



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Πανεπιστημιακή Ορθοπαιδική Κλινική
Διευθυντής, Καθηγητής Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΙΟΣΤΙΚΩΝ ΥΠΕΡΗΧΩΝ
ΣΤΗ ΔΙΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΟΣΤΟΥ-ΤΕΝΟΝΤΑ ΚΑΙ
ΣΤΑ ΚΑΤΑΓΜΑΤΑ ΜΑΚΡΩΝ ΟΣΤΩΝ.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υπό

ΛΟΥΚΙΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ

Ειδικευόμενη Ορθοπαιδικής Χειρουργικής

Λάρισα 2009

ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΘΕΜΑΤΟΣ
ΕΓΚΡΙΣΗ 1^η ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΝΕΛΕΥΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΕΝΑΡΞΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 25-01-2006

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ – ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

1. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπων)
2. Δημήτριος Φωτιάδης, Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Παναγιώτης Μέγας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Πατρών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπων)
2. Δημήτριος Φωτιάδης, Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Παναγιώτης Μέγας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Πατρών
4. Θεόφιλος Καραχάλιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. Ζωή Νταϊλιάννα, Επίκουρος Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. Σωκράτης Βαρυτιμίδης, Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Βάντα

Ευχαριστίες

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης και Παρακολούθησης για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Κωνσταντίνο Ν. Μαλίζο για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντάς μου αυτή τη διδακτορική διατριβή καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να οργανώσω αρχικά μία πειραματική μελέτη και στη συνέχεια κλινική μελέτη, δίνοντάς μου πρόσβαση στο προσωπικό του αρχείου ασθενών. Επίσης, για την καθοδήγηση και τη μεθοδολογία που μου παρείχε κατά το σχεδιασμό και την εκτέλεση της μελέτης και τη συνεχή υποστήριξη στη δύσκολη φάση της περιεγχειρητικής φροντίδας και χειρισμού των πειραματόζωων καθώς και για την προεγχειρητική και μετεγχειρητική εκτίμηση των ασθενών. Η συνεισφορά του στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης ήταν καθοριστική.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δημήτριο Φωτιάδη για την ουσιαστική βοήθεια κατά τη διάρκεια της μελέτης και για την επεξεργασία των δεδομένων του συστήματος υπερήχων καθώς και τον ερευνητή του εργαστηρίου του Βασίλειο Πρωτόπαππα.

Ιδιαίτερη μνεία χρειάζεται η σημαντικότερη συμβολή του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Πανεπιστημίου Πατρών κ. Κωνσταντίνου Σταθόπουλου για την συνεχή συμπαράσταση και εμπύχωση σε κάθε στάδιο της μελέτης, για τις πολύτιμες συμβουλές του στο σχεδιασμό της μελέτης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επίσης, για τη δυνατότητα βιοχημικής επεξεργασίας των δειγμάτων στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το οποίο ηγούνταν τότε ως Επίκουρος Καθηγητής, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου κ. Κατερίνα Γραφανάκη και κ. Σταματίνα Γιαννούλη.

Ευχαριστώ επίσης, τον καθηγητή Παθολογοανατομίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Κουκούλη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας κ. Μαρία Ιωάννου για την ιστολογική επεξεργασία των δειγμάτων και τον Αναπληρωτή Καθηγητή

Ακτινολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Απόστολο Καραντάνα για την καθοριστική συμβολή του στην απεικονιστική ανάλυση της μελέτης. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Στατιστικής Ανάλυσης Δεδομένων, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Βασίλειο Μπαγιάτη για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μιγάλη Χαντέ για την συνεργασία και υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της μελέτης, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια του πειραματικού μοντέλου. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον Ειδικευόμενο Ιατρό Ορθοπαιδικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Λάζαρο Πουλτσίδα για την πολύτιμη βοήθεια καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης καθώς και τον Στρατιωτικό Κτηνίατρο κ. Θωμά Γεωργιάδη για την φροντίδα και περιεγχειρητικό χειρισμό των πειραματόζωων.

Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη της Ορθοπαιδικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόφιλο Καραχάλιο, Επίκουρους Καθηγητές κ. Ζωή Νταϊλιάνα και κ. Σωκράτη Βαρυτιμίδα, και τους κ. Θεοφάνη Μωραΐτη, κ. Κωνσταντίνο Μπαργιώτα και κ. Γεώργιο Μπασδέκη για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις κάθε φορά που χρειάστηκα τη βοήθεια και την εμπειρία τους για την πραγματοποίηση της ερευνητικής μου εργασίας.

Διακρίσεις

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: Gene expression and Histological analysis in rabbits

Papatheodorou LK, Malizos KN, Poultsides LA, Hantes ME, Grafanaki K, Giannouli S, Ioannou MG, Koukoulis GK, Protopappas VC, Fotiadis DI, Stathopoulos C.

Ultrasound Med Biol. 2009 Apr;35(4):576-584.

Η διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης επιταχύνει την πόρωση. Πειραματική μελέτη σε οστεοτομία κνήμης.

Μ.Η. Χαντές, Ν.Ε. Γκουγκουλιάς, **Α. Παπαθεοδώρου**, Κ.Ν. Μαλίζος
Οστούν, 2007, 18 (1):37-43.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Gene expression analysis in healing at tendon graft-bone interface in rabbits after transosseous application of Low-Intensity Ultrasound.

Papatheodorou L., Poultsides L., Hantes M., Grafanaki K., Stathopoulos C., Malizos K.N.

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc May 2008;16 (Suppl.1):68

Ultrasound for enhancement of bone healing: Review and innovative approaches.

K.N. Malizos, **L.K. Papatheodorou**

The Bone Defect, Oct 2008;(Suppl.1):31

Transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface affects the healing rate and up-regulates simultaneously the expression of collagen type I and tRNA^{Gly}

Papatheodorou LK, Grafanaki K, Giannouli S, Fotiadis D, Stathopoulos C, Malizos KN.

IEEE Trans Biomed Eng, proceeding BIBE 2008

ΒΡΑΒΕΙΑ

1^ο Βραβείο

Γονιδιακή έκφραση επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος σε κουνέλια υπό την επίδραση διοστικής εφαρμογής χαμηλής έντασης υπερήχων.

Λ.Κ. Παπαθεοδώρου Λ. Πουλτσίδης, Μ. Χαντές, Κ. Γραφανάκη, Κ. Σταθόπουλος, ΚΝ Μαλίζος

2^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αρθροσκόπησης Χειρουργικής Γόνατος και Αθλητικών κακώσεων «Γ. Νούλης» Αθήνα, Ελλάδα 14-16 Ιουνίου 2007

1^ο Βραβείο (έπαινος)

Gene expression analysis in healing at tendon graft-bone interface in rabbits after transosseous application of low-intensity ultrasound

L.K. Papatheodorou, L. Poultsides, M. Hantes, K. Grafanaki, C. Stathopoulos, K.N. Malizos

13th ESSKA (European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy) Congress in Porto/Portugal, 21-24 May 2008

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound on gene expression at tendon graft-bone interface healing in rabbits

L.K. Papatheodorou, L. Poultsides, M. Hantes, K. Grafanaki, C. Stathopoulos, K.N. Malizos

8th EFORT CONGRESS, Florence, Italy 11-15 May 2007

Septic femoral nonunion with shortening treatment and monitoring with transosseous ultrasound

L.K. Papatheodorou, L. Poultsides, A. Papachristos, D. Fotiadis, K.N. Malizos

26th Congress of the European Bone and Joint Infection Society. Corfu, Greece 20-22 September 2007

Gene expression analysis in healing at tendon graft-bone interface in rabbits after transosseous application of low-intensity ultrasound

L.K. Papatheodorou, L. Poultsides, M. Hantes, K. Grafanaki, C. Stathopoulos, K.N. Malizos

13th ESSKA (European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy) Congress in Porto/Portugal, 21-24 May 2008

Transosseous application of low-intensity ultrasound at tendon graft-bone interface affects the healing rate and up-regulates simultaneously the expression of collagen type I and tRNA^{GLY}

L. Papatheodorou, K. Grafanaki, S. Giannouli, D. Fotiadis, C. Stathopoulos, K.N. Malizos

8th IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering (BIBE), Athens, Greece, 8-10 October 2008

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντάσσεται στο Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού- ΠΕΝΕΔ 2003 (έργο 03ΕΔ140) και συγχρηματοδοτείται κατά 80% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 20% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο- Υπουργείο Ανάπτυξης - Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ερευνητικού Προγράμματος Ανταγωνιστικότητα- Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Διακρίσεις	5
Εισαγωγή	12
Γενικό Μέρος	
1. Συνδεσμοποίηση και επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος	14
1.1 Στάδια συνδεσμοποίησης - επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος	17
1.2 Ευόδωση επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος	18
1.3 Μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας- β_1 (TGF- β_1)	20
1.4 Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας- I (IGF-I)	23
1.5 Άξονας RANKL / RANK/ OPG	23
1.6 Κολλαγόνο και κολλαγόνο τύπου I	25
1.7 Πρωτεΐνη Biglycan	29
2. Επουλωτική εξεργασία πάρωσης καταγμάτων	31
2.1 Φυσιολογία της πάρωσης	32
2.2 Βιολογία της πάρωσης	37
2.3 Εμβιομηχανική της πάρωσης	42
2.4 Ευόδωση της πάρωσης	43
2.5 Βιολογικές μέθοδοι ευόδωσης της πάρωσης	44
2.5.1 Οστικά Μοσχεύματα	44
2.5.2 Αυξητικοί παράγοντες	46
2.5.3 Γονιδιακή Θεραπεία	47
2.5.4 Οστεοκαθοδηγητικά Υλικά	48
2.5.5 Οστεογενετικά Υλικά	50
2.6 Βιοφυσικές μέθοδοι ευόδωσης της πάρωσης	51
2.6.1 Ηλεκτρικά- Ηλεκτρομαγνητικά πεδία	51
3. Χαμηλής έντασης Υπέρηχοι	53
3.1 Ευόδωση επουλωτικών εξεργασιών με υπερήχους χαμηλής έντασης.....	56

3.2	Παρακολούθηση της πόρωσης με υπερήχους χαμηλής έντασης	64
Ειδικό Μέρος		
1.1	Σκοπός της μελέτης	67
1.2	Σχεδιασμός της μελέτης	68
2.	Α΄ Φάση– Πειραματική μελέτη επίδρασης διοστικών υπερήχων στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος	69
2.1	Υλικό και Μέθοδος	69
2.1.1	Ζωικό μοντέλο μελέτης	69
2.1.2	Διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης	71
2.1.3	Θυσία πειραματόζωων – Δειγματοληψίες	71
2.1.4	Απομόνωση RNA	72
2.1.5	Σχεδιασμός εκκινητών	74
2.1.6	Σύνθεση cDNA – Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων	74
2.1.7	Ημι-ποσοτική RT-PCR	75
2.1.8	Ιστολογική ανάλυση	77
2.1.9	Στατιστική ανάλυση	77
2.2	Αποτελέσματα	78
2.2.1	Προσδιορισμός παραμέτρων ημι-ποσοτικής PCR	78
2.2.2	Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων	78
2.2.3	Αποτελέσματα Ιστολογικής Ανάλυσης	89
3.	Β΄ Φάση– Κλινική μελέτη επίδρασης υπερήχων στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος	92
3.1	Υλικό και μέθοδος	92
3.1.1	Χειρουργική Επέμβαση- Τεχνική	92
3.1.2	Εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης	95
3.1.3	Δειγματοληψίες- αιμοληψίες	96
3.1.4	Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών παραγόντων αίματος με τη μέθοδο ELISA.....	96
3.1.5	Προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων	98
3.1.6	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	99

3.1.7	Μέθοδος ELISA	99
3.1.8	Πολυτομική Αξονική Τομογραφία	100
3.1.9	Στατιστική ανάλυση	101
3.2	Αποτελέσματα	101
3.2.1	Αποτελέσματα πρωτεϊνικών παραγόντων	101
3.2.2	Αποτελέσματα Απεικονιστικής Ανάλυσης	108
4.	Γ΄ Φάση– Κλινική μελέτη επίδρασης διοστικών υπερήχων στην πόρωση καταγμάτων μακρών οστών	111
4.1	Υλικό και Μέθοδος	111
4.2	Αποτελέσματα	113
5.	Συζήτηση –Συμπεράσματα	130
	Περίληψη	144
	Abstract	146
	Βιβλιογραφία	148

Εισαγωγή

Η μελέτη της ανακατασκευής του προσθίου χιαστού συνδέσμου (ΠΧΣ), επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τένοντα, αποκτά αυξημένο ενδιαφέρον δεδομένου ότι τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι έφηβοι και ενήλικες συμμετέχουν σε ποικίλες αθλητικές δραστηριότητες ατομικές, συλλογικές, οργανωμένες ή ευκαιριακές. Οι ρήξεις του ΠΧΣ είναι συχνές κακώσεις του γόνατος, οι οποίες αφορούν κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας με αυξημένη δραστηριότητα. Η ρήξη του ΠΧΣ έχει ως αποτέλεσμα τη μηχανική αστάθεια και την τελική έκπτωση της λειτουργικότητας του γόνατος. Έχει παρατηρηθεί αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης πρώιμης οστεοαρθρίτιδας γόνατος μετά από τραυματισμό ΠΧΣ σε νέους ενήλικες. Από τον τραυματισμό του συνδέσμου και την αποκατάστασή του προκύπτουν κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικού αριθμού εργατοωρών (άδεια από εργασία, αναρρωτική άδεια, πρώιμη συνταξιοδότηση) και την οικονομική επιβάρυνση του συστήματος υγείας. Επιπλέον, στους συστηματικά και επαγγελματικά αθλούμενους καθώς και στους αθλητές υψηλών επιδόσεων τα επακόλουθα σοβαρών τραυματισμών μπορούν να καθορίσουν την εξέλιξή τους, μέχρι και να ακυρωθούν προσπάθειες ετών και να αναγκαστούν να διακόψουν οριστικά. Στόχος της ανακατασκευής του ΠΧΣ είναι η επιστροφή στο προηγούμενο επίπεδο δραστηριότητας και λειτουργίας όσο το δυνατόν γρηγορότερα και ασφαλέστερα. Η ανακατασκευή του ΠΧΣ μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση τενόντιου μοσχεύματος εντός οστικού τούνελ με πολύ καλά λειτουργικά αποτελέσματα.

Η επουλωτική εξεργασία της πώρωσης των καταγμάτων αποτελεί ένα πολύπλοκο βιολογικό και μηχανικό φαινόμενο κατά το οποίο σταδιακά αποκαθίστανται οι δομικές, λειτουργικές και μηχανικές ιδιότητες του οστού. Η διαδικασία διαρκεί συνήθως από 3 έως 9 μήνες, ενώ δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις εμφάνισης επιπλοκών, όπως καθυστερημένων πωρώσεων και ψευδαρθρώσεων (6-10%), αυξάνοντας το κόστος θεραπείας διότι απαιτούν περαιτέρω χειρουργικές επεμβάσεις προκειμένου να επιτευχθεί πώρωση. Παράλληλα, οι επιπτώσεις στον ψυχισμό του ασθενούς καθώς και στο ευρύτερο κοινωνικό περιβάλλον του είναι σημαντικές. Η παρακολούθηση της εξέλιξης

της πώρωσης απαιτεί επανειλημμένες επισκέψεις στο ιατρείο του Ορθοπαιδικού Χειρουργού με ταυτόχρονη λήψη ακτινογραφιών, γεγονός που αποτελεί μία ακόμη επιβάρυνση για τον ασθενή.

Οι χαμηλής έντασης υπέρηχοι (Low-Intensity Ultrasound – LiUS) αποτελούν μία μορφή μηχανικής ενέργειας, που μεταβιβάζονται ως υψηλής συχνότητας ωστικά ηχητικά κύματα και χρησιμοποιούνται ευρέως στη ιατρική ως διαγνωστικό αλλά και θεραπευτικό μέσο. Έχει βρεθεί σε πολλές μελέτες βασικών επιστημών, πειραματικές καθώς και κλινικές μελέτες ότι η χρήση LiUS ευοδώνει την επούλωση των τενόντων και συνδέσμων. Επιπρόσθετα, έχει καταδειχθεί ότι η διαδερμική εφαρμογή LiUS ευοδώνει και επιταχύνει τη διαδικασία της πώρωσης των καταγμάτων και συμβάλλει και στην αντιμετώπιση των περιπτώσεων καθυστερημένης πώρωσης και ψευδάρθρωσης. Πρόσφατα, πειραματικές μελέτες απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής διοστικών LiUS στην πώρωση καθώς και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της διαδικασίας της πώρωσης των καταγμάτων. Η διοστική διάδοση των υπερήχων οδηγεί σε αποδοτικότερη μεταφορά ενέργειας στην περιοχή του κατάγματος επιταχύνοντας την σκληρότητα του πώρου με αποτέλεσμα να επιταχύνεται σημαντικά ο χρόνος της πώρωσης των καταγμάτων.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για την ανεύρεση νέων τρόπων θεραπευτικής αντιμετώπισης, νέων τρόπων προαγωγής και επιτάχυνσης των επουλωτικών εξεργασιών του μυσκελετικού συστήματος είναι πολυάριθμες και διεξάγονται από επιστήμονες διαφόρων ειδικοτήτων. Οι μελέτες αυτές εκτείνονται από το επίπεδο της βασικής έρευνας μέχρι την κλινική πράξη. Στα πλαίσια αυτής της συνεχώς εντεινόμενης έρευνας, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στη διερεύνηση της επίδρασης του συστήματος χαμηλής έντασης διοστικών υπερήχων α) στην ευόδωση και επιτάχυνση επουλωτικής εξεργασίας διεπιφάνειας οστού-τένοντα μετά από αποκατάσταση ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα, πειραματική και κλινική μελέτη και β) στην επιτάχυνση της πώρωσης καταγμάτων μακρών οστών καθώς και μελέτη της κλινικής εφαρμογής διοστικών υπερήχων για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πώρωσης.

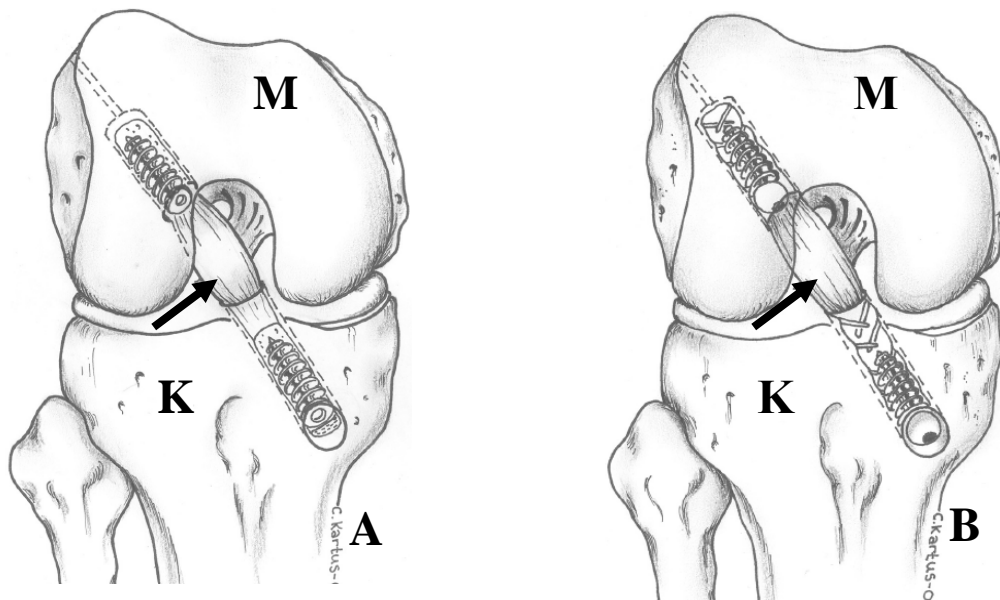
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Συνδεσμοποίηση και επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος

Οι ρήξεις του πρόσθιου χιαστού συνδέσμου (ΠΧΣ) είναι συχνές κακώσεις του γόνατος, οι οποίες αφορούν κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας με αυξημένη δραστηριότητα¹. Στις ΗΠΑ οι κακώσεις του συνδέσμου αυτού αφορούν 1/3000 άτομα του γενικού πληθυσμού κάθε χρόνο ενώ η συχνότητα είναι ακόμη μεγαλύτερη στις νεότερες ηλικίες, υπολογίζεται ότι μεταξύ 15 και 45 ετών η συχνότητα του τραυματισμού του ΠΧΣ είναι 1/1750². Η ρήξη του ΠΧΣ έχει ως αποτέλεσμα τη μηχανική αστάθεια και την τελική έκπτωση της λειτουργικότητας του γόνατος. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι η αποκατάσταση μόνο των 50.000 ρήξεων του ΠΧΣ κοστίζει περί το 1 δισεκατομμύριο δολάρια³. Στο ποσό αυτό δεν συμπεριλαμβάνεται το κόστος από τη συντηρητική αντιμετώπιση, τη μετεγχειρητική αποκατάσταση και τις μετεγχειρητικές επιπλοκές.

Στόχος της ανακατασκευής του ΠΧΣ είναι η επιστροφή στο προηγούμενο επίπεδο δραστηριότητας και λειτουργίας όσο το δυνατόν γρηγορότερα και ασφαλέστερα. Η ανακατασκευή του ΠΧΣ όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικές και κλινικές μελέτες⁴⁻⁷ μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση τενοντίου μοσχεύματος εντός οστικού τούνελ με πολύ καλά λειτουργικά αποτελέσματα, αφού ο ίδιος ο ΠΧΣ διαθέτει μικρή ικανότητα επούλωσης. Τα δύο πιο συχνά αυτομοσχεύματα που χρησιμοποιούνται για την ανακατασκευή του ΠΧΣ είναι οι οπίσθιοι μηριαίοι και ο επιγονατιδικός τένοντας (εικ. 1). Από συγκριτικές μελέτες⁸⁻¹² και μετα-αναλύσεις¹³ δεν παρατηρείται στατιστική σημαντική διαφορά στην λειτουργική αποκατάσταση του ΠΧΣ με τη χρήση μοσχεύματος οπίσθιων μηριαίων έναντι της χρήσης επιγονατιδικού τένοντα.

Όπως έχει παρατηρηθεί σε πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες το φαινόμενο της συνδεσμοποίησης (ligamentization) πραγματοποιείται εντός του πρώτου έτους μετά την επέμβαση. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος και της διαδικασίας της συνδεσμοποίησης τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση⁸ πλαστικής ανακατασκευής ΠΧΣ με χρήση τενοντίου μοσχεύματος (μαύρο βέλος, A: επιγονατιδικός τένοντας και B: οπίσθιοι μηριαίοι) εντός οστικού τούνελ, διαμέσου μηριαίου οστούν (M) και κνήμης (K).

Ο όρος συνδεσμοποίηση, όπως έχει προταθεί από την ερευνητική ομάδα του Amiel¹⁴, αναφέρεται στο φαινόμενο της βιοχημικής και ιστολογικής ανακατασκευής που υφίστανται τα μοσχεύματα από την τενόντια στη συνδεσμική μορφή μετά από πλαστική αποκατάσταση του συνδέσμου. Η διαδικασία της συνδεσμοποίησης είναι βραδεία και το μόσχευμα υφίσταται αρχικά μία περίοδο εξασθένησης. Τα τενόντια αυτομοσχεύματα υφίστανται μετάπτωση μέσω βιοχημικών και ιστολογικών αλλαγών με αποτέλεσμα να αποκτούν την εμφάνιση συνδέσμου. Με τον τρόπο αυτό τα τενόντια αυτομοσχεύματα εμφανίζουν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του φυσιολογικού ΠΧΣ παρόλο που οι δύο αυτοί ιστοί διαφέρουν βιοχημικά καθώς παρουσιάζουν διαφορετική αναλογία κολλαγόνου, γλυκοζαμινογλυκανών και σταυροσυνδεδεμένων ιών κολλαγόνου (collagen-reducible crosslinks). Η διαδικασία της συνδεσμοποίησης θεωρείται ότι αποτελεί μέρος της γενικότερης ιστικής προσαρμογής του μοσχεύματος, η οποία περιλαμβάνει τη διαδικασία της ωρίμανσης καθώς και τη διαδικασία της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ. Στη διαδικασία της ιστικής προσαρμογής διακρίνεται η φάση της νέκρωσης, του οιδήματος, της νεοαγγειογένεσης, της

ινοβλαστικής διείσδυσης και της σύνθεσης κολλαγόνου κατά την αναδιαμόρφωση του συνδέσμου¹⁵.

Η διαδικασία της ωρίμανσης του μοσχεύματος έχει μελετηθεί σε πειραματικά ζωικά μοντέλα^{4,14,16,17} στα οποία έχει παρατηρηθεί ότι το τενόντιο μόσχευμα, που χρησιμοποιείται για την ανακατασκευή του ΠΧΣ, υφίσταται αρχικά εκφύλιση στο κεντρικό τμήμα κατά τις πρώτες 2 έως 6 εβδομάδες μετεγχειρητικά, λόγω ισχαιμικής νέκρωσης των ινοβλαστών και στη συνέχεια το μόσχευμα αποκτά δομή παρόμοια με το φυσιολογικό ΠΧΣ μεταξύ 6 και 12 μήνες μετεγχειρητικά. Ο Goradia και συν⁵ περιέγραψαν σε πειραματική μελέτη σε πρόβατα την ιστολογική δομή των αυτομοσχευμάτων και κατέδειξαν ότι τα αυτομοσχεύματα αποκτούν την εμφάνιση φυσιολογικού ΠΧΣ ένα χρόνο μετά την επέμβαση. Στην ίδια μελέτη δεν παρατηρήθηκε νέκρωση στο μόσχευμα σε καμία χρονική περίοδο. Σε μία παρόμοια μελέτη, ο Shino και συν¹⁸ χρησιμοποιώντας ως οργανισμό-μοντέλο σκύλους κατέδειξαν ότι τα τενόντια μοσχεύματα αποκτούν την εμφάνιση του φυσιολογικού ΠΧΣ μέσω της επουλωτικής εξεργασίας η οποία περιλαμβάνει τη φάση της ισχαιμικής νέκρωσης, της επαναγγείωσης και της βαθμιαίας ανακατασκευής. Οι εμβιομηχανικές ιδιότητες του τενόντιου αυτομοσχεύματος μειώνονται αμέσως μετά τη χειρουργική αποκατάσταση του ΠΧΣ και δεν αποκαθίστανται σε φυσιολογικό επίπεδο ακόμα και 12 μήνες μετά την επέμβαση.

Στις κλινικές μελέτες¹⁹⁻²⁴ η διαδικασία της ωρίμανσης του τενοντίου μοσχεύματος αξιολογείται ιστολογικά σε βιοψίες που λαμβάνονται αρθροσκοπικά. Στις περισσότερες μελέτες παρατηρήθηκε ότι τα μοσχεύματα δεν είναι πλήρως ώριμα ένα χρόνο μετά την επέμβαση. Βέβαια ένα σημαντικό μειονέκτημα των κλινικών μελετών αποτελεί το γεγονός ότι με τη βιοψία ελέγχεται μόνο μία συγκεκριμένη περιοχή του μοσχεύματος και όχι ολόκληρη η επιφάνειά του όπως πραγματοποιείται στις πειραματικές μελέτες. Ο Rougraff και συν²³ κατέδειξε ότι τα μοσχεύματα στον άνθρωπο είναι βιώσιμα πρώιμα κατά τις 3 πρώτες εβδομάδες μετεγχειρητικά, ότι ίσως δεν υφίστανται νέκρωση ή εκφύλιση και αποκτούν την εμφάνιση συνδέσμου 3 χρόνια μετά την επέμβαση. Αντίθετα ο Johnson²⁵ περιέγραψε ότι τα μοσχεύματα αποκτούν ιστολογική εμφάνιση παρόμοια με φυσιολογικό ΠΧΣ 4 μήνες μετεγχειρητικά.

1.1 Στάδια συνδεσμοποίησης - επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος

Ο Rougraff και συν²³ σε κλινική μελέτη διέκρινε τη διαδικασία της συνδεσμοποίησης σε τέσσερα στάδια: α) στάδιο αναδιοργάνωσης κυτταρικού πληθυσμού (repopulation), β) στάδιο ταχείας ανακατασκευής, γ) στάδιο ωρίμανσης και δ) στάδιο ηρεμίας (quiescence).

Αναλυτικότερα οι διεργασίες που παρατηρήθηκαν σε κάθε στάδιο έχουν ως εξής: α) στάδιο αναδιοργάνωσης κυτταρικού πληθυσμού (repopulation): συμβαίνει περίπου κατά τους δύο πρώτους μήνες. Αρχικά αμέσως μετά την επέμβαση, το κέντρο του μοσχεύματος είναι ανάγγειο και περιέχει πολύ μικρό αριθμό ζώντων κυττάρων και επομένως και η σύνθεση κολλαγόνου είναι πολύ μικρή. Ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται κατά τη μετακίνηση από την περιφέρεια προς το κέντρο του μοσχεύματος. Στη συνέχεια το μόσχευμα περιτυλίγεται σε μια υμενική μεμβράνη και με τη διείσδυση αγγείων από την επιφάνεια του μοσχεύματος ξεκινά η νεοαγγειογένεση εντός της 3-8 εβδομάδας. Μέσω των νεοσχηματιζόμενων αγγείων εισέρχονται στο μόσχευμα ζωντανά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό αρχίζει να αυξάνεται ο αριθμός των ινοβλαστών, οι οποίοι μορφολογικά παρουσιάζουν ενεργό πυρήνα. Από τα ζωντανά κύτταρα απελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι μαζί με τις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται διεγείρουν στη συνέχεια την παραγωγή κολλαγόνου.

β) στάδιο ταχείας ανακατασκευής: συμβαίνει κατά τους επόμενους δέκα μήνες (2-12 μήνες μετεγχειρητικά). Στο στάδιο αυτό παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών και μυοβλαστών, οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα στον πυρήνα και συμβάλλουν στη σύνθεση κολλαγόνου και στο μετασχηματισμό του τενοντίου μοσχεύματος σε σύνδεσμο. Στο μόσχευμα παρατηρούνται περισσότερες εκφυλισμένες περιοχές και η νεοαγγειογένεση συνεχίζεται. Παράλληλα με τη σύνθεση του κολλαγόνου πραγματοποιείται και η μετατροπή των σταυροσυνδεδεμένων ινών κολλαγόνου (collagen crosslinks) από μειώσιμες (reducible) σε μη-μειώσιμες (nonreducible). Η διάταξη των ινών κολλαγόνου είναι τυχαία και το ποσοστό του ώριμου κολλαγόνου είναι μειωμένο.

γ) στάδιο ωρίμανσης: διαρκεί περίπου 2 χρόνια. Συμβαίνει μεταξύ του πρώτου και τρίτου χρόνου μετεγχειρητικά. Παρατηρείται βραδεία μείωση της δραστηριότητας

του πυρήνα των κυττάρων και ωρίμανση του στρώματος κολλαγόνου, με επιμήκη διάταξη των δεσμίδων ινών κολλαγόνου. Η ωρίμανση πραγματοποιείται από την περιφέρεια προς το κέντρο του μοσχεύματος.

Κατά την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος, οι ίνες κολλαγόνου βαθμιαία αναγεννώνται ξανά ²⁶⁻²⁸ συμβάλλοντας σε πιο σταθερή σύνδεση και προσκόλληση του τενοντίου μοσχεύματος στην επιφάνεια του οστικού τούνελ. Η διαδικασία της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος στο οστόν επιτυγχάνεται με το σχηματισμό κάθετων ινών κολλαγόνου, που ομοιάζουν με τις ίνες του Sharpey, στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες και στη συνέχεια με τη διείδυση ινοβλαστών, μυοβλαστών και χονδροβλαστών στο μόσχευμα ²⁹⁻³⁴. Μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, από τις 6 εβδομάδες ως 3 μήνες, επιτυγχάνεται οστεοποίηση εντός του τούνελ και καθώς συνεχίζεται η νεοαγγειογένεση τα λεία μυϊκά κύτταρα και οι χονδροβλάστες συμβάλλουν στη συνδεσμοποίηση του μοσχεύματος. Έχει βρεθεί ότι καθώς αυξάνονται οι ίνες κολλαγόνου στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος αυξάνεται και η δύναμη σύνδεσης του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ ^{28,35}.

Όταν επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ τότε διευκολύνεται και η διαδικασία μεταλλαγής του μοσχεύματος σε λειτουργικό σύνδεσμο. Έχει παρατηρηθεί ότι η στερεή σταθεροποίηση και η πλήρης επαφή του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ προκαλούν άμεση αντιφλεγμονώδη αντίδραση και βοηθούν την επούλωση συμβάλλοντας σε καλύτερη νεοαγγειογένεση και συνδεσμοποίηση του μοσχεύματος²⁹. Εξαιτίας της σταθερότητας αυτής, οι δυνάμεις συνάφειας που αναπτύσσονται επηρεάζουν διαρκώς το σχηματισμό των ινών κολλαγόνου στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος καθώς και τη διαδικασία ωρίμανσης του κολλαγόνου στο μόσχευμα.

1.2 Ευόδωση επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος

Η πολύπλοκη βιολογική διεργασία της συνδεσμοποίησης και της διαδικασίας ενσωμάτωσης του τενοντίου μοσχεύματος φαίνεται ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με τη χειρουργική τεχνική όσο και με τη

μετεγχειρητική αποκατάσταση. Έχει βρεθεί ότι παράγοντες, όπως ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης, μονής ή διπλής δεσμίδας αποκατάσταση, ο τύπος του μοσχεύματος, η τεχνική σταθεροποίησής του, το μηχανικό στρες/ μηχανική φόρτιση καθώς και η συμμόρφωση του ασθενούς με το πρωτόκολλο αποκατάστασης επηρεάζουν άμεσα την διαδικασία ωρίμανσης και ενσωμάτωσης του τενοντίου μοσχεύματος εντός του οστικού τούνελ^{36,37}.

Πειραματικές μελέτες σε μοριακό επίπεδο³⁸⁻⁴⁶ υποδεικνύουν ότι διάφορα μόρια, όπως αυξητικοί παράγοντες και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, παίζουν σημαντικό ρόλο στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος. Επίσης, η χρήση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) και του περιostίου, κατά την πλαστική ανακατασκευή του ΠΧΣ σε πειραματικές μελέτες^{47,48}, φαίνεται ότι ευοδώνουν την προσκόλληση του τενοντίου μοσχεύματος στην επιφάνεια του οστικού τούνελ επιταχύνοντας την ενσωμάτωση του μοσχεύματος.

Αυξητικοί παράγοντες όπως η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-2 (bone morphogenetic protein, BMP-2), ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor, TGF-β), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (insulin-like growth factor, IGF), η οστεοπροτεγερίνη (OPG) καθώς και πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η biglycan, φαίνεται ότι επηρεάζουν τη διαδικασία της συνδεσμοποίησης και πιθανότατα επιταχύνουν την ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ.

Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σε πειραματικές μελέτες ότι η δράση της BMP-2 επιταχύνει την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού – τενοντίου μοσχεύματος και αυξάνει τη συντονισμένη μέσω διέγερσης διαδικασία ενσωμάτωσης του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ ιδίως κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες μετεγχειρητικά³⁸⁻⁴⁰. Επιπλέον, έχει βρεθεί σε πειραματική μελέτη ότι και η εξωγενής χορήγηση της BMP-7 διεγείρει και επιταχύνει την ωρίμανση και ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος εντός του οστικού τούνελ⁴¹. Αυτή η δράση των BMPs στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος, φαίνεται ότι

επιτυγχάνεται μέσω του μονοπατιού της ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών, κυρίως Smad1, Smad4 και Smad5⁴².

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η αγγειογενετική πρωτεΐνη VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην νεοαγγειογένεση κατά τη διαδικασία της συνδεσμοποίησης, ιδίως στα πρώτα στάδια ⁴⁴. Παράλληλα, ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγων-2, (fibroblast growth factor-2,FGF-2)^{45,46} έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλει στην προσκόλληση του τενοντίου μοσχεύματος στην επιφάνεια του οστικού τούνελ και πιθανώς ευοδώνει την διαδικασία ωρίμανσης του μοσχεύματος επιταχύνοντας την παραγωγή ινών κολλαγόνου.

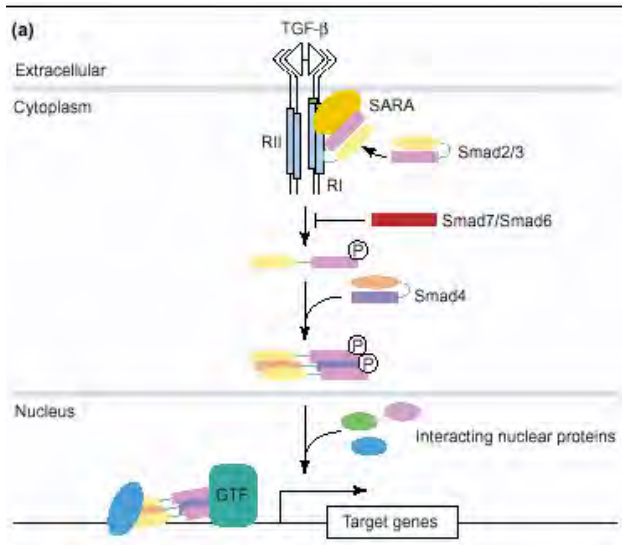
1.3 Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας- β₁ (TGF-β₁)

Η υποοικογένεια του αυξητικού παράγοντα TGF-β, ανήκει στην υπεροικογένεια των TGF-β πρωτεϊνών και αποτελούνται από ομοδιμερείς πρωτεΐνες μοριακού βάρους 25kDa. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν κυρίως ως ενδιάμεσοι τοπικοί μεσολαβητές συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, από τον έλεγχο της διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου ως τη ρύθμιση του σχηματισμού της εξωκυττάριας ουσίας ⁴⁹. Έχει βρεθεί ότι ο TGF-β συμμετέχει σε μονοπάτια απόπτωσης ⁵⁶⁻⁵⁸. Σε κυτταρικό επίπεδο ο ρόλος του TGF-β ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο και την κατάσταση του κυττάρου. Σε επίπεδο ιστών ο TGF-β επηρεάζει την επούλωση τραύματος μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και κατά συνέπεια ρύθμισης του επιπέδου mRNA, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας ⁵⁰.

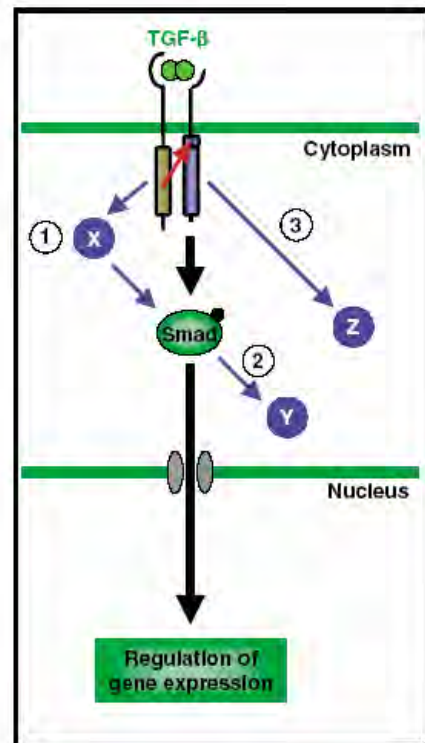
Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρία ισομερή του TGF-β τα οποία κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια ⁵¹ και φαίνεται από πειραματικές μελέτες ότι καθένα εμφανίζει διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά ⁴⁹. Τα τρία αυτά ισομερή TGF-β₁, TGF-β₂, TGF-β₃ παρουσιάζουν μεταξύ τους ομολογία κατά 70-80% και καθένα έχει διαφορετική συγγένεια δέσμευσης προς τους δύο τύπους υποδοχέων του TGF-β ⁵², οι οποίοι είναι υποδοχείς τύπου κινάσης σερίνης-θρεονίνης.

Ένας τρόπος μετάδοσης του σήματος του TGF-β στον πυρήνα του κυττάρου, για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, επιτυγχάνεται μέσω του μονοπατιού της ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών ⁵³⁻⁵⁵. Με τον τρόπο αυτό, ο TGF-β αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες στον πυρήνα και επάγεται η μεταγραφή των

γονιδίων στόχων (εικ. 2). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι ο TGF-β ασκεί τη δράση του και μέσω άλλων μονοπατιών εκτός του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών, γνωστά ως “non-Smad pathways” τα οποία βρίσκονται μέχρι σήμερα υπό μελέτη (εικ. 3)⁵⁶. Είναι φανερό ότι ο TGF-β μέσω και των δύο προαναφερόμενων οδών μεταγωγής σήματος αλληλεπιδρά και επηρεάζει πολλές κύριες βιοχημικές διεργασίες.



Εικόνα 2: TGF-β: Έλεγχος μεταγραφής γονιδίων μέσω του μονοπατιού Smad⁵³



Εικόνα 3: “Non- Smad μονοπάτια”. Το μονοπάτι των Smad ξεκινά με το σύμπλοκο σύνδεσης σήματος-υποδοχέα και καταλήγει στον πυρήνα, απεικονίζεται με τα μαύρα βέλη. Τα “non- Smad” μονοπάτια απεικονίζονται με τα μπλε βέλη και βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση⁵⁶.

Ο TGF-β₁ έχει παρατηρηθεί σε πειραματικές μελέτες^{59,60} ότι εμφανίζεται κατά το πρώιμο στάδιο της επούλωσης των συνδέσμων και της ανακατασκευής του ΠΧΣ. Σε *in vitro* μελέτες^{61,62} έχει βρεθεί ότι ο TGF-β₁ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και αυξάνει την σύνθεση κολλαγόνου από αυτά τα κύτταρα κατά την επούλωση των συνδέσμων. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο TGF-β₁ αυξάνει το μέγιστο φορτίο αντοχής του μοσχεύματος κατά την επούλωση ινώδους ιστού και ότι υποβοηθά την ενσωμάτωση των εμφυτευμάτων στο οστόν^{63,64}.

Παράλληλα τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες⁶⁵⁻⁶⁸ έχει βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση του TGF-β₁ επηρεάζει την σύνθεση κολλαγόνου, αυξάνοντας την έκφραση mRNA κυρίως κολλαγόνου τύπου I και τύπου III, καθώς και τη σύνθεση άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως οι πρωτεογλυκάνες από τους ινοβλάστες των συνδέσμων. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός εφαρμογής TGF-β και EGF βελτιώνει την διαδικασία της ωρίμανσης καθώς και τις εμβιομηχανικές ιδιότητες του τενοντίου μοσχεύματος κατά τη συνδεσμοποίηση⁶⁹. Αυτό πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω της καταστολής που προκαλούν αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες στη δραστηριότητα της κολλαγόνασης των νέων ινοβλαστών που διεισδύουν στο μόσχευμα κατά την συνδεσμοποίηση, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων του μοσχεύματος που παρατηρείται αρχικά μετά τη χειρουργική αποκατάσταση του ΠΧΣ.

Επιπλέον, ο Yamazaki και συν⁷⁰ έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση TGF-β₁ αυξάνει τη σύνθεση και την ωρίμανση των κάθετων ινών κολλαγόνου στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλοντας στην ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι ο TGF-β₁ δρα πρώιμα ως χημειοτακτικός παράγοντας διεγείροντας τη μετανάστευση και την ενεργοποίηση των αρχέγονων μεσεγγυματικών κυττάρων στον κοκκιωματώδη ιστό που σχηματίζεται στο διάστημα μεταξύ τενοντίου μοσχεύματος και οστού. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο TGF-β₁ συμβάλλει στο σχηματισμό νέου οστού από την επιφάνεια του οστικού τούνελ. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η δύναμη σύνδεσης (bonding strength) μεταξύ μοσχεύματος και οστικού τούνελ μετεγχειρητικά, κατά την τρίτη εβδομάδα από την αποκατάσταση του ΠΧΣ.

1.4 Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας- I (IGF-I)

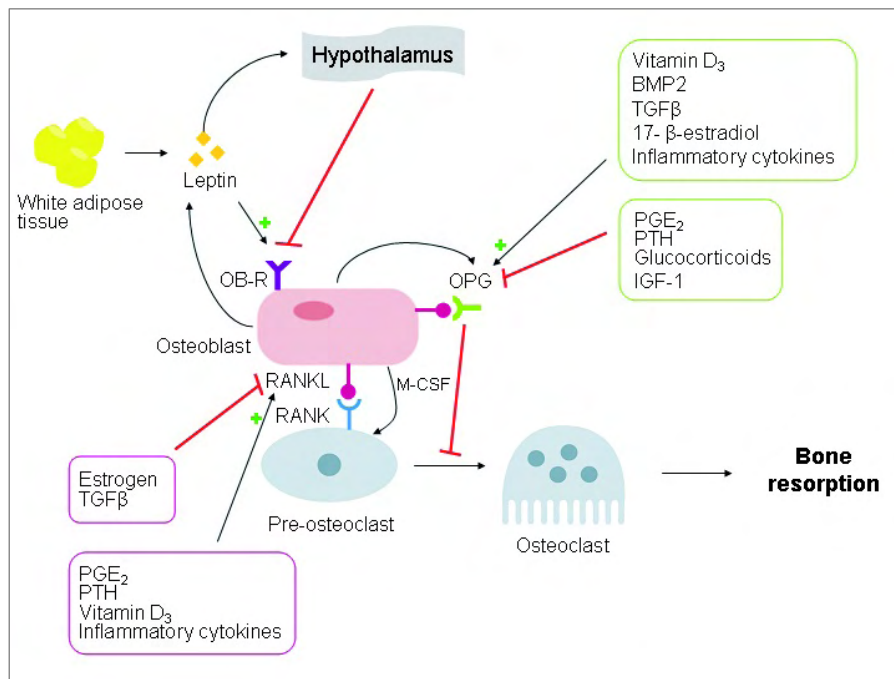
Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (IGF) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετού. Έχουν αναγνωρισθεί δύο IGFs, ο IGF-I και IGF-II. Έχει βρεθεί ότι ο IGF-I είναι ο πιο ισχυρός (πολυπεπτιδίο 70 αμινοξέων) παράλο που ο IGF-II είναι ο πιο άφθονος αυξητικός παράγοντας στα οστά. Οι IGFs συνδέονται με υποδοχείς τύπου τυροσίνης –κινάσης (IGFRs)⁷¹. Η σύνδεση του IGF-I με τον υποδοχέα IGF τύπου I (IGFIR) ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος, τα οποία προκαλούν μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων και επάγουν θετικά τη ρύθμιση της αναβολικής απάντησης στο κύτταρο⁷².

Το σύστημα του IGF, που περιλαμβάνει και ειδικές πρωτεΐνες που συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τον IGF-I, φαίνεται ότι συμμετέχει στην επουλωτική εξεργασία της πώρωσης^{73,74}, διεγείροντας κυρίως την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση, καθώς και στην επούλωση των τενόντων και των συνδέσμων. Έχει βρεθεί σε πειραματικές μελέτες με ζωικά μοντέλα ότι η έκφραση του IGF-I αυξάνεται κατά την πρώιμη φάση της επούλωσης των τενόντων, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ινοβλαστών συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου⁷⁵⁻⁷⁷. Σε πειραματικές μελέτες έχει καταδειχθεί ότι η εξωγενής χορήγηση IGF-I διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας βελτιώνοντας την επούλωση τενόντων και συνδέσμων⁷⁸⁻⁸⁰. Επιπλέον, φαίνεται ότι η συστηματική χορήγηση IGF-I ευοδώνει την επούλωση συνδέσμων μέσω αύξησης της παραγωγής κολλαγόνου⁸¹.

1.5 Άξονας RANKL / RANK/ OPG

Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) αποτελεί μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια των TNF (tumor necrosis factor) υποδοχέων. Πρόκειται για διαλυτό υποδοχέα που εκφράζεται και παράγεται από διάφορους ιστούς και κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των οστεοβλαστών. Συμμετέχει στη ρύθμιση της οστικής μάζας, οστική απορρόφηση και ανακατασκευή^{82,83} καθώς και στην επιβίωση των κυττάρων αλλά φαίνεται ότι ασκεί δράση και στην ανοσολογική απάντηση και στο κυκλοφορικό σύστημα. Η OPG λειτουργεί ως υποδοχέας «δόλωμα» (decoy receptor) και συνδέεται με το πρόσδεμα του υποδοχέα ενεργοποίησης του παράγοντα NFκB (Receptor

activator for nuclear factor κ B ligand – RANKL) αναστέλλοντας τη σύνδεση του RANKL με τον κανονικό του υποδοχέα RANK⁸⁴ (εικ. 4).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση δράσης OPG, RANK, RANKL στην ομοιοστασία οστικής μάζας (osteoblast: οστεοβλάστη, pre-osteoblast: προ-οστεοβλάστη, osteoclast: οστεοκλάστη, bone resorption: οστική άπορροφήση)

Το RANKL είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια των TNF πρωτεϊνών, εκφράζεται και παράγεται από κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών και ενδοθηλιακά κύτταρα. Το RANKL συνδέεται με τον υποδοχέα του RANK, ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των οστεοκλαστών καθώς και των πρόδρομων μορφών οστεοκλαστών και στα δενδριτικά κύτταρα⁸⁵. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, την επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης και την οστική απορρόφηση^{85,86}. Η σύνδεση της OPG με τον RANKL έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών και της οστεοκλαστογένεσης⁸⁶. Με τον τρόπο αυτό η OPG δρα ως ενδογενής ανταγωνιστικός υποδοχέας.

Ο άξονας RANKL/RANK/ OPG αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή στην ομοιοστασία της οστικής μάζας, σχηματισμό οστών και ανακατασκευή οστών⁸⁶. Η αναλογία έκφρασης RANKL και OPG παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης

οστεοκλαστών και στον κύκλο οστικής ανακατασκευής. Διαταραχές στην αναλογία έκφρασης μεταξύ RANKL και OPG φαίνεται ότι σχετίζονται με την παθογένεια διαφόρων μεταβολικών νοσημάτων και όγκων των οστών. Πειραματικές μελέτες με διαγονιδιακά ζώα έχουν καταδείξει ότι η υπερέκφραση της OPG οδηγεί σε οστεοπέτρωση ενώ η έλλειψή της σε οστεοπόρωση^{82,87}. Η OPG και το sRANKL (soluble RANKL- διαλυτή μορφή RANKL) βρίσκονται στην συστηματική κυκλοφορία του αίματος. Έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές ότι η ανίχνευση και μέτρηση της συγκέντρωσής τους μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την αξιολόγηση της ρύθμισης μεταβολισμού των οστών^{88,89}.

Σε πειραματικές μελέτες^{90,91} έχει βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση OPG στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλει στο σχηματισμό οστού γύρω από το τενόντιο μόσχευμα και βελτιώνει την ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ. Φαίνεται ότι η OPG μέσω αναστολής της οστεοκλαστογένεσης πιθανόν ευοδώνει την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος.

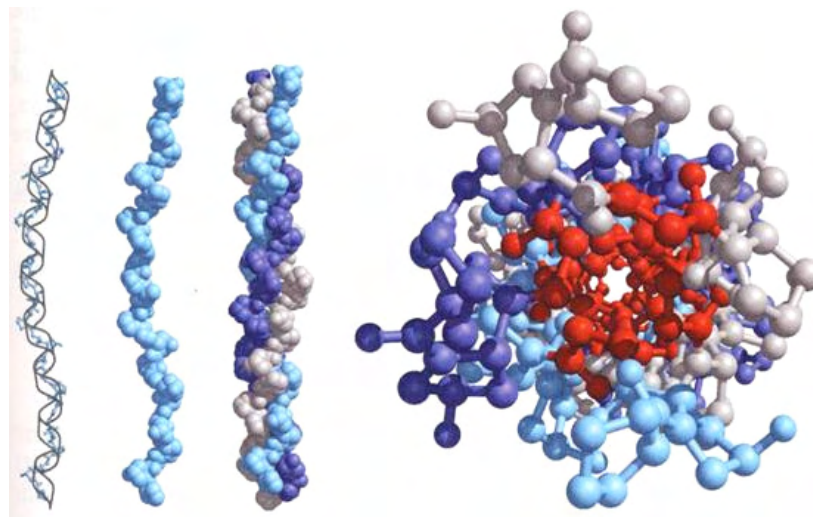
1.6 Κολλαγόνο και κολλαγόνο τύπου I

Το κολλαγόνο είναι μία οικογένεια γραμμικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των θηλαστικών και αποτελεί το ένα τέταρτο της συνολικής πρωτεΐνης του οργανισμού. Το κολλαγόνο αποτελεί το κύριο συστατικό των τενόντων και των συνδέσμων, αντιστοιχεί στο 65-80% του ξηρού βάρους τους.

Η βασική δομική μονάδα του κολλαγόνου είναι το τροποκολλαγόνο, το οποίο έχει μοριακή μάζα 285 kd περίπου και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες τύπου α ίδιου μεγέθους. Η αλληλουχία των αμινοξέων στο ώριμο κολλαγόνο παρουσιάζει μία ιδιαιτερότητα. Σχεδόν κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη και εμφανίζεται συχνά η αλληλουχία Gly-Pro-HyPro. Οι τρεις ελικοειδείς α αλυσίδες περιελίσσονται η μία γύρω από την άλλη δημιουργώντας ένα ινίδιο κολλαγόνου. Έτσι το μόριο του κολλαγόνου έχει επιμήκη, άκαμπτη δομή τριπλής έλικας⁹².

Το κολλαγόνο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε προλίνη και γλυκίνη και περιέχει υδροξυπρολίνη και υδροξυλισίνη, τροποποιημένα αμινοξέα που βρίσκονται σε πολύ λίγες άλλες πρωτεΐνες. Η προλίνη και η γλυκίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στο

σχηματισμό της τριπλής έλικας κολλαγόνου. Η γλυκίνη επειδή είναι το μικρότερο αμινοξύ (η πλευρική της αλυσίδα αποτελείται από ένα μόνο άτομο υδρογόνου) είναι το αμινοξύ που συναντάται κάθε τρία κατάλοιπα στην κεντρική περιοχή της α αλυσίδας στο εσωτερικό της τριπλής έλικας όπου υπάρχει πολύ λίγος χώρος. Η γλυκίνη με τον τρόπο αυτό επιτρέπει στις α αλυσίδες να πλησιάζουν τόσο κοντά η μία στην άλλη με αποτέλεσμα να στοιβάζονται στενά μεταξύ τους σχηματίζοντας το ώριμο υπερελικωμένο μόριο (εικ. 5).



Εικόνα 5: Δομή Κολλαγόνου. α) Δευτεροταγής δομή της α αλυσίδας κολλαγόνου. Εμφανίζεται συχνά η αλληλουχία Gly-Pro-HyPro. β) Μοντέλο πλήρωσης χώρου της ίδιας αλυσίδας. γ) Δεξιόστροφη περιελίκωση τριών α αλυσίδων (γκρι, γαλάζιο, μπλε). δ) Ώριμο υπερελικωμένο μόριο κολλαγόνου. Η γλυκίνη απεικονίζεται με κόκκινο και λόγω του μικρού μεγέθους της επιτρέπει στις α αλυσίδες να αλληλεπιδρούν στενά μεταξύ τους (από www.pdb.org).

Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί περίπου 25 διαφορετικές α αλυσίδες κολλαγόνου και κάθε μία κωδικοποιείται από ξεχωριστό γονίδιο. Σε διαφορετικούς ιστούς εκφράζονται διαφορετικοί συνδυασμοί αυτών των γονιδίων. Έχουν βρεθεί όμως μόνο 20 τύποι κολλαγόνου παρόλο που οι πιθανοί συνδυασμοί των 25 αυτών α αλυσίδων ξεπερνούν τους 10000 τύπους κολλαγόνου. Οι κυριότεροι τύποι κολλαγόνου που ανευρίσκονται στο συνδετικό ιστό είναι ο τύπος I, II, III, V, και XI (πίνακας 1).

Μελέτες σε ιστούς που συνθέτουν κολλαγόνο τύπου I δείχνουν ότι αυτοί οι ιστοί αυξάνουν την χρήση των μορίων tRNA^{Gly}, σε σχέση με αυτούς που δεν συνθέτουν^{93,94}. Τα αυξημένα επίπεδα του tRNA^{Gly} οφείλονται στην ποσοτική υπεροχή του αμινοξέος της

γλυκίνης (Gly) στο μόριο του κολλαγόνου τύπου I, αφού όπως προαναφέρθηκε αντιπροσωπεύει το ένα τρίτο των αμινοξέων στη τριπλή έλικα του κολλαγόνου. Υπάρχουν τέσσερα κωδικόνια ειδικά για το μόριο της γλυκίνης. Παρόλο αυτά, συγκρίσεις συχνότητας εμφάνισης των κωδικονίων γλυκίνης στα γονίδια μεταξύ κολλαγονούχων και μη κολλαγονούχων ιστών έδειξαν ότι στους μη κολλαγονούχους ιστούς τα κωδικόνια GGU και GGC αντιπροσωπεύουν το 62% των κωδικονίων γλυκίνης, ενώ στους ιστούς που συνθέτουν κολλαγόνο αντιπροσωπεύουν το 89%⁹⁵.

Το πρόδρομο μόριο του κολλαγόνου είναι το προκολλαγόνο (procollagen), το οποίο περιέχει επιπλέον αλληλουχίες πεπτιδίων, προπεπτίδια, τόσο στο αμινο-τελικό όσο και στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Τα προπεπτίδια του προκολλαγόνου διασπώνται έξω από το κύτταρο από ειδικές πεπτιδάσες (ειδική για κάθε τύπο κολλαγόνου) και με αυτόν τον τρόπο ο σχηματισμός των ινών κολλαγόνου γίνεται στον εξωκυττάριο χώρο κοντά στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα προπεπτίδια εμποδίζουν τη δημιουργία ανώριμων ινών και προάγουν τη δημιουργία τριπλής έλικας κολλαγόνου. Η ποσότητα των ελεύθερων προπεπτιδίων αντανακλά στοιχειομετρικά την ποσότητα του κολλαγόνου που συντίθεται.

Το κολλαγόνο είναι υπεύθυνο για τη λειτουργική ακεραιότητα και το δομικό πλαίσιο των τενόντων και των συνδέσμων. Αυτό οφείλεται στη μοναδική στερεοχημική δομή και την ικανότητα του κολλαγόνου να σχηματίζει ομοιοπολικούς ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς με σταυροσυνδέσμους (crosslinks). Οι σταυροσυνδεδεμένες ίνες κολλαγόνου (crosslinks collagen fibers) καθιστούν τους ιστούς αυτούς σταθερούς και προσδίδουν σε αυτούς μεγαλύτερη αντοχή στον εφελκυσμό (tensile strength) και ιξωδοελαστικότητα (viscoelasticity). Ωστόσο οι δύο αυτοί ιστοί έχουν διαφορετικό διάγραμμα έκλυσης λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Οι τένοντες περιέχουν σχετικά μεγάλο ποσό υδροξυλυσινορλευκίνης (Hydroxylysinoorleucine – HLNL) και μικρό ποσό διυδροξυλυσινορλευκίνης (dihydroxylysinoorleucine – DHNL) ενώ αντίθετα οι σύνδεσμοι περιέχουν μικρή ποσότητα HLNL και μεγάλη ποσότητα DHNL και έχουν υψηλότερο λόγο DHNL/HLNL σε σχέση με τους τένοντες⁹⁶.

Ο φυσιολογικός ΠΧΣ αποτελείται από δεσμίδες ινών κολλαγόνου κυρίως κολλαγόνου τύπου I και μικρότερη ποσότητα κολλαγόνου τύπου III^{97,98}. Κατά την επούλωση των συνδέσμων έχει παρατηρηθεί ότι στην πρώιμη φάση παράγεται μικρή

ποσότητα κολλαγόνου τύπου I και αυξάνεται η σύνθεση κυρίως του κολλαγόνου τύπου III. Στην τελική φάση της επούλωσης, κατά την ωρίμανση του κολλαγόνου, η αναλογία κολλαγόνου τύπου I και III επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα^{99, 100}.

Το κολλαγόνο υφίσταται αλλαγές τόσο στη συγκέντρωση καθώς και στις βιοχημικές ιδιότητές του κατά τη διαδικασία της συνδεσμοποίησης του τενοντίου μοσχεύματος στην ανακατασκευή του ΠΧΣ. Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στο συνολικό ποσό κολλαγόνου, στο λόγο DHNL/HLNL και αλληλομετατροπή του ποσοστού σταυροσυνδεδεμένων ινών κολλαγόνου κατά το μετασχηματισμό του μοσχεύματος. Σε πειραματική μελέτη¹⁴ έχει βρεθεί ότι το κολλαγόνο τύπου III, που φυσιολογικά δεν παρατηρείται στον τένοντα, εμφανίζει σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής του στο μόσχευμα κατά τη συνδεσμοποίηση και αποκτά τελικά συγκέντρωση όμοια με αυτή του ΠΧΣ.

Η σύνθεση του κολλαγόνου κατά τη συνδεσμοποίηση πιθανότατα διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες (κυρίως TGF-β₁) που απελευθερώνονται από τις ινοβλάστες καθώς και από τις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται συμβάλλοντας στην ωρίμανση του κολλαγόνου και την καλύτερη ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστόν.

Τύπος	Σύνθεση	Κατανομή
I	[α1(I)] ₂ α2(I)	δέρμα, οστά, τένοντες, σύνδεσμοι, κερατοειδής χιτώνας
II	[α1(II)] ₃	χόνδρος, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι, υαλώδες σώμα
III	[α1(III)] ₃	δέρμα, αιμοφόρα αγγεία, εσωτερικά όργανα
V	[α1(V)] ₂ α2(V) και α1(V)α2(V)α3(V)	όπως τύπος I
XI	α1(XI)α2(IX)α3(XI)	όπως τύπος II

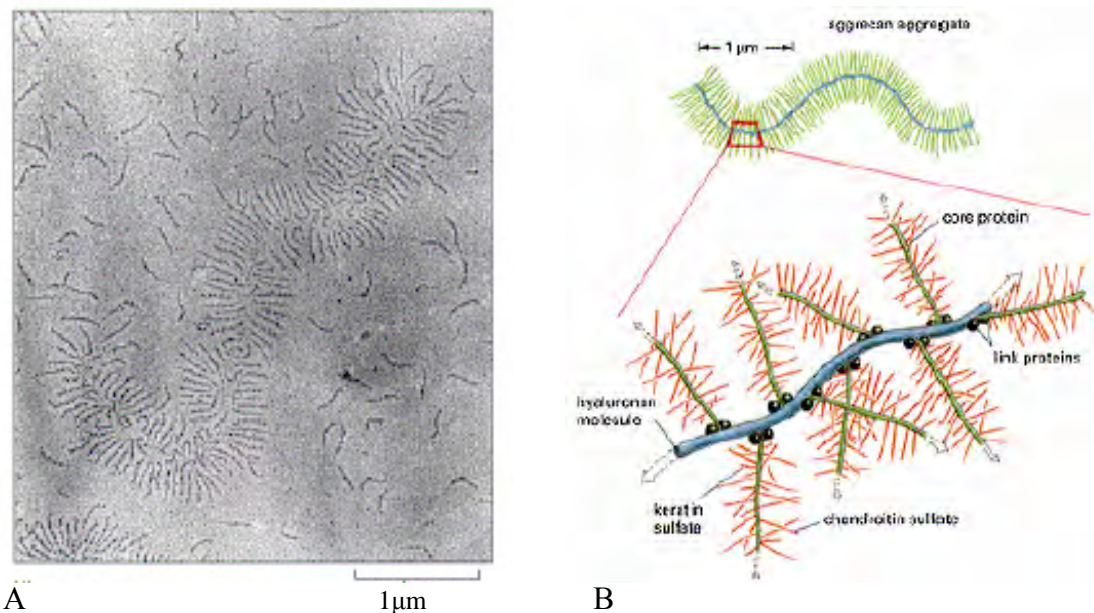
Πίνακας 1: Κυριότεροι τύποι κολλαγόνου

Σε *in vitro* καλλιέργειες ινοβλαστών ΠΧΣ έχει καταδειχθεί ότι τα επίπεδα του mRNA κολλαγόνου τύπου I και τύπου III μεταβάλλονται με το χρόνο κατά τη συνεχή δυναμική μηχανική διέγερση και παρατηρείται κυρίως αύξηση του mRNA του

κολλαγόνου τύπου I ¹⁰¹. Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη ¹⁰² σε καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών ΠΧΣ παρατηρήθηκε ότι η μηχανική κυκλοτερής διάταση αυξάνει την παραγωγή του TGF-β₁ από τις ινοβλάστες, ο οποίος πιθανώς μέσω ενός αυτοκρινή μηχανισμού διεγείρει στη συνέχεια την έκφραση mRNA του κολλαγόνου τύπου I καθώς και του τύπου III. Μέσω της οδού αυτής φαίνεται να επηρεάζεται η επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος.

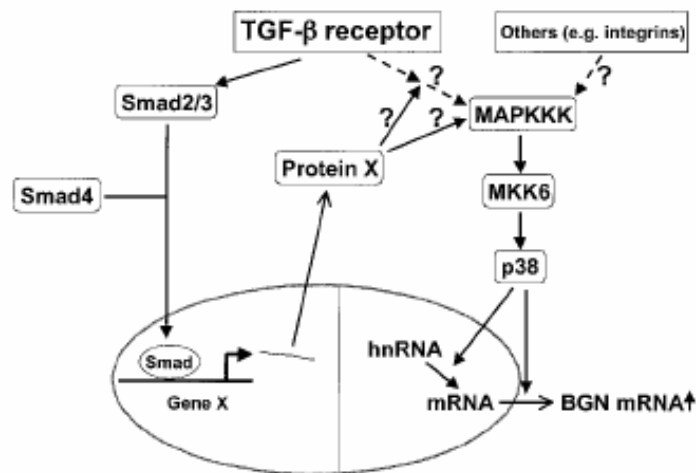
1.7 Πρωτεΐνη Biglycan

Η πρωτεΐνη biglycan ανήκει στην οικογένεια των μικρών πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας ουσίας του συνδετικού ιστού. Όπως όλες οι πρωτεογλυκάνες και η biglycan αποτελείται από πρωτεϊνικό πυρήνα (protein core) στον οποίο συνδέονται ομοιοπολικά γλυκοζαμινογλυκάνες (πολυμερή επαναλαμβανόμενων δυσασκαριτών) (εικ. 6). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με διάφορους σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες καθώς και με άλλες λειτουργικές πρωτεΐνες. Ο πρωτεϊνικός πυρήνας της biglycan είναι περίπου 35-40kDa και αποτελείται από χαρακτηριστικές επαναλήψεις 20-40 αμινοξέων πλούσιες σε λευκίνη ^{103,104}.



Εικόνα 6: Α. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συσσωματώματος πρωτεογλυκάνης aggrecan. Β. Σχηματικό διάγραμμα της εικόνας Α. Απεικονίζονται τα μονομερή πρωτεογλυκάνης διατεταγμένα σε κανονικά διαστήματα και στις δύο πλευρές ενός επιμήκους κεντρικού ινιδίου υαλουρονικού οξέος. (από Buckwalter J. and Rosenberg L. “Molecular Biology of the cell”, 4th ed GS 2002)

Η biglycan ανήκει στις πρωτεογλυκάνες που εκκρίνονται και συναντάται στους συνδέσμους μεταξύ των δεσμίδων κολλαγόνου και κυρίως κοντά στους ινοβλάστες^{107,108}. Επίσης, συμμετέχει στην οργάνωση και ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας, συμβάλλει στην προσκόλληση και μετανάστευση κυττάρων καθώς και στη ρύθμιση της δραστηριότητας των αυξητικών παραγόντων, προωθώντας με τον τρόπο αυτό στην επούλωση των ιστών. Η δράση της biglycan επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της με τις υπόλοιπες πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ουσίας (όπως η decorin) καθώς και μέσω της αλληλεπίδρασης ή σύνδεσής της με αυξητικούς παράγοντες^{107,108}, οι οποίοι με τον τρόπο αυτό προστατεύονται από μη-εξειδικευμένη πρωτεόλυση. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά την επούλωση των συνδέσμων ιδίως μετά από ρήξη ΠΧΣ αυξάνονται τα επίπεδα mRNA biglycan^{99,105}. Η αύξηση παρατηρείται κυρίως κατά τους δύο πρώτους μήνες μετά τον τραυματισμό και στη συνέχεια η έκφραση της biglycan μειώνεται και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 7: Προτεινόμενο μοντέλο επίδρασης TGF-β στην έκφραση της biglycan μέσω του μονοπατιού Smad πρωτεϊνών και p38. Ο TGF-β μέσω του μονοπατιού Smad πρωτεϊνών επάγει την έκφραση μίας άγνωστης μέχρι στιγμής πρωτεΐνης (πρωτεΐνη X, protein X), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την p38 μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών. Η ενεργοποίηση της p38 επάγει την έκφραση της biglycan (BGN), με αποτέλεσμα την αύξηση του mRNA της biglycan¹¹².

Σε *in vitro* μελέτες^{107,109} έχει καταδειχθεί ότι η biglycan αλληλεπιδρά και με τα τρία ισομερή του TGF-β μέσω του πρωτεϊνικού πυρήνα της. Φαίνεται ότι η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των συντηρημένων περιοχών του πρωτεϊνικού πυρήνα

και των επαναλαμβανόμενων περιοχών πλούσιων σε λευκίνη. Με τον τρόπο αυτό ο TGF-β τουλάχιστον *in vitro* επάγει την αύξηση της έκφρασης της biglycan από ινοβλάστες¹⁰⁹⁻¹¹¹ μέσω της ενεργοποίησης μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών (εικ. 7)¹¹².

Έχει βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση αυξητικών παραγόντων, ιδίως TGF-β₁ ευοδώνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας ουσίας από τους ινοβλάστες^{66,67}. Μάλιστα, η επίδραση των TGF-β και EGF αυξάνει τη σύνθεση κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών ιδίως biglycan στο τενόντιο μόσχευμα κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ⁶⁹. Αυτό φαίνεται ότι επηρεάζει το δίκτυο κολλαγόνου – πρωτεογλυκανών στο μόσχευμα συμβάλλοντας στην ωρίμανση του τενοντίου μοσχεύματος και την οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας με αποτέλεσμα την καλύτερη ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά τη διαδικασία της συνδεσμοποίησης.

2. Επουλωτική εξεργασία πόρωσης καταγμάτων

Η επουλωτική εξεργασία της πόρωσης είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό και μηχανικό φαινόμενο κατά το οποίο σταδιακά αποκαθίστανται οι δομικές, λειτουργικές και μηχανικές ιδιότητες του οστού. Η πολύπλοκη αυτή φυσιολογική διεργασία που οδηγεί σε αναγέννηση του οστού αποτελεί ιστολογικά μια πρόσκαιρη υποστροφή σε αναπτυξιακές βιολογικές λειτουργίες (ενδοχόνδρινη και ενδομεμβρανώδης οστεογένεση), με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της αιμάτωσης και της μηχανικής σταθερότητας στην περιοχή του κατάγματος.

Το είδος και η αποτελεσματικότητα του φαινομένου της πόρωσης εξαρτάται από τη διαταραχή του βιολογικού παράγοντα (αιμάτωση), από την κινητικότητα της περιοχής (μηχανική σταθερότητα), από το είδος του οστού που υπέστη το κάταγμα και από τη θεραπευτική αντιμετώπιση που εφαρμόζεται. Η πόρωση των καταγμάτων διαρκεί συνήθως από 3 έως 9 μήνες, ενώ δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις εμφάνισης επιπλοκών, όπως καθυστερημένων πωρώσεων και ψευδαρθρώσεων (6-10%). Υπολογίζεται ότι οι επιπλοκές αυτές συμβαίνουν περίπου στο 7% των καταγμάτων που συμβαίνουν ετησίως (4 εκατομμύρια) στην Ευρώπη και στο 10% (6 εκατομμύρια κατάγματα ετησίως) στις Η.Π.Α.^{113,114}.

2.1 Φυσιολογία της πώρωσης

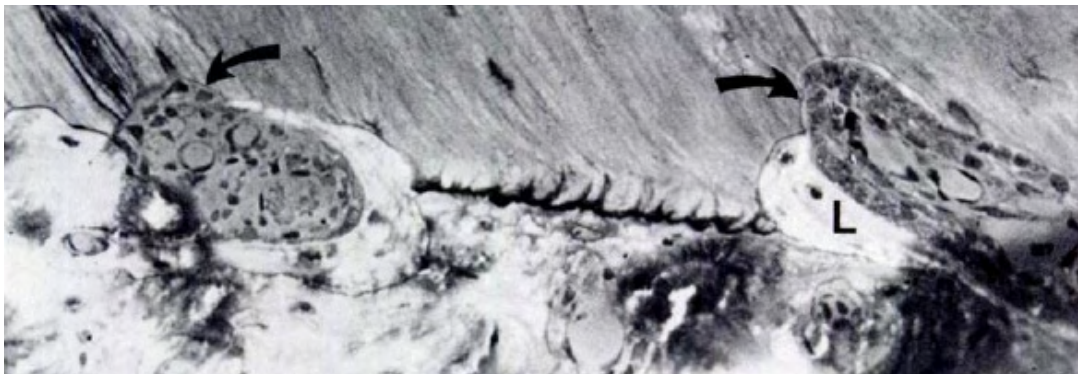
Μετά το κάταγμα ενός μακρού οστού, ακολουθεί μια σειρά κυτταρικών και μοριακών λειτουργιών με την οποία επιτυγχάνεται η επανένωση των κατεαγότων τμημάτων και επανασχηματίζεται η αρχική δομή και η λειτουργία του οστού. Η πολύπλοκη επουλωτική εξεργασία της πώρωσης συντίθεται από τις επιμέρους διεργασίες της βιολογικής απάντησης του μυελού των οστών, του φλοιού, του περιostίου και των γύρω μαλακών ιστών στην εστία του κατάγματος. Ανάλογα με τον τύπο, τη θέση και τη μέθοδο αντιμετώπισης του κατάγματος, μία ή περισσότερες από τις πιο πάνω αναφερόμενες περιοχές μπορεί να αντιδράσουν ταυτόχρονα. Έτσι στην πώρωση συμμετέχουν φλεγμονώδη κύτταρα, αγγειοβλάστες, ινοβλάστες, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες^{115,116} και κυρίως διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιostίου σε χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες¹¹³. Η επουλωτική εξεργασία της πώρωσης διακρίνεται ιστολογικά σε πρωτογενή και δευτερογενή πώρωση.

Η **πρωτογενής πώρωση** παρατηρείται σε περιπτώσεις που το κάταγμα αντιμετωπίζεται χειρουργικά με ανατομική ανάταξη και σταθερή οστεοσύνθεση (διακαταγματικές βίδες ή πλάκες συμπίεσης)^{115,117}. Από τη δεκαετία του '40 ήταν ήδη γνωστό ότι, εάν τα κατεαγότα άκρα βρίσκονται σε άμεση επαφή και κάτω από συνθήκες απόλυτης σταθερότητας στην περιοχή του κατάγματος, είναι δυνατό μετά από ένα λανθάνον χρονικό διάστημα, οστεώνες από το φλοιό να γεφυρώσουν τη γραμμή του κατάγματος. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μια ενδοστική συρραφή με οστεώνες.

Στην πρωτογενή πώρωση πρέπει ο φλοιός από τη μια πλευρά να πωρωθεί με το φλοιό της απέναντι πλευράς. Αρχικά στην εστία του κατάγματος παρατηρείται έντονη αγγειογένεση καθώς και διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες. Στην εστία του κατάγματος, τα νεκρά οστικά στοιχεία (το οστόν νεκρώνεται σε πάχος 2mm στα χείλη των κατεαγότων οστών), ασκούν τακτισμό στα τριχοειδή αγγεία της περιοχής. Το ενδοθήλιο των αγγείων αυτών μετατρέπεται σε οστεοκλάστες που φαγοκυτταρώνουν το νεκρό οστόν, επιτρέπουν τη διείσδυση των νέων αγγείων στην περιοχή και συμβάλλουν στη δημιουργία νέων Αβερσιανών συστημάτων (harvesian systems). Τα νέα αγγεία συνοδεύονται από ενδοθηλιακά και

περιαγγειακά μεσεγγυματικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τα πρόδρομα οστεογενετικά κύτταρα για το σχηματισμό οστεοβλαστών. Με τη διαδικασία αυτή σχηματίζονται μεμονωμένες μονάδες ανακατασκευής, γνωστές ως “cutting cones”^{115,116} (εικ. 8) που αποτελούνται από οστεοκλάστες και αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα, που διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες με τη σειρά τους παράγουν το οστεοειδές και μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα διαμορφώνοντας έτσι πεταλιώδες οστούν (ώριμο οστούν με κανονική διάταξη ινών κολλαγόνου και μετάλλωση) στην περιοχή της σταθερής οστεοσύνθεσης¹¹³.

Στην πραγματικότητα τα κατεαγότα άκρα δεν ευρίσκονται ποτέ σε πλήρη άμεση επαφή, ακόμα και μετά από χειρουργική ανατομική ανάταξη. Λόγω του ότι οι επιφάνειες είναι ανώμαλες, μετά από την ανάταξη υπάρχουν περιοχές άμεσης επαφής και περιοχές όπου μεταξύ των κατεαγότων άκρων υπάρχει κενό. Εάν αυτό το κενό δεν είναι μεγαλύτερο από 2mm περίπου, υπάρχει η δυνατότητα γεφύρωσης με οστεώνες, αφού πρώτα μεσολαβήσει ένα στάδιο αιματώματος και σχηματισμού οστεώνων παράλληλα προς την καταγματική γραμμή.



Εικόνα 8: Εικόνα μικροσκοπίου, όπου παρατηρούνται κωνικά ρήγματα ‘cutting cones’ (μαύρα βέλη) που δημιουργούνται από τους οστεοβλάστες-οστεοκλάστες στην πρωτογενή πώρωση¹¹⁶.

Η πρωτογενής πώρωση είναι βραδείας εξέλιξης και πραγματοποιείται χωρίς το σχηματισμό εξωτερικού πόρου, για το λόγο αυτό η μηχανική αντοχή της περιοχής του κατάγματος είναι για μεγάλο χρονικό διάστημα μειονεκτική και βασίζεται στη μηχανική επάρκεια των υλικών οστεοσύνθεσης.

Η δευτερογενής πώρωση χαρακτηρίζεται από την έντονη αντίδραση του περιostίου και των γύρω μαλακών ιστών. Επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό της

ενδομεμβρανώδους και ενδοχόνδριας οστεοποίησης και ακολουθεί διαδοχικά εξελεκτικές διαφοροποιήσεις που είναι τόσο ταχύτερες όσο μικρότερη είναι η ηλικία του πάσχοντος. Πρόκειται για διεργασία που εξελίσσεται κάτω από συνθήκες μη απόλυτης σταθερότητας. Αυτό συμβαίνει όταν μετά από συντηρητική ή χειρουργική αντιμετώπιση του κατάγματος (εφαρμογή γύψινου επιδέσμου, ενδομυελική ήλωση, εξωτερική οστεοσύνθεση, οστεοσύνθεση με πλάκα γεφύρωσης) εξακολουθεί να υπάρχει κάποιος βαθμός κίνησης στην περιοχή του κατάγματος.

Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση παρατηρείται κυρίως στην περιφέρεια της περιοχής του κατάγματος. Αρχικά περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων και ακολούθως τη διαφοροποίησή τους προς οστεοβλάστες. Οι ώριμοι οστεοβλάστες παράγουν το οστεοειδές, το οποίο στη συνέχεια μεταλλάσσεται/ασβεστοποιείται και καθώς οι οστεοβλάστες εμβυθίζονται μέσα στη νέα αποτιτανωμένη/ασβεστοποιημένη θεμέλιο οστική ουσία μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα. Μέσω της συνεχούς αυτής διαδικασίας σχηματίζεται νέο οστόν χωρίς να έχει προηγηθεί ο σχηματισμός χόνδρου^{115,119}.

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση παρατηρείται κυρίως στα γειτονικά σημεία της εστίας του κατάγματος και περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό χόνδρου, ο οποίος στη συνέχεια μεταλλάσσεται/ασβεστοποιείται, εκφυλίζεται και τελικά αντικαθίσταται από οστίτη ιστό^{115,119}.

Η πορεία της δευτερογενούς πώρωσης σε ένα κάταγμα μακρού υαλοειδούς οστού μπορεί να αναλυθεί στα ακόλουθα στάδια-φάσεις^{115,120}:

Στάδιο 1 (αιμάτωμα). Το κάταγμα συνοδεύεται από ρήξη των γειτονικών αγγείων του οστού και του περιosteού και εκτεταμένη τοπική αιμορραγία, η οποία σύντομα τερματίζεται μετά από το σχηματισμό θρόμβων (αιμάτωμα κατάγματος). Λόγω της πλούσιας αιμάτωσης, το αιμάτωμα που δημιουργείται είναι σχετικά μεγάλο. Ακολουθεί άσηπτη φλεγμονώδης αντίδραση στην περιοχή εξαιτίας της διαταραγμένης κυκλοφορίας του αίματος τοπικά, με αποτέλεσμα τη νέκρωση των γειτονικών οστικών κυττάρων, διευρύνοντας το κενό του κατάγματος. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται από έξοδο πλάσματος από τα διευρυσμένα αγγεία, μετανάστευση λευκών αιμοσφαιρίων και μακροφάγων ιστιοκυττάρων (χημειοταξία).

Στάδιο 2 (μαλακός πόρος). Το αιμάτωμα του κατάγματος λειτουργεί ως πηγή μοριακών σημάτων τα οποία προκαλούν την έναρξη ενός καταρράκτη κυτταρικών γεγονότων. Έτσι ξεκινά η μιτογενετική δραστηριότητα της οστεοβλαστικής στιβάδας του περιostίου, μέσω των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα κύτταρα του περιostίου και του ενδοστίου τα οποία ήταν αρχικά ανενεργά, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και τα θυγατρικά τους κύτταρα μεταναστεύουν στη μεριά του κατάγματος. Στο σημείο αυτό αρχίζουν να δημιουργούνται δύο δακτύλιοι πόρου οι οποίοι επεκτεινόμενοι σε πλάτος τείνουν να ενωθούν. Ο εξωτερικός πόρος είναι ένας μαλακός ιστός χόνδρου και οστού που περικλείει το οστόν στο επίπεδο του κατάγματος. Ταυτόχρονα, αρχίζει και ο σχηματισμός του λεγόμενου εσωτερικού πόρου μέσα στη μυελική κοιλότητα στο σημείο του κατάγματος. Στο κέντρο του εξωτερικού πόρου, τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα και παράγουν χονδρικό ιστό. Στο κάθε άκρο του πόρου τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και αρχίζουν να γεφυρώνουν το χάσμα μεταξύ των κατεαγών άκρων (εικ. 9).

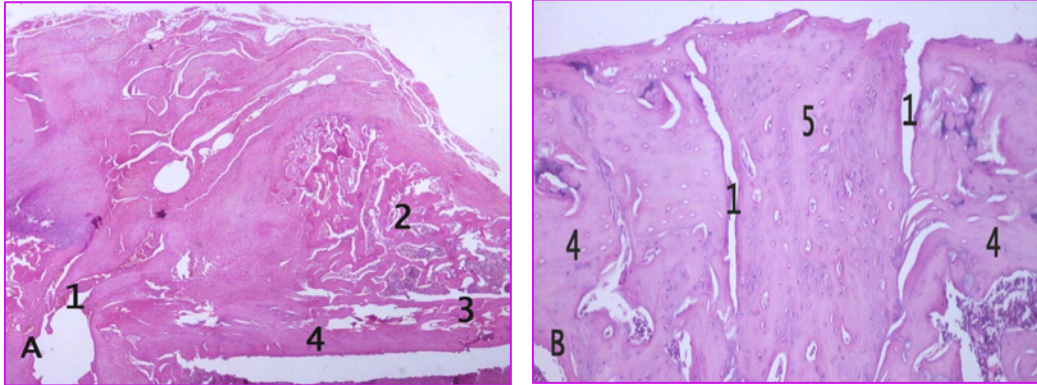


Εικόνα 9: Ιστολογική εικόνα πώρωσης κατάγματος πλευράς ποντικού ¹²¹.

1: περιοχή κατάγματος, 2: νεοσχηματιζόμενο οστόν από περίostιο, 3: εξωτερικός πόρος, 4: προυπάρχων φυσιολογικός φλοιός

Στάδιο 3 (σκληρός πόρος). Καθώς η πώρωση συνεχίζεται, μετά την διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροβλάστες και χονδροκύτταρα ο μαλακός πόρος σκληρύνεται. Ακολουθεί μετάλλωση της μεσοκυτταρίου ουσίας και ωρίμανση των χονδροκυττάρων που οδηγεί στην εκφύλισή τους και τελικά οι οστεοβλάστες αντικαθιστούν τον χόνδρο με σπογγώδες οστόν. Μόλις

αυτή η διαδικασία ολοκληρωθεί, ο εσωτερικός και εξωτερικός πόρος παρέχουν μια μηχανική ευστάθεια στο κάταγμα και το σπογγώδες οστό ενώνει σταθερά τα κατεαγότα άκρα (εικ. 10).



Εικόνα 10: Ιστολογική απεικόνιση διαδικασίας οστικής επούλωσης σε ποντίκι: Α) πόρωση σε 2 εβδομάδες, Β) πόρωση σε 4 εβδομάδες, διακρίνονται 1: περιοχή κατάγματος, 2: νεοσχηματιζόμενο οστόν από περίοστεο, 3: εξωτερικός πόρος, 4: προυπάρχων φυσιολογικός φλοιός, 5: ώριμο σχηματιζόμενο οστόν

Στάδιο 4 (ανακατασκευή): Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής ελέγχεται από μεταβολικά και ορμονικά ερεθίσματα. Καθώς συνεχίζονται οι κυτταρικές εξεργασίες της ωρίμανσης του οστικού πόρου, οι οστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες ξεκινούν τη διαδικασία της ανακατασκευής του οστού (remodeling), η οποία μπορεί να διαρκέσει μερικά χρόνια.

Αρχικά ενεργοποιούνται τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες, που με τη μορφή των πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων προκαλούν τη φαγοκυττάρωση του νεκρού οστού. Ακολουθεί η φάση της αναστροφής κατά την οποία εξαφανίζονται οι οστεοκλάστες και εμφανίζονται κύτταρα που προσομοιάζουν με τα μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά πιθανόν εκλύουν παράγοντες που αναστέλλουν τη λειτουργία των οστεοκλαστών ενώ διεγείρουν την παραγωγή οστεοβλαστών. Τελικά οι ώριμοι οστεοβλάστες συμβάλλουν στην παραγωγή νέου οστού. Όταν η ανακατασκευή ολοκληρωθεί, το άναρχα δομημένο σπογγώδες οστόν έχει πλήρως αντικατασταθεί από συμπαγές οστόν. Η θεραπεία μπορεί να είναι πλήρης και το οστόν υγιές όπως ήταν πριν το κάταγμα ή να είναι

ελαφρώς πιο πλατύ και δυνατό από μηχανική άποψη στην περιοχή που είχε δημιουργηθεί το κάταγμα.

Η επουλωτική εξεργασία της πάρωσης επομένως επιτυγχάνεται μέσω μιας καλά συντονισμένης διαδικασίας πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης ποικίλων κυτταρικών σειρών, η οποία ρυθμίζεται και επηρεάζεται από την επίδραση ποικίλων αυξητικών παραγόντων και το μηχανισμό της απόπτωσης.

2.2 Βιολογία της πάρωσης

Η συνεχιζόμενη έρευνα στην επουλωτική εξεργασία της πάρωσης συμβάλλει στην κατανόηση περαιτέρω των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στο πολύπλοκο αυτό φαινόμενο της πάρωσης. Τα προαναφερθέντα στάδια της πάρωσης σε ιστολογικό επίπεδο φαίνεται ότι εξελίσσονται σε τρεις φάσεις σε κυτταρικό επίπεδο, τη φλεγμονώδη φάση (inflammation, 6-10^η ημέρα μετά το κάταγμα), φάση επιδιόρθωσης- αναγέννησης (repair and regeneration, 6 ως τη 12^η εβδομάδα) και τη φάση της ανακατασκευής (remodeling, πρώιμη έναρξη αλλά κυρίως ξεκινά μετά τη 12^η εβδομάδα και μπορεί να διαρκεί ως και 2-3 έτη).

Σε μοριακό επίπεδο, η επουλωτική εξεργασία της πάρωσης ρυθμίζεται μέσω τοπικών και συστηματικών παραγόντων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, παράγοντες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση κυττάρων, ορμόνες, κυτοκίνες καθώς και στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας, οι οποίοι αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με διάφορους τύπους κυττάρων (πρόδρομες μορφές χονδροκυττάρων και οστεοκυττάρων). Έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον δεκαοκτώ διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην επουλωτική εξεργασία της πάρωσης των καταγμάτων¹³¹. Η ρύθμιση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της δράσης των αυξητικών παραγόντων, κυριότεροι των οποίων είναι οι BMPs, ο TGF-β, ο FGF, ο αυξητικός παράγοντας από αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor – PDGF), ο VEGF και ο IGF. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στα αρχέγονα μεσεγχοματικά κύτταρα της οστεοβλαστικής στιβάδας του περιostίου ασκώντας συνεργικές και ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις σε έναν καταρράκτη βιολογικών φαινομένων κατά τις διάφορες φάσεις της πάρωσης.

Κατά την πρώιμη φλεγμονώδη φάση της πάρωσης απελευθερώνονται τοπικά παράγοντες όπως κυτοκίνες (ιντερλευκίνη IL-1, IL-6), προσταγλανδίνες (PGE-2),

θρομβίνη, αιμοπετάλια, παράγοντες που σχετίζονται με τα αιμοπετάλια προκειμένου να προαχθεί αντιφλεγμονώδης απάντηση. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από την θρομβίνη και το υπενδοθηλιακό κολλαγόνο και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους καθώς και μικρά μεμβρανικά κυστίδια, τα μικροσωματίδια (microparticles) στο σχηματιζόμενο αιμάτωμα^{122,123}. Με τον τρόπο αυτό αυξάνονται τοπικά οι παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια (platelet-release factors), μερικοί από τους οποίους διεγείρουν το σχηματισμό των αγγείων¹²⁴, την προσέλκυση των μονοκυττάρων/ μακροφάγων και την συνάθροιση και άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή του κατάγματος¹²⁵. Παράλληλα, τα μακροφάγα με τη σειρά τους εκκρίνουν και αυτά ενεργούς βιολογικούς παράγοντες (πρωτεολυτικά ένζυμα, μεταλλο-πρωτεΐνάσες, αυξητικοί παράγοντες) που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων^{126,127}.

Ο VEGF είναι ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας¹²⁸. Κατά το πρώιμο στάδιο της πώρωσης στρατολογεί στο σημείο του κατάγματος ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω χημειοταξίας. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους και με τη συμμετοχή των BMPs προάγει την αγγειογένεση¹²⁹. Επηρεάζει τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε υπερτροφικά χονδροκύτταρα και σε οστεοβλάστες. Κατά το στάδιο της ανακατασκευής στρατολογεί οστεοκλάστες και οστεοβλάστες μέσω χημειοταξίας. Διεγείρει κυρίως τη μετάλλωση του οστεοειδούς που παράγεται από τους οστεοβλάστες προάγοντας την οστεογένεση¹²⁹.

Ο TGF-β απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια στην περιοχή του κατάγματος και έχει πλειοτροπική λειτουργία. Ασκεί μιτογενετική δράση αρχικά στα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα της οστεοβλαστικής στιβάδας του περιοστέου και προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους και τη διαφοροποίηση προς οστεοβλάστες και αργότερα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και προάγει την ενδοχόνδρια οστεοποίηση^{136,137}. Ο TGF-β1 ρυθμίζει τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών¹³⁷.

Η διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιοστέου σε οστεοβλάστες ρυθμίζεται και από την κυκλοοξυγενάση -2 (COX-2)¹³⁰. Στη φλεγμονώδη φάση της πώρωσης η COX-2 αυξάνει τοπικά την παραγωγή της προσταγλανδίνης PGE-2, η οποία στη συνέχεια διεγείρει τις BMPs. Οι BMPs μόνες ή και σε συνεργασία με την

PGE-2 επάγουν την παραγωγή των μεταγραφικών παραγόντων, όπως Runx2/cbfa1 και Osx, συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιostίου σε προ-οστεοβλάστες και στη συνέχεια σε ώριμες οστεοβλάστες.

Οι BMPs αποτελούν μάλλον τους κυριότερους ρυθμιστές της οστικής επούλωσης διεγείροντας, την διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιostίου σε χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες. Ο πρώτος που εισήγαγε την ύπαρξη των BMPs ήταν ο Marshall R. Urist το 1965 καθώς παρατήρησε το σχηματισμό έκτοπου οστίτη ιστού κατά την εμφύτευση μη αποτιτανωμένης θεμέλιας ουσίας σε μυς ποντικού¹³². Είναι γνωστό ότι οι BMP-2, BMP-4 και BMP-7 διεγείρουν τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε πρόδρομες μορφές χονδροκυττάρων και σε προ-οστεοβλάστες¹³³. Οι BMP-2, BMP-6 και BMP-9 είναι οι πιο ισχυροί παράγοντες^{134,135} που διεγείρουν την διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε προ-οστεοβλάστες και στη συνέχεια σε ώριμους οστεοβλάστες. Οι υπόλοιπες BMPs φαίνεται ότι διεγείρουν την οστεογένεση των ώριμων οστεοβλαστών.

Στον καταρράκτη των κυτταρικών γεγονότων που συμβαίνουν στην επουλωτική εξεργασία της πώρωσης σημαντικό ρόλο παίζει και η αντίδραση των οστεοκυττάρων. Τα οστεοκύτταρα, που βρίσκονται εμβυθισμένα μέσα στην αποτιτανωμένη/ασβεστοποιημένη θεμέλιο οστική ουσία, πιστεύεται ότι είναι μηχανοευαίσθητα και μπορούν να μετατρέψουν τις μεταβολές του μηχανικού περιβάλλοντος σε σήματα ρυθμίζοντας την οστική ανακατασκευή. Τα οστεοκύτταρα φυσιολογικά παράγουν την πρωτεΐνη σκληροστίνη (sclerostin- SOST)¹³⁸ η οποία ανταγωνίζεται τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες για τη σύνδεση με τον υποδοχέα BMPs. Με τον τρόπο αυτό η σκληροστίνη αποκλείει το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs με αποτέλεσμα αναστέλλεται η διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα, μειώνεται ο σχηματισμός οστού και ρυθμίζεται η οστική ανακατασκευή.

Η επουλωτική εξεργασία της πώρωσης όμως επί νεκρού οστού με νεκρά οστεοκύτταρα, που δεν παράγουν σκληροστίνη, μπορεί να εξελιχθεί χάρις στο περίοστεο που καλύπτει το νεκρό φλοιώδες οστόν αφού δεν αναστέλλεται το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs. Η ανεμπόδιστη δράση των BMPs διεγείρει τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα και τελικά σε οστεοκύτταρα. Τα

οστεοκύτταρα λοιπόν συμμετέχουν στην έναρξη της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης και μπορεί να επηρεάζουν και την μετά-διαφοροποίηση των οστεοβλαστών του περιostίου.

Κατά τη διάρκεια της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης, πρωτεογλυκάνες εκκρίνονται στη μεσοκυττάρια ουσία του πώρου ιδιαίτερα τις δυο πρώτες εβδομάδες. Την τρίτη εβδομάδα, η ποσότητα των πρωτεογλυκανών και των συμπλόκων τους μειώνεται και αρχίζει η επιμετάλλωση του πώρου. Κολλαγενάση, ζελατινάση και στρωματολυσίνη είναι ένζυμα τα οποία αποσπών συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας προετοιμάζοντας την επασβέστωση του πώρου.

Αφθονη παραγωγή κολλαγόνου τύπου II παρατηρείται περίπου 9 ημέρες μετά το κάταγμα από τα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα στο μαλακό πώρο και στο περίostιο. Τη 14^η ημέρα μετά το κάταγμα μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα του mRNA κολλαγόνου τύπου II στα χονδροκύτταρα, ακολουθεί υπερτροφία όλων σχεδόν των χονδροκυττάρων και στη συνέχεια τερματίζεται η παραγωγή χόνδρου και ξεκινά η προετοιμασία της μεσοκυττάριας ουσίας για τη μετάλλωσή της. Αυτό επιτυγχάνεται με ελάττωση των πρωτεογλυκανών μέσω των ενζύμων που απελευθερώνονται στη μεσοκυττάρια ουσία από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα (και αργότερα οι οστεοβλάστες), που περιέχουν στη μεμβράνη τους κυστικά σωματίδια με ουδέτερες πρωτεάσες και αλκαλική φωσφατάση¹³⁹.

Η συγκέντρωση της αλκαλικής φωσφατάσης κορυφώνεται τη 17^η ημέρα μετά από το κάταγμα, ενώ παράλληλα τα κύτταρα του πώρου αρχίζουν να παράγουν κολλαγόνο τύπου I, το πρόεχον κολλαγόνο του οστίτη ιστού, διατασσόμενα έτσι, που να αφήνουν μεταξύ τους διαστήματα (hole zones) για την εναπόθεση των αλάτων ασβεστίου¹⁴⁰. Τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα που περικλείονται από ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία, υφίστανται κυτταροπλασματική εκφύλιση, μέσω απόπτωσης¹⁴¹ και αντικαθίστανται από οστεοβλάστες.

Σημαντικό ρόλο στη διεργασία της πώρωσης παίζουν και οι τύποι κολλαγόνου III, V και XI. Κολλαγόνο τύπου III, το οποίο παράγεται από ινοβλάστες, ανευρίσκεται κατά μήκος της επιφάνειας του περιostίου παίζοντας το ρόλο υποστρώματος για την εγκατάσταση των προγονικών οστεοπαραγωγών κυττάρων και την ανάπτυξη των νεοσχηματισθέντων τριχοειδών. Οι τύποι κολλαγόνου V και XI, όπως έχει προταθεί,

ρυθμίζουν την παραγωγή και τον προσανατολισμό του κολλαγόνου I και II ^{142,143}. Επίσης, κολλαγόνο τύπου IX έχει εντοπιστεί στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου τύπου II και πιστεύεται ότι συνεισφέρει στη μηχανική σταθερότητα του πλαισίου που συγκροτούν τα ινίδια αυτά.

Επίσης, στην επουλωτική εξεργασία της πάρωσης εμπλέκονται και τρεις πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας, η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και η οστεοποντίνη. Η οστεοκαλσίνη είναι μια ειδική για τα οστά, εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K πρωτεΐνη, η οποία περιέχει πλευρικές αλύσους που επιτρέπουν τη σύνδεση ιόντων ασβεστίου και μορίων υδροξυαπατίτη. Παράγεται από τους οστεοβλάστες στον υποπεριοστικά σχηματιζόμενο από ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση πάρο. Εμφανίζεται μεταξύ της 9^{ης} και 11^{ης} ημέρας μετά από το κάταγμα και η συγκέντρωσή της κορυφώνεται περίπου τη 15^η ημέρα. Η οστεονεκτίνη εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια τόσο της ενδομεμβρανώδους, όσο και της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης. Η οστεοποντίνη είναι γνωστή για το ρόλο της στη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων και ανιχνεύεται στα οστεοκύτταρα όπως και στα προγονικά οστεοπαραγωγά κύτταρα του σκληρού πάρου που σχηματίζεται υποπεριοστικά. Αυτή η πρωτεΐνη είναι επίσης γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την CD44 γλυκοπρωτεΐνη της επιφάνειας των πολυδύναμων κυττάρων, η οποία συνδέεται με το υαλουρονικό οξύ, το κολλαγόνο τύπου I και τη φιβρονεκτίνη.

Ο μηχανισμός της απόπτωσης, δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ολόκληρης της επουλωτικής εξεργασίας της πάρωσης τόσο κατά την ενδομεμβρανώδη όσο και κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση¹⁴⁴. Η απομάκρυνση των χονδροκυττάρων κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της απόπτωσης και φαίνεται ότι σε αυτό μεσολαβεί και το γονίδιο c-fos. Οι οστεοβλάστες κατά την πάρωση, απομακρύνονται μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης, ο οποίος διεγείρεται από την ιντερλευκίνη IL-1β. Έχει βρεθεί ότι η IL-1β και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου TNF-α (tumor necrosis factor-alpha) ρυθμίζουν τον αριθμό των οστεοβλαστών μέσω του Fas αποπτωτικού μηχανισμού¹⁴⁵. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού των οστεοβλαστών κατά την επουλωτική εξεργασία της πάρωσης παίζει και ο άξονας RANKL/RANK/OPG στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση και κυρίως στη φάση της οστικής ανακατασκευής ¹⁴⁶.

2.3 Εμβιομηχανική της πόρωσης

Κατά την επουλωτική εξεργασία της πόρωσης των κατάγματων αποκαθίστανται σταδιακά και οι μηχανικές ιδιότητες του οστού. Οι μηχανικές ιδιότητες ενός κατάγματος, στο οποίο η πόρωση βρίσκεται σε εξέλιξη, εξαρτώνται από την υφή και τη γεωμετρία του πόρου. Η αποκατάσταση της αντοχής (strength) και της ακαμψίας (stiffness) εξαρτώνται από την ποσότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού, το οποίο γεφυρώνει το κενό μεταξύ των κατεαγόντων άκρων. Η σκληρότητα (hardness) του πόρου σχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητά του σε ασβέστιο¹⁴⁷. Έχει βρεθεί ότι η αντοχή σε διάταση στην περιοχή του κατάγματος είναι ανάλογη με το λόγο πόρος/φλοιώδες οστού (εικ. 11) τόσο κατά το σχηματισμό όσο και κατά την εξέλιξη ωρίμανσης του πόρου¹⁴⁸.

Ο White και συν¹⁴⁹ διεκρίνε σε πειραματική μελέτη την εμβιομηχανική διαδικασία της πόρωσης, τη μεταβολή του πόρου από την ελαστική, χαμηλής ακαμψίας μορφή, στη μορφή του σκληρού ιστού με την ανάλογη “δραστική” ελαστικότητα σε τέσσερα στάδια τα οποία εξελίσσονται σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα.

Στο **1^ο στάδιο** πραγματοποιείται το γεφύρωμα του κενού μεταξύ των κατεαγόντων άκρων από μαλακό ιστό. Στο στάδιο αυτό παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα ακαμψίας, το κάταγμα εμφανίζει ελαστικού τύπου συμπεριφορά και χαρακτηρίζεται από μεγάλες γωνίες εκτροπής, που αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές της ροπής στρέψης. Το οστούν υφίσταται θραύση στην περιοχή του κατάγματος κατόπιν μικρής φόρτισης.



Εικόνα 11: Αντοχή στη θραύση του πόρου μετά από διάταση¹⁴⁸.

Στο **2^ο στάδιο** παρατηρείται απότομη αύξηση της ακαμψίας, η οποία πλησιάζει αυτή του άθικτου φλοιώδους οστού. Στο στάδιο αυτό η θραύση του οστού στην περιοχή του κατάγματος εμφανίζεται σε χαμηλά επίπεδα φόρτισης.

Στο 3^ο στάδιο η ακαμψία είναι παρόμοια με αυτή του φλοιώδους οστού. Παρατηρείται μερική θραύση του οστού στην περιοχή του κατάγματος κάτω όμως από τη φυσιολογική του αντοχή.

Στο 4^ο στάδιο, η ακαμψία και η αντοχή του οστού είναι ίδιες με αυτές του άθικτου οστού. Το τελικό αυτό στάδιο επιτυγχάνεται όταν η περιοχή της θραύσης δεν σχετίζεται με την περιοχή του κατάγματος.

Η μορφολογία του πόρου επηρεάζεται σε όλα τα στάδια της πόρωσης από μηχανικούς παράγοντες που έχουν άμεση σχέση με το βαθμό της διακαταγματικής κίνησης (interfragmentary motion), το μέγεθος του κενού μεταξύ των κατεαγόντων άκρων (fracture gap)¹⁵⁰ και του τύπου των μηχανικών φορτίων¹⁵¹. Οι διάφορες μέθοδοι θεραπευτικής αντιμετώπισης ενός κατάγματος (ακινητοποίηση σε γύψο, εσωτερική ή εξωτερική οστεοσύνθεση) οδηγούν τα κατεαγόντα οστικά τεμάχια σε άλλοτε άλλο βαθμό κίνησης υπό συνθήκες φόρτισης. Η ελεγχόμενη φόρτιση φαίνεται ότι επιδρά θετικά στην πορεία της πόρωσης¹⁵². Βέβαια, έχει παρατηρηθεί ότι ανάλογα με τον τύπο των μηχανικών φορτίων παράγονται διαφορετικά είδη ιστού. Έτσι, στα αρχικά στάδια της πόρωσης η χαμηλή πίεση του οξυγόνου και οι διακοπτόμενες συμπιεστικές δυνάμεις έχουν θετικό αποτέλεσμα στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροβλάστες με αποτέλεσμα το σχηματισμό χόνδρου, ενώ η υψηλή πίεση οξυγόνου και οι διατμητικές δυνάμεις οδηγούν σε δημιουργία ινώδους ιστού¹⁵¹.

Φαίνεται λοιπόν ότι η φύση της κυτταρικής απάντησης στην περιοχή του κατάγματος σχετίζεται άμεσα από το μηχανικό περιβάλλον που επικρατεί στην ίδια περιοχή. Ωστόσο, δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμη πλήρως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ εμβιομηχανικής και βιολογίας που καθορίζουν την επίδραση του μηχανικού περιβάλλοντος στις ενδοκυττάριας λειτουργίες, μέσω των οποίων τα κύτταρα ανταποκρίνονται και παράγουν ουσίες που δρουν ως διαμεσολαβητές και καθορίζουν την πορεία της πόρωσης.

2.4 Ευόδωση της πόρωσης

Η πολύπλοκη επουλωτική εξεργασία της πόρωσης των καταγμάτων μπορεί να αποτύχει κάτω από δυσμενείς συνθήκες οδηγώντας σε εμφάνιση επιπλοκών, όπως καθυστερημένη πόρωση ή ψευδάρθρωση (6-10%). Από τις επιπλοκές αυτές προκύπτουν

σοβαρές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις, αύξηση του κόστους θεραπείας διότι απαιτούνται περαιτέρω χειρουργικές επεμβάσεις προκειμένου να επιτευχθεί πόρωση και σοβαρές επιπτώσεις και στον ψυχισμό του ίδιου του ασθενούς^{113,114}.

Τα αίτια των επιπλοκών της πόρωσης παραμένουν πολλές φορές αδιευκρίνιστα. Οι επιπλοκές αυτές μπορεί να προκληθούν από διάφορα λάθη κατά τη συντηρητική ή χειρουργική αντιμετώπιση των καταγμάτων, όπως ανεπαρκής σταθεροποίηση του κατάγματος, εκσεσημασμένη αποκόλληση του περιostίου ή πρόκληση βλάβης στα γύρω μαλακά μόρια, υπερβολική διάταση των κατεαγόντων άκρων με συσκευές εξωτερικής οστεοσύνθεσης, υπέρμετρη πρόωμη κινητοποίηση. Επίσης, η επιμόλυνση του κατάγματος κατά τον τραυματισμό ή κατά την διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης μπορεί να συμβάλλει στην πρόκληση επιπλοκών της πόρωσης των καταγμάτων.

Η τοποθέτηση σπογγωδών οστικών αυτομοσχευμάτων αποτελούσε για πολλά χρόνια και εξακολουθεί ακόμα και σήμερα να είναι μέθοδος εκλογής (“gold standard”) για την αντιμετώπιση των ψευδαρθρώσεων και οστικών ελλειμμάτων. Η συνεχής ερευνητική προσπάθεια για περισσότερα από 30 χρόνια έχει αναπτύξει εναλλακτικές θεραπείες χρησιμοποιώντας βιολογικές ή βιοφυσικές μεθόδους για την ευόδωση και προαγωγή της πόρωσης. Τα οστικά μοσχεύματα, οι αυξητικοί παράγοντες, η γονιδιακή θεραπεία, τα οστεοκαθοδηγητικά υλικά και τα οστεογενετικά υλικά ανήκουν στις βιολογικές μεθόδους. Τα ηλεκτρικά-ηλεκτρομαγνητικά πεδία και οι χαμηλής έντασης υπέρηχοι περιλαμβάνονται στις βιοφυσικές μεθόδους ευόδωσης της πόρωσης.

2.5 Βιολογικές μέθοδοι ευόδωσης της πόρωσης

2.5.1 Οστικά Μοσχεύματα

Τα οστικά μοσχεύματα διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους σε αυτομοσχεύματα, αλλομοσχεύματα και ξενομοσχεύματα. Τα αυτομοσχεύματα μπορεί να είναι αγγειούμενα ή μη και προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή, τα αλλομοσχεύματα προέρχονται από ζώντα ή πτωματικό δότη του ίδιου φυσικού είδους ενώ τα ξενομοσχεύματα προέρχονται από δότη άλλου φυσικού είδους. Οι δυνατότητες του κάθε οστικού μοσχεύματος διαφέρουν. Η κύρια ένδειξη των οστικών μοσχευμάτων είναι η πλήρωση οστικού ελλείμματος και η προαγωγή της πόρωσης σε περιπτώσεις ψευδαρθρώσεων.

Τα σπογγώδη και τα φλοιώδη οστικά αυτομοσχεύματα χρησιμοποιούνται συχνότερα προάγοντας αποτελεσματικά την πώρωση σε περιπτώσεις σπονδυλοδεσίας, οστικού ελλείμματος ή κατάγματος^{114,153-155}. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των βιολογικών τους ιδιοτήτων καθώς τα συγκεκριμένα αυτομοσχεύματα παρέχουν ζώντα οστεογενετικά κύτταρα και οστεοεπαγωγικές πρωτεΐνες που διεγείρουν την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ιδιαίτερα, στα σπογγώδη αυτομοσχεύματα λόγω της πωρώδους επιφάνειάς τους η διαδικασία της νεοαγγείωσης προχωρά γρήγορα και το μόσχευμα λειτουργεί ως ικρίωμα για την πλήρη ανάπτυξη των αγγείων, που με τη σειρά τους μεταφέρουν οστεοβλάστες συμβάλλοντας στην παραγωγή οστού. Η πλήρης ενσωμάτωση του σπογγώδους αυτομοσχεύματος ολοκληρώνεται συνήθως σε ένα έτος μετά το χειρουργείο ενώ του φλοιώδους απαιτεί περισσότερο χρόνο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα φλοιώδη οστικά αυτομοσχεύματα λόγω της συμπαγούς δομής τους καθυστερεί η διαδικασία της νεοαγγείωσης και είναι μικρότερη η συγκέντρωση των πρόδρομων μορφών οστεοβλαστών σε σχέση με τα σπογγώδη αυτομοσχεύματα.

Τα αγγειούμενα όμως οστικά φλοιώδη αυτομοσχεύματα (περόνη, λαγόνια, πλευρά) άρουν τους παραπάνω περιορισμούς, επιτυγχάνοντας γρήγορη ενσωμάτωση με διατήρηση μεγαλύτερου ποσοστού ζώντων κυττάρων (90%) προσδίδοντας μεγάλη ικανότητα οστεοπαραγωγής. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί σε μελέτη με πειραματοζώα ότι ο αγγειούμενος κρημνός του περιστέου μόνος του ή σε συνδυασμό με οστικά μόσχευματα επάγει την οστεογένεση σε ετερότοπη θέση έξω από το οστόν¹⁵⁸. Ο αγγειούμενος κρημνός του περιστέου εφαρμόζεται για την αποκατάσταση μικρών σκελετικών ελλειμμάτων καθώς και για την αντιμετώπιση της οστεονέκρωσης και της ψευδάρθρωσης στο άνω και κάτω άκρο, ιδίως στο άπω τμήμα του αντιβραχίου και στον καρπό^{159,160}.

Ωστόσο, η τεχνική λήψης και τοποθέτησης των αγγειούμενων αυτομόσχευμάτων απαιτεί ιδιαίτερες γνώσεις και ικανότητες από τον χειρουργό. Μειονέκτημα των αυτομοσχευμάτων αποτελεί το πρόσθετο χειρουργικό τραύμα που απαιτείται για τη λήψη τους, που μπορεί να οδηγεί σε νοσηρότητα της δότριας περιοχής με πόνο, αιμάτωμα ή λοίμωξη^{156,157}.

2.5.2 Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ήδη έχει αναφερθεί και παραπάνω, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της επουλωτικής εξεργασίας της πόρωσης των καταγμάτων. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες- BMPs φαίνεται ότι αποτελούν τους κυριότερους ρυθμιστές της πόρωσης διεγείροντας την διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων του περιostίου σε χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες.

Οι BMPs ανακαλύφθηκαν από τον Marshall R. Urist¹³² το 1965 καθώς κατέδειξε τις οστεοεπαγωγικές τους ιδιότητες, επιστράτευση αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε πρόδρομες μορφές χονδροπαραγωγών και οστεοπαραγωγών κυττάρων. Η επίδραση και η αποτελεσματικότητα των BMPs έχει επιβεβαιωθεί με πολλές μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες ανασυνδυασμένες BMPs (rhBMPs) για την επούλωση οστικών ελλειμμάτων¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

Σε μελέτες με ζωικά μοντέλα^{162,164} έχει βρεθεί ότι οι BMPs μόνες ή μαζί με ειδικούς φορείς επάγουν το σχηματισμό οστού σε οστικά ελλείμματα με ισάξια ή και καλύτερα αποτελέσματα με αυτά που επιτυγχάνονται με τη χρήση οστικών αυτομοσχευμάτων για την αντιμετώπιση οστικών ελλειμμάτων και ψευδαρθρώσεων.

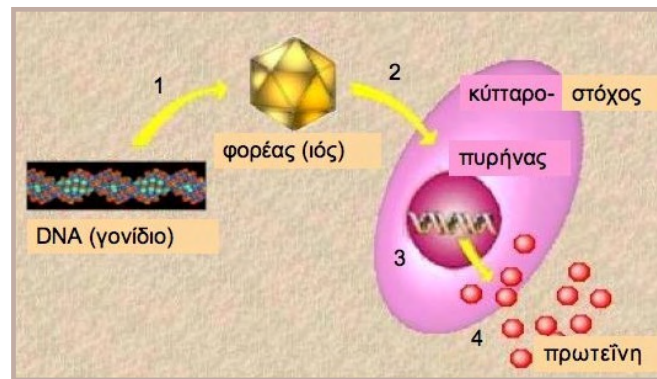
Μόνο η rhBMP-2 και rhBMP-7 έχουν πάρει έγκριση, από τον Οκτώβριο 2001, από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA) για κλινική χρήση, η rhBMP-2 για την αντιμετώπιση ανοικτών καταγμάτων κνήμης σε συνδυασμό με ενδομυελική ήλωση και η rhBMP-7 για ψευδαρθρώσεις μακρών οστών στις οποίες έχουν αποτύχει προηγούμενες θεραπείες¹⁶⁵. Σε κλινικές μελέτες οι BMP-2 και BMP-7 χρησιμοποιούνται τις περισσότερες φορές σε συνδυασμό με αλλομοσχεύματα ή αυτομοσχεύματα για την κάλυψη οστικών ελλειμμάτων. Σε κλινικές μελέτες¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση της BMP-7 στην αντιμετώπιση ψευδαρθρώσεων κνήμης έχει ισάξια αποτελεσματικότητα με αυτήν των αυτομοσχευμάτων. Παράλληλα, σε κλινικές μελέτες^{169,170} έχει βρεθεί ότι η BMP-2 επάγει το σχηματισμό οστού ακόμα και σε περιπτώσεις ανοικτών καταγμάτων κνήμης όταν χρησιμοποιείται με κατάλληλο ειδικό φορέα.

Αν και πολλά υποσχόμενα, τα αποτελέσματα αυτά χρειάζονται περαιτέρω πιστοποίηση σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών. Επιπρόσθετα, η δόση της rh-BMP που

χρησιμοποιήθηκε στις παραπάνω κλινικές μελέτες ήταν αρκετά υψηλή (3,4-6,8mg) και μπορεί αυτό να θεωρηθεί ως υπεύθυνο για την πυροδότηση μη προβλέψιμων τοπικών ή και συστηματικών αντιδράσεων από τη χρήση ανασυνδυασμένων rhBMPs στην ορθοπαιδική χειρουργική.

2.5.3 Γονιδιακή Θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία συνίσταται στη μεταφορά εξωγενούς γενετικής πληροφορίας μέσω διαγονιδιακού υλικού στα κύτταρα-στόχους. Κατά τη μεταφορά αυτή πραγματοποιούνται βιολογικές διεργασίες, όπου το DNA του γονιδίου με τη βοήθεια κατάλληλου φορέα (vector) διεισδύει στο κύτταρο-στόχος, μεταγράφεται στον πυρήνα σε mRNA, στη συνέχεια ακολουθεί η μετάφρασή του στα ριβοσώματα και τελικά συντίθεται και απελευθερώνεται κάποια πρωτεΐνη (εικ. 12).



Εικόνα 12: Στάδια γονιδιακής θεραπείας. 1:δημιουργία μορίου- φορέα (ιός), με τροποποιημένο γονιδίωμα, 2: διαμόλυνση κυττάρων-στόχων με το φορέα-ιό, 3: μεταφορά γενετικού υλικού φορέα-ιού σε κύτταρο στόχο, 4: δημιουργία λειτουργικής πρωτεΐνης – προϊόν του θεραπευτικού γονιδίου και επαναφορά του κυττάρου-στόχου σε φυσιολογική κατάσταση.

Με τη γονιδιακή θεραπεία το κύτταρο-στόχος, ανάλογα με την πρωτεΐνη που συντίθεται μπορεί να διεγερθεί προς πολλαπλασιασμό, προς παραγωγή ενός συγκεκριμένου στοιχείου μεσοκυττάριας ουσίας, ή να τροποποιήσει τη βιολογική του συμπεριφορά. Η μεταφορά των γονιδίων, που επιλέγονται με βάση τους θεραπευτικούς στόχους, μπορεί να γίνει είτε με *in vivo* διαγονιδιακή προσπέλαση (απευθείας μεταφορά της εξωγενούς γενετικής πληροφορίας σε ιστούς/κύτταρα ασθενών) είτε με *ex vivo* διαγονιδιακή προσπέλαση (λήψη του κυτταρικού πληθυσμού-στόχου από ασθενείς, *in*

in vitro καλλιέργειες- γενετικοί χειρισμοί και ακόλουθη εισαγωγή των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων στους ασθενείς).

Προκειμένου να επιτευχθεί η τροποποίηση της βιολογικής συμπεριφοράς του κυττάρου-στόχου, το εξωγενώς χορηγούμενο γενετικό υλικό πρέπει να διεισδύσει στο κύτταρο, να αποφύγει τον κατακερματισμό από τα λυσοσώματα και να εισέλθει στον πυρήνα όπου λαμβάνει χώρα η διεργασία της μεταγραφής¹⁷². Η είσοδος και η έκφραση του DNA στα κύτταρα-στόχος μπορεί να επιτευχθεί με ιϊκούς ή μη-ιϊκούς φορείς καθώς και με μεθοδολογία RNAi (RNA παρεμβολή - RNA interference). Έχουν χρησιμοποιηθεί γενετικά ανασυνδυασμένοι ιϊκοί-φορείς από την ομάδα των ρετροϊών, λεντι-ιών, αδενοϊών ή ιών του απλού έρπητα. Στους μη-ιϊκούς φορείς ανήκουν τα λιποσώματα και τα συνθετικά πολυμερή (συμπλέγματα DNA-προσδέτη, που έχουν την τάση να συνδέονται με υποδοχείς της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης).

Πειραματικές μελέτες^{173,174} υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης κυττάρων του μυελού των οστών και στελέχους αδενοϊού ως φορέα για κάλυψη κριτικού μεγέθους οστικών ελλειμμάτων. Επίσης, σε πειραματικές μελέτες^{175,176} έχει βρεθεί ταχύτερη αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων και σπονδυλοδεσίας μετά από τοπική εφαρμογή κυττάρων του μυελού των οστών, τροποποιημένων γενετικά ώστε να παράγουν BMP-2 ή BMP -7.

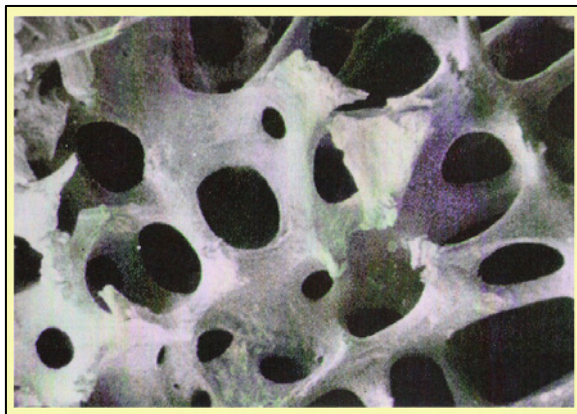
Ωστόσο, απαιτείται βελτίωση των στρατηγικών γενετικών χειρισμών στις διαγονιδιακές προσπελάσεις ώστε να αναπτυχθούν αποδοτικότεροι και βιοασφαλέστεροι ιϊκοί και μη-ιϊκοί φορείς, μείωση της μεταλλαξογενικότητας και τοξικότητας των παραγόμενων διαγονιδιακών φορέων καθώς και εξειδίκευση στόχευσης^{171,174}.

2.5.4 Οστεοκαθοδηγητικά Υλικά

Οστεοκαθοδήγηση (osteoconduction) είναι η ιδιότητα που έχουν ορισμένα υλικά να ενισχύουν τη μετανάστευση, προσκόλληση και κατανομή πάνω στην επιφάνειά τους κυττάρων που είναι υπεύθυνα για το νεοσχηματισμό οστού. Η οστεοκαθοδήγηση εξαρτάται από τη χημική σύσταση της επιφάνειας του εμφυτεύματος, από την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του με ύπαρξη ή όχι πόρων και από το ρυθμό αποδόμησής του σε συνάρτηση με το χρόνο. Το εμφύτευμα λειτουργεί με τον τρόπο αυτό σαν ικρίωμα πάνω στο οποίο σχηματίζεται και εναποτίθεται νέο οστόν.

Το απαιτούμενο μέγεθος των πόρων ενός πορώδους εμφυτεύματος για το σχηματισμό οστού είναι 100-500 μm ¹⁷⁷. Τα τελευταία 30 έτη έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί σε διάφορα μοντέλα πειραματόζωων φυσικά και συνθετικά οστεοκαθοδηγητικά υλικά που έχουν τις πιο πάνω ιδιότητες, όπως τα κεραμικά του φωσφορικού ασβεστίου και τα κοράλλια¹⁷⁸. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στη χρήση κεραμικών με βάση το ασβέστιο. Τέτοια υλικά είναι ο υδροξυαπατίτης (HA) και η φωσφορική τριάσβεστος (TCP). Η TCP είναι περισσότερο απορροφήσιμη συγκριτικά με τον HA και σχεδόν δε διασπάται, όταν εμφυτεύεται in vivo. Τα πορώδη διφασικά βιοϋλικά, στα οποία υπάρχει συνδυασμός HA και TCP (60% και 40% αντίστοιχα), έχουν έναν ενδιάμεσο βαθμό διάσπασης¹⁷⁹. Τα υλικά αυτά αν και έχουν άριστη δυνατότητα σύνδεσης με το οστόν είναι όμως εύθρυπτα και παρουσιάζουν φτωχή αντίσταση σε δυνάμεις συμπίεσης.

Ο HA και η TCP έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα για τη θεραπεία μικρής έκτασης οστικών ελλειμμάτων, όταν η εμφύτευση γίνεται σε στενή επαφή με το οστό του δέκτη και η διεπιφάνεια μεταξύ εμφυτεύματος-οστού δεν εκτίθεται σε δυνάμεις διάτμησης^{180,181}. Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια νέα βιοενεργής αλοιφή δίκην οστικού τσιμέντου, η οποία παράγεται μετά από συνδυασμό δύο κεραμικών φωσφορικών επιτρέποντας το σχηματισμό HA in situ¹⁸². Όμως, το εν λόγω οστικό τσιμέντο στερείται πόρων, στους οποίους θα μπορούσε να εμφανιστεί κυτταρική ανάπτυξη, πράγμα σημαντικό για την αντιμετώπιση μεγαλύτερων οστικών ελλειμμάτων.



Εικόνα 13: Μικροφωτογραφία πορώδους δομής κοραλλιού. Η αρχιτεκτονική διάταξη των πόρων είναι παρόμοια με αυτή του σπογγώδους οστού.

Το φυσικό κοράλλι έχει σαν κύριο συστατικό το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), παρουσιάζει άριστες μηχανικές ιδιότητες και μια ιδεώδη αρχιτεκτονική διάταξη των πόρων του παρόμοια με αυτή του σπογγώδους οστού¹⁸³ (εικ. 13). Τα κοράλλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φυσική τους μορφή¹⁸⁴ ή εναλλακτικά, το CaCO_3 του φυσικού κοραλλίου μπορεί να μετασχηματιστεί σε HA με ειδική υδροθερμική αντίδραση, παραμένοντας αμετάβλητη η στερεοχημική δομή του χωρίς να αλλάζει η διάμετρος των πόρων του¹⁸⁵.

Ωστόσο, τα πιο πάνω περιγραφέντα υλικά δεν έχουν αποδειχθεί σε κλινικές μελέτες κατάλληλα για την αντιμετώπιση εκτεταμένων οστικών ελλειμμάτων. Ο σχηματισμός οστού εμφανίζεται περισσότερο στην επιφάνεια και στα άκρα των υλικών αυτών, παρά στο εσωτερικό τους. Η ουσιαστική ενίσχυση του σχηματισμού νέου οστού που είναι απαραίτητο για την πλήρωση ενός σημαντικού οστικού ελλείμματος, επιτυγχάνεται κλινικά μόνο με την προσθήκη μιας βιολογικά ενεργούς ουσίας, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες και τα οστεογενετικά υλικά.

2.5.5 Οστεογενετικά Υλικά

Υλικά ικανά να παράγουν οστούν ως υποκατάστατα οστικών μοσχευμάτων εμπλουτισμένα με οστεογενετικά κύτταρα ονομάζονται οστεογενετικά. Ο μυελός των οστών περιέχει πρόδρομα οστεογενετικά κύτταρα και για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί αυτόλογος μυελός των οστών σε συνδυασμό με οστεοκαθοδηγητικά υλικά για την ενίσχυση της διεργασίας σχηματισμού νέου οστού¹⁸⁶.

Συχνότερα προτιμάται η λήψη κυττάρων από το στρώμα του μυελού των οστών, από το οποίο είναι δυνατό να απομονωθεί ένας ετερογενής πληθυσμός ινοβλαστών και να αυξηθεί με πολλαπλασιασμό κατόπιν καλλιέργειας *in vitro*^{187,188}. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται ινοβλάστες του στρώματος του μυελού των οστών (bone-marrow stromal fibroblasts, BMSFs) και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστικά κύτταρα, όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας¹⁸⁹. Μελέτες μετά από κλωνοποίηση κατέδειξαν την παρουσία ενός υποπληθυσμού BMSFs με τουλάχιστον τριπλό δυναμικό διαφοροποίησης σε χόνδρινο, λιπώδη και οστίτη ιστό στον άνθρωπο¹⁹⁰.

Τα οστεογενετικά υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως για την αποκατάσταση μεγάλων οστικών ελλειμμάτων. Πειραματικές μελέτες τοποθέτησης HA/TCP διφασικού

υλικού εμπλουτισμένου με BMSFs για την πλήρωση σημαντικού μεγέθους οστικών ελλειμμάτων (21mm) κατέδειξαν ότι η ικανότητα των οστεογενετικών εμφυτευμάτων για νεοσχηματισμό οστού ήταν πάντα μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή του υλικού χωρίς εμπλουτισμό με κύτταρα ή όταν δεν υπήρχε καμία παρεμβολή υλικού μεταξύ του οστικού ελλείμματος¹⁹¹. Τα φυσικά κοράλλια, εμπλουτισμένα με BMSFs, είναι επίσης ένα υλικό που συνδυάζει καλές μηχανικές ιδιότητες με ταχύ ρυθμό απορρόφησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση μεγάλων οστικών ελλειμμάτων κυρίως κάτω από συνθήκες συμπιεστικής φόρτισης¹⁹².

Τα αποτελέσματα της χρήσης οστεογενετικών υλικών είναι ενθαρρυντικά ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την αξιοπιστία της αποτελεσματικότητάς τους.

2.6 Βιοφυσικές μέθοδοι ευόδωσης της πώρωσης

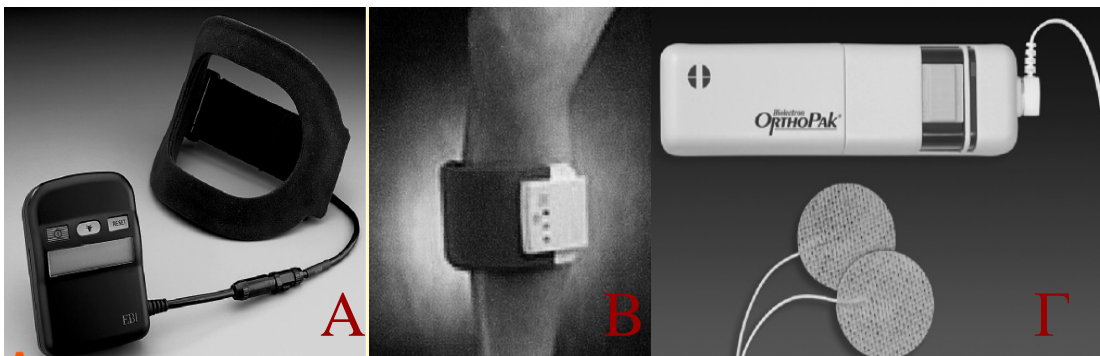
2.6.1 Ηλεκτρικά- Ηλεκτρομαγνητικά πεδία

Η εφαρμογή συσκευών για τον ηλεκτρικό ερεθισμό των οστών σε περιπτώσεις που απαιτείται ενίσχυση της πώρωσης για την αποκατάσταση διαφόρων τύπων οστικής βλάβης βασίζεται στο γεγονός ότι το οστόν έχει ηλεκτρικές ιδιότητες. Η διάφυση των ζώντων οστών σε κατάσταση ηρεμίας έχει θετικό ηλεκτρικό φορτίο σε σχέση με τα άκρα του οστού. Εστίες καταγμάτων ή περιοχές με ενεργό σχηματισμό οστού είναι ηλεκτραρνητικές¹⁹³. Το οστόν διαθέτει επίσης ηλεκτρικές ιδιότητες οι οποίες μεταβάλλονται μετά από την εφαρμογή μηχανικών δυνάμεων σε αυτό, όπως συμβαίνει υπό την επίδραση της φόρτισης του βάρους του σώματος. Οι ιδιότητες αυτές είναι δύο τύπων: τα πιεζοηλεκτρικά δυναμικά (piezoelectric potentials) που δημιουργούνται μετά από παραμόρφωση των ινών του κολλαγόνου της εξωκυττάριας ουσίας¹⁹⁴ και τα δυναμικά ροής (streaming potentials) παραγόμενα κατά την κίνηση των υγρών που περιέχουν ήδη φορτισμένα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας.

Τρεις τύποι συσκευών υπάρχουν για κλινική εφαρμογή στην τρέχουσα ορθοπαιδική: α) διέγερση με παλλόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία (μη αιματηρή μέθοδος) β) διέγερση με εναλλασσόμενο ηλεκτρικό ρεύμα με τη χρήση ηλεκτροδίων επί του δέρματος (μη αιματηρή μέθοδος) και γ) διέγερση με συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα με τη χρήση διαδερμικών ή εμφυτεύσιμων ηλεκτροδίων (αιματηρή μέθοδος). Οι συσκευές αυτές λειτουργούν παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα με διαφορετικό τρόπο η καθεμία.

Η διέγερση με συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα (Direct Current -DC) ήταν η πρώτη που αναπτύχθηκε και ο μηχανισμός δράσης της είναι διαφορετικός από αυτόν των άλλων δύο μεθόδων. Φαίνεται ότι οι ηλεκτροχημικές μεταβολές στην κάθοδο οδηγούν τοπικά σε μείωση της μερικής τάσης του οξυγόνου, αύξηση του pH και εμφάνιση χημικών “φαραδικών προϊόντων” όπως H_2O_2 , καταστάσεις που ευνοούν το σχηματισμό οστού. Με τον τρόπο αυτό, το ηλεκτρικό ρεύμα και τα χημικά προϊόντα από κοινού ενεργοποιούν την οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα προάγοντας την οστική ανακατασκευή¹⁹⁵. Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, τοπική συνάθροιση και διαφοροποίηση πρόδρομων μορφών οστεοκυττάρων καθώς και επιτάχυνση του ρυθμού επιμετάλλωσης της μεσοκυττάριας ουσίας¹⁹⁶. Η ευόδωση της πάρωσης με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος αν και έχει διερευνηθεί σε κλινικές μελέτες τα τελευταία 30 χρόνια^{197,198}, σήμερα όμως, δεν χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος εφαρμογής DC για οστική διέγερση.

Περισσότερο διαδεδομένη είναι η χρήση του παλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου (pulsed electromagnetic field- PEMF) και του εναλλασσόμενου ηλεκτρικού ρεύματος (alternating current- AC) με αντίστοιχες κλινικές μελέτες που αξιολογούν την αποτελεσματικότητά τους¹⁹⁹⁻²⁰¹. Στις περιπτώσεις αυτές, το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο παράγεται από πηνία και επάγει την παραγωγή και διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του ιστού, ο οποίος παρεμβάλλεται ανάμεσα στα πηνία (εικ. 14).



Εικόνα 14: Διάφοροι εμπορικοί τύποι συσκευών ηλεκτροδιέγερσης. Α. EBI bone healing system (Biomet), Β. Physiostim Lite (Orthofix), Γ. Orthopak (Biomet).

Τα PEMF επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη όπου φαίνεται ότι μπλοκάρουν τη δράση της παραθορμόνης και του παράγοντα ενεργοποίησης των οστεοκλαστών²⁰². Επίσης, προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την

αύξηση της νεοαγγειογένεσης²⁰³. Έχει δειχθεί ότι η ηλεκτρομαγνητική διέγερση ρυθμίζει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου και επάγει την παραγωγή ή απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διεργασία της πώρωσης, όπως BMP-2, BMP-4, TGF-β1^{201,204,205}.

Πειραματικές μελέτες *in vitro* με εφαρμογή AC υποδεικνύουν ότι παρουσία ηλεκτρικού πεδίου διανοίγονται οι διάυλοι της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας την είσοδο του εξωκυτταρικού Ca²⁺ εντός του κυττάρου και παράλληλα διεγείρεται η παραγωγή PGE-2 στην κυτταρική μεμβράνη. Η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca²⁺ στο κυτταροπλασματικό δίκτυο προάγει την αύξηση της ενεργοποιημένης καλμοδουλίνης των κυττάρων του σκελετού, η οποία με τη σειρά της επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση του TGF-β1²⁰⁶.

Πειραματικές και κλινικές μελέτες υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της επίδρασης του ηλεκτρικού ρεύματος στο σχηματισμό οστού ιδίως σε ψευδαρθρώσεις ωστόσο, χρήζει περαιτέρω διερεύνηση όσο αφορά τις ενδείξεις και αντενδείξεις της χρήσης του ηλεκτρικού ρεύματος καθώς και το βαθμό υπεροχής του έναντι των άλλων μεθόδων προαγωγής της πώρωσης.

3. Χαμηλής έντασης Υπέρηχοι

Οι υπέρηχοι αποτελούν υψηλής συχνότητας ηχητικά κύματα που δεν μπορεί να συλλάβει το ανθρώπινο αυτί, ήχοι πάνω από 20.000 Hz. Φυσιολογικά το αυτί μας, μπορεί να συλλάβει ήχους στις συχνότητες μεταξύ 16 και 20.000 Hz. Πρόκειται για μια μορφή μηχανικής ενέργειας που μεταβιβάζονται ως ωστικά ηχητικά κύματα διαμέσου και μεταξύ παρακείμενων βιολογικών ιστών. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην Ιατρική ως διαγνωστικό, χειρουργικό αλλά και θεραπευτικό μέσο^{207,208}.

Οι υπέρηχοι στις συσκευές ιατρικών χρήσεων, παράγονται από τον μετατροπέα (transducer). Ο μετατροπέας αποτελεί ένα από τα βασικά μέρη μιας συσκευής που μετατρέπει ένα είδος ενέργειας σε ένα άλλο. Το βασικό συστατικό του μετατροπέα, είναι το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, κρύσταλλος ή κεραμικό, το οποίο έχει την ιδιότητα όταν παραμορφωθεί με ηλεκτρικό ρεύμα να παράγει ένα υπερηχητικό κύμα, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό ως πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Αντίστροφα, όταν ένα υπερηχητικό κύμα κατά την ανάκλαση του προσπίπτει πάνω στον μετατροπέα τότε παράγεται

ηλεκτρικό ρεύμα. Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται είναι ανάλογη με την ενέργεια του προσπίπτοντος κύματος. Η όλη διάταξη, στοιχείο-ηλεκτρόδια, είναι τοποθετημένη εντός θήκης μετά από παρεμβολή κατάλληλου ηχομονωτικού υλικού. Η χαρακτηριστική συχνότητα των υπερήχων που παράγει ο μετατροπέας καθορίζεται από το πάχος του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου.

Οι μετατροπείς μπορούν να εκπέμπουν συνεχή ηχητικά κύματα (continuous wave, CW) ή σειρές ταυτόσημων παλμών (pulsed wave, PW), καθένας από τους οποίους απαρτίζεται από λίγους κύκλους. Το φάσμα όλων των συχνοτήτων που εμπεριέχονται μέσα σε κάθε παλμό ονομάζεται εύρος συχνοτήτων (frequency bandwidth). Διάρκεια παλμού (pulse duration, PD) είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ έναρξης και τέλους του κάθε παλμού και καθορίζεται από τον αριθμό των κύκλων και τη διάρκεια του καθενός κύκλου. Περίοδος επανάληψης παλμού (pulse repetition period, PRP) είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη ενός παλμού μέχρι την έναρξη του επόμενου. Συχνότητα επανάληψης παλμού (pulse repetition frequency, PRF) είναι ο αριθμός των παλμών σε κάθε δευτερόλεπτο.

Κάθε φορά λοιπόν, που εφαρμόζεται στιγμιαία ηλεκτρικό ρεύμα στον μετατροπέα, εκπέμπεται ένα υπερηχητικό κύμα το οποίο ακολουθεί τους κανόνες που διέπουν τα ηχητικά κύματα. Προχωρεί δηλαδή ευθύγραμμο και όταν προσπέσει σε μια επιφάνεια μπορεί να ανακλαστεί, να διαθλαστεί (περαιτέρω διάδοση του κύματος) ενώ ένα μέρος απορροφάται (μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια). Η γωνία ανακλάσεως είναι ίση με την γωνία προσπτώσεως. Το ανακλώμενο κύμα προσκρούει στον πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο που στο μεταξύ ηρεμεί, δημιουργεί ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο καταγράφεται και μετατρέπεται σε φωτεινό σήμα.

Ένα απλό υπερηχητικό κύμα (μία πυκνώση και μία αραιώση) που παράγεται έχει δύο διαστάσεις, μία χρονική και μία χωρική. Η πρώτη καλείται περίοδος (T , sec) και η δεύτερη μήκος κύματος (λ , cm). Ο αριθμός των ηχητικών κυμάτων στη μονάδα του χρόνου ονομάζεται συχνότητα (f , Hz). Ταχύτητα (c , m/sec) του ήχου είναι η ταχύτητα διάδοσης του ηχητικού κύματος μέσα στα διάφορα υλικά. Η ταχύτητα του ήχου είναι ανεξάρτητη από την συχνότητα του υπερηχητικού κύματος και εξαρτάται από δύο ιδιότητες του υλικού, την πυκνότητα και το συντελεστή ελαστικότητας, ο οποίος εκφράζει το μέτρο της ακαμψίας του υλικού. Η ισχύς (P , Watts) εκφράζει το ρυθμό

παραγωγής έργου από τα ηχητικά κύματα στη μονάδα του χρόνου. Η ισχύς ελαττώνεται καθώς ο ήχος διαδίδεται διαμέσου κάποιου υλικού. Η ισχύς των διαφόρων συσκευών υπερήχων που χρησιμοποιούνται στην ιατρική είναι αυτή που καθορίζει τη βιολογική επίδραση των υπερήχων στους ιστούς. Ως ένταση (I , w/cm^2) ορίζεται η ισχύς του ηχητικού κύματος που αντιστοιχεί στη μονάδα επιφάνειας του υλικού.

Η ικανότητα ενός υλικού ως προς τη μετάδοση του ήχου ονομάζεται ακουστική εμπέδηση (Z , Rayl), είναι σταθερή για κάθε υλικό και η σχέση της με την πυκνότητα του υλικού (ρ) και την ταχύτητα του ήχου (C) δίδεται από τον τύπο $Z = \rho \times c$. Γενικά, όταν αυξάνεται η πυκνότητα του υλικού, αυξάνει και η ταχύτητα μετάδοσης του ήχου διαμέσου αυτού. Επειδή $c = f \times \lambda$, η συχνότητα και το μήκος κύματος είναι αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη έτσι ώστε, όταν η συχνότητα αυξάνει το μήκος κύματος ελαττώνεται. Η σχέση αυτή είναι σημαντική στην απεικόνιση με υπερήχους καθώς, για να παραχθεί λεπτομερώς ευδιάκριτη εικόνα, απαιτείται μικρότερο μήκος κύματος. Όταν οι υπέρηχοι προσπίπτουν στη διεπιφάνεια δύο υλικών με την ίδια ακουστική εμπέδηση, συνεχίζουν να διαδίδονται χωρίς καμία μεταβολή από το ένα υλικό στο άλλο. Στην περίπτωση που τα υλικά αυτά έχουν διαφορετική ακουστική εμπέδηση, τότε ένα μέρος των υπερήχων ανακλάται και το υπόλοιπο μεταδίδεται από το πρώτο στο δεύτερο υλικό. Η ανάκλαση είναι η αρχή, στην οποία στηρίζεται η απεικόνιση με υπερήχους. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά της ακουστικής εμπέδησης μεταξύ των δύο υλικών τόσο μεγαλύτερη και η ανάκλαση των υπερήχων. Η γωνία ανάκλασης είναι ίση με τη γωνία πρόσπτωσης. Μέγιστη ανάκλαση παρατηρείται, όταν το κύμα προσπίπτει κάθετα στη διεπιφάνεια των υλικών. Γίνεται αντιληπτό ότι η ισχύς του ανακλώμενου κύματος είναι το αποτέλεσμα συνδυασμού της γωνίας πρόσπτωσης και της διαφοράς ακουστικής εμπέδησης στη διεπιφάνεια.

Άλλος ένας παράγοντας που επιδρά στην ένταση του ανακλώμενου κύματος είναι το μέγεθος και η μορφολογία του υλικού πάνω στο οποίο προσπίπτει το κύμα των υπερήχων. Υλικά μικρά σε μέγεθος ή με ανώμαλες επιφάνειες είναι ικανά να παράγουν ανακλώμενα κύματα που δεν εξαρτώνται από τη γωνία πρόσπτωσης, διαδίδονται προς όλες τις κατευθύνσεις και έχουν σημαντικά μικρότερη ένταση. Επίσης καθώς ο ήχος μεταδίδεται από το ένα μέσο στο άλλο ένα ποσοστό διαθλάται, εκτροπή του κύματος των υπερήχων από την αρχική του πορεία. Διάθλαση δεν είναι δυνατό να συμβεί, όταν η

γωνία πρόσπτωσης είναι 90^0 ή όταν η ταχύτητα διάδοσης του κύματος στα δύο υλικά είναι ίση (τα δύο υλικά έχουν την ίδια ακουστική εμπέδηση). Η γωνία διάθλασης είναι μεγαλύτερη από τη γωνία πρόσπτωσης, αν η ταχύτητα διάδοσης του κύματος είναι μεγαλύτερη στο δεύτερο υλικό συγκριτικά με το πρώτο (νόμος του Snell). Επειδή η ταχύτητα του ήχου στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος δεν παρουσιάζει αξιόλογες μεταβολές, το ποσοστό διάθλασης που εμφανίζεται κατά τη διέλευση των υπερήχων από το σώμα είναι πολύ μικρό και έτσι θεωρούμε ότι η κατεύθυνση της δέσμης των υπερήχων παραμένει ευθεία.

Κατά τη διέλευση ενός κύματος υπερήχων διαμέσου των ιστών του σώματος παρατηρείται μείωση της έντασης, της ισχύος και του πλάτους του (εξασθένηση). Η εξασθένηση αυτή εμφανίζεται λόγω απορρόφησης και μετατροπής σε θερμότητα της ενέργειας των υπερήχων καθώς και ανάκλασης ή σκέδασης σε πολύ μικρές διεπιφάνειες ή ασυνέχειες στην ελαστικότητα των ιστών. Επομένως σε βαθύτερους ιστούς, η ενέργεια του κύματος μειώνεται με σύγχρονη μείωση της διεισδυτικής του ικανότητας. Διαφορές στην ακουστική εμπέδηση συμβάλλουν σημαντικά στην εξασθένηση και αυτός είναι και ο λόγος χρήσης της υδατοδιαλυτής γέλης μεταξύ μετατροπέα υπερήχων και δέρματος κατά την απεικόνιση.

Η ένταση των υπερήχων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς και χειρουργικούς σκοπούς είναι υψηλή ($1-3 \text{ W/cm}^2$) και μπορούν να προκαλούν σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας στους ζωντανούς ιστούς²⁰⁹. Ακόμη μεγαλύτερης έντασης $5-300 \text{ W/cm}^2$ υπέρηχοι χρησιμοποιούνται στη χειρουργική, όπως στη νεφρική λιθοτριψία, απομάκρυνση τσιμέντου στις αναθεωρήσεις ολικών αρθροπλαστικών, θεραπεία του καταρράκτη²¹⁰. Αντίθετα, η χρήση των υπερήχων σε διαγνωστικές μεθόδους απαιτεί χαμηλές εντάσεις ($1-50 \text{ mW/cm}^2$) και θεωρείται μη θερμική και ασφαλής²¹¹.

3.1 Ευόδωση επουλωτικών εξεργασιών με υπερήχους χαμηλής έντασης

Οι χαμηλής έντασης υπέρηχοι (Low-Intensity pulsed Ultrasound – LiUS) χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοφυσικό μέσο διέγερσης στις επουλωτικές εξεργασίες του μυσκελετικού συστήματος. Έχει βρεθεί σε πολλές μελέτες βασικών επιστημών, πειραματικές μελέτες καθώς και κλινικές μελέτες ότι οι LiUS ευοδώνουν τη διαδικασία της πόρωσης των καταγμάτων²¹²⁻²²⁴, την επούλωση τενόντων²³⁰⁻²⁴⁰ καθώς και των

συνδέσμων²⁴¹⁻²⁴³. Πειραματικές και κλινικές μελέτες κατέδειξαν ότι η εφαρμογή LiUS έχει θετική επίδραση σε καθένα από τα επιμέρους στάδια της πάρωσης, ενισχύοντας την αγγειογένεση, χονδρογένεση και οστεογένεση. Επιπλέον οι LiUS έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν εκτός από την πάρωση των πρόσφατων καταγμάτων, και στην αντιμετώπιση των περιπτώσεων καθυστερημένης πάρωσης και ψευδάρθρωσης²²⁵⁻²²⁹. Η συχνότητα των επιπλοκών αυτών μειώνεται σημαντικά όταν χρησιμοποιούνται και LiUS πρώιμα στη θεραπεία των καταγμάτων, ιδίως σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (καπνιστές, διαβητικοί, κλπ). Η αντιμετώπιση των καταγμάτων με LiUS μειώνει σημαντικά τον χρόνο της πάρωσης και τον αριθμό άλλων επεμβάσεων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σημαντικά οικονομικά οφέλη από την επιστροφή των πασχόντων σε πλήρη δραστηριότητα σε συντομότερο χρόνο²⁴⁴.

Σε *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων καθώς και σε πειραματικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η εφαρμογή LiUS έχει διεγερτική επίδραση στην ενδοκυττάρια δραστηριότητα, στην απελευθέρωση κυτοκινών και επάγει την σύνθεση DNA στις οστεοβλάστες, ινοβλάστες και κύτταρα περιosteού^{262,263}. Οι υπέρηχοι έχει βρεθεί ότι μεταβάλλουν την αναλογία ανταλλαγής ιόντων K^+ στην μεμβράνη των θυμοκυττάρων του ποντικίου και αυξάνουν την ενσωμάτωση ιόντων ασβεστίου σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων και οστεοβλαστών διεγείροντας την ενδοχόνδρια οστεοποίηση^{262,264}. Οι LiUS σε καλλιέργειες κυττάρων αυξάνουν τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης^{223,265} αυξάνουν τα επίπεδα της PGE-2 διαμέσου επαγωγής της COX-2 διεγείροντας αναβολικές οδούς και επάγουν θετικά την ρύθμιση της αλκαλικής φωσφατάσης, οστεοκαλσίνης και της οστεοποντίνης²⁶⁶⁻²⁶⁸. Η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης, της οστεοκαλσίνης και της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με οστεοβλάστες φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω διέγερσης από τους LiUS πρόδρομων μορφών κυττάρων που προέρχονται από το αιμάτωμα στην εστία του κατάγματος²⁶⁹.

Επιπρόσθετα, σε *in vitro* μελέτες έχει καταδειχθεί ότι οι LiUS ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της πάρωσης, όπως το γονίδιο aggrecan^{270,271}, προκολλαγόνο, RANKL, χημειοτακτικές κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως BMP-2, IGF, VEGF και TGF-β^{267,272-276}. Φαίνεται ότι οι LiUS επιταχύνουν την αγγειογένεση κατά την πάρωση μέσω της αύξησης της έκφρασης του VEGF στην περιοχή του κατάγματος²⁷⁴. Παράλληλα, έχει καταδειχθεί ότι η

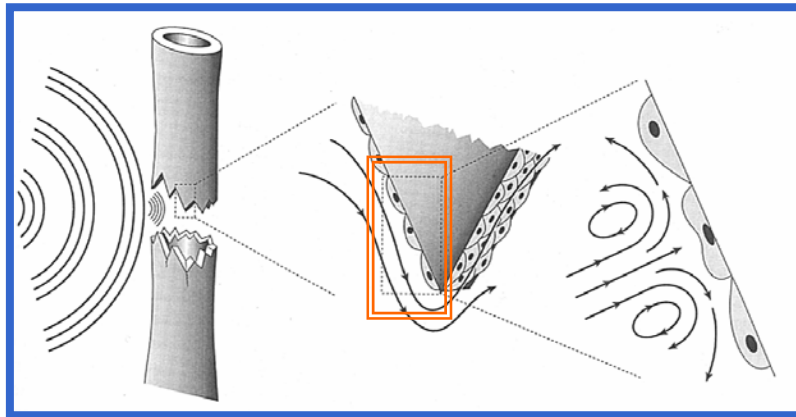
εφαρμογή LiUS σε καλλιέργειες ώριμων οστεοβλαστών αυξάνουν τα επίπεδα mRNA του RANKL και χημειοτακτικές κυτοκίνες μέσω των υποδοχέων τύπου I της αγγειοτενσίνης II, επάγοντας το σχηματισμό οστού²⁷⁵. Οι LiUS ασκούν διαφορετική επίδραση στα τρία ισομερή του TGF-β. Έχει παρατηρηθεί ότι σε καλλιέργειες οστεοβλαστών οι LiUS αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων TGF-β₁ και TGF-β₃ αλλά όχι του TGF-β₂²⁷³. Επίσης έχει βρεθεί ότι οι LiUS παρατείνουν την έκφραση του γονιδίου TGF-β₁ επιταχύνοντας με τον τρόπο αυτό την επούλωση των συνδέσμων²⁴³.

Οι LiUS αυξάνουν την αιματική ροή και τη διαπερατότητα της μεμβράνης των ινοβλαστών των τενόντων με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου, διεγείροντας μοριακούς μηχανισμούς που συμβάλλουν σε αύξηση του ρυθμού σύνθεσης πρωτεϊνών υπεύθυνων για την παραγωγή κολλαγόνου^{232,233}. Σε ιστολογικές και βιοχημικές μελέτες έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης κολλαγόνου καθώς και του μεγέθους και της πυκνότητας των ινών κολλαγόνου^{234,235}. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι LiUS διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, μέσω αύξησης της ενσωμάτωσης θυμιδίνης και του περιεχομένου DNA²³³. Φαίνεται ότι με την εφαρμογή των LiUS πρώιμα επιτυγχάνεται καλύτερη οργάνωση των δεσμίδων κολλαγόνου και επιταχύνεται η επούλωση των τενόντων^{230,231}.

Στην επούλωση των συνδέσμων έχει καταδειχθεί ότι οι υπέρηχοι αυξάνουν την αναλογία κολλαγόνου τύπου I και βελτιώνουν την οργάνωση των δεσμίδων κολλαγόνου επιταχύνοντας την διαδικασία της επούλωσης^{241,242}, ιδίως στον έσω πλάγιο σύνδεσμο του γόνατος.

Ωστόσο, παρά τις παραπάνω καλώς τεκμηριωμένες μελέτες, ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης LiUS με τους ζωντανούς ιστούς καθώς και ο μηχανισμός επιτάχυνσης της επούλωσης των ιστών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Φαίνεται ότι η ενέργεια των υπερήχων κατά τη διέλευσή τους διαμέσου των ιστών απορροφάται με ρυθμό ανάλογο της πυκνότητας του ιστού (εικ. 15)²⁵⁴. Η απορρόφηση του σήματος των LiUS οδηγεί στη μετατροπή ενέργειας σε θερμότητα²⁵⁵. Παρότι η διαφορά στην τοπική αύξηση της θερμοκρασίας είναι πολύ μικρή (<1°C), μερικά ένζυμα όπως οι κολλαγενάσες είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε πολύ μικρές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας²⁵⁶. Η διαφορά αυτή στην απορρόφηση της ενέργειας των υπερήχων δίνει γένεση στο φαινόμενο της «ακουστικής κατευθυνόμενης ροής» (acoustic streaming

phenomenon) με αποτέλεσμα τη μετακίνηση υγρών διαμέσου διαφόρων επιφανειών. Η διαδικασία αυτή πιθανόν προάγει μηχανικά τη μετάδοση βιολογικών σημάτων ενδοκυττάρια, μηχανοεπαγωγή (mechanotransduction) (εικ. 16), μέσω των υποδοχών ιντεγκρίνης, του μηχανοϋποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II και του σηματοδοτικού μονοπατιού Rho/ROCK/Src/ERK διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ινοβλαστών, χονδροβλαστών και οστεοβλαστών^{215,257-261,275}. Επιπλέον τα ωστικά ηχητικά κύματα παράγουν πεδία μικροστρες (microstress fields) προκαλώντας μηχανικό ερεθισμό στα οστά, ανάλογο με το φαινόμενο που περιγράφεται από το νόμο του Wolf²⁷⁷, συμβάλλοντας στην ευόδωση της πώρωσης των καταγμάτων.

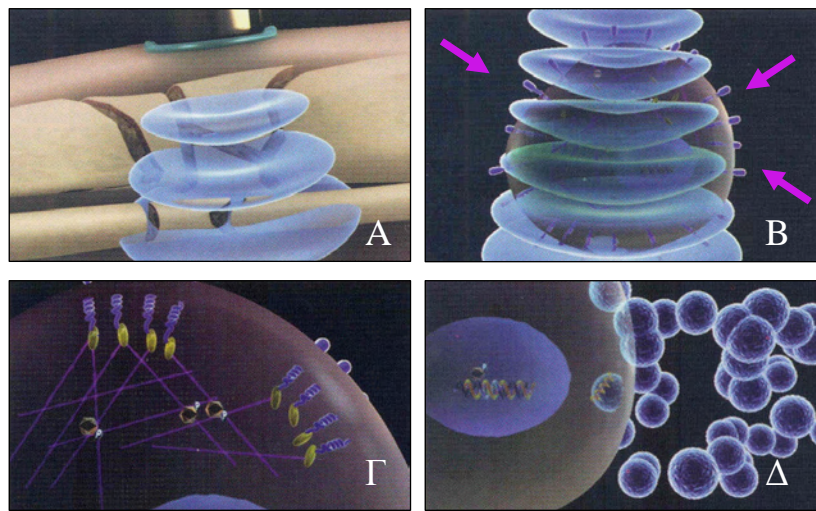


Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση φυσικής επικέντρωσης των υπερήχων στο διακαταγματικό κενό και μηχανικής διέγερσης κυττάρων της περιοχής από τους υπερήχους. Εξαιτίας της μεγαλύτερης πυκνότητας του οστού συγκριτικά με το διακαταγματικό κενό και τα περίξ μαλακά μόρια, το κύμα των υπερήχων (αριστερά) αυτοεπικεντρώνεται στη σχετικά χαμηλής πυκνότητας περιοχή του κατάγματος. Τα ωστικά κύματα διαπερνούν τις αιχμηρές επιφάνειες των κατεαγόντων οστικών άκρων (μέσον- πορτοκαλί πλαίσιο) διεγείροντας μηχανικά τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της περιοχής. Η φυσική αυτή αλληλεπίδραση με τα κύτταρα επάγει το μεταβολισμό τους προς διάφορους οδούς (δεξιά) λόγω της μηχανικής παραμόρφωσης που αυτά υφίστανται, καθώς επίσης και εξαιτίας της “ακουστικά κατευθυνόμενης ροής” των παρακείμενων υγρών²⁵⁴.

Από ιστορικής απόψεως, οι Corradi και Cozzolino²¹² ήταν οι πρώτοι ερευνητές που το 1952 κατέδειξαν σε πειραματική μελέτη ότι συνεχή κύματα υπερήχων είναι δυνατό να διεγείρουν το σχηματισμό του οστικού πώρου σε κατάγματα κερκίδας σε κουνέλια. Οι ίδιοι ερευνητές το 1953 παρατήρησαν στην πρώτη κλινική εφαρμογή των υπερήχων σε 8 ασθενείς ότι η θεραπεία είναι ασφαλής και οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό περιостτικού πώρου²¹³.

Περίπου, 30 χρόνια αργότερα οι Xavier και Duarte²¹⁴ ανακοίνωσαν την επιτυχή κλινική εφαρμογή χαμηλής έντασης υπερήχων ($30\text{mW}/\text{cm}^2$) στην θεραπεία ψευδαρθρώσεων. Την ίδια χρονιά ο Duarte²¹⁵ χρησιμοποιώντας ιστολογικά και ακτινολογικά κριτήρια αναφέρει επιτάχυνση της πάρωσης σε οστεοτομία περόνης σε κουνέλια μετά από εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης ($49\text{mW}/\text{cm}^2$) διάρκειας 15 λεπτών καθημερινώς.

Ο Pilla και συν²¹⁶ απέδειξαν σε πειραματική μελέτη με εμβιομηχανικά κριτήρια την επιτάχυνση της πάρωσης μετά από καθημερινή εφαρμογή LiUS για 20 λεπτά (έντασης $30\text{mW}/\text{cm}^2$ και συχνότητας 1.5MHZ). Ακολούθησαν πειραματικές μελέτες^{217,218} με χρήση διαφορετικών συχνοτήτων LiUS οι οποίες κατέδειξαν ότι η παλμική μορφή LiUS επιταχύνει την οστεογένεση. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η πάρωση προάγεται αποτελεσματικότερα όταν εφαρμόζονται LiUS με διάρκεια παλμού της τάξης των 200 μs και συχνότητα επανάληψης της τάξης του 1kHz.



Εικόνα 16: Μηχανοεπαγωγή. Α: μηχανική διάδοση υπερήχων στο οστόν Β: υποδοχείς ιντεγκρίνης (μωβ βέλη) Γ: ενδοκυττάρια επαγωγή σήματος Δ: αύξηση έκφρασης πρωτεϊνών.

Ακολούθησαν αρκετές κλινικές μελέτες που κατέδειξαν τη θεραπευτική αξία των υπερήχων. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η πολυκεντρική διπλή τυφλή κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Heckmann και συν²¹⁹ σε 67 κατάγματα κνήμης κλειστά ή ανοικτά 1^{ου} βαθμού που υποβλήθηκαν σε συντηρητική θεραπεία. Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η θεραπευτική εφαρμογή LiUS έντασης $30\text{mW}/\text{cm}^2$ για 20 min ημερησίως οδήγησε σε σημαντική (24%) μείωση του χρόνου κλινικής πάρωσης (μέση

τιμή του χρόνου πώρωσης $86 \pm 5,8$ ημέρες για την ομάδα θεραπείας συγκριτικά με $114 \pm 10,4$ ημέρες για την ομάδα ελέγχου). Καταγράφηκε επίσης μείωση κατά 38% του συνολικού χρόνου πώρωσης, κλινική και ακτινολογική πώρωση, (μέση τιμή $96 \pm 4,9$ ημέρες για την ομάδα θεραπείας συγκριτικά με $154 \pm 13,7$ ημέρες για την ομάδα ελέγχου). Επίσης, η συνεργασία των ασθενών όσον αφορά την καθημερινή εφαρμογή των LiUS ήταν εξαιρετική, ενώ επίσης δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές που να σχετίζονται με τη χρήση των υπερήχων.

Μια άλλη παρόμοια μελέτη, πολυκεντρική διπλή τυφλή μελέτη, έγινε από τους Kristiansen και συν²²⁰ σε 61 κατάγματα κάτω πέρατος κερκίδας ραχιαίως παρεκτοπισμένα που αντιμετωπίστηκαν συντηρητικά. Παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου πώρωσης κατά 38% στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με LiUS για 20 min ημερησίως (μέση τιμή 61 ± 3 ημέρες για την ομάδα θεραπείας συγκριτικά με 98 ± 5 ημέρες για την ομάδα ελέγχου). Επιπρόσθετα, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο της μελέτης ήταν ότι η απώλεια της ανάταξης ήταν σημαντικά μικρότερη ($20 \pm 6\%$ έναντι $43 \pm 8\%$) για την ομάδα που έλαβε θεραπεία με υπερήχους. Αναλύοντας περαιτέρω τα δεδομένα των παραπάνω μελετών ο Cook και συν²²¹ παρατήρησαν ότι η εφαρμογή LiUS επιταχύνει την πώρωση καταγμάτων κνήμης και κάτω πέρατος κερκίδας και σε καπνιστές. Αυτό είναι ένα σημαντικό εύρημα γιατί αποδεικνύει ότι οι ασθενείς υψηλού κινδύνου (καπνιστές, διαβητικοί κ.λ.π) θα μπορούσαν να βοηθηθούν με αυτό τον τρόπο.

Η συσκευή LiUS που χρησιμοποιούσαν οι ασθενείς στις παραπάνω μελέτες εφαρμόζεται για 20 λεπτά/ημέρα, παράγει υπερήχους έντασης $30-161 \pm 30\%$ mW/cm² και η σφαιρική κεφαλή του μετατροπέα τοποθετείται σε άμεση επαφή με το δέρμα και επικεντρωμένη στην περιοχή του κατάγματος (εμπορική ονομασία συσκευής ExogenTM, Smith & Nephew Inc, Memphis, TN, USA, εικ. 17). Ακολούθησαν και άλλες κλινικές μελέτες¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ που απέδειξαν ότι η διαδερμική εφαρμογή LiUS ευοδώνει και επιταχύνει στατιστικά σημαντικά την πώρωση των καταγμάτων, τόσο κλινικά, βιοχημικά και ακτινολογικά.

Επιπλέον, η διαδερμική εφαρμογή LiUS, με την ίδια συσκευή υπερήχων, συμβάλλει και στην αντιμετώπιση ψευδαρθρώσεων ευοδώνοντας το σχηματισμό πόρου όπως έχει βρεθεί σε πειραματικές και κλινικές μελέτες²²²⁻²²⁹. Ο Nolte και συν²²⁸ χρησιμοποίησε την ίδια συσκευή LiUS για τη θεραπευτική αντιμετώπιση 29

ψευδαρθρώσεων σε μακρά οστά. Ο μέσος χρόνος που είχε μεσολαβήσει μεταξύ της κάκωσης και της εφαρμογής των LiUS ήταν 61 εβδομάδες. Πώρωση επιτεύχθη στο 86% του συνόλου των περιπτώσεων με επιμέρους ποσοστά 100% για τους μη καπνιστές, 82% για τους καπνιστές και 60% για τους πρώην καπνιστές. Σε παρόμοια μελέτη ο Gebauer και συν²²⁹ αξιολόγησε την επίδραση των LiUS σε 67 ψευδαρθρώσεις. Ο μέσος χρόνος που είχε μεσολαβήσει από την τελευταία χειρουργική επέμβαση ήταν 24.2 μήνες, με μέσο όρο δύο αποτυχημένες επεμβάσεις ανά ασθενή. Στη μελέτη επιτεύχθη πώρωση στο 85% σε 6 μήνες κατά μέσο όρο από την διαδερμική εφαρμογή LiUS.



Εικόνα 17: i: Συσκευή παραγωγής χαμηλής έντασης υπερήχων (Exogen™, Smith & Nephew Inc, Memphis, TN, USA). ii: Διαφορετικοί τρόποι τοποθέτησης μεταλλάκτη υπερήχων συσκευής Exogen.

Η εφαρμογή LiUS έχει πάρει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA) για την αντιμετώπιση των πρόσφατων καταγμάτων τον Οκτώβριο του 1994 και για τη θεραπεία των εγκατεστημένων ψευδαρθρώσεων τον Φεβρουάριο του 2000.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένες πρόσφατες μελέτες που υποδεικνύουν την ευεγερτική επίδραση των LiUS και σε περιπτώσεις διατακτικής οστεογένεσης²⁴⁶⁻²⁴⁸ και σπονδυλοδεσίας²⁴⁹.

Σε όλες τις παραπάνω κλινικές μελέτες, κατά τη διαδερμική εφαρμογή των LiUS, η εκπομπή των κυμάτων στην επιφάνεια του δέρματος οδηγεί στην απορρόφηση, σκέδαση και μερική ανάκλαση των υπερήχων στη διεπιφάνεια οστού μαλακών μορίων. Με τον τρόπο αυτό, η διαδερμική εφαρμογή οδηγεί σε μεγάλη εξασθένιση του σήματος

των υπερήχων εξαιτίας της απορρόφησής τους από τους παρεμβαλλόμενους μαλακούς ιστούς, η οποία είναι ανάλογη της πυκνότητας του ιστού.

Ο Hantes και συν²⁵⁰ μελέτησε για πρώτη φορά το αποτέλεσμα της διοστικής εφαρμογής των LiUS σε μοντέλο οστεοτομίας κνήμης σε πρόβατα. Για τη συγκράτηση της ανάταξης μετά την οστεοτομία χρησιμοποιήθηκε συσκευή εξωτερικής οστεοσύνθεσης, στις βελόνες της οποίας τοποθετήθηκαν μετατροπείς υπερήχων για την απευθείας μετάδοση αυτών στο οστό. Η μελέτη κατέδειξε ελάττωση κατά 23% του χρόνου που απαιτήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί ακτινολογικά η πόρωση και σημαντική αύξηση του φορτίου θραύσης, της ακαμψίας καθώς και της οστικής πυκνότητας στα ζώα που έλαβαν θεραπεία με LiUS. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν συγκριτικά με τα ζώα της ομάδας ελέγχου που δεν έλαβε θεραπεία με LiUS και αφορούν την 75^η μετεγχειρητική ημέρα.

Σε πειραματική μελέτη που ακολούθησε ο Malizos και συν²⁵¹ χρησιμοποιώντας το ίδιο μοντέλο οστεοτομίας τοποθέτησαν υπερηχητικούς μετατροπείς πάνω στην επιφάνεια του οστού υποδεικνύοντας ότι η διοστική εφαρμογή LiUS έχει θετική επίδραση στην ευόδωση της πόρωσης κατάγματος στα μακρά οστά. Η εκατοστιαία αναλογία των ζώων της ομάδας θεραπείας τα οποία εμφάνισαν ακτινολογική πόρωση ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη αναλογία των ζώων της ομάδας ελέγχου. Σε ότι αφορά την οστική πυκνότητα και τις μηχανικές ιδιότητες του νεοσχηματισθέντος πόρου, αυτές παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερες τιμές στο δείγμα που έλαβε θεραπεία με υπερήχους. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία φορητή συσκευή που αποτελεί μέρος ενός πρωτοποριακού συστήματος τηλεϊατρικής²⁵² που υποστηρίζει ταυτόχρονα την εφαρμογή των LiUS και την αυτόματη συλλογή και μετάδοση των ανακτηθέντων σημάτων, προσφέροντας και τη δυνατότητα αξιολόγησης της εξέλιξης της πόρωσης.

Οι πειραματικές αυτές μελέτες απέδειξαν ότι η χρήση υπερηχητικών μετατροπέων επί του οστού και η διοστική διάδοση των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την αποδοτικότερη μεταφορά ενέργειας στην περιοχή του κατάγματος επιταχύνοντας την σκληρότητα του πόρου, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται σημαντικά ο χρόνος της πόρωσης. Επιπλέον η εμφύτευση των υπερηχητικών μετατροπέων στην περιοχή του κατάγματος συμβάλλει ταυτόχρονα εκτός από την ευόδωση της πόρωσης και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της πόρωσης καθώς μπορούν να μετρηθούν τόσο

μηχανικές όσο και μορφολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση του πώρου.

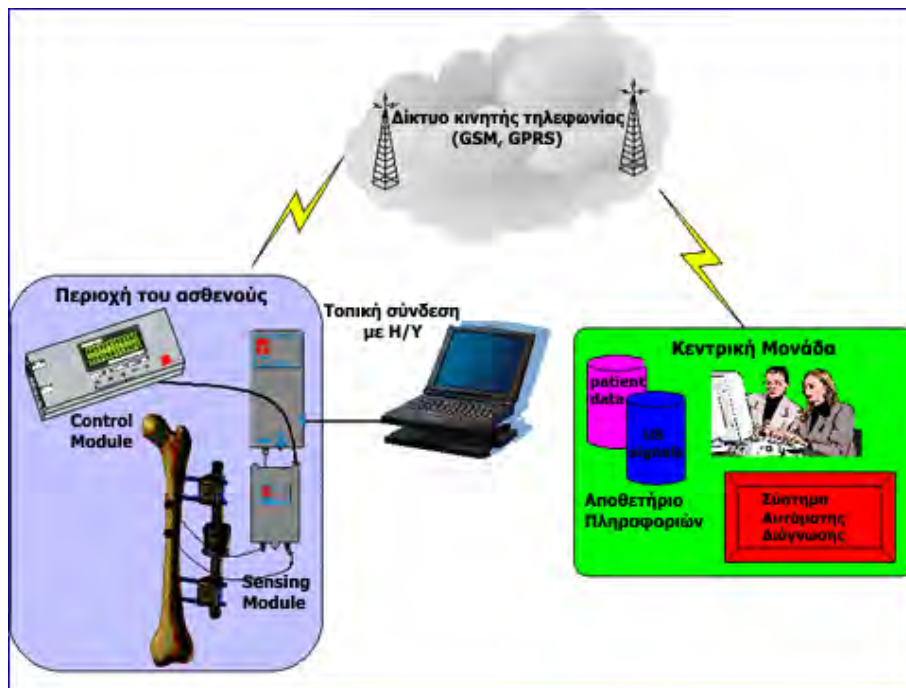
3.2 Παρακολούθηση της πώρωσης με υπερήχους χαμηλής έντασης

Μέχρι σήμερα η μέθοδος εκλογής για την παρακολούθηση της πώρωσης των καταγμάτων είναι ο συνδυασμός κλινικής εξέτασης του ασθενούς με ταυτόχρονη λήψη και αξιολόγηση ακτινογραφιών σε μια ή περισσότερες προβολές. Αυτό πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά από την αρχική αντιμετώπιση του κατάγματος. Οι παραπάνω τεχνικές είναι υποκειμενικές καθώς εξαρτώνται από τις ικανότητες, την εμπειρία και την κρίση του ορθοπαιδικού χειρουργού και επιπλέον δεν παρέχουν ποσοτική πληροφορία.

Οι υπάρχουσες τεχνικές της χρήσης των υπερήχων για την εκτίμηση της προόδου της πώρωσης των καταγμάτων των οστών στηρίζονται στις ακουστικές ιδιότητες των οστών (ταχύτητα αγωγής υπερήχων, ακουστική εμπέδηση). Η πλειοψηφία των ερευνητικών ομάδων χρησιμοποιούν την τεχνική γραμμικής ή αξονικής μετάδοσης, όπου ο ήχος διαδίδεται κατά μήκος του οστού (τεχνική μετάδοσης-λήψης στην οποία δύο ή περισσότεροι μεταλλάκτες τοποθετούνται στην επιφάνεια του δέρματος, σε γνωστή απόσταση μεταξύ τους)²⁷⁸. Πειραματικές και κλινικές μελέτες²⁷⁹⁻²⁸² έχουν καταδείξει, με την παραπάνω τεχνική, ότι η ταχύτητα διάδοσης υπερήχων διαμέσου του οστού στο πωρωθέν κάταγμα πλησιάζει το 80% της ταχύτητας στο άθικτο οστό. Ωστόσο, με την προαναφερθείσα τεχνική δεν έχει διευκρινιστεί η δυνατότητα της πρώιμης διάκρισης μεταξύ πωρωθέντων και μη πωρωθέντων οστών. Επιπρόσθετα, παρέχει μικρή δυνατότητα συσχέτισης μεταξύ της ταχύτητας και των μηχανικών ιδιοτήτων των οστών κατά τα διάφορα στάδια της πώρωσης καθώς δεν παρέχει πληροφορίες που αφορούν τη μορφολογία και τη σύσταση του πώρου.

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών που προσφέρουν ποσοτική αξιολόγηση της διαδικασίας της πώρωσης και η ανάπτυξη διαγνωστικών συστημάτων μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό βοήθημα για τους ορθοπαιδικούς στη διαχείριση των καταγμάτων. Προς αυτή την κατεύθυνση, ένα καινοτόμο σύστημα υπερήχων έχει αναπτυχθεί πρόσφατα τόσο για τη παρακολούθηση της πώρωσης, όσο και για την επιτάχυνση της διαδικασίας^{251,252}, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Το σύστημα περιλάμβανε δυο μικροσκοπικούς υπερηχητικούς μετατροπείς (transducers – κεντρικής συχνότητας 1MHz) που εμφυτεύτηκαν επί του οστού. Για την παρακολούθηση της πώρωσης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη πομπού-δέκτη κατά την οποία κύματα υπερήχων διαδίδονται διαμέσου του μακρύ άξονα του οστού (διστική διάδοση) και καταγράφονται από μια πρωτότυπη φερόμενη (wearable) συσκευή. Η συσκευή είναι ασύρματη και μεταδίδει τα συλλεγόμενα δεδομένα σε ένα κεντρικό σύστημα με χρήση του δικτύου ασύρματης τηλεφωνίας (εικ. 18,19). Στην περίπτωση που ο υπέρηχος χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό μέσο, οι δυο μετατροπείς λειτουργούν ως πομποί χαμηλής έντασης παλμικών υπερήχων (κεντρικής συχνότητας 1MHz, έντασης 35 mW/cm²).

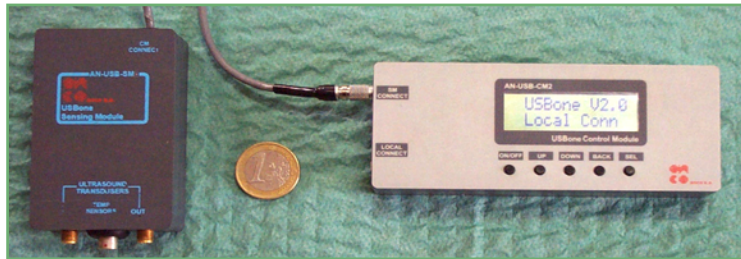


Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση συστήματος υπερήχων για την ευόδωση και την παρακολούθηση της πώρωσης²⁵¹.

Όσον αφορά στην παρακολούθηση της διαδικασίας, έχει δημιουργηθεί ένα ευρύ σύνολο δεδομένων αποτελούμενο από τις μετρήσεις υπερήχων σε διάφορες φάσεις της πώρωσης και έχει εμπλουτιστεί από σειριακές ακτινογραφίες, τη διάγνωση ορθοπαιδικών, μετρήσεις οστικής πυκνότητας και εμβιομηχανικό έλεγχο. Το σύνολο δεδομένων αντιστοιχεί σε διάφορες κλινικές περιπτώσεις τόσο πωρωμένων

(επιτυχημένων) καταγμάτων, όσο και καθυστερημένων πωρώσεων και ψευδαρθρώσεων, όπως αυτές προέκυψαν από την πειραματική μελέτη. Η μέχρι σήμερα ανάλυση των δεδομένων για το συγκεκριμένο σύστημα παρακολούθησης έχει επιδείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και οδηγεί σε σημαντικά συμπεράσματα που ο παραδοσιακός ακτινολογικός έλεγχος αδυνατεί να απεικονίσει. Η ανάλυση των σημάτων συνίσταται στον υπολογισμό των χαρακτηριστικών των σημάτων (ταχύτητα διάδοσης και μελέτη του φασματικού περιεχομένου) και πώς αυτά μεταβάλλονται μετεγχειρητικά. Η ασύρματη μετάδοση των δεδομένων στην κεντρική μονάδα μειώνει τον αριθμό των επισκέψεων του ασθενούς στο χειρουργό μετεγχειρητικά και παράλληλα καθιστά δυνατή τη διαχείριση ασθενών που βρίσκονται σε γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές.

Εικόνα 19: Φορητή συσκευή (μπορεί να βρίσκεται συνεχώς πάνω στον ασθενή- wearable device) για την ευόδωση και παρακολούθηση της πώρωσης. Αριστερά φαίνεται το δομοστοιχείο παραγωγής και λήψης υπερήχων και δεξιά το δομοστοιχείο ελέγχου^{251,252}.



Με τον τρόπο αυτό, χρήση του διοστικού συστήματος υπερήχων δίνει τη δυνατότητα να μετρηθούν τόσο μηχανικές, όσο και μορφολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση του πώρου. Η μελέτη της ακουστικής συμπεριφοράς κατεαγόντων οστών και πώς αυτή συσχετίζεται με τις μεταβολές των μηχανικών ιδιοτήτων στα διάφορα στάδια της πώρωσης μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο, παρέχοντας ποσοτικά κριτήρια στους ορθοπαιδικούς χειρουργούς για την πρόοδο της πώρωσης και τον έγκαιρο εντοπισμό επιπλοκών ενώ παράλληλα μπορεί να επιταχύνει το χρόνο θεραπείας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Σκοπός της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένη συχνότητα τραυματισμού του ΠΧΣ καθώς όλο και περισσότεροι έφηβοι και νεαροί ενήλικες συμμετέχουν σε ποικίλες αθλητικές δραστηριότητες. Η μελέτη της ανακατασκευής του ΠΧΣ αποκτά αυξημένο ενδιαφέρον δεδομένου ότι ο τραυματισμός και η αποκατάσταση αυτού του συνδέσμου επιφέρουν τόσο άμεσες όσο και μεταγενέστερες επιπτώσεις, όπως κοινωνικοοικονομικές καθώς και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρώιμης οστεοαρθρίτιδας γόνατος σε νέους ενήλικες. Στόχος της ανακατασκευής του ΠΧΣ είναι η επιστροφή στο προηγούμενο επίπεδο δραστηριότητας και λειτουργίας όσο το δυνατόν γρηγορότερα και ασφαλέστερα.

Η πάρωση των καταγμάτων αποτελεί μια σύνθετη βιολογική διεργασία κατά την οποία αποκαθίστανται σταδιακά οι μηχανικές ιδιότητες του οστού και η λειτουργικότητα του σκελετού. Η πολύπλοκη επουλωτική εξεργασία της πάρωσης στην οποία εμπλέκονται πολυάριθμα κύτταρα και γονίδια είναι χρονοβόρος διαδικασία, απαιτώντας τις περισσότερες φορές αρκετούς μήνες για την ολοκλήρωσή της. Παράλληλα, δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις εμφάνισης επιπλοκών με σημαντικές επιπτώσεις τόσο στο ψυχισμό του ασθενούς όσο και στο ευρύτερο κοινωνικοοικονομικό περιβάλλον του. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της πάρωσης απαιτεί επανειλημμένες επισκέψεις στον ορθοπαιδικό χειρουργό με ταυτόχρονη λήψη ακτινογραφιών, γεγονός που αποτελεί μια ακόμη επιβάρυνση για τον ασθενή.

Στα πλαίσια της ερευνητικής προσπάθειας ανάπτυξης μεθόδων προαγωγής και επιτάχυνσης των επουλωτικών εξεργασιών του μυσκελετικού συστήματος, ο σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής είναι διττός: α) διερεύνηση και αξιολόγηση της επίδρασης των διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης στην ευόδωση και επιτάχυνση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος μετά από πλαστική αποκατάσταση ΠΧΣ, πειραματική και κλινική μελέτη, και β) διερεύνηση και αξιολόγηση της κλινικής εφαρμογής των διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης στην επιτάχυνση της πάρωσης καταγμάτων μακρών οστών καθώς και αξιολόγηση δυνατότητας παρακολούθησης της εξέλιξης της πάρωσης.

1.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη εντάσσεται στο Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού- ΠΕΝΕΔ 2003 (έργο 03ΕΔ140) και συγχρηματοδοτείται κατά 80% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 20% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο- Υπουργείο Ανάπτυξης - Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ερευνητικού Προγράμματος Ανταγωνιστικότητα- Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Ο σχεδιασμός και η εκπόνηση της μελέτης βασίστηκε σε τρεις επιμέρους φάσεις με σκοπό την όσο δυνατόν πληρέστερη κατανόηση της επίδρασης των υπερήχων στις επουλωτικές εξεργασίες του μυσκελετικού συστήματος. Έτσι, κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης πραγματοποιήθηκε πειραματική μελέτη σε κουνέλια για τη διερεύνηση και αξιολόγηση της επίδρασης των διοστικών LiUS στην ευόδωση και επιτάχυνση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος μετά από πλαστική αποκατάσταση ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα. Μελετήθηκε η διαδικασία της συνδεσμοποίησης ενός τενοντίου μοσχεύματος κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με έλεγχο και αξιολόγηση της έκφρασης γονιδίων (TGF- β_1 , biglycan, κολλαγόνο τύπου I και tRNA^{Gly}) με ημιποσοτική RT-PCR καθώς και ιστολογική ανάλυση. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ήταν καθοριστικά για την πραγματοποίηση της δεύτερης φάσης της μελέτης, κατά την οποία διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε η κλινική εφαρμογή LiUS στην ευόδωση και επιτάχυνση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού- τενοντίου μοσχεύματος σε ασθενείς μετά από αρθροσκοπική αποκατάσταση ΠΧΣ. Η επίδραση των υπερήχων διερευνήθηκε με την αξιολόγηση των επιπέδων αυξητικών παραγόντων (TGF- β_1 , IGF) και πρωτεϊνών (OPG, sRANKL, τελοπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου I - NTx, προκολλαγόνο τύπου I) που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επουλωτική διαδικασία, με μέθοδο ELISA καθώς και με απεικονιστικό έλεγχο.

Στην τρίτη φάση μελετήθηκε η επίδραση των διοστικών LiUS στην ευόδωση και επιτάχυνση της πόρωσης καταγμάτων μακρών οστών καθώς και των συναφών επιπλοκών της και διερευνήθηκε η κλινική εφαρμογή διοστικών LiUS για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πόρωσης. Η αξιολόγηση της επίδρασης των υπερήχων πραγματοποιήθηκε με την κλινική εξέταση και τον απεικονιστικό έλεγχο από δύο τουλάχιστον παρατηρητές.

2. Α΄ Φάση– Πειραματική μελέτη επίδρασης διοστικών υπερήχων στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος

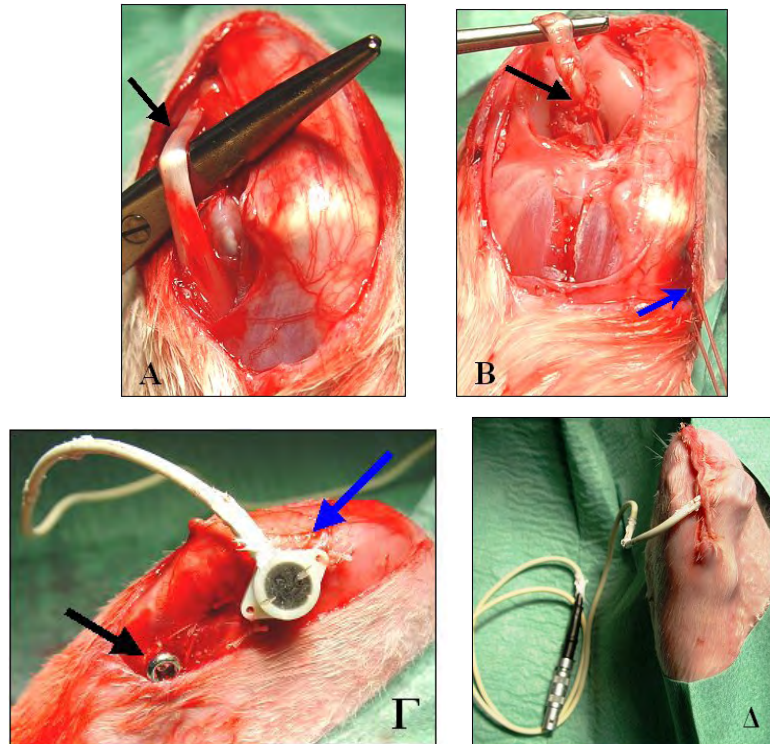
2.1 Υλικό και Μέθοδος

Το πείραμα διεξήχθη στο πειραματικό χειρουργείο-εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με το εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προϋποθέσεις που καθορίζονται από τους κανόνες της Ορθής Κλινικής Πρακτικής της Διακήρυξης του Ελσίνκι (ICH/GCP).

2.1.1 Ζωικό μοντέλο μελέτης

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 52 λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας σκελετικά ώριμα (>3 μηνών), βάρους 3.0 – 3.5 kg και κάθε κουνέλι παρέμενε σε χωριστό κλουβί. Σε όλα τα κουνέλια πραγματοποιήθηκε αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση 5mg κεταμίνης, 3 mg μιδαζολάμης και 1mg ατροπίνης (1%) και στη συνέχεια και τα δύο πόδια ξυρίστηκαν και προετοιμάστηκαν για χειρουργική επέμβαση με αποστειρωμένη τεχνική (10% povidone-iodine). Σε όλα τα κουνέλια και στα δύο γόνατα πραγματοποιήθηκε πλαστική αποκατάσταση προσθίου χιαστού συνδέσμου με ανοικτή μέθοδο με τενόντιο μόσχευμα. Μετά από μέση παραεπιγονατιδική τομή και υπό άσηπτες συνθήκες ανοίχθηκε η άρθρωση του γόνατος και ακολούθησε πλήρης εκτομή του ΠΧΣ. Ο τένοντας του μακρού εκτείνοντα τους δακτύλους μυός, χρησιμοποιήθηκε ως τενόντιο μόσχευμα, αναγνωρίστηκε μετά από ανατομικό διαχωρισμό και ακολούθησε διατομή του στο άπω όριο της μυοτενοντώδους συνένωσης ενώ η εγγύς πρόσφυσή του στο μηριαίο παρέμεινε ανέπαφη. Το οστικό τούνελ στην κνήμη δημιουργήθηκε με χειροκίνητο τρυπάνι με φρέζα διαμέτρου 2.5mm από το αποτύπωμα – σημείο κατάφυσης του φυσιολογικού ΠΧΣ με λοξή φορά και σημείο εξόδου στο πρόσθιο- πλάγιο τμήμα της εγγύς κνήμης. Στο άπω άκρο του τενοντίου μοσχεύματος τοποθετήθηκαν ράμματα Ethibond (Ethicon, INC., Somerville, NJ, USA) και στη συνέχεια το μόσχευμα

εισέρχονταν από την ενδοαρθρική πλευρά του τούνελ και έλκονταν εντός του οστικού τούνελ της κνήμης και καθηλώνονταν με τα ράμματα του άπω άκρου σε φλοιώδη βίδα με το γόνατο σε κάμψη 30° (εικ. 20A,B). Η φλοιώδης βίδα 10mm τοποθετήθηκε οριζόντια στην κνήμη ακριβώς κάτω από το σημείο εξόδου του οστικού τούνελ (εικ. 20Γ).



Εικόνα 20: Α. Διεχειρητική απεικόνιση του μακρού εκτείνοντα τους δακτύλους μυός (μαύρο βέλος). Β. Είσοδος τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ (μαύρο βέλος: άπω άκρο του μοσχεύματος με ράμματα κατά το σημείο εισόδου, μπλε βέλος: σημείο εξόδου). Γ. Καθήλωση τενοντίου μοσχεύματος σε βίδα (μαύρο βέλος) ακριβώς κάτω από σημείο εξόδου του τούνελ. Εμφύτευση υπερηχητικού μετατροπέα επί του οστού κατά μήκος οστικού τούνελ (μπλε βέλος). Δ. Συρραφή δέρματος και παραμονή καλωδίου υπερηχητικού μετατροπέα εκτός του δέρματος.

Η μελέτη σχεδιάστηκε με επικέντρωση μόνο στο οστικό τούνελ στην κνήμη και δεν δημιουργήθηκε οστικό τούνελ στο μηριαίο και για το λόγο αυτό το εγγύς τμήμα του τενοντίου μοσχεύματος παρέμεινε ανέπαφο. Στη συνέχεια εμφυτεύτηκε ο ειδικά κατασκευασμένος υπερηχητικός μετατροπέας (Lead Metaniobate piezoelectric material, custom product, Valley Fisher Corp., Hopkinton, MA, USA)^{251,252} επί του οστού, πάνω στο περίοστεο της κνήμης, κατά μήκος της επιφάνειας του οστικού τούνελ στην κνήμη, ο οποίος καθηλώθηκε με ράμματα Ethibond μέσω των ειδικών εγκοπών στην πάνω επιφάνεια του περιβλήματός του (εικ. 20Γ). Ακολούθησε έκπλυση της άρθρωσης του

γόνατος και σύγκλειση ιστών κατά στρώματα. Κατά τη συρραφή του δέρματος το καλώδιο σύνδεσης του υπερηχητικού μετατροπέα με τη συσκευή παραγωγής υπερήχων παρέμενε εκτός του δέρματος (εικ. 20Δ).

Σε όλα τα κουνέλια χορηγήθηκε μία δόση 0.2ml μελοξικάμης (Metagam) υποδόρια για την ανακούφιση από το μετεγχειρητικό άλγος και προφυλακτική αντιβίωση 0.2ml ενροφλοξασίνη (Baytril, Bayer) υποδόρια για 5 ημέρες. Κάθε κουνέλι επέστρεφε στο χωριστό κλουβί του και η γενική κατάσταση των κουνελιών καθώς και η κατάσταση του τραύματος τοπικά παρακολουθούνταν καθημερινά από κτηνίατρο.

2.1.2 Διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης

Στο δεξί γόνατο όλων των κουνελιών εφαρμόζονταν διοστικοί LiUS και αποτελούσαν την ομάδα θεραπείας. Η διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης πραγματοποιούνταν καθημερινά από την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα μέχρι την ημέρα της θυσίας των κουνελιών και η κάθε συνεδρία διαρκούσε 20 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της συνεδρίας, ο εμφυτευμένος υπερηχητικός μετατροπέας συνδέονταν μέσω του καλωδίου του με τη συσκευή, η οποία διεγείρει το μετατροπέα να παράγει υπερήχους χαμηλής έντασης (εικ. 21). Το εκπεμπόμενο σήμα των υπερήχων αποτελείτο από ριπές ημιτονοειδών κυμάτων διάρκειας 200μsec, κεντρικής συχνότητας 1MHz, ρυθμού επανάληψης παλμού 1KHz και μέσης χωρικής και χρονικής έντασης 30mW/cm². Στο αριστερό γόνατο όλων των κουνελιών δεν εφαρμόστηκαν διοστικοί LiUS και αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Αμέσως μετά την εφαρμογή LiUS το δεξί γόνατο ελέγχονταν για τυχόν τοπικές επιπλοκές. Δεν παρατηρήθηκε λοίμωξη του τραύματος στο σημείο εξόδου του καλωδίου ούτε κάποια άλλη τοπική ή συστηματική επιπλοκή.

2.1.3 Θυσία πειραματόζωων – Δειγματοληψίες

Τα 52 κουνέλια θυσιάστηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μετά από 1,2,5,7,9,12,14,17 και 21 ημέρες διοστικής εφαρμογής LiUS. Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με ενδοφλέβια έγχυση θανατηφόρου δόσης πεντοθάλης. Μετά τη θυσία, συλλέχθηκαν με χειρουργικό ανατομικό διαχωρισμό από κάθε πειραματόζωο δείγματα μοσχευμάτων που βρίσκονταν εντός του οστικού τούνελ και από τα δύο γόνατα, ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου. Τα δείγματα 36 πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκαν για

βιοχημική ανάλυση με ημιποσοτική RT- PCR ενώ τα δείγματα 16 πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική ανάλυση.















Εικόνα 21: Απεικόνιση κατά τη διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης σε πειραματόζωο- κουνέλι.

2.1.4 Απομόνωση RNA

Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKE GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) και ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA με kit απομόνωσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας (Total RNA Isolation kit Nucleospin RNA II, MACHEREY-NAGEL). Η διαδικασία απομόνωσης είναι βασισμένη στην μέθοδο των Chomczynski και Sacchi ²⁸³ στην οποία χρησιμοποιείται στο αρχικό στάδιο της ομογενοποίησης ιστού και εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων, όξινο φαινολικό διάλυμα θειοκυανικής γουανιδίνης. Συνοπτικά η διαδικασία φαίνεται στην εικόνα 22. Αρχικά περίπου 30 mg από κάθε δείγμα ομογενοποιούνται με την προσθήκη 350 μ L διαλύματος RA1 παρουσία 3.5 μ L β -μερκαπτοαιθανόλης. Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε ειδικές στήλες οι οποίες επιτρέπουν το φιλτράρισμα του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διηθημένο μίγμα μεταφέρεται σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες erpedorf, στο οποίο προστίθενται 0.350 ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί δέσμευση του ολικού RNA σε στήλες μικρές χρωματογραφίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση τυχόν αλάτων με ειδικό διάλυμα (Membrane Desalting Buffer, MDB) και επώαση του δείγματος παρουσία DNAασης I , για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή

επιμόλυνση του δείγματός μας με γονιδιωματικό DNA, γεγονός το οποίο θα επηρέαζε την τελική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR. Ακολουθούν σταδιακές φυγοκεντρήσεις του δείγματος κατά τις οποίες απομακρύνονται τα υποπροϊόντα της πέψης με την DNAασης I και τέλος ακολουθεί έκλυση του ολικού RNA του δείγματος με H₂O ελεύθερο ριβονουκλεασών (RNase-free ή DEPC-treated water).

1	Homogenization of sample		30 mg
2	Cell Lysis		350 µl RA1 3.5 µl β-mercaptoethanol Mix
3	Filtration of lysate	 	1 min 11,000 x g
4	Adjust RNA binding conditions		350 µl 70 % ethanol
5	Bind RNA	 	30 sec 8,000 x g
6	Desalt silica membrane		350 µl MDB 1 min 11,000 x g
7	Digest DNA		95 µl DNase reaction mixture RT 15 min
8	Wash and Dry silica membrane	  	1 st wash 200 µl RA2 2 nd wash 600 µl RA3 3 rd wash 250 µl RA3 1 st and 2 nd 30 sec 8,000 x g 3 rd 2 min 11,000 x g
9	Elute highly pure RNA	 	60 µl H ₂ O (RNase free) 1 min 11,000 x g

Εικόνα 22: Συνοπτική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης RNA.

Κάθε δείγμα RNA που απομονώνεται ελέγχεται για τυχαία υδρόλυση μετά από ανάλυση τόσο σε πηκτή αγαρόζης 0,8% όσο και σε πηκτή αγαρόζης 1,2% παρουσία

φορμαλδεΐδης. Κάθε δείγμα ολικού RNA φυλάσσεται μετά την απομόνωση στους -80°C για την αποφυγή τυχαιάς υδρόλυσης.

2.1.5 Σχεδιασμός εκκινητών

Επιλέχθηκαν για τη μελέτη έκφρασης τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν: TGF- β 1, κολλαγόνο τύπου I, biglycan και tRNA^{Gly}. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το 28S rRNA στον υπό μελέτη οργανισμό.

Μετά από μελέτη των διαθέσιμων αλληλουχιών των γονιδίων αυτών από τη βάση δεδομένων GenBank του NCBI, δημιουργήθηκαν ομοπαράθεσεις (alignments) με άλλες γνωστές αλληλουχίες των γονιδίων αυτών από θηλαστικά (π.χ. ποντίκι, πρόβατο, βόδι). Οι ομοπαράθεσεις αυτές υπέδειξαν εξελικτικά συντηρημένες περιοχές για τις οποίες σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers). Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον πίνακα 2.

2.1.6 Σύνθεση cDNA – Ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων

Όλα τα δείγματα ολικού RNA φωτομετρούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του σε κάθε δείγμα. Από αυτά δημιουργήθηκαν διαλύματα RNA 5 μg με DEPC. Ακολούθησε η σύνθεση cDNA με δύο τρόπους: είτε απευθείας χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές για κάθε γονίδιο, με ταυτόχρονη ενίσχυση του κάθε μορίου cDNA που παράγεται με την βοήθεια PCR σε ένα στάδιο (One step RT-PCR), είτε με χρησιμοποίηση αρχικά ως εκκινητή oligodT₍₁₈₎ έτσι ώστε όλα τα αρχικά μόρια mRNA να μετατραπούν σε cDNA και να ακολουθήσει ένα δεύτερος κύκλος ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων με PCR σε ένα δεύτερο στάδιο χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές. Η πρώτη μέθοδος βασίστηκε στην χρησιμοποίηση του συστήματος Robus T II RT-PCR kit (FINNZYMES). Εξασφαλίζει την σε ένα βήμα παραγωγή ενισχυμένων τμημάτων cDNA χωρίς να μεσολαβούν δύο βήματα για την ανίχνευση του τελικού προϊόντος. Ακολούθως τα τελικά προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 2% και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αποτυπώνεται με ψηφιακή φωτογράφιση σε σύστημα ανάλυσης εικόνας VILBER-LURMAT TP-001-FDC.

Η δεύτερη μέθοδος η οποία βασίζεται στην ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων σε δύο βήματα περιλαμβάνει την αρχική σύνθεση ολικού cDNA σε μίγμα αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Τα προϊόντα της αντίδρασης φωτομετρώνται (A260) για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης cDNA η οποία θα χρησιμοποιηθεί στο δεύτερο στάδιο ενίσχυσης μέσω PCR. Ακολούθως τα τελικά προϊόντα αναλύονται σε πηκτική αгарόζης 2% και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αποτυπώνεται με ψηφιακή φωτογράφιση σε σύστημα ανάλυσης εικόνας VILBER-LURMAT TP-001-FDC. Όλα τα δείγματα φυλάσσονται για περαιτέρω αναλύσεις στους -20°C .

Γονίδιο	Θερμοκρασία υβριδοποίησης ($^{\circ}\text{C}$)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αλληλουχία εκκινητή (5' to 3')	GenBank accession number
TGF- β 1	55	268	F-CGGCAGCTGTACATTGACTT R-AGCGCACGATCATGTTGGAC	AF020217
Biglycan	61	406	F-CGGCAGCTGTACATTGACTT R-GGTTGTTGAAGAGGCTGATGCCG	AF020290
Collagen type I	60	480	F-GACTTCTACAGGGCTGACCAGCCTC R-GCAATGCTGTTCTTGCAGTGGTAGG	D49399
tRNA ^{Gly}	53		F-GCGGGTGTATAATGGC R-TGATGGGAATCGAACCC	SA65TCC2
28S rRNA	61	510	F-CATTGTGAAGCAGAATTCACCAAGC R-GCTCTGCTACGTACGAAACCCCG	AF460236

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μόριο με βάση Οι αντίστοιχα τμήματα mRNA ή cDNA από το *Oryctolagus cuniculus* τα οποία έχουν κατατεθεί στην δημόσια βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.1.7 Ημι-ποσοτική RT-PCR

Η RT-PCR αντίδραση (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction- Αντίστροφης Μεταγραφής - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος μέσω της οποίας μπορούν να ανιχνευθούν μικρά ποσά RNA χάρη στην αντίστροφη μεταγραφή. Παρόλα αυτά, η ακριβής ποσοτικοποίηση δεν είναι πάντα

εφικτή με την απλή PCR μιας και το ποσό του ενισχυμένου προϊόντος δεν αντανακλά απαραίτητα την ποσότητα του μορίου που υπάρχει αρχικά στην αντίδραση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην «φάση κορεσμού» της PCR η οποία προκαλείται από:

- Απενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης
- Έλλειψη του νουκλεοτιδικού υποστρώματος
- Έλλειψη εκκινητών
- Αναστολή του πυροφωσφορικού άλατος
- Επανασυγκόλληση εκκινητών σε ήδη ενισχυμένα cDNA

Στη διάρκεια αυτής της φάσης, αποκτάται περίπου η ίδια ποσότητα ενισχυμένων προϊόντων, μετά το πέρας αρκετών PCR επαναλήψεων. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, απαιτείται η εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου PCR για το κάθε μόριο ξεχωριστά, έτσι ώστε να αποκτάται επαρκής ποσότητα προϊόντος κατά την εκθετική φάση. Για όλα τα μόρια πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές αντιδράσεων σε τρεις επαναλήψεις η καθεμιά. Στην πρώτη σειρά σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 250 μg cDNA και στη δεύτερη 500 μg cDNA.

Μετά το πέρας των 15 κύκλων και για κάθε 3 κύκλους αφαιρούνταν 5μl από το μίγμα της αντίδρασης. Σε κάθε νέο δείγμα προσθέτονταν 3μl loading buffer και διατηρούνταν στους 4 °C μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

Όταν ολοκληρώνονταν και η τελευταία δειγματοληψία, τα δείγματα αναλύονταν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Τα ηλεκτροφορήματα φωτογραφίζονταν και αποθηκεύονταν ηλεκτρονικά. Στη συνέχεια με βάση τη μεθοδολογία της πυκνομετρίας η εικόνα αναλύονταν και τελικά καθορίζονταν ο επιθυμητός αριθμός των κύκλων για κάθε μόριο. Η ανάλυση όλων ψηφιακών εικόνων έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageQUANT TL 2005 (AMERSHAM Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Η τιμή της πυκνομετρίας για κάθε ζώνη λογαριθμοποιήθηκε (Log pixel) και ακολούθησε αφαίρεση του background.

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, για την ακριβή μέτρηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων – στόχων στα κύτταρα, τα επίπεδα cDNA που εφαρμόζονται κανονικοποιούνται σε ένα πάγιο ποσό. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική RT-PCR και ενισχύοντας ένα εσωτερικό μόριο αναφοράς (internal standard). Το γονίδιο 28S rRNA είναι ένα μόριο το οποίο μπορεί εύκολα να

παίζει αυτό το ρόλο μιας και εκφράζεται σε όλα τα είδη κυττάρων και σε μεγάλη ποσότητα. Εφ' όσον το γονίδιο στόχος και το γονίδιο αναφοράς ενισχύονται μέσω της RT-PCR, στη συνέχεια τοποθετούνται στην ίδια θέση στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Από κάθε ηλεκτροφόρημα και με τη μέθοδο της πυκνομετρίας, υπολογίστηκε ο λόγος του σήματος μεταξύ του εκφραζόμενου γονιδίου-στόχου και του εκφραζόμενου γονιδίου-αναφοράς.

2.1.8 Ιστολογική ανάλυση

Σε δείγματα τενοντίου μοσχεύματος εντός του οστικού τούνελ που προέρχονταν και από τις δύο ομάδες (ομάδα θεραπείας και ελέγχου) από 16 πειραματόζωα πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση μετά τη θυσία τους κατά την 1^η, 2^η και 3^η εβδομάδα μετεγχειρητικά. Τα δείγματα και των δύο ομάδων μονιμοποιήθηκαν για 48 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφατικής φορμαλίνης πριν την απασβέστωση σε 10% μυρμηκικό οξύ. Ακολούθησε κοπή του οστικού τούνελ της κνήμης σε λεπτές τομές 5mm για την σκλήνωση σε παραφίνη. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργήθηκαν σειρές διαδοχικών κύβων (blocks) παραφίνης που περιείχαν τους ιστούς στην περιοχή της διεπιφάνειας οστού-τενοντίου μοσχεύματος στην κνήμη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τομές πάχους 3μm με μικροτόμο Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Ακολούθησε χρώση όλων των διαδοχικών τομών των ιστών με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, με Masson trichrome και χρώση με Gordon Sweet reticulin.

Κατά την ιστολογική ανάλυση αξιολογήθηκε ο βαθμός ενσωμάτωσης του μοσχεύματος εντός του οστικού τούνελ, η αγγείωση στη διεπιφάνεια οστού –τενοντίου μοσχεύματος, ο προσανατολισμός των ινών κολλαγόνου στη διεπιφάνεια καθώς και γενικότερα η ποιότητα του τενοντίου μοσχεύματος εντός του οστικού τούνελ. Τα ιστολογικά δείγματα εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν αρχικά τυφλά, ανεξάρτητα από την ομάδα την οποία προέρχονταν (ομάδα θεραπείας ή ομάδα ελέγχου) καθώς και της χρονικής περιόδου μετεγχειρητικά (1^η, 2^η ή 3^η εβδομάδα).

2.1.9 Στατιστική ανάλυση

Μετά από εξομάλυνση όλων των δεδομένων από την RT-PCR και αφού υπολογίστηκε η ίδια ποσότητα υλικού που χρωματογραφήθηκε σε πηκτή, προχωρήσαμε

σε συγκριτικό ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR και υπολογίσαμε το σχετικό λόγο έκφρασης των γονιδίων μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας θεραπείας. Η σύγκριση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε και αξιολογήθηκε με τη χρήση T-test για ζευγαρωτές παρατηρήσεις. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ηλεκτρονικού στατιστικού πακέτου SPSS v13.0. (στατιστικά σημαντικές τιμές $P < 0.05$).

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 Προσδιορισμός παραμέτρων ημι-ποσοτικής PCR

Ο αρχικός σκοπός μας ήταν η εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου PCR για το κάθε μόριο ξεχωριστά, ώστε να αποκτάται ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Για την εύρεση του κατάλληλου αριθμού κύκλων της PCR για το κάθε υπό μελέτη μόριο καθώς και του 28SrRNA έγιναν έξι δειγματοληψίες, μεταξύ του 10⁰⁰ και του 35⁰⁰ κύκλου της αντίδρασης. Βάση της καμπύλης επιλέχθηκε η αντίδραση να εξελίσσεται για 30 κύκλους, σημείο που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης και εξασφαλίζει ικανοποιητική συσσώρευση προϊόντος.

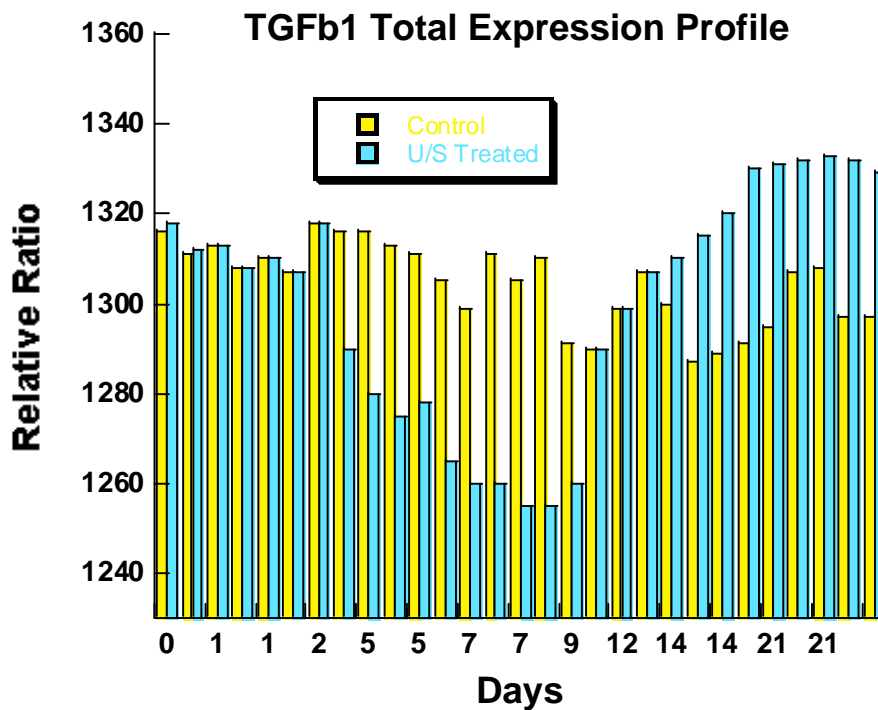
2.2.2 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων

Σε όλα τα δείγματα των τενοντίων μοσχευμάτων και από τις δύο ομάδες, ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου, εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων TGF-β₁, biglycan, κολλαγόνο τύπου I και tRNA^{Gly} καθώς και του γονιδίου αναφοράς 28SrRNA.

Όλα τα επίπεδα μεταγράφων εξομαλύνθηκαν συγκρίνοντάς τα με το συνεχώς και σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο που κωδικοποιεί το 28SrRNA, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω. Η ανάλυση όλων των ψηφιακών εικόνων έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageQUANT TL 2005. Η τιμή της πυκνομετρίας για κάθε ζώνη λογαριθμοποιήθηκε (Log pixel) και ακολούθησε αφαίρεση του υποστρώματος background.

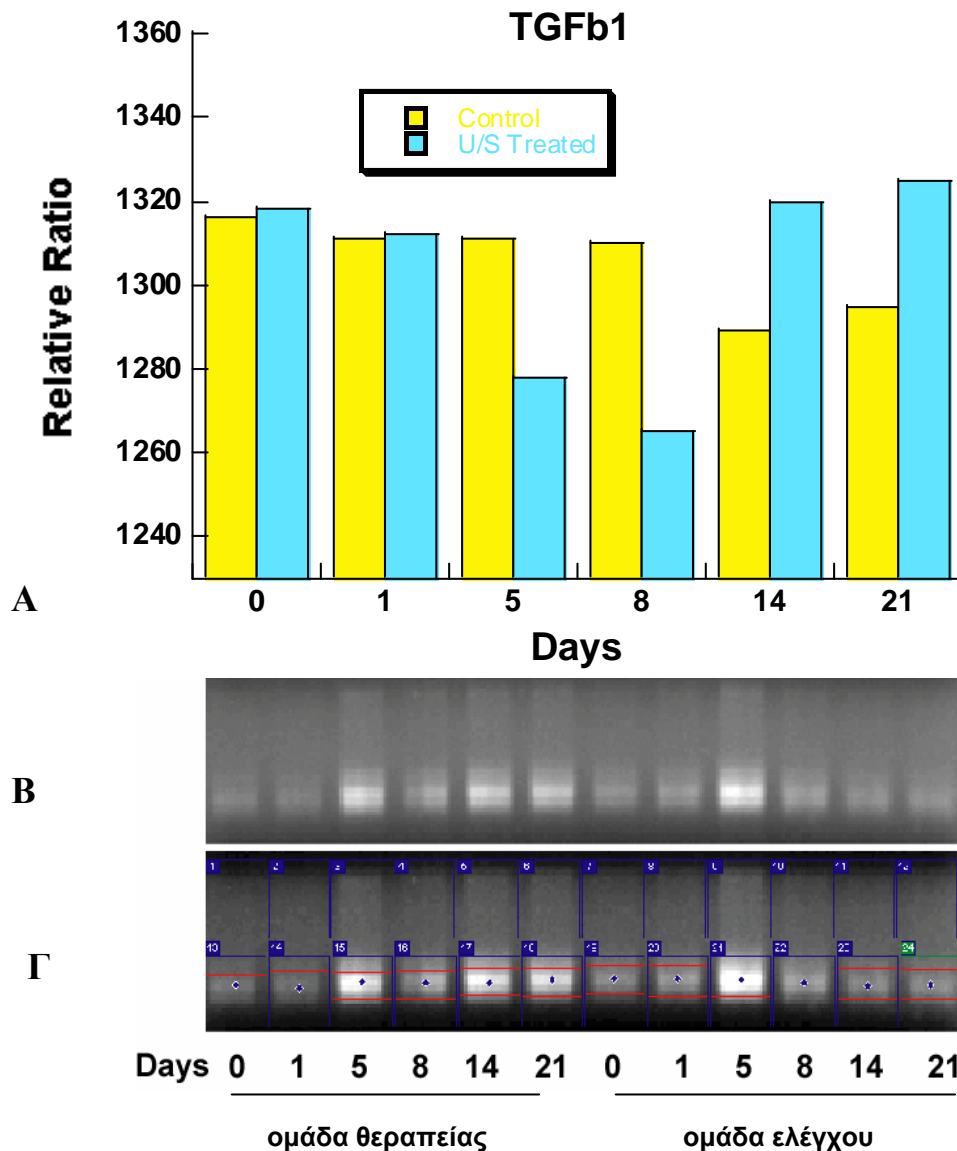
TGF-β₁

Σε όλα τα δείγματα των τενοντίων μοσχευμάτων και των δύο ομάδων εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων TGF-β₁ και 28S rRNA με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR (εικ. 23,24,25). Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ένταση του εκάστοτε σήματος, οι τιμές λογαριθμοποιήθηκαν και τέλος υπολογίστηκε ο σχετικός λόγος έκφρασης (relative ratio) των δύο γονιδίων.



Εικόνα 23: Επίπεδα έκφρασης mRNA του TGF-β₁ στο σύνολο όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στις δύο ομάδες. (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, γαλάζιο: ομάδα θεραπείας)

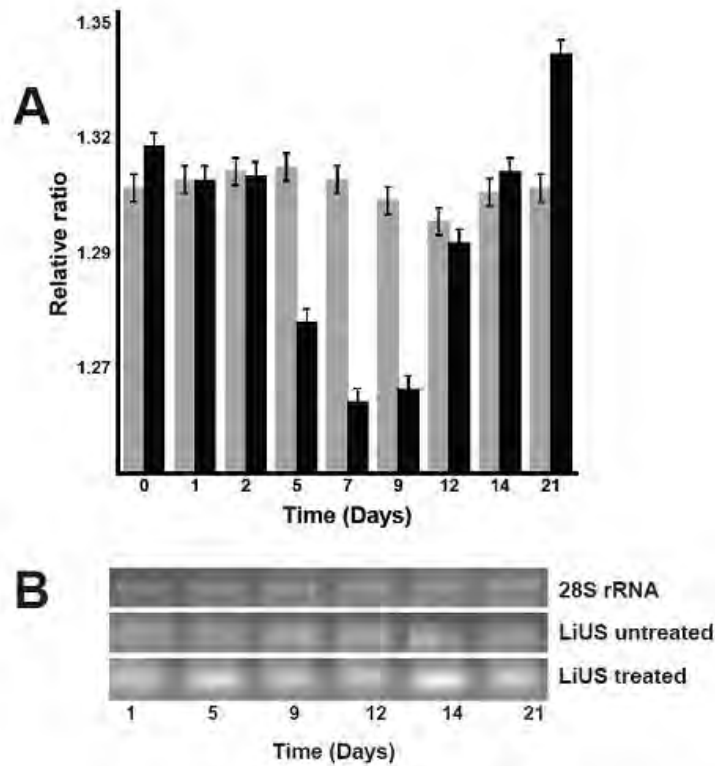
Από τα αποτελέσματα του TGF-β₁ όπως παρουσιάζονται στην εικ. 25 είναι φανερό ότι κατά την αρχική φάση της εφαρμογής υπερήχων τα επίπεδα έκφρασης του TGF-β₁ είναι λίγο υψηλότερα στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (~10%). Στη συνέχεια τα επίπεδα του TGF-β₁ στην ομάδα θεραπείας μειώνονται ελαφρώς και τη 2^η ημέρα είναι σχεδόν ίδια με τα αυτά της ομάδας ελέγχου. Από την 5^η ως την 12^η ημέρα παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του TGF-β₁ στην ομάδα θεραπείας.



Εικόνα 24: Α. Ενδεικτικά επίπεδα έκφρασης mRNA του TGF- β_1 από ένα δείγμα ανά ημέρα και στις δύο ομάδες (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, γαλάζιο: ομάδα θεραπείας) Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ιστογράμματος. Γ. Φωτογραφία του ίδιου ηλεκτροφορήματος μετά από επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας με το πρόγραμμα ανάλυσης ImageQUANT TL 2005.

Ιδιαίτερα, μεταξύ της 5^{ης} και 9^{ης} ημέρας μόνο το 40% των επιπέδων έκφρασης της ομάδας ελέγχου παρατηρείται στην ομάδα θεραπείας (0-9 ημέρα, $p=0.001$). Μετά τη 12^η ημέρα η έκφραση του TGF- β_1 στην ομάδα θεραπείας επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα και στη συνέχεια από τη 14^η ημέρα αυξάνεται βαθμιαία μέχρι την 21^η ημέρα. Σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA του TGF- β_1 (30%) παρατηρούνται στην ομάδα

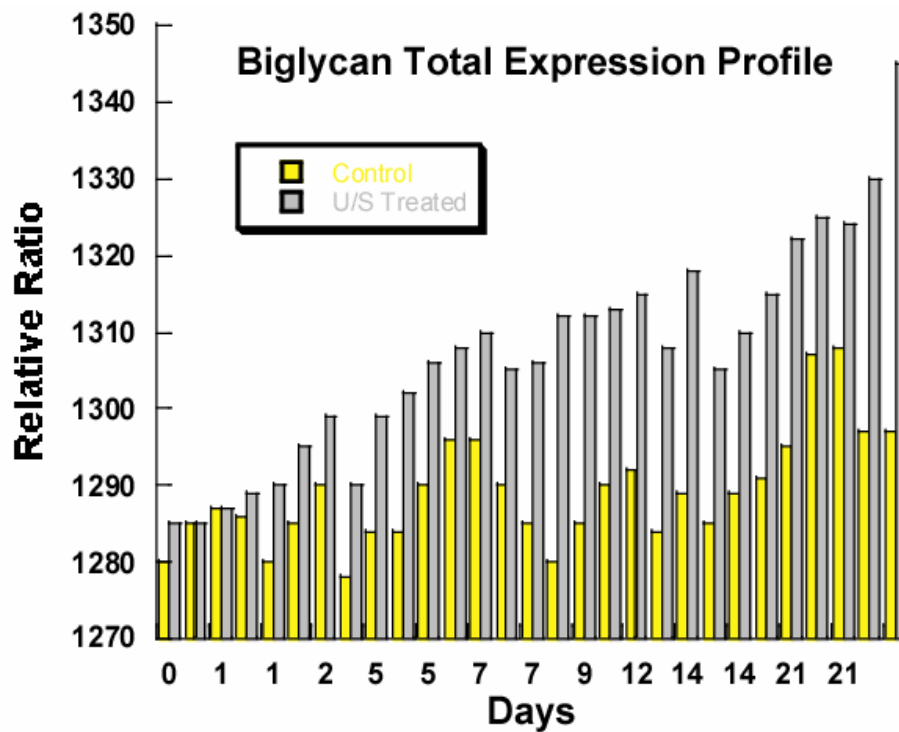
θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου από την 14^η ως την 21^η ημέρα (12-21 ημέρα, $p=0.003$). Στην ομάδα ελέγχου δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή της έκφρασης του TGF- β_1 και τα επίπεδα του παρέμειναν σχεδόν σταθερά κατά τη διάρκεια των 21 ημερών.



Εικόνα 25: Αλλαγές επιπέδων έκφρασης mRNA του TGF- β_1 . Α. Μέσος όρος επιπέδων έκφρασης mRNA του TGF- β_1 όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (γκρι χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (μαύρο χρώμα). Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος αποτελεσμάτων RT-PCR για TGF- β_1 και στις δύο ομάδες (ομάδας ελέγχου- LiUS untreated και ομάδας θεραπείας- LiUS treated) και για 28SrRNA.

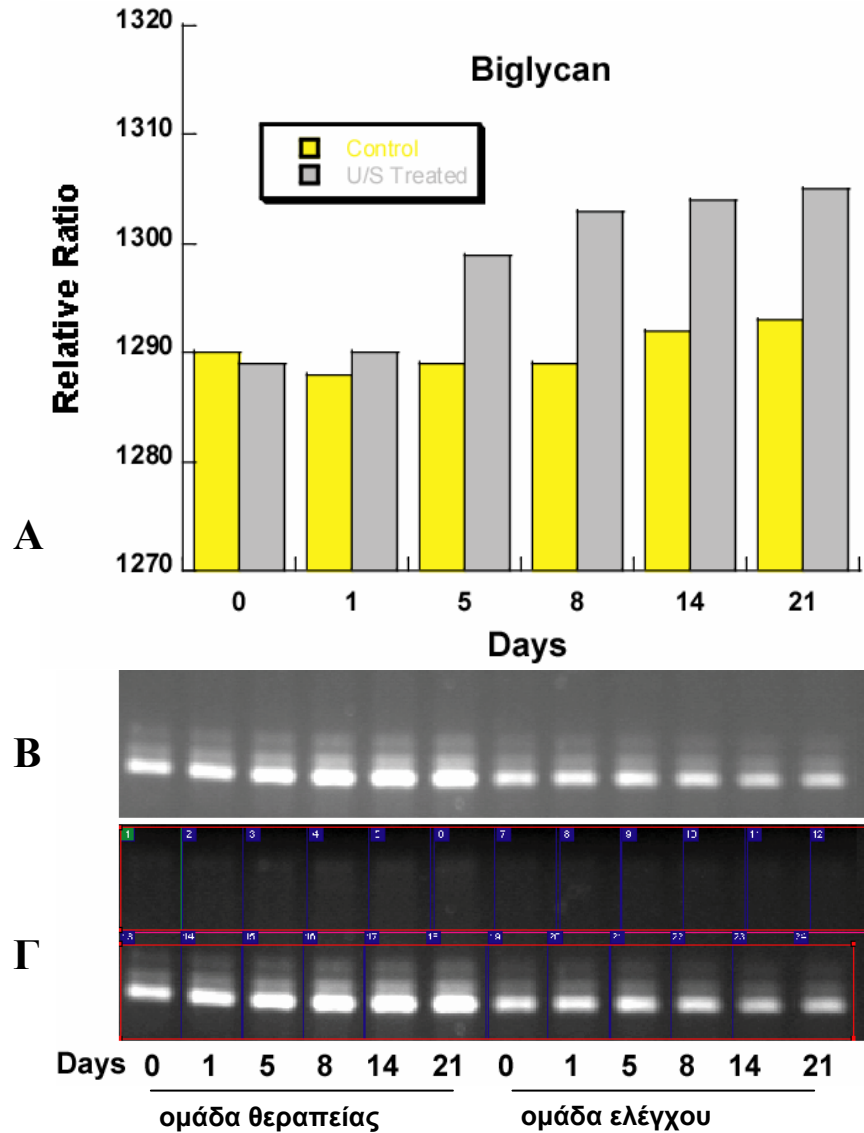
Biglycan

Σε όλα τα δείγματα των τενοντίων μοσχευμάτων και των δύο ομάδων εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων biglycan και 28SrRNA με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR (εικ. 26,27,28). Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ένταση του εκάστοτε σήματος, οι τιμές λογαριθμοποιήθηκαν και τέλος υπολογίστηκε ο σχετικός λόγος έκφρασης (relative ratio) των δύο γονιδίων.

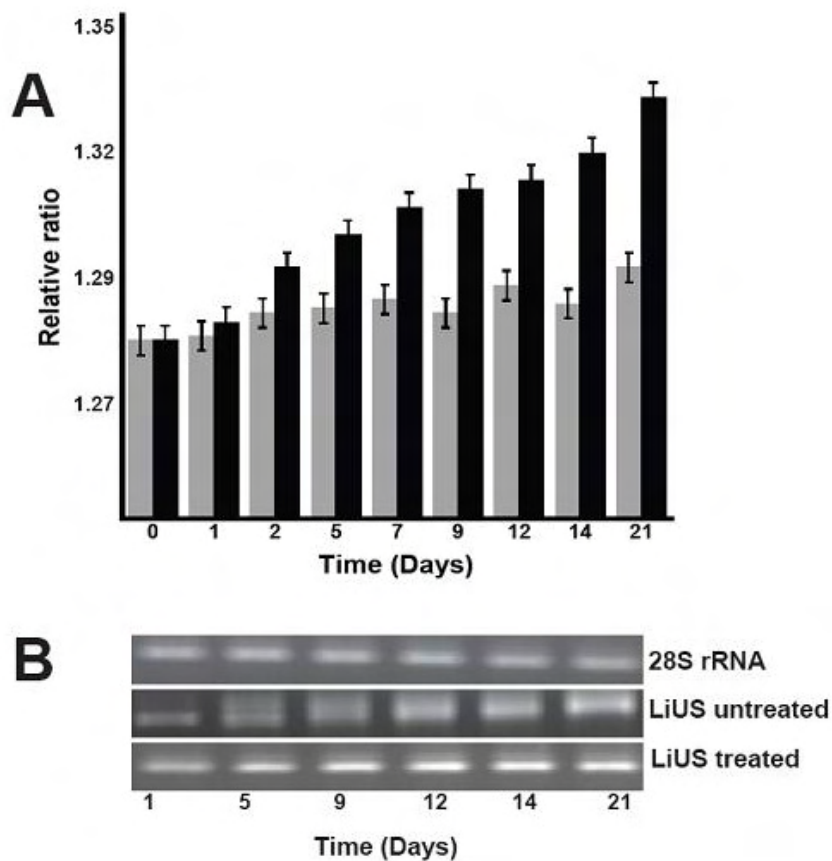


Εικόνα 26: Επίπεδα έκφρασης mRNA της biglycan στο σύνολο όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στις δύο ομάδες (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, γκρι: ομάδα θεραπείας).

Από τα αποτελέσματα της έκφρασης biglycan όπως παρουσιάζονται στην εικ. 27 φαίνεται ότι τα επίπεδα mRNA της biglycan αυξάνονται προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου και στις δύο ομάδες. Ωστόσο, τα επίπεδα μεταγραφής για την biglycan στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (~50% την 21^η ημέρα, $p=0.003$).



Εικόνα 27: Α. Ενδεικτικά επίπεδα έκφρασης mRNA της biglycan από ένα δείγμα ανά ημέρα και στις δύο ομάδες (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, γκρι: ομάδα θεραπείας) Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ιστογράμματος. Γ. Φωτογραφία του ίδιου ηλεκτροφορήματος μετά από επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας με το πρόγραμμα ανάλυσης ImageQUANT TL 2005.



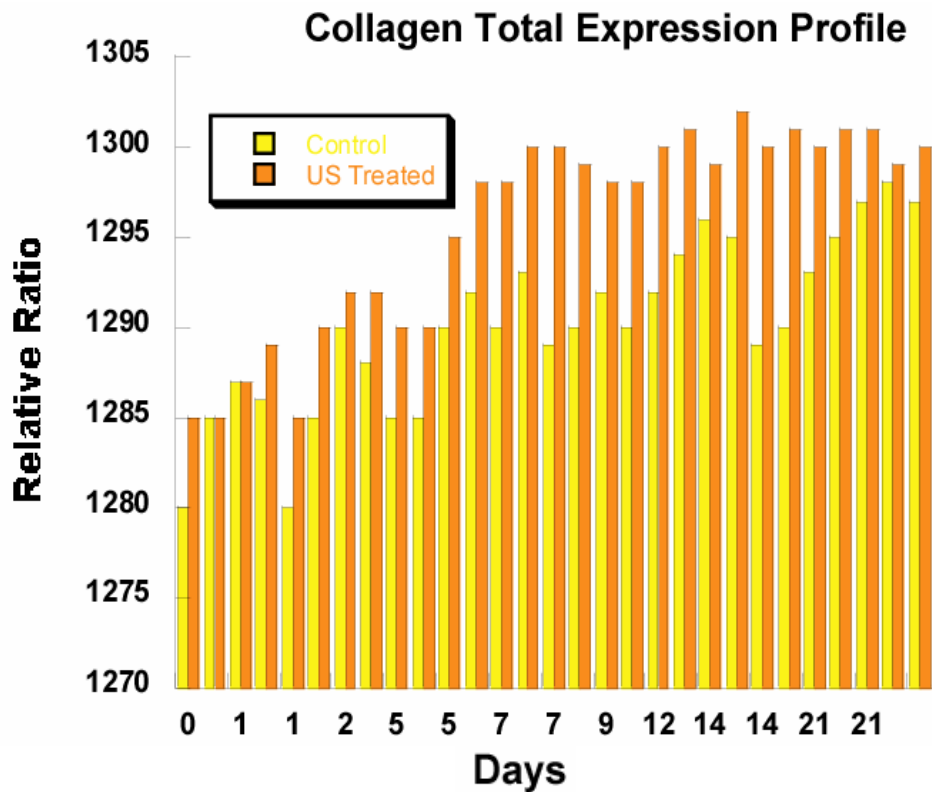
Εικόνα 28: Αλλαγές επιπέδων έκφρασης mRNA της biglycan. A. Μέσος όρος επιπέδων έκφρασης mRNA της biglycan όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (γκρι χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (μαύρο χρώμα). Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. B. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος αποτελεσμάτων RT-PCR για biglycan και στις δύο ομάδες (ομάδας ελέγχου- LiUS untreated και ομάδας θεραπείας- LiUS treated) και για 28SrRNA.

Κολλαγόνο τύπου I

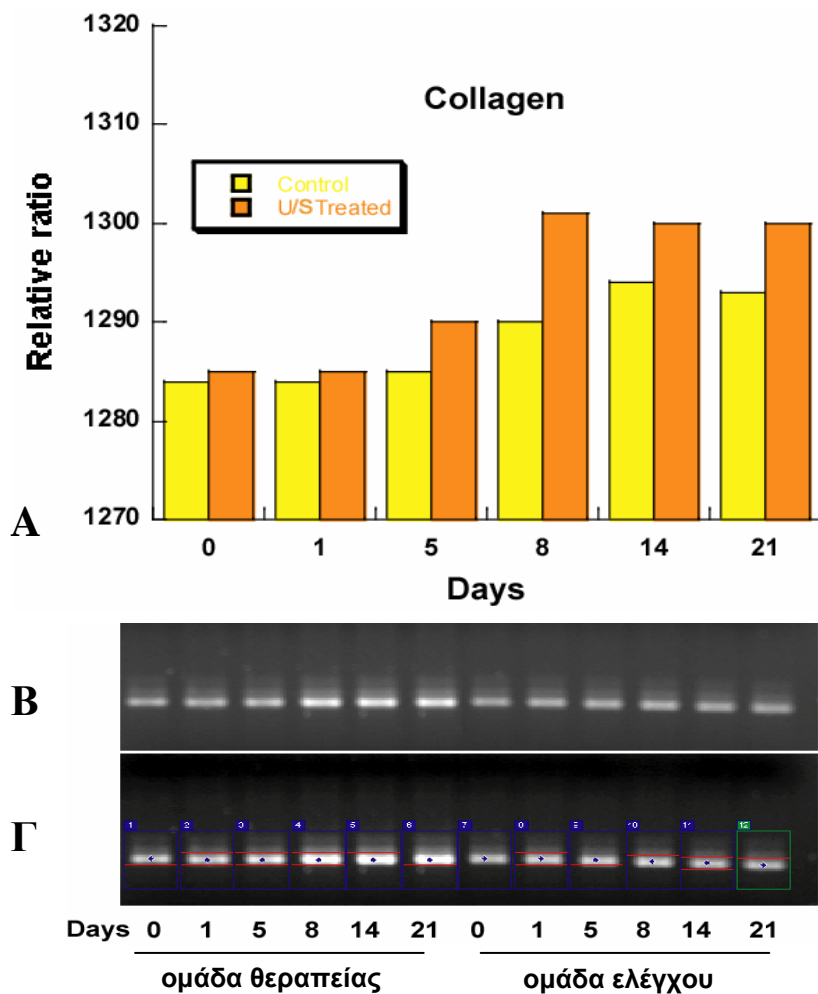
Σε όλα τα δείγματα των τενοντίων μοσχευμάτων και των δύο ομάδων εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων κολλαγόνου τύπου I και 28SrRNA με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR (εικ. 29,30,31). Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ένταση του εκάστοτε σήματος, οι τιμές λογαριθμοποιήθηκαν και τέλος υπολογίστηκε ο σχετικός λόγος έκφρασης (relative ratio) των δύο γονιδίων.

Όταν συγκρίναμε τα επίπεδα mRNA για biglycan και κολλαγόνο τύπου I και στις δύο ομάδες, παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων ακολουθούν

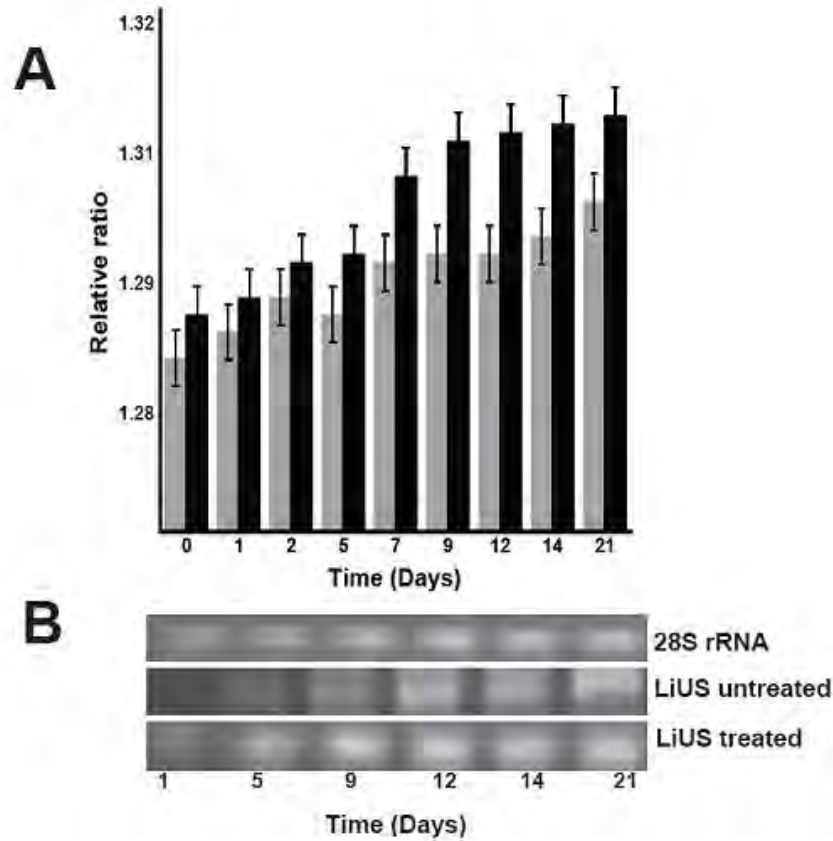
την ίδια πορεία. Όμοια με την biglycan τα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου τύπου I αυξάνονται βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου και στις δύο ομάδες. Τα επίπεδα έκφρασης του κολλαγόνου τύπου I στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (20%, $p=0.001$). Ωστόσο, η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του κολλαγόνου τύπου I μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας θεραπείας δεν ήταν τόσο μεγάλη όσο παρατηρήθηκε στην biglycan.



Εικόνα 29: Επίπεδα έκφρασης mRNA του κολλαγόνου τύπου I στο σύνολο όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στις δύο ομάδες (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, πορτοκαλί: ομάδα θεραπείας).



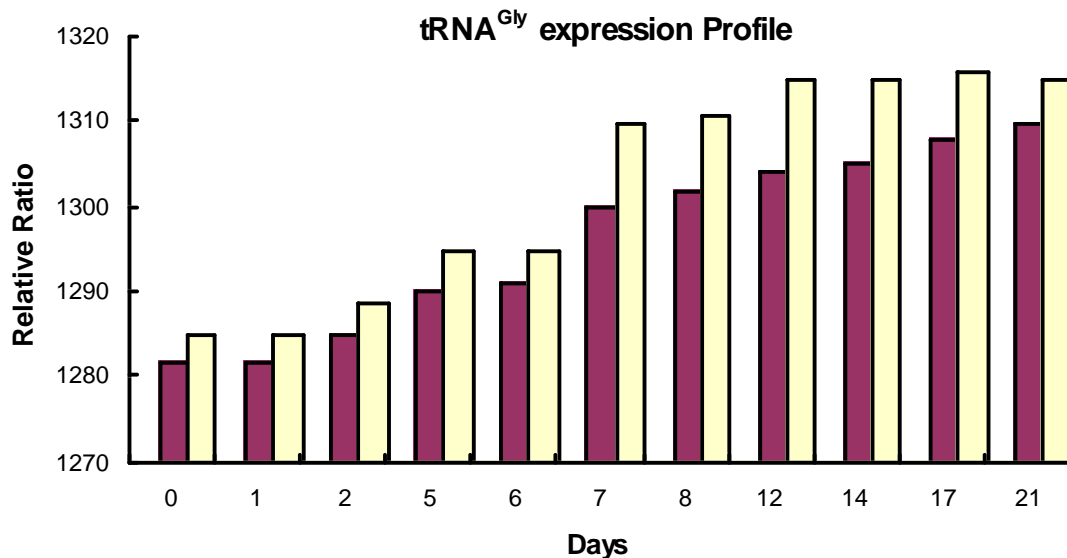
Εικόνα 30: Α. Ενδεικτικά επίπεδα έκφρασης mRNA του κολλαγόνου τύπου I από ένα δείγμα ανά ημέρα και στις δύο ομάδες (κίτρινο: ομάδα ελέγχου, πορτοκαλί: ομάδα θεραπείας) Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ιστογράμματος. Γ. Φωτογραφία του ίδιου ηλεκτροφορήματος μετά από επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας με το πρόγραμμα ανάλυσης ImageQUANT TL 2005.



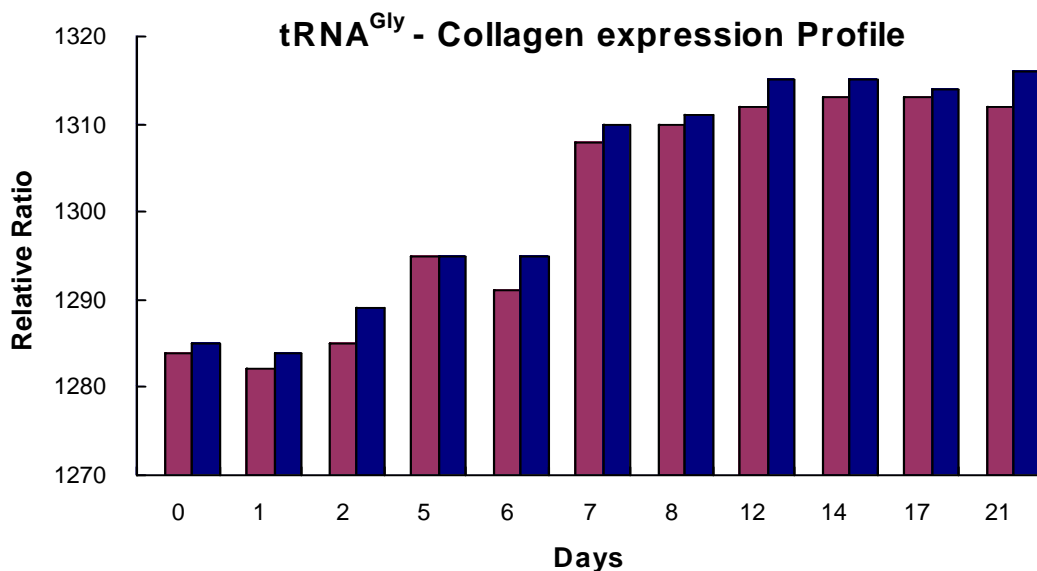
Εικόνα 31: Αλλαγές επιπέδων έκφρασης mRNA του κολλαγόνου τύπου I. Α. Μέσος όρος επιπέδων έκφρασης mRNA του κολλαγόνου τύπου I όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (γκρι χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (μαύρο χρώμα). Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος αποτελεσμάτων RT-PCR για κολλαγόνο τύπου I και στις δύο ομάδες (ομάδας ελέγχου- LiUS untreated και ομάδας θεραπείας- LiUS treated) και για 28SrRNA.

tRNA^{Gly}

Σε όλα τα δείγματα των τενοντίων μοσχευμάτων και των δύο ομάδων εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του tRNA^{Gly} και 28SrRNA με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR (εικ. 32). Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ένταση του εκάστοτε σήματος, οι τιμές λογαριθμοποιήθηκαν και τέλος υπολογίστηκε ο σχετικός λόγος έκφρασης (relative ratio) των δύο γονιδίων.



Εικόνα 32: Μέσος όρος επιπέδων έκφρασης mRNA του tRNA^{Gly} στο σύνολο όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και στις δύο ομάδες (κόκκινο: ομάδα ελέγχου, κίτρινο: ομάδα θεραπείας).



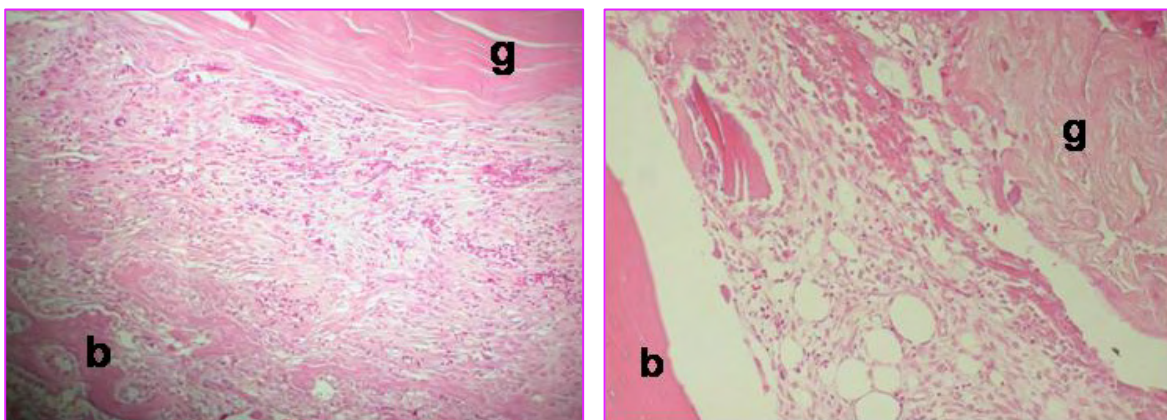
Εικόνα 33: Σύγκριση μέσων όρων επιπέδων έκφρασης mRNA του κολλαγόνου τύπου I και του tRNA^{Gly} όλων των δειγμάτων της ίδιας ημέρας στην ομάδα θεραπείας (μπλε: κολλαγόνο τύπου I, κόκκινο: tRNA^{Gly}).

Όμοια με το κολλαγόνο τύπου I τα επίπεδα mRNA του tRNA^{Gly} αυξάνονται βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου και στις δύο ομάδες. Τα επίπεδα έκφρασης του

tRNA^{Gly} στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (30%, $p=0.001$). Χαρακτηριστική είναι η αύξηση που παρατηρείται μεταξύ της 5^{ης} και 14^{ης} ημέρας. Συγκρίνοντας τα επίπεδα mRNA του tRNA^{Gly} και του κολλαγόνου τύπου I στην ομάδα θεραπείας, παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης και του tRNA^{Gly} και του κολλαγόνου τύπου I (εικ. 33). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι όντως γίνεται αυξημένη χρήση των tRNA^{Gly} σε ιστούς που παράγουν κολλαγόνο.

2.2.3 Αποτελέσματα Ιστολογικής Ανάλυσης

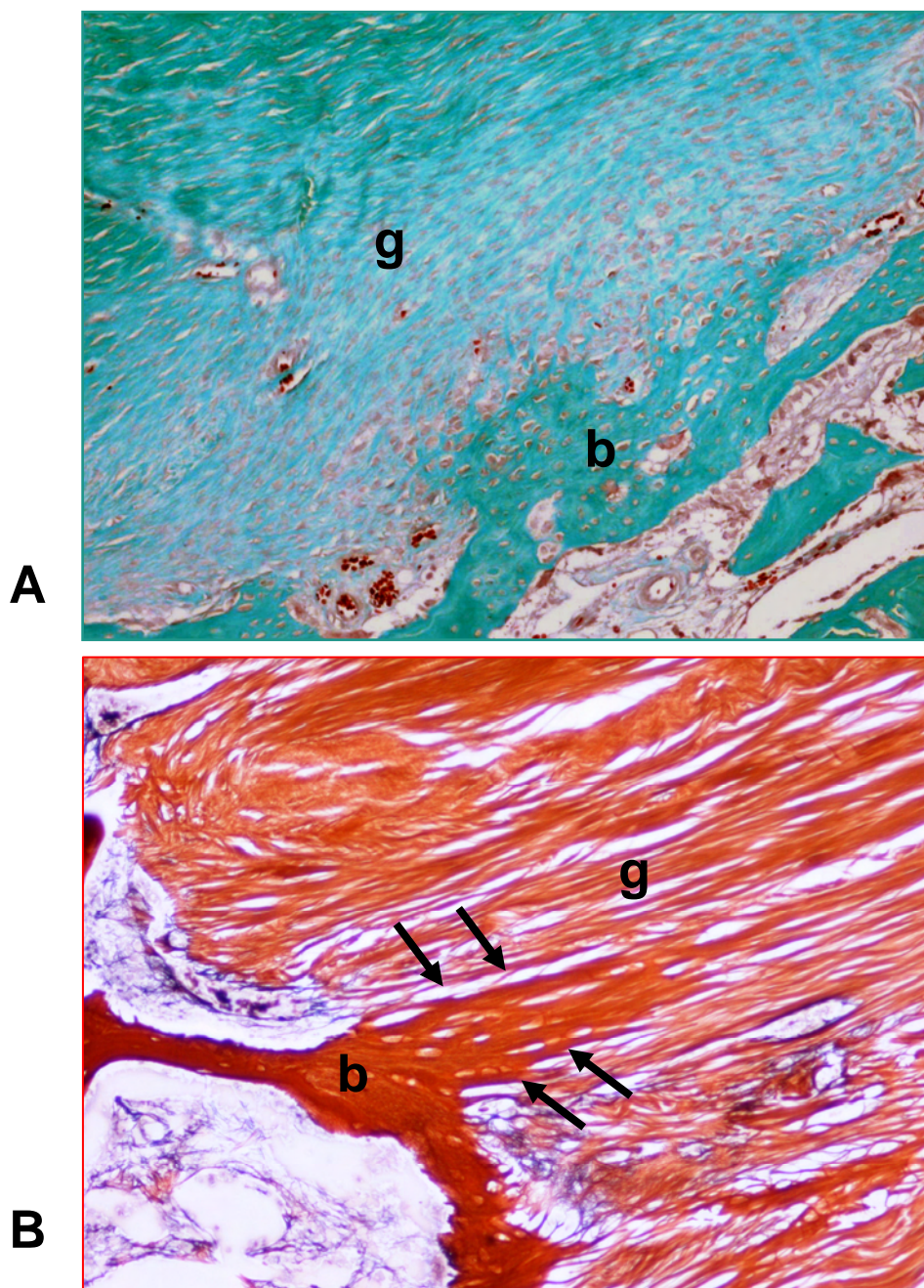
Η ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων και των δύο ομάδων υπέδειξε αξιοσημείωτες αλλαγές στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος με την πάροδο του χρόνου. Από την πρώτη εβδομάδα παρατηρήθηκε ανάπτυξη αγγείων μεταξύ μοσχεύματος και οστού και στις δύο ομάδες (εικ. 34). Ωστόσο, στην ομάδα θεραπείας η αγγείωση στη διεπιφάνεια ήταν πιο έντονη και εμφανής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου τόσο κατά την πρώτη όσο και κατά το τέλος της τρίτης εβδομάδας (21^η ημέρα) (εικ. 35). Επίσης, στην ομάδα θεραπείας παρατηρήθηκε αυξημένη κυτταρική δραστηριότητα στη διεπιφάνεια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την πρώτη εβδομάδα.



A

B

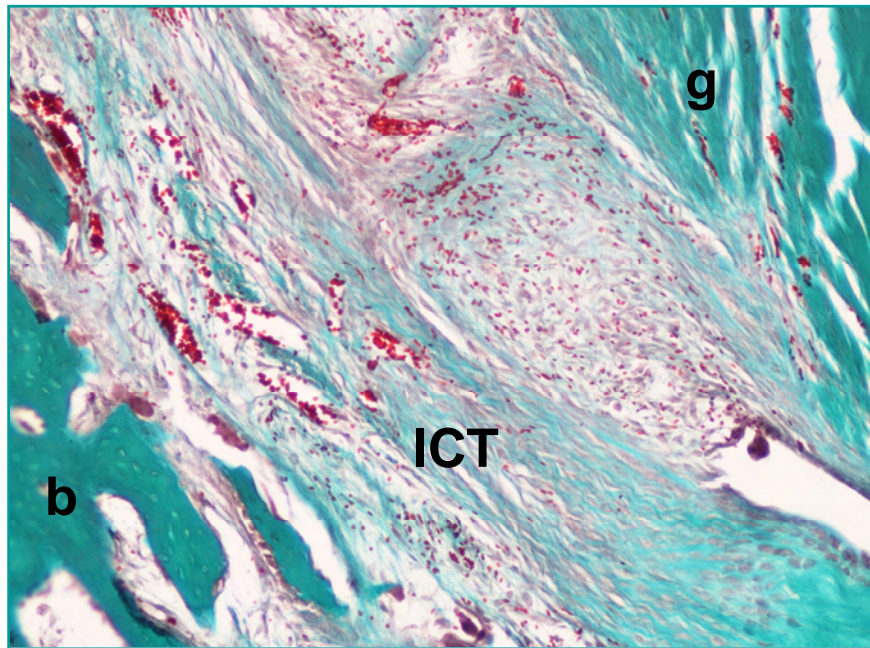
Εικόνα 33: **A.** Ομάδα θεραπείας κατά την πρώτη εβδομάδα, ενεργός διεπιφάνεια με κύτταρα και αγγεία μεταξύ τενοντίου μοσχεύματος και οστού (χρώση αιματοξυλίνη και ηωσίνη, μεγέθυνση X20). **B.** Ομάδα ελέγχου κατά την πρώτη εβδομάδα, στη διεπιφάνεια παρατηρείται χαλαρός συνδετικός ιστός με λίγα αγγεία (χρώση αιματοξυλίνη και ηωσίνη, μεγέθυνση X40). b:bone-οστό, g:graft- μόσχευμα.



Εικόνα 35: **A.** Διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μόσχευματος κατά το τέλος τρίτης εβδομάδας, ομάδα θεραπείας. Στον συνδετικό ιστό που παρεμβάλλεται, υπάρχουν ίνες κολλαγόνου που συνδέουν το μόσχευμα με το οστόν.(χρώση Masson-trichrome, μεγέθυνση X100). **B.** Διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μόσχευματος κατά το τέλος τρίτης εβδομάδας, ομάδα θεραπείας. Στον συνδετικό ιστό που παρεμβάλλεται, υπάρχουν ίνες κολλαγόνου που συνδέουν ξεκάθαρα το μόσχευμα με το γύρω οστόν (μαύρα βέλη).(χρώση Gordon-Sweet, μεγέθυνση X100). b:bone-οστό, g:graft- μόσχευμα.

Κατά την τρίτη εβδομάδα το τενόντιο μόσχευμα περιβάλλονταν από κυτταρικό «αντιδραστικό» συνδετικό ιστό. Ο ιστός αυτός σχημάτιζε μία «γέφυρα» μεταξύ του

τενοντίου μοσχεύματος και του γύρω άωρου σπογγώδους νεο-οστού. Χρησιμοποιώντας τις χρώσεις Masson trichome και reticulin (Gordon- Sweet), παρατηρήθηκαν λεπτές ίνες κολλαγόνου οι οποίες διέρχονται διά του νεοσχηματιζόμενου αυτού ιστού και συνδέουν το τενόντιο μόσχευμα με το οστό (επιφάνεια οστικού τούνελ) (εικ. 35). Οι ίνες αυτές παρατηρούνται πριν το τέλος της τρίτης εβδομάδας στα δείγματα της ομάδας θεραπείας. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν παρόμοια ευρήματα στα δείγματα της ομάδας ελέγχου κατά την ίδια χρονική περίοδο (εικ. 36).



Εικόνα 36: Διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος κατά το τέλος τρίτης εβδομάδας, ομάδα ελέγχου. Στον συνδετικό ιστό που παρεμβάλλεται (ICT: intervening connective tissue), υπάρχουν αγγεία και λίγες αραιές ίνες κολλαγόνου. (χρώση Masson-trichrome, μεγέθυνση X100). b:bone-οστό, g:graft- μόσχευμα.

3. Β΄ Φάση– Κλινική μελέτη επίδρασης υπερήχων στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος

3.1 Υλικό και μέθοδος

Η κλινική μελέτη διεξήχθη στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προϋποθέσεις που καθορίζονται από τους κανόνες της Ορθής Κλινικής Πρακτικής της Διακήρυξης του Ελσίνκι (ICH/GCP).

Στην κλινική μελέτη συμμετείχαν συνολικά 60 ασθενείς με ρήξη ΠΧΣ, 52 ασθενείς ήταν άνδρες και 8 ήταν γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 27 έτη (εύρος 18-42έτη). Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε αρθροσκοπική αποκατάσταση ΠΧΣ με τενόντιο αυτομόσχευμα οπίσθιων μηριαίων, τένοντας ημιτενοντώδη και ισχνού, μονής δεσμίδας υπό επισκληρίδιο αναισθησία. Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ισάριθμες ομάδες, 30 ασθενών, την ομάδα θεραπείας και την ομάδα ελέγχου. Στους ασθενείς της ομάδας θεραπείας εφαρμόστηκαν διαδερμικά LiUS καθημερινά για 20 ημέρες ενώ στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου δεν πραγματοποιήθηκε εφαρμογή υπερήχων. Όλοι οι ασθενείς ακολούθησαν το ίδιο πρόγραμμα αποκατάστασης και φυσιοθεραπείας.

3.1.1 Χειρουργική Επέμβαση- Τεχνική

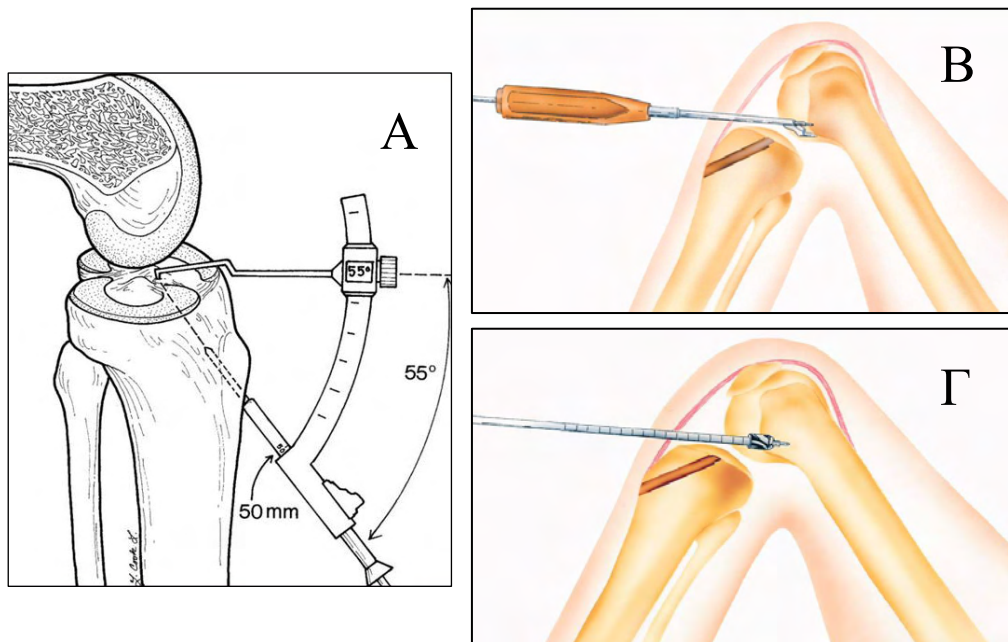
Σε όλους τους ασθενείς μετά από αποστείρωση του πάσχοντος γόνατος και ίσχαιμο περίδεση πραγματοποιήθηκε λήψη του μοσχεύματος των οπίσθιων μηριαίων, του ημιτενοντώδη και του ισχνού, μέσω επιμήκους τομής δέρματος 3cm, 4cm κάτωθεν της άρθρωσης του γόνατος επί τα εντός του κνημιαίου κυρτώματος. Η λήψη των τενόντων του ημιτενοντώδη και του ισχνού πραγματοποιήθηκε με ειδικό εργαλείο (tendon stripper) με διατομή τους στο εγγύς όριο της μυοτενοντώδους συνένωσης. Ακολούθησε επεξεργασία και παρασκευή του τενοντίου μοσχεύματος, κατά την οποία οι δύο τένοντες του ημιτενοντώδη και του ισχνού αφού καθαρίστηκαν από μυϊκές ίνες συρράπτονται μεταξύ τους κατά το εγγύς και το άπω άκρο τους με ειδική σταυρωτή ραφή (cross stich) και μη απορροφήσιμα ισχυρά ράμματα (No 2). Η δέσμη του

μοσχεύματος των οπίσθιων μηριαίων που σχηματίζεται περνάει στο ειδικό σύστημα καθήλωσης του μοσχεύματος τύπου κουμπιού (Endobutton, Smith & Nephew, Endoscopy Division, Andover, MA) και αναδιπλώνεται στη μέση σχηματίζοντας τετραπλή δέσμη (εικ. 37).



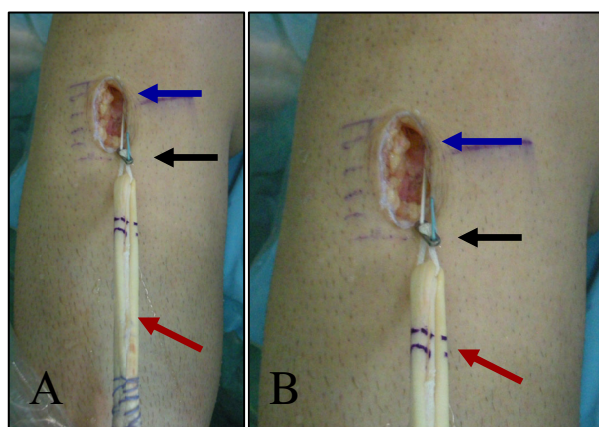
Εικόνα 37: Α. Σύστημα καθήλωσης Endobutton. Β. Τενόντιο μόσχευμα οπίσθιων μηριαίων, ημιτενοντώδη και ισχνού, μετά από συρραφή μεταξύ τους κατά τα δύο άκρα (κόκκινο βέλος) και αναδίπλωση διαμέσου του ειδικού συστήματος καθήλωσης Endobutton (μαύρο βέλος).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αρθροσκόπηση του πάσχοντος γόνατος μέσω δύο μικρών οπών του δέρματος (πόρτες αρθροσκόπησης) στην πρόσθια έσω και έξω επιφάνεια γόνατος, από τις οποίες εισάγονται η ειδική κάμερα αρθροσκόπησης και τα υπόλοιπα αρθροσκοπικά εργαλεία. Κατά την αρθροσκόπηση του γόνατος παρατηρήθηκε η πλήρης ρήξη του ΠΧΣ. Ακολούθησε καθαρισμός των ρακών του συνδέσμου με μηχανοκίνητο μαχαιρίδιο (shaver) και κεφαλή ραδιοσυχνότητας (RF). Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τα οστικά τούνελ, αρχικά στην κνήμη με ειδικό οδηγό και φρέζα διαμέτρου ανάλογα με τη διάμετρο του τενόντιου μοσχεύματος, με λοξή φορά και έξοδο στο αποτύπωμα-σημείο κατάφυσης του φυσιολογικού ΠΧΣ και στη συνέχεια δημιουργία του οστικού μηριαίου τούνελ από την έσω πρόσθια πόρτα με λοξή φορά και σημείο εισόδου το αποτύπωμα της έκφυσης του φυσιολογικού ΠΧΣ (εικ. 38). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν τα οστικά τούνελ σε τέτοια θέση, η οποία αντιστοιχεί στη θέση του υγιούς συνδέσμου. Στη συνέχεια δύο ισχυρά ράμματα, τα οποία διέρχονται από τις οπές του συστήματος καθήλωσης Endobutton, προωθούνται διαμέσου του κνημιαίου και του μηριαίου τούνελ και εξέρχονται από το δέρμα του μηρού μέσω ενός ειδικού οδηγού ράμματος. Με την έλξη των ραμμάτων αυτών το τενόντιο μόσχευμα προωθείται από το κνημιαίο τούνελ και στη συνέχεια ενδαρθρικά στο μηριαίο τούνελ (εικ. 40).

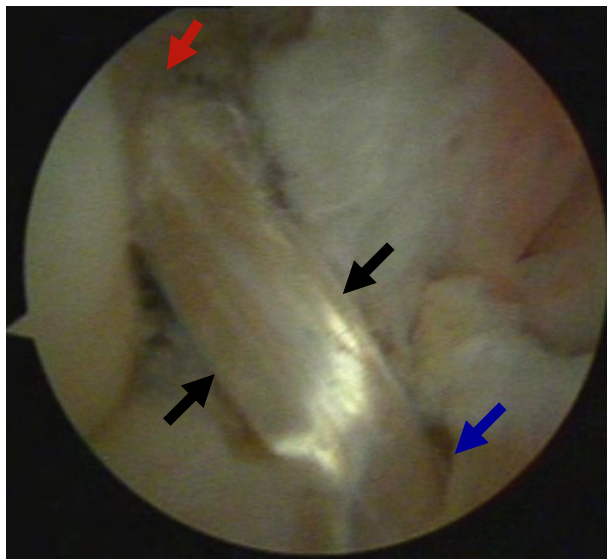


Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας οστικών τούνελ κατά την αρθροσκοπική αποκατάσταση του ΠΧΣ. Δημιουργία κνημιαίου τούνελ (Α). Δημιουργία μηριαίου τούνελ είσοδος αρχικά ειδικού οδηγού (Β) και στη συνέχεια είσοδος φρέζας (Γ).

Το μόσχευμα συγκρατήθηκε υπό τάση και καθλώθηκε στο εγγύς άκρο του μηριαίου τούνελ με το ειδικό σύστημα Endobutton (εικ. 39) και στο άπω άκρο του κνημιαίου τούνελ με μια ειδική βίδα ενδιάμεση (interference screw) με το γόνατο σε κάμψη 10°. Ακολουθούσε έλεγχος της σταθερότητας του μοσχεύματος και συρραφή των τομών του δέρματος.



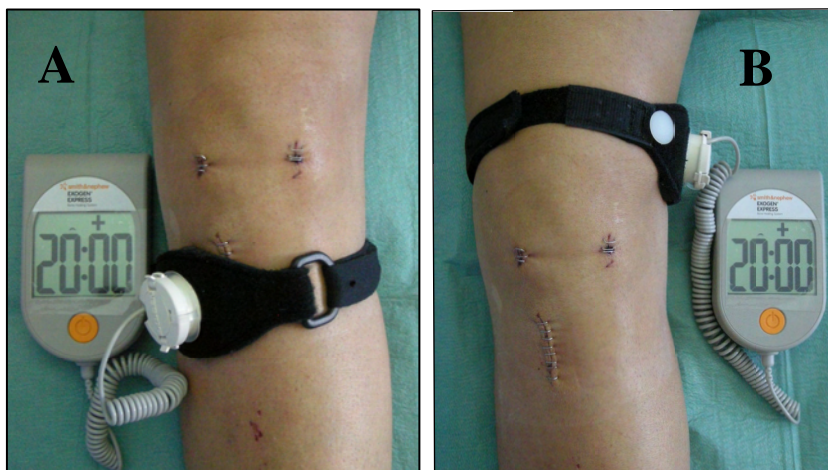
Εικόνα 39: Α και Β: Απεικόνιση προώθησης τενοντίου μοσχεύματος (κόκκινο βέλος) με Endobutton (μαύρο βέλος) εντός των οστικών τούνελ αρχικά διά του κνημιαίου τούνελ (μπλε βέλος: άπω όριο κνημιαίου τούνελ) κατά την αρθροσκοπική αποκατάσταση του ΠΧΣ.



Εικόνα 40: Αρθροσκοπική εικόνα του τενοντίου μοσχεύματος οπίσθιων μηριαίων που υποκαθιστά τον ΠΧΣ. Μαύρο βέλος: τενόντιο μόσχευμα οπίσθιων μηριαίων, κόκκινο βέλος: άπω άκρο μηριαίου τούνελ, μπλε βέλος: εγγύς όριο κνημιαίου τούνελ.

3.1.2 Εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης

Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ισάριθμες ομάδες, την ομάδα θεραπείας και την ομάδα ελέγχου. Στους 30 ασθενείς της ομάδας θεραπείας εφαρμόστηκαν διαδερμικά LiUS σε δύο συνεδρίες ημερησίως (πρωί και βράδυ), διάρκειας 20 λεπτών ανά συνεδρία, από την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα για 20 ημέρες. Η εφαρμογή των LiUS πραγματοποιήθηκε με την συσκευή των υπερήχων ExogenTM (Exogen Express, Smith & Nephew Inc, Memphis, TN, USA) (εικ.16). Το εκπεμπόμενο σήμα των υπερήχων αποτελείται από ριπές ημιτονοειδών κυμάτων διάρκειας 200μsec, κεντρικής συχνότητας 1.5 MHz, ρυθμού επανάληψης παλμού 1KHz και μέσης χωρικής και χρονικής έντασης 30mW/cm². Η σφαιρική κεφαλή του υπερηχητικού μετατροπέα τοποθετούνταν σε άμεση επαφή με το δέρμα μέσω γέλης σύζευξης στη μία συνεδρία επί τα εντός του κνημιαίου κυρτώματος κατά μήκος του κνημιαίου τούνελ και στην άλλη συνεδρία επί του έξω μηριαίου κονδύλου κατά μήκος της επιφάνειας του μηριαίου τούνελ (εικ. 41). Στους 30 ασθενείς της ομάδας ελέγχου δεν πραγματοποιήθηκε εφαρμογή υπερήχων.



Εικόνα 41: Απεικόνιση κατά τη διαδερμική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης κατά μήκος κνημιαίου τούνελ (A) και κατά μήκος μηριαίου τούνελ (B).

3.1.3 Δειγματοληψίες- αιμοληψίες

Σε όλους τους ασθενείς και των δύο ομάδων, ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου, πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες περιφερικού αίματος με τυπική τεχνική φλεβοπαρακέντησης. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν προεγχειρητικά και κατά την 1^η, 7^η, 14^η, 21^η και 42^η ημέρα μετεγχειρητικά για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών παραγόντων (TGF- β_1 , IGF, OPG, sRANKL, NTx, προκολλαγόνο τύπου I) με τη μέθοδο ELISA.

3.1.4 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών παραγόντων αίματος με τη μέθοδο ELISA

Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν και να προσδιοριστούν ποσοτικά με μονοκλωνικά αντισώματα υψηλής συγγένειας μέσω της μεθόδου ELISA. Η ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay- Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέτρηση) είναι μία βιοχημική τεχνική που αξιολογεί την παρουσία αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα δείγμα και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα δείγμα. Κατά τη μέθοδο ELISA ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου (πρωτεΐνη) καθιλώνεται σε επεξεργασμένη επιφάνεια ειδικών πλακών (εικ. 42) και έπειτα ένα συγκεκριμένο αντίσωμα προστίθεται στην επιφάνεια έτσι ώστε να μπορεί να δεσμεύσει το αντιγόνο. Το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο (ενζυμο-συνδεδεμένο

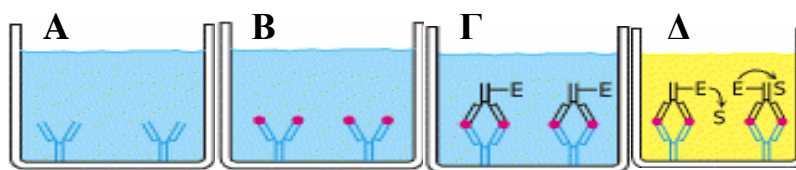
αντίσωμα) και κατά το τελικό στάδιο της μεθόδου προστίθεται χρωμογόνος ουσία, την οποία το ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε κάποιο ανιχνεύσιμο ορατό σήμα. Όταν το φως κατάλληλου μήκους κύματος προσπέσει πάνω στο δείγμα, το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος φθορίζει. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το ποσό αντιγόνου (πρωτεΐνη) στο δείγμα μέσω του μεγέθους φθορισμού.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(B)	(S4)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B	(B)	(S4)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C	(S1)	(S5)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D	(S1)	(S5)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	(S2)	(S6)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
F	(S2)	(S6)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G	(S3)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H	(S3)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Εικόνα 42: Ειδική πλάκα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο ELISA. B:blank, S1-S6: βαθμονομητές 1-6 (Standards 1-6), *: δείγματα (Samples) ή μάρτυρες (Quality controls).

Όλα τα δείγματα αίματος των ασθενών και από τις δύο ομάδες, ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου, εξετάστηκαν με τη μέθοδο ELISA διπλού αντισώματος (sandwich ELISA) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των υπό μελέτη παραγόντων TGF-β₁, IGF, OPG, sRANKL, προκολλαγόνο τύπου I και με την μέθοδο ανταγωνιστικής ELISA (competitive ELISA) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παράγοντα NTx.

Στη μέθοδο sandwich ELISA, η ειδική πλάκα είναι επιστρωμένη με ένα επιπλέον αντίσωμα σύλληψης. Με την προσθήκη του δείγματος στην πλάκα το αντιγόνο δεσμεύει το αντίσωμα και στη συνέχεια προστίθεται το ενζυμο-συνδεδεμένο αντίσωμα και ακολουθεί η υπόλοιπη διαδικασία της μεθόδου (εικ. 43). Στον τύπο της competitive ELISA το μη-σημασμένο αντίσωμα επωάζεται παρουσία του αντιγόνου του. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα αντίσωμα- αντιγόνο προστίθεται στην επιφάνεια καλυμμένη με αντιγόνο και με ξέπλυμα της πλάκας το μη-συνδεδεμένο αντίσωμα απομακρύνεται (περισσότερο αντιγόνο στο δείγμα, λιγότερο αντίσωμα μπορεί να δεσμεύσει το αντιγόνο καλά). Στη συνέχεια προστίθεται το ενζυμο-συνδεδεμένο αντίσωμα συγκεκριμένο για το αρχικό αντίσωμα και ακολουθεί η υπόλοιπη διαδικασία της μεθόδου (εικ. 44).



Εικόνα 43: ELISA διπλού αντισώματος (sandwich). Α:Θέση καλυμμένη με αντίσωμα Β:Το αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα Γ:Ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, δεσμεύεται στο αντιγόνο Δ: Το προστιθέμενο υπόστρωμα μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν.



Εικόνα 44: Ανταγωνιστική ELISA (competitive). Α:Θέση καλυμμένη με αντίσωμα Β:Προσθήκη δείγματος με αντιγόνο Γ: Ξέπλυμα αντιγόνου που δεν συνδέθηκε Δ: Μόνο συνδεδεμένο αντιγόνα Ε:Το προστιθέμενο υπόστρωμα μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν. Η ένταση του χρώματος αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης αντιγόνου.

3.1.5 Προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων

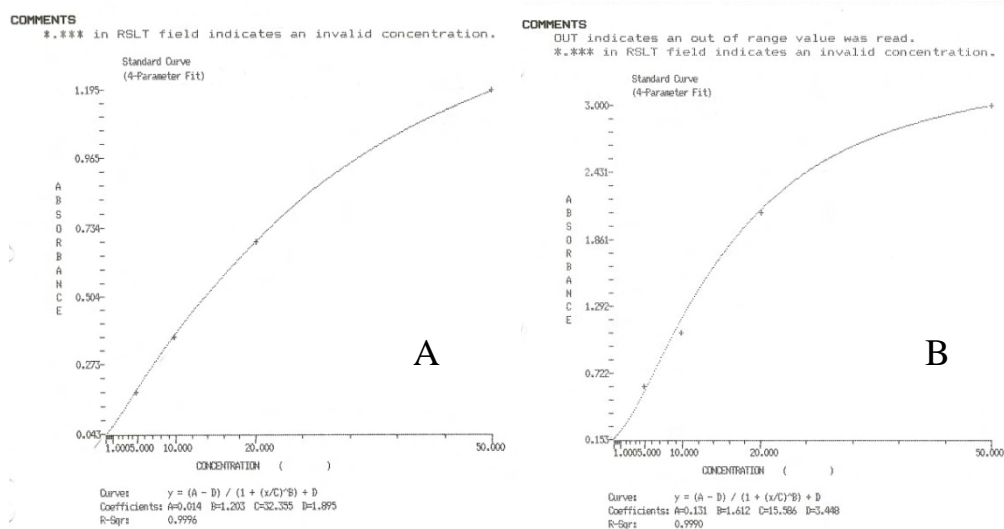
Μετά την αιμοληψία το δείγμα αίματος κάθε ασθενούς τοποθετείται σε κενά σωληνάρια (χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα) και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά ώστε να επιτευχθεί πλήρης πήξη του αίματος. Στη συνέχεια το δείγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στα 1370g για 10 λεπτά στους 5°C. Ο ορός μοιράζεται σε σωληνάρια eppendorf και τα δείγματα ορού αίματος αποθηκεύονται σε ψύξη (2-8° C) για διάστημα ως 24 ώρες ή καταψύχονται (-20°C ή χαμηλότερη θερμοκρασία) για μακρόχρονη αποθήκευση. Τα δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης. Για τη μέτρηση του εκάστοτε υπό μελέτη παράγοντα τα δείγματα του ορού αίματος υποβάλλονται σε απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου και όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται επίσης σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την πραγματοποίηση της ELISA χρησιμοποιούνται βαθμονομητές (standards) και μάρτυρες (quality control) για τον έλεγχο της λειτουργίας του αντιδραστηρίου καθώς και για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Οι βαθμονομητές αποτελούν δείγματα γνωστής συγκέντρωσης της ουσίας (απομονωμένο αντιγόνο της ουσίας σε σταθεροποιημένο πρωτεϊνικό διάλυμα μαζί με συντηρητικό) που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Οι μάρτυρες αποτελούν δείγματα ανθρώπινου

ορού με τιμές κατανομημένες σε όλο το εύρος ρύθμισης της δοκιμής. Οι βαθμονομητές και οι μάρτυρες παρέχονται στο kit του αντιδραστηρίου λυοφιλοποιημένοι. Αναμειγνύονται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά.

3.1.6 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Προκειμένου να ορίσουμε ανώτερη και κατώτερη φυσιολογική τιμή του εκάστοτε υπό μελέτη μορίου κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη (εικ. 45). Η ανώτερη και η χαμηλότερη τιμή προσδιορίζονται από το quality high και quality low μάρτυρες και οι ενδιάμεσες τιμές από τους βαθμονομητές. Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίζονται οι τιμές των υπό μελέτη δειγμάτων.



Εικόνα 45: Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη. Α. Απορρόφηση στα 405nm και Β. Απορρόφηση στα 450nm.

3.1.7 Μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας των kit των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Συνοπτικά η μέθοδος ακολουθεί τα παρακάτω στάδια: Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων ακολουθεί η σχεδίαση της διαμόρφωσης και η χαρτογράφηση της ειδικής πλάκας (εικ. 42). Στη συνέχεια τοποθετούνται με πιπέτα 100μL αραιωμένου βαθμονομητή, μάρτυρα και δείγματος στη μικροπλάκα σύμφωνα με

το χάρτη της πλάκας. Τοποθετούνται με πιπέτα 100μL διαλύματος αντίστοιχων αντισωμάτων σε κάθε μικροκοιλότητα (πηγαδάκι) της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με μόνωση, στροβιλίζεται ελαφρά και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 90 ± 5 λεπτά. Παρασκευάζεται διάλυμα χρωμογόνου αντιδραστηρίου (ρυθμισμένο υπόστρωμα) κατά τη διάρκεια των τελευταίων 5 λεπτών της επώασης. Ακολουθεί έκπλυση των μικροκοιλοτήτων πέντε φορές με διάλυμα έκπλυσης και μετά την τελική έκπλυση στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια πραγματοποιείται προσθήκη 200μL αραιωμένου χρωμογόνου αντιδραστηρίου (ρυθμισμένο υπόστρωμα) σε κάθε μικροκοιλότητα. μL Η πλάκα καλύπτεται με στεγνωτικό και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 ± 2 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 100μL αντιδραστηρίου παύσης σε κάθε μικροκοιλότητα. Η πλάκα στροβιλίζεται ελαφρά ώστε να επιτευχθεί ανάμειξη και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε κάθε μικροκοιλότητα σε 405nm ή 450nm ή 630nm. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με βάση την πρότυπη καμπύλη.

3.1.8 Πολυτομική Αξονική Τομογραφία

Σε όλους τους ασθενείς και στις δύο ομάδες πραγματοποιήθηκε πολυτομική αξονική τομογραφία (MDCT), δύο ή τρεις μήνες μετεγχειρητικά για την αξιολόγηση της επουλωτικής διαδικασίας κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ. Μετά την ελικοειδή λήψη των δεδομένων με τομογράφο 16 σειρών ανιχνευτών και πάχος τομής 0.6mm, ακολούθησαν ανασχηματοποιήσεις σε τρία επίπεδα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο ανατομικής οριοθέτησης (στεφανιαίες παράλληλα προς την οπίσθια μοίρα των μηριαίων κονδύλων, οβελιαίες παράλληλα προς τον έξω μηριαίο κόνδυλο). Με βάση την MDCT έγινε ποσοτική εκτίμηση της οστικής πυκνότητας σε μονάδες Hounsfield (HU) καθώς και ημιποσοτική εκτίμηση του ποσοστού οστεοποίησης γύρω από το μόσχευμα στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος σε εγκάρσιες τομές τόσο στην κνήμη όσο και στο μηριαίο. Η ποσοτική αξιολόγηση της οστεοποίησης αντιστοιχεί στο μέσο όρο 4 μετρήσεων σε κάθε οστικό τούνελ (σε κνήμη και μηριαίο). Η μέτρηση έγινε σε απόσταση 1-2mm από το φλοιό του τούνελ, με μονάδες HU. Προηγήθηκε διόρθωση του στατιστικού σφάλματος της δέσμης φωτονίων με «ομοίωμα» που ακτινοβολήθηκε ταυτόχρονα με τους ασθενείς. Τα ευρήματα της ημιποσοτικής εκτίμησης του ποσοστού

οστεοποίησης αξιολογήθηκαν και διακρίθηκαν σε τρεις διαβαθμίσεις: Α) μη εμφανής οστεοποίηση εντός του οστικού τούνελ, Β) εμφάνιση μερικής οστεοποίησης ή απεικόνιση «θαμβής υάλου» (ground glass appearance) εντός του οστικού τούνελ και Γ) εικόνα οστεοποίησης (βαθμός Β) αλλά επιπλέον σε όλη την επιφάνεια του οστικού τούνελ. Όλες οι τομές εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν αρχικά τυφλά, ανεξάρτητα από την ομάδα την οποία προέρχονταν (ομάδα θεραπείας ή ομάδα ελέγχου) καθώς και της χρονικής περιόδου μετεγχειρητικά (2^ο ή 3^ο μήνα μετεγχειρητικά) από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές.

3.1.9 Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των δεδομένων της βιοχημικής και απεικονιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε και αξιολογήθηκε με τη χρήση T-test για ζευγαρωτές παρατηρήσεις. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ηλεκτρονικού στατιστικού πακέτου SPSS v13.0.

3.2 Αποτελέσματα

3.2.1 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών παραγόντων

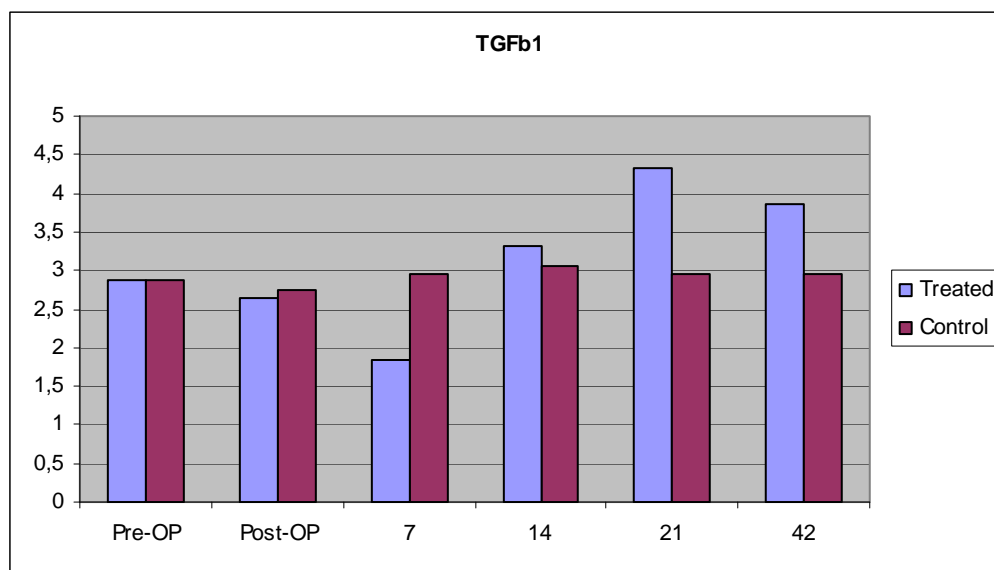
Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων, ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου, εξετάστηκαν με τη μέθοδο ELISA και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των υπό μελέτη αυξητικών παραγόντων TGF-β₁, IGF, OPG, sRANKL, προκολλαγόνο τύπου I και σταυροσυνδεόμενων N-τελοπεπτιδίων του κολλαγόνου τύπου I (NTx).

TGF-β₁

Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάστηκαν με τη μέθοδο sandwich ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο (Human TGF-β₁ Elisa, kit/96tests, Bender MEDSystems) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του TGF-β₁ με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα του TGF-β₁ όπως παρουσιάζονται στην εικ. 46 είναι φανερό ότι κατά την αρχική μετεγχειρητική περίοδο η συγκέντρωση του TGF-β₁ είναι

σχεδόν ίδια και στις δύο ομάδες. Στη συνέχεια κατά την 7^η ημέρα παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του TGF-β₁ στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μόνο το 30% της συγκέντρωσης του TGF-β₁ της ομάδας ελέγχου παρατηρείται στην ομάδα θεραπείας (p=0.001). Από την 14^η ημέρα μέχρι την 21^η ημέρα αυξάνεται βαθμιαία στην ομάδα θεραπείας. Σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης του TGF-β₁ (35%) παρατηρείται στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την 21^η ημέρα (p=0.003). Στη συνέχεια κατά την 42^η ημέρα η συγκέντρωση του TGF-β₁ μειώνεται στην ομάδα θεραπείας αλλά είναι πιο υψηλή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (~10%) καθώς και από τα αρχικά επίπεδά της. Στην ομάδα ελέγχου δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης του TGF-β₁ και τα επίπεδα του παρέμειναν σχεδόν σταθερά κατά τη διάρκεια των 42 ημερών.

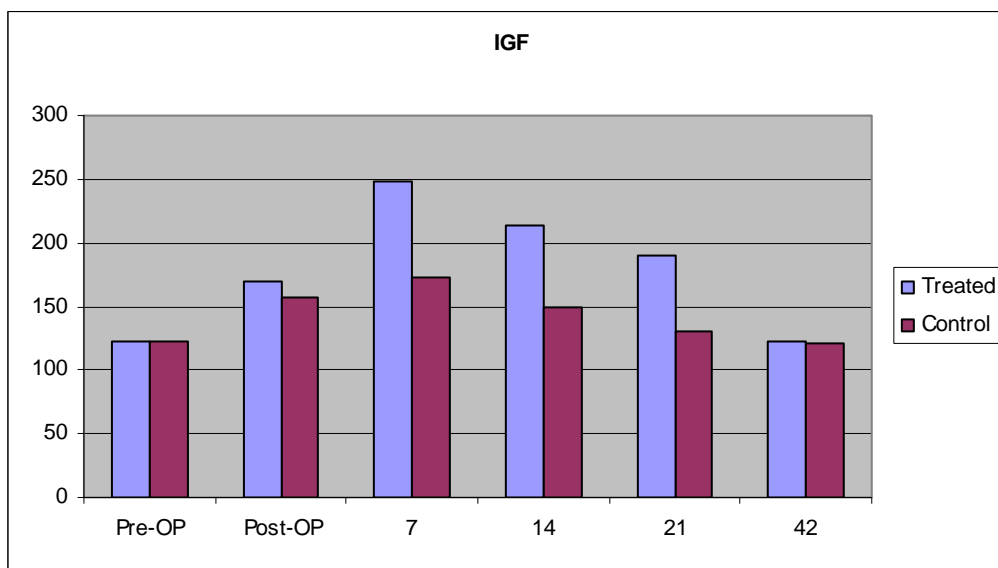


Εικόνα 46: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης του TGF-β₁ προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης πρωτεΐνης (μg/L) του TGF-β₁ όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

IGF

Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάσθηκαν με τη μέθοδο sandwich ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο (Human IGF I Elisa, kit/96tests, IDS) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του IGF με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα του IGF όπως παρουσιάζονται στην εικ. 47 είναι φανερό ότι η συγκέντρωση του IGF κατά την αρχική μετεγχειρητική περίοδο παρουσιάζει βαθμιαία αύξηση μέχρι την 7^η ημέρα και στη συνέχεια από την 14^η ημέρα προοδευτική μείωση και στις δύο ομάδες αλλά πάντα οι τιμές είναι υψηλότερες σε σχέση με τις προεγχειρητικές. Ωστόσο, η συγκέντρωση του IGF στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την 7^η, 14^η και 21^η ημέρα (7-21^η ημέρα, $p=0.003$). Κατά τη 42^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα του IGF είναι σχεδόν ίδια και στις δύο ομάδες.



Εικόνα 47: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης του IGF προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης πρωτεΐνης (μg/L) του IGF όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

Προκολλαγόνο τύπου I

Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάστηκαν με τη μέθοδο sandwich ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο [procollagen type IC-peptide (PIP) EIA Elisa, kit/96 wells TAKARA] για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του προκολλαγόνου τύπου IC-πεπτιδίου (PIP) με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα του PIP όπως παρουσιάζονται στην εικ. 48 είναι φανερό ότι δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης του PIP μετεγχειρητικά σε

σχέση με τα προεγχειρητικά και στις δύο ομάδες. Τα επίπεδα του PIP παρέμειναν σχεδόν σταθερά κατά τη διάρκεια των 42 ημερών μετεγχειρητικά παρουσιάζοντας ελάχιστα υψηλότερη συγκέντρωση στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



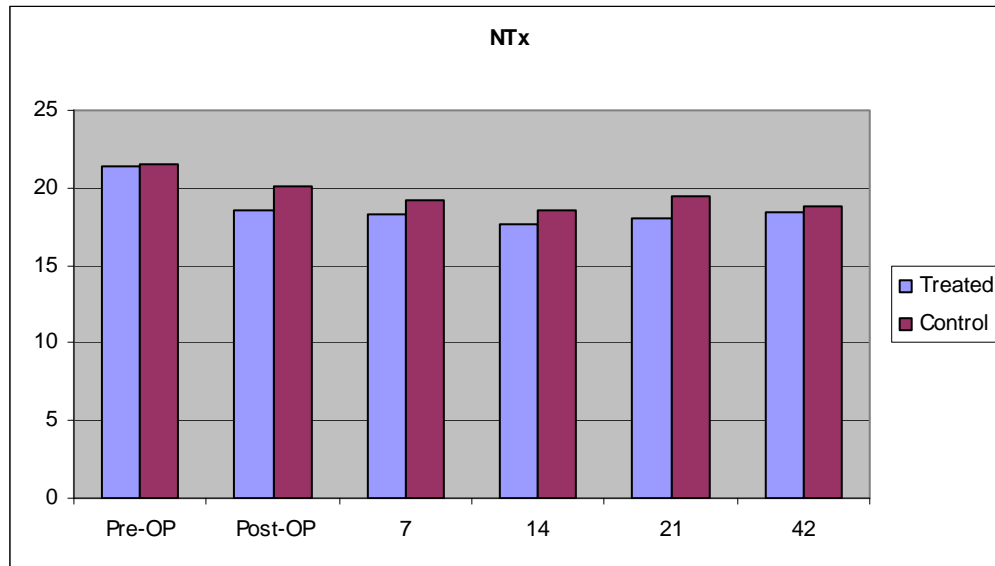
Εικόνα 48: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης του PIP προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης πρωτεΐνης (μg/L) του PIP όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

NTx

Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάσθηκαν με τη μέθοδο competitive ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο (OsteoMark NTx Serum, kit/96 wells Walpole Laboratories) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του τελοπεπτιδίου N κολλαγόνου τύπου I (NTx) με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα του NTx όπως παρουσιάζονται στην εικ. 49 παρατηρείται μικρή μείωση της συγκέντρωσης του NTx μετεγχειρητικά σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα και στις δύο ομάδες. Φαίνεται ότι η συγκέντρωση του NTx στην ομάδα θεραπείας παραμένει σχεδόν ίδια κατά την μετεγχειρητική περίοδο των 42 ημερών. Ωστόσο, παρατηρείται μείωση (10%) της συγκέντρωσης του NTx στην ομάδα θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την 7^η, 14^η και 21^η ημέρα (7-21^η ημέρα, $p=0.003$). Στην ομάδα ελέγχου παρατηρείται μικρή μεταβολή της συγκέντρωσης του NTx

μετεγχειρητικά. Κατά τη 42^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα του NTx είναι σχεδόν ίδια και στις δύο ομάδες.



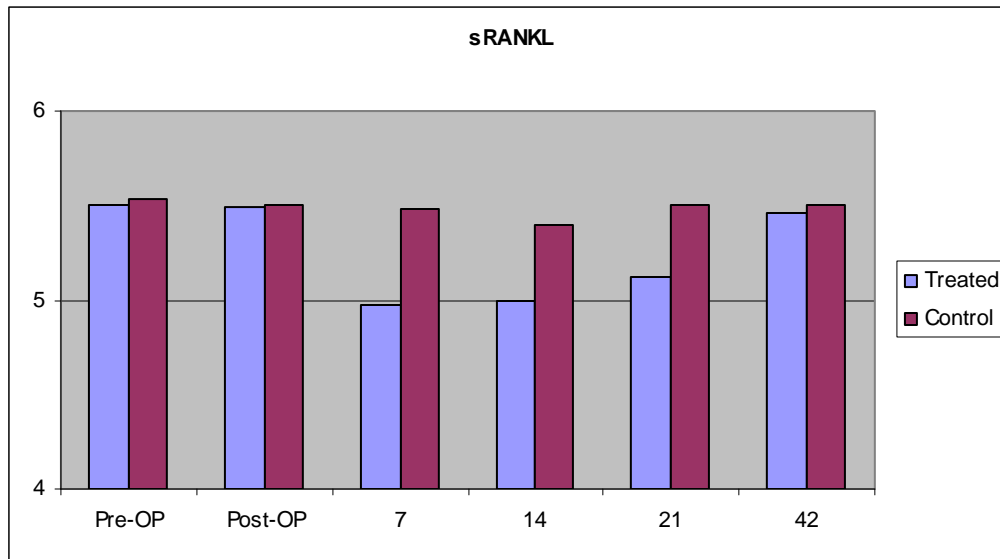
Εικόνα 49: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης του NTx προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης [nM (BCE)] του NTx όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

sRANKL

Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάσθηκαν με τη μέθοδο sandwich ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο [Human sRANKL (total) Elisa, kit/96wells, BioVENDOR] για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του sRANKL με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα του sRANKL όπως παρουσιάζονται στην εικ. 50 είναι φανερό ότι η συγκέντρωση του sRANKL στην ομάδα θεραπείας κατά την αρχική μετεγχειρητική περίοδο παρουσιάζει βαθμιαία μείωση μέχρι την 14^η ημέρα και στη συνέχεια από την 21^η ημέρα προοδευτική αύξηση και κατά τη 42^η ημέρα επανέρχεται στα αρχικά προεγχειρητικά επίπεδα. Ωστόσο, η συγκέντρωση του sRANKL στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την 7^η, 14^η και 21^η ημέρα (7-21^η ημέρα, $p=0.003$). Κατά τη 42^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα του sRANKL είναι σχεδόν ίδια και στις δύο ομάδες. Στην ομάδα

ελέγχου δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης του sRANKL και τα επίπεδα του παρέμειναν σχεδόν σταθερά κατά τη διάρκεια των 42 ημερών.



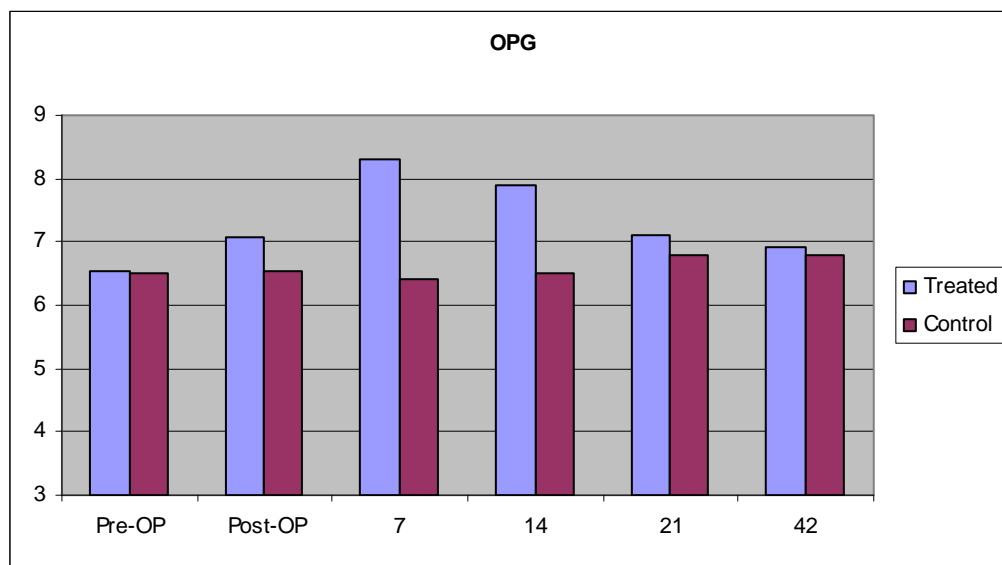
Εικόνα 50: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης του sRANKL προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης πρωτεΐνης (pmol/L) του sRANKL όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

OPG

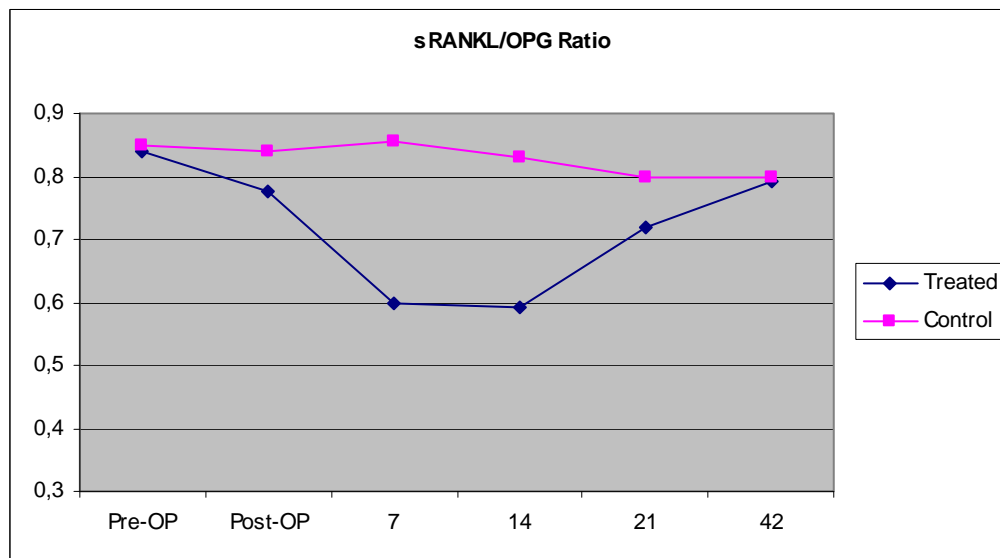
Όλα τα δείγματα ορών αίματος των ασθενών και των δύο ομάδων εξετάσθηκαν με τη μέθοδο sandwich ELISA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντιδραστήριο (Human OPG Elisa, kit/96wells, BioVENDOR) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης OPG με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Από τα αποτελέσματα της OPG όπως παρουσιάζονται στην εικ. 51 είναι φανερό ότι η συγκέντρωση της OPG είναι σημαντικά αυξημένη στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά τη μετεγχειρητική περίοδο. Κατά την αρχική μετεγχειρητική περίοδο η συγκέντρωση της OPG παρουσιάζει στην ομάδα θεραπείας βαθμιαία αύξηση μέχρι την 7^η ημέρα και στη συνέχεια από την 14^η ως τη 42^η ημέρα προοδευτική μείωση αλλά πάντα οι τιμές είναι υψηλότερες σε σχέση με τις προεγχειρητικές. Ωστόσο, η συγκέντρωση της OPG στην ομάδα θεραπείας βρέθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την 7^η, 14^η και 21^η ημέρα (7-21^η ημέρα,

p=0.001). Κατά τη 42^η μετεγχειρητική ημέρα τα επίπεδα της OPG είναι σχεδόν ίδια και στις δύο ομάδες.



Εικόνα 51: Αλλαγές συγκέντρωσης πρωτεΐνης της OPG προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα. Μέσος όρος συγκέντρωσης πρωτεΐνης (pmol/L) της OPG όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και της ομάδας θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).



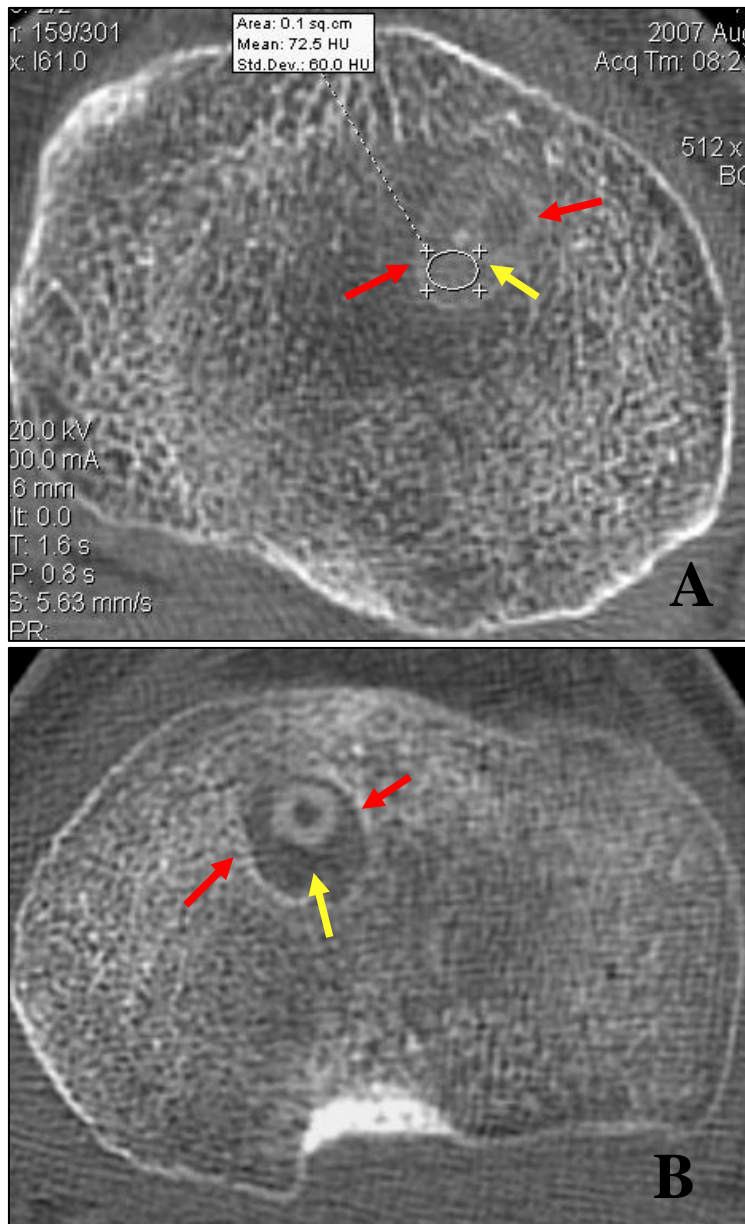
Εικόνα 52: Αλλαγές λόγου sRANKL/OPG προεγχειρητικά (pre-op) και μετεγχειρητικά (post-op) ως την 42^η ημέρα και στις δύο ομάδες, ομάδα ελέγχου (κόκκινο χρώμα) και ομάδα θεραπείας (γαλάζιο χρώμα).

Ο λόγος του sRANKL/OPG όπως φαίνεται στην εικ. 52 παρουσιάζει πολύ μικρή μεταβολή μετεγχειρητικά κατά τη διάρκεια των 42 ημερών στην ομάδα ελέγχου, ωστόσο είναι υψηλότερος συγκριτικά με την ομάδα θεραπείας. Στην ομάδα θεραπείας ο λόγος του sRANKL/OPG παρουσιάζει σημαντική μείωση (40%) ως τη 14^η ημέρα και στη συνέχεια αυξάνεται και επανέρχεται σχεδόν στα προεγχειρητικά επίπεδα. Ιδιαίτερα κατά την 7^η και 14^η ημέρα παρατηρείται σημαντική μείωση του λόγου sRANKL/OPG στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (p=0.001).

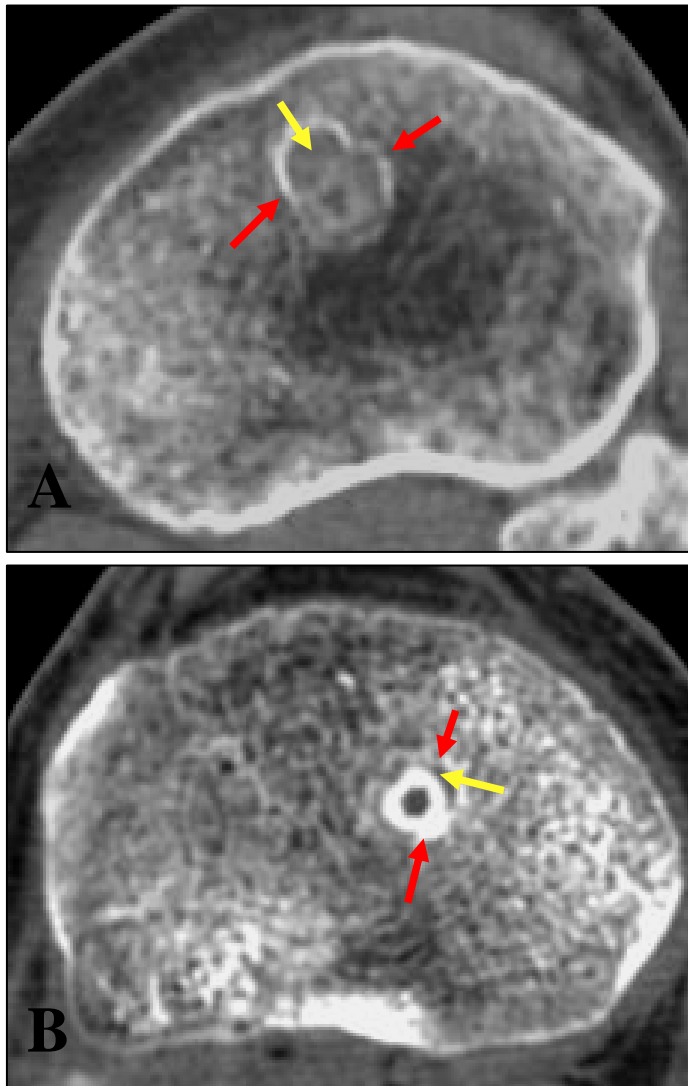
3.2.2 Αποτελέσματα Απεικονιστικής Ανάλυσης

Η ανάλυση των ευρημάτων της MDCT όλων των ασθενών και των δύο ομάδων υπέδειξε αξιοσημείωτες αλλαγές στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος με την πάροδο του χρόνου. Κατά την ποσοτική μέτρηση οστικής πυκνότητας τόσο στη διεπιφάνεια όσο και κεντρικότερα στο μόσχευμα βρέθηκε μη στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, οι τιμές της οστικής πυκνότητας στην ομάδα θεραπείας ήταν υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου τόσο στο μηριαίο όσο και στο κνημιαίο τούνελ στον 2^ο αλλά και στον 3^ο μήνα μετεγχειρητικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω του μικρού μεγέθους της περιοχής μελέτης της διεπιφάνειας οστού τενοντίου μοσχεύματος (2-3mm) αυξάνεται η πιθανότητα σφάλματος στον ορισμό της περιοχής ενδιαφέροντος που θα περιλαμβάνεται στις μετρήσεις.

Επιπρόσθετα, κατά την ημιποσοτική εκτίμηση του ποσοστού οστεοποίησης γύρω από το μόσχευμα στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος, παρατηρήσαμε στην ομάδα θεραπείας πιο έντονη οστεοποίηση σε όλο σχεδόν το μήκος του μηριαίου και του κνημιαίου τούνελ (βαθμός Β και Γ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (βαθμός Α και Β) στους δύο μήνες μετεγχειρητικά (εικ. 53). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήσαμε και στους τρεις μήνες μετεγχειρητικά, όπου οι ασθενείς της ομάδας θεραπείας εμφάνιζαν πιο έντονη οστεοποίηση γύρω από το μόσχευμα σε όλο το μήκος του μηριαίου και του κνημιαίου τούνελ σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου (εικ. 54).



Εικόνα 53: **A.** Εγκάρσια τομή δεξιάς κνήμης MDCT κατά 2^ο μετεγχειρητικό μήνα, ομάδα θεραπείας. Πιο έντονη οστεοποίηση (βαθμός Γ) γύρω από μόσχευμα **B.** Εγκάρσια τομή αριστερής κνήμης MDCT κατά 2^ο μετεγχειρητικό μήνα, ομάδα ελέγχου. Βαθμός Β οστεοποίησης γύρω από μόσχευμα στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος (κόκκινο βέλος: κνημιαίο τούνελ, κίτρινο βέλος: περιοχή αξιολόγησης οστεοποίησης).



Εικόνα 54: **A.** Εγκάρσια τομή αριστερής κνήμης MDCT κατά 3^ο μετεγχειρητικό μήνα, ομάδα θεραπείας. Πιο έντονη οστεοποίηση (βαθμός Γ) γύρω από μόσχευμα **B.** Εγκάρσια τομή δεξιάς κνήμης MDCT κατά 3^ο μετεγχειρητικό μήνα, ομάδα ελέγχου. Βαθμός Β οστεοποίησης γύρω από μόσχευμα στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος (κόκκινο βέλος: κνημιαίο τούνελ, κίτρινο βέλος: περιοχή αξιολόγησης οστεοποίησης).

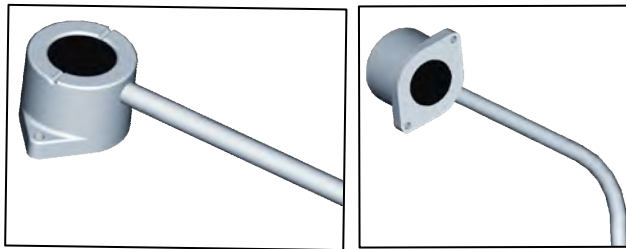
4. Γ΄ Φάση– Κλινική μελέτη επίδρασης διοστικών υπερήχων στην πώρωση καταγμάτων μακρών οστών

4.1 Υλικό και Μέθοδος

Η κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προϋποθέσεις που καθορίζονται από τους κανόνες της Ορθής Κλινικής Πρακτικής της Διακήρυξης του Ελσίνκι (ICH/GCP).

Το σύστημα διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης εφαρμόστηκε σε 5 ασθενείς. Οι περιπτώσεις αφορούσαν 3 ασθενείς με φρέσκα κατάγματα μακρών οστών, 1 ασθενή με καθυστερημένη πώρωση και 1 ασθενή με σηπτική ψευδάρθρωση. Το σύστημα διοστικών υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε στους ασθενείς αποτελεί ένα καινοτόμο σύστημα υπερήχων που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα και έχει εφαρμοστεί σε μία πειραματική μελέτη^{251,252}. Το σύστημα αποτελείται από δύο μικροσκοπικούς υπερηχητικούς μετατροπείς (ultrasound transducers –κεντρικής συχνότητας 1MHz), μία συσκευή που ο ασθενής δύναται να φέρει διαρκώς πάνω του (wearable device) και μια κεντρική μονάδα (εικ. 18,19). Οι υπερηχητικοί μετατροπείς εμφυτεύονται και στερεώνονται επί του οστού εκατέρωθεν της εστίας κατάγματος και η λειτουργία τους βασίζεται στην αξονική μετάδοση (axial transmission mode). Οι υπερηχητικοί μετατροπείς συγκρατήθηκαν στη θέση τους μετά από περιβρογισμό με βιοαπορροφήσιμο ράμμα (No 0) μέσω των ειδικών εγκοπών στην πάνω επιφάνεια του περιβλήματός τους (εικ. 55). Για την παρακολούθηση της πώρωσης χρησιμοποιείται η διάταξη πομπού - δέκτη κατά την οποία κύματα υπερήχων διαδίδονται διαμέσου του μακρού άξονα του οστού και καταγράφονται από την πρωτότυπη φερόμενη συσκευή με δυνατότητα ασύρματης μετάδοσης των μετρήσεων σε απομακρυσμένο υπολογιστή. Στην περίπτωση που ο υπέρηχος χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό μέσο και οι δύο μετατροπείς λειτουργούν ως πομποί χαμηλής έντασης παλμικών υπερήχων (κεντρικής συχνότητας 1MHz, έντασης 35mW/cm²).

Οι ασθενείς λάμβαναν καθημερινές συνεδρίες χαμηλής έντασης διοστικών υπερήχων διάρκειας 20 λεπτών. Η εφαρμογή τόσο των θεραπευτικών υπερήχων όσο και των υπερηχητικών μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με την ίδια συσκευή η οποία χρησιμοποιείται στο σπίτι του ασθενούς. Μετρήσεις υπερήχων λαμβάνονταν άμεσα μετεγχειρητικά και ανά 4 ημέρες μέχρι την ολοκλήρωση της επούλωσης του κατάγματος. Οι μετρήσεις συλλέγονταν εξ'αποστάσεως και αποθηκεύονταν στο διακομιστή (server) της Μονάδας Ιατρικής Τεχνολογίας και Ευφών Πληροφοριακών Συστημάτων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



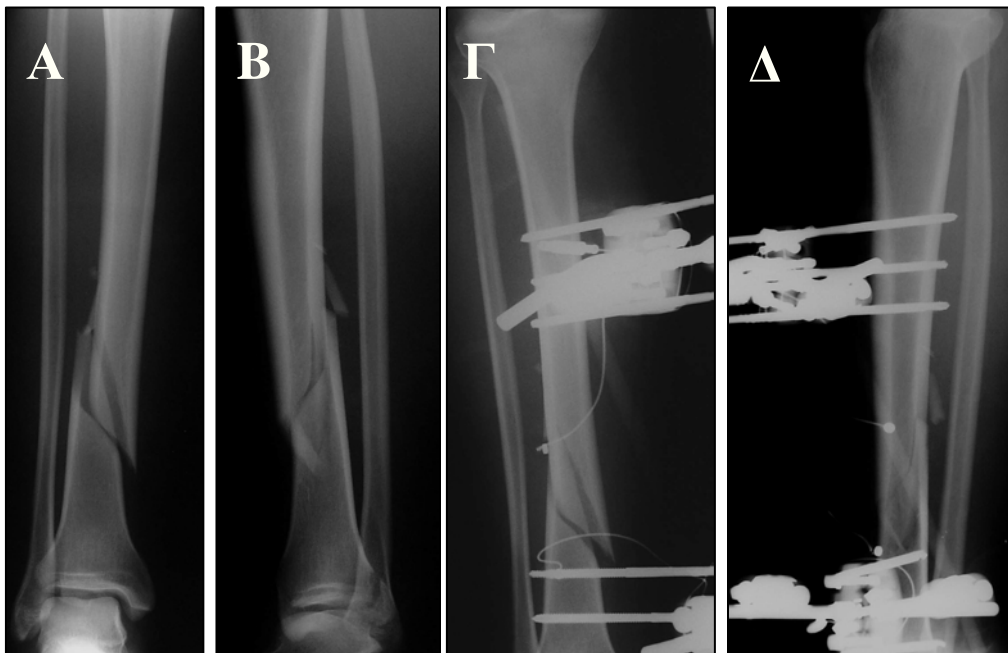
Εικόνα 55: Απεικόνιση υπερηχητικού μετατροπέα (διακρίνονται οι οπές στα πλάγια και εγκοπές στην πάνω επιφάνεια του περιβλήματός του για την υποδοχή ράμματος).

Για τη μελέτη της επίδρασης των υπερήχων χρησιμοποιήθηκε η κλινική εξέταση και ο απεικονιστικός έλεγχος με απλές ακτινογραφίες, από δύο τουλάχιστον ανεξάρτητους ορθοπαιδικούς χειρουργούς και μετά την ολοκλήρωση της επούλωσης πραγματοποιήθηκε αξονική τομογραφία. Ο χρόνος για την πώρωση του κατάγματος προσδιορίστηκε τόσο από τις κλινικές δοκιμασίες όσο και με την ανάλυση των ακτινογραφιών σύμφωνα με τα κριτήρια του Heckman. Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά, οι παράμετροι που διερευνώνται είναι η γεφύρωση τεσσάρων φλοιών (δύο στην προσθοπίσθια και δύο στην πλάγια ακτινογραφία) σε συνδυασμό με τη σταδιακή εξαφάνιση της αρχικής ακτινοδιαφανούς γραμμής μεταξύ των κατεαγότων οστικών τεμαχίων (μια γραμμή στην προσθοπίσθια και μια στην πλάγια προβολή). Κατά τον Heckman ένα κάταγμα θεωρείται πωρωθέν με βάση την ακτινολογική εικόνα όταν τρεις από τους τέσσερις φλοιούς έχουν γεφυρωθεί.

4.2 Αποτελέσματα

1^η Κλινική εφαρμογή

Πρόκειται για ασθενή, άρρεν 34 ετών, με κλειστό κατάγμα διάφυσης δεξιάς κνήμης (εικ.56). Ο ασθενής αντιμετώπιστηκε κατόπιν συναίνεσής του χειρουργικά με ανοικτή ανάταξη του κατάγματος, τοποθέτηση εξωτερικής οστεοσύνθεσης και σύστημα διοστικών υπερήχων. Υπό ραχιαία αναισθησία πραγματοποιήθηκε ανοικτή ανάταξη του κατάγματος σε ανατομική θέση και υπό ακτινοσκοπικό έλεγχο τοποθετήθηκαν έξι βελόνες εξωτερικής οστεοσύνθεσης μετά από ισάριθμες μικρές τομές δέρματος, 3 κεντρικά και 3 περιφερικά της εστίας του κατάγματος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε μονόπλευρο πλαίσιο εξωτερικής οστεοσύνθεσης (τύπου HOFFMAN), για την σταθεροποίηση και συγκράτηση της ανάταξης. Παράλληλα εμφυτεύθηκαν δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί της κνήμης, πάνω στο περίοστεο, εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων (εικ. 56). Τα καλώδια των μεταλλακτών εξέρχονται του δέρματος δια των οπών των βελονών της εξωτερικής οστεοσύνθεσης.



Εικόνα 56: Ακτινογραφική απεικόνιση κατάγματος δεξιάς κνήμης Α και Β: προεγχειρητικά προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα. Γ και Δ: μετεγχειρητικά, εξωτερική οστεοσύνθεση και δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί του οστού εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων, προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα.

Ακολούθησε καθημερινή θεραπεία με υπερήχους χαμηλής έντασης διάρκειας 20 λεπτών (εικ. 57) και παρακολούθηση της πώρωσης κάθε τέσσερις ημέρες. Η εξέλιξη της πώρωσης παρατηρήθηκε ακτινολογικά με το σχηματισμό κυρίως ενδοοστικού πώρου λόγω της ακαμψίας της εξωτερικής οστεοσύνθεσης (εικ. 58 και 59).

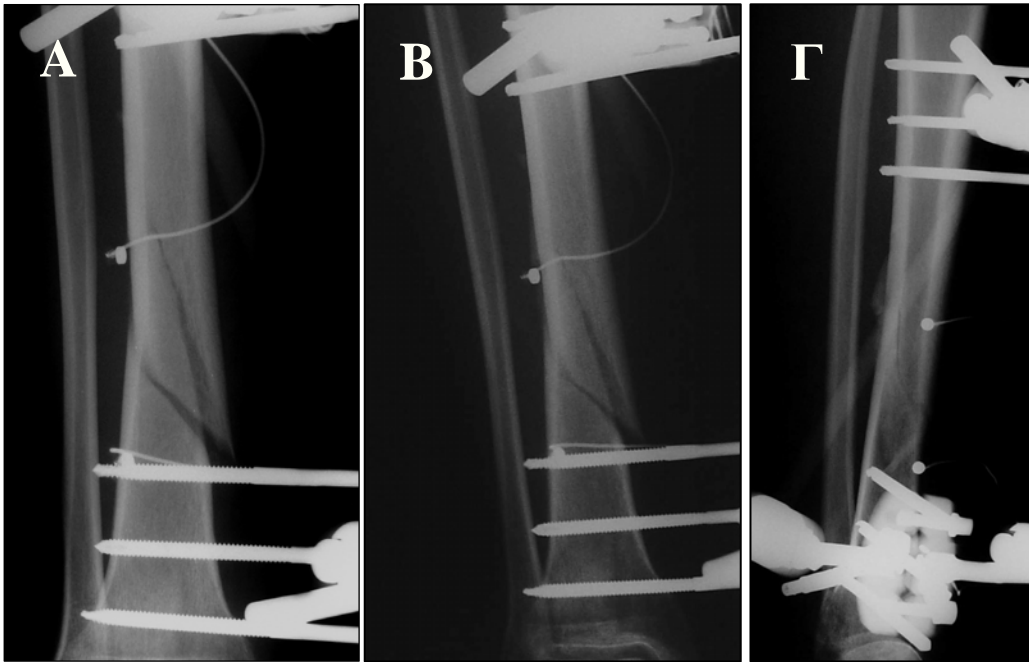


Εικόνα 57: Απεικόνιση ασθενούς με το σύστημα διοστικών υπερήχων- φορητή συσκευή για την ευόδωση και παρακολούθηση πώρωσης. Στη ζώνη του ασθενούς φέρεται το δομοστοιχείο ελέγχου και το δομοστοιχείο παραγωγής και λήψης υπερήχων προσαρμύζονταν στο πλαίσιο της εξωτερικής οστεοσύνθεσης.

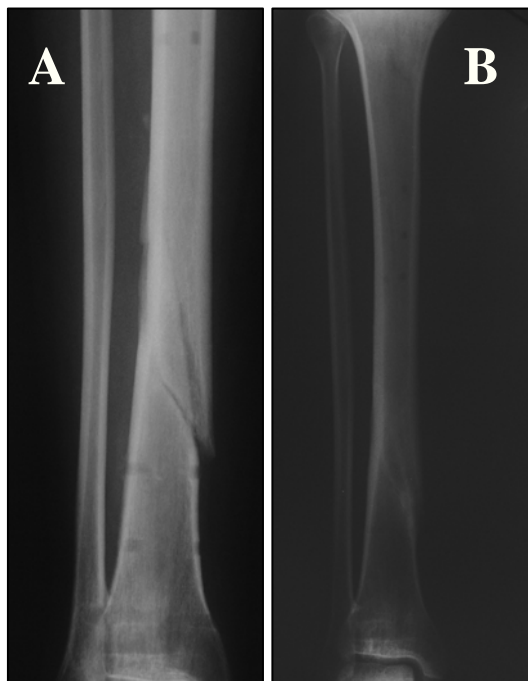
Στις 110 ημέρες από την χειρουργική επέμβαση πραγματοποιήθηκε αξονική τομογραφία στην περιοχή του κατάγματος, όπου και με την χρήση του λογισμικού analyze 4.0 έγινε τρισδιάστατη ανακατασκευή στο χώρο του πώρου, όπου φάνηκε καθαρά ότι αναπτύχθηκε ενδοοστικός πώρος λόγω της ακαμψίας του συστήματος εξωτερικής οστεοσύνθεσης (εικ. 60).

Οι μετρήσεις με υπερήχους κατέδειξαν ότι στις 110 ημέρες υπήρχε θετική μεταβολή της ταχύτητας των υπερήχων σε σχέση με την ταχύτητα που μετρήθηκε άμεσα μετεγχειρητικά. Η αύξηση αυτή σε συνδυασμό με τα ακτινοδιαγνωστικά δεδομένα οδήγησε στην αφαίρεση του συστήματος της εξωτερικής οστεοσύνθεσης και των υπερηχητικών μετατροπέων. Ακολούθησε σταδιακή επαναφορά του ασθενούς στην πλήρη φόρτιση. Η κλινική δοκιμασία της αντοχής του πώρου του κατάγματος υπήρξε

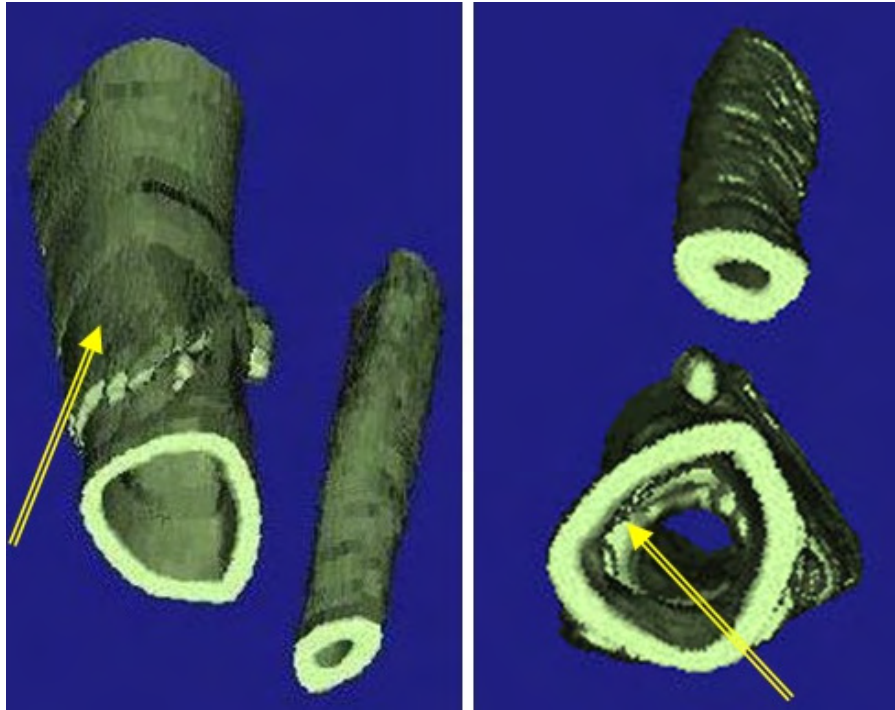
θετική. Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια της θεραπείας δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές ή ανεπιθύμητες ενέργειες.



Εικόνα 58: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πάρωσης σχηματισμός ενδοστικού πόρου σε: 1,5 μήνα , προσθοπίσθια λήψη (A) και 2,5 μήνες, προσθοπίσθια (B) και πλάγια (Γ) λήψη μετεγχειρητικά.



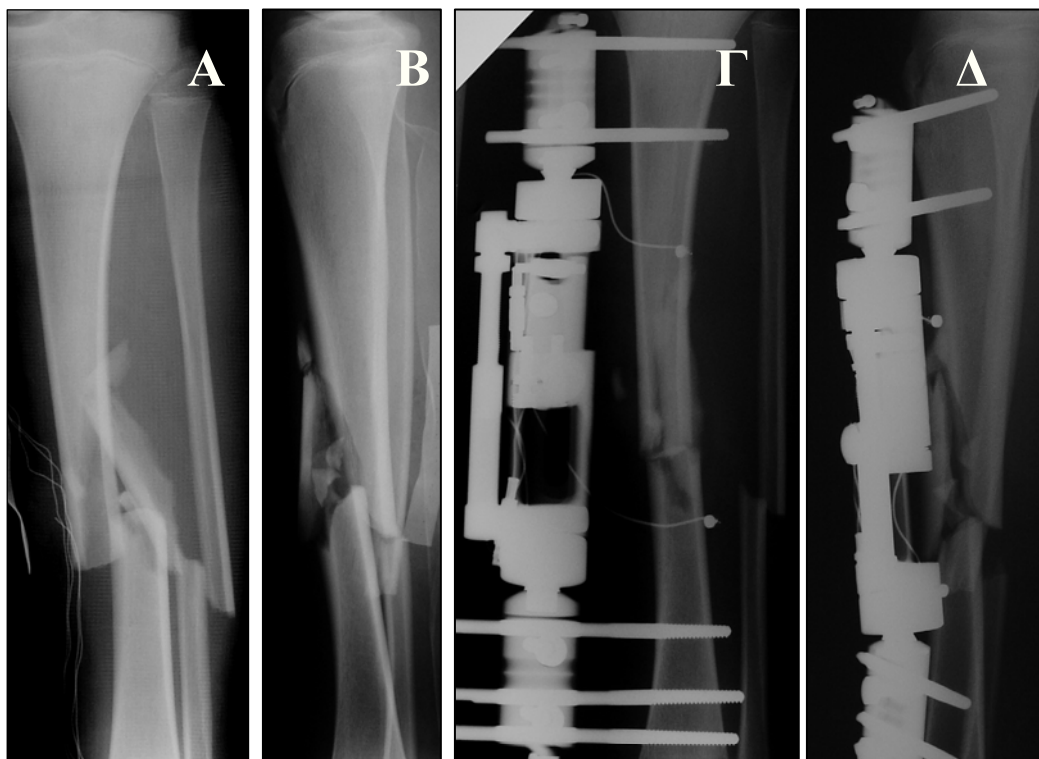
Εικόνα 59: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πάρωσης σε 4,5 μήνες (A) και 12 μήνες (B) σε προσθοπίσθια λήψη μετεγχειρητικά.



Εικόνα 60: Τρισδιάστατη ανακατασκευή του πόρου επί της αξονικής τομογραφίας στην περιοχή του κατάγματος. Τα κίτρινα βέλη αναδεικνύουν τον μικρό περισπαστικό πόρο και τον εκτεταμένο ενδοοστικό σε επιμήκη και εγκάρσια διατομή αντίστοιχα

2^η Κλινική εφαρμογή

Πρόκειται για ασθενή, άρρεν 15 ετών, με ανοικτό κάταγμα 2^{ου} βαθμού διάφυσης αριστερής κνήμης και περόνης (εικ. 61). Ο ασθενής αντιμετωπίστηκε κατόπιν συναίνεσής του χειρουργικά με ανοικτή ανάταξη του κατάγματος, τοποθέτηση εξωτερικής οστεοσύνθεσης και σύστημα διστικτών υπερήχων. Υπό ραχιαία αναισθησία πραγματοποιήθηκε ανοικτή ανάταξη του κατάγματος σε ανατομική θέση και υπό ακτινοσκοπικό έλεγχο τοποθετήθηκαν πέντε βελόνες εξωτερικής οστεοσύνθεσης μετά από ισάριθμες μικρές τομές δέρματος, 2 κεντρικά και 3 περιφερικά της εστίας του κατάγματος στην κνήμη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε μονόπλευρο πλαίσιο εξωτερικής οστεοσύνθεσης (τύπου ORTHOFIX), για την σταθεροποίηση και συγκράτηση της ανάταξης. Παράλληλα εμφυτεύθηκαν δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί της κνήμης, πάνω στο περίοστεο, εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων (εικ. 61). Τα καλώδια των μεταλλακτών εξέρχονται του δέρματος δια των οπών των βελονών της εξωτερικής οστεοσύνθεσης.



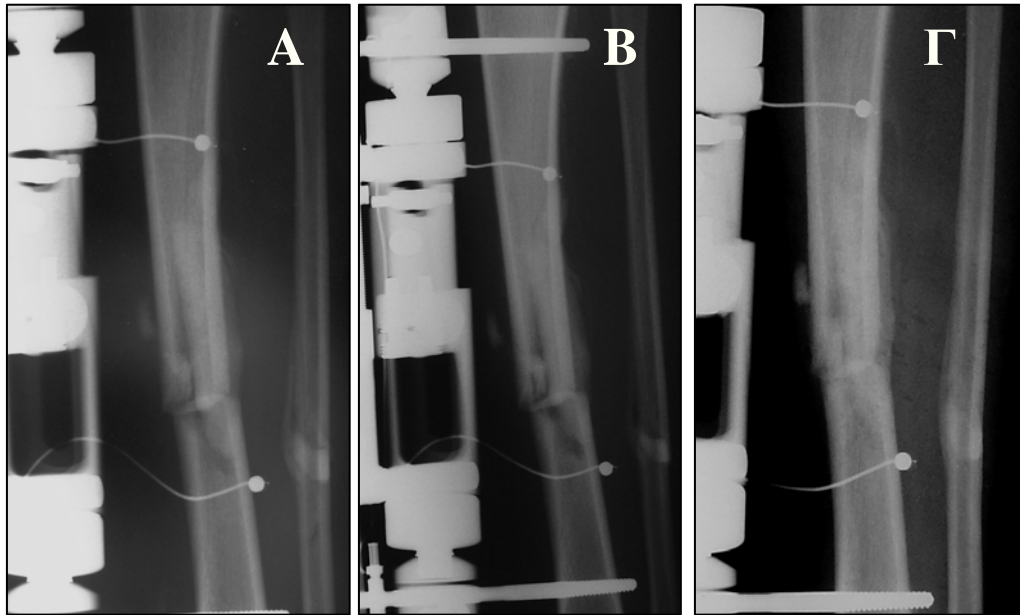
Εικόνα 61: Ακτινογραφική απεικόνιση κατάγματος αριστερής κνήμης Α και Β: προεγχειρητικά προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα. Γ και Δ: μετεγχειρητικά, εξωτερική οστεοσύνθεση και δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί του οστού εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων, προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα.

Ακολούθησε καθημερινή θεραπεία με υπερήχους χαμηλής έντασης διάρκειας 20 λεπτών και παρακολούθηση της πόρωσης κάθε τέσσερις ημέρες. Η εξέλιξη της πόρωσης παρατηρήθηκε ακτινολογικά με το σχηματισμό κυρίως περιοστικού πόρου ίσως λόγω της σχετικής ελαστικότητας της εξωτερικής οστεοσύνθεσης (εικ. 62 και 63).

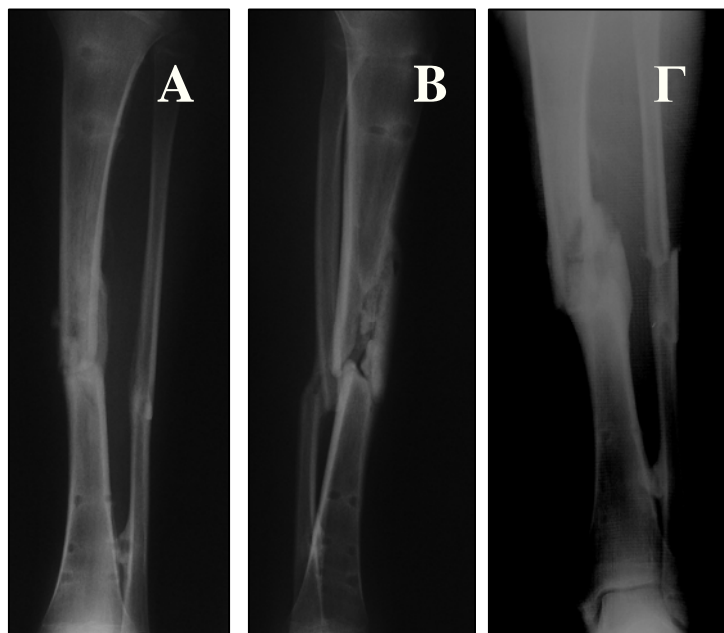
Στις 110 ημέρες από την επέμβαση πραγματοποιήθηκε αξονική τομογραφία στην περιοχή του κατάγματος, όπου και με την χρήση του λογισμικού analyze 4.0 έγινε τρισδιάστατη ανακατασκευή στην περιοχή του πόρου, όπου φάνηκε καθαρά ότι αναπτύχθηκε περιοστικός πόρος λόγω της σχετικής ελαστικότητας του συστήματος εξωτερικής οστεοσύνθεσης (εικ. 64).

Καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας δεν σημειώθηκαν επιπλοκές και ανεπιθύμητες ενέργειες. Η καταγραφή των μετρήσεων της ταχύτητας διάδοσης των υπερήχων κατέδειξε ότι στις 110 ημέρες υπήρχε θετική μεταβολή της ταχύτητας των υπερήχων σε σχέση με την ταχύτητα που μετρήθηκε άμεσα μετεγχειρητικά. Με βάση την

αύξηση αυτή και τα ακτινοδιαγνωστικά ευρήματα αποφασίστηκε η αφαίρεση του συστήματος της εξωτερικής οστεοσύνθεσης και των υπερηχητικών μετατροπέων και ο ασθενής επανήλθε στις καθημερινές του δραστηριότητες του.



Εικόνα 62: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πάρωσης σχηματισμός περιστικού πάρου σε: Α) 2 μήνες, Β) 3 μήνες και Γ) 4 μήνες μετεγχειρητικά σε προσθιοπίσθια λήψη.



Εικόνα 63: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πάρωσης σε 4,5 μήνες προσθιοπίσθια (Α) και πλάγια λήψη (Β) και σε 9 μήνες προσθιοπίσθια λήψη (Γ) μετεγχειρητικά.



Εικόνα 64: Τρισδιάστατη ανακατασκευή, αναπαράσταση στην περιοχή του πώρου επί της αξονικής τομογραφίας στην περιοχή κατάγματος. Τα κόκκινα βέλη αναδεικνύουν τον εκτεταμένο περιοστικό πόρο σε επιμήκη και εγκάρσια διατομή.

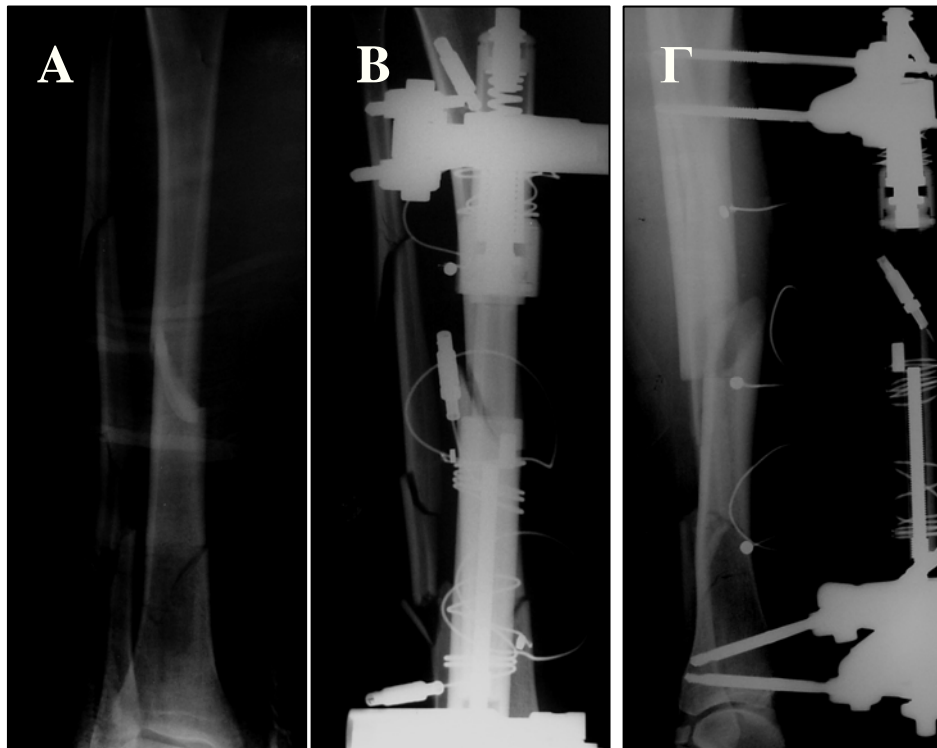
3^η Κλινική Εφαρμογή

Πρόκειται για ασθενή, θήλυ 40 ετών, πολυτραυματίας με κλειστό διπολικό κάταγμα δεξιάς κνήμης και περόνης (εικ. 65). Η ασθενής αντιμετωπίστηκε κατόπιν συναίνεσής της χειρουργικά με κλειστή ανάταξη του κατάγματος, τοποθέτηση εξωτερικής οστεοσύνθεσης και σύστημα διοστικών υπερήχων. Υπό ραχιαία αναισθησία πραγματοποιήθηκε κλειστή ανάταξη του κατάγματος και υπό ακτινοσκοπικό έλεγχο τοποθετήθηκαν τέσσερις βελόνες εξωτερικής οστεοσύνθεσης μετά από ισάριθμες μικρές τομές δέρματος, 2 κεντρικά και 2 περιφερικά της εστίας του κατάγματος στην κνήμη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε μονόπλευρο πλαίσιο εξωτερικής οστεοσύνθεσης (τύπου THETALOS), για την σταθεροποίηση και συγκράτηση της ανάταξης. Παράλληλα εμφυτεύθηκαν δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί της κνήμης, πάνω στο περίοστεο, εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων στο ένα επίπεδο και ένας υπερηχητικός μετατροπέας στο δεύτερο επίπεδο του κατάγματος της κνήμης (εικ. 65). Τα καλώδια των

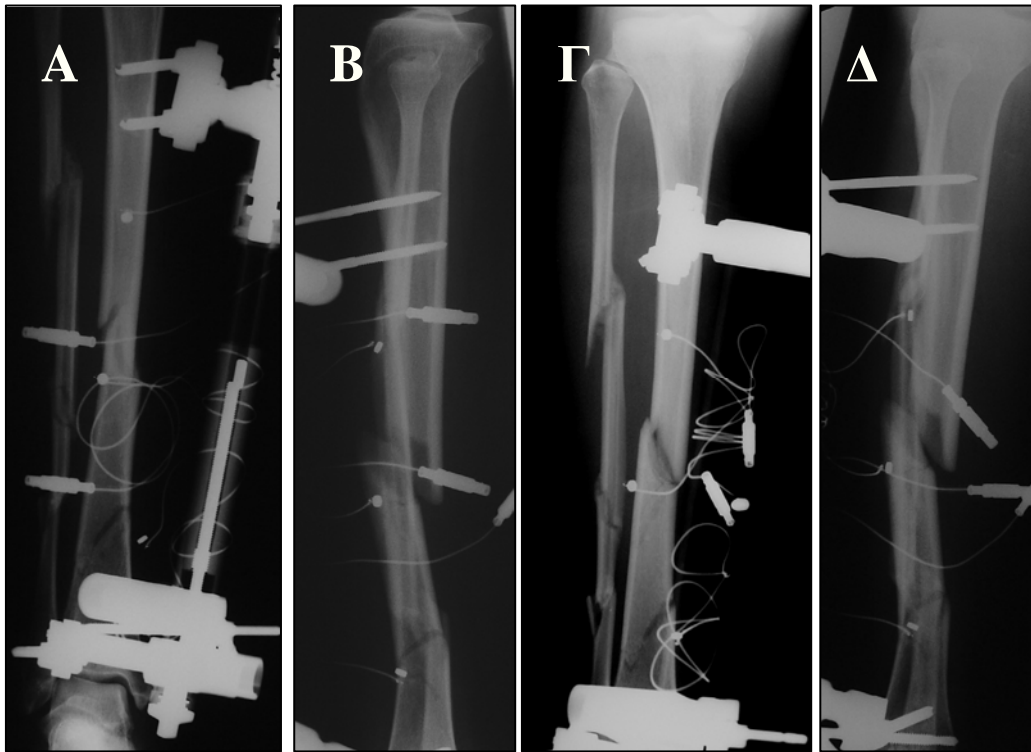
μεταλλακτών εξέρχονται του δέρματος δια των οπών των βελονών της εξωτερικής οστεοσύνθεσης.

Ακολούθησε καθημερινή θεραπεία με διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης διάρκειας 20 λεπτών και παρακολούθηση της πόρωσης κάθε τέσσερις ημέρες. Λόγω τεχνικών δυσκολιών ενώ ήταν εφικτή η θεραπεία δεν πραγματοποιήθηκε καταγραφή των μετρήσεων της ταχύτητας διάδοσης των υπερήχων. Στη συνέχεια δεν ήταν εφικτή ούτε η θεραπεία με διοστική εφαρμογή υπερήχων χαμηλής έντασης λόγω τεχνικού προβλήματος, κοπή του καλωδίου ενός υπερηχητικού μετατροπέα.

Πέντε μήνες μετά την αρχική αντιμετώπιση (εικ. 66) πραγματοποιήθηκε νέα χειρουργική επέμβαση λόγω ψευδάρθρωσης κνήμης με αλλαγή του συστήματος της εξωτερικής οστεοσύνθεσης, αφαίρεσης των υπερηχητικών μετατροπέων και τοποθέτηση οστικών μοσχευμάτων στην εστία της ψευδάρθρωσης. Τελικά η ψευδάρθρωση αντιμετωπίστηκε 8 μήνες αργότερα με ενδομυελική ήλωση της κνήμης με νέα χειρουργική επέμβαση (εικ. 67).



Εικόνα 65: Ακτινογραφική απεικόνιση διπολικού κατάγατος δεξιάς κνήμης Α: προεγχειρητικά προσθοπίσθια λήψη. Β και Γ: μετεγχειρητικά, εξωτερική οστεοσύνθεση και τρεις υπερηχητικοί μετατροπέες επί του οστού εκατέρωθεν εστίας κατάγατος, προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα.



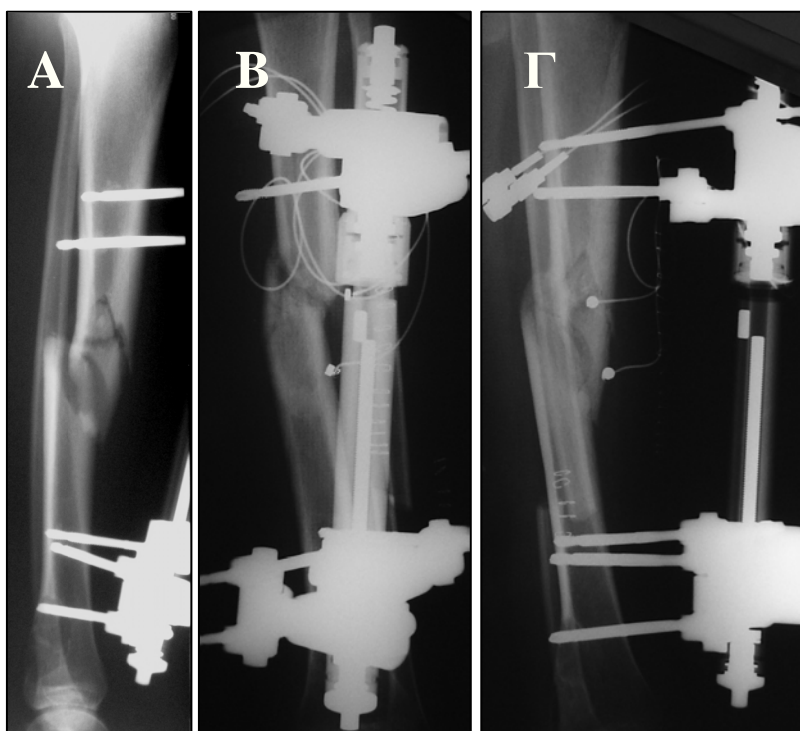
Εικόνα 66: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πώρωσης 2 μήνες προσθιοπίσθια (Α) και πλάγια λήψη (Β) 3 μήνες και 5 μήνες μετεγχειρητικά σε προσθιοπίσθια (Γ) και πλάγια λήψη (Δ).



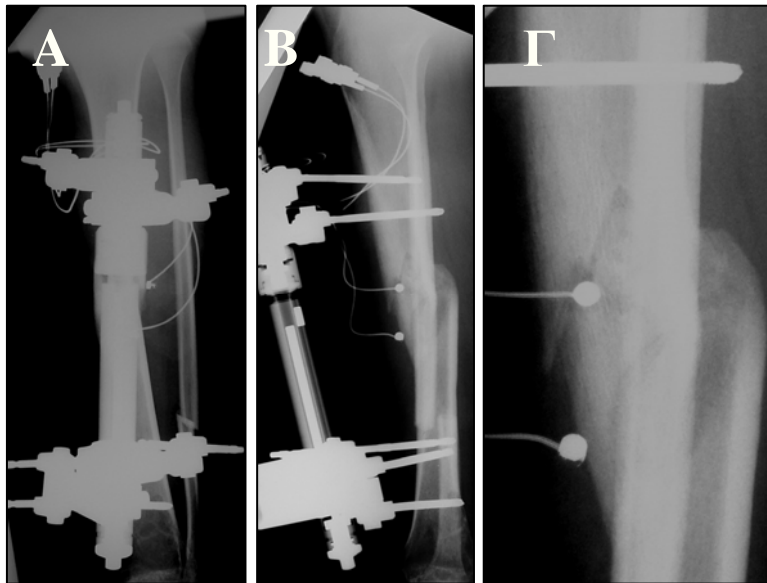
Εικόνα 67: Ακτινογραφική απεικόνιση ψευδάρθρωσης ένα χρόνο μετεγχειρητικά (Α), και ενδομελική ήλωση σε προσθιοπίσθια (Α) και πλάγια λήψη (Γ).

4^η Κλινική Εφαρμογή

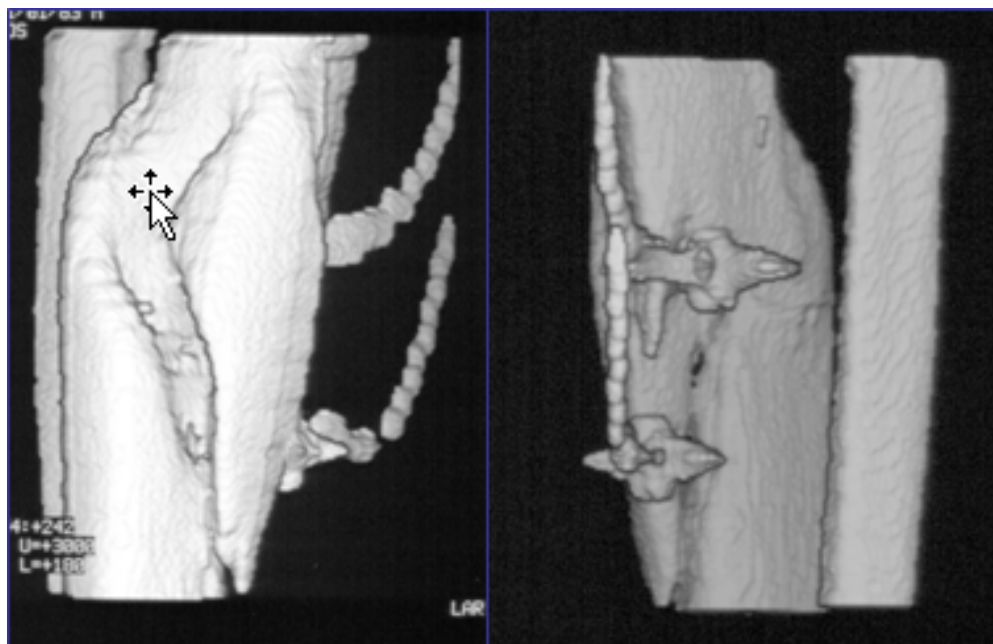
Πρόκειται για ασθενή, άρρεν 19 ετών, με καθυστερημένη πώρωση κατάγματος διαφύσεως αριστερής κνήμης. Ο ασθενής είχε υποστεί τροχαίο ατύχημα προ τριμήνου, νοσηλεύτηκε στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας λόγω κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης και το κάταγμα κνήμης είχε αντιμετωπιστεί χειρουργικά με κλειστή ανάταξη και τοποθέτηση εξωτερικής οστεοσύνθεσης (τύπου THETTALOS) (εικ. 68Α). Ο ασθενής στη συνέχεια εμφάνισε καθυστερημένη πώρωση και κατόπιν συναίνεσής του αντιμετωπίστηκε χειρουργικά με διατήρηση της εξωτερικής οστεοσύνθεσης, οστεοτομία περόνης και εμφυτεύθηκαν δύο υπερηχητικοί μετατροπείς επί της κνήμης, πάνω στο περίοστεο, εκατέρωθεν των κατεαγόντων άκρων (εικ. 68Β,Γ). Στον ασθενή συνεστήθει μερική φόρτιση με την χρήση δύο βακτηριών μασχάλης, ενώ γινόταν καθημερινή θεραπεία με υπερήχους χαμηλής έντασης διάρκειας 20 λεπτών και παρακολούθηση της πώρωσης κάθε τέσσερις ημέρες.



Εικόνα 68: Ακτινογραφική απεικόνιση μετεγχειρητικά (Α): μετά την τοποθέτηση εξωτερικής οστεοσύνθεσης κατάγματος αριστερής κνήμης, (Β) και (Γ): μετά την εμφύτευση δύο υπερηχητικών μετατροπέων επί της κνήμης εκατέρωθεν εστίας κατάγματος επί καθυστερημένης πώρωσης, προσθοπίσθια και πλάγια λήψη αντίστοιχα.



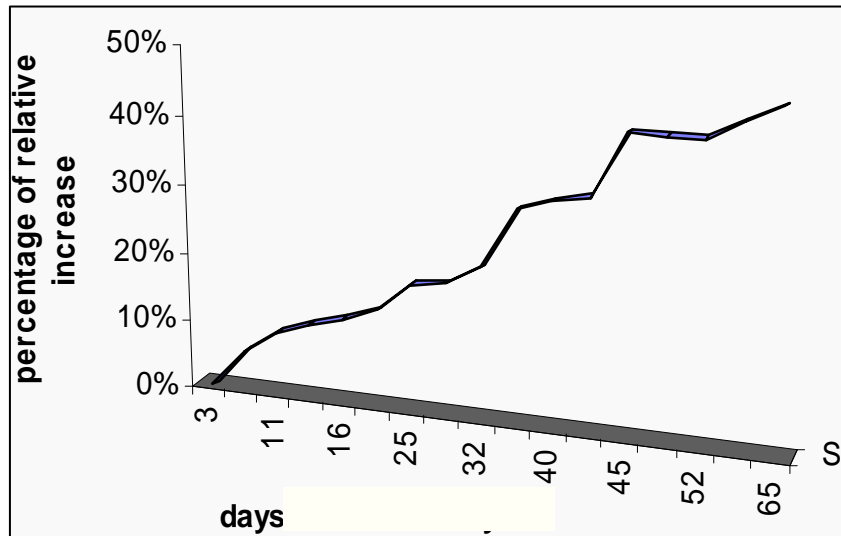
Εικόνα 69: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πάρωσης σε 2 μήνες μετεγχειρητικά σε προσθιοπίσθια (Α) και πλάγια λήψη (Β), (Γ).



Εικόνα 70: Τρισδιάστατη αναπαράσταση στην περιοχή του πάρου επί της ποσοτικής αξονικής τομογραφίας στην περιοχή κατάγματος δύο μήνες μετεγχειρητικά.

Η παρακολούθηση του ασθενούς τόσο ακτινολογικά όσο και με σύστημα των υπερήχων υποδείκνυε ότι η διαδικασία της πάρωσης εξελίσσονταν κανονικά. Όπως καταδεικνύεται από το σχήμα 1, η ταχύτητα των υπερήχων αυξάνονταν γοργά σε σχέση

με την τιμή που είχε μετρηθεί αρχικά αμέσως μετά την τοποθέτηση των μετατροπέων. Από την 25^η ημέρα φαίνεται ότι η αύξηση ήταν της τάξης του 20% ενώ στους 2 μήνες η αύξηση ανέρχονταν στο 47%.



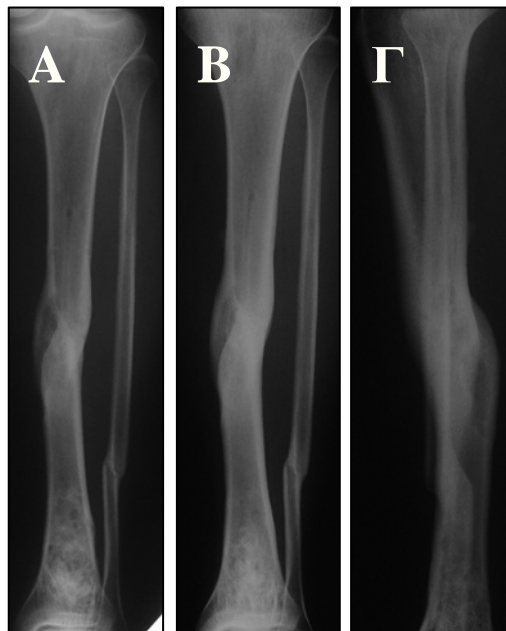
Σχήμα 1: Σχετική αύξηση ταχύτητας μετάδοσης, εκφρασμένη σε εκατοστιαία μεταβολή, (ψ) σε σχέση με χρόνο από την εφαρμογή των υπερηχητικών μετατροπέων (χ).



Εικόνα 71: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πώρωσης κατάγματος αριστερής κνήμης 66 ημέρες μετεγχειρητικά σε προσθιοπίσθια λήψη (A) και (B) και πέντε μήνες μετεγχειρητικά (Γ).

Η τρισδιάστατη ανασύσταση στο χώρο με τη χρήση της ποσοτικής αξονικής τομογραφίας ανέδειξε την ποσοτικοποίηση και τμηματοποίηση του σχηματισθέντος πόρου στους δύο μήνες από την εμφύτευση των υπερηχητικών μετατροπέων (εικ. 70). Η εξωτερική οστεοσύνθεση μαζί με τους υπερηχητικούς μετατροπείς αφαιρέθηκε στους 2,5 μήνες με βάση τα ακτινολογικά σημεία πώρωσης (εικ. 69) σε συνδυασμό με την σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στην ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων, που αποτελεί σημαντική ένδειξη της ικανοποιητικής πώρωσης που επιτεύχθει (σχήμα 1).

Καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας δεν σημειώθηκαν επιπλοκές και ανεπιθύμητες ενέργειες. Μετά την αφαίρεση των υλικών ο ασθενής επανήλθε στις καθημερινές του δραστηριότητες του (εικ. 71,72).

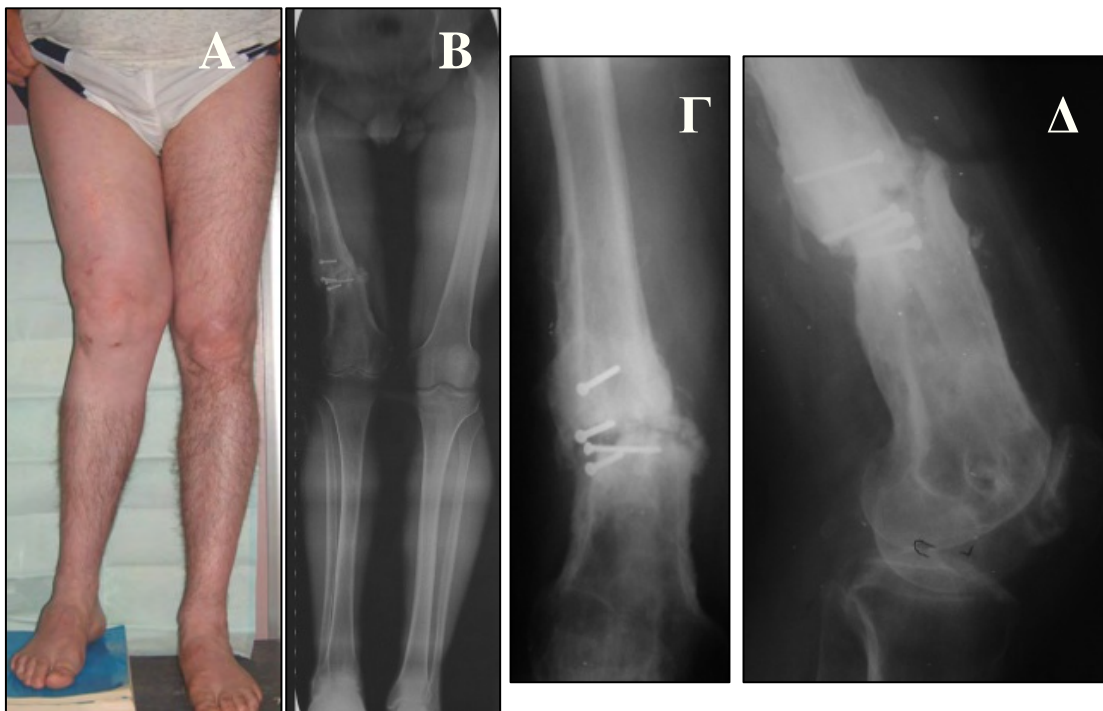


Εικόνα 72: Ακτινογραφική απεικόνιση 1 έτος (Α) και 2 έτη μετεγχειρητικά σε προσθιοπίσθια λήψη (Β) και πλάγια λήψη (Γ).

5^η Κλινική εφαρμογή

Πρόκειται για ασθενή, άρρεν 45 ετών, με σηπτική μη πυορρούσα ψευδάρθρωση δεξιού μηριαίου (διαφυσίτιδα) και σημαντική ανισοσκελία δεξιού κάτω άκρου 5cm επί παλαιού ανοικτού (2^{ου} βαθμού) υπερκονδύλιου κατάγματος δεξιού μηριαίου (εικ. 73). Ο ασθενής αρχικά, προ τρία έτη, αντιμετωπίστηκε χειρουργικά με ανοικτή ανάταξη και εσωτερική οστεοσύνθεση με πλάκα και κοχλίες, σε άλλο νοσοκομείο. Πέντε μήνες μετά

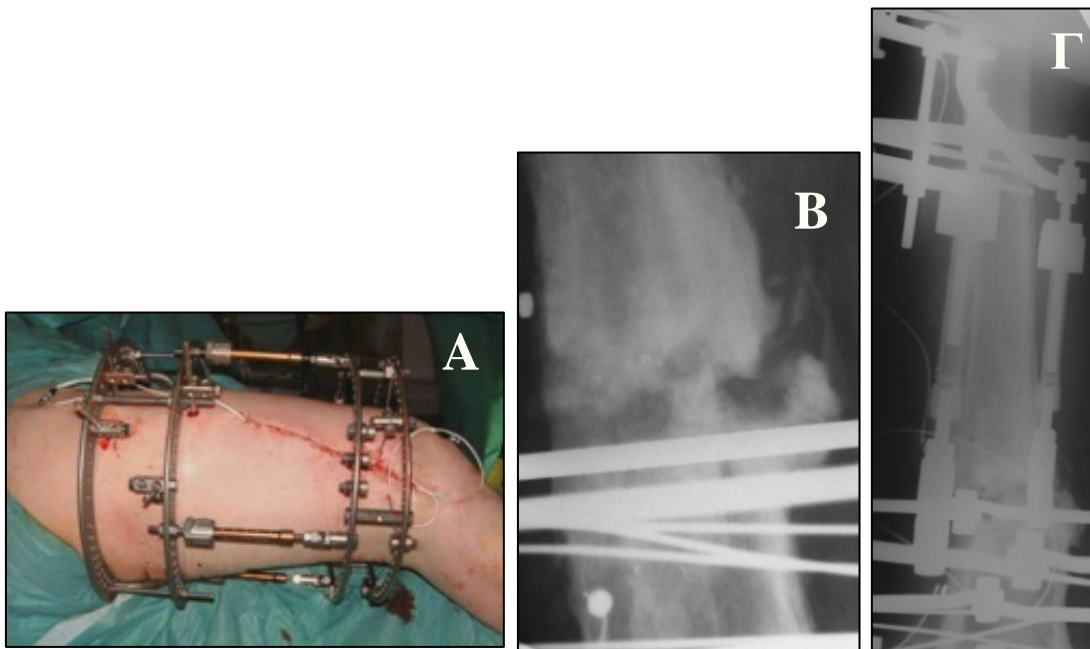
τον αρχικό τραυματισμό ο ασθενής υπέστη επανακάταγμα δεξιού μηριαίου και αντιμετωπίστηκε χειρουργικά με ενδομυελική ήλωση μηριαίου κατόπιν αφαίρεσης των υλικών της εσωτερικής οστεοσύνθεσης, εκτός τεσσάρων κοχλιών. Ο ασθενής όμως, δεν παρουσίασε την αναμενόμενη εξέλιξη της πόρωσης και τρεις μήνες αργότερα τοποθετήθηκαν με νέα χειρουργική επέμβαση οστικά μοσχεύματα στην περιοχή της ψευδάρθρωσης του δεξιού μηριαίου, με στόχο την ευόδωση της επουλωτικής εξεργασίας της πόρωσης. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε ευόδωση της πόρωσης και δύο έτη μετά τον αρχικό τραυματισμό λόγω ύπαρξης πλέον σηπτικής ψευδάρθρωσης του μηριαίου πραγματοποιήθηκε νέα χειρουργική επέμβαση η οποία περιλάμβανε την αφαίρεση του ενδομυελικού ήλου και χειρουργικό καθαρισμό της εστίας της σηπτικής ψευδάρθρωσης.



Εικόνα 73: (Α) Ασθενής με σηπτική μη πυορρούσα ψευδάρθρωση δεξιού μηριαίου και σημαντική ανισοσκελία δεξιού κάτω άκρου 5cm και (Β) ακτινογραφική απεικόνιση, σε προσθιοπίσθια (Γ) και πλάγια (Δ) λήψη.

Τελικά, ο ασθενής τρία έτη από τον αρχικό τραυματισμό, με σηπτική ψευδάρθρωση του δεξιού μηριαίου και ανισοσκελία 5cm αντιμετωπίστηκε χειρουργικά στην Ορθοπαιδική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Κατά την χειρουργική επέμβαση, κατόπιν συναίνεσης του ασθενούς, αφαιρέθηκαν οι 4 κοχλίες

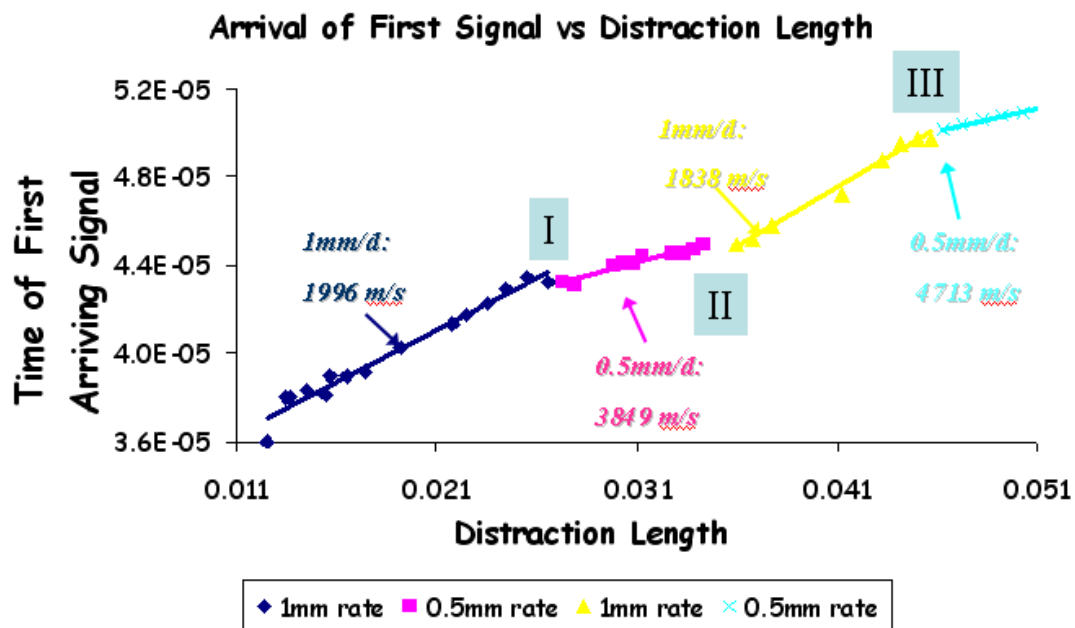
καθώς και το νεκρωμένο τμήμα του οστού λόγω λοίμωξης και τοποθετήθηκε σύστημα εξωτερικής οστεοσύνθεσης κυκλικού πλαισίου τύπου ILIZAROV στο μηριαίο και πραγματοποιήθηκε επιμήκυνση με τη μέθοδο διατατικής οστεογένεσης (δύο δακτύλιοι άνω και δύο δακτύλιοι κάτω από τη εστία επιμήκυνσης). Παράλληλα, εμφυτεύθηκαν δύο υπερηχητικοί μετατροπείς εκατέρωθεν της εστίας της επιμήκυνσης (εικ. 74). Εφαρμόστηκε καθημερινή θεραπεία με υπερήχους διάρκειας 20 λεπτών και παρακολούθηση της πάρωσης μέσω διοστικών υπερηχητικών μετρήσεων ανά τέσσερις ημέρες αρχικά, ενώ αργότερα ανά μία μέρα λόγω της εναλλαγής του ρυθμού διατατικής οστεογένεσης, δηλαδή με τον ρυθμό επιμήκυνσης του οστού (σχήμα 2).



Εικόνα 74: (Α) απεικόνιση εξωτερικής οστεοσύνθεσης τύπου ILIZAROV και των δύο υπερηχητικών μετατροπέων επί του οστού εκατέρωθεν εστίας επιμήκυνσης δεξιού μηριαίου, ακτινογραφική απεικόνιση (Β) και (Γ).

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται ο χρόνος άφιξης των υπερηχητικών κυμάτων στο δέκτη (time of first arrival signal) ως συνάρτηση του μήκους της διάτασης. Τα διαφορετικά χρώματα καταδεικνύουν διαφορετικό ρυθμό διάτασης. Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης σε κάθε τμήμα της γραφικής παράστασης δίνει την ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων μέσω του ανασχηματιζόμενου οστού για κάθε ρυθμό επιμήκυνσης. Παρατηρείται ότι από την αρχή των μετρήσεων μέχρι και το σημείο I ο ρυθμός επιμήκυνσης ήταν 1 χιλιοστό την ημέρα (για ένα διάστημα περίπου δεκαπέντε ημερών)

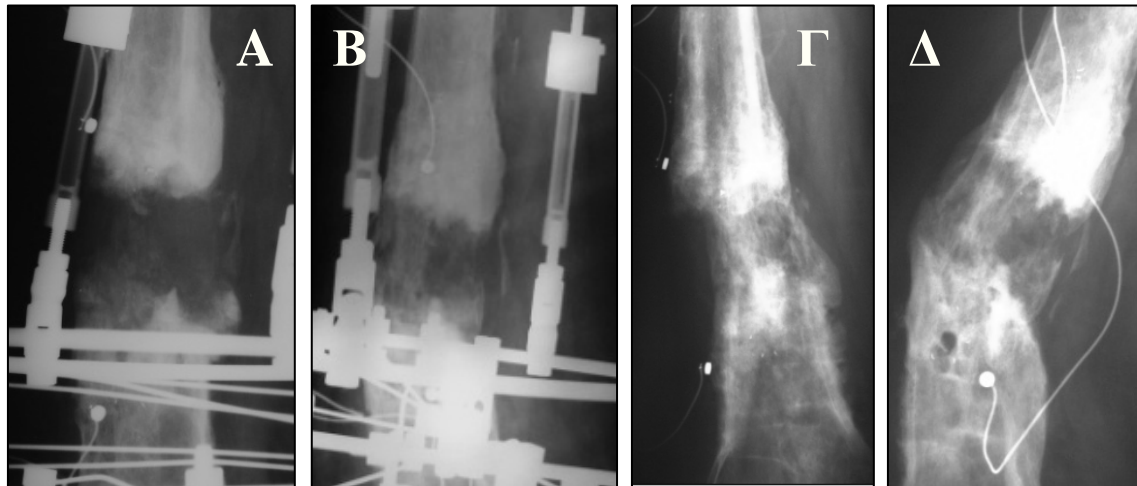
και η υπολογιζόμενη ταχύτητα διάδοσης ήταν 1996 m/s. Από το σημείο I μέχρι το II διάρκειας δέκα ημερών, ο ρυθμός επιμήκυνσης υποδιπλασιάστηκε και αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί (περίπου διπλασιασμός) η ταχύτητα διάδοσης γεγονός ερμηνεύεται από το ότι ο σχηματιζόμενος πόρος (ανασχηματιζόμενο οστόν) ήταν πιο στέρεος και με μεγαλύτερη οστική πυκνότητα. Με την αύξηση του ρυθμού επιμήκυνσης ξανά (σημείο II – III), η ταχύτητα μειώθηκε αντιστοίχως, ενώ αυξήθηκε ξανά με την μείωση του ρυθμού επιμήκυνσης από το σημείο III και έπειτα (μέχρι και την 45^η ημέρα). Η ταχύτητα για το εν λόγω τελευταίο χρονικό διάστημα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του σημείου από 0 ως I καθώς είχε ήδη σχηματιστεί πόρος.



Σχήμα 2: Διάγραμμα που απεικονίζει το χρόνο άφιξης των υπερηχητικών κυμάτων στο δέκτη συναρτήσει του μήκους της επιμήκυνσης. Η κλίση της συνάρτησης (μέσω ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης) δίνει την ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ωρίμανσης του ανασχηματιζόμενου οστού κατά την διατακτική οστεογένεση.

Οι μετρήσεις σταμάτησαν στους δύο μήνες περίπου, ενώ στους τρεις μήνες η πόρωση εξελίσσονταν κανονικά (εικ. 75A) και στους πέντε μήνες αφαιρέθηκε αρχικά το κυκλικό πλαίσιο εξωτερικής οστεοσύνθεσης και στη συνέχεια οι υπερηχητικοί μετατροπείς με ικανοποιητικά ακτινολογικά σημεία πόρωσης (εικ. 75B). Στον ασθενή δεν παρατηρήθηκε καμία επιπλοκή ή ανεπιθύμητη ενέργεια κατά τη διάρκεια της

θεραπείας. Κατά τα τρία έτη μετεγχειρητικής παρακολούθησης του ασθενούς δεν παρατηρήθηκε καμία υποτροπή της λοίμωξης και ο ασθενής παρουσιάζει άριστη οστική επούλωση (εικ. 76).



Εικόνα 75: Ακτινογραφική απεικόνιση εξέλιξης πόρωσης (Α): τρεις μήνες, (Β): πέντε μήνες, (Γ) και (Δ) επτά μήνες (κατόπιν αφαίρεσης κυκλικού πλαισίου) μετεγχειρητικά.



Εικόνα 76: Ακτινογραφική απεικόνιση πόρωσης ένα (Α: προσθιοπίσθια) και (Β: πλάγια λήψη) και τρία έτη (Γ: προσθιοπίσθια) και (Δ: πλάγια λήψη) μετεγχειρητικά.

5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Τα ευρήματα πολλών μελετών σε επίπεδο βασικής έρευνας αλλά και πειραματικών καθώς και κλινικών μελετών καταδεικνύουν ότι οι υπέρηχοι χαμηλής έντασης ευοδώνουν την επούλωση τενόντων²³⁰⁻²⁴⁰, συνδέσμων²⁴¹⁻²⁴³ καθώς και τη διαδικασία της πόρωσης των καταγμάτων²¹²⁻²²⁴.

Η επίδραση της διοστικής εφαρμογής υπερήχων χαμηλής έντασης (LiUS) στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος καθώς και στην διαδικασία της συνδεσμοποίησης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία. Είναι γνωστό ότι το φαινόμενο της συνδεσμοποίησης πραγματοποιείται εντός του πρώτου έτους μετά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με χρήση τενοντίου μοσχεύματος όπως έχει παρατηρηθεί σε πολλές κλινικές μελέτες χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ακριβής μηχανισμός τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο. Η επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία φαίνεται ότι επηρεάζεται από διάφορους βιολογικούς παράγοντες αλλά και παράγοντες μηχανικού στρες (mechanotransduction). Πειραματικές μελέτες³¹⁻³⁵ υποδεικνύουν ότι οι αυξητικοί παράγοντες επηρεάζουν τη διαδικασία μεταλλαγής κολλαγόνου στην διεπιφάνεια οστού - τενοντίου μοσχεύματος και πιθανώς επιταχύνουν την ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ.

Στην πρώτη φάση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής επιλέξαμε να μελετήσουμε σε κουνέλια την έκφραση γονιδίων του TGF-β₁, biglycan, κολλαγόνου τύπου I και του tRNA^{Gly} κατά την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος υπό την επίδραση των διοστικών LiUS. Η έκφραση των γονιδίων αυτών φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάζουν τη διαδικασία ωρίμανσης του μοσχεύματος καθώς και τη διαδικασία μεταλλαγής κολλαγόνου στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος κατά τη συνδεσμοποίηση.

Ο TGF-β₁ ως τοπικός μεσολαβητής ρυθμίζει πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας⁵⁰, οστικής ανακατασκευής²⁸⁶ και επάγει την παραγωγή ποικίλων αυξητικών παραγόντων. Στην παρούσα πειραματική μελέτη η έκφραση του γονιδίου του TGF-β₁ παρουσιάζει ένα προφίλ δύο φάσεων στην

ομάδα θεραπείας ενώ στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρείται αυτή η διακύμανση στην έκφραση του γονιδίου του TGF-β₁ και τα επίπεδά του παραμένουν αμετάβλητα (εικ. 25). Αυτό το διφασικό προφίλ έκφρασης του TGF-β₁ φαίνεται ότι σχετίζεται με την διοστική εφαρμογή των υπερήχων στην ομάδα θεραπείας. Στην αρχή της θεραπείας παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα του TGF-β₁ ήταν περίπου 10% υψηλότερα στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και στη συνέχεια μειώνονται από τη 2^η ημέρα. Ανάλογη διακύμανση της έκφρασης των επιπέδων mRNA του TGF-β₁, που παρουσιάζεται στην ομάδα θεραπείας της παρούσας πειραματικής μελέτης, έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και σε καλλιέργειες οστεοβλαστών^{273,284}. Έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι υπό την επίδραση υπερήχων αυξάνονται αρχικά τα επίπεδα mRNA του TGF-β₁ σε ομοιογενείς καλλιέργειες οστεοβλαστών για περίπου μία ώρα μετά την εφαρμογή τους και στη συνέχεια μετά από λίγες ώρες μειώνονται σημαντικά κατά έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο²⁷³. Ωστόσο στην παρούσα πειραματική μελέτη η μείωση των επιπέδων του TGF-β₁ είναι πιο έντονη κατά την 5^η ως και την 9^η ημέρα και κατόπιν αυξάνονται βαθμιαία ως την 21^η ημέρα.

Η απόκριση αυτή της βαθμιαίας μείωσης των επιπέδων mRNA του TGF-β₁ στην ομάδα θεραπείας μπορεί να ερμηνευθεί με το γεγονός ότι κατά το πρώτο στάδιο της συνδεδεσμοποίησης, στάδιο κατά το οποίο αναδιοργανώνεται ο κυτταρικός πληθυσμός (repopulation)²³, υπάρχει μικρός αριθμός ενεργών κυττάρων. Υπάρχει όμως περίπτωση ο αριθμός των ενεργών κυττάρων να παραμένει ο ίδιος, τόσο στην ομάδα θεραπείας όσο και στην ομάδα ελέγχου. Στην περίπτωση αυτή, τα ελαττωμένα επίπεδα mRNA του TGF-β₁ φαίνεται να υποδεικνύουν ότι στα κύτταρα της ομάδας θεραπείας επάγεται μία μείωση του επιπέδου της συγκεκριμένης έκφρασης ως απόκριση στην αναγκαία μείωση του ρυθμού απόπτωσης των κυττάρων. Η μειωμένη αυτή έκφραση είναι πιθανό να μετατοπίζει την δυναμική του κυττάρου προς βιοχημικές διεργασίες που συμβάλουν στην ταχύτερη επουλωτική εξεργασία στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος, πιθανώς μέσω του non-Smad μονοπατιού⁵⁶. Συνεπακόλουθα και καθώς αυξάνεται μέσω της νεοαγγειογένεσης ο αριθμός των ενεργών κυττάρων (κυρίως των ινοβλαστών που είναι μεταβολικά ενεργοί) αυξάνονται και τα επίπεδα mRNA του TGF-β₁ για να επανέλθουν σε φυσιολογικά επίπεδα, με συνολικό αποτέλεσμα την περαιτέρω καλύτερη και ταχύτερη ωρίμανση του μοσχεύματος.

Επίσης έχει βρεθεί σε πειραματική μελέτη ότι η εφαρμογή LiUS παρατείνει την έκφραση του γονιδίου TGF-β₁ επιταχύνοντας με τον τρόπο αυτό την επούλωση των συνδέσμων²⁴³. Φαίνεται λοιπόν ότι η διοστική εφαρμογή LiUS επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου του TGF-β₁, διφασικό προφίλ, επιταχύνοντας την ωρίμανση του μοσχεύματος κατά την επούλωτική εξεργασία στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος στα κουνέλια.

Όπως έχει αναφερθεί, η πρωτεογλυκάνη biglycan παίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση και ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας. Σε *in vitro* μελέτες^{107,109} έχει καταδειχθεί ότι η biglycan αλληλεπιδρά και με τα τρία ισομερή του TGF-β. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση του TGF-β₁ ευοδώνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών της εξωκυττάριας ουσίας από τους ινοβλάστες^{66,67}. Στην παρούσα πειραματική μελέτη η έκφραση του γονιδίου biglycan με ημι-ποσοτική RT-PCR παρουσιάζει μία βαθμιαία αύξηση των επιπέδων του mRNA με το πέρασ του χρόνου, από την 1^η ως και την 21^η ημέρα, και στις δύο ομάδες (εικ. 28). Ωστόσο, στην ομάδα θεραπείας παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων mRNA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτή η βαθμιαία μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του mRNA μπορεί να οδηγεί σε ταχύτερη αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας στην ομάδα θεραπείας. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο και με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών όπου έχει παρατηρηθεί ότι κατά την επούλωση των συνδέσμων ιδίως μετά από ρήξη ΠΧΣ αυξάνονται τα επίπεδα mRNA της biglycan^{99,105}.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα mRNA της biglycan παραμένουν αυξημένα και κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ της 5^{ης} και 9^{ης} ημέρας που η έκφραση του γονιδίου του TGF-β₁ παρουσιάζει ελάττωση στην ομάδα θεραπείας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών^{110,111} που κατέδειξαν ότι ο TGF-β επάγει την αύξηση της έκφρασης της biglycan σε ομοιογενή καλλιέργεια ινοβλαστών. Στις *in vivo* συνθήκες της μελέτης μας, όπου σημειωτέον ο κυτταρικός πληθυσμός είναι ποιοτικά ανομοιογενής, φαίνεται ότι η έκφραση της biglycan δεν εξαρτάται κατά αποκλειστικότητα από την δράση του TGF-β₁ αλλά μπορεί να επηρεάζεται και από άλλους αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρονται από τους υπερήχους.

Φαίνεται λοιπόν ότι η διοστική εφαρμογή LiUS ευοδώνει την έκφραση του γονιδίου biglycan συμβάλλοντας ίσως σε ταχύτερη σύνθεση και οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας κατά το πρώιμο στάδιο της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγεί σε ταχύτερη ωρίμανση του τενοντίου μοσχεύματος και καλύτερη ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα.

Τα ευρήματα των επιπέδων mRNA της biglycan συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών υποδεικνύοντας ότι η biglycan μπορεί να επηρεάζει άμεσα το σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας μέσω της συσχέτισής με το σχηματισμό ινών κολλαγόνου²⁸⁵. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση του TGF-β₁ στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος αυξάνει τα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου τύπου I^{68,70}. Στην παρούσα πειραματική μελέτη η έκφραση του γονιδίου κολλαγόνου τύπου I παρουσιάζει μία σταδιακή αύξηση των επιπέδων του mRNA με το πέρασ του χρόνου και στις δύο ομάδες (εικ. 31). Στην ομάδα θεραπείας, με την εφαρμογή των διοστικών υπερήχων, παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων mRNA του κολλαγόνου τύπου I σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αν και η διαφορά στην έκφραση των επιπέδων mRNA του κολλαγόνου τύπου I μεταξύ των δύο ομάδων δεν είναι τόσο εμφανής όσο κατά την έκφραση της biglycan, αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου τύπου I παραμένουν αυξημένα και κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ της 5^{ης} και 9^{ης} ημέρας που η έκφραση του γονιδίου του TGF-β₁ παρουσιάζει ελάττωση στην ομάδα θεραπείας. Προφανώς η έκφραση του γονιδίου κολλαγόνου τύπου I επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες εκτός από τη δράση του TGF-β₁. Ωστόσο, η επίδραση των LiUS στη δράση του TGF-β₁ φαίνεται ότι επάγει επαρκή επίπεδα TGF-β₁ που διεγείρουν τόσο τη σύνθεση της biglycan όσο και του κολλαγόνου τύπου I.

Επίσης είναι γνωστό ότι οι ιστοί που συνθέτουν κολλαγόνο σχετίζονται με αυξημένη έκφραση μορίων tRNA^{Gly}⁹⁵. Το γεγονός αυτό συνάδει με το ότι η γλυκίνη αλλά και η προλίνη είναι τα αμινοξέα τα οποία υπερ-αντιπροσωπεύονται στα μόρια κολλαγόνου. Στην παρούσα πειραματική μελέτη, επιβεβαιώθηκε το γεγονός αυτό καθώς η αυξημένη έκφραση μορίων tRNA^{Gly} συνοδεύεται με σημαντική αύξηση των επιπέδων κολλαγόνου τύπου I (εικ. 33). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η εφαρμογή των

LiUS κατά την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος μπορεί να ασκεί δύο δράσεις. Από τη μία, άμεση επίδραση στην έκφραση γονιδίων και από την άλλη έμμεση αύξηση του ρυθμού σύνθεσης πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας ότι παράγοντες της πρωτεϊνοσύνθεσης μπορεί άμεσα ή έμμεσα να εμπλέκονται ή να επηρεάζονται κατά την διάρκεια της προαναφερόμενης διεργασίας.

Η διοστική εφαρμογή LiUS φαίνεται λοιπόν ότι επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου κολλαγόνου τύπου I στα κουνέλια, γεγονός που μπορεί πιθανώς να ευοδώνει τη διαδικασία μεταλλαγής του κολλαγόνου κατά τη συνδεσμοποίηση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να επιταχύνεται η διαδικασία ωρίμανσης και ενσωμάτωσης του μοσχεύματος στο οστόν κατά ανακατασκευή του ΠΧΣ.

Τα ευρήματα της ιστολογικής ανάλυσης επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης σε μοριακό επίπεδο υποδεικνύοντας ότι η εφαρμογή LiUS οδηγεί σε ταχύτερη αποκατάσταση του ΠΧΣ. Στη μελέτη παρατηρήσαμε ότι η έναρξη της συνδεσμοποίησης είναι ορατή νωρίτερα στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου πριν το τέλος της τρίτης εβδομάδας. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε νεοσχηματιζόμενος συνδετικός ιστός γύρω από το τενόντιο μόσχευμα στην ομάδα θεραπείας και σχηματισμός ινών κολλαγόνου που διέρχονται διά του παρεμβαλλόμενου νέου ιστού και συνδέουν το τενόντιο μόσχευμα με την επιφάνεια του οστικού τούνελ (εικ. 35). Φαίνεται λοιπόν ότι η διοστική εφαρμογή LiUS ευοδώνει τη διαδικασία συνδεσμοποίησης και οδηγεί σε ταχύτερο ρυθμό επούλωσης στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος.

Στην δεύτερη φάση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε την κλινική εφαρμογή LiUS στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Πραγματοποιήθηκε διαδερμική εφαρμογή LiUS καθώς θεωρήθηκε ότι στην περιοχή του γόνατος η εξασθένιση του σήματος των υπερήχων είναι μικρή λόγω της ελάχιστης παρεμβολής μαλακών μορίων στην επιφάνεια των οστικών τούνελ ιδιαίτερα στην κνήμη. Επιλέξαμε να μελετήσουμε σημαντικούς αυξητικούς παραγόντες (TGF- β_1 , IGF) και πρωτεΐνες κλειδιά (OPG, sRANKL, τελοπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου I NTx, προκολλαγόνο τύπου I) που πιθανότατα εμπλέκονται σε σημαντικές βιοχημικές διεργασίες της επουλωτικής διαδικασίας με μέθοδο ELISA, σε ασθενείς μετά από

αρθροσκοπική αποκατάσταση ΠΧΣ με τενόντιο αυτομόσχευμα οπίσθιων μηριαίων, τένοντας ημιτενοντώδη και ισχνού, μονής δεσμίδας.

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης TGF-β₁ στην κλινική μελέτη παρουσιάζουν ίδιο προφίλ όπως παρατηρήθηκε και στην πειραματική μελέτη, δηλαδή διφασικό προφίλ στην ομάδα θεραπείας ενώ στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρείται διακύμανση των επιπέδων του TGF-β₁ (εικ. 46). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι το διφασικό προφίλ του TGF-β₁ σχετίζεται με την εφαρμογή υπερήχων στην ομάδα θεραπείας. Στην κλινική μελέτη παρατηρήσαμε ότι ακόμα και μετά την 21^η ημέρα τα επίπεδα του TGF-β₁ είναι σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επομένως, η γονιδιακή έκφραση για τον TGF-β₁ και η σύνθεση του παράγοντα αυτή καθεαυτή συμβαδίζουν. Φαίνεται λοιπόν ότι το διφασικό προφίλ του TGF-β₁ που εμφανίζεται με την εφαρμογή των LiUS επάγει βιοχημικές διεργασίες και μοριακούς μηχανισμούς που ευοδώνουν και επιταχύνουν την επουλωτική εξεργασία στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Ωστόσο, αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω τα βιοχημικά μονοπάτια που επηρεάζονται από το διφασικό προφίλ του TGF-β₁ κατά την συνδεσμοποίηση του τενοντίου μοσχεύματος.

Στην παρούσα κλινική μελέτη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης IGF εμφανίζει την ίδια διακύμανση και στις δύο ομάδες, αρχικά βαθμιαία αύξηση και στη συνέχεια βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης του IGF, πάντα όμως τα επίπεδα είναι υψηλότερα σε σχέση με τα προεγχειρητικά ιδίως ως την 21^η ημέρα (εικ. 47). Ωστόσο, στην ομάδα θεραπείας παρατηρείται σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης IGF σε σχέση με την ομάδα ελέγχου υποδεικνύοντας ότι η διαδερμική εφαρμογή υπερήχων αυξάνει τη σύνθεση του IGF ευοδώνοντας την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Έχει βρεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα IGF συμβάλλουν σε αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας⁷⁵⁻⁷⁷. Στην παρούσα κλινική μελέτη η υψηλότερη αύξηση του IGF στην ομάδα θεραπείας συμβαδίζει και με μεγαλύτερη αύξηση του κολλαγόνου στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επομένως, η μεγαλύτερη αύξηση του IGF στην ομάδα θεραπείας μετά την εφαρμογή υπερήχων, μπορεί να οδηγεί σε ταχύτερη ωρίμανση του τενοντίου μοσχεύματος και καλύτερη ενσωμάτωση του

μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης του IGF παρατηρείται κατά την 7^η ημέρα που ο TGF-β₁ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελάττωσή του στην ομάδα θεραπείας. Το γεγονός αυτό ενισχύει την παραπάνω άποψη ότι η εφαρμογή υπερήχων διεγείρει διεργασίες που ευοδώνουν την επουλωτική εξεργασία στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος.

Στη συνδεσμοποίηση του τενοντίου μοσχεύματος κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ το κολλαγόνο υφίσταται αλλαγές τόσο στη συγκέντρωση καθώς και στις βιοχημικές ιδιότητές του. Τα προπεπτίδια του προκολλαγόνου, πρόδρομο μόριο του κολλαγόνου, είναι γνωστό ότι διασπώνται έξω από το κύτταρο με αποτέλεσμα ο σχηματισμός ινών κολλαγόνου γίνεται στον εξωκυττάριο χώρο κοντά στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα επίπεδα του προκολλαγόνου στον ορό του αίματος αποτελούν δείκτη του ποσού κολλαγόνου που δυνητικά μπορεί να συντεθεί. Το τελοπεπτίδιο N κολλαγόνου τύπου I (NTx) στον ορό αίματος αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης και χρησιμοποιείται ως δείκτης οστεόλυσης στον άνθρωπο. Στην παρούσα κλινική μελέτη, η συγκέντρωση του προκολλαγόνου τύπου I στον ορό αίματος των ασθενών ομάδας θεραπείας εμφανίζεται ελάχιστα υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικ. 48) ενώ παρατηρείται μικρή μείωση (10%) της συγκέντρωσης του NTx στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ιδίως κατά την 7^η ως 21^η ημέρα (εικ. 49). Τα ευρήματα αυτά αποτελούν έμμεση ένδειξη ότι στην ομάδα θεραπείας συντίθεται περισσότερο κολλαγόνο τύπου I συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Βέβαια, είναι γνωστό ότι η σύνθεση του κολλαγόνου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως τη διατροφή, την ηλικία και το βάρος σώματος καθώς και από τις μηχανικές δυνάμεις. Ωστόσο, τα ελαττωμένα επίπεδα NTx στην ομάδα θεραπείας προφανώς σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό οστεοποίησης στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλοντας σε ταχύτερη ωρίμανση του μοσχεύματος και καλύτερη ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστόν. Φαίνεται λοιπόν ότι η εφαρμογή LiUS ευοδώνει το ρυθμό επούλωσης στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος στον άνθρωπο.

Επίσης, ο άξονας RANKL/RANK/OPG προφανώς παίζει σημαντικό ρόλο στη συνδεσμοποίηση του τενοντίου μοσχεύματος κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ. Έχει

βρεθεί ότι η εξωγενής χορήγηση OPG στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλει στο σχηματισμό οστού γύρω από το τενόντιο μόσχευμα και βελτιώνει την ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ^{90,91}. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η OPG παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ιδίως κατά την 7^η και 14^η μετεγχειρητική ημέρα (εικ. 51). Αντίθετα, το sRANKL εμφανίζει σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ιδίως κατά την 7^η και 14^η ημέρα (εικ. 50). Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι ο λόγος sRANKL/OPG εμφανίζει σημαντική μείωση στην ομάδα θεραπείας κατά την 7^η και 14^η ημέρα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικ. 52). Είναι γνωστό ότι ο λόγος sRANKL/OPG αποτελεί δείκτη εξέλιξης της επούλωσης, όσο μικρότερος λόγος τόσο ευοδώνεται η επούλωση. Επομένως η εφαρμογή LiUS προάγει την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά το χρονικό διάστημα 7^{ης} και 14^{ης} ημέρας που η συγκέντρωση του TGF-β₁ παρουσιάζει ελάττωση στην ομάδα θεραπείας η συγκέντρωση της OPG παραμένει αυξημένη, το sRANKL ελαττωμένο και ο λόγος sRANKL/OPG ελαττωμένος. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό και φαίνεται ότι σχετίζεται με το ρόλο του TGF-β₁ στη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής. Είναι γνωστό ότι ο TGF-β₁ κατά την οστική ανακατασκευή μπορεί να διεγείρει την οστική απορρόφηση μέσω διαφοροποίησης των μονοκύτταρων σε οστεοκλάστες αλλά παράλληλα όταν απελευθερώνεται από την εξωκυττάρια ουσία οστών μπορεί να περιορίσει την οστική απορρόφηση μέσω μείωσης της παραγωγής του RANKL από τις οστεοβλάστες²⁸⁶. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η OPG όταν απελευθερώνεται από εξωκυττάρια ουσία οστών ασκεί παρόμοια δράση με τον TGF-β₁ στην οστική ανακατασκευή αλλά και γενικότερα σε διαδικασίες επούλωσης²⁸⁷. Στην παρούσα μελέτη τα ελαττωμένα επίπεδα του TGF-β₁ στην ομάδα θεραπείας προφανώς περιορίζουν την οστική απορρόφηση μέσω μείωσης του sRANKL. Φαίνεται λοιπόν ότι η εφαρμογή LiUS επάγει την απελευθέρωση του TGF-β₁ και της OPG από την εξωκυττάρια ουσία οστών κατά το πρώιμο στάδιο της επουλωτικής εξεργασίας ευοδώνοντας την οστεοποίηση στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλοντας στην ταχύτερη ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ.

Τα ευρήματα της απεικονιστικής ανάλυσης με MDCT επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης σε μοριακό επίπεδο υποδεικνύοντας ότι η εφαρμογή LiUS οδηγεί σε ταχύτερη αποκατάσταση ΠΧΣ. Στη μελέτη παρατηρήσαμε πιο υψηλές τιμές οστικής πυκνότητας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε πιο έντονη οστεοποίηση γύρω από το μόσχευμα στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος σε όλο το μήκος των οστικών τούνελ στους ασθενείς της ομάδας θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στους δύο αλλά και στους τρεις μήνες μετεγχειρητικά (εικ. 53,54). Τα ευρήματα αυτά φαίνεται ότι σχετίζονται με τα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της OPG και τα ελαττωμένα επίπεδα του sRANKL καθώς και τον ελαττωμένο λόγο του sRANKL/OPG στην ομάδα θεραπείας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας ότι η εφαρμογή LiUS ευοδώνει την οστεοποίηση στην διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος συμβάλλοντας στην ταχύτερη ενσωμάτωση του μοσχεύματος στο οστικό τούνελ.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ευρήματα της MDCT της κλινικής μελέτης συμβαδίζουν με τα ευρήματα της ιστολογικής ανάλυσης της πειραματικής μελέτης. Κατά την ιστολογική ανάλυση, ο νεοσχηματιζόμενος συνδετικός ιστός γύρω από το τενόντιο μόσχευμα και ο σχηματισμός ινών κολλαγόνου που συνδέουν το τενόντιο μόσχευμα με την επιφάνεια του οστικού τούνελ που εμφανίζονται νωρίτερα στην ομάδα θεραπείας πριν από το τέλος της 3^{ης} μετεγχειρητικής εβδομάδας οδηγούν προφανώς και σε πιο πρόωμη οστεοποίηση γύρω από το μόσχευμα όπως παρατηρήθηκε στην MDCT. Φαίνεται λοιπόν ότι η εφαρμογή LiUS ευοδώνει τη διαδικασία συνδεσμοποίησης και οδηγεί σε ταχύτερο ρυθμό επούλωσης στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος κατά ανακατασκευή του ΠΧΣ.

Επιπρόσθετα, σημειώνεται ότι στην κλινική εφαρμογή των LiUS στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος τα αποτελέσματα των παραγόντων και των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν αφορούν τη συστηματική κυκλοφορία καθώς τα δείγματα προέρχονταν από αιμοληψίες περιφερικού αίματος. Επομένως, παρατηρούμε ότι οι LiUS επιδρούν στην επουλωτική εξεργασία όχι μόνο τοπικά όπως υποδεικνύεται από την πειραματική μελέτη αλλά και στη γενικότερη συστηματική κυκλοφορία επηρεάζοντας μοριακούς

μηχανισμούς που συμβάλλουν στην ευόδωση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε λεπτομερώς η διοστική εφαρμογή LiUS στην επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος και συνεπακόλουθα πραγματοποιήθηκε μελέτη και της διαδερμικής εφαρμογής. Με τη διαδερμική εφαρμογή LiUS, στην οποία η εκπομπή κυμάτων στην επιφάνεια του δέρματος οδηγεί στην απορρόφηση, σκέδαση και μερική ανάκλασή τους στη διεπιφάνεια οστού μαλακών μορίων, μπορεί να υπάρχει μεγαλύτερη εξασθένηση του σήματος σε σχέση με την διοστική εφαρμογή LiUS όπου πραγματοποιείται απευθείας μετάδοση των κυμάτων κατά μήκος του μακρού άξονα του οστού και ίσως αποδοτικότερη μεταφορά ενέργειας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Ωστόσο, παρατηρήσαμε ότι η εφαρμογή των LiUS τόσο στην πειραματική μελέτη με τη διοστική εφαρμογή όσο και στην κλινική μελέτη με τη διαδερμική εφαρμογή προκαλεί μεταβολές σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο επάγοντας ταχύτερο ρυθμό επούλωσης στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι το κρίσιμο χρονικό διάστημα επίδρασης των LiUS στην επουλωτική εξεργασία διεπιφάνειας οστού-τενοντίου μοσχεύματος αφορά μεταξύ 7^{ης} και 14^{ης} ημέρας όπου παρατηρήθηκαν οι σημαντικότερες μοριακές μεταβολές τόσο στη γονιδιακή έκφραση όσο και στη σύνθεση των πρωτεϊνών. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η εφαρμογή LiUS μετά την ανακατασκευή ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα μπορεί να συμβάλλει σε ταχύτερη επανάκτηση πλήρους δραστηριότητας και λειτουργίας μειώνοντας τις κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις στον ασθενή.

Ωστόσο το ακριβές δίκτυο των μηχανισμών μέσω του οποίου οι LiUS επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων και τη σύνθεση πρωτεϊνών δεν είναι πλήρως γνωστό. Έχει προταθεί ότι η διαφορά στην απορρόφηση της ενέργειας των υπερήχων κατά την διέλευση τους από τους ιστούς, δίνει γένεση στο φαινόμενο της «ακουστικής κατευθυνόμενης ροής» (acoustic streaming phenomenon) που πιθανόν προάγει μηχανικά τη μετάδοση βιολογικών σημάτων (mechanotransduction), διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ινοβλαστών, χονδροβλαστών και οστεοβλαστών. Αξίζει επομένως να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός καθώς και τα βιοχημικά μονοπάτια μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αυτή η δράση των LiUS.

Συνοψίζοντας, η εφαρμογή υπερήχων, διοστική και διαδερμική, φαίνεται ότι επηρεάζει την έκφραση γονιδίων καθώς και την παραγωγή πρωτεϊνών που κωδικοποιούν σημαντικά μόρια κατά την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού–τενοντίου μοσχεύματος. Οι μεταβολές των επιπέδων mRNA των γονιδίων και των πρωτεϊνών που παρατηρήθηκαν στην πειραματική και την κλινική μελέτη αντίστοιχα, σχετίζονται με ταχύτερη ωρίμανση και ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα όπως αποδείχθηκε από την ιστολογική και την απεικονιστική ανάλυση. Φαίνεται λοιπόν ότι η εφαρμογή των LiUS ευοδώνει και επιταχύνει την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος μέσω μοριακών μονοπατιών και μηχανισμών που επηρεάζουν την έκφραση σημαντικών γονιδίων και πρωτεϊνικών προϊόντων τους.

Στην τρίτη φάση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε την κλινική εφαρμογή των διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης στην πόρωση καταγμάτων και συναφών επιπλοκών της καθώς και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της πόρωσης σε πέντε ασθενείς με κάταγμα μακρών οστών (3 ασθενείς με κάταγμα κνήμης, 1 ασθενής με καθυστερημένη πόρωση επί κατάγματος κνήμης και 1 ασθενής με σηπτική ψευδάρθρωση μηριαίου). Σε όλους τους ασθενείς τοποθετήθηκε μονόπλευρο πλαίσιο εξωτερικής οστεοσύνθεσης εκτός από τον ασθενή με τη σηπτική ψευδάρθρωση μηριαίου, στον οποίο τοποθετήθηκε κυκλικό πλαίσιο και πραγματοποιήθηκε επιμήκυνση με τη μέθοδο διατατικής οστεογένεσης, και παράλληλα σε όλους τους ασθενείς εμφυτεύθηκαν υπερηχητικοί μετατροπείς επί του οστού. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα φορητό σύστημα που αποτελεί πρωτοποριακό σύστημα τηλεϊατρικής με δυνατότητα τόσο για την ευόδωση όσο και για την παρακολούθηση της διεργασίας της πόρωσης²⁵².

Η κλινική εφαρμογή του συστήματος διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης απέδειξε άριστη ανοχή από τους ασθενείς χωρίς επιπλοκές και ανεπιθύμητες ενέργειες, τοπικές και συστηματικές. Δεν παρατηρήθηκαν αντιδραστικά φαινόμενα από τον υπερηχητικό μετατροπέα καθώς δεν υπήρχαν τοπικά ευρήματα παθολογικής ιστικής αντίδρασης και στις ακτινογραφίες δεν αναδείχθηκε σχηματισμός κυκλοτερούς διαυγαστικής ζώνης πέριξ των μετατροπέων.

Σε όλους τους ασθενείς ήταν εφικτή η θεραπεία με την εφαρμογή του συστήματος διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης. Η μελέτη της κλινικής εφαρμογής

διοστικών υπερήχων για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πώρωσης δεν ήταν εφικτή σε όλες τις περιπτώσεις καθώς δεν πραγματοποιήθηκε καταγραφή των μετρήσεων της ταχύτητας διάδοσης των υπερήχων, λόγω τεχνικών δυσκολιών. Ωστόσο, από όλες τις περιπτώσεις κατέστη φανερό ότι υπήρχε μεταβολή στην ταχύτητα διάδοσης υπερήχων μετεγχειρητικά γεγονός που σχετίζεται με το σχηματισμό και την ωρίμανση του πόρου. Επιπρόσθετα, τα υπερηχητικά ευρήματα συμβάδισαν και με τα ακτινογραφικά δεδομένα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποσοστιαία αύξηση της ταχύτητας ήταν ιδιαίτερα σημαντική μέχρι και την ημέρα αφαίρεσης των υπερηχητικών μετατροπέων. Φαίνεται λοιπόν ότι η κλινική εφαρμογή παρουσιάζει θετική επίδραση του συστήματος χαμηλής έντασης διοστικών υπερήχων στην επιτάχυνση της πώρωσης καταγμάτων μακρών οστών.

Μία διαφορετική περίπτωση ανάλυσης των υπερηχητικών μετρήσεων και εξαγωγής συμπερασμάτων παρατηρήθηκε στον ασθενή που αντιμετωπίστηκε με τη μέθοδο διατατικής οστεογένεσης. Η μέτρηση της ταχύτητας διάδοσης δεν έγινε όπως στις υπόλοιπες περιπτώσεις, μέσω μέτρησης της απόστασης πομπού-δέκτη και του χρόνου άφιξης, αλλά μέσω ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης από τις καμπύλες που προκύπτουν από το χρόνο άφιξης του κύματος σε σχέση με το μήκος διάτασης. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να παρακολουθηθεί η εξέλιξη του σχηματισμού νέου οστού. Επιπρόσθετα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί για πρώτη φορά η επίδραση του ρυθμού διάτασης- επιμήκυνσης στις μηχανικές ιδιότητες του ανασχηματιζόμενου οστού, όπως αυτές αντικατοπτρίζονται στην ταχύτητα που διαδίδεται ο υπέρηχος μέσα από τον νεοσχηματιζόμενο ιστό.

Τα ευρήματα της κλινικής μελέτης συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών^{250,251} στις οποίες έχει μελετηθεί μέχρι τώρα η επίδραση της διοστικής εφαρμογής LiUS στην πώρωση των καταγμάτων. Οι πειραματικές αυτές μελέτες, σε μοντέλο οστεοτομίας κνήμης προβάτου, απέδειξαν ότι η χρήση υπερηχητικών μετατροπέων επί του οστού και η διοστική διάδοση των υπερήχων έχει ως αποτέλεσμα την αποδοτικότερη μεταφορά ενέργειας στην περιοχή του κατάγματος επιταχύνοντας την σκληρότητα του πόρου, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται σημαντικά ο χρόνος της πώρωσης. Επιπλέον κατέδειξαν ότι η εμφύτευση των υπερηχητικών μετατροπέων στην περιοχή του κατάγματος συμβάλλει ταυτόχρονα εκτός από την ευόδωση της πώρωσης και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της πώρωσης καθώς

μπορούν να μετρηθούν τόσο μηχανικές όσο και μορφολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση του πόρου.

Η μελέτη της ακουστικής συμπεριφοράς κατεαγόντων οστών και πώς αυτή συσχετίζεται με τις μεταβολές των μηχανικών ιδιοτήτων στα διάφορα στάδια της πάρωσης μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο, παρέχοντας ποσοτικά κριτήρια στους ορθοπαιδικούς χειρουργούς για την πρόοδο της πάρωσης και τον έγκαιρο εντοπισμό επιπλοκών ενώ παράλληλα μπορεί να επιταχύνει το χρόνο θεραπείας.

Ωστόσο, απαιτείται η συνέχιση της κλινικής μελέτης διοστικής εφαρμογής LiUS σε περισσότερους ασθενείς με κάταγμα μακρών οστών ώστε να επιβεβαιωθούν περαιτέρω τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Με τον τρόπο αυτό, θα αναδειχθούν τα πλεονεκτήματα της μεθόδου τόσο για τον ασθενή όσο και για τον θεράποντα ιατρό καθώς η φορητή συσκευή υποστηρίζει ταυτόχρονα την εφαρμογή LiUS και την αυτόματη συλλογή και μετάδοση των ανακτηθέντων σημάτων υπερήχων. Η ασύρματη μετάδοση των δεδομένων στην κεντρική μονάδα μπορεί να μειώσει τον αριθμό επισκέψεων του ασθενούς στον ορθοπαιδικό χειρουργό μετεγχειρητικά και παράλληλα καθιστά δυνατή και τη διαχείριση ασθενών που βρίσκονται σε γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές. Επιπρόσθετα, μειώνεται η επιβάρυνση του ασθενούς από την ιονίζουσα ακτινοβολία καθώς αποφεύγονται επανειλημμένες λήψεις ακτινογραφιών. Από την άλλη μεριά, για τον θεράποντα ιατρό το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το σύστημα των υπερήχων εκτός του ότι προάγει την πάρωση, αποτελεί και ένα μοντέρνο σύστημα τηλεϊατρικής που του δίνει τη δυνατότητα για άμεση και έγκαιρη λήψη αποφάσεων όσον αφορά την αντιμετώπιση τυχόν επιπλοκών της πάρωσης των καταγμάτων.

Βέβαια, ως αδυναμία της μεθόδου μπορεί να θεωρηθεί το γεγονός ότι η αφαίρεση των υπερηχητικών μετατροπέων μετά το πέρας της θεραπείας δεν είναι αναίμακτη καθώς απαιτεί χειρουργική τεχνική. Παρόλα αυτά, τα περιθώρια βελτίωσης του μεγέθους και σχήματος των υπερηχητικών μετατροπέων είναι ευρέα με αποτέλεσμα να καταστεί δυνατή η αφαίρεσή τους σε επίπεδο εξωτερικού ιατρείου με χρήση τοπικής αναισθησίας.

Η κλινική εφαρμογή διοστικών LiUS απέδειξε ότι είναι ανεκτή χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες σε ασθενείς με κάταγμα μακρών οστών και συναφών επιπλοκών

πώρωσης. Η διοστική εφαρμογή LiUS, με την εμφύτευση υπερηχητικών μετατροπέων απευθείας πάνω στο οστό στην περιοχή του κατάγματος, συμβάλλει στην ευόδωση της πώρωσης καθώς αυξάνει την ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων μειώνοντας το χρόνο επούλωσης. Παράλληλα, μπορεί να συμβάλλει στην παρακολούθηση της διεργασίας της πώρωσης καθώς μπορούν να μετρηθούν μηχανικές και μορφολογικές μεταβολές κατά την ωρίμανση του πόρου. Συμπερασματικά το σύστημα διοστικών LiUS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη ευόδωση και παρακολούθηση της εξέλιξης της πώρωσης σε ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών.

Περίληψη

Η επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία φαίνεται ότι επηρεάζεται από διάφορους βιολογικούς παράγοντες αλλά και παράγοντες μηχανικού στρες. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η πάρωση των καταγμάτων αποτελεί ένα εξίσου πολύπλοκο βιολογικό και μηχανικό φαινόμενο κατά το οποίο σταδιακά αποκαθίστανται οι δομικές, λειτουργικές και μηχανικές ιδιότητες του οστού. Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις εμφάνισης επιπλοκών (καθυστερημένη πάρωση, ψευδάρθρωση) αυξάνοντας το κόστος θεραπείας καθώς απαιτούνται περαιτέρω χειρουργικές επεμβάσεις.

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής είναι: α) η διερεύνηση και αξιολόγηση της επίδρασης των διοστικών υπερήχων χαμηλής έντασης (LiUS) στην ευόδωση και επιτάχυνση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος μετά από πλαστική αποκατάσταση προσθίου χιαστού συνδέσμου (ΠΧΣ): πειραματική και κλινική μελέτη, και β) η διερεύνηση και αξιολόγηση της κλινικής εφαρμογής των διοστικών LiUS στην επιτάχυνση της πάρωσης καταγμάτων μακρών οστών καθώς και αξιολόγηση δυνατότητας παρακολούθησης της εξέλιξης της πάρωσης.

Κατά την πειραματική μελέτη διερευνήθηκε η διαδικασία συνδεσμοποίησης κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ σε κουνέλια με έλεγχο και αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων TGF- β_1 , biglycan, κολλαγόνου τύπου I, και tRNA^{Gly} με ημιποσοτική RT-PCR και ιστολογική ανάλυση. Η κλινική εφαρμογή LiUS στην ευόδωση και επιτάχυνση της επουλωτικής εξεργασίας στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος διερευνήθηκε σε ασθενείς μετά από αρθροσκοπική αποκατάσταση ΠΧΣ με έλεγχο των επιπέδων αυξητικών παραγόντων (TGF- β_1 , IGF) και πρωτεϊνών (OPG, sRANKL, τελοπεπτιδίο κολλαγόνου τύπου I - NTx, προκολλαγόνο τύπου I) με μέθοδο ELISA καθώς και με απεικονιστικό έλεγχο.

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και των πρωτεϊνών μετά την εφαρμογή LiUS τόσο στην πειραματική όσο και την κλινική μελέτη αντίστοιχα. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με ταχύτερη ωρίμανση και ενσωμάτωση του τενοντίου μοσχεύματος στο οστικό τούνελ κατά την ανακατασκευή του ΠΧΣ με τενόντιο μόσχευμα όπως αποδείχθηκε από την ιστολογική και την

απεικονιστική ανάλυση. Φαίνεται λοιπόν ότι η εφαρμογή των LiUS ευοδώνει και επιταχύνει την επουλωτική εξεργασία στη διεπιφάνεια οστού-τενοντίου μοσχεύματος μέσω μοριακών μονοπατιών και μηχανισμών που επηρεάζουν την έκφραση σημαντικών γονιδίων και πρωτεϊνικών προϊόντων τους.

Η κλινική εφαρμογή διοστικών LiUS για την ευόδωση και επιτάχυνση της πόρωσης καθώς και για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πόρωσης των καταγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με κάταγμα μακρών οστών. Η αξιολόγηση της επίδρασης των υπερήχων πραγματοποιήθηκε με ακτινολογικό έλεγχο και υπολογιστική τομογραφία. Η εφαρμογή διοστικών υπερήχων τόσο για τη θεραπεία όσο και για την παρακολούθηση της πόρωσης, υποστηρίζεται από ένα ολόκληρο σύστημα τηλεϊατρικής, το οποίο ενσωματώνει μια φορητή συσκευή και μια κεντρική μονάδα διαχείρισης ασθενών. Η εφαρμογή απέδειξε άριστη ανοχή από τους ασθενείς χωρίς επιπλοκές και ανεπιθύμητες ενέργειες και παρατηρήθηκε ότι η ταχύτητα διάδοσης των υπερήχων αυξάνονταν μετεγχειρητικά γεγονός που υποδηλώνει τον σχηματισμό και ωρίμανση πόρου.

Η διοστική εφαρμογή LiUS, με την εμφύτευση υπερηχητικών μετατροπέων απευθείας πάνω στο οστό στην περιοχή του κατάγματος, συμβάλλει στην ευόδωση των μηχανικών ιδιοτήτων του πόρου μειώνοντας το χρόνο επούλωσης. Φαίνεται λοιπόν ότι το σύστημα διοστικών LiUS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη ευόδωση και παρακολούθηση της εξέλιξης της πόρωσης σε ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών.

Abstract

The process of ligamentization includes histological and structural remodelling of the tendon graft during healing at the tendon-bone interface and thereafter. A number of essential genes are involved in this process and their expression can be regulated through complex biochemical pathways. However, there is little information documenting the mechanism of healing at the tendon graft-bone interface at molecular and cellular level. Fracture healing is also a complex biological process that involves the spatial and temporal action of many different cell types, proteins and the expression of hundreds of genes all working towards restoring the bone's functional and mechanical properties. About 10 % of fractures require further surgical procedures due to impaired healing, such as delayed union or pseudarthrosis.

The purpose of this study is: a) to investigate the effect of transosseous application of low intensity ultrasound (LiUS) during ligamentization process on the healing at tendon graft-bone interface: experimental and clinical study and b) to investigate the clinical application of transosseous LiUS on the enhancement and monitoring of fracture healing process in patients with fracture of long bones.

We investigated the healing at tendon graft-bone interface in rabbits after transosseous application of LiUS by analyzing the expression levels of TGFb1, biglycan, collagen I and tRNA^{Gly} using semiquantitative RT-PCR, and through subsequent histological analysis. We also investigated the clinical application of LiUS during the ligamentization process in patients who underwent arthroscopically assisted anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction by analyzing the serum levels of TGFb1, IGF, OPG, sRANKL, NTx and procollagen I using ELISA, and through subsequent Multiple Direction Computer Tomography.

We observed statistically significant alterations in gene expression and protein level of all factors after application of LiUS in both experimental and clinical study, respectively. Histological and imaging examination supported our molecular findings, indicating a faster healing rate and a more efficient ligamentization process after ultrasound treatment. These results suggest that application of LiUS enhances the healing rate of the tendon graft-bone interface in ACL reconstruction, possibly by affecting the

expression levels of genes significant for the tendon to bone healing through important biochemical pathways.

The clinical efficacy of the transosseous application of LiUS for both enhancement and monitoring of the bone healing process was investigated in patients with fracture of long bones. The effect of LiUS on fracture healing was evaluated using radiograph and computer tomography. Both the LiUS application and the ultrasonic measurements are supported by an integrated telemedicine system which also incorporates an ultrasound wearable device and a patient management system. Transosseous application of LiUS was well tolerated by all patients. No complications or adverse effects were observed and we showed that the propagation velocity of ultrasound increased post-operatively which has been found to be a most sensitive parameter to reflect structural changes into the newly formed callus.

Taken together our findings suggest that transosseous application of LiUS, with the ultrasound transducers placed directly on the periosteum at the fracture site, can enhance the mechanical properties of the fracture callus and reduce the time to fracture healing. Therefore, transosseous application of LiUS can be used for both enhancement and monitoring of the bone healing process in patients with fracture of long bones.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Miyasaka KC, Daniel DM, Stone ML, et al.** The incidence of knee ligament injuries in general population. *Am J Knee Surg* 1991;4(1):3.
2. **Griffin LY et al.** Noncontact anterior cruciate ligament injuries: Risk factors and preventions strategies. *JAAOS* 2000;8(3):141-149.
3. **Frank CB, Jackson DW.** Current concepts review-the science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1556-1576.
4. **Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL.** Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon: an evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:217-224.
5. **Goradia VK, Rochat MC, Kida M, Grana WA.** Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model. *Am J Sports Med* 2000;28:40-46.
6. **Bach BR Jr, Tradonsky S, Bojchuk J, Levy ME, Bush-Joseph CA, Khan NH.** Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft: five-to nine-year follow-up evaluation. *Am J Sports Med* 1998;26:20-29.
7. **Shelbourne KD, Gray T.** Anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon graft followed by accelerated rehabilitation: a two-to nine-year followup. *Am J Sports Med* 1997;25:786-795.
8. **Liden M, Ejerhed L, Sernert N, Bovaller A, Karlsson J, Kartus J.** Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized study with a 7-Year follow-up. *2007;35(5):740-748.*
9. **Herrington L, Wrapson c, Matthews M, Matthews H.** Anterior cruciate ligament reconstruction, hamstring versus bone-patella tendon-bone grafts: a systematic literature review of outcome from surgery. *Knee* 2005;12(1):41-50.
10. **Laxdal G, Kartus J, Hansson L, Heidvall M, Ejerhed L, Karlsson J.** A prospective randomized comparison of bone-patellar tendon-bone and hamstring grafts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 2005;21(1):34-42.
11. **Spindler KP, Kuhn JE, Freedman KB, Matthews CE, Dittus RS, Harrell FE.** Anterior cruciate ligament reconstruction autograft choice: bone-tendon-bone versus hamstring: does it really matter? A systematic review. *Am J Sports Med* 2004;32(8):1986-1995.
12. **Sherman OH, Banffy MB.** Anterior cruciate ligament reconstruction: which graft is best? *Arthroscopy* 2004;20(9):974-980.
13. **Goldblatt JP, Fitzsimmons SE, Balk E, Richmond JC.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament: meta-analysis of patellar tendon versus hamstring tendon autograft. *Arthroscopy* 2005;21(7):791-803.
14. **Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH.** The phenomenon of “ligamentization” : anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res* 1986;4(2):162-172.
15. **Marumo K, Saito M, Yamagishi T, Fujii K.** The “ligamentization” process in human anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar and hamstring tendons: a biochemical study. *Am J Sports Med* 2005;33(8):1166-1173.
16. **Amiel D, Kleiner JB, Akeson WH.** The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med* 1986;14:449-462.

17. **Ballock RT, Woo SL, Lyon RM, Hollis JM, Akeson WH.** Use of patellar tendon autograft in anterior cruciate ligament reconstruction in the rabbit: a long-term histological and biomechanical study. *J Orthop Res* 1989;7(4):474-485.
18. **Shino K, Kawasaki T, Hirose H, Gotoh I, Inoue M, Ono K.** Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66(5):672-681.
19. **Abe S, Kurosaka M, Igushi T, Yoshiya S, Hirohata K.** Light and electron microscopic study of remodeling and maturation process in autogenous graft for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1993;9(4):394-405.
20. **Horstman JK, Ahmadu-Suka F, Norrdin RW.** Anterior cruciate ligament fascia lata allograft reconstruction: progressive histologic changes toward maturity. *Arthroscopy* 1993;9(5):509-518.
21. **Kohn D.** Arthroscopic evaluation of anterior cruciate ligament reconstruction using a free patellar tendon autograft. A prospective, randomized study. *Clin Orthop Relat Res* 1990;(254):220-224.
22. **Meyers JF, Caspari RB, Cash JD, Manning JB.** Arthroscopic evaluation of allograft anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1992;8(2): 157-161.
23. **Rougraff B, Shelbourne KD, Gerth PK, Warner J.** Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1993;21(2):277-284.
24. **Falconeiro RP, DiStefano VJ, Cook TM.** Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans. *Arthroscopy* 1998;14(2):197-205.
25. **Johnson LL.** The outcome of a free autogenous semitendinosus tendon graft in human anterior cruciate reconstructive surgery: A histological study. *Arthroscopy* 1993;9:131-142.
26. **Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW.** An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* 1994;22(3):344-351.
27. **Blickenstaff KR, Grana WA, Egle D.** Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *Am J Sports Med* 1997;25(4):554-559.
28. **Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Minami A, Tohyama H.** The effect of graft-tunnel diameter disparity on intraosseous healing of the flexor tendon graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2002;30(4):498-505.
29. **Arnoczky SP, Torzilli PA, Warren RF, Allen AA.** Biologic fixation of ligament prostheses and augmentations: An evaluation of bone ingrowth in the dog. *Am J Sports Med* 1988;16:106-112.
30. **Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF.** Tendon-healing in a bone tunnel. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:1795-1803.
31. **Scranton PE, Lanzer W, Ferguson M, Kirkman TR, Pflaster D.** Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy* 1998;14(7):702-716.
32. **Ishibashi Y, Toh S, Okamura Y, Sasaki T, Kusumi T.** Graft incorporation within the tibial bone tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autograft. *Am J Sports Med* 2001;29:473-479.
33. **Meller R, Willbold E, Hesse E, Dreymann B, Fehr M, Haasper C, Hurschler C, Krettek C, Witte F.** Histologic and biomechanical analysis of anterior cruciate ligament graft to bone healing in skeletally immature sheep. *Arthroscopy* 2008;24(11):1221-1231.

34. **Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A.** Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(9):834-842
35. **Tomita F, Yasuda K, Mikami S.** Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2001;17:461-476.
36. **Ekdahl M, Wang JH, Ronga M, Fu FH.** Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(10):935-947.
37. **Lu Y, Markel MD, Nemke B, Wynn S, Graf B.** Comparison of single- versus double-tunnel tendon-to-bone healing in an ovine model: a biomechanical and histological analysis. *Am J Sports Med* 2009;37(3):512-517.
38. **Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF** Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 1999;27(4):476-488.
39. **Martinek V, Latterman C, Usas A, Amramowits S, Woo SL, Fu FH, Huard J.** Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84(7):1123-1131.
40. **Ma CB, Kawamura S, Deng XH, Ying L, Schneidkraut J, Hays P, Rodeo SA.** Bone morphogenetic proteins-signaling plays a role in tendon-to-bone healing: a study of rhBMP-2 and noggin. *Am J Sports Med* 2007;35(4):597-604.
41. **Mihelic R, Pecina M, Jelic M, Zoricic S, Kusec V, Simic P, Bobinac D, Lah B, Legovic D, Vukicevic S.** Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) promotes tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med* 2004;32(7):1619-1625.
42. **Yu Y, Bliss JP, Bruce WJ, Walsh WR.** Bone morphogenetic proteins and Smad expression in ovine tendon-bone healing. *Arthroscopy* 2007;23(2):205-210.
43. **Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Tohyama H, Minami A.** The effect of transforming growth factor- β 1 on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy* 2005;21(9):1034-1041.
44. **Petersen W, Unterhauser F, Pufe T, Zantop T, Sudkamp NP, Weiler A.** The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003;123(4):168-174.
45. **Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J.** Direct-, fibroblast- and myoblast- mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng* 1999;5(5):435-442.
46. **Kohno T, Ishibashi Y, Tsuda E, Kusumi T, Tanaka M, Toh S.** Immunohistochemical demonstration of growth factors at the tendon-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction using a rabbit model. *J Orthop Sci* 2007;12(1):67-73.
47. **Karaoglu S, Celik C, Korkusuz P.** The effects of bone marrow or periosteum on tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(2):170-178.
48. **Kyung HS, Kim SY, Oh CW, Kim SJ.** Tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model: the effect of periosteum augmentation at the tendon-to-bone interface. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003;11(1):9-15.
49. **Bonewald LF.** Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;9:33-44.

50. **Dibrov A, Kashour T, Amara FM.** The role of transforming growth factor beta signaling in messenger RNA stability. *Growth Factors* 2006;24(1):1-11.
51. **Croucher PI, Russell RGG.** Growth factors in: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (Eds). *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Academic Press, San Diego 1999:453-464.
52. **Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J.** Distinct transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265:20533-20538.
53. **Akhurst R, Dernyck R.** TGF- β signaling in cancer- a double edged sword. *Trends Cell Biol* 2001;11:S44-50.
54. **Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.** TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465-471.
55. **Attisano L, Wrana JL.** Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002;31:296(5573):1646-1647.
56. **Moustakas A, Heldin CH.** Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci* 2005;118(16):3573-3584.
57. **Kim SC, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH, Bang YJ.** Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:420-434.
58. **Siegel PM, Massague J.** Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807-820.
59. **Lee J, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D.** Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J* 1998;18:19-25.
60. **Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K.** Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament: immunohistological study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;8:120-126.
61. **Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, Blomstrom GL, Engle CP, Larkin LA, Evans CH, Woo SL.** Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Orthop Res* 1995;13(2):184-190.
62. **Lee J, Green MH, Amiel D.** Synergistic effect of growth factors on cell outgrowth from explants of rabbit the anterior cruciate and medial collateral ligaments. *J Orthop Res* 1995;13:435-441.
63. **Sakai T, Yasuda K, Tohyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, Frank CB.** Effects of combined administration of transforming growth factor- β 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligaments in rabbits. *J Orthop Res* 2002;20(6):1345-1351.
64. **Lind M, Overgaard S, Soballe K, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C.** Transforming growth factor-beta 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Orthop Res* 1996;14(3):343-350.
65. **Kondo E, Yasuda K, Yamanaka M, Minami A, Tohyama H.** Effects of administration of exogenous growth factors on biomechanical properties of the elongation-type anterior cruciate ligament injury with partial laceration. *Am J Sports Med* 2005;33(2):188-196.
66. **Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, Cao M, Kavalkovich KW, Levine RE, Woo SL.** Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 1997;15:18-23.

67. **DesRosiers EA, Yahia L, Rivard CH.** Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res* 1996;14:200-208.
68. **Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB, Hart DA.** Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol* 1994;72:403-409.
69. **Yasuda K, Tomita F, Yamazaki S, Minami A, Tohyama H.** The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction: a canine model study. *Am J Sports Med* 2004;32(4):870-880.
70. **Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Tohyama H, Minami A.** The effect of transforming growth factor-beta1 on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy* 2005;21(9):1034-1041.
71. **Herington AC, Cornell HJ, Kuffer AD.** Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor/somatomedin family. *Int J Biochem.* 1983;15(10):1201-1210.
72. **Nissley SP, Haskell JF, Sasaki N, De Vroede MA, Rechler MM.** Insulin-like growth factor receptors. *J Cell Sci Suppl.* 1985;3:39-51.
73. **Thaller SR, Dart A, Tesluk H.** The effects of insulin-like growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg.* 1993;31(5):429-433.
74. **Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT.** Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1990;61(1):54-57.
75. **Molloy T, Wang Y, Murrell G.** The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003;33(5):381-94.
76. **Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ.** Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2006 Feb;24(2):183-192
77. **Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB.** Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg [Am].* 2008;33(10):1834-1842.
78. **Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS.** Long-term explant culture of rabbit flexor tendon: effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *J Orthop Res.* 1991;9(4):503-15.
79. **Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ.** Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res.* 2002;20(5):910-919.
80. **Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS.** Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res.* 1991;9(4):495-502.
81. **Provenzano PP, Alejandro-Osorio AL, Grorud KW, Martinez DA, Vailas AC, Grindeland RE, Vanderby R Jr.** Systemic administration of IGF-I enhances healing in collagenous extracellular matrices: evaluation of loaded and unloaded ligaments. *BMC Physiol.* 2007;7:2.
82. **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, et al.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-319.

83. **Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K.** Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234(1):137-342.
84. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(7):3597-602.
85. **Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T.** Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*. 2000;141(9):3478-3484.
86. **Reid P, Holen I.** Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol*. 2009;88(1):1-17.
87. **Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H.** Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247(3):610-615.
88. **Rogers A, Eastell R.** Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6323-6331.
89. **Dovio A, Data V, Angeli A.** Circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: do they have a future in clinical practice? *J Endocrinol Invest*. 2005;28(10 Suppl):14-22.
90. **Rodeo SA, Kawamura S, Ma CB, Deng XH, Sussman PS, Hays P, Ying L.** The effect of osteoclastic activity on tendon-to-bone healing: an experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2250-2259.
91. **Dynybil C, Kawamura S, Kim HJ, Ying L, Perka C, Rodeo SA.** The effect of osteoprotegerin on tendon-bone healing after reconstruction of the anterior cruciate ligament: a histomorphological and radiographical study in the rabbit. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2006;144(2):179-186.
92. **Prockop DJ & Kivirikko KI.** Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-434.
93. **Quenzer B, Agoutin B, Reinisch F, Weill D, Perin F, Keith G, Heyman T.** Distribution of isoaccepting tRNAs and codons for proline and glycine in collagenous and noncollagenous chicken tissues. *Biochem.Bioph. Res Commun* 1988;150:148-155.
94. **Christner P, Rosenbloom G.** A Comparison of Transfer tRNA Isoaccepting Species Between Collagenous And Non Collagenous Tissues In Embryonic Chick. *Biochim- Biophys* 1976;172:399-409.
95. **Leboy PS, Uschmann BD, Lin D.** Increased levels of glycine tRNA associated with collagen synthesis; *Arch.Biochem.Bioph* 1987;259: 558-566.
96. **Fujii K, Yamagishi T, Nagafuchi T, Tsuji M, Kuboki Y.** Biochemical properties of collagen from ligaments and periarticular tendons of the human knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1994;2(4):229-233.
97. **Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W.** Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1984;1(3):257-265.

98. **Bland YS, Ashhurst DE.** Changes in the distribution of fibrillar collagens in the collateral and cruciate ligaments of the rabbit knee joint during fetal and postnatal development. *Histochem J* 1996;28:325-334.
99. **Lo IK, Marchuk LL, Hart DA, Frank CB.** Comparison of mRNA levels for matrix molecules in normal and disrupted human anterior cruciate ligaments using reverse transcription- polymerase chain reaction. *J Orthop Res* 1998;16(4):421-428.
100. **Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH.** Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(367 Suppl):S312-323.
101. **Hsieh AH, Tsai CM, Ma QJ, Lin T, Banes AJ, Villarreal FJ, Akeson WH, Sung KL.** Time-dependent increases in type-III collagen gene expression in medical collateral ligament fibroblasts under cyclic strains. *J Orthop Res* 2000;18(2):220-227.
102. **Kim SG, Akaike T, Sasagaw T, Atomi Y, Kurosawa H.** Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 2002;27(3):139-144.
103. **Patthy L.** Detecting homology of distantly related proteins with consensus sequences. *J Mol Biol* 1987;198(4):567-577.
104. **Fisher LW, Termine JD, Young MF.** Deduced protein sequence of small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several unconnected tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264:4571-4576.
105. **Kavanagh E, Ashhurst DE.** Distribution of biglycan and decorin in collateral and cruciate ligaments and menisci of the rabbit knee joint. *J Histochem Cytochem* 2001;49(7):877-885.
106. **Bianco P, Fisher LW, Young mf, Termine JD, Robey PG.** Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38(11):1549-1563.
107. **Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E.** Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;302:527-534.
108. **Buckwalter JA, Mankin HJ.** Articular cartilage. Part I. Tissue design and chondrocyte- matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 1997;79A:600-611.
109. **Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E.** Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990;346(6281):281-284.
110. **Romaris M, Heredia A, Molist A, Bassols A.** Differential effect of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis in human embryonic lung fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 1991;1093(2-3):229-233.
111. **Kahari VM, Larjava H, Uitto J.** Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1991;266(16):10608-10615.
112. **Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, Faendrich F, Kalthoff H.** Regulation of biglycan gene expression by Transforming Growth Factor- β requires MKK6-p38 Mitogen -activated Protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *J Biol Chem* 2003;278(13):11041-11049.

113. **Einhorn TA.** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;358(Suppl):7-21.
114. **Einhorn TA.** Current concepts review: Enhancement of fracture -healing. *J Bone Joint Surg* 1995;77A:940-956.
115. **McKibbin B.** The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60-B:150-162.
116. **Shapiro F.** Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(7):1067-1081.
117. **Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P.** Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007;38Suppl1:S11-25.
118. **Steinemann SG.** Implants for stable fixation of fractures. In: Rubin LR (ed). *Biomaterials in reconstructive surgery.* St. Louis, CV Mosby 1983:283-311
119. **Tonna EA, Cronkite EP.** Autoradiographic studies of cell proliferation in the periosteum of intact and fractured femora of mice utilizing DNA labeling with H3-thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1961;107:719-721.
120. **Martini I.** "Fundamentals of anatomy and physiology" Prentice Hall. Inc. 1998
121. **Bullogh PG.** In *Orthopaedic Pathology: "Normal bone structure and development"*, (eds) Mosby 4th edition 2004.
122. **Klinger MH.** Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 196:1-11.
123. **Mackie IJ, Bull HA.** Normal haemostasis and its regulation. *Blood Rev* 1989; 3:237-250.
124. **Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, et al.** In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998; 275:H 1054-1061.
125. **Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E.** Platelets and inflammation: role of platelet- derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 1997;46(1):4-18.
126. **DiPietro LA.** Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock.* 1995;4(4):233-240.
127. **Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF** Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone.* 2002;30(1):26-31.
128. **Glowacki J.** Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop* 1998; 355:82-89.
129. **Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, et al.** Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002;143(4):1545-1553.
130. **Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ.** Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest.* 2002;109(11):1405-1415.
131. **Li X, Wang H, Touma E, Rousseau E, Quigg RJ, Ryaby JT.** Genetic network and pathway analysis of differentially expressed proteins during critical cellular events in fracture repair. *J Cell Biochem* 2006;100(2):527-543.
132. **Urist MR.** Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-899.
133. **Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO.** Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999; 17:269-278.
134. **Cheng H, Jiang W, Philips FM et al.** Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85A(8):1544-1552.

135. **Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al.** Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 2004; 11(17):1312-1320.
136. **Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG.** The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S294-300.
137. **Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM et al.** Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(6):2028-2038.
138. **Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, et al.** Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003;22:6267-6276.
139. **Hiltunen A, Aro T, Vuorio E.** A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 1993;11:305-312.
140. **Einhorn A, Hirschman A, Kaplan C.** Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus. A preliminary report. *J Orthop Res* 1989;7:792-805.
141. **Lee H, Choi W, Behrens F, DeFouw O, Einhorn A.** Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 1998;16:144-150.
142. **Campbell R, Kaplan S.** The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 1992;50:283-287.
143. **Mendler M, Vaughn L.** Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. *J Cell Biol* 1989;108:191-197.
144. **Olmedo ML, Landry PS, Sadasivan KK, Albright JA, Marino AA.** Programmed cell death in post-traumatic bone callus. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000;46(1):89-97.
145. **Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, et al.** Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab clin Med* 1999;134(3):222-231.
146. **Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA.** Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1004-1014.
147. **Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Wahner HW, Lewallen DG, Chao EY.** Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry. *J Bone Joint Surg* 1989;71A:1020-1030.
148. **Chao EYS, Aro HT.** Biomechanics of fracture fixation. In: Mow VC, Hayes WC (eds). *Basic orthopaedic biomechanics.* New York: Raven Press 1991:293-335
149. **White AA, Panjabi MM, Southwick WO.** The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg* 1977;59A:188-192.
150. **Claes L, Augat P, Suger G, Wilke J.** Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 1997;15:577-584.
151. **Bassett CAL, Hermann I.** Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. *Nature* 1961;190:460-461.
152. **Sarmiento A, Sobol A, Hoy L.** Prefabricated functional braces for the treatment of fractures of the tibial diaphysis. *J Bone Joint Surg* 1984;66A:1328-1340.
153. **Heiple K, Chase S, Herndon C.** A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1963;45:1592.
154. **Muschler GF, Lane JM.** Spinal fusion: Principles of bone fusion. In: Rothman, Simeone (eds). *The spine*, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999.

155. **Sandhu H, Boden S.** Biologic enhancement of spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1998;29:621-631.
156. **Damien CJ, Parsons JR.** Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991;2:187-208.
157. **Meister K, Segal D, Whitelaw GP.** The role of bone grafting in the treatment of delayed unions and nonunions of the tibia. *Orthop Rev* 1990;19:260-271.
158. **Dailiana ZH, Shiamishis G, Niokou D, Ioachim E, Malizos KN.** Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periosteum and bone grafts. *J Trauma*. 2002;53(5):934-938.
159. **Doi K, Sakai K.** Vascularized periosteal bone graft from the supracondylar region of the femur. *Microsurgery*. 1994;15(5):305-315.
160. **Dailiana ZH, Malizos KN, Urbaniak JR.** Vascularized periosteal flaps of distal forearm and hand. *J Trauma*. 2005;58(1):76-82.
161. **Bostrom MP, Camacho NP.** Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S274-282.
162. **Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, et al.** Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;(293):317-326.
163. **Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, Wolfe MW, Rueger DC.** Use of an osteoinductive biomaterial (RhOP-1) in healing large segmental bone defects. *J Orthop Trauma* 1998;12:407-412
164. **Sciadini MF, Johnson KD.** Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*. 2000;18(2):289-302.
165. **Mont MA, Ragland PS, Biggins B, Friedlaender G, Patel T, Cook S, Etienne G, Shimmin A, Kilday R, Rueger DC, Einhorn TA.** Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86-A Suppl 2:41-55.
166. **Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK.** Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81(4):710-718.
167. **Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S.** Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-158.
168. **Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, Vangosa LB, Cherubino P, Baldo F, Ristiniemi J, Kontakis G, Giannoudis PV.** Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S83-90.
169. **Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y et al.** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(12):2123-2134.
170. **Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, Pollak AN, Golden JD, Valentin-Opran A; BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma-Allgraft (BESTT-ALL) Study Group.** Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(7):1431-1441.
171. **Rang A, Will H.** The tetracycline-responsive promoter contains functional interferon-inducible response elements. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1120-1125.

172. **Carofino BC, Lieberman JR.** Gene therapy applications for fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 1:99-110.
173. **Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, Kabo JM, Finerman GA, Berk AJ, Witte ON.** The effect of regional gene therapy with BMP-2 producing bone marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:905-917.
174. **Gafni Y, Pelled G, Zilberman Y, Turgeman G, Apparailly F, Yotvat H, Galun E, Gazit Z, Jorgensen C, Gazit D.** Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2-based gene expression system. *Mol Ther.* 2004;9(4):587-595.
175. **Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, Fukushima K, Cummins J, Usas A, Robbins P, Fu FH, Huard J.** Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83A:1032-1039.
176. **Hidaka C, Goshi K, Rawlins B, Boachie-Adjei O, Crystal RG.** Enhancement of spine fusion using combined gene therapy and tissue engineering BMP-7 expressing bone marrow cells and allograft bone. *Spine* 2003;28:2049-2057.
177. **White E, Shors EC.** Biomaterial aspects of interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin North Am* 1986;30:49-67.
178. **Bauer TW, Muschler GF.** Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000;371:10-27.
179. **Hannouche D, Petite H, Sedel L.** Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83B:157-164.
180. **Block JE, Thorn MR.** Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopaedic procedures. *Calcif Tissue Int* 2000;66:234-238.
181. **Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K, Senpuku N, Tamai S, Shors EC.** Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1992;26:885-895.
182. **Sanchez-Sotelo J, Munuera L, Madero R.** Treatment of fractures of the distal radius with a remodelable bone cement: a prospective randomized study using Norian SRS. *J Bone Joint Surg (Br)* 2000;82B:856-863.
183. **Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L.** Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res* 1989;23:765-779.
184. **Roudier M, Bouchon C, Rouvillain JL, Amédée J, Bareille R, Rouais F, Fricain JC, Dupuy B, Kien P, Jeandot R, et al.** The resorption of bone-implanted corals varies with porosity but also with the host reaction. *J Biomed Mater Res* 1995;29:909-915.
185. **Shors EC.** Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999;30:599-613.
186. **Bruder SP, Fox BS.** Tissue engineering of bone: cell based strategies. *Clin Orthop* 1999;Suppl367:68-83.
187. **Bianco P, Gheron Robey P.** Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1663-1668.
188. **Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
189. **Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH.** Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254:317-330.

190. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
191. **Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S.** The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg (Am)* 1998;80A:985-996.
192. **Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G.** Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959-963.
193. **Anglen J.** Enhancement of fracture healing with bone stimulators. *Tech Orthop* 2002;17:506-514.
194. **Marino AA, Becker RO.** Origin of the piezoelectric effect in bone. *Calcif Tissue Res* 1971;8:177-180.
195. **Bodamyali T, Kanczler JM, Simon B, Blake DR, Stevens CR.** Effect of faradic products on direct current-stimulated calvarial organ culture calcium levels. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;264:657-661.
196. **Bozic KJ, Glazer PA, Zurakowski D, Simon BJ, Lipson SJ, Hayes WC.** In vivo evaluation of coralline hydroxyapatite and direct current electrical stimulation in lumbar spinal fusion. *Spine* 1999;24:2127-2133.
197. **Dwyer AF, Wickham GG.** Direct current stimulation in spinal fusion. *Med J Aust* 1974;1:73.
198. **Paterson DC, Lewis GN, Cass CA.** Treatment of delayed union and nonunion with an implanted direct current stimulator. *Clin Orthop* 1980;148:117-128.
199. **Sharrard WJW.** A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:347-355.
200. **Scott G, King JB.** A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of nonunion of the long bones. *J Bone Joint Surg (Am)* 1994;76:820-826.
201. **Ciombor DM, Aaron RK.** The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin.* 2005;10(4):579-593.
202. **Luben RA, Cain CD, Chen MC, Rosen DM, Adey WR.** Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy, low frequency fields. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:4180.
203. **Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS.** Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 1988;134:37-46.
204. **Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR, Kanczler JM, Simon B, Abbott J, Blake DR, Stevens CR.** Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;250:458-461.
205. **Ryaby JT.** Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355Suppl:205-215.
206. **Zhuang H, Wang W, Seldes RM, Tahernia AD, Fan H, Brighton CT.** Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;237:225-229.
207. **Maylia E, Nokes LD.** The use of ultrasonics in orthopaedics- a review. *Technol Health care.* 1999;7:1-28.
208. **Ziskin MC.** Applications of ultrasound in medicine- comparison with other modalities. In: Rapacholi MH, Grandolfo M, Rindi A, editors. *Ultrasound:*

- medical applications, biological effects, and hazard potential. New York: Plenum Press; 1987. p 49-59.
209. **Dyson M.** Therapeutic applications of ultrasound. In: Nyborg WL, Ziskin MC (eds). Biological effects of ultrasound. New York, Churchill Livingstone 1985:121-133.
 210. **Wells PNT.** Surgical applications of ultrasound. In: Nyborg WL, Ziskin MC (eds). Biological effects of ultrasound. New York, Churchill Livingstone 1985:157-167.
 211. **St John Brown R.** How safe is diagnostic ultrasonography? J Can Med Assoc 1984;131:307-311.
 212. **Corradi C, Cozzolino A.** The action of ultrasound in the evolution of an experimental fracture in rabbits. Minerva Ortop 1952;55:44-45 Italian.
 213. **Corradi C, Cozzolino A.** Ultrasound and bone callus formation during function. Arch Ortop 1953;66:77-98 Italian.
 214. **Xavier CAM, Duarte LR.** Stimulation of bone callus by ultrasound. Rev Brasil Ortop 1983;18:73-80 Portuguese.
 215. **Duarte LR.** The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg. 1983;101:153-159.
 216. **Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS.** Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. J Orthop Trauma. 1990;4:246-253.
 217. **Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao Ey, Istrup DM, Greenleaf JF.** Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. J Orthop Res. 1994;12:40-47.
 218. **Jingushi S, Azuma V, Ito M, et al.** Effects of non-invasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. In Proceedings of the Third World Congress of Biomechanics, 1998:17b.
 219. **Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF.** Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg Am. 1994;76:26-34.
 220. **Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR.** Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg Am. 1997;79:961-973.
 221. **Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Heckman JD, Kristiansen TK.** Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. Clin Orthop. 1997;337:198-207.
 222. **Mayr E, Rutzki MM, Rutzki M, Borchardt B, Ruter A.** Does low intensity, pulsed ultrasound speed healing of scaphoid fractures? Handchir Mikrochir Plast Chir 2000;32:115-122.
 223. **Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou M.** Current Concepts Review: The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. J Bone Joint Surg (Am) 2001;83A:259-270.
 224. **Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH.** Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. Ultrasound Med Biol 2004;30:389-395.
 225. **Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, Azuma Y.** Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. J Ultrasound Med. 2001;20(3):197-205.
 226. **Mayr E, Frankel V, Ruter A.** Ultrasound- an alternative healing method for nonunions? Arch Orthop Trauma Surg 2000;120:1-8.

227. **Duarte LR, Xavier CA, Choffie M, McCabe JM.** Review of nonunions treated by pulsed low- intensity ultrasound. In proceedings of the 1996 Meeting of the Société Internationale de Chirurgie Orthopaédique et de Traumatologie (SICOT), Amsterdam. 1996, p 110.
228. **Notle PA, van der Krans A, Patka P, Janssen IMC, Ryaby JP, Albers GHR.** Low-intensity ultrasound in the treatment of nonunions. *J Trauma* 2001;51:693-703.
229. **Gebauer D, Mayr E, Orthner E, Ryaby J.** Low-intensity pulsed ultrasound: Effects on nonunions. *Ultrasound Med Biol* 2005;31(10):1391-1402.
230. **Yeung CK, Guo X, Ng YF.** Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res* 2006;24(2):193-201.
231. **Cunha A, Parizotto NA, Campos- Vidal B.** The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon of the rat. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:1691-1696.
232. **Webster DF, W Harvey W, Dyson M, Pond JB.** The role of ultrasound – induced cavitation in the in vitro stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics* 1980;18:33-37.
233. **Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B.** The effects of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exercise* 1987;29(3):326-332.
234. **Frieder S, Weisberg J, Fleming B, Stanek A.** A pilot study: The therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendons in male rats. *J Orthop Sports Phys Ther* 1988;10:39-46.
235. **Jackson BA, Schwane JA, Stracher BC.** Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exere* 1991;23:171-176.
236. **Saini NS, Roy KS, Bansal PS, Singh B, Simran PS.** A preliminary study on the effect of ultrasound therapy on the healing of surgically severed Achilles tendons in five dogs. *J Vet Med* 2002;49:321-328.
237. **Ng COY, Ng GYF, See EKN, Leung MCP.** Therapeutic ultrasound improves strength of Achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1501-1506.
238. **Walsh WR, Stephens P, Vizesi F, Bruce W, Huckle J, Yu Y.** Effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in an intra-articular sheep knee model. *Arthroscopy* 2007;23:197-204.
239. **Qin L, Lu H, Fok P, Cheung W, Zheng Y, Lee K, Leung K.** Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteogenesis at bone-tendon healing junction. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:1905-1911.
240. **Lu H, Qin L, Fok P, Cheung W, Lee K, Guo X, Wong W, Leung K.** Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits. *Am J Sports Med* 2006;34:1287-1296.
241. **Sparrow KJ, Finucane SD, Owen JR, Wayne JS.** The effects of low -intensity ultrasound on medial collateral ligament healing in the rabbit model. *Am J Sports Med.* 2005;33(7):1048-1056.
242. **Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S, Fujioka H, Muratsu H, Tsunoda M, Kurosaka M.** Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. *J Ultrasound Med* 2002;21(3):283-288.
243. **Leung MCP, Ng GYF, Yip KK.** Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. *Ultrasound Med Biol* 2006;32(3):449-452.
244. **Heckman JD, Sarasohn-Kahn J.** The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis* 1997;56:63-72.

245. **Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, Nishimura N, Yamano Y.** Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *J Bone Joint Surg (Br)* 2000;82:1077-1082.
246. **Tsumaki N, Kakiuchi M, Sasaki J, Ochi T, Yoshikawa H.** Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening-wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A(11):2399-405.
247. **Gold SM, Wasserman R.** Preliminary results of tibial bone transports with pulsed low intensity ultrasound (Exogen). *J Orthop Trauma.* 2005;19(1):10-16.
248. **Gebauer D, Correll J.** Pulsed low-intensity ultrasound: A new salvage procedure for delayed unions and nonunions after leg lengthening in children. *J Pediatr Orthop* 2005;25:750-754.
249. **Glazer PA, Heilmann MR, Lotz JC, Bradford DS.** Use of ultrasound in spinal arthrodesis. A rabbit model. *Spine* 1998;23:1142-1148.
250. **Hantes ME, Mavrodontidis AN, Zalavras CG, Karantanas AH, Karachalios T, Malizos KN.** Low-intensity transosseous ultrasound accelerates osteotomy healing in a sheep fracture model. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A(10):2275-2282.
251. **Malizos KN, Papachristos AA, Protopappas VC, Fotiadis DI.** Transosseous application of low-intensity ultrasound for the enhancement and monitoring of fracture healing process in a sheep osteotomy model. *Bone* 2006;38(4):530-539.
252. **Protopappas VC, Baga DA, Fotiadis DI, Likas AC, Papachristos AA, Malizos KN.** An ultrasound wearable system for the monitoring and acceleration of fracture healing in long bones. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2005; 52(9):1597-1608.
253. **Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME.** Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan Gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res.* 1996;14:802-809.
254. **Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C.** Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S216-229.
255. **Wu J, Du G.** Temperature elevation in tissues generated by finite-amplitude tone bursts of ultrasound. *J Acoust Soc (Am)* 1990;88:1562-1577.
256. **Welgus HG, Jeffrey JJ, Elsen AZ.** Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. *J Biol Chem* 1981;256:9516-9521.
257. **Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG.** Molecular mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279(52):54463-54469.
258. **Hsu HC, Fong YC, Chang CS, Hsu CJ, Hsu SF, Lin JG, Fu WM, Yang RS, Tang CH.** Ultrasound induces cyclooxygenase-2 expression through integrin, integrin-linked kinase, Akt, NF-kappaB and p300 pathway in human chondrocytes. *Cell Signal.* 2007;19(11):2317-2328.
259. **Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, Fu WM.** Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2006;69(6):2047-2057.
260. **Pounder NM, Harrison AJ.** Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics.* 2008;48(4):330-338.

261. **Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH, Huang TH, Lu BY, Fu WM.** Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone*. 2005;36(2):276-283.
262. **Chapman IV, MacNally NA, Tucker S.** Ultrasound-induced changes in rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1980;6:47-58.
263. **Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS.** Cytokine release from osteoblast in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003;24:2379-2385.
264. **Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo JA, et al.** Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* 1989;14:15.
265. **Ryaby JT, Mathew J, Duarte-Alves P.** Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF- β synthesis in osteoblastic cells. *Trans Orthop Res Soc* 1992;7:590.
266. **Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K.** Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:284-287.
267. **Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y.** Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res* 2001;18:360-369.
268. **Leung KS, Cheung WH, Zhang C, Lee KM, Lo HK.** Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(418):253-259.
269. **Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, Niikura T, Kurosaka M, Komori T.** Osteogenic activity of human fracture haematoma-derived progenitor cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91(2):264-270.
270. **Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME.** Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res*. 1996;14(5):802-809.
271. **Nolte PA, Klein-Nulend J, Albers GH, Marti RK, Semeins CM, Goei SW, Burger EH.** Low-intensity ultrasound stimulates endochondral ossification in vitro. *J Orthop Res*. 2001;19(2):301-307.
272. **Ebisawa K, Hata K, Okada K, Kimata K, Ueda M, Torii S, Watanabe H.** Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2004;10(5-6):921-927.
273. **Harle J, Mayia F, Olsen I, Salih V.** Effects of ultrasound on transforming growth factor-B genes in bone cells. *Eur Cell Mater* 2005;10:70-77.
274. **Rawool D, Goldberg B, Forsberg F, et al.** Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *Trans Radiol Soc North Am* 1998;83:1185
275. **Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, Kuroe K, Matsuguchi T.** Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *J Cell Physiol*. 2007;211(2):392-398.

276. **Hou CH, Hou SM, Tang CH.** Ultrasound increased BMP-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun, and AP-1 pathways in cultured osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2009;106(1):7-15.
277. **Rubin CT, Hausman MR.** The cellular basis of Wolf's law: transduction of physical stimuli to skeletal adaptation. *Rheum Dis Clin North Am* 1988;14:503-517.
278. **Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V, Papachristos A.** Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. *Injury.* 2006;37 Suppl 1:S56-62.
279. **Anast T, Fields T, Hiseth A.** Ultrasonic technique for the evaluation of bone fracture. *J Phys Med (Am)* 1958;37:157-159.
280. **Abendschein WF, Hyatt GW.** Ultrasonics and physical properties of healing bone. *J Trauma.* 1972;12(4):297-301.
281. **Cunningham JL, Kenwright J, Kershaw CJ.** Biomechanical measurement of fracture healing. *J Med Eng Tech* 1990;13:92-101.
282. **Gerlanc M, Haddad D, Hyatt GW, Langloh JT, Hillaire PS.** Ultrasonic study of normal and fractured bone. *Clin Orthop* 1975;111:175-180.
283. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
284. **Lai J, Pittelkow MR.** Physiological effects of ultrasound mist on fibroblasts. *Int J Dermatol.* 2007;46:587-593.
285. **Boykiw R, Sciore P, Reno C, Marchuk L, Frank CB, Hart DA.** Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biol* 1998;17:371-378.
286. **Fox SW, Lovibond AC.** Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol. Cell Endocrinol.* 2005;243(1-2):19-26.
287. **Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D.** RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(18):2334-2350.