985). Συνέχειά της αποτελεί η ραχιαία αρτηρία του ποδός που πορεύεται στην κάμπτουςα επιφάνεια του ταρσού και αιματώνει περιφερικώς το άκρο. Η απεικόνισή της και η καταγραφή τυχόν αποκλίσεων από το φυσιολογικό της ροής θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την πρόωπη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων του περιφερικού άκρου.

Οι δείκτες RI και PI χαρακτηρίζονται από τη διεθνή βιβλιογραφία ως περισσότερο αξιόπιστοι για την εκτίμηση της ροής μικρότερης διαμέτρου αγγείων από τους PSV και EDV, καθώς δεν επηρεάζονται από τη γωνία πρόσπτωσης και τη διάμετρο του αγγείου, όπως οι

τελευταίοι (Sladkevicius and Valentin 1995, Marchesini *et al.* 2008). Μελέτη του 2018 υπολόγισε τα EDV και RI της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του υγιούς ανθρώπου $3,85 \pm 4,46$ cm/s και $0,5 \pm 0,1$ cm/s αντίστοιχα (Wang *et al.* 2018). Στην παρούσα μελέτη οι διάμεσες τιμές των δεικτών EDV και RI της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του υγιούς προβάτου ήταν 2,9 (0,8-9,9) cm/s (ελάχιστη-μέγιστη) και 1,07 (0,78-1,13) cm/s αντίστοιχα. Όσον αφορά στον δείκτη PI στην πρόσθια κνημιαία αρτηρία του προβάτου η διάμεση τιμή ήταν 4,36. Η φυσιολογική τιμή PSV σε αρτηρίες του περιφερικού τμήματος των άκρων στον άνθρωπο ποικίλλει από 45 έως 180 cm/s και η διάμεση τιμή της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας φέρεται να είναι 49,43 cm/s (Wang *et al.* 2018, Gupta *et al.* 2019). Τα ευρήματα από την μελέτη μας είναι ανάλογα, καθώς η διάμεση PSV της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του υγιούς προβάτου φαίνεται να είναι 41,6 cm/s. Τέλος, ανάλογα καταγράφεται και η διάμετρος του αγγείου (0,3 cm στα ενήλικα πρόβατα της μελέτης μας, 0,42 cm σε ενήλικες άνδρες) (Lorbeer *et al.* 2018).

Στην παρούσα μελέτη, ο δείκτης RI παρουσίασε μείωση έως την 20^η ημέρα ενώ, παράλληλα, η αιμάτωση στο οστικό έλλειμμα και τους γύρω μαλακούς ιστούς παρουσίασε αύξηση. Είναι πιθανόν η αρχική πτώση του RI να οφείλεται στην έντονη αγγειογένεση που παρατηρείται περιφερικά κατά τα αρχικά στάδια της πώρωσης και η οποία μειώνει τις αντιστάσεις, προκειμένου περισσότερα αγγεία να τροφοδοτήσουν το οστικό έλλειμμα με οξυγόνο, κύτταρα και χημικούς μεταβιβαστές για την επιτυχή εξέλιξη της επούλωσης. Η σταδιακή αύξηση του δείκτη RI στη συνέχεια φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση της αγγειογένεσης, καθώς επέρχεται προοδευτικά ασβεστοποίηση του πόρου. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν και προγενέστερες μελέτες που συσχέτισαν τη μείωση και έπειτα τη σταδιακή αύξηση του RI με την επιτυχή πώρωση καταγμάτων στον άνθρωπο (Bottinelli *et al.* 1996, Su *et al.* 2013, Wawrzyk *et al.* 2015). Η διαφορά είναι ότι στη μελέτη μας καταγράφηκαν για πρώτη φορά οι μεταβολές της ροής του τροφοδοτούντος αγγείου, ενώ στις προγενέστερες οι μεταβολές του δείκτη RI αφορούσαν αγγεία του νεοσχηματιζόμενου πόρου.

Τέλος, εκτός από τον δείκτη RI παρατηρήθηκαν και οι μεταβολές των επιμέρους παραμέτρων ροής της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας κατά την πώρωση του οστικού ελλείμματος που δημιουργήθηκε. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού διαπιστώθηκε διπλασιασμός της παραμέτρου PSV καθώς και της επιτάχυνσης του αίματος κατά την 20^η ημέρα του πειραματισμού και, στη συνέχεια, μείωση τους έως τη 40^η ημέρα, χωρίς ωστόσο να προσεγγίζουν οι τιμές απόλυτα τις προεγχειρητικές. Η ταυτόχρονη αύξηση αυτών των δύο δεικτών δείχνει αύξηση τόσο της ταχύτητας όσο και του στροβιλισμού του αίματος που κατευθύνεται περιφερικά, υποδεικνύοντας αυξημένες ανάγκες σε αιματική παροχή. Παρόμοιο είναι το μοτίβο μεταβολής των παραμέτρων EDV και BF, που την 20^η ημέρα της πώρωσης είχαν δεκαπλασιαστεί σε σχέση με την αρχική τιμή ενώ κατόπιν μειώθηκαν. Η παράλληλη αύξηση της διαμέτρου της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας αποτελεί αντικειμενικό δείκτη της έντονης νεοαγγειογένεσης περιφερικά. Γνωρίζοντας ότι οι δείκτες RI και PI δείχνουν αντίσταση στη ροή του αίματος, ενώ οι δείκτες PSV

και EDV ταχύτητα ροής (Tarhan *et al.* 2011), αναμένουμε αύξηση των τελευταίων όταν οι αντιστάσεις (RI, PI) περιφερικά ελαχιστοποιούνται, όπως σε περιπτώσεις αγγειοδιαστολής ή έντονης αγγειογένεσης. Αυτό διαπιστώθηκε κατά την 20^ή ημέρα του πειραματισμού, οπότε και παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός αγγείων στο σημείο του ελλείμματος. Αν και δεν κατεγράφησαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, οι δείκτες PI, RI και BF οδηγούν σε κοινό συμπέρασμα, ότι δηλαδή διαπιστώνεται πάντα μεγάλη παλμικότητα στο τροφοδοτούν αγγείο, διατηρείται αυξημένη ροή αίματος περιφερικά και χαμηλή αντίσταση στη ροή.

Στην παρούσα μελέτη, περιορισμός, καθαρά για οικονομικούς λόγους, αποτέλεσε η συνολική διάρκεια παρακολούθησης των ζώων κατά τον πειραματισμό. Εάν υπήρχε η δυνατότητα να διατηρήσουμε τα ζώα υπό παρακολούθηση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα μπορούσαμε, ενδεχομένως, να παρακολουθήσουμε την ολοκλήρωση της πώρωσης σε ζώα των ομάδων και να είμαστε σε θέση να συγκρίνουμε τους χρόνους ανά ομάδα έως την πλήρη αποκατάσταση. Αναφορικά με τις μεθόδους κλινικής παρακολούθησης, η δυνατότητα κινηματικής ανάλυσης της βάδισης θα αποτελούσε, πιθανώς, αντικειμενικότερη μέθοδο αξιολόγησης, αν και η ισχύς της αξιολόγησης της χωλότητας κατά Kaler's, κατέστη επαρκής και επιβεβαιώθηκε με την ισχυρή συσχέτιση που παρουσίασε τόσο με την ακτινολογική απεικόνιση όσο και με την υπερηχοτομογραφική εξέταση. Η αξονική τομογραφία, επιπλέον, θα μπορούσε να παρέχει επιπλέον χρήσιμα ευρήματα. Τέλος, ως προς τη συνολική αξιολόγηση της χρήσης του SVF, η χρήση ανοστοϊχημείας θα μπορούσε να μας παρέχει επιπλέον δεδομένα αναφορικά με την παραγωγή μεσοκυττάρων πρωτεϊνών, όπως, για παράδειγμα το κολλαγόνο τύπου II ή η αγκρεκάνη.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα παρακάτω.

1. Η απομόνωση φρέσκου SVF από κλινικούς κτηνιάτρους υπό άσηπτες συνθήκες, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εργαστηριακού προσωπικού, με εργαλεία και αναλώσιμα που υπάρχουν σε κάθε σύγχρονο ιατρείο ζώων συντροφιάς και η άμεση διεγχειρητική εφαρμογή του είναι μια εφικτή και εύκολα αναπαράξιμη διαδικασία, σε αντίθεση με το ανθρώπινο δυναμικό και την υποδομή που απαιτείται για την παραγωγή καλλιεργημένων βλαστοκυττάρων.
2. Ο χρόνος προετοιμασίας SVF από τη λήψη του λιπώδους ιστού έως την εμφύτευση στο οστικό έλλειμμα ή κάταγμα μπορεί να ολοκληρωθεί εντός 90 λεπτών και να πραγματοποιηθεί σε ένα χειρουργικό και αναισθησιολογικό χρόνο.
3. Οι διαδικασίες από τη λήψη, απομόνωση έως και την εμφύτευση, εφόσον γίνονται σε συνθήκες χειρουργικής ασηψίας, αποδείχθηκαν ασφαλείς, καθώς σε διάστημα τριών μηνών δεν καταγράφηκε καμία τοπική ή συστηματική επιπλοκή.
4. Για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής αυτόλογου νωπού SVF για την ενίσχυση της οστικής αποκατάστασης σε στηρικτικό μακρό οστό μεγάλου ζωικού προτύπου και, μάλιστα, με θετικό αποτέλεσμα. Το SVF και στις δύο ομάδες που χρησιμοποιήθηκε (Γ και Δ) οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής οστού σε ποσοστό ανάλογο με εκείνο του σπογγώδους οστεομοσχεύματος (ομάδα Β).
5. Με βάση τα ευρήματα που προέκυψαν από τον ακτινολογικό έλεγχο, την υπερηχοτομογραφική μέτρηση του οστικού ελλείμματος και την ιστοπαθολογική εξέταση, τα ζώα της ομάδας Γ παρουσίασαν σημαντικά ταχύτερη και μεγαλύτερη εναπόθεση νέου οστού σε σχέση με τα ζώα της ομάδας Α, υποδεικνύοντας τη θετική επίδραση του SVF στην οστική αποκατάσταση. Φαίνεται, συνεπώς, ότι το SVF διαθέτει οστεογενετική και οστεοεπαγωγική ιδιότητα, ενισχύοντας την πόρωση τμηματικού ελλείμματος μακρού οστού, όπως αποδείχθηκε *in vivo*.
6. Η οστεογενετική, η οστεοεπαγωγική καθώς και η διεγερτική δράση στην αγγειογένεση που προκαλεί το σπογγώδες οστεομόσχευμα φαίνεται να ενισχύεται από τα μη καλλιεργημένα κύτταρα του SVF σε οστικό έλλειμμα διάφυσης μακρού οστού.
7. Η σύγκριση μεταξύ αυτόλογου σπογγώδους οστεομοσχεύματος και αυτόλογου νωπού SVF οδήγησε σε συγκρίσιμα αποτελέσματα, καθιστώντας το SVF μια εξαιρετική επιλογή ως εναλλακτικό μέσο ενίσχυσης της πόρωσης. Πλεονέκτημα έναντι του σπογγώδους οστεομοσχεύματος αποτελεί η αφθονία λιπώδους ιστού στον οργανισμό και, συνεπώς, η εύκολη και ανώδυνη λήψη του, ανεξαρτήτως σωματικού βάρους και ηλικίας, σε αντίθεση με τη μειωμένη και, συχνά, ελλιπή ποσότητα σπογγώδους οστεομοσχεύματος σε μικρόσωμους σκύλους και

γάτες και το συνοδό κίνδυνο ιατρογενούς κατάγματος, αλλά και την υποβαθμισμένη ποιότητά του σε οστεοπορωτικούς ασθενείς.

8. Στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν $1,77 \times 10^6$ ζωντανά μονοπύρρηνα κύτταρα SVF ανά ml λιπώδους ιστού για πρώτη φορά από την οσφυοϊερή χώρα και τη βάση της ουράς του προβάτου, αριθμός συγκρίσιμος με τα κύτταρα που απομονώνονται από την αυχενοθωρακική περιοχή. Η οσφυοϊερή περιοχή και η βάση της ουράς, ως εναλλακτικά σημεία λήψης, προσφέρουν το πλεονέκτημα της εύκολης και ανώδυνης συλλογής με ικανοποιητικό αριθμό ζωντανών κυττάρων υπό επισκληρίδια αναλγησία, χωρίς να απαιτείται γενική ή τοπική αναισθησία. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι αποτελεί, αν όχι καλύτερη, εξίσου κατάλληλη δότρια περιοχή.

9. Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά, καταγράφηκε η βελτίωση της κινητικότητας μετά από έγχυση SVF σε καταγματική εστία. Ως μηχανισμός για τη δράση αυτή προτείνεται η μείωση του πόνου χάρη στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των κυττάρων του SVF, η πιθανώς ρυθμιστική επίδραση στα T και B λεμφοκύτταρα και η έκκριση αντιφλεγμονωδών παραγόντων.

10. Διερευνώντας τη συσχέτιση μεταξύ της κλίμακας χωλότητας του Kaler και της τροποποιημένης κλίμακας ακτινολογικής αξιολόγησης της πώρωσης κατά Lane και Sandhu διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση σε κάθε χρονική στιγμή μέτρησης, ενισχύοντας έτσι την αξιοπιστία των δύο μεθόδων αξιολόγησης στο πρόβατο.

11. Η χρήση της υπερηχοτομογραφίας (B-mode και Color Doppler) δείχνει να είναι μια εναλλακτική μέθοδος για την εκτίμηση της εξέλιξης της πώρωσης καταγμάτων, καθώς δίνει την ικανότητα απεικόνισης της πώρωσης από τα πολύ πρώιμα στάδιά της, παρέχει πληροφορίες για ενδεχόμενη επιβράδυνσή της και είναι μη επεμβατική μέθοδος. Η υπερηχοτομογραφική εξέταση αποτελεί μια ευαίσθητη και αξιόπιστη διαγνωστική τεχνική από τα αρχικά στάδια της πώρωσης, σε αντίθεση με την ακτινολογική εξέταση, η οποία αποδεικνύεται περισσότερο αξιόπιστη κατά τα τελευταία στάδια της πώρωσης.

12. Πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά καταγραφή των παραμέτρων της ροής του αίματος της πρόσθιας κνημιαίας αρτηρίας του προβάτου με χρήση Pulsed-wave Doppler. Η ροή σε φυσιολογικό άκρο είναι τριφασική, παρόμοια με του ανθρώπου, με υψηλές αντιστάσεις.

13. Στα αρχικά στάδια της πώρωσης ενός κατάγματος περιφερικά του σημείου εκτίμησης της ροής, καταγράφεται αύξηση στο δείκτη PSV και BF στις πρώτες είκοσι ημέρες και σταδιακή μείωση κατά την εξέλιξη της πώρωσης, ενώ αντίθετη εξέλιξη παρατηρείται στους δείκτες PI και RI.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aalami, O. O. Nacamuli, R. P., Lenton, K. A., Cowan, C. M., Fang, T. D., Fong, K. D., Shi, Y. Y., Song, H. M., Sahar, D. E., and Longaker, M. T. (2004) Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plastic and Reconstructive surgery*, 114, 713–720.
- Abd El-Fattah, H., Helmy, Y., El-Kholy, B., and Marie, M. (2010). In vivo animal histomorphometric study for evaluating biocompatibility and osteointegration of nano-hydroxyapatite as biomaterials in tissue engineering. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 22, 241–250.
- Albee, F. H. (1915) *Bone-Graft Surgery*. Philadelphia: Saunders.
- Albee, F. H. (1920) Studies in bone growth – triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*, 71, 32–39.
- Alstrup, A. K. O. and Winterdahl, M. (2009) Imaging techniques in large animals. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 36, 55–66.
- Andjelkov, K., Sforza, M., Barisic, G., Soldatovic, I., Hiranyakas, A., and Krivokapic, Z. (2017) A novel method for treatment of chronic anal fissure: adipose-derived regenerative cells – a pilot study. *Colorectal Disease*, 19, 570–575.
- Arnhold, S. and Wenisch S. (2015) Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *American Journal of Stem Cells*, 4, 1–12.
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A. and Hakakian, C. S. (2015) Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue, *SpringerPlus*, 4, 713.
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., Hakakian, C. S., and Hicok, K. C. (2015) Clinical safety of stromal vascular fraction separation at the point of care. *Annals of Plastic Surgery*, 75, 666–671.
- Arthurs G. (2016) ‘Chapter 14 Bone grafts and alternatives’, in Gemmill, T. and Clements, D. (eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Fracture Repair and Management*. 2nd edition. England: British Small Animal Veterinary Association, pp. 120–125.
- Astor, D. E., Hoelzler, M. G., Harman, R., and Bastian, R. P. (2013) Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77, 177–182.
- Atalay, S., Coruh, A. and Deniz, K. (2014) Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns*, 40, 1375–1383.
- Atesok, K., Li, R., Stewart, D. J., and Schemitsch, E. H. (2010) Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 1007–1114.
- Autefage, A. and Dejardin L. M. (2010) ‘Chapter 88 Bone Grafting’ and ‘89 Bone Substitutes’, in Bojrab, J. M. and Monnet, E. (eds) *Mechanisms Of Disease In Small Animal Surgery*. 3rd edition. Teton: NewMedia, pp. 1188–1225.
- Bateman, M. E., Strong, A. L., Gimble, J. M., and Bunnell, B. A. (2018) Concise Review: Using fat to fight disease: A systematic review of nonhomologous Adipose-derived Stromal/Stem Cell therapies. *Stem Cells*, 36, 1311–1328.
- Bauer, T. W. and Muschler G. F. (2000) Bone graft materials: An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 371, 10–27.
- Bebchuk, T. N., Degner, D. A., Walshaw, R., Brouman, J. D., Arnoczky, S. P., Stickle, R. L., and Probst, C. W. (2000) Evaluation of a free vascularized medial tibial bone graft in dogs, *Veterinary Surgery*, 29, 128–144.
- Behfar, M., Javanmardi, S. and Sarrafzadeh-Rezaei, F. (2014) Comparative study on functional effects of allotransplantation of Bone Marrow stromal cells and adipose derived stromal vascular fraction on tendon repair: A biomechanical study in rabbits. *Cell Journal*, 16, 263–270.
- Black, L. L., Gaynor, J., Adams, C., Dhupa, S., Sams, A. E., Taylor, R., Harman, S., Gingerich, D. A., and Harman, R. (2008) Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*, 9, 192–200.

- Black, L. L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D. A., and Harman, R. (2007) Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*, 8, 272–284.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology*, 7, 14
- Bora, P. and Majumdar A. S. (2017) Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Research and Therapy*. 8, 145.
- Borowski, D. W., Gill, T. S., Agarwal, A. K., and Bhaskar, P. (2012) Autologous adipose-tissue derived regenerative cells for the treatment of complex cryptoglandular fistula-in-ano: a report of three cases. *BMJ Case Reports*.
- Bottinelli, O., Calliada, F. and Campani, R. (1996) Bone callus: possible assessment with color Doppler ultrasonography. Normal bone healing process. *La Radiologia Medica*, 91, 537–541.
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., and Gimble, J. M. (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15, 641–648.
- Braden, T. D. and Brinker, W. O. (1976) Radiologic and gross anatomic evaluation of bone healing in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169, 1318–1323.
- Brandt, J., Henning, S., Michler, G., Hein, W., Bernstein, A., and Schulz, M. (2010) Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: An animal study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 283–294.
- Brinker, W. O. (1978) *Small Animal Fractures*. East Lansing, MI: Michigan State University Press.
- Bruder, S. P., Fink, D. J. and Caplan A. I. (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56, 283–294.
- Bucholz R. W. (2002) Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 44–52.
- Calori, G. M., Albisetti, W., Agus, A., Iori, S., and Tagliabue, L. (2007) Risk factors contributing to fracture non-unions, *Injury*, 38, S11–S18.
- Calori, G. M. and Giannoudis, P. V. (2011) Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber. *Injury*. 42, 1191–1193.
- Canapp, S. O., Canapp, D. A., Ibrahim, V., Carr, B. J., Cox, C., and Barrett, J. G. (2016) The use of adipose-derived progenitor cells and platelet-rich plasma combination for the treatment of supraspinatus tendinopathy in 55 dogs: A retrospective study. *Frontiers in Veterinary Science*, 3.
- Cannada, L. K. (2010) Viable bone and circulatory factors required for survival of bone grafts. *Orthopedic Clinics of North America*, 41, 5–13.
- Caplan A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650.
- Carstens, M. H., Gómez, A., Cortés, R., Turner, E., Pérez, C., Ocon, M., and Correa, D. (2017) Non-reconstructable peripheral vascular disease of the lower extremity in ten patients treated with adipose-derived stromal vascular fraction cells *Stem Cell Research*. 18, 14–21.
- Caruso, G., Lagalla, R., Derchi, L., Iovane, A., and Sanfilippo, A. (2000) Monitoring of fracture calluses with color Doppler sonography. *Journal of Clinical Ultrasound*, 28, 20–27.
- Carvalho, A. M., Yamada, A. L., Golim, M. A., Álvarez, L. E., Hussni, C. A., and Alves, A. L. (2014) Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy, *Equine Veterinary Journal*, 46, 635–638.
- Chae, D. S., Han, S., Son, M., and Kim, S. W. (2017) Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property. *Cytotherapy*, 19, 543–554.
- Charles- de-Sá, L., Gontijo-de-Amorim, N. F., Maeda Takiya, C., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., Sbarbati, A., and Rigotti, G. (2015) Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135, 999–1009.

- Chernousov, M. A., Yu, W. M., Chen, Z. L., Carey, D. J., and Strickland, S. (2008) Regulation of schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia*, 56, 1498–1507.
- Chiroff, R. T., White, E. W., Weber, K. N., and Roy, D. M. (1975) Tissue ingrowth of replamineform implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 9, 29–45.
- Chris Arts, J. J., Verdonshot, N., Schreurs, B. W., and Buma, P. (2006) The use of a bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting. *Biomaterials*, 27, pp. 1110–1118.
- Chung, D. J., Hayashi, K., Toupadakis, C. A., Wong, A., and Yellowley, C. E. (2012) Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Research in Veterinary Science*, 92, 66–75.
- Comella, K., Parceró, J., Bansal, H., Perez, J., Lopez, J., Agrawal, A., and Ichim, T. (2016) Effects of the intramyocardial implantation of stromal vascular fraction in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *Journal of Translational Medicine*, 14, 158.
- Comella, K., Silbert, R. and Parlo, M. (2017) Effects of the intradiscal implantation of stromal vascular fraction plus platelet rich plasma in patients with degenerative disc disease, *Journal of Translational Medicine*, 15, 12.
- Connolly, J. F., Guse, R., Tiedeman, J., and Dehne, R. (1991) Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 266, 259–270.
- Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., and Rueger, D. C. (1994) Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 301, 302–312.
- Cornell C. N. (1999) Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts, *Orthopedic Clinics of North America*, 30, 591–598.
- Corrales, L. A., Morshed, S., Bhandari, M., and Miclau, T., (2008) Variability in the assessment of fracture-healing in orthopaedic trauma studies. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*. 90, 1862–1868.
- Corre, P., Merceron, C., Vignes, C., Sourice, S., Masson, M., Durand, N., Espitalier, F., Pilet, P., Cordonnier, T., Mercier, J., Remy, S., Anegón, I., Weiss, P., and Guicheux, J. (2013). Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: An “all-in-one” study in nude mice. *PLoS ONE*, 8(12).
- Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Dominguez, J. M., Vilar, J., Morales, M., Cugat, R., and Carrillo, J. M. (2014) Hip osteoarthritis in dogs: A randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, pp. 13437–13460.
- Dalal, J., Gandy, K. and Domen, J. (2012) Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn’s disease. *Pediatric Research*, 71, 445–451.
- Danis, R. (1949) *Theorie et Pratique de l’Osteosynthese*. Masson, Paris: Soulis-Martin.
- Dau, M., Kämmerer, P. W., Henkel, K. O., Gerber, T., Frerich, B., and Gundlach, K. K. (2016) Bone formation in mono cortical mandibular critical size defects after augmentation with two synthetic nanostructured and one xenogenous hydroxyapatite bone substitute - *in vivo* animal study. *Clinical Oral Implants Research*, 27, 597–603.
- Davidson, M., Lindsey, J. and Davis, J. (1987) Requirements and selection of an animal model, *Israel Journal of Medical Sciences*, 23, 551–555.
- De Becker, A. and Van Riet, I. (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 8, 73–87.
- DeCamp, C. E. et al. (2016) Brinker, Piermattei, and Flo’s *Handbook of SMALL ANIMAL Orthopedics and Fracture Repair*. 5th edition. Missouri: Elsevier Inc.
- DeGirolamo, L., Grassi, M., Viganò, M., Orfei, C., Montrasio, U. and Uselli, F. (2016) Treatment of achilles tendinopathy with autologous adipose-derived stromal vascular fraction: Results of a randomized prospective clinical trial. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 4.
- DeLong, W. G., Jr, Einhorn, T. A., Koval, K., McKee, M., Smith, W., Sanders, R., and Watson, T. (2007). Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89, 649–658.
- Denny, H. R. and Butterworth S. J. (2000) *A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery*. 4th edition. Oxford, UK: Blackwell Science.

- DeOliveira, P. T., Zalzal, S. F., Beloti, M. M., Rosa, A. L., and Nanci, A. (2007). Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 80, 554–564.
- DeVries, W. J., Runyon, C. L., Martinez, S. A., and Ireland, W. P. (1996) Effect of volume variations on osteogenic capabilities of autogenous cancellous bone graft in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 5, 1501–1505.
- Dhanoa, D., Baerlocher, M. O., Benko, A. J., Benenati, J. F., Kuo, M. D., Dariushnia, S. R., Faintuch, S., Midia, M., and Nikolic, B. (2016) Position statement on noninvasive imaging of peripheral arterial disease by the Society of Interventional Radiology and the Canadian Interventional Radiology Association. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 27, 947–951.
- Dijkman, B. G., Sprague, S., Schemitsch, E. H., and Bhandari, M. (2010). When is a fracture healed? Radiographic and clinical criteria revisited. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 24 Suppl 1, S76–S80.
- Doi, K., Tanaka, S., Iida, H., Eto, H., Kato, H., Aoi, N., Kuno, S., Hirohi, T., and Yoshimura, K. (2013). Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, 864–870.
- Dominici M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315–317.
- Dorea, H. C., McLaughlin, R. M., Cantwell, H. D., Read, R., Armbrust, L., Pool, R., Roush, J. K., and Boyle, C. (2005). Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft or Bioglass. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 18, 157–168.
- Dórea Neto, F. A., Filho, J.G., Dos Santos, L.A., Oriá, A., Canola, J.C., Stefanos, S., Regonato, E. (2007) The use of hydroxyapatite for arthrodesis in dogs and cats: A clinical study. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 59, 932–938.
- Dorozhkin S. V. (2009) Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, 2, 399–498.
- Dubok V. A. (2000) Bioceramics - Yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 39, 381–394.
- Durham, M. E., Sod, G. A., Riggs, L. M., and Mitchell, C. F. (2015). An in vitro biomechanical comparison of hydroxyapatite coated and uncoated ao cortical bone screws for a limited contact: dynamic compression plate fixation of osteotomized equine 3rd metacarpal bones. *Veterinary Surgery*, 44, 206–213.
- Dutta, S. R., Passi, D., Singh, P., and Bhuibhar, A. (2015). Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Irish Journal of Medical Science*, 184, 101–106.
- Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M., and Kota, D. J. (2017). Concise review: fat and furious: harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction. *Stem Cells Translational Medicine*, 6, 1096–1108.
- Espina, M., Jülke, H., Brehm, W., Ribitsch, I., Winter, K., and Delling, U. (2016). Evaluation of transport conditions for autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for therapeutic application in horses. *Peer Journal*, 4.
- Eto, H., Ishimine, H., Kinoshita, K., Watanabe-Susaki, K., Kato, H., Doi, K., Kuno, S., Kurisaki, A., and Yoshimura, K. (2013). Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells and Development*, 22, 985–997.
- Faria, M. L., Lu, Y., Heaney, K., Uthamanthil, R. K., Muir, P., and Markel, M. D. (2007). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in absorbable collagen sponge enhances bone healing of tibial osteotomies in dogs. *Veterinary Surgery*, 36, 122–131.
- Farré-Guasch, E., Bravenboer, N., Helder, M. N., Schulten, E. A. J. M., Ten Bruggenkate, C. M., and Klein-Nulend, J. (2018). Blood vessel formation and bone regeneration potential of the stromal vascular fraction seeded on a calcium phosphate scaffold in the human maxillary sinus floor elevation model. *Materials*, 11, 161.
- FDA (2017) Regulatory Considerations for Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue- Based Products: Minimal Manipulation and Homologous Use, *Guidance for Industry and Drug Administration Staff*.

- Fetter, A. W. (1985) 'SECTION ONE STRUCTURE AND FUNCTION OF BONE', in Newton, C. D. and Nunamaker, D. M. (eds) *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. J.B. Lippincott Company.
- Fisher, J. S., Kazam, J. J., Fufa, D., and Bartolotta, R. J. (2019). Radiologic evaluation of fracture healing. *Skeletal Radiology*, 48, 349–361.
- Fodor, P. B. and Paulseth, S. G. (2016) Adipose Derived Stromal Cell (ADSC) injections for pain management of osteoarthritis in the human knee joint. *Aesthetic Surgery Journal*, 36, 229–236.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230–247.
- Gautschi, O. P., Frey, S. P. and Zellweger, R. (2007) Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ Journal of Surgery*, 77, 626–631.
- Goodship, A. E. and Kenwright, J. (1985) The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery - British volume*, 67, 650–655.
- Gosain, A. K., Song, L., Riordan, P., Amarante, M. T., Nagy, P. G., Wilson, C. R., Toth, J. M., and Ricci, J. L. (2002). A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 109, 619–630.
- Goujon E. (1869) Recherches expérimentales sur les propriétés physiologiques de la moelle des os. *Journal of Anatomy and Physiology*, 6, 399–412.
- Granel, B., Daumas, A., Jouve, E., Harlé, J. R., Nguyen, P. S., Chabannon, C., Colavolpe, N., Reynier, J. C., Truillet, R., Mallet, S., Baiada, A., Casanova, D., Giraudo, L., Arnaud, L., Veran, J., Sabatier, F., and Magalon, G. (2015). Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 2175–2182.
- Griffon J. D. (2005) '3 Fracture healing', in Johnson, A. L., Houlton J. E., and Vannini, R. (eds) *AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat*. Switzerland: AO Publishing, pp. 82–89.
- Grigoryan, M., Lynch, J. A., Fierlinger, A. L., Guermazi, A., Fan, B., MacLean, D. B., MacLean, A., and Genant, H. K. (2003). Quantitative and qualitative assessment of closed fracture healing using computed tomography and conventional radiography. *Academic radiology*, 10, 1267–1273.
- Guda, T., Walker, J. A., Singleton, B., Hernandez, J., Oh, D. S., Appleford, M. R., Ong, J. L., and Wenke, J. C. (2014). Hydroxyapatite scaffold pore architecture effects in large bone defects in vivo. *Journal of biomaterials applications*, 28, 1016–1027.
- Gugala, Z., Lindsey, R. W. and Gogolewski, S. (2007) New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones, *Macromolecular Symposia*, 253, 147–161.
- Guo J., Nguyen, A., Banyard, D. A., Fadavi, D., Toranto, J. D., Wirth, G. A., Paydar, K. Z., Evans, G. R., and Widgerow, A. D. (2016). Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 69, 180–188.
- Gupta, P., Lyons, S. and Hedgire, S. (2019) Ultrasound imaging of the arterial system, *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 9, S2–S13.
- Haahr, M. K., Jensen, C. H., Toyserkani, N. M., Andersen, D. C., Damkier, P., Sørensen, J. A., Lund, L., and Sheikh, S. P. (2016). Safety and potential effect of a single intracavernous injection of autologous adipose-derived regenerative cells in patients with erectile dysfunction following radical prostatectomy: an open-label phase I clinical trial. *EBioMedicine*, 5, 204–210.
- Hammond, G. (2016) 'Chapter 6 Imaging of fractures', in *BSAVA Manual of Canine and Feline Fracture Repair and Management*, pp. 37–48.
- Han, J., Koh, Y. J., Moon, H. R., Ryoo, H. G., Cho, C. H., Kim, I., and Koh, G. Y. (2010). Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 115, 957–964.
- Han, S. K., Kim, H. R. and Kim, W. K. (2010) The treatment of diabetic foot ulcers with uncultured, processed lipospiate cells: A pilot study, *Wound Repair and Regeneration*, 18, 342–348.
- Hench, L. L., Splinter R. J., Allen W.C. and Greenlee T.K. (1971) Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5, 117–141.
- Hench, L. L. and Wilson, J. (1984) Surface-active biomaterials. *Science*, 226, 630–636.

- Hernigou, P. and Homma, Y. (2012) Tissue bioengineering in orthopedics, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 9, 21–23.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., and Rouard, H. (2005). Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 87, 1430–1437.
- Hivernaud, V., Grimaud, F., Guicheux, J., Portron, S., Pace, R., Pilet, P., Sourice, S., Wuillems, S., Bertin, H., Roche, R., Espitalier, F., Weiss, P., and Corre, P. (2019). Comparing "intra operative" tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 120, 432–442.
- Hodgkinson, O. (2010) The importance of feet examination in sheep health management', *Small Ruminant Research*. 92, 67–71.
- Hong, L., Hengchang, X. and de Groot, K. (1992) Tensile strength of the interface between hydroxyapatite and bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26, 7–18.
- Houlton J. (2016) 'Chapter 5 Fracture healing', in Gemmill, T. and Clements, D. (eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Fracture Repair and Management*. 2nd edition. England: British Small Animal Veterinary Association, pp. 32–36.
- Hruschka, V., Tangl, S., Ryabenkova, Y., Heimel, P., Barnewitz, D., Möbus, G., Keibl, C., Ferguson, J., Quadros, P., Miller, C., Goodchild, R., Austin, W., Redl, H., and Nau, T. (2017). Comparison of nanoparticulate hydroxyapatite pastes of different particle content and size in a novel scapula defect model. *Scientific Reports*, 7, 43425.
- Huber, F. X., Berger, I., McArthur, N., Huber, C., Kock, H. P., Hillmeier, J., and Meeder, P. J. (2008). Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 19, 33–38.
- Huber, F. X., McArthur, N., Heimann, L., Dingeldein, E., Cavey, H., Palazzi, X., Clermont, G., and Boutrand, J. P. (2009). Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim in comparison to Alpha-BSM - more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim compared to Alpha BSM. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10, 164.
- Hussain, S. T. (1997) Blood flow measurements in lower limb arteries using duplex ultrasound. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 79, 323–330.
- Hwang, J. Y. (2017) Doppler ultrasonography of the lower extremity arteries: Anatomy and scanning guidelines, *Ultrasonography*, 36, 111–119.
- Jain, R. (2014) Comparison of nano-sized hydroxyapatite and b -tricalcium phosphate in the treatment of human periodontal intrabony defects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8, 74–78.
- James, D. R., Webster, N., White, J. D., Marchevsky, A. M., Cashmore, R. G., Havlicek, M., Fearnside, S., and Black, A. P. (2017). Comparison of bone healing, as assessed by computed tomography, following tibial tuberosity advancement in dogs with and without autogenous cancellous bone grafts. *New Zealand Veterinary Journal*, 65, 270–276.
- Jeon, S., Jang, J., Lee, G., Park, S., Lee, S. K., Kim, H., and Choi, J. (2020). Assessment of neovascularization during bone healing using contrast-enhanced ultrasonography in a canine tibial osteotomy model: a preliminary study. *Journal of Veterinary Science*, 21, e10.
- Jerome, J. T. J. and Venkatachalam, I. (2020) The use of doppler ultrasound to assess the blood flow of pedicled vascularized bone grafting for scaphoid nonunions. *Journal of Wrist Surgery*, 9, 396–403.
- Joswig, A. J., Mitchell, A., Cummings, K. J., Levine, G. J., Gregory, C. A., Smith, R., 3rd, and Watts, A. E. (2017). Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research and Therapy*, 8, 42.
- Jurgens, W. J., Kroeze, R. J., Zandieh-Doulabi, B., van Dijk, A., Renders, G. A., Smit, T. H., van Milligen, F. J., Ritt, M. J., and Helder, M. N. (2013). One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study. *BioResearch Open Access*, 2, 315–325.

- Kaler, J., Wassink, G. J. and Green, L. E. (2009) The inter- and intra-observer reliability of a locomotion scoring scale for sheep, *The Veterinary Journal*, 180, 189–194.
- Kattimani, V. S., Kondaka, S. and Lingamaneni, K. P. (2016) Hydroxyapatite--past, present, and future in bone regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7, 9–19.
- Kemilew, J., Sobczyńska-Rak, A., Żylińska, B., Szponder, T., Nowicka, B., and Urban, B. (2019). The use of allogenic stromal vascular fraction (SVF) cells in degenerative joint disease of the spine in dogs. *In vivo*, 33, 1109–1117.
- Key, A. J. (1934) The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, 16, 176–184.
- Khalpey, Z., Janardhanan, R., Konhilas, J., and Hemphill, C. (2014). First in man: adipose-derived stromal vascular fraction cells may promote restorative cardiac function. *The American Journal of Medicine*, 127, e11–e12.
- Kim, A., Kim, D. H., Song, H. R., Kang, W. H., Kim, H. J., Lim, H. C., Cho, D. W., and Bae, J. H. (2012). Repair of rabbit ulna segmental bone defect using freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction. *Cytotherapy*, 14, 296–305.
- Klijn, R. J., Meijer, G. J., Bronkhorst, E. M., and Jansen, J. A. (2010). A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16, 493–507.
- Koh, Y. G. and Choi, Y. J. (2012) Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *The Knee*, 19, 902–907.
- Koh, Y. G., Choi, Y. J., Kwon, O. R., and Kim, Y. S. (2014). Second-look arthroscopic evaluation of cartilage lesions after mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees. *American Journal of Sports Medicine*, 42, 1628–1637.
- Koh, Y. G., Choi, Y. J., Kwon, S. K., Kim, Y. S., and Yeo, J. E. (2015). Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 23, 1308–1316.
- Koh, Y. G., Jo, S. B., Kwon, O. R., Suh, D. S., Lee, S. W., Park, S. H., and Choi, Y. J. (2013). Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*, 29, 748–755.
- Koh, Y. J., Koh, B. I., Kim, H., Joo, H. J., Jin, H. K., Jeon, J., Choi, C., Lee, D. H., Chung, J. H., Cho, C. H., Park, W. S., Ryu, J. K., Suh, J. K., and Koh, G. Y. (2011). Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, 1141–1150.
- Kraus, K. H. and Kirker-Head, C. (2006) Mesenchymal stem cells and bone regeneration *Veterinary Surgery*, 35, 232–242.
- Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M., Murata, M., Nagai, N., Dohi, Y., and Ohgushi, H. (1998). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, 190–199.
- Kulus, M., Kulus, J., Jankowski, M., Borowiec, B., Jeseta, M., Bukowska, D., Brüssow, K., Kempisty, B. and Antosik, P. (2018). The use of mesenchymal stem cells in veterinary medicine. *Medical Journal of Cell Biology*, 6, 101–107.
- Kuno, S. and Yoshimura, K. (2015) Condensation of tissue and stem cells for fat grafting. *Clinics in Plastic Surgery*, 42, 191–197.
- Kwon, H. M., Hur, S. M., Park, K. Y., Kim, C. K., Kim, Y. M., Kim, H. S., Shin, H. C., Won, M. H., Ha, K. S., Kwon, Y. G., Lee, D. H., and Kim, Y. M. (2014). Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, 63, 19–28.
- Lalidou, F., Kolios, G. and Drosos, G. I. (2014) Bone infections and bone graft substitutes for local antibiotic therapy. *Surgical Technology International*, 24, 353–362.
- Lane, J. M. and Sandhu, H. (1987) Current approaches to experimental bone grafting. *Orthopedic Clinics of North America*, 18, 213–225.
- Lang, H. M., Schnabel, L. V., Cassano, J. M., and Fortier, L. A. (2017). Effect of needle diameter on the viability of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Veterinary Surgery*, 46, 731–737.

- Laschke, M. W., Witt, K., Pohlemann, T., and Menger, M. D. (2007). Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 82, 494–505.
- Lee, J., Lee, K. S., Kim, C. L., Byeon, J. S., Gu, N. Y., Cho, I. S., and Cha, S. H. (2017). Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, 18, 141–148.
- LeGeros R. Z. (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 81–98.
- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., Hedrick, M. H., Berthold, L., and Howaldt, H. P. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery*, 32, 370–373.
- Lescun, T. B., Baird, D. K., Oliver, L. J., Adams, S. B., Hawkins, J. F., and Moore, G. E. (2012). Comparison of hydroxyapatite-coated and uncoated pins for transfixation casting in horses. *American journal of veterinary research*, 73, 724–734.
- Levitt, S. R., Crayton, P. H., Monroe, E. A., and Condrate, R. A. (1969). Forming method for apatite prostheses. *Journal of biomedical materials research*, 3, 683–684.
- Li, Y., Chen, S. K., Li, L., Qin, L., Wang, X. L., and Lai, Y. X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3, 95–104.
- Li, Z., Yang, Y., Wang, C., Xia, R., Zhang, Y., Zhao, Q., Liao, W., Wang, Y., and Lu, J. (2005). Repair of sheep metatarsus defects by using tissue-engineering technique. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences*, 25, 62–67.
- Lindholm, T. S. and Urist, M. R. (1980). A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 150, 288–300.
- Liu, H. and Webster, T. J. (2007). Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials*, 28, 354–369.
- Liu Y. L., Liu, W. H., Sun, J., Hou, T. J., Liu, Y. M., Liu, H. R., Luo, Y. H., Zhao, N. N., Tang, Y., and Deng, F. M. (2014). Mesenchymal stem cell-mediated suppression of hypertrophic scarring is p53 dependent in a rabbit ear model. *Stem Cell Research and Therapy*, 5, 136.
- Lorbeer, R., Grotz, A., Dörr, M., Völzke, H., Lieb, W., Kühn, J. P., and Mensel, B. (2018). Reference values of vessel diameters, stenosis prevalence, and arterial variations of the lower limb arteries in a male population sample using contrast-enhanced MR angiography. *PloS one*, 13, e0197559.
- Lovatt, F. M. (2010). Clinical examination of sheep. *Small Ruminant Research*, 92, 72–77.
- Lu, L. Y., Ma, M., Cai, J. F., Yuan, F., Zhou, W., Luo, S. L., Pan, Z. Y., Zeng, W., Zhong, N., and Yin, F. (2018). Effects of local application of adipose-derived stromal vascular fraction on tendon-bone healing after rotator cuff tear in rabbits. *Chinese medical journal*, 131, 2620–2622.
- Lv, X., He, J., Zhang, X., Luo, X., He, N., Sun, Z., Xia, H., Liu, V., Zhang, L., Lin, X., Lin, L., Yin, H., Jiang, D., Cao, W., Wang, R., Zhou, G., and Wang, W. (2018). Comparative efficacy of autologous stromal vascular fraction and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells combined with hyaluronic acid for the treatment of sheep osteoarthritis. *Cell Transplantation*, 27, 1111–1125.
- Madonna, R. and De Caterina, R. (2008). In vitro neovasculogenic potential of resident adipose tissue precursors. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295, 1271–1280.
- Maffulli, N. and Thornton, A. (1995). Ultrasonographic appearance of external callus in long-bone fractures. *Injury*, 26, 5–12.
- Mahé G., Boulon, C., Desormais, I., Lacroix, P., Bressollette, L., Guilmot, J. L., Le Hello, C., Sevestre, M. A., Pernod, G., Constans, J., Boissier, C., and Bura-Rivière, A. (2017). Statement for Doppler waveforms analysis. *Vasa*, 46, 337–345.
- Marchesini, A. C., Magrio, F. A., Berezowski, A. T., Neto, O. B., Nogueira, A. A., and Candido dos Reis, F. J. (2008). A critical analysis of Doppler velocimetry in the differential diagnosis of malignant and benign ovarian masses. *Journal of Women's Health*, 17, 97–102.
- Marcucio, R. S., Nauth, A., Giannoudis, P. V., Bahney, C., Piuze, N. S., Muschler, G., and Miclau, T. (2015). 'Stem cell therapies in orthopaedic trauma', *Journal of Orthopaedic Trauma*, 29.

- Markel, M. D., Morin, R. L., Wikenheiser, M. A., Lewallen, D. G., and Chao, E. Y. (1991). Quantitative CT for the evaluation of bone healing. *Calcified Tissue International*, 49, 427–432.
- Markoski M. M. (2016) Advances in the use of stem cells in veterinary medicine: from basic research to clinical practice. *Scientifica*, 2016, 4516920.
- Marsell, R. and Einhorn, T. A. (2012). The biology of fracture healing. *Injury*, 42, 551–555.
- Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Mollo, A., Sampaolesi, M., Mascarello, F., Decaminada, M., and Patruno, M. (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*, 91, 18–24.
- Martinez, S. A. Probst, C. W., Hauptman, J. G., and Weisbrode, S. E. (1992). Effects of a fixed compression load on the osteogenic effect of autogenous cancellous bone grafts in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 2381–2385.
- Martinez, S. A. and Walker T. (1999). Bone grafts. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 2, 1207–1219.
- Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., and Giardino, R. (2001). Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative Medicine*, 51, 292–299.
- Marx, C., Silveira, M. D. and Beyer Nardi N. (2015) Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells and Development*, 24, 803–813.
- Marx, C., Silveira, M. D., Selbach, I., da Silva, A. S., Braga, L. M., Camassola, M., and Nardi, N. B. (2014). Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs., *Stem Cells International*. 2014, 391274.
- Matsui, N., Nozaki, K., Ishihara, K., Yamashita, K., and Nagai, A. (2015). Concentration-dependent effects of fibronectin adsorbed on hydroxyapatite surfaces on osteoblast adhesion. *Materials Science and Engineering C*, 48, 378–383.
- McAnulty, J. F. (1999) Effect of various short-term storage methods on viability of cancellous bone fragments. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 63–67.
- McClelland, D., Thomas, P. B., Bancroft, G., and Moorcraft, C. I. (2007). Fracture healing assessment comparing stiffness measurements using radiographs. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 457, 214–219.
- McGovern, J. A., Griffin, M. and Hutmacher, D. W. (2018) Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease Models and Mechanisms*, 11.
- Michalek, J., Vrablikova, A., Darinskas, A., Lukac, L., Prucha, J., Skopalik, J., Travník, J., Cibulka, M., and Dudasova, Z. (2019). Stromal vascular fraction cell therapy for osteoarthritis in elderly: Multicenter case-control study. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10, 76–80.
- Millis D. L. (1999) Bone- and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 29, 1221–1246.
- Mills, L. A. and Simpson, A. H. R. W. (2012). *In vivo* models of bone repair. *Journal of Bone and Joint Surgery - British volume*, 94, 865–874.
- Mills, S., Cowin, A. and Kaur, P. (2013). Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells*, 2, 621–634.
- Moed, B. R., Subramanian, S., van Holsbeeck, M., Watson, J. T., Cramer, K. E., Karges, D. E., Craig, J. G., and Bouffard, J. A. (1998). Ultrasound for the early diagnosis of tibial fracture healing after static interlocked nailing without reaming: clinical results. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 12, 206–213.
- Moed, B. R., Watson, J. T., Goldschmidt, P., and van Holsbeeck, M. (1995). Ultrasound for the early diagnosis of fracture healing after interlocking nailing of the tibia without reaming. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 310, 137–144.
- Mohammadi, R. and Amini, K. (2015). Guided bone regeneration of mandibles using chitosan scaffold seeded with characterized uncultured omental adipose-derived stromal vascular fraction: an animal study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 30, 216–222.
- Mohammadi, R., Sanaei, N., Ahsan, S., Masoumi-Verki, M., Khadir, F., and Mokarizadeh, A. (2015). Stromal vascular fraction combined with silicone rubber chamber improves sciatic nerve regeneration in diabetes. *Chinese journal of traumatology, English Edition*, 18, 212–218.
- Monroe, E. A., Votava, W., Bass, D. B., and McMullen, J. (1971). New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *Journal of Dental Research*, 50, 860–861.

- Montorfano, M. A., Montorfano, L. M., Perez Quirante, F., Rodríguez, F., Vera, L., and Neri, L. (2017). The FAST D protocol: a simple method to rule out traumatic vascular injuries of the lower extremities. *Critical Ultrasound Journal*, 9, 8.
- Moon, K. C., Chung, H. Y., Han, S. K., Jeong, S. H., and Dhong, E. S. (2019). Possibility of injecting adipose-derived stromal vascular fraction cells to accelerate microcirculation in ischemic diabetic feet: a pilot study. *International Journal of Stem Cells*, 12, 107–113.
- Muschler G. F., Boehm, C. and Easley, K. (1997). Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, 79, 1699–1709.
- Muschler G. F. and Midura, R. J. (2002) Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 66–80.
- Nam, A., Han, S. M., Go, D. M., Kim, D. Y., Seo, K. W., and Youn, H. Y. (2017). Long-term management with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and conventional treatment in a dog with hepatocutaneous syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 1514–1519.
- Navarro, A., Marín, S., Riol, N., Carbonell-Uberos, F., and Miñana, M. D. (2014). Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Research and Therapy*, 5, 50.
- Nery, E. B., Lynch, K. L., Hirthe, W. M., and Mueller, K. H. (1975). Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. *Journal of Periodontology*, 46, 328–347.
- Nery, E. B., Pflughoeft, F. A., Lynch, K. L., and Rooney, G. E. (1980). Functional loading of bioceramic augmented alveolar ridge--a pilot study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 43, 338–343.
- Newman, E., Turner, A. and Wark, J. (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*, 16, 277S-284S.
- Nyberg, E., Farris, A., O'Sullivan, A., Rodriguez, R., and Grayson, W. (2019). Comparison of SVF and passaged ASCs as point-of-care agents for bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 25, 1459–1469.
- Oedayrajsingh-Varma, M. J., van Ham, S. M., Knippenberg, M., Helder, M. N., Klein-Nulend, J., Schouten, T. E., Ritt, M. J., and van Milligen, F. J. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 8, 166–177.
- Oliveira, H. L., Da Rosa, W. L. O., Cuevas-Suárez, C. E., Carreño, N. L. V., da Silva, A. F., Guim, T. N., Dellagostin, O. A., and Piva, E. (2017). Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review. *Calcified Tissue International*, 101, 341–354.
- Olsen, A., Johnson, V., Webb, T., Santangelo, K. S., Dow, S., and Duerr, F. M. (2019). Evaluation of intravenously delivered allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of elbow osteoarthritis in dogs: a pilot study. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 32, 173–181.
- Paduano, F., Marrelli, M., Amantea, M., Rengo, C., Rengo, S., Goldberg, M., Spagnuolo, G., and Tatullo, M. (2017). Adipose tissue as a strategic source of mesenchymal stem cells in bone regeneration: A topical review on the most promising craniomaxillofacial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2140.
- Pak, J. (2011) Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: A case series. *Journal of Medical Case Reports*, 5.
- Pak, J. (2012) Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician*, 15, 75–85.
- Pak, J., Chang, J. J., Lee, J. H., and Lee, S. H. (2013). Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14, 337.
- Pak, J., Lee, J. H., Jeon, J. H., and Lee, S. H. (2014). Complete resolution of avascular necrosis of the human femoral head treated with adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma. *The Journal of International Medical Research*, 42, 1353–1362.

- Pak, J., Lee, J. H., Pak, N., Pak, Y., Park, K. S., Jeon, J. H., Jeong, B. C., and Lee, S. H. (2018). Cartilage regeneration in humans with adipose tissue-derived stem cells and adipose stromal vascular fraction cells: Updated status. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2146.
- Pak, J., Lee, J. H., Park, K. S., Park, M., Kang, L. W., and Lee, S. H. (2017). Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Science*, 24, 9.
- Parcero, J.J., Perez, J.A., Patel, A.N., Ichim, T.E., González, S.L., Comella, K., Lopez-Diaz, M.A., Castañeda, C., and Limon, J. (2014). Autologous adipose-derived stromal stem cell implantation to resolve critical limb ischemia: Case report. *Cureus*, 6.
- Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., and Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials*, 13, 1–10.
- Penwick, R. C., Mosier, D. A. and Clark, D. M. (1991) Healing of canine autogenous cancellous bone graft donor sites. *Veterinary Surgery*, 20, 229–234.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaïd, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., and Guillemain, G. (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology*, 18, 959–963.
- Polizopoulou, Z. S. (2010) Haematological tests in sheep health management. *Small Ruminant Research*, 92, 88–91.
- Pommer, A., Muhr, G. and Dávid, A. (2002) Hydroxyapatite-coated Schanz pins in external fixators used for distraction osteogenesis: A randomized, controlled trial. *Journal of Bone and Joint Surgery - American volume*, 84, 1162–1166.
- Popkin, P. R. W., Baker, P., Worley, F., Payne, S. and Hammon, A. (2012) The Sheep Project (1): determining skeletal growth, timing of epiphyseal fusion and morphometric variation in unimproved Shetland sheep of known age, sex, castration status and nutrition. *Journal of Archaeological Science. Academic Press*, 39, 1775–1792.
- Potes, J.C., Reis, J., Silva, F.C., Relvas, C., Cabrita, A. and Simoes, J. (2008). The sheep as an animal model in orthopaedic research. The sheep as an animal model in orthopaedic research. *Experimental Pathology and Health Sciences*, 2, 29–32.
- Pozzi, A., Risselada, M. and Winter, M. D. (2012) Assessment of fracture healing after minimally invasive plate osteosynthesis or open reduction and internal fixation of coexisting radius and ulna fractures in dogs via ultrasonography and radiography. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241, 744–753.
- Premaratne, G. U., Ma, L. P., Fujita, M., Lin, X., Bollano, E., and Fu, M. (2011). Stromal vascular fraction transplantation as an alternative therapy for ischemic heart failure: anti-inflammatory role., *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 6.
- Prins H. J., Schulten, E. A., Ten Bruggenkate, C. M., Klein-Nulend, J., and Helder, M. N. (2016). Bone regeneration using the freshly isolated autologous stromal vascular fraction of adipose tissue in combination with calcium phosphate ceramics. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 1362–1374.
- Ragety, G. R. and Griffon D. J. (2010) The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 24, 1–8.
- Rathfelder, F. and Paar, O. (1995) Possibilities for using sonography as a diagnostic procedure in fractures during the growth period. *Unfallchirurg*, 98, 645–649.
- Rawool N. M., Goldberg, B. B., Forsberg, F., Winder, A. A., and Hume, E. (2003). Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 22, 145–153.
- Ray, R. D. and Ward, A. A. (1951) A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement., *Surgical Forum*, 429–434.
- Remedios A. (1999) Bone and bone healing. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*. 29, 1029–1044.
- Rhee, S. C., Ji, Y. H., Gharibjanian, N. A., Dhong, E. S., Park, S. H., and Yoon, E. S. (2011). In vivo evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells and Development*, 20, 233–242.

- Rhineland, F. W. (1985) 'SECTION TWO NORMAL VASCULAR ANATOMY', in Newton, C. D. and Nunamaker, D. M. (eds) *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. J.B. Lippincott Company.
- Rigotti, G., Charles-de-Sá, L., Gontijo-de-Amorim, N. F., Takiya, C. M., Amable, P. R., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., and Sbarbati, A. (2016). Expanded stem cells, stromal-vascular fraction, and platelet-rich plasma enriched fat: Comparing results of different facial rejuvenation approaches in a clinical trial. *Aesthetic Surgery Journal*, 36, 261–270.
- Rigotti, G., Marchi, A., Galiè, M., Baroni, G., Benati, D., Krampera, M., Pasini, A., and Sbarbati, A. (2007). Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119, 1409–1422.
- Riordan, N. H., Ichim, T. E., Min, W. P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J. P., Harman, R. J., Patel, A. N., Murphy, M. P., Lee, R. R., and Mineev, B. (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 7, 29.
- Ripamonti, U. (1996) Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, 17, 31–35.
- Risselada, M., Kramer, M., de Rooster, H., Taeymans, O., Verleyen, P., and van Bree, H. (2005). Ultrasonographic and radiographic assessment of uncomplicated secondary fracture healing of long bones in dogs and cats. *Veterinary Surgery : VS*, 34, 99–107.
- Risselada, M., Kramer, M., Saunders, J. H., Verleyen, P., and Van Bree, H. (2006). Power Doppler assessment of the neovascularization during uncomplicated fracture healing of long bones in dogs and cats. *Veterinary Radiology Association*, 47, 301–306.
- Risselada, M., van Bree, H., Kramer, M., Duchateau, L., Verleyen, P., and Saunders, J. H. (2007). Ultrasonographic assessment of fracture healing after plate osteosynthesis. *Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 48, 368–372.
- Risselada, M., Winter, M. D., Lewis, D. D., Griffith, E., and Pozzi, A. (2018). Comparison of three imaging modalities used to evaluate bone healing after tibial tuberosity advancement in cranial cruciate ligament-deficient dogs and comparison of the effect of a gelatinous matrix and a demineralized bone matrix mix on bone healing - a pilot study. *BMC Veterinary Research*, 14, 164.
- Roato, I., Alotto, D., Belisario, D. C., Casarin, S., Fumagalli, M., Cambieri, I., Piana, R., Stella, M., Ferracini, R., and Castagnoli, C. (2016). Adipose derived-mesenchymal stem cells viability and differentiating features for orthopaedic reparative applications: Banking of adipose tissue. *Stem Cells International*, 2016, 4968724.
- Roato, I., Belisario, D. C., Compagno, M., Verderio, L., Sighinolfi, A., Mussano, F., Genova, T., Veneziano, F., Pertici, G., Perale, G., and Ferracini, R. (2018). Adipose-derived stromal vascular fraction/xenohybrid bone scaffold: An alternative source for bone regeneration. *Stem Cells International*, 2018, 4126379.
- Rodbell M. (1966). Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 130–139.
- Rodbell, M., and Jones, A. B. (1966). Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 140–142.
- Rombouts, W. J., and Ploemacher, R. E. (2003). Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 17, 160–170.
- Rovesti, G. L. (2005) '20.1 Delayed unions and 20.2 Nonunions', in Johnson, A. L., Houlton J. E., and Vannini, R. (eds) *AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat*. Switzerland: AO Publishing, pp. 394–408.
- Rozen, N., Bick, T., Bajayo, A., Shamian, B., Schift-Tzadok, M., Gabet, Y., Yayon, A., Bab, I., Soudry, M., and Lewinson, D. (2009). Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone*, 45, 918–924.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen and Co Ltd.

- Salgado, A. J., Reis, R. L., Sousa, N. J., and Gimble, J. M. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 5, 103–110.
- Santić, V., Cvek, S. Z., Sestan, B., Bobinac, D., Tudor, A., Miletić, D., and Nemec, B. (2009). Treatment of tibial bone defect with rotational vascular periosteal graft in rabbits. *Collegium Antropologicum*, 33, 43–50.
- Saxer, F., Scherberich, A., Todorov, A., Studer, P., Miot, S., Schreiner, S., Güven, S., Tchang, L. A., Haug, M., Heberer, M., Schaefer, D. J., Rikli, D., Martin, I., and Jakob, M. (2016). Implantation of stromal vascular fraction progenitors at bone fracture sites: From a rat model to a first-in-man study. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34, 2956–2966.
- Schemitsch E. H. (2017). Size matters: Defining critical in bone defect size!. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 31, S20–S22.
- Scherberich, A., Di Maggio, N. D., and McNagny, K. M. (2013). A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World Journal of Stem Cells*, 5, 1–8.
- Schnabel, L. V., Pezzanite, L. M., Antczak, D. F., Felipe, M. J., and Fortier, L. A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, 5, 13.
- Seddighi, R., and Doherty, T. J. (2016). Field sedation and anesthesia of ruminants. *The veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 32, 553–570.
- Seebach, C., Henrich, D., Kähling, C., Wilhelm, K., Tami, A. E., Alini, M., and Marzi, I. (2010). Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Engineering. Part A*, 16, 1961–1970.
- Séguin, B., Walsh, P. J., Mason, D. R., Wisner, E. R., Parmenter, J. L., and Dernell, W. S. (2003). Use of an ipsilateral vascularized ulnar transposition autograft for limb-sparing surgery of the distal radius in dogs: an anatomic and clinical study. *Veterinary Surgery : VS*, 32, 69–79.
- Semon, J. A., Zhang, X., Pandey, A. C., Alandete, S. M., Maness, C., Zhang, S., Scruggs, B. A., Strong, A. L., Sharkey, S. A., Beuttler, M. M., Gimble, J. M., and Bunnell, B. A. (2013). Administration of murine stromal vascular fraction ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 789–796.
- Shi, Y. Y., Nacamuli, R. P., Salim, A., and Longaker, M. T. (2005). The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116, 1686–1696.
- Sigurdson, U., Reikeras, O., Hoiseth, A., and Utvag, S. E. (2011). Correlations between strength and quantitative computed tomography measurement of callus mineralization in experimental tibial fractures. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)*, 26, 95–100.
- Sladkevicius, P., and Valentin, L. (1995). Interobserver agreement in the results of Doppler examinations of extrauterine pelvic tumors. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 6, 91–96.
- Smeets, A. J., Robben, S. G., and Meradji, M. (1990). Sonographically detected costo-chondral dislocation in an abused child. A new sonographic sign to the radiological spectrum of child abuse. *Pediatric radiology*, 20, 566–567.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., and Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, 21, 2724–2752.
- Su, H. Q., Zhuang, X. Q., Bai, Y., Ye, H. H., Huang, X. H., Lu, B. B., Lu, S. L., Nong, D. Y., and Wang, W. (2013). Value of ultrasonography for observation of early healing of humeral shaft fractures. *Journal of Medical Ultrasonics (2001)*, 40, 231–236.
- Sullivan, M. O., Gordon-Evans, W. J., Fredericks, L. P., Kiefer, K., Conzemius, M. G., and Griffon, D. J. (2016). Comparison of mesenchymal stem cell surface markers from bone marrow aspirates and adipose stromal vascular fraction sites. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 82.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676.
- Tarhan, S., Ucer, O., Sahin, M. O., and Gumus, B. (2011). Long-term effect of microsurgical inguinal varicocele on testicular blood flow. *Journal of Andrology*, 32, 33–39.

- Thirumala, S., Gimble, J. M., and Devireddy, R. V. (2010). Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4, 224–232.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282, 1145–1147.
- Todorov, A., Kreutz, M., Haumer, A., Scotti, C., Barbero, A., Bourguin, P. E., Scherberich, A., Jaquiere, C., and Martin, I. (2016). Fat-derived stromal vascular fraction cells enhance the bone-forming capacity of devitalized engineered hypertrophic cartilage matrix. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 1684–1694.
- Tonnard, P., Verpaele, A., Peeters, G., Hamdi, M., Cornelissen, M., and Declercq, H. (2013). Nanofat grafting: Basic research and clinical applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132, 1017–1026.
- Toombs, J. P., Wallace, L. J., Bjorling, D. E., and Rowland, G. N. (1985). Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 513–518.
- Toplu, G., Ozcelik, D., Serin, M., Erdem, H., and Topacoglu, A. T. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction increases osteogenesis in an experimental design zygomatic bone defect model. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 28, 2179–2182.
- Torres-Torrillas, M., Rubio, M., Damia, E., Cuervo, B., Del Romero, A., Peláez, P., Chicharro, D., Miguel, L., and Sopena, J. J. (2019). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells: A promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3105.
- Traktuev, D. O., Prater, D. N., Merfeld-Clauss, S., Sanjeevaiah, A. R., Saadatzadeh, M. R., Murphy, M., Johnstone, B. H., Ingram, D. A., and March, K. L. (2009). Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circulation Research*, 104, 1410–1420.
- Trivisonno, A., Alexander, R. W., Baldari, S., Cohen, S. R., Di Rocco, G., Gentile, P., Magalon, G., Magalon, J., Miller, R. B., Womack, H., and Toietta, G. (2019). Intraoperative strategies for minimal manipulation of autologous adipose tissue for cell- and tissue-based therapies: Concise Review. *Stem Cells Translational Medicine*, 8, 1265–1271.
- Tshamala, M., and van Bree, H. (2006). Osteoinductive properties of the bone marrow--myth or reality. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 19, 133–141.
- Tzouvelekis, A., Paspaliaris, V., Koliakos, G., Ntoliou, P., Bouros, E., Oikonomou, A., Zissimopoulos, A., Boussios, N., Dardzinski, B., Gritsalis, D., Antoniadis, A., Froudarakis, M., Kolios, G., and Bouros, D. (2013). A prospective, non-randomized, no placebo-controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Translational Medicine*, 11, 171.
- Upchurch, D. A., Renberg, W. C., Roush, J. K., Milliken, G. A., and Weiss, M. L. (2016). Effects of administration of adipose-derived stromal vascular fraction and platelet-rich plasma to dogs with osteoarthritis of the hip joints. *American Journal of Veterinary Research*, 77, 940–951.
- Uselli, F. G., Grassi, M., Maccario, C., Viganò, M., Lanfranchi, L., Alfieri Montrasio, U., and de Girolamo, L. (2018). Intratendinous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) injection provides a safe, efficacious treatment for Achilles tendinopathy: results of a randomized controlled clinical trial at a 6-month follow-up. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : Official Journal of the ESSKA*, 26, 2000–2010.
- Van Dijk, A., Naaijken, B. A., Jurgens, W. J., Nalliah, K., Sairras, S., van der Pijl, R. J., Vo, K., Vonk, A. B., van Rossum, A. C., Paulus, W. J., van Milligen, F. J., and Niessen, H. W. (2011) Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Research*, 7, 219–229.
- Vertenten, G., Gasthuys, F., Cornelissen, M., Schacht, E., and Vlamincx, L. (2010). Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology : V.C.O.T.*, 23, 153–162.
- Viateau, V., Guillemain, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H. (2007). Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on

- sheep. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 25, 741–749.
- Viateau, V., Guillemin, G., Yang, Y. C., Bensaid, W., Reviron, T., Oudina, K., Meunier, A., Sedel, L., and Petite, H. (2004). A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. *American Journal of Veterinary Research*, 65, 1653–1657.
- Vilar, J. M., Batista, M., Morales, M., Santana, A., Cuervo, B., Rubio, M., Cugat, R., Sopena, J., and Carrillo, J. M. (2014). Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Veterinary Research*, 10, 143.
- Volk, S. W., Wang, Y. and Hankenson, K. D. (2012) Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: Implications for MSC-based therapies, *Cell Transplantation*, 21, 2189–2200.
- Walker D. (1987) Sequence of epiphyseal fusion in the Rocky Mountain bighorn sheep, *Great Basin Naturalist*, 47.
- Wang, C., Wei, Y., Zhang, L., Song, J., Liu, N., and Fu, Y. (2018) Blood flow differences in cun-kou (radial) artery and anterior tibial artery: normal people vs patients with chronic gastritis. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38, 911–916.
- Wang, W., and Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2, 224–247.
- Ward, B. C., and Webster, T. J. (2006). The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials*, 27, 3064–3074.
- Wawrzyk, M., Sokal, J., Andrzejewska, E., and Przewratil, P. (2015). The role of ultrasound imaging of callus formation in the treatment of long bone fractures in children. *Polish Journal of Radiology*, 80, 473–478.
- Webster, T. J., and Ejirofor, J. U. (2004). Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, 25, 4731–4739.
- Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W., and Bizios, R. (2000). Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 21, 1803–1810.
- Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W., and Bizios, R. (2001). Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 22, 1327–1333.
- Webster, T. J., Siegel, R. W., and Bizios, R. (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 20, 1221–1227.
- Welch, J. A., Boudrieau, R. J., DeJardin, L. M., and Spodnick, G. J. (1997). The intraosseous blood supply of the canine radius: implications for healing of distal fractures in small dogs. *Veterinary Surgery : VS*, 26, 57–61.
- Werntz, J. R., Lane, J. M., Burstein, A. H., Justin, R., Klein, R., and Tomin, E. (1996). Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 14, 85–93.
- Wieding, J., Lindner, T., Bergschmidt, P., and Bader, R. (2015). Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep. *Biomaterials*, 46, 35–47.
- Williams, L. B., Russell, K. A., Koenig, J. B., and Koch, T. G. (2016). Aspiration, but not injection, decreases cultured equine mesenchymal stromal cell viability. *BMC Veterinary Research*, 12, 45.
- Wolff, J. (1867). Ueber die innere Architectur der linochen und ihre Bedeutung fiir die Frage vom Knochenwachsthum . *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 50, 389–450
- Wu, L., Prins, H. J., Leijten, J., Helder, M. N., Evseenko, D., Moroni, L., van Blitterswijk, C. A., Lin, Y., and Karperien, M. (2016). Chondrocytes cocultured with stromal vascular fraction of adipose tissue present more intense chondrogenic characteristics than with adipose stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 22, 336–348.
- Yang, Z., Yuan, H., Tong, W., Zou, P., Chen, W., and Zhang, X. (1996). Osteogenesis in extraskelally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, 17, 2131–2137.

- Yeadon R. (2016) 'Chapter 3 Bone development and physiology', in Gemmill, T. and Clements, D. (eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Fracture Repair and Management*. 2nd edition. England: British Small Animal Veterinary Association, pp. 12–19.
- Yokota, N., Yamakawa, M., Shirata, T., Kimura, T., and Kaneshima, H. (2017). Clinical results following intra-articular injection of adipose-derived stromal vascular fraction cells in patients with osteoarthritis of the knee. *Regenerative Therapy*, 6, 108–112.
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., and Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 32, 48–55.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., and Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208, 64–76.
- You, D., Jang, M. J., Kim, B. H., Song, G., Lee, C., Suh, N., Jeong, I. G., Ahn, T. Y., and Kim, C. S. (2015). Comparative study of autologous stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells for erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury. *Stem Cells Translational Medicine*, 4, 351–358.
- Youssef, G. B. Bakry, H.H., El-Shwarrby R.M., Nabila, M. and Elham, A. (2016) The relation between the growth plate closure in tibia and the age of sheep and goat: Medicolegal study. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 812–815.
- Yuan, H., Fernandes, H., Habibovic, P., de Boer, J., Barradas, A. M., de Ruiter, A., Walsh, W. R., van Blitterswijk, C. A., and de Bruijn, J. D. (2010). Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 13614–13619.
- Zakhari, J. S., Zabonick, J., Gettler, B., and Williams, S. K. (2018). Vasculogenic and angiogenic potential of adipose stromal vascular fraction cell populations in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 54, 32–40.
- Zhang, Y., Grosfeld, E. C., Camargo, W. A., Tang, H., Magri, A. M. P., and van den Beucken, J. J. J. P. (2018). Efficacy of intraoperatively prepared cell-based constructs for bone regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, 9, 283.
- Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Rubin, J. P., and Donnenberg, A. D. (2013). Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 83, 134–140.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279–4295.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 211–228.
- Γιαννούκας, Α. Δ. και Λαμπρόπουλος Ν. (2013) *Υπερηχογραφική διερεύνηση των αγγειακών παθήσεων*. Αττική: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
- Μιχαήλ Σ. (1985) Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών. 2η. Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη.
- Μιχαήλ Σ. (1996) *Ιστολογία*. 2η. Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη.
- Σμοκοβίτης Α. (2007) *Φυσιολογία*. 5η. Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη.