



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ**

**ΠΕΡΙΟΣΤΕΟΥ – ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ"**

υπό

**ΧΡΗΣΤΟΥ Γ. ΧΑΣΑΝΙΔΗ**

Μοριακός Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2012

© 2012 Χρήστος Χασανίδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3<sup>η</sup>/21-03-2012 ΓΣΕΣ):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής**  
**(Επιβλέπουσα)** Δρ. Ζωή **Νταϊλιάνα**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Ν. **Μαλίζος**  
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Παναγούλα **Κόλλια**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο  
Αθηνών (ΕΚΠΑ)
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Θεόφιλος **Καραχάλιος**  
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ασπασία **Τσέζου**  
Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Σωκράτης **Βαρυτιμίδης**  
Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Μιχαήλ **Χαντές**  
Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, το Εργαστήριο Γενετικής Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Ολοκληρώνοντας αυτή τη προσπάθεια, οφείλω να αναγνωρίσω πως αποτέλεσε μια πρωτόγνωρη, όμορφη αλλά και δύσκολη διαδρομή. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που αποκόμισα γύρω από το επιστημονικό πεδίο που ασχολήθηκα αλλά και τον τρόπο δουλειάς και συνεργασίας ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμες. Αισθάνομαι ευγνώμων που μου δόθηκε η ευκαιρία να εκπονήσω την συγκεκριμένη διατριβή, και θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν τα μέγιστα, ο καθένας με τον τρόπο και την ιδιότητά του, στην πραγμάτωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική υπεύθυνη της διατριβής μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κυρία Ζωή Νταϊλιάνα, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την ανάθεση της μελέτης αυτής. Την ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική καθοδήγηση και επίβλεψη, την εποικοδομητική κριτική, την αμέριστη υποστήριξη, τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε και για την γενικότερη συνεργασία μαζί της που αποτέλεσε για εμένα διδαχή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, κύριο Κωνσταντίνο Μαλίζο, για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον, την πολύπλευρη συμπαράσταση, την πολύτιμη συνεισφορά του, την επιστημονική καθοδήγηση και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα διατριβή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας κυρία Παναγούλα Κόλλια, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, της οποίας η επίβλεψη, η συμπαράσταση, η γνώση του αντικειμένου, η απλόχερη βοήθεια και οι πολύτιμες συμβουλές της, στήριξαν την προσπάθειά μου καθόλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο

Θεόφιλο Καραχάλιο, την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κυρία Ασπασία Τσέζου, τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Σωκράτη Βαρυτιμίδη και τον Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Μιχάλη Χαντέ, που δέχθηκαν να συμμετάσχουν και να βοηθήσουν με τις παρατηρήσεις τους στην ορθή συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κύριο Γεώργιο Κουκούλη για τη διάθεση του εργαστηρίου του.

Πολλές ευχαριστίες στους Ειδικούς Ιατρούς κύριο Κωνσταντίνο Μπαργιώτα και κύριο Γεώργιο Μπασδέκη, την ιατρό Λουκία Παπαθεοδώρου αλλά και στους υπόλοιπους ιατρούς και το προσωπικό της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για τη συνεργασία, τη συνεισφορά αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν σε κλινικά ζητήματα.

Ευχαριστώ θερμά τον Στατιστικολόγο κύριο Γεώργιο Δημακόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή του στην παρούσα μελέτη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και συναδέλφους Σταυρούλα Σαμαρά, Θεοδώρα Κορομηλά, Ιωάννα Χιώτογλου, Ανδρομάχη Βαγενά και Μαρία Σαμαρά για την μεγάλη βοήθεια, την άψογη συνεργασία, τη συνολική υποστήριξη και τις όμορφες στιγμές που ζήσαμε εν ώρα εργασίας.

Τέλος, πάνω απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου. Τους γονείς μου, Γιώργο και Νικολέττα, όπως επίσης και την αδερφή μου Αλεξάνδρα, για την αγάπη, τη συμπαράσταση και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια. Η δική τους στήριξη αποτέλεσε πηγή δύναμης για να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις των σπουδών και να ολοκληρώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή.

*Χρήστος Χασανίδης*

## **ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ**

Τμήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν δημοσιευτεί στα παρακάτω περιοδικά και παρουσιάστηκαν στα παρακάτω ελληνικά και διεθνή συνέδρια:

### **A. Δημοσιεύσεις**

**C. G. Chassanidis**, K. N. Malizos, S. Varitimidis, S. Samara, T. Koromila, P. Kollia, Z. Dailiana  
“Smoking affects mRNA expression of bone morphogenetic proteins in human periosteum”  
*J Bone Joint Surg Br* 2012;94(10):1427-1432, (Accepted June 21, 2012)

### **B. Δημοσιευμένες περιλήψεις**

**Chassanidis C**, Samara S, Koromila T, Varitimidis S, Dailiana Z, Malizos K, Kollia P  
“BMP mRNA expression in human periosteum during fracture healing”  
*Calcified Tissue International* 82(suppl 1): S62, 2008

**Chassanidis C**, Dailiana Z, Samara R, Koromila S, Varitimidis S, Malizos K, Kollia P  
“BMP mRNA expression in human periosteum during fracture healing”  
*Transactions of the 55<sup>th</sup> Meeting of the Orthopaedic Research Society, abstract 0611, 2009*

**C. Chassanidis**, Z. Dailiana, P. Kollia, T. Koromila, K. Malizos, S. Samara, S. Varitimidis  
“Bone morphogenetic protein mRNA expression in human periosteum”  
*Journal of Bone and Joint Surgery Br* 92-B (Suppl.IV): 614, 2010

**C. Chassanidis**, Z. Dailiana, P. Kollia, T. Koromila, K. Malizos, S. Samara, S. Varitimidis  
“Bone morphogenetic protein mRNA expression in human periosteum of fractured bones”  
*Journal of Bone and Joint Surgery Br* 92-B (Suppl.IV): 615, 2010

**CG Chassanidis**, P Kollia, S Samara, T Koromila, S Varitimidis, KN Malizos, Z Dailiana  
«Bone morphogenetic protein mRNA expression in human periosteum»  
*Journal of Bone and Joint Surgery Br* 93-B (Suppl.II):355, 2011

### **Γ. Ανακοινώσεις Προφορικές**

**Χ. Γ. Χασανίδης**, Σ. Σαμαρά, Θ. Κορομηλά, Σ. Βαρυτιμίδης, Κ. Μαλίζος, Π. Κόλλια, Ζ. Νταϊλιάννα  
«Έκφραση οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) του περιostίου μετά από κατάγματα»  
64ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Αθήνα, 8-11 Οκτωβρίου 2008

**Χ. Γ. Χασανίδης**, Ζ. Νταϊλιάννα, Σ. Σαμαρά, Θ. Κορομηλά, Σ. Βαρυτιμίδης, Π. Κόλλια, Κ. Μαλίζος

«Έκφραση οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) στο ανθρώπινο περίοστεο»

*6ο Ετήσιο Συνέδριο Τμήματος Ορθοπαιδικής Έρευνας, Αθήνα, 28-30 Νοεμβρίου 2008*

**Chassanidis C**, Dailiana Z, Samara S, Koromila T, Varitimidis S, Malizos K, Kollia P

“Bone Morphogenetic Protein mRNA expression in Human Periosteum”

*55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), Las Vegas, USA 22-25 February 2009*

**Chassanidis C**, Dailiana Z, Samara S, Koromila T, Varitimidis S, Malizos KN, Kollia P.

“Bone Morphogenetic Protein mRNA Expression in Human Periosteum”

**Chassanidis C**, Kollia P, Samara S, Koromila T, Varitimidis S, Malizos K, Dailiana Z.

“Bone morphogenetic protein mRNA expression in human periosteum of fractured bones”

*10th European Congress of European Federation of National Association of Orthopaedics and Traumatology, EFFORT, Vienna 3-6 June 2009*

**C. Chassanidis**, P. Kollia, S. Varitimidis, S. Samara, T. Koromila, K.N. Malizos, Z. Dailiana

“Smoking habit affects Bone Morphogenetic Protein (BMPs) mRNA expression in human periosteum”

*Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, (AAOS), New Orleans, Louisiana, USA, March 9 – 13, 2010.*

**Χ. Γ. Χασανίδης**, Π. Κόλλια, Σ. Βαρυτιμίδης, Σ. Σαμαρά, Θ. Κορομηλά, Κ.Ν. Μαλίζος, Ζ. Νταϊλιάννα

«Έκφραση οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) στο ανθρώπινο περίοστεο»

*66ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Αθήνα, 13-16 Οκτωβρίου 2010*

**Χ. Γ. Χασανίδης**, Π. Κόλλια, Σ. Βαρυτιμίδης, Σ. Σαμαρά, Θ. Κορομηλά, Κ. Μαλίζος, Ζ. Νταϊλιάννα

«Η επίδραση του καπνίσματος στην έκφραση των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) στο ανθρώπινο περίοστεο»

*34ο Πανελλήνιο Βιολογικό Συνέδριο (ΕΕΒΕ), Τρίκαλα, 17- 19 Μαΐου 2012*

#### **Δ. Αναρτημένες ανακοινώσεις (poster)**

**C.G. Chassanidis**, S. Samara, T. Koromila, S. Varitimidis, Z. Dailiana, K. Malizos, P. Kollia

“Bone morphogenetic protein mRNA expression in human periosteum during fracture healing.”

*35th European Symposium of Calcified Tissue, Barcelona, Spain 24-28 May 2008*

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ**

**ΠΕΡΙΟΣΤΕΟΥ – ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ "**

**ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΣΑΝΙΔΗΣ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Ζωή Νταϊλιάνα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας - **Επιβλέπουσα**
2. **Δρ. Κωνσταντίνος Ν. Μαλίζος**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Παναγούλα Κόλλια**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το περίοστεο είναι ένα εξειδικευμένος συνδετικός ιστός ο οποίος περιβάλλει τα περισσότερα ανθρώπινα οστά. Υποστηρίζει τον οστίτη ιστό και εξασφαλίζει συνεχή παροχή νέων οστεοβλαστών για την αύξηση, επιδιόρθωση και ομοιοστασία του οστού. Η παρουσία στο περίοστεο πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων, οστεοπρογονικών κυττάρων και αυξητικών παραγόντων, το καθιστά ένα πολύ σημαντικό ιστό για την αναγεννητική διαδικασία του οστού. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs), οι οποίες εκτός των άλλων εδρεύουν και στο περίοστεο, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο μεταξύ των αυξητικών παραγόντων στην ανάπτυξη των οστών, τον ανασχηματισμό και την διαδικασία της πώρωσης των καταγμάτων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναλύθηκαν οι ανθρώπινες περιοστικές BMPs και συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7, σε ένα σύνολο 314 δειγμάτων περιοστέου τα οποία λήφθηκαν από ασθενείς της Ορθοπαιδικής Χειρουργικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας κατά τη διάρκεια επανορθωτικών χειρουργικών επεμβάσεων και έκτακτων χειρουργικών επεμβάσεων για την αποκατάσταση καταγμάτων. Το σύνολο των δειγμάτων κατηγοριοποιήθηκε σε φυσιολογικά δείγματα (n=107) και καταγματικά (n=207) εκ των οποίων τα 193 προέρχονταν από την εστία του κατάγματος και τα 14 ήταν από απόσταση από την εστία του κατάγματος. Περαιτέρω κατηγοριοποίηση ανέδειξε τις ομάδες παιδιών και ενηλίκων, ενώ μελετήθηκαν και αναλύθηκαν παράγοντες που πιθανά επηρέαζαν την έκφραση των γονιδίων που ελέγχθηκαν, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, δείκτης μάζας σώματος) και τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων (περιοχή προέλευσης-μηχανική φόρτιση, μέγεθος οστού από όπου προήλθε το δείγμα). Απομονώθηκε γενετικό υλικό από τα δείγματα, στο οποίο μέσω των τεχνικών της μοριακής βιολογίας εφαρμόστηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης για τα γονίδια BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7. Για την ανίχνευση των παραγόντων που έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στις μετρήσεις των BMP2, BMP4, BMP6 και BMP7, χρησιμοποιήθηκαν Γενικά Γραμμικά Μοντέλα μετά από μετασχηματισμό λογαρίθμου. Τα παρατηρούμενα επίπεδα σημαντικότητας (p-values) των διαφορών εκτιμήθηκαν με το κριτήριο Bonferroni ή το Newman – Keuls ανάλογα με την ικανοποίηση ή μη των προϋποθέσεων. Το επίπεδο σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε ίσο με 0.05.

Συσχετίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκαν με το συντελεστή Pearson correlation coefficient. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA v.8.0.

Παρατηρήθηκε ένα ιεραρχικό μοντέλο γονιδιακής έκφρασης σε όλες τις συγκρίσεις και αναλύσεις που εκπονήθηκαν (BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7). Διαπιστώθηκε γενική καταστολή της έκφρασης των γονιδίων των BMPs στα κατάγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα σε όλες τις κατηγορίες. Σημειώθηκε αύξηση της έκφρασης μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα του κατάγματος για όλες τις BMPs. Η γονιδιακή έκφραση των δειγμάτων από απόσταση ήταν μεγαλύτερη από αυτή των καταγμάτων εστίας αλλά μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών. Η γονιδιακή έκφραση ήταν μικρότερη στους καπνιστές. Οι γυναίκες παρουσίασαν υψηλότερη γονιδιακή έκφραση συγκριτικά με τους άνδρες. Τα παιδιά, ως επί των πλείστον είχαν υψηλότερη έκφραση από τους ενήλικες ενώ οι ασθενείς άνω των 50 ετών έδειξαν υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης από του νεότερους ενήλικες (18-49 ετών). Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ άνω και κάτω άκρου. Το μέγεθος του οστού επηρέασε την έκφραση στα κατάγματα. Από την άλλη, καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε ανάλογα με τον δείκτη μάζας σώματος των ασθενών στα επίπεδα mRNA των BMPs. Οι ακραίες τιμές δεν επηρέασαν τα αποτελέσματα και καμία συσχέτιση δεν προέκυψε ανάλογα με το οστό προέλευσης του δείγματος.

Συνοψίζοντας, από τις αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης των ανθρώπινων περιστικίων BMPs αναδείχθηκε ο πρωταγωνιστικός και πρώιμος ρόλος της BMP-2 στην οστεογενετική σειρά, όπως επίσης επιβεβαιώθηκε και η οστεοεπαγωγική δράση της BMP-6 αφού διατήρησε την έκφρασή της στα κατάγματα όπως αυτή που είχε στα φυσιολογικά. Επιπλέον, φάνηκε πως το γεγονός ενός οστικού τραυματισμού επηρεάζει αρνητικά την γονιδιακή έκφραση ενώ παράγοντες όπως το κάπνισμα, το φύλο, η ηλικία και το μέγεθος του οστού είναι ικανοί να επηρεάσουν χαρακτηριστικά τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των παραγόντων του περιostίου.

Συμπερασματικά, η κατανόηση της συμπεριφοράς του περιostίου σε μοριακό επίπεδο μέσω της ανάλυσης των παραγόντων που συμβάλλουν στο ρόλο του (BMPs και άλλων αυξητικών παραγόντων) κατά την ομοιοστασία, αναδόμηση και επουλωτική διαδικασία, θα αναδείξουν τη δυναμική του αλλά και των κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό, ως νέα πηγή έμπνευσης και πρώτων υλών για τη νέα αναγεννητική ιατρική.

## SUMMARY

Periosteum is a specialized connective tissue that surrounds the majority of human bones, supports the bone and ensures a constant supply of new osteoblasts to bone growth, repair and homeostasis. The presence of pluripotent mesenchymal cells, osteoprogenitor cells and growth factors within periosteum, makes it a very important tissue in the regenerative process of bone. Bone morphogenetic proteins (BMPs), which are established in periosteum, play a critical role among the growth factors in bone growth, remodeling and healing process.

In the present thesis, human periosteal BMPs were analyzed and particularly the gene expression of BMP-2, BMP-4, BMP-6 and BMP-7, in a total of 314 periosteal samples, collected from patients of the Department of Orthopaedic Surgery of the University of Thessalia in Larissa, Greece, undergoing reconstructive skeletal procedures or open reduction and fixation of extremity fractures. The samples were categorized into normal samples (n = 107), fractured samples (n = 207), obtained from the site of fracture (n=193) or from a distance (n=14). Samples were further classified in groups of children and adults, while potential factors that might affect the expression of tested genes were studied and analyzed, depending on patient characteristics (age, gender, smoking, body mass index) and sample characteristics (area of origin - mechanical loading, size of donor bone). RNA was isolated, molecular biology techniques were performed in order to quantify the gene expression of BMP-2, BMP-4, BMP-6 and BMP-7. A General Linear Model was applied to assess statistically significant effects of factors and covariates on log transformed values of BMP2, BMP4, BMP6 and BMP7. Statistically significant differences were detected with the use of the Bonferroni criterion or the Newman – Keuls where appropriate. P-values <0.05 were considered statistically significant. Correlations between variables were assessed with the Pearson correlation coefficient. Analysis was carried out with the use of STATISTICA v.8.0.

There was a hierarchical model of gene expression in all tested confrontations and analysis (BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7). A general suppression of gene expression of BMPs in fractures was noted comparatively to normal samples in all groups. An increase of gene expression was observed after day 30 of fracture, in all BMPs. Gene expression of

distanced samples was less than normal's but higher than the fracture site. Gene expression was lower in smokers than non smokers. Women showed higher gene expression than men. Children had higher gene expression than adults in most of BMPs and patients older than 50 years showed higher levels of gene expression than younger adults (18-49 years). No differences were found between upper and lower extremity. The size of donor bone did affect the gene expression in fractures. No difference was detected depending on the body mass index of patients in mRNA levels of BMPs. Outliers did not affect the results, and no association was revealed regarding the origin of bone sample.

In summary, the analysis of gene expression of human periosteal BMPs highlighted the leading and primitive role of BMP-2 on the osteogenic lineage, and confirmed the osteoinductive activity of BMP-6, since BMP-6 maintained the gene expression in fractured samples in levels similar to normal samples. Moreover, it seems that bone injury negatively affects gene expression and factors such as smoking, sex, age and size of bone are able to affect in a characteristic way the levels of gene expression of periosteal growth factors.

In conclusion, understanding the behavior of periosteum at the molecular level by analyzing the factors that contribute to its function (BMPs and other growth factors) during homeostasis, remodeling and healing process, will highlight its efficacy and potential use of periosteal cells, in regenerative medicine.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>Α ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1-77</b>
A1. ΟΣΤΑ – ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	1-24
A1.1 Οστίτης ιστός	3
A1.2 Κύτταρα οστού	5
A1.2.1 Οστεοβλάστες	5
A1.2.2 Οστεοκύτταρα	7
A1.2.3 Επενδυτικά κύτταρα	8
A1.2.4 Οστεοκλάστες	8
A1.2.5 Θεμέλια ουσία	9
A1.3 Συνδετικός ιστός	11
A1.4 Το περίοστεο	12
A1.4.1 Ιστολογία του περιostίου	12
A1.4.2 Εξωτερική στοιβάδα του περιostίου	15
A1.4.3 Εσωτερική στοιβάδα του περιostίου	16
A1.4.4 Αναπτυξιακή ανατομία του περιostίου και ο ρόλος του στην οστεοποίηση	17
A1.4.4.i Ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση και περίοστεο	18
A1.4.4.ii Ενδοχόνδρια οστεοποίηση και περίοστεο	19
A1.4.4.iii Προέλευση των οστεοπρογονικών κυττάρων του περιostίου	21
A1.5 Αύξηση και αναδόμηση του οστού	22
A1.5.1 Ρύθμιση οστικής αναδόμησης	23
A2. ΟΣΤΙΚΟ ΚΑΤΑΓΜΑ	25-41
A2.1 Ταξινόμηση καταγμάτων	25
A2.2 Πύρωση οστικών καταγμάτων	26
A2.2.1 Φλεγμονή και αποκατάσταση κατάγματος	26
A2.2.2 Αποκατάσταση και ανακατασκευή καταγμάτων	27
A2.3 Ο ρόλος του περιostίου στην πύρωση και ανακατασκευή του κατάγματος	35
A2.3.1 Το περίοστεο στα παιδιά κατά την επουλωτική διαδικασία	38
A2.4 Αποτυχία της πύρωσης	40
A2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την πύρωση του κατάγματος	41
A3. ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ, ΑΝΑΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΩΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	42-75
A3.1 Υπεροικογένεια TGF-beta	42
A3.1.1 TGF-β (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β)	42
A3.2 Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (BMPs)	44
A3.2.1 Βασικές γνώσεις	44
A3.2.2 Υποδοχείς Οστικών Μορφογενετικών Πρωτεϊνών	47

(BMPs Receptors, BMPRs)	
A3.2.2.i Υποδοχείς TGF-β πρωτεϊνών	47
A3.2.2.ii Υποδοχείς BMPs (BMP Receptors)	48
A3.2.3 Λειτουργία μονοπατιού μέσω των BMPs	49
A3.2.3.i Πρωτεΐνες πρόσδεσης στους BMPRs	49
A3.2.3.ii Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών	49
A3.2.3.iii Οι πρωτεΐνες Smad ενέχονται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF-b/ BMP	50
A3.2.3.iv Καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης Smad	52
A3.2.3.v Ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAP-κινάσης μέσω του μονοπατιού TAB1/TAK1	53
A3.2.3.vi Καταστολή του μονοπατιού TAB1/TAK1	53
A3.2.3.vii Συνεργάτες/καταστολείς του μονοπατιού των BMPs	54
A3.2.4 Ανταγωνιστές των BMPs	54
A3.2.4.i Εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs	54
A3.2.4.ii Μη σηματοδοτικοί BMP ψευδο-υποδοχείς και ενδοκυτταρικοί ανταγωνιστές	55
A3.3 BMPs: Δράση και λειτουργία	56
A3.3.1 BMPs κατά την πρώιμη ανάπτυξη	57
A3.3.2 Οι BMPs στην ανάπτυξη και αναδόμηση του σκελετού	59
A3.3.3 BMPs και επούλωση του κατάγματος	61
A3.4 Παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη/αναδόμηση/επούλωση του οστού	64
A3.4.1 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	65
A3.4.2 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	66
A3.4.3 IGF (Insulin-like Growth Factors)	66
A3.4.4 FGF (Fibroblast Growth Factor)	67
A3.4.5 PTH/PTHrP	67
(Parathyroid Hormone/ Parathyroid Hormone-related Peptide)	
A3.4.6 OPG-RANKL-RANK (Osteoprotegerin signal pathway)	68
A3.5 Παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση	69
A3.5.1 Κάπνισμα	69
A3.5.2 Φύλο	70
A3.5.3 Ηλικία	72
A3.5.4 Μηχανική φόρτιση	74
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>76-77</b>
<b>Β ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>78-222</b>
<b>B1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>78-103</b>
B1.1 Δείγμα μελέτης	78
B1.2 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης	82
B1.2.1 Γενικά	82

B1.2.2 Απομόνωση RNA από το περιοστικό τεμάχιο	82
B1.2.3 Σύνθεση cDNA	85
B1.2.4 Ποσοτική PCR Πραγματικού χρόνου (Quantitative RT-PCR)	87
B1.2.4.i. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I	90
B1.2.4.ii Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης	91
B1.2.4.iii Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού	92
B1.2.4.iv Γονίδιο αναφοράς h-PBGD	96
B1.2.4.v Αντίδραση Q-RT-PCR	97
B1.3 Στατιστική ανάλυση	103
<b>B2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>104-172</b>
B2.1 Χαρακτηριστικά δείγματος και ανάλυσης	104
B2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και στατιστική ανάλυση	106
B2.3 Ανάλυση της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των δειγμάτων (φυσιολογικά – κατάγματα, παιδιά – ενήλικες)	107
B2.3.1 Συσχέτιση της έκφρασης των BMPs ανεξαρτήτου κατηγοριοποίησης	108
B2.4 Ανάλυση της έκφρασης των BMPs στις μεγαλύτερες σε πλήθος δειγμάτων υποομάδες (φυσιολογικά – κατάγματα 1 <sup>ης</sup> ημέρας – κατάγματα 2 <sup>ης</sup> -10 <sup>ης</sup> ημέρας)	113
B2.5 Μελέτη, σύγκριση και στατιστική ανάλυση των BMPs ανά γονίδιο στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1 <sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2 <sup>ης</sup> – 10 <sup>ης</sup> ημέρας.	116
B2.5.1 BMP-2	116
B2.5.2 BMP-4	120
B2.5.3 BMP-6	124
B2.5.4 BMP-7	128
B2.6 Μελέτη, σύγκριση και στατιστική ανάλυση ανά γονίδιο BMP στο σύνολο των δειγμάτων, στον ενήλικο πληθυσμό και στα παιδιά	132
B2.6.1 BMP-2	132
B2.6.2 BMP-4	141
B2.6.3 BMP-6	150
B2.6.4 BMP-7	159
B2.7 Συσχέτιση έκφρασης και χρονικού διαστήματος από στιγμή κατάγματος	167
B2.8 Συσχέτιση έκφρασης διαφορετικών περιοχών (δείγμα εστίας – δείγμα απόστασης) ίδιου οστού σε κατάγματα 1 <sup>ης</sup> ημέρας (εστία) με δείγμα από απόσταση από το ίδιο οστό	169
B2.9 Λοπές συσχετίσεις	170
B2.10 Σύνοψη αποτελεσμάτων	171

<b>B3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>173-205</b>
B3.1 Γενικά	173
B3.2 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των περιοστικών BMPs στα φυσιολογικά δείγματα και τα κατάγματα	176
B3.3 Επίδραση του καπνίσματος στην γονιδιακή έκφραση των περιοστικών BMPs	181
B3.4 Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των περιοστικών BMPs με το φύλο	183
B3.5 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των BMPs του περιοστέου σε σχέση με την ηλικία	185
B3.6 Σχέση της μηχανικής φόρτισης με την γονιδιακή έκφραση των BMPs του περιοστέου	187
B3.7 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των περιοστικών BMPs ανάλογα με το μέγεθος του οστού δότη του περιοστικού δείγματος	189
B3.8 Δείκτης μάζας σώματος και συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των περιοστικών BMPs	190
B3.9 Λοιπές συσχετίσεις της γονιδιακής έκφρασης των BMPs του περιοστέου	191
B3.10 Συμπεράσματα και προτάσεις για επόμενες μελέτες	191
B3.11 Κλινικές εφαρμογές του περιοστέου και των BMPs – Ανασκόπηση	194
B3.11.1 Περίοστεο	194
B3.11.2 Χρήση και θεραπευτικές ιδιότητες των BMPs	198
B3.11.3 Περίοστεο και BMPs στην αναγεννητική ιατρική	204
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>206-222</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>223-254</b>



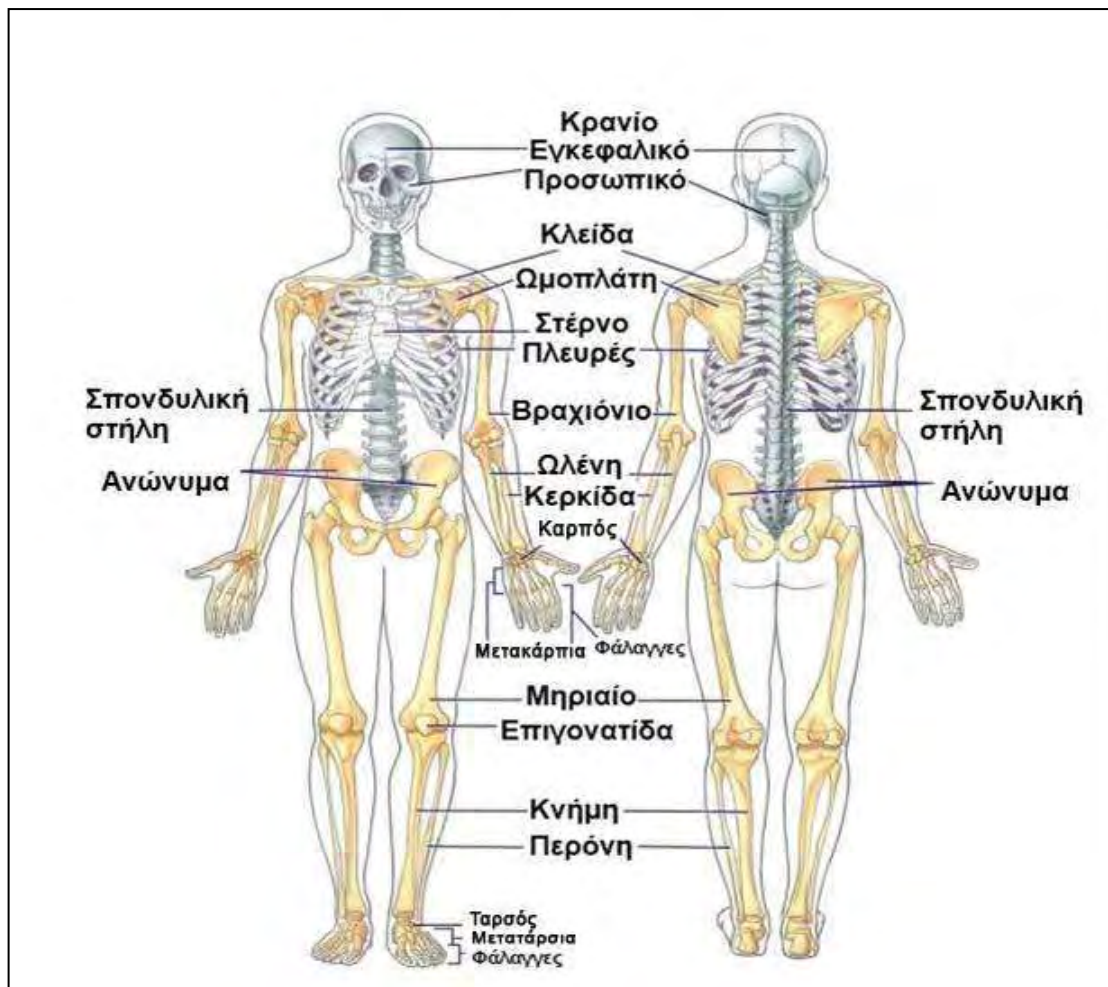
***Στην οικογένειά μου,  
που μου χάρισε το ζην και το ευ ζην...***

**A**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## A1. ΟΣΤΑ – ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα οστά είναι όργανα του ερειστικού ιστού. Είναι άκαμπτα όργανα του σώματος, που αποτελούν τμήμα του ενδοσκελετού των σπονδυλοζώων. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η σκληρότητα και η αντοχή. Αποτελούνται από ένα σκληρό υλικό αλάτων ασβεστίου που εναποτίθεται γύρω από ίνες πρωτεΐνης. Τα άλατα καθιστούν το οστό άκαμπτο και οι πρωτεΐνες (κυρίως το κολλαγόνο) παρέχουν ισχύ και ελαστικότητα. Συνδέονται μεταξύ τους με τις αρθρώσεις και σχηματίζουν το σκελετό (παθητικό κινητικό σύστημα) στον οποίο οφείλεται και το σχήμα του σώματος. Το κύριο συστατικό του σκελετού του ενήλικα, ο *οστίτης ιστός*, υποστηρίζει σωματικές δομές, προστατεύει ζωτικά όργανα όπως εκείνα της κρανιακής και θωρακικής κοιλότητας και χρησιμεύει ως αποθήκη ασβεστίου, φωσφόρου και άλλων ιόντων, τα οποία είναι δυνατόν να απελευθερώνονται ή να εναποτίθενται με ελεγχόμενο τρόπο ώστε να διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση



Εικόνα A1.1 Ανθρώπινος σκελετός

των σημαντικών αυτών ιόντων στα υγρά του σώματος. Επιπλέον, τα οστά διαμορφώνουν ένα σύστημα μοχλών το οποίο πολλαπλασιάζει τις δυνάμεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής και τις μετατρέπει σε σωματικές κινήσεις. Αυτός ο ασβεστοποιημένος ιστός προσδίδει μηχανικές και μεταβολικές λειτουργίες στο σκελετό (Εικόνα Α1.1).

Ανάλογα με την μορφολογία τους τα οστά διακρίνονται σε μακρά ή επιμήκη, σε βραχέα και σε πλατεά (Εικόνα Α1.2). Τα επιμήκη αποτελούνται από το σώμα ή διάφυση και δύο πιο ογκώδη άκρα, τις επιφύσεις, με τις αρθρικές επιφάνειες των οποίων συνδέονται τα γειτονικά οστά. Τα βραχέα οστά έχουν σχήμα κυβικό, είναι μικρά και συνήθως έχουν πολλές αρθρικές επιφάνειες. Τα επίπεδα ή πλατιά οστά συμμετέχουν στον σχηματισμό κοιλοτήτων του σώματος, έχουν μια εξωτερική κυρτή επιφάνεια και μια εσωτερική κοίλη [1,2,3].



Εικόνα Α1.2 Διάκριση οστών

Επίσης τα οστά χαρακτηρίζονται ως *αξονικά* (axial) και *περιφερικά* (appendicular). Τα αξονικά οστά είναι προστατευτικά. Για παράδειγμα, στα σπονδυλόζωα δρουν προστατευτικά για το νωτιαίο μυελό. Τα περιφερικά οστά είναι τα οστά των άκρων. Τα οστά έχουν μία ποικιλία σχημάτων και περίπλοκη εσωτερική και εξωτερική δομή, είναι ελαφρά σε βάρος και χαρακτηρίζονται από πολλαπλές λειτουργίες [1,2].

Κατά τη γέννηση, υπάρχουν περισσότερα από 270 οστά, τα οποία σταδιακά κατά την ανάπτυξη συντήκονται, με αποτέλεσμα στο σώμα ενός ενηλίκου ατόμου να υπάρχουν 206 ξεχωριστά οστά. Το μεγαλύτερο οστό του ανθρώπινου σκελετού είναι το μηριαίο, ενώ τα μικρότερα είναι τα τρία ακουστικά οστάρια [2].

Τα οστά είναι ένας εξειδικευμένος ιστός που αποτελείται από μεσοκυττάριο ασβεστοποιημένο υλικό, τη θεμέλια ουσία του οστού, και τέσσερις κύριους τύπους κυττάρων: 1) τις οστεοβλάστες, 2) τα οστεοκύτταρα, 3) τις οστεοκλάστες και 4) τα επενδυτικά κύτταρα [3].

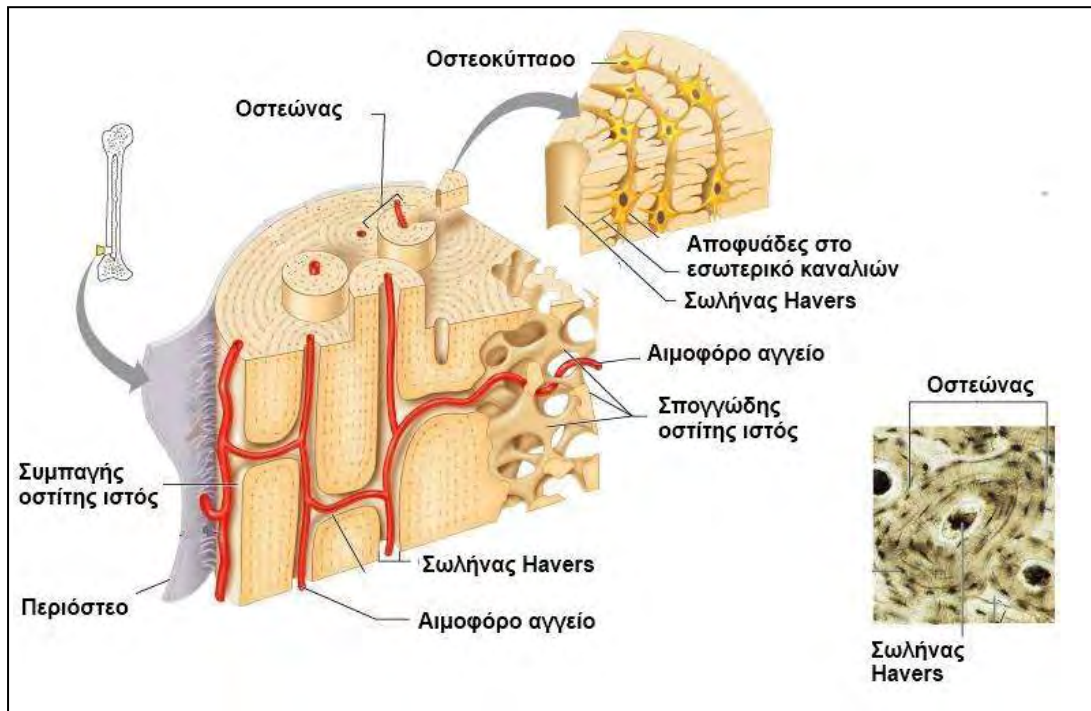
Οι οστεοβλάστες συνθέτουν τα οργανικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας, και μερικοί από αυτούς μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες (βοθρία) της θεμέλιας ουσίας και συμβάλλουν στην συντήρηση της οστέινης ουσίας. Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα που συμμετέχουν στην απορρόφηση και την ανακατασκευή των οστών. Τα επενδυτικά κύτταρα καλύπτουν την επιφάνεια του οστού και είναι απόγονοι των οστεοβλαστών. Επειδή δεν είναι δυνατή η διάχυση ουσιών διαμέσου της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας του οστού, οι ανταλλαγές θρεπτικών υλικών και μεταβολικών προϊόντων μεταξύ των οστεοκυττάρων και των αιμοφόρων τριχοειδών βασίζονται στην επικοινωνία μέσω των οστικών σωληναρίων, τα οποία είναι λεπτοί κυλινδρικοί σχηματισμοί που διατρύπουν τη θεμέλια ουσία και φιλοξενούν τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστικών κυττάρων. Τα οστά επενδύονται στην εσωτερική και στην εξωτερική τους επιφάνεια από στοιβάδες ιστού που περιέχουν οστεοπαραγωγά κύτταρα, το ενδόστεο και το *περιόστεο* [2,3].

### **A1.1 Οστίτης ιστός**

Ο *οστίτης ιστός* διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Ο πρωτογενής οστίτης ιστός είναι συνήθως προσωρινός, και στους ενήλικες αντικαθίσταται από δευτερογενή οστίτη ιστό. Ο δευτερογενής οστίτης ιστός εμφανίζει κολλαγόνες ίνες διατεταγμένες σε πετάλια (πάχους 3-7  $\mu\text{m}$ ) που είναι παράλληλα μεταξύ τους ή είναι οργανωμένα συγκεντρικά γύρω από αγγειακούς σωλήνες. Το συνολικό σύμπλεγμα των συγκεντρικών πεταλίων του οστού γύρω από ένα σωλήνα που περιέχει αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και χαλαρό συνδετικό ιστό, ονομάζεται σύστημα του Havers ή οστεώνας. Βοθρία που περιέχουν οστεοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ, και μερικές φορές μέσα, στα πετάλια. Μέσα σε κάθε πετάλιο, οι κολλαγόνες ίνες είναι παράλληλες μεταξύ τους. Γύρω από κάθε σύστημα του Havers υπάρχει εναπόθεση άμορφου υλικού που ονομάζεται οστέινη ουσία, η οποία αποτελείται από ασβεστοποιημένη θεμέλια ουσία με λίγες κολλαγόνες ίνες. Στα συμπαγή οστά (π.χ. στις διαφύσεις των μακρών οστών), τα πετάλια παρουσιάζουν την τυπική οργάνωση που χαρακτηρίζεται από τα συστήματα του Havers, τα εξωτερικά περιφερικά πετάλια που εντοπίζονται αμέσως κάτω από το *περιόστεο*, τα

εσωτερικά περιφερικά πετάλια που εντοπίζονται γύρω από την κοιλότητα του μυελού των οστών, και τα ενδιάμεσα πετάλια (Εικόνα A1.3).

Μεταξύ των δύο περιφερικών συστημάτων υπάρχουν πολυάριθμα συστήματα του Havers που περιλαμβάνουν ομάδες παράλληλων πεταλιών και μεταξύ αυτών βρίσκονται τα διάμεσα ή ενδιάμεσα πετάλια, τα οποία είναι δομές που έχουν παραμείνει από συστήματα του Havers που έχουν καταστραφεί κατά την ανάπτυξη και την ανακατασκευή του οστού. Κάθε σύστημα του Havers είναι ένας επιμήκης, συχνά δισχιδής κύλινδρος παράλληλος με τον επιμήκη άξονα της διάφυσης. Αποτελείται από ένα κεντρικό σωλήνα που περιβάλλεται από 4-20 συγκεντρικά πετάλια. Κάθε σωλήνας επενδύεται από ενδόστεο και περιέχει αγγεία, νεύρα και χαλαρό συνδετικό ιστό, επικοινωνεί με την κοιλότητα του μυελού των οστών, το περίοστεο και μεταξύ τους μέσω εγκάρσιων ή λοξών σωλήνων, των σωλήνων του Volkmann. Οι σωλήνες του Volkmann δεν έχουν συγκεντρικά πετάλια, άλλα οι αγγειακοί σωλήνες τους έχουν λοξή ή κάθετη κατεύθυνση ως προς τον επιμήκη άξονα του οστού. Όλοι οι αγγειακοί σωλήνες που βρίσκονται στον οστίτη ιστό δημιουργούνται όταν η θεμέλια ουσία εναποτίθεται γύρω από προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία. Επειδή ο οστίτης ιστός είναι υπό συνεχή ανακατασκευή, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στη διάμετρο των σωλήνων του Havers. Κάθε σύστημα σχηματίζεται από διαδοχικές εναποθέσεις πεταλιών, αρχίζοντας προς τα έσω από την περιφέρεια, με τρόπο ώστε νεαρά συστήματα να έχουν ευρύτερους σωλήνες. Στα ώριμα συστήματα του Havers το πιο πρόσφατα σχηματισμένο πετάλιο είναι εκείνο που είναι πλησιέστερο προς τον κεντρικό σωλήνα [3,4].



Εικόνα A1.3 Τυπική δομή οστού (Junqueira L. Basic Histology: Text & Atlas 2005, 11<sup>th</sup> edition, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης)

## A1.2 Κύτταρα οστού

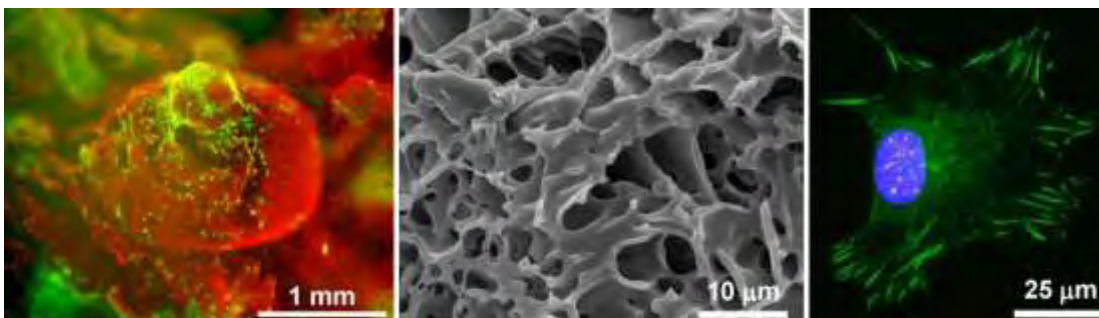
### A1.2.1. Οστεοβλάστες

Τα οστεοπαραγωγά κύτταρα είναι οι οστεοβλάστες (Εικόνα A1.4) και τα οστεοκύτταρα. Αν και έχουν την ίδια καταγωγή, διαφέρουν τόσο ως προς τη θέση που βρίσκονται όσο και στη λειτουργία. Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση των οργανικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας των οστών (κολλαγόνο τύπου I, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες), είναι ευαίσθητοι στην παραθορμόνη (PTH) ενώ εκκρίνουν οστεοκαλσίνη (ostecalcin) και οστική σιαλοπρωτεΐνη (bone sialoprotein). Επίσης ευθύνονται για την εναπόθεση ανόργανων συστατικών στην οστέινη ουσία με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση, την οποία περιέχουν σε αφθονία στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης. Η εναπόθεση των ανόργανων συστατικών των οστών εξαρτάται επίσης από την παρουσία ζωντανών οστεοβλαστών. Οι οστεοβλάστες εντοπίζονται αποκλειστικά στις επιφάνειες του οστίτη ιστού, η μια δίπλα στην άλλη, με τρόπο που θυμίζει μονόστιβο επιθήλιο. Κατά τη σύνθεση της

θεμέλιας ουσίας, οι οστεοβλάστες έχουν κυβοειδές προς κυλινδρικό σχήμα, βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, επιθηλιακή διάταξη επάνω στις ελεύθερες επιφάνειες του οστίτη ιστού και ενώνονται μεταξύ τους με λεπτές και κοντές κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Όταν υποχωρεί η οστεοβλαστική τους δραστηριότητα, οι οστεοβλάστες επιπεδώνονται και το κυτταρόπλασμά τους γίνεται λιγότερο βασεόφιλο [3,5-7].

Μικροσκοπικά, οι οστεοβλάστες, εμφανίζουν πυρήνα, εκτεταμένο κοκκώδες ενδοπλασματικό δίκτυο και αναπτυγμένη συσκευή Golgi. Εμφανίζουν πολικότητα και έτσι ο πυρήνας βρίσκεται στον ένα πόλο του κυττάρου ενώ το προϊόν έκκρισης αποβάλλεται από τον άλλο πόλο. Το προϊόν αυτό είναι το προστάδιο της θεμέλιας ουσίας του οστίτη οστού, περιβάλλει αμέσως τους οστεοβλάστες, δεν είναι ακόμη αποτιτανωμένο και ονομάζεται οστεοειδές (osteoid) [3,5-7].

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από διαφοροποιημένα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οστεοπρογονικά κύτταρα (osteoprogenitor cells), που βρίσκονται στην εσωτερική στοιβάδα του περιοστέου καθώς και στο ενδόστεο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση αυτή είναι πολλοί και περιλαμβάνουν τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins – BMPs), κυτταροκίνες (cytokines), ιντερλευκίνες (interleukins) και πλήθος άλλων αυξητικών παραγόντων (growth factors) [3,5-7].

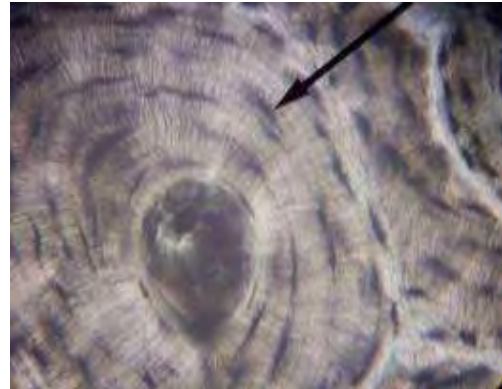


*Εικόνα A1.4. Αριστερά: τυπική εικόνα οστεοβλαστικού κυττάρου. Μέσο: οστεοβλάστες προσκολλημένες σε πολύ λακτο-συν-γλυκολικό οξύ στην επιφάνεια ενός πολυμερούς συνθετικού ικριώματος (έγχρωμη απεικόνιση: οστεοβλάστες με πράσινο χρώμα, πολυμερές με κόκκινο). Δεξιά: Οστεοβλάστες που καλλιεργούνται σε πολυ-D, L-γαλακτικό οξύ με Focal χρωστική πρόσφυσης (Πυρήνας=μπλέ)  
[Simon C., Material Measurement Laboratory, National Institute of Standards and Technology, USA]*



### A1.2.2 Οστεοκύτταρα

Μερικές οστεοβλάστες μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα (Εικόνα A1.5), όταν περιβληθούν πλήρως από αποτιτανωμένη οστέινη ουσία που οι ίδιες παράγουν, τα οποία περιβάλλονται από μια κοιλότητα (βοθρίο) που βρίσκεται μέσα στη θεμέλια ουσία. Μόνο ένα οστεοκύτταρο βρίσκεται μέσα σε κάθε κοιλότητα. Τα λεπτά κυλινδρικά σωληνάκια της θεμέλιας ουσίας φιλοξενούν τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων. Οι



*Εικόνα A1.5 Οστεοκύτταρο, ακτινοειδές κύτταρο μεσεγχυματικής προέλευσης, κυρίως από οστεοβλάστες.*

αποφυάδες γειτονικών κυττάρων έρχονται σε επαφή μέσω χασματοσυνδέσεων, διαμέσου των οποίων είναι δυνατή η ροή μορίων από κύτταρο σε κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η επικοινωνία μεταξύ των οστεοκυττάρων και η αντίδρασή τους σε ορμονικά ερεθίσματα που διαβιβάζονται μόνο στα οστεοκύτταρα που γειτνιάζουν άμεσα με τα αιμοφόρα αγγεία. Συγκρινόμενα με τους οστεοβλάστες, τα επιπεδωμένα, αμυγδαλοειδούς σχήματος οστεοκύτταρα έχουν σημαντικά ελαττωμένη ποσότητα αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και μικρότερη συσκευή Golgi, έχουν όμως πυκνότερη πυρηνική χρωματίνη [3,6,7].

Το σύμπλεγμα των οστεοκυττάρων-οστεοβλαστών της περιφέρειας των σωλήνων του Havers και συνδετικών κυττάρων, έχει ονομαστεί βασικό οστικό κυτταρικό σύστημα (Bone Basic Cellular System) και μέσω αυτού πυροδοτούνται διαδικασίες απορρόφησης και σχηματισμού του οστού υπό τον έλεγχο μηχανικών και ορμονικών ερεθισμάτων. Τα οστεοκύτταρα φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο συνολικό μεταβολισμό του οστίτη ιστού, στην συντήρηση της οστέινης ουσίας αλλά και στην κινητοποίηση του ασβεστίου και την άμεση ανταλλαγή του μεταξύ οστίτη ιστού και αίματος [3,8].

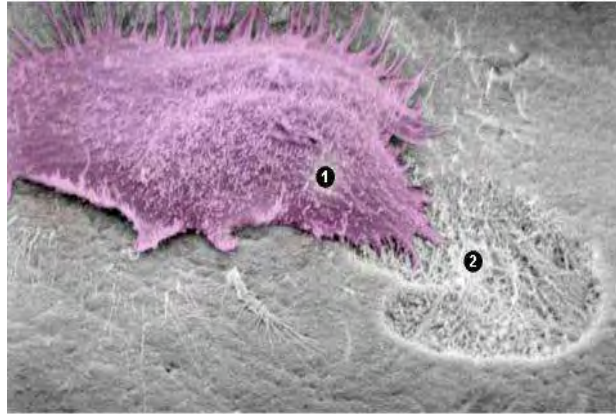
### **A1.2.3 Επενδυτικά κύτταρα**

Η επιφάνεια των οστών που δεν βρίσκονται σε ενεργή αναδόμηση καλύπτεται από ένα παχύ στρώμα μη επιμεταλλωμένης μήτρας κολλαγόνου, επάνω στην οποία υπάρχει ένα στρώμα επίπεδων κι επιμηκυμένων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται επενδυτικά κύτταρα (lining cells) και είναι απόγονοι των οστεοβλαστών. Η μετατροπή των οστεοβλαστών σε επενδυτικά κύτταρα είναι η εναλλακτική τους «μοίρα» (σε σχέση με τη μετατροπή τους σε οστεοκύτταρα), εφόσον έχουν ολοκληρώσει την οστεοσυνθετική τους λειτουργία. Οι οστεοκλάστες δεν μπορούν να προσδεθούν σε αυτό το στρώμα του κολλαγόνου που καλύπτει το φυσιολογικό οστό. Οπότε, κάποια κύτταρα, πιθανόν τα επενδυτικά, εκκρίνουν κολλαγενάση η οποία αποβάλλει το κολλαγόνο και οι οστεοκλάστες έρχονται σε επαφή με το οστό. Έχει προταθεί ότι η στόχευση μίας συγκεκριμένης θέσης του οστού από προδρόμους των οστεοκλαστών εξαρτάται από «αυτοκατευθυνόμενο» σήμα των επενδυτικών κυττάρων. Επίσης, το σήμα αυτό έχει την αφετηρία του στα οστεοκύτταρα, τα μοναδικά οστικά κύτταρα που αισθάνονται την ανάγκη της αναδόμησης σε συγκεκριμένο τόπο και χρόνο [9].

### **A1.2.4 Οστεοκλάστες**

Οι οστεοκλάστες (Εικόνα A1.6) είναι πολύ μεγάλα, πολυπύρηννα, διακλαδιζόμενα και κινητά κύτταρα, τα οποία περιέχουν από 5 έως 50 πυρήνες, και τα οποία προέρχονται από την ένωση κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών (της κυτταρικής σειράς μονοκυττάρων-μακροφάγων). Οι οστεοκλάστες εντοπίζονται σε περιοχές του οστού που υπόκεινται σε απορρόφηση, μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα της θεμέλιας ουσίας που δημιουργούνται με τη διαβρωτική δράση ενζύμων, και είναι γνωστά ως βοθρία του Howship. Στις ενεργές οστεοκλάστες, η κυτταρική επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με τη θεμέλια ουσία του οστού είναι αναδιπλωμένη σε ανώμαλες, συχνά υποδιαιρούμενες προσεκβολές, που σχηματίζουν μια πτυχωτή παρυφή. Γύρω από την πτυχωτή παρυφή υπάρχει μια κυτταροπλασματική ζώνη – η διαυγής ζώνη – η οποία

στερείται οργανιδίων, είναι όμως πλούσια σε νημάτια ακτίνης. Αυτή η ζώνη είναι η θέση προσκόλλησης της οστεοκλάστης στη θεμέλια ουσία του οστού, και δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η διάβρωση και απορρόφηση της οστέινης ουσίας. Οι οστεοκλάστες εκκρίνουν κολλαγενάση και άλλα ένζυμα και αντλούν πρωτόνια μέσα σε ένα υποκυτταρικό θύλακο. Με τον τρόπο αυτό



*Εικόνα A1.6 Ηλεκτρονιομικρογραφία όπου απεικονίζεται (1) οστεοκλάστη επί το έργο. (2) Επιφάνεια οστού που αποδομείται από την οστεκλάστη.(Arnett T. The Bone Research Society, [www.brsoc.org.uk](http://www.brsoc.org.uk))*

προωθεί την εντοπισμένη πέψη του κολλαγόνου και την διάλυση των κρυσταλλικών αλάτων ασβεστίου. Η δραστηριότητα των οστεοκλαστών ελέγχεται από κυτταροκίνες (μικρές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που δρουν ως τοπικοί μεταβιβαστές) και ορμόνες. Οι οστεοκλάστες διαθέτουν υποδοχείς για καλσιτονίνη, μία ορμόνη του θυρεοειδούς, όχι όμως για την παραθορμόνη. Όταν διεγείρονται από την ορμόνη αυτή παράγουν μια κυτταροκίνη που ονομάζεται παράγοντας διέγερσης των οστεοκλαστών [3,10].

### 1.2.5 Θεμέλια ουσία

Η *θεμέλια ουσία* του οστού αποτελείται σε ποσοστό περίπου 50% από ανόργανες ύλες, όπως ασβέστιο, φωσφόρο, διττανθρακικά και κιτρικά ιόντα, μαγνήσιο, κάλιο και νάτριο. Το ασβέστιο και ο φωσφόρος σχηματίζουν κρυστάλλους υδροξυαπατίτη  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  αλλά βρίσκονται και με τη μορφή του άμορφου (μη κρυσταλλικού) φωσφορικού ασβεστίου [3]. Επιπλέον, οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη περιέχουν προσμίξεις και αντικαταστάσεις από ανθρακικά άλατα, υδροξείδιο, νάτριο, φθόριο, στρόντιο κ.ά. που αντανακλούν το διαιτητικό ιστορικό, την κατάσταση υγείας, τη θέση του ιστού και την ηλικία. Αρχικά, η θεμέλια ουσία είναι το μη επιμεταλλωμένο οστεοειδές που εκκρίνουν οι

οστεοβλάστες. Η επιμετάλλωση (mineralization) ξεκινά με τις ώριμες οστεοβλάστες, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν τις τοπικές συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου, έτσι ώστε να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη. Τέλος, η αλκαλική φωσφατάση που εκκρίνουν συσχετίζεται με τη διαδικασία της επιμετάλλωσης, χωρίς όμως να είναι σαφής ο ακριβής ρόλος της αλλά και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί [3,9].

Η οργανική ύλη της θεμέλιας ουσίας του οστού αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I κατά 90% και θεμέλια ουσία, η οποία περιέχει συσσωματώματα πρωτεογλυκανών και αρκετές ειδικές δομικές γλυκοπρωτεΐνες. Οι οστικές γλυκοπρωτεΐνες είναι δυνατόν να είναι υπεύθυνες για την ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας του οστού [3,4].

Το κολλαγόνο είναι η αφθονότερη ινώδης πρωτεΐνη, υπεύθυνη για την υποστήριξη των συνδετικών ιστών, όπως μυών, τενόντων, δέρματος, οστών και χόνδρου, αλλά και εσωτερικών οργάνων. Όλοι οι τύποι σχηματίζουν μία ή περισσότερες διαμορφώσεις, έτσι ώστε να σχηματιστεί μια τριπλή έλικα. Το μοτίβο της τριπλής έλικας συντίθεται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, των οποίων η αμινοξική αλληλουχία αποτελείται από επαναλήψεις Gly-X-Y. Στο 1/3 των περιπτώσεων, το κατάλοιπο X είναι προλίνη και το Y υδροξυπρολίνη: η παρουσία της υδροξυπρολίνης είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση της τριπλής έλικας και πρόκειται για ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των μορίων κολλαγόνου. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί και περιγραφεί 29 τύποι κολλαγόνου, με τον Τύπο I να επικρατεί στο ενήλικο οστό. Η *in vivo* σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I πραγματοποιείται από τις οστεοβλάστες ή ινοβλάστες και μπορεί να τροποποιηθεί άμεσα ή έμμεσα από διάφορα μόρια όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες και βιταμίνες. Μόρια όπως οι αυξητικοί παράγοντες TGF-β (Transforming growth factor), IGF-I (Insuline-like Growth Factor) και IGF-II προκαλούν αύξηση στη σύνθεση του κολλαγόνου. Μείωση στο ρυθμό σύνθεσης κολλαγόνου προκαλούν μόρια, όπως το bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) IL-1, IFN-γ (Interferon-γ), τα κορτικοστεροειδή, η PTH και η βιταμίνη D [6,7,11].

Λόγω της υψηλής της περιεκτικότητας σε κολλαγόνο, η αφαλατωμένη θεμέλια ουσία του οστού συνδέεται έντονα με χρώσεις για κολλαγόνες ίνες. Ο

συνδυασμός των ανόργανων ουσιών με τις κολλαγόνες ίνες είναι υπεύθυνος για τη σκληρότητα και την αντίσταση του οστίτη ιστού. Μετά την αφαλάτωσή του, το οστό διατηρεί το σχήμα του, γίνεται όμως εύκαμπτο, όπως ο χόνδρος. Η αφαίρεση του οργανικού μέρους της θεμέλιας ουσίας – που είναι κυρίως κολλαγόνο – αφήνει επίσης το οστό με το αρχικό του σχήμα, καθιστώντας το όμως εύθραυστο και εύκολα θρυμματιζόμενο [11].

### **A1.3 Συνδετικός ιστός**

Ο συνδετικός ιστός (connective tissue) αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικής οργάνωσης που απαντάται σε όλα τα όργανα. Παρέχει τη μηχανική υποδομή και παίζει κεντρικό ρόλο στη μεταβολική επικοινωνία των οργάνων με το κυκλοφορικό σύστημα, συμμετέχοντας στην ανοσολογική άμυνα, στην κυκλοφορία των αερίων με τα ερυθροκύτταρα και στην αποθήκευση ενέργειας στο λιπώδη ιστό [12]. Ο συνδετικός ιστός αποτελείται από κύτταρα, πρωτεϊνικές ίνες (κυρίως κολλαγόνου) και θεμέλια ουσία [3].

Τα κύτταρα του συνδετικού ιστού προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal), τα οποία δίνουν γένεση στα πολυδύναμα (pluripotent) μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchyme stem cells-MSC) που μπορούν να διαφοροποιηθούν στα κύτταρα του οστίτη ιστού αλλά και στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Haemopoietic Stem Cells - HSC) (13,14,15). Τα MSC είναι προσκολλημένα, πολυδύναμα βλαστοκύτταρα που μπορούν να απομονωθούν από διάφορους συνδετικούς ιστούς όπως ο μυελός των οστών (BM - Bone Marrow), οι εμβρυϊκές μεμβράνες (FM - Fetal Membranes), ο λιπώδης ιστός (AT - Adipose Tissue), και ο «οδοντικός πολφός» (DP - Dental Pulp) (Εικόνα 11) [16]. Από αυτά προκύπτει ο κοινός πρόγονος των περισσότερων κυττάρων του οστίτη ιστού μεταξύ των οποίων είναι και το οστεοπρογονικό κύτταρο από το οποίο προέρχονται οι οστεοβλάστες. Από τη σειρά των HSC κυττάρων προκύπτουν τα πρόδρομα κύτταρα που δημιουργούνται από τη σύντηξη 14 μονοκυττάρων και δίνουν τις οστεοκλάστες (3, 13). Ο σχηματισμός των μονοκυττάρων προάγεται από τον παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων (Macrophage Colony Stimulating Factor M-CSF), ενώ για την τελική διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών είναι

απαραίτητη η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα c-fos που επάγεται από την κυτταροκίνη RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor KB Ligand) που όπως και ο M-CSF παράγονται από τους οστεοβλάστες [17].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt καθορίζει την πορεία του αρχέγονου μεσεγχυματικού κυττάρου προς οστεοβλάστη ή προς λιποκύτταρο. Οι πρωτεΐνες BMP διεγείρουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Runx2 και Sp7 (ή Osterix) που παίζουν καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό της τύχης των MSC, αναστέλλοντας με την απουσία τους το σχηματισμό των ινοβλαστών [18,19]. Επιπλέον η BMP4 επάγει την έκφραση της ομοιοτικής (homeotic) πρωτεΐνης DLX5 (Distal Less Homeobox 5) που φαίνεται να είναι ιστοειδικός μεταγραφικός παράγοντας των οστών αφού ελέγχει την έκφραση των οστεοβλαστικών γονιδίων της οστεοκαλσίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης. Υπάρχουν πολλοί ακόμη μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην περαιτέρω διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών, όπως είναι οι παράγοντες IGF, TGF και PDGF [9].

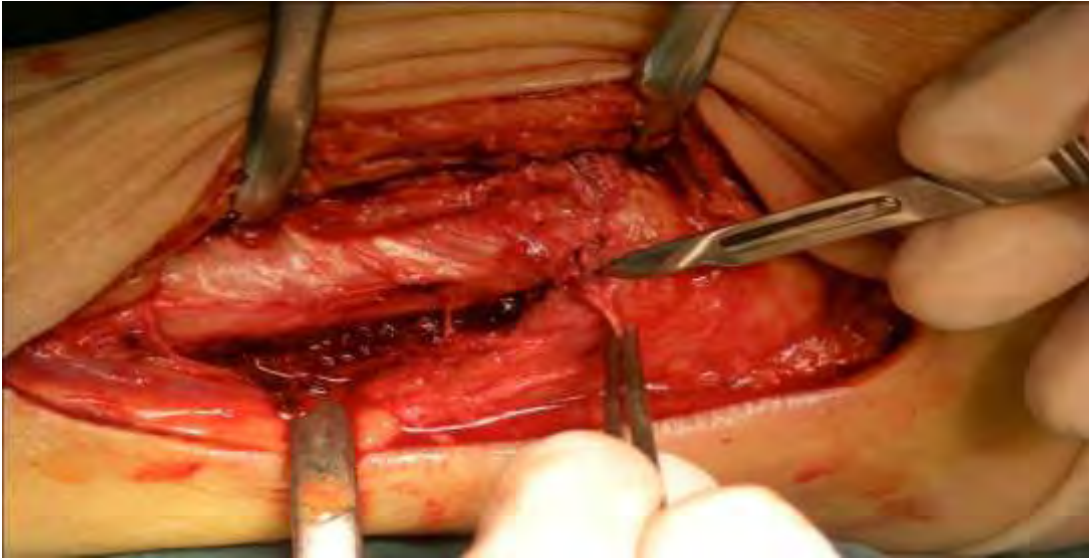
## **A1.4 Το περίστεο**

### **A1.4.1 Ιστολογία του περιostίου**

Οι εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες των οστών καλύπτονται από στοιβάδες κυττάρων που παράγουν οστό και συνδετικό ιστό και ονομάζονται περίστεο και ενδόστεο αντίστοιχα [3].

Το περίστεο (Εικόνα A1.7), από ιστολογικής πλευράς αποτελείται από δύο ευδιάκριτα στρώματα, την εξωτερική και την εσωτερική στοιβάδα, ενώ αναγνωρίζονται και πέντε διαφορετικές και ευδιάκριτες λειτουργικά περιοχές όταν διαχωρίζεται ενζυματικά και καλλιεργείται. Η εξωτερική στοιβάδα αποτελείται από κολλαγόνες ίνες και ινοβλάστες. Δεσμίδες κολλαγόνων ινών του περιostίου, ονομαζόμενες ίνες του Sharpey, διαπερνούν τη θεμέλια ουσία του οστού και προσδένουν το περίστεο στο οστό. Η εσωτερική στοιβάδα του περιostίου αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και ονομάζονται οστεοπρογονικά κύτταρα. Αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται με μίτωση και

να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και στην επιδιόρθωση των οστών. Το ενδόστεο επενδύει όλες τις εσωτερικές κοιλότητες μέσα στα οστά και αποτελείται από μια μόνο στιβάδα πεπλατυσμένων οστεοπρογονικών κυττάρων και μια πολύ μικρότερη ποσότητα συνδετικού ιστού. Το ενδόστεο είναι σημαντικά λεπτότερο από το



*Εικόνα Α1.7 Ανασηκωμένο περίοστεο κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης στην Ορθοπαιδική Κλινική του Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας.*

περίοστεο [3,4,20]. Αυτοραδιογραφικές μελέτες δείχνουν ότι τα οστεοπρογονικά αυτά κύτταρα προσλαμβάνουν  $^3\text{H}$ -θυμιδίνη, η οποία στη συνέχεια βρίσκεται μέσα στους οστεοβλάστες. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και επιδιόρθωση των οστών [3].

Οι κυριότερες λειτουργίες του περιostίου και του ενδοostίου είναι η διατροφή του οστίτη ιστού και η εξασφάλιση συνεχούς παροχής νέων οστεοβλαστών για την επιδιόρθωση ή αύξηση του οστού [4]. Επίσης λειτουργεί ως υποστηρικτικός ιστός για τα αιμοφόρα αγγεία και για την πρόσφυση τενόντων και συνδέσμων [3,20].

Επειδή υπάρχουν σύνδεσμοι, τένοντες μυών αλλά και χόνδρινος ιστός με τους οποίους έρχονται σε επαφή ορισμένες περιοχές της περιοστικής επιφάνειας, τα διαφορετικά φυσικά περιβάλλοντα στα οποία εκτίθενται τα περιοστικά κύτταρα βρίσκονται σε αντίθεση με εκείνα τα κύτταρα του ενδόστεου (τα οποία έχουν μελετηθεί σε μεγάλο εύρος), τα οποία είναι κυριολεκτικά βυθισμένα μέσα στον

αιμοποιητικό μυελό των οστών. Σε σύγκριση με τους οστεοβλάστες του ενδόστεου, οι οστεοβλάστες του περιόστεου παρουσιάζουν μεγαλύτερη μηχανική ευαισθησία, κατάλληλη απόκριση σε παράγοντες που επηρεάζουν την οστεογενετική διαδικασία όπως η παραθυρεοειδής ορμόνη, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών όπως η περιοστίνη και περισσότερους υποδοχείς άλφα των οιστρογόνων. Αυτές οι διαφορές στο όριο ευαισθησίας των φυσικών, ορμονικών και μηχανικών ερεθισμάτων αποτελούν τη βάση για τις διαφορές στην περιοστική και ενδοστική επιφάνεια σε σχέση με τον ρόλο τους στην αναδόμηση, την επουλωτική διαδικασία του οστού ύστερα από κάποιο τραύμα/κάταγμα όπως επίσης και στην απόκριση σε στοχευόμενη θεραπεία σε μοριακό επίπεδο [20,21].

Το περίοστεο έχει επίσης ένα πυκνό αγγειακό δίκτυο που εφάπτεται της εξωτερικής ινώδους στοιβάδας του. Οι αναστομώσεις του δικτύου αυτού συνδέονται με τα μικροαγγειακά πλέγματα των μυών και με τα πλέγματα των βαθύτερων στοιβάδων του περιοστέου. Στα παιδιά τα μικροαγγειακά συστήματα των εν τω βάθει στοιβάδων του περιοστέου είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένα, διατιτράινουν τον φλοιό και συνδέονται με το αγγειακό σύστημα του μυελού των οστών. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το περίοστεο έχει υποδοχείς ιδιοδεκτικής αισθητικότητας οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την τοπική ρύθμιση της μικροκυκλοφορίας. Σε μεγαλύτερη ηλικία, τα αγγεία του περιοστέου ελαττώνονται σε αριθμό και η συμβολή τους στην αιμάτωση του φλοιού περιορίζεται. Λαμβάνοντας υπ' όψιν κλινικά ευρήματα και παρατηρήσεις που αφορούν την σύνδεση του αγγειακού συστήματος του περιοστέου με τα μικροαγγειακά συστήματα των μυών, έχει διαπιστωθεί ότι, εάν μετά από κάκωση ένας μυς στερηθεί την παροχή αίματος από την τροφοφόρο αρτηρία του μπορεί να επιζήσει μόνο εάν διατηρούνται ακέραιες οι αναστομώσεις με το δίκτυο του περιοστέου. Εάν ο μυς έχει υποστεί βλάβη της τροφοφόρου αρτηρίας και ταυτόχρονα έχει αποκολληθεί σε μεγάλη έκταση από το περίοστεο, τότε η ανάπτυξη ολική ή μερικής ισχαιμίας είναι βέβαια. Εάν μετά από μια κάκωση ή από μια υποπεριοστική χειρουργική παρασκευή το περίοστεο αποκολληθεί από την επιφάνεια του φλοιού, συνεχίζει να παραμένει λειτουργικά δραστήριο, μόνο όταν δεν έχει διαταραχθεί η αγγειακή του σύνδεση με τους μύες. Η αποκόλληση του περιοστέου από την

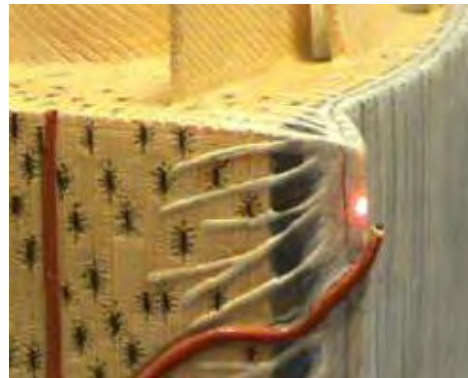


επιφάνεια του φλοιού μπορεί να προκαλέσει περιορισμένη τοπική νέκρωση του φλοιού λόγω διαταραχής της φλεβικής απαγωγής του αίματος του φλοιού [21-23].

Τα νεύρα των οστών σχηματίζουν στο περίοστεο πυκνά πλέγματα, κλάδοι των οποίων συνοδεύουν τα τροφοφόρα αγγεία προς το εσωτερικό του οστού έως και το εσωτερικό των σωλήνων του Havers. Είναι κυρίως νεύρα του συμπαθητικού και της «εν τω βάθει» αισθητικότητας. Αισθητικές ίνες πόνου είναι αμφίβολο αν υπάρχουν στα οστά, ενώ είναι βέβαιη η ύπαρξη τους στο περίοστεο. Επίσης η παρουσία λεμφικών αγγείων στα οστά αμφισβητείται ή τουλάχιστον περιορίζεται στο περίοστεο [1,7,21].

#### **A1.4.2 Εξωτερική στοιβάδα του περιostίου**

Η εξωτερική (ινώδης) στοιβάδα (Εικόνα A1.8) αποτελείται από ινοβλάστες, κολλαγόνο και ίνες ελαστικής μαζί με ένα διακριτό δίκτυο από νευρώνες και αιμοφόρα αγγεία (τριχοειδή). Μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο μέρη. Το επιφανειακό τμήμα, είναι ανελαστικό και πλούσιο σε κολλαγόνο. Οι ίνες κολλαγόνου του επιφανειακού τμήματος είναι μικρές και συμπαγείς δεσμίδες με διεσπαρμένους



*Εικόνα A1.8 Διάκριση των δύο στοιβάδων του περιostίου..*

επιμήκεις ινοβλάστες. Είναι το πιο πλούσιο αγγειούμενο υπόστρωμα του περιostίου και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παροχή αίματος των οστών, ακόμα και των σκελετικών μυών. Η εξωτερική ινώδης στοιβάδα περιλαμβάνει επίσης ένα πλούσιο νευρικό δίκτυο. Μερικές από αυτές τις νευρικές ίνες συμπορεύονται με τα αιμοφόρα αγγεία μέσα από το φλοιό των οστών και η πλειοψηφία τερματίζει στο βαθύτερο υπόστρωμα της εξωτερικής ινώδους στοιβάδας. Το βαθύ μέρος της εξωτερικής στοιβάδας έχει χαρακτηριστεί ως το ινοελαστικό στρώμα δεδομένου ότι περιέχει πολλές ελαστικές ίνες και έτσι έχει σημαντική ελαστικότητα. Επίσης είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε κολλαγόνο, ενώ χαρακτηριστική είναι η μικρή παρουσία οστεοπρογονικών κυττάρων και αιμοφόρων αγγείων [3,24,25].

### **A1.4.3 Εσωτερική στοιβάδα (κάμβιο) του περιostίου**

Η εσωτερική, κυτταροβριθέστερη, στοιβάδα του περιostίου (cambium) είναι σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του οστού και είναι πλούσια σε κύτταρα. Περιέχει ώριμα προγονικά μεσεγγυματικά κύτταρα, διαφοροποιημένα οστεοπρογονικά κύτταρα, οστεοβλάστες, ινοβλάστες όπως επίσης ποσότητα μικροαγγείων και νευρώνων σε ένα αραιό δίκτυο κολλαγόνου. Οι οστεοβλάστες βρίσκονται σε επαφή με την επιφάνεια του φλοιού. Μια μικρή συμπαγής μάζα κυττάρων που μοιάζουν με ινοβλάστες είναι παρούσα μαζί με τα οστεοβλαστικά κύτταρα συνοδευόμενη από ένα πλούσιο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων και νευρώνων. Λόγω των αιμοφόρων αγγείων πολλά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι παρόντα. Έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα κύτταρα έχουν οστεοβλαστική δυνατότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητική πηγή των υπόλοιπων οστεοπρογονικών κυττάρων. Ειδικά οι νευρώνες του συμπαθητικού συστήματος βρίσκονται στη στοιβάδα αυτή σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με αυτούς το ενδόστεο. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται με μίτωση και να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Επίσης, λόγω της υψηλής αγγείωσης, το περιόστεο περιέχει μία πληθώρα από ενδοθηλιακά περικύτταρα. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε φυσική επαφή με τα τριχοειδή κύτταρα του ενδοθηλίου, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε πάρα πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των οστεοβλαστών, πάντα υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Αυτά τα κύτταρα θεωρητικά μπορούν να συνεισφέρουν ως βοηθητική πηγή οστεοπρογονικών κυττάρων και μπορεί να είναι πολύ σημαντικά στην οστεοποιητική διαδικασία μέσω του περιostίου, ενώ συνεχίζονται έρευνες κυρίως μέσω της καλλιέργειας αυτών στο εργαστήριο για τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζουν, κυρίως για θεραπευτική χρήση [25-28].

Το κάμβιο είναι παχύτερο στο έμβρυο και διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστών, αλλά χάνει μεγάλο μέρος της οστεοβλαστικής ικανότητας κατά την παιδική ηλικία. Σταδιακά γίνεται λεπτότερο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και κατά την ενηλικίωση είναι τόσο λεπτό και δεν μπορεί να διακριθεί από τον υπερκείμενο ινώδη ιστό. Οι οστεοβλάστες της

εσωτερικής στοιβάδας του περιostέου έχουν κυβοειδές προς κυλινδρικό σχήμα στο ανώριμο οστό και γίνονται πιο επιμήκεις και λιγότερες στον αριθμό με την ωρίμανση αυτού. Η μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών μπορεί να συνεισφέρει στην φαινομενική ατροφία και λέπτυνση της εσωτερικής στοιβάδας η οποία επέρχεται με την ηλικία όπως επίσης και η μείωση της οστεοβλαστικής δυνατότητας. Οι ινοβλάστες μέσα σε αυτήν είναι μικρότερες και έχουν παραπλήσια διάμετρο σε σχέση με αυτές που βρίσκονται στην εξωτερική στοιβάδα η οποία περιέχει πιο τυπικά (επιμήκη) ινοβλαστικά χαρακτηριστικά. Όπως συμβαίνει με τις οστεοβλάστες έτσι και ο αριθμός των ινοβλαστών καθώς επίσης και το στρώμα της ινώδους επιφάνειας του περιostέου μειώνονται, αν και η ατροφία της εξωτερικής στοιβάδας είναι μικρότερη από αυτή της εσωτερικής. Η πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων επίσης μειώνεται με την ηλικία αλλά σε αυτή την περίπτωση διατηρείται η ικανότητα να αυξηθεί άμεσα, αφού ενεργοποιηθεί ξανά, λόγω κάποιας μηχανικής φόρτισης ή ενός κατάγματος ώστε να διεγείρει και να αναζωογονήσει τοπικά την περιοχή. Έτσι λοιπόν κατά την ενηλικίωση το περίosteo είναι ένας πολύ λεπτός ιστός που περιβάλλει το οστό [21,22,26,29-31].

#### **A1.4.4 Αναπτυξιακή ανατομία του περιostέου και ο ρόλος του στην οστεοποίηση**

Ανατομικά, το περίosteo καλύπτει την πλειοψηφία των οστικών δομών ενώ απουσιάζει από τις ενδοαρθρικές επιφάνειες, τις προσφύσεις των τενόντων και την επιφάνεια από τα σησαμοειδή οστά. Αυτό γίνεται κατανοητό όταν εξετάζεται η εμβρυολογία καθώς επίσης η διαμόρφωση των μακρών οστών και των αρθρώσεων κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού. Ο σχηματισμός των οστών γίνεται με δύο μεθόδους, την ενδομεμβρανώδη ή την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Σε ορισμένα οστά συμβαίνουν και οι δύο διαδικασίες [21,32].

Και στις δύο διεργασίες, ο πρωτοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός είναι πρωτογενής ή δικτυωτός. Το πρωτογενές οστό είναι προσωρινό και γρήγορα αντικαθίσταται από το οριστικό, πεταλιώδες ή δευτερογενές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οστών, περιοχές του πρωτογενούς οστού, περιοχές απορρόφησης και περιοχές του δευτερογενούς οστού εμφανίζονται η μία δίπλα στην άλλη. Αυτός ο συνδυασμός σύνθεσης και απομάκρυνσης του οστού (ανακατασκευή) συμβαίνει

όχι μόνο στα αναπτυσσόμενα οστά, αλλά και κατά διάρκεια της ζωής του ενήλικα, αν και ο ρυθμός της μεταβολής σε ενήλικες εμφανίζει σημαντική επιβράδυνση [4,31].

#### *A1.4.4.i Ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση και περίοστεο*

Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση με την οποία σχηματίζονται τα περισσότερα από τα πλατέα οστά, έχει αυτό το όνομα επειδή λαμβάνει χώρα μέσα σε συμπυκνώσεις μεσεγχυματικού ιστού. Η διεργασία αυτή συμβάλλει επίσης στην αύξηση των βραχέων οστών και στην πάχυνση των μακρών οστών. Στη στοιβάδα συμπύκνωσης του μεσεγχύματος, το σημείο έναρξης της οστεοποίησης ονομάζεται πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης. Η διεργασία αρχίζει όταν ομάδες κυττάρων διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες που παράγουν τη θεμέλια ουσία του οστού, και ακολουθεί η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου, με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό μερικών οστεοβλαστών, οι οποίοι μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Ο συνδετικός ιστός που παραμένει μεταξύ των οστέινων τοιχωμάτων διαπερνάται από τα αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα δίνουν γένεση σε κύτταρα του μυελού των οστών. Τα κέντρα οστεοποίησης ενός οστού αναπτύσσονται ακτινοειδώς και τελικά ενώνονται μεταξύ τους, αντικαθιστώντας τον αρχικό συνδετικό ιστό. Το τμήμα της στοιβάδας του συνδετικού ιστού που δεν οστεοποιείται δίνει γένεση στο ενδόστεο και το περίοστεο του ενδομεμβρανώδους οστού [3,4,33,34].

#### *A1.4.4.ii Ενδοχόνδρια οστεοποίηση και περίοστεο*

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα τμήμα υαλοειδούς χόνδρου, του οποίου το σχήμα μοιάζει κατά προσέγγιση με το σχήμα του οστού που πρέπει να σχηματισθεί. Αυτός ο τύπος οστεοποίησης είναι κυρίως υπεύθυνος για το σχηματισμό των βραχέων και των μακρών οστών [3,4].

Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση ενός μακρού οστού περιλαμβάνει την εξής αλληλουχία γεγονότων. Αρχικά ο οστίτης ιστός πρωτοεμφανίζεται ως ένας κοίλος οστικός κύλινδρος που περιβάλλει τη μεσαία περιοχή του χόνδρινου

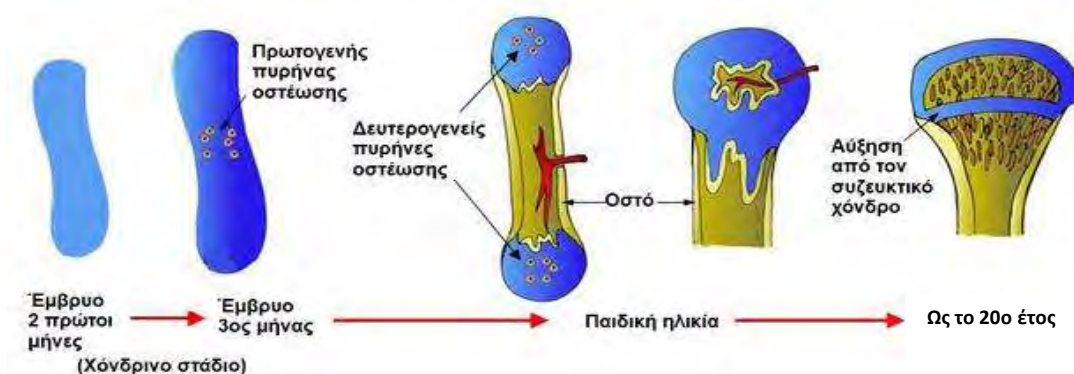
προπλάσματος. Αυτή η δομή, το οστικό περιλαίμιο, παράγεται με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση μέσα στο τοπικό περιχόνδριο. Στο επόμενο βήμα, ο τοπικός χόνδρος υφίσταται μια εκφυλιστική διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με μεγέθυνση των κυττάρων (υπερτροφία) και αποτιάνωση της θεμέλιας ουσίας, γεγονός που οδηγεί σε μια τρισδιάστατη δομή που σχηματίζεται από τα υπολείμματα της ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας του χόνδρου. Αυτή η διεργασία αρχίζει στην κεντρική περιοχή του χόνδρινου προπλάσματος (διάφυση), όπου τα αιμοφόρα αγγεία διαπερνούν το οστικό περιλαίμιο που έχει προηγουμένως πωρωθεί από τις οστεοκλάστες, φέρνοντας οστεοπρογονικά κύτταρα στην περιοχή αυτή. Με την παρουσία των αιμοφόρων αγγείων τα χονδροκύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Σε αυτό το σημείο της ενδοχόνδριας οστεοποίησης εμφανίζεται το *περιόστεο*. Μέσω μιας διαδικασίας όμοιας με αυτή της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης το περιόστεο αρχίζει να παράγει ένα λεπτό στρώμα φλοιού γύρω από το οστό. Ο φλοιός αναπτύσσεται παράλληλα με το οστό εσωκλείοντας το χόνδρινο πρόπλασμα και συνεισφέροντας στην ομαλή οστεοποιητική διαδικασία [3,4,22].

Εν συνεχεία οι οστεοβλάστες προσκολλώνται στην ασβεστοποιημένη θεμέλια ουσία του χόνδρου και παράγουν συνεχείς στοιβάδες πρωτογενούς οστού που περιβάλλουν τα υπολείμματα της χόνδρινης θεμέλιας ουσίας. Στο στάδιο αυτό ο ασβεστοποιημένος χόνδρος εμφανίζεται βασεόφιλος και το πρωτογενές οστό ηωσινόφιλο. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται το πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης. Στα παιδιά, το *περιόστεο* επεκτείνεται κατά μήκος του πρωτογενούς κέντρου οστεοποίησης. Κατόπιν, εμφανίζονται τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης στις βολβώδεις διογκώσεις, που βρίσκονται στα άκρα του χόνδρινου προπλάσματος (επιφύσεις). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ανακατασκευής τους, το πρωτογενές και τα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης δημιουργούν κοιλότητες που βαθμιαία πληρούνται από το μυελό των οστών. Στα δευτερογενή κέντρα οστεοποίησης, ο χόνδρος παραμένει σε δύο περιοχές: στον αρθρικό χόνδρο, ο οποίος παραμένει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ενήλικα και δεν συμβάλλει στην κατά μήκος αύξηση του οστού και στον επιφυσιικό χόνδρο, επίσης ονομαζόμενο συζευκτικό χόνδρο, ο οποίος συνδέει τις δύο επιφύσεις με τη διάφυση. Ο επιφυσιικός χόνδρος είναι υπεύθυνος για την κατά μήκος αύξηση του

οστού και εξαφανίζεται στους ενήλικες, πράγμα που εξηγεί γιατί η ανάπτυξη των οστών δεν συνεχίζεται στην ενήλικη ζωή [3,4].

Η σύγκλιση των επιφύσεων ακολουθεί μια χρονολογική σειρά ανάλογα με κάθε οστό και συμπληρώνεται στο 20ο περίπου έτος της ηλικίας. Εξετάζοντας τον αναπτυσσόμενο σκελετό ακτινολογικά είναι δυνατόν να προσδιορίσουμε την "οστική ηλικία" ενός νεαρού ατόμου, σημειώνοντας ποιες επιφύσεις είναι ανοικτές και ποιες έχουν κλείσει. Όταν οι επιφύσεις έχουν κλείσει, η κατά μήκος ανάπτυξη των οστών γίνεται αδύνατη, αν και η αύξηση τους σε πλάτος είναι ακόμα δυνατή [4,34].

Η κατά μήκος ανάπτυξη ενός μακρού οστού γίνεται στο συζευκτικό χόνδρο (Εικόνα Α1.9), όπου στην πλευρά της επίφυσης πολλαπλασιάζονται τα χονδροκύτταρα ενώ ταυτόχρονα στην πλευρά της διάφυσης τα χονδροκύτταρα εμφανίζουν υπερτροφία, η θεμέλια ουσία τους ασβεστοποιείται και τα κύτταρα αποπίπτουν. Οι οστεοβλάστες εναποθέτουν μια στοιβάδα πρωτογενούς οστού στην ασβεστοποιημένη χόνδρινη θεμέλια ουσία. Επειδή οι ρυθμοί αυτών των δύο αντιθέτων γεγονότων (πολλαπλασιασμός και καταστροφή) είναι περίπου ίδιοι, το πάχος του συζευκτικού χόνδρου δε μεταβάλλεται, αλλά ο ίδιος μετατοπίζεται μακριά από το μέσο της διάφυσης, με αποτέλεσμα την κατά μήκος αύξηση του οστού.



Εικόνα Α1.9 Σχηματισμός και ανάπτυξη του οστού. (Junqueira L. Basic Histology: Text & Atlas 2005, 11<sup>th</sup> edition, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης)

#### *A1.4.4.iii Προέλευση των οστεοπρογονικών κυττάρων του περιostίου*

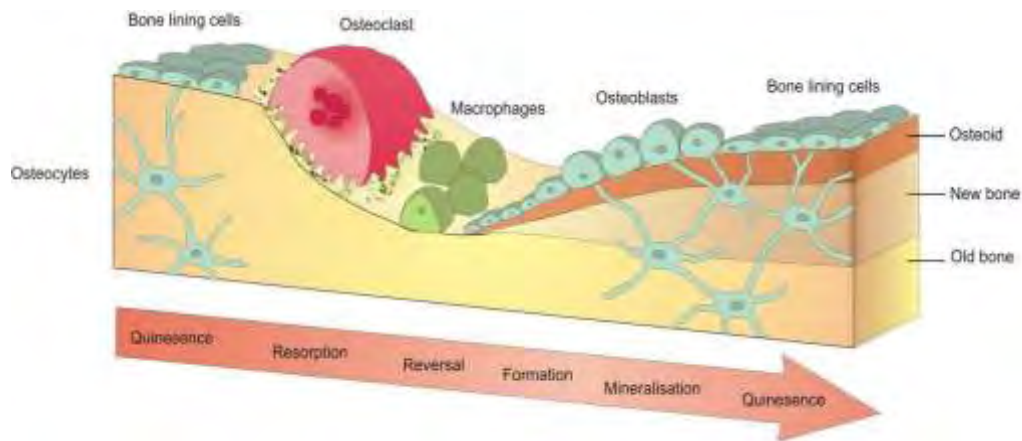
Πώς και με ποιο τρόπο το περίostιο, συγκεκριμένα η εσωτερική του στοιβάδα, περιέχει την πληθώρα των οστεοπρογονικών κυττάρων που το κάνουν τόσο ξεχωριστό ιστό;

Κάθε στοιχείο του οστού προέρχεται από το μεσεγχυματικό συμπύκνωμα το οποίο δημιουργεί ένα χόνδρινο επίστρωμα περιβαλλόμενο από το περιχόνδριο. Η οστεοποίηση αυτών των στοιχείων ξεκινά με την παρουσία αγγείων στο περιχόνδριο ακολουθούμενη από την δημιουργία υπερτροφικού χόνδρου στο κέντρο του αρχικού χόνδρινου επιστρώματος. Μετά και την αγγείωση της περιοχής, επέρχεται η γρήγορη απομάκρυνση του ασβεστοποιημένου χόνδρου και η αντικατάστασή του από οστό και μυελό των οστών. Αυτή η διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης ρυθμίζεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των Hedgehog, BMP, TGF-beta, PTH/PTHrP, FGF, Wnt, Notch και VEGF τα οποία δρουν στο επίπεδο των χονδροκυττάρων, του περιχόνδριου και των αιμοφόρων αγγείων, επιτρέποντας και προάγοντας τον συγχρονισμό της κυτταρικής διαφοροποίησης σε αυτούς τους παρακείμενους ιστούς. Πολλοί κυτταρικοί τύποι συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία με μερικούς από αυτούς να διαφοροποιούνται τοπικά και άλλους να οδηγούνται μέσα από τα αιμοφόρα αγγεία στον προδιαγεγραμμένο προορισμό τους, αλλά ανάλυση της οστεογενετικής σειράς δείχνει ότι όλες οι οστεοβλάστες προέρχονται από το περιχόνδριο. Οι πρόγονοι των οστεοβλαστών προερχόμενοι από το περιχόνδριο μεταναστεύουν μέσω των αιμοφόρων αγγείων ώστε να δημιουργήσουν το πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης [35-39].

Όπως γίνεται κατανοητό, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τα οστεοπρογονικά κύτταρα και οι οστεοβλάστες που βρίσκονται στο περίostιο και στον μυελό των οστών προέρχονται τοπικά από το περιχόνδριο χωρίς τη συστηματική μεταφορά τους μέσω των αιμοφόρων αγγείων.

### A1.5 Αύξηση και αναδόμηση του οστού

Η αύξηση του οστού συνδυάζεται γενικά με μερική απορρόφηση του προσχηματισμένου οστού και τη ταυτόχρονη εναπόθεση νέου οστού (η οποία υπερβαίνει το ρυθμό της απώλειας οστού). Αυτή η διεργασία επιτρέπει τη διατήρηση του σχήματος του οστού ενώ αυτό αναπτύσσεται. Ο ρυθμός της αναδόμησης (ανακατασκευής/ ανακύκλωσης) του οστού είναι πολύ ενεργός σε νεαρά παιδιά, στα οποία μπορεί να είναι 200 φορές ταχύτερος από ότι σε ενήλικες [40]. Η ανακατασκευή των οστών σε ενήλικες είναι μια δυναμική φυσιολογική διεργασία που συμβαίνει συγχρόνως σε πολλές περιοχές του σκελετού και δεν



*Εικόνα A1.10 Οστική αναδόμηση. Αρχικά υπάρχουν επιστρωμένα επενδυτικά κύτταρα. Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια και εν συνεχεία απορροφούν το οστό. Ακολουθεί η απομάκρυνση των οστεοκλαστών και η εγκατάσταση οστεοβλαστών στο βοθρίο. Σχηματίζεται το νέο οστό με την παραγωγή και πλήρωση του βοθρίου. (Biomedical Tissue Research, University of York, England, www.york.ac.uk)*

σχετίζεται με την ανάπτυξη των οστών (Εικόνα A1.10) [41].

Είναι εύλογο ότι θα πρέπει να γίνει ένας διαχωρισμός μεταξύ της διαδικασίας δόμησης/κατασκευής και της αναδόμησης/ανακατασκευής του ανθρώπινου σκελετού. Η δόμηση είναι ο σχηματισμός του οστού μέσω της διαδικασίας δόμησης/αποδόμησης, προερχόμενη από τους φακέλους του οστού. Η αναδόμηση αποτελεί την αλλαγή ή αντικατάσταση τμημάτων του οστού και αυτό σημαίνει ανανέωση της οστικής μάζας χωρίς να επιφέρει κάποια σχηματική ή δομική αλλαγή στο οστό. Η δόμηση περιορίζεται μόνο στην ανάπτυξη του σκελετού με εξαίρεση την εμφάνισή της στους ενήλικες ύστερα από αποτυχημένη ανάταξη



ενός κατάγματος. Η αναδόμηση συμβαίνει κατά τη διάρκεια όλης της ζωής. Κατά την ανάπτυξη, συμβάλλει στην ωρίμανση του οστού. Στους ενήλικες, παρέχει ουσιαστικά ενεργό μεταβολικό οστίτη ιστό για την ομοιοστασία του ασβεστίου, αφαιρεί νεκρά τμήματα οστού και δρα προφυλακτικά για τυχόν μικροτραυματισμούς των οστών.

Η ανανέωση οστίτη ιστού γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό στο σπογγώδες σε σχέση με το συμπαγές οστό. Συγκεκριμένα περίπου 25% του σπογγώδους οστού ανανεώνεται ετησίως ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στο συμπαγές είναι 2-3%. Η ανακατασκευή δεν συμβαίνει σε όλο τον οστίτη ιστό ταυτόχρονα αλλά αφορά περιορισμένου μεγέθους οστικές μονάδες, μικρά τμήματα οστίτη ιστού που ονομάζονται Βασικές Δομικές Μονάδες (BDM). Η ανακατασκευή του οστού περιλαμβάνει τις εξής φάσεις: τη φάση ηρεμίας, ενεργοποίησης, απορρόφησης, αναστροφής και οστικής παραγωγής. Ο σχηματισμός ενός οστεώνα κατά τη διαδικασία της οστικής αναδόμησης ξεκινά με την εμφάνιση οστεοκλαστών, οι οποίες σχηματίζουν τον λεγόμενο τέμνωντα κώνο (cutting cone). Καθώς τα κύτταρα αυτά απομακρύνουν οστό, αγγείο διεισδύει στο κενό που δημιουργείται δημιουργώντας μια σήραγγα η οποία καλείται σήραγγα διάβρωσης (erosion tunnel). Μέσω αυτής φτάνουν τα οστεοπρογονικά κύτταρα. Ο τέμνων κώνος συνεχίζει την πορεία έως ότου απομακρύνει πλήρως όλο το νεκρωτικό ή αποδυναμωμένο ιστό. Στη συνέχεια τα οστεοπρογονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και ξεκινά η σύνθεση του οστεοειδούς. Η ασβεστοποίηση του οστεοειδούς θα οδηγήσει τελικά στο σχηματισμό του ώριμου οστού. Το αγγείο πλέον περιβάλλεται από οστό και το με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το κανάλι του Havers. Ορισμένοι ερευνητές περιγράφουν τους οστεώνες αυτούς ως δευτερογενείς σε αντιδιαστολή με τους πρωτογενείς οι οποίοι προκύπτουν χωρίς την εμφάνιση της σήραγγας διάβρωσης. Δευτερογενείς οστεώνες εμφανίζονται επίσης κατά τη διάρκεια αναγέννησης κατεστραμμένου οστού [42,43].

#### **A1.5.1 Ρύθμιση Οστικής Αναδόμησης**

Στη ρύθμιση της οστικής αναδόμησης συμμετέχουν κυρίως ορμόνες και κυτταροκίνες. Στη ρύθμιση όμως της διαφοροποίησης των BDM σημαντικό ρόλο

παίζουν τα μόρια κυτταρικής πρόσφυσης όπως οι ιντεγκρίνες, σελεκτίνες, καδερίνες και πεπτιδάσες ADAMS (A Disintegrin And Metalloproteinase protein) [9]. Βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση των οστεοκλαστών παίζει η κυτταροκίνη RANKL που εκκρίνεται από τις οστεοβλάστες, ώριμες οστεοκλάστες και επενδυτικά κύτταρα. Μέσω των πρωτεϊνικών προσαρμογέων (adaptor proteins) που ονομάζονται TRAF (TNFR Associated Factors), η σύνδεση RANK/RANKL, ενεργοποιεί ένα καταρράκτη MAP κινασών (Mitogen-activated protein kinases – MAPK) που οδηγεί στην κινητοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 (activator protein-1) και NFκB (Nuclear Factor κB) [17,18]. Η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) επιστρατεύεται για να αντισταθμίσει την έλλειψη ασβεστίου και προάγει τη δημιουργία των BMPs διεγείροντας την έκφραση του RANKL από τα επενδυτικά κύτταρα. Παρόμοια δράση παρατηρείται και από τη βιταμίνη D, η οποία επιτείνει επιπλέον και την αναπαραγωγή των πρόδρομων οστεοκλαστών [44]. Η ορμόνη καλσιτονίνη παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση και προάγει την απόπτωση των οστεοκλαστών προσδεμένη στους μεμβρανικούς υποδοχείς που αυτοί διαθέτουν. Τα οιστρογόνα αναστέλλουν την παραγωγή ιντερλευκίνης-6, η οποία προάγει την οστεοκλαστογένεση, ενώ παράλληλα βραχύνουν τη διάρκεια ζωής των οστεοκλαστών, ωθώντας με τη δράση τους το ισοζύγιο της ανακατασκευής προς την οστεοσύνθεση [9, 44]. Στην διέγερση των οστεοβλαστών και των επενδυτικών κυττάρων εμπλέκονται κυτταροκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-1, IL-6 και IL-11, ενώ στην προαγωγή του πολλαπλασιασμού της οστεοβλαστικής σειράς παίρνουν μέρος αυξητικοί παράγοντες όπως οι TGFβ, FGF, PDGF καθώς και μέλη της οικογένειας των BMPs [44].

## A2. ΟΣΤΙΚΟ ΚΑΤΑΓΜΑ

### A2.1 Ταξινόμηση καταγμάτων

Κάταγμα ονομάζεται η μερική ή ολική λύση της συνέχειας ενός οστού. Τα κατάγματα διαιρούνται:

α) ανάλογα με την ένταση της βίας και διακρίνονται σε βίαια ή υψηλής ενέργειας, κατάγματα από καταπόνηση και παθολογικά.

β) ανάλογα με την επικοινωνία ή όχι της εστίας του κατάγματος με το περιβάλλον (απλό ή κλειστό και επιπλεγμένο ή ανοικτό).

γ) ανάλογα με την έκταση της κάκωσης του οστού σε ατελές ή ρωγμώδες και τέλειο.

δ) ανάλογα με τη φορά της γραμμής του κατάγματος και διαχωρίζονται σε εγκάρσια, λοξά, επιμήκη, σπειροειδή και κατάγματα σε σχήμα T ή Y.

ε) ανάλογα με τον μηχανισμό σε άμεσα ή έμμεσα.

στ) ανάλογα με την μετατόπιση των κατεαγόντων τμημάτων διακρίνονται σε αποσπαστικό, ενσφηνωμένο, συμπιεστικό και πιεστικό.

ζ) σε άλλες υποδιαιρέσεις όπως τα συντριπτικά κατάγματα, τα διπλά ή διπολικά, τα κατάγματα-εξαρθρήματα, κατάγματα δίκην «χλωρού ξύλου» που συμβαίνουν κυρίως στα παιδιά και τέλος, από θεραπευτικής πλευράς, σε σταθερά και ασταθή.

Σχεδόν κάθε κάταγμα στον άνθρωπο έχει τουλάχιστον μια δική του ταξινόμηση. Η πλέον χρησιμοποιούμενη και ευρέως αποδεκτή σήμερα ταξινόμηση όλων των καταγμάτων είναι αυτή που πρότεινε η ομάδα της AO/ASIF (Association for the Study of Internal Fixation) το 1990, η οποία κατέστησε δυνατή την σαφή περιγραφή των καταγμάτων αλλά και τον καλύτερο σχεδιασμό της αντιμετώπισής τους [1,45].

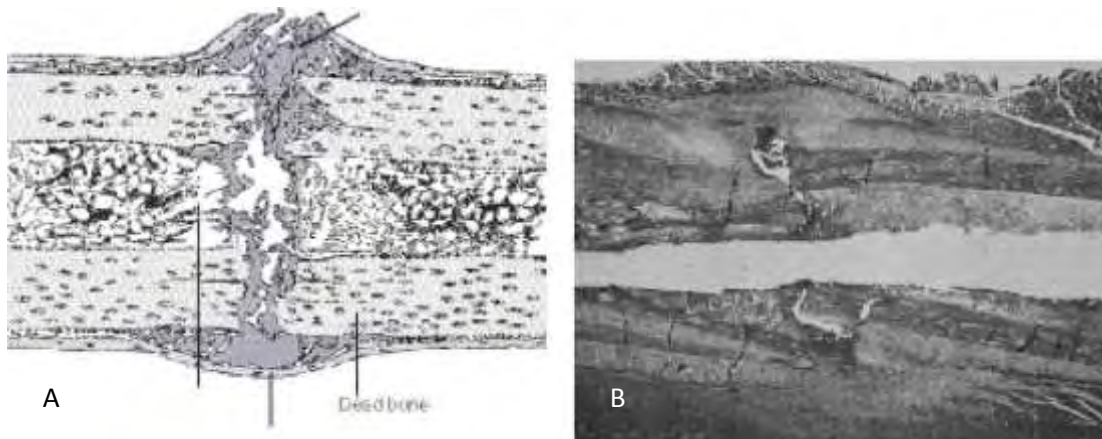
## A2.2 Πώρωση οστικών καταγμάτων

### A2.2.1 Φλεγμονή και αποκατάσταση κατάγματος

Ένα οστικό κάταγμα πυροδοτεί μια ακολουθία φλεγμονής, αποκατάστασης και ανακατασκευής που μπορεί να επαναφέρει το τραυματισμένο οστό στην αρχική του κατάσταση [46]. Η φλεγμονή αρχίζει αμέσως μετά τον τραυματισμό και ακολουθείται ταχύτατα από αποκατάσταση. Αφού αντικατασταθούν τα κύτταρα και η θεμέλια ουσία που χάθηκε και καταστράφηκε, μέσω της αποκατάστασης, αρχίζει μια παρατεταμένη φάση ανακατασκευής. Οι ενεργειακές απαιτήσεις της πώρωσης του κατάγματος αυξάνονται ραγδαία κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και φθάνουν το μέγιστο κατά την αποκατάσταση, όταν τα κύτταρα του πώρου πολλαπλασιάζονται και συνθέτουν μεγάλη ποσότητα νέας θεμέλιας ουσίας. Αυτές οι ενεργειακές απαιτήσεις παραμένουν υψηλές έως ότου αρχίσει να μειώνεται η κυτταρική πυκνότητα και δραστηριότητα καθώς αρχίζει η ανακατασκευή [47].

Ένα τραύμα που προκαλεί κάταγμα στο οστό, δεν καταστρέφει απλώς τα κύτταρα, τα αιμοφόρα αγγεία και την οστική θεμέλια ουσία αλλά καταστρέφει και τους περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς, μεταξύ των οποίων το περιόστεο και τους μύες. Ένα αιμάτωμα συσσωρεύεται μεταξύ των άκρων του κατάγματος και κάτω από το ανυψωμένο περιόστεο. Η ζημία στα αιμοφόρα αγγεία του οστού στερεί την τροφή από τα οστεοκύτταρα, τα οποία αποπίπτουν μέχρι το σημείο διασταύρωσης με παράπλευρα αγγεία, αφήνοντας τα άμεσα άκρα του κατάγματος χωρίς ζωντανά κύτταρα. Το σοβαρά κατεστραμμένο περιόστεο και ο μυελός, καθώς και οι περιβάλλοντες μαλακοί ιστοί, μπορούν να συνεισφέρουν νεκρωτικό υλικό στη θέση του κατάγματος (Εικόνα A1.11).

Φλεγμονώδεις παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια και από νεκρά και τραυματισμένα κύτταρα προκαλούν τη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και την εκροή πλάσματος, προκαλώντας οξύ οίδημα στην περιοχή του κατάγματος. Φλεγμονώδη κύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή, μεταξύ των οποίων πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα που ακολουθούνται από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν κυτταροκίνες που διεγείρουν



*Εικόνα A1.11 A. Άμεση σχηματική απεικόνιση ενός κατάγματος της διάφυσης μακρού οστού: το περίοστεο έχει σχιστεί απέναντι από το σημείο κρούσης ενώ παραμένει ανέπαφο στην άλλη πλευρά. Ένα αιμάτωμα συσσωρεύεται κάτω από το περίοστεο και μεταξύ των άκρων του κατάγματος. Υπάρχει νεκρωτικός μυελός και φλοιώδες οστό κοντά στη γραμμή κατάγματος. B. Μικροφωτογραφία μηριαίου οστού επίμυος με κάταγμα τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό: πολλαπλασιασμός του περιοστικού ιστού αποκατάστασης. (Cruess R, Dumont J. Textbook of small animal Orthopaedics. Basic fracture healing. Lippincott 1985)*

την αγγειογένεση [48]. Καθώς η φλεγμονώδης αντίδραση υποχωρεί, ο νεκρωτικός ιστός και το εξίδρωμα απορροφώνται, και οι ινοβλάστες και τα χονδροκύτταρα αρχίζουν να παράγουν νέα θεμέλια ουσία, τον πώρο.

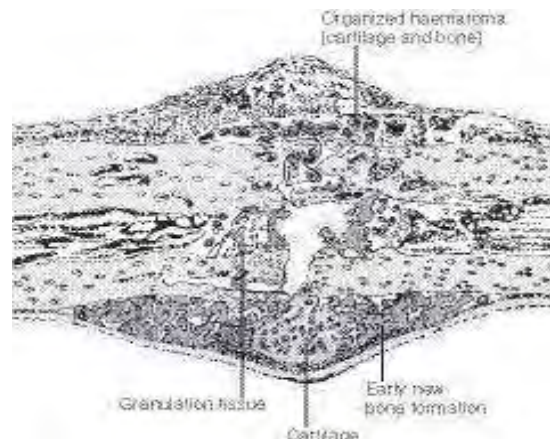
Οι παράγοντες που διεγείρουν την αποκατάσταση του κατάγματος περιλαμβάνουν χημειοτακτικούς και αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης στο κάταγμα, καθώς και πρωτεΐνες οστικής θεμέλιας ουσίας [49]. Αν και η φλεγμονή που ακολουθεί το κάταγμα εμφανίζει τα ίδια στάδια σχεδόν για κάθε κάταγμα, η ποσότητα, η σύσταση και ο ρυθμός αποκατάστασης του οστού ενδέχεται να διαφέρουν, ανάλογα με το είδος του οστού, την έκταση του τραυματισμού των μαλακών μορίων που περιβάλλει το κάταγμα, και άλλους παράγοντες. Η μηχανική σταθερότητα της θέσης του κατάγματος επηρεάζει επίσης τη διαδικασία αποκατάστασης.

### **A2.2.2 Αποκατάσταση και ανακατασκευή καταγμάτων**

Η ρήξη των αιμοφόρων αγγείων στο οστό, τον μυελό, το περίοστεο και τον περιβάλλοντα ιστό κατά τον τραυματισμό οδηγεί στην εξαγγείωση αίματος στη

θέση του κατάγματος και στο σχηματισμό αιματώματος [50,51]. Το αιμάτωμα λειτουργεί κυρίως ως πηγή ενεργοποιημένων μορίων που σηματοδοτούν την έναρξη αλυσιδωτών κυτταρικών γεγονότων απαραίτητων για την επούλωση του οστού. Η οργάνωση αυτού του αιματώματος συνήθως αναγνωρίζεται στο πρώτο βήμα αποκατάστασης ενός κατάγματος (Εικόνα A1.12). Με τη ρήξη των αγγείων, προκαλείται διακοπή της κυκλοφορίας και νέκρωση των οστεοκυττάρων στα άκρα του κατάγματος [42,46].

Η παρουσία του συνόλου των νεκρωμένων ιστών προκαλεί άμεση και έντονη αντίδραση φλεγμονής (αγγειοδιαστολή, εξίδρωση πλάσματος και οξύ οίδημα). Παράλληλα εμφανίζεται πλήθος φλεγμονωδών κυττάρων (κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα, λεμφοκύτταρα) τα οποία αρχίζουν την αποδόμηση των νεκρών ιστών. Τα φλεγμονώδη καθώς και τα νεκρά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως



*Εικόνα A1.12 Πρώιμη φάση αποκατάστασης ενός κατάγματος της διάφυσης μακρού οστού. Οργάνωση του αιματώματος, πρώιμος σχηματισμός δικτυωτού οστού στις υπο-περιοστικές περιοχές, και σχηματισμός χόνδρου σε άλλες περιοχές.*

*(Cruess R, Dumont J. Textbook of small animal Orthopaedics. Basic fracture healing. Lippincott 1985)*

τις ιντερλευκίνες -1 και -6, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αρχικών γεγονότων της πώρωσης. Επιπροσθέτως, τα αποσυντεθειμένα αιμοπετάλια του αιματώματος απελευθερώνουν χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης β (transforming growth factor – beta, TGF-β) και τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (platelet-derived growth factor, PDGF), που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και εν μέρει βοηθούν στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων και σε συνδυασμό με άλλες ουσίες προάγουν τις διεργασίες της φλεγμονής. Ο ρόλος δηλαδή του αιματώματος στα αρχικά στάδια της πώρωσης είναι ουσιώδης [52,53].

Η απώλεια του αιματώματος εξασθενεί ή επιβραδύνει την πώρωση του κατάγματος αποδεικνύοντας ότι το αιμάτωμα και ο ανέπαφος περιβάλλων περιοστικός ιστός που το περιέχει διευκολύνουν τα αρχικά στάδια της

αποκατάστασης [50,51]. Τα ανοικτά κατάγματα ή η θεραπεία τους με ανοικτή ανάταξη διακόπτει την οργάνωση του αιματώματος και κατά συνέπεια ενδέχεται να επιβραδύνει τη διαδικασία αποκατάστασης. Τα αίτια της πιθανής επίδρασης ενός αιματώματος στην πύρωση του κατάγματος παραμένουν αβέβια. Προφανώς, το ανέπαφο αιμάτωμα στο σημείο του κατάγματος παρέχει ένα ικρίωμα ινιδίων που διευκολύνει τη μετανάστευση των κυττάρων αποκατάστασης. Επιπλέον, οι αυξητικοί παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, τα κύτταρα του αιματώματος και το περίσσειο μεσολαβούν στα αρχικά γεγονότα της αποκατάστασης του κατάγματος, όπως η μετανάστευση των κυττάρων και η σύνθεση της θεμέλιας ουσίας του ιστού αποκατάστασης [48,49].

Τα διεγερμένα μεσεγγυματικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται οκτώ ώρες μετά το κάταγμα και η μιτωτική δραστηριότητα κορυφώνεται στις 24 ώρες. Έτσι σχηματίζεται ένας μαλακός κοκκιωματώδης ιστός από τα πολλαπλασιαζόμενα θυγατρικά κύτταρα αλλά και από τους θυγατρικούς τους ινοβλάστες που σταδιακά γεφυρώνει το καταγματικό κενό σε διάστημα περίπου δύο εβδομάδων και παρέχει το απαραίτητο υποστηρικτικό σύστημα για την ανάπτυξη νέων αγγείων.

Σε 2 με 3 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό είναι εμφανής κλινικά η συνένωση των καταγματικών άκρων, καθώς πλέον ο κοκκιωματώδης ιστός έχει αντικαταστήσει το αρχικό αιμάτωμα. Υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων και μηχανικής φόρτισης, τα οστεοπρογονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και ινοβλάστες μέσω του φαινομένου της οστεοεπαγωγής (osteoiduction). Τα διαφοροποιημένα αυτά κύτταρα αρχίζουν να συνθέτουν πρωτογενές οστόν στην περιφέρεια του κατάγματος όπου η αιμάτωση είναι επαρκής, χόνδρινο ιστό στις γειτονικές του κατάγματος περιοχές όπου η αιμάτωση είναι φτωχότερη και ινοχόνδρινο ιστό μεταξύ των καταγματικών άκρων. Έτσι, δημιουργείται ένα ινοχόνδρινο μόρφωμα που αποτελεί το μαλακό πώρο του κατάγματος και με τη μορφή δύο εξωτερικών δακτυλίων γύρω από κάθε καταγματικό άκρο, επεκτείνεται για να συναντήσει ο ένας δακτύλιος τον άλλο. Η δημιουργία του εξωτερικού πώρου αποδίδεται σε δύο τύπους κυττάρων. Τα πρώτα είναι συγκεκριμένα μεσεγγυματικά κύτταρα από τους παρακείμενους ιστούς που όταν διεγερθούν παράγουν οστόν ή χόνδρο. Τα κύτταρα αυτά είναι επαγωγίμα

οστεοπρογονικά και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του πύρου που βρίσκεται μακριά από τις καταγματικές επιφάνειες. Ο άλλος τύπος κυττάρων που ευθύνεται για τη δημιουργία εξωτερικού πύρου είναι τα οστεοπρογονικά κύτταρα του περιostίου [52,54].

Το περίostιο και συγκεκριμένα τα περιostικά κύτταρα είναι αυτά που συνεισφέρουν τα μέγιστα στην επουλωτική διαδικασία του κατάγματος και αρχικά είναι ο κύριος διαθέσιμος μηχανισμός των οστικών δομών για την ίδια τους την αναδόμηση έπειτα από ένα τραύμα/κάταγμα [21,26,30].

Η αρχική διαδικασία επούλωσης του τραύματος είναι η ενδοχόνδρια όπου το περίostιο διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Μετά από κάποιο κάταγμα δημιουργείται αιμάτωμα στην περιοχή το οποίο σταθεροποιείται από τους περιβαλλόμενους μαλακούς ιστούς και από ένα ινώδες στρώμα προερχόμενο από το γειτονικό περίostιο. Ιστολογικά, τα κύτταρα που βρίσκονται στο περίostιο απαντούν άμεσα στα κυτταρικά, μοριακά και μηχανικά σήματα και αυτή η απόκριση μπορεί να ανιχνευθεί τις πρώτες 48 ώρες μετά το κάταγμα [35]. Κύτταρα της εσωτερικής στοιβάδας πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται. Στην περιφέρεια του κατάγματος όπου τα αιμοφόρα αγγεία δεν έχουν καταστραφεί, το εσωτερικό στρώμα του περιostίου δημιουργεί ένα οστικό δακτύλιο μέσω της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης. Πιο κοντά στο σημείο του κατάγματος, το κάμβιο παράγει μία χόνδρινη μάζα γύρω από αυτό. Έπειτα, μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, η οποία προσομοιάζει την σκελετογένεση στο έμβρυο, η χόνδρινη μάζα οστεοποιείται. Αυτός ο τύπος της επουλωτικής διαδικασίας κυριαρχεί σε καταστάσεις όπου υπάρχει είτε μακρο-κινητικότητα είτε μικρο-κινητικότητα των καταγματικών τμημάτων σε οστά που περιβάλλονται από περίostιο. Είναι ο τύπος της επουλωτικής διαδικασίας η οποία είναι ακτινολογικά ορατή ως *περιοστική αντίδραση*, και περιλαμβάνει μία μεθοδική και βαθμιαία πρόοδο ξεκινώντας από τον υπο-περιοστικό νέο-σχηματισμό οστού, τον σχηματισμό μαλακού πύρου, ο οποίος είναι ακτινοδιαπερατός και τον σχηματισμό σκληρού πύρου. Η περιοστική αντίδραση μπορεί να συμβεί εκεί όπου το περίostιο είναι παρόν, αν και δεν είναι ξεκάθαρο γιατί στους ενήλικες, η περιοστική αντίδραση συνήθως δεν επεκτείνεται στο επίπεδο της μετάφυσης και την εξω-αρθρική επίφυση όπως μπορούμε να δούμε σε πολλές επουλωτικές διαδικασίες καταγμάτων, και σε άλλες καταστάσεις



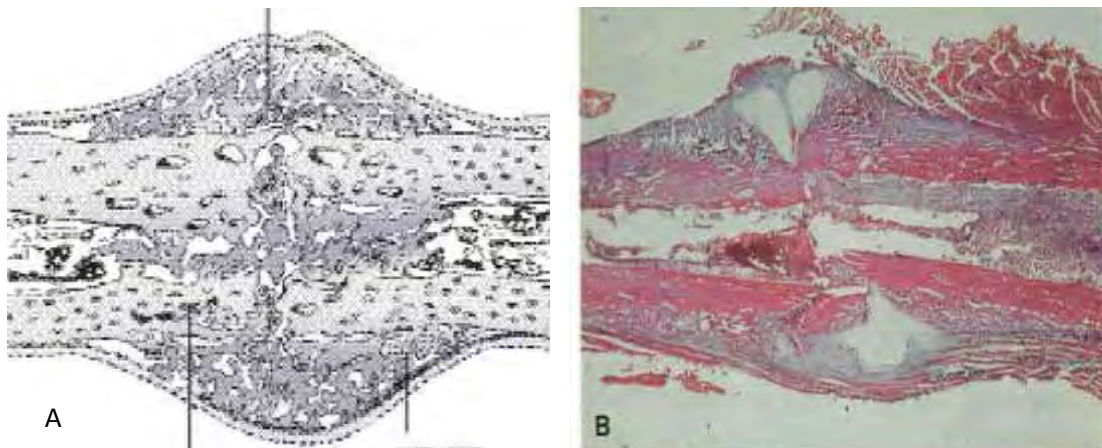
όπου η περιοστική αντίδραση πιστεύεται ότι θα μπορούσε να είναι παρούσα όπως η υπερτροφική οστεοπάθεια. Η περιοστική αντίδραση δεν μπορεί να λάβει χώρα όπου υπάρχει έλλειψη περιοστέου [35,55-58].

Το περίοστεο συμβάλλει περισσότερο στο σχηματισμό του πώρου σε σχέση με την συνεισφορά του μυελού των οστών και του ενδοστέου. Τα κύτταρα των τελευταίων κυρίως σχηματίζουν οστό στην κοιλότητα του μυελού και δεν μεταναστεύουν εκτός αυτής για τη δημιουργία του πώρου. Έτσι, όχι μόνο οι τοπικοί ιστοί, αλλά πιθανότατα το πιο σημαντικό, το περίοστεο αποτελεί κλειδί για την κυτταρική συνεισφορά στην αποκατάσταση του οστού [59-61]. Επιπροσθέτως σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο τύπος κατάγματος καθώς κύτταρα που είναι στο περίοστεο και τον μυελό δεν λαμβάνουν τα ίδια βιολογικά και μηχανικά σήματα [62-64].

Υπό κανονικές συνθήκες, τα περιοστικά αγγεία συνεισφέρουν στην εμφάνιση τριχοειδών αγγείων από νωρίς στη φυσιολογική πώρωση του οστού, με τη θρεπτική μυελική αρτηρία να καθίσταται σημαντικότερη αργότερα κατά τη διαδικασία. Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες είναι σημαντικοί στην αγγειογένεση κατά την διάρκεια της πώρωσης, αλλά τα ακριβή ερεθίσματα που ευθύνονται για την αγγειακή εισβολή και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν έχουν προσδιοριστεί. Όταν ο χειρουργός παρεμβαίνει στην παροχή αίματος στη θέση του κατάγματος, απογυμνώνοντας υπερβολικά το περίοστεο ή καταστρέφοντας το ενδόστεο και το μυελικό σύστημα με τη χρήση ενδομυελικών ήλων, η αποκατάσταση πρέπει να προχωρήσει με τα αγγεία που προκύπτουν από το σύστημα που επιβίωσε.

Τα κατεαγότα οστικά άκρα χωρίς παροχή αίματος, γίνονται νεκρωτικά και απορροφώνται. Το γεγονός αυτό μπορεί να δημιουργήσει ένα ακτινογραφικά εμφανές κενό στη θέση του κατάγματος αρκετές εβδομάδες μετά τον τραυματισμό. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία αυτή, οι οστεοκλάστες, προέρχονται από διαφορετική κυτταρική σειρά από ότι αυτά που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό οστών. Προέρχονται από μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών, ενώ οι οστεοκλάστες αναπτύσσονται από μη διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά κύτταρα που μεταναστεύουν στη θέση του κατάγματος [46].

Πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, πιθανόν κοινής προέλευσης, σχηματίζουν τον ινώδη ιστό, το χόνδρο και τελικά το οστό στη θέση του κατάγματος (Εικόνα Α1.13). Μερικά από αυτά τα κύτταρα δημιουργούνται στους τραυματισμένους ιστούς, ενώ άλλα μεταναστεύουν στη θέση του τραυματισμού με τα αιμοφόρα αγγεία. Τα κύτταρα του περιοστέου σχηματίζουν το προ-οστό. Τα περιοστικά κύτταρα έχουν έναν εξαιρετικά ξεχωριστό ρόλο στην πύρωση των παιδικών καταγμάτων, επειδή το περίοστεο είναι πυκνότερο και πιο κυτταροβριθές σε νεαρά άτομα. Όσο αυξάνει η ηλικία, το περίοστεο γίνεται λεπτότερο και η συμβολή του στην πύρωση των καταγμάτων γίνεται λιγότερο σημαντική. Οι οστεοβλάστες από την επιφάνεια του ενδοστέου συμμετέχουν επίσης στο σχηματισμό οστού, αλλά τα οστεοκύτταρα που επιβίωσαν δεν φαίνεται να σχηματίζουν τον ιστό αποκατάστασης. Η πλειονότητα των κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την οστεογένεση εμφανίζεται στην περιοχή του κατάγματος με τον κοκκιώδη ιστό που αντικαθιστά το αιμάτωμα.



*Εικόνα Α1.13 Προοδευτική αποκατάσταση κατάγματος με πύρωση. Α. Δικτυωτό οστό γεφυρώνει το κενό και ενώνει τα άκρα του κατάγματος. Ο χόνδρος παραμένει στις περιοχές που είναι πιο απόμακρες από τα τριχοειδή. Σε πολλά σημεία, τα τριχοειδή περιβάλλονται από νέο οστό. Τα αγγεία επαναγγειώνουν το φλοιώδες οστό στη θέση του κατάγματος. Β. Μικροφωτογραφία μηριαίου οστού επίμυος με κάταγμα 21 ημέρες μετά τον τραυματισμό: ο πώρος ενώνει τα οστικά κατεαγότα οστικά τεμάχια.*

*(Cruess R, Dumont J. Textbook of small animal Orthopaedics. Basic fracture healing. Lippincott 1985)*

Ο πώρος γεμίζει και περιβάλλει τη θέση του κατάγματος, και στα πρώτα στάδια επούλωσης μπορεί να διαιρεθεί σε σκληρό ή οστέινο και σε μαλακότερο ινώδη και χόνδρινο πώρο. Το οστό που σχηματίζεται αρχικά στην περιφέρεια του πώρου από σχηματισμό ενδομεμβρανώδους οστού είναι ο **σκληρός πώρος**. Ο

μαλακός πύρος σχηματίζεται στις κεντρικές περιοχές και αποτελείται κυρίως από χόνδρο και ινώδη ιστό. Το οστό σταδιακά αντικαθιστά το χόνδρο μέσω της διαδικασίας της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, μεγεθύνοντας το σκληρό πύρο και αυξάνοντας τη σταθερότητα των άκρων του κατάγματος. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι το νέο οστό να «γεφυρώσει» τα άκρα του κατάγματος, αποκαθιστώντας τη συνέχεια μεταξύ των άκρων του φλοιώδους οστού [54,65,66].

Η βιοχημική σύσταση της θεμέλιας ουσίας του πύρου αλλάζει καθώς προοδεύει η αποκατάσταση. Τα κύτταρα αντικαθιστούν το θρόμβο ινώδους με χαλαρή ινώδη θεμέλια ουσία, που περιλαμβάνει γλυκοζαμινογλυκάνες και κολλαγόνο τύπου I και III. Σε πολλές περιοχές μετατρέπουν τον ιστό αυτό σε πυκνότερο ινώδη ή υαλώδη χόνδρο. Με το σχηματισμό υαλώδους χόνδρου, το κολλαγόνο τύπου II, η πρωτεογλυκάνη και η χονδροσυνδεΐνη αυξάνονται. Το νεοσχηματισμένο δικτυωτό οστό αναπλάθεται σε πεταλιώδες, και με την ανακατασκευή η περιεκτικότητα κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα [54,65,66].

Η αποκατάσταση του κατάγματος εξαρτάται από την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων στα κύτταρα αποκατάστασης, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων, κοκκιδώδους ιστού, χόνδρου και οστού. Η ταυτόχρονη εμφάνιση χονδρογένεσης, ενδοχόνδριας και ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης σε διαφορετικές περιοχές του πύρου υποδεικνύει ότι τοπικοί παράγοντες και μικρές παραλλαγές στο μικροπεριβάλλον, μεταξύ των οποίων μηχανικές τάσεις, καθορίζουν ποια γονίδια θα εκφραστούν, και κατά συνέπεια τον τύπο του ιστού που θα σχηματίσουν τα κύτταρα αποκατάστασης [54,65,66].

Στην απουσία σταθεροποίησης του κατάγματος, η περισοτική αντίδραση είναι ιδιαίτερα εύρωστη και ισχυρή οδηγώντας στον σχηματισμό πύρου και την επούλωση μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Όταν τα κατάγματα είναι άκαμπτα σταθεροποιημένα, τα κύτταρα του περισσέου δεν διεγείρονται τόσο αποτελεσματικά και ο σχηματισμός πύρου είναι ελάχιστος. Οι διαφορές στην κυτταρική απόκριση λόγω των μηχανικών σημάτων ανήκουν κυρίως στο περίοστεο, όπως έχει αποδειχθεί με την αναβολική ρύθμιση του μονοπατιού BMP στο περίοστεο, κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της επουλωτικής διαδικασίας σε μη σταθεροποιημένα κατάγματα [35].

Οι τοπικοί μεσολαβητές που ενδέχεται να επηρεάσουν τη λειτουργία των κυττάρων αυτών συμπεριλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από κύτταρα και αιμοπετάλια. Η όξινη και η βασική μορφή του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα FGF και ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ενδέχεται να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό χονδροκυττάρων και το σχηματισμό χόνδρου, τον πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών και την οστεοσύνθεση. Ο παράγοντας TGF- $\beta$  που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια αμέσως μετά από τον τραυματισμό μπορεί να πυροδοτήσει το σχηματισμό πύρου. Η σύνθεση TGF- $\beta$  συνδέεται επίσης με την υπερτροφία του χόνδρου και την επασβέστωση στο πλαίσιο της ενδοχόνδριας οστεοποίησης [65,66].

Καθώς προχωρά η επιμετάλλωση του πύρου, τα άκρα του οστού σταδιακά περιβάλλονται από μια ατρακτοειδή μάζα που περιέχει αυξανόμενες ποσότητες δικτυωτού οστού. Η αυξανόμενη οστική πυκνότητα συσχετίζεται με την αυξανόμενη ακαμψία του πύρου. Η σταθερότητα των άκρων του κατάγματος αυξάνεται προοδευτικά εξαιτίας του σχηματισμού εσωτερικού και εξωτερικού πύρου και τελικά λαμβάνει χώρα κλινική συνένωση (πύρωση): δηλαδή η θέση του κατάγματος γίνεται σταθερή και ανώδυνη. Η ακτινογραφική συνένωση (πύρωση) συμβαίνει όταν απλές ακτινογραφίες δείχνουν οστικές δοκίδες ή φλοιώδες οστό να διασχίζουν τη θέση του κατάγματος, και συνήθως εμφανίζεται μετά την κλινική συνένωση. Ωστόσο, ακόμη και σε αυτό το στάδιο η πύρωση δεν έχει ολοκληρωθεί. Ο άωρος πύρος είναι πιο αδύναμος από το κανονικό οστό, και αποκτά πλήρη δύναμη μόνο κατά την ανακατασκευή [45,54].

Κατά τα τελικά στάδια αποκατάστασης, η ανακατασκευή του ιστού αποκατάστασης αρχίζει με την αντικατάσταση του δικτυωτού οστού από πεταλιώδες και την απορρόφηση του περιττού πύρου. Μελέτες ραδιοϊσοτόπων δείχνουν αυξημένη δραστηριότητα στη θέση του κατάγματος πολύ μετά την πλήρη αποκατάσταση της λειτουργίας του άκρου και την ακτινολογική επιβεβαίωση της ενοποίησης των οστικών τεμαχίων, αποδεικνύοντας ότι η ανακατασκευή του κατάγματος συνεχίζεται για αρκετό χρόνο μετά την κλινική και την ακτινολογική πύρωση. Η ανακατασκευή του πύρου μετά την αντικατάσταση όλου του δικτυωτού οστού προφανώς χαρακτηρίζεται από την οστεοκλαστική απορρόφηση των περιττών ή κακώς τοποθετημένων δοκίδων και το σχηματισμό νέων κατά μήκος των

γραμμών τάσης [66]. Παρά την επιτυχημένη πώρωση του κατάγματος, η οστική πυκνότητα του συγκεκριμένου άκρου ενδέχεται να είναι μειωμένη για χρόνια. Η κλινική σημασία αυτών των παρατηρήσεων παραμένει ασαφής, υποδεικνύουν, όμως, ότι τα κατάγματα, και πιθανόν η μειωμένη φόρτιση του άκρου μετά το κάταγμα, μπορούν να προκαλέσουν μακροχρόνιες μεταβολές στους ιστούς [67, 68].

### **A2.3 Ο ρόλος του περιostίου στην πώρωση και ανακατασκευή του κατάγματος**

Η επούλωση του τραυματισμένου οστού είναι μια διαδικασία δυναμική, πολύ καλά ενορχηστρωμένη που περιλαμβάνει πλήθος πολύπλοκων και πολύπλευρων λειτουργιών σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα και μοριακά μονοπάτια. Αμέσως μετά το κάταγμα, το περίostιο υποβάλλεται σε μια σειρά αλλαγών ώστε να αρχίσει την ενδοχόνδρια και ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση στην τραυματισμένη περιοχή. Και οι δύο τύποι οστεοποίησης αρχίζουν με τον έντονο και άμεσο πολλαπλασιασμό των περιostικών οστεοπρογονικών κυττάρων. Έτσι τα κύτταρα του φλοιού του οστού στο σημείο του κατάγματος διαφοροποιούνται σε προγονικά χονδροκύτταρα και κύτταρα στην περιφέρεια αυτού, και υιοθετούν τη παραγωγή οστεογενετικών κυττάρων [21,24,25].

Στην συνέχεια θα αναφερθούμε σε μια σειρά πρόσφατων μελετών που σημειώνουν βασικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την επούλωση και ανακατασκευή της περιοχής του κατάγματος μέσω της περιostικής αντίδρασης. Η συμβολή των οστεοπρογονικών περιostικών κυττάρων στον σχηματισμό του πώρου μετά από κάταγμα έχει εξετασθεί και αποδειχθεί σε πειράματα ζώων.

Ο Zhang και οι συνεργάτες του με πειράματα σε ποντικούς απέδειξαν την κυρίαρχη συνεισφορά των περιostικών οστεοπρογονικών κυττάρων τόσο στην ενδοχόνδρια όσο και στην ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση κατά τη διάρκεια της επουλωτικής διαδικασίας. Επίσης συμπέραναν πως η ενεργοποίηση, η επέκταση και η διαφοροποίηση των περιostικών πολυδύναμων/προγονικών κυττάρων δρα ως απαραίτητο βήμα για την πρόοδο της νέο-αγγείωσης της περιοχής, του σχηματισμού πώρου και τελικά της ανακατασκευής του οστού [69].

Χρησιμοποιώντας γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών, ανακαλύφθηκαν μοριακά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της περιοστικής αντίδρασης. Ανάμεσα σε όλα το πιο σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι θεωρήθηκε αυτό του TGF- $\beta$ /BMP και αναδείχθηκε ο ενεργός ρόλος των BMPs και πολύ περισσότερο απ' όλες αυτές της BMP-2. Φαίνεται λοιπόν ότι η BMP-2 αποτελεί την κορυφή της σηματοδοτικής διαδικασίας και ξεκινά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των περιοστικών προγονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της επούλωσης και ανακατασκευής. Αρχικά εντοπίστηκε στο οστικό συμπυκνωμένο μεσέγχυμα μακρών οστών. Η έλλειψη του γονιδίου της BMP-2 ανέπτυξε σποραδικά κατάγματα στους ενήλικους ποντικούς. Πιο εντυπωσιακό ήταν το γεγονός πως η απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της BMP-2 ακύρωσε ολοκληρωτικά τη διαδικασία σχηματισμού πώρου τονίζοντας τον σημαντικό ρόλο της στην έναρξη της ανακατασκευής. Σε παρόμοια μελέτη απενεργοποιώντας το γονίδιο της BMP-2 σε αρχικά στάδια της επουλωτικής διαδικασίας καταργήθηκε πλήρως η ενδοχόνδρια και ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση. Η έλλειψη της BMP-2 από τα περιοστικά προγονικά κύτταρα όχι μόνο σταμάτησε την κυτταρική διαφοροποίηση αλλά εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Περαιτέρω παρατήρηση μεταλλαγμένων για την BMP-2 κυττάρων σε χιμαιρικό σχηματισμένο περιοστικό πώρο έδειξε ότι λίγα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες, ακόμη και όταν τοποθετήθηκαν σε ένα φυσιολογικό περιβάλλον κατάγματος, δηλώνοντας τον απαραίτητο ρόλο της ενδογενούς BMP-2 στην σηματοδότηση του σχηματισμού του περιοστικού πώρου [70-72].

Μαζί με την BMP-2, διάφοροι άλλοι παράγοντες «κλειδιά» της οικογένειας των BMPs και των υποδοχέων τους εντοπίστηκαν στο ενεργοποιημένο περίοστεο συμπεριλαμβανομένων των BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMPRIA, BMPRII, noggin, και Smad1/5/8. Πιο συγκεκριμένα οι BMP-4, BMP-6 και BMP-7 έδειξαν υψηλή έκφραση κατά τη διάρκεια της ανακατασκευής του οστού ενώ η BMP-3 διαδραμάτισε κατασταλτικό ρόλο για την πρόωμη περιοστική ανάπτυξη [73].

Σχετιζόμενο με τις BMPs και την λειτουργία τους είναι το μονοπάτι hedgehog, και πιο συγκεκριμένα το Ihh σηματοδοτικό μονοπάτι. Έχει υποτεθεί ότι παίζει ουσιώδη και πρωταγωνιστικό ρόλο στην ενδοχόνδρια ανακατασκευή του

οστού μέσω της περιοστικής αντίδρασης. Συμβάλλει στην ανάπτυξη του περιχόνδριου και της οστικής πεταλιώδους ανάπτυξης και η έλλειψή του σταματά πρώιμα την οστεοβλαστική ανάπτυξη. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως το Ihh εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο χονδρογενή ιστό και στον πόρο του περιοστέου παρακείμενα της οστικής επιφάνειας κατά το αρχικό στάδιο της επούλωσης [74-76]. Αυτά τα παραγόμενα hedgehog κύτταρα προωθούν μηνύματα στα γειτονικά προγονικά χονδροκύτταρα, στους προγονικούς οστεοβλάστες όπως και σε κύτταρα υπεύθυνα για την προαγωγή αγγείων στην περιοχή. Για τον καθορισμό του ρόλου του μονοπατιού hedgehog στα κύτταρα περιοστέου κατά την επούλωση και την ανακατασκευή ο Wang και οι συνεργάτες του απομόνωσαν ένα μοναδικό πληθυσμό μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων κατά την 5<sup>η</sup> μέρα ανάπτυξης ενός αυτόλογου μοσχεύματος περιοστέου. Τα απομονωμένα περιοστικά κύτταρα εξέφρασαν μάρτυρες προερχόμενους από μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα όπως: SSEA4, CD105, CD29, CD140b και Scα1. Επομένως θα μπορούσαν να δώσουν γένεση σε οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα *in vitro*. Σε σχέση με μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από άλλους ιστούς, όπως αυτά του μυελού των οστών, τα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από το περίοστεο έδειξαν μεγαλύτερη απόκριση τόσο στην παρουσία της BMP-2 όσο και σε μόρια του μονοπατιού hedgehog. Σε πειράματα υπερέκφρασης μορίων του μονοπατιού hedgehog τα μεσεγχυματικά περιοστικά κύτταρα οδηγήθηκαν σε έκτοπη οστεοποίηση. Επίσης, σε αποσιώπηση γονιδίου υπεύθυνου για έναν υποδοχέα μεταγωγής σημάτων του hedgehog (Smoothened1) τα κύτταρα μείωσαν σημαντικά την περιοστική έκφραση για παραγωγή οστού. Αυτές οι μελέτες έδειξαν πόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μονοπάτι hedgehog στην επούλωση και ανακατασκευή του οστού προερχόμενη από το περίοστεο [35,77].

Η COX-2 ανακαλύφθηκε ως μια ισομορφή επαγωγής της κυκλοοξυγενάσης κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι των προσταγλανδινών. Η COX-2 επάγεται από διάφορες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, επάγοντας τους οστικούς αναβολικούς παράγοντες TGF-β, BMP-2, IGF, FGF. Η επαγωγή της COX-2 εντοπίζεται στα προγονικά χονδροκύτταρα, στα χονδροκύτταρα και στις οστεοβλάστες. Έχει βρεθεί ότι η έλλειψη της COX-2 στο μεσέγχυμα ή στο χόνδρο εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των περιοστικών προγονικών κυττάρων και

καθυστερεί την ενδοχόνδρια και ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση κατά την ανακατασκευή του κατάγματος. Πειράματα σχετικά με την επούλωση του κατάγματος και τον ρόλο της COX-2 σε αυτή τη διαδικασία σε ηλικιωμένα ποντίκια σε σχέση με νεαρότερα, έδειξε μειωμένη επαγωγή της COX-2 στα ηλικιωμένα ποντίκια κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Θεραπεία όμως των ηλικιωμένων ποντικών με έναν αγωνιστή του υποδοχέα τύπου 4 των προσταγλανδινών, τον EP4, ανέστρεψε την καθυστερημένη ενδοχόνδρια οστεοποίηση υποδηλώνοντας την θετική δράση που θα είχε κατά την επούλωση του κατάγματος η «στόχευση» του υποδοχέα EP [78-82].

Το μονοπάτι Wnt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και τον σχηματισμό του οστού ενώ πρόσφατα οι ερευνητές ανακοίνωσαν πως παράγοντες κλειδιά του μονοπατιού, όπως η Wnt/β-κατενίνη, θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς παράγοντες για την ανακατασκευή και επούλωση του οστού. Πολλές από τις Wnt πρωτεΐνες και διαμορφωτές αυτών εκφράζονται στο περίοστεο. Γενετικά πειράματα σε ποντικούς όπου το μονοπάτι Wnt τροποποιήθηκε έδειξαν ότι η αναστολή της Wnt/β-κατενίνης μπορεί να καταστείλει την χονδρογένεση αλλά να ευνοήσει την οστεογένεση οδηγώντας σε επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι σημαντικά μονοπάτια, γνωστά για την διέγερση της επουλωτικής διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένων αυτών των BMP και hedgehog, επάγουν το Wnt μονοπάτι. Επιπροσθέτως, διακοπή της θεραπείας με PTH διεγείρει την επουλωτική διαδικασία με το να επάγει το μονοπάτι Wnt. Επίσης η προσταγλανδίνη E2, ο μεταβολίτης της COX-2, ενεργοποιεί το Wnt μέσω των υποδοχέων EP2 και EP4 [83-87].

### ***A2.3.1 Το περίοστεο στα παιδιά κατά την επουλωτική διαδικασία***

Η βασική διαφορά στο ανώριμο οστό είναι ότι έχει ένα παχύτερο, αγγειοβριθέστερο και αρκετά ισχυρότερο περίοστεο. Το παχύτερο περίοστεο στα παιδιά είναι πολύ πιο ανθεκτικό στη διάσπασή του και συχνά παρέχει, σε ένα βαθμό, την εγγενή σταθερότητά του στην περίπτωση κατάγματος. Το περίοστεο είναι επίσης, πιο μεταβολικά ενεργό στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Η



αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα συμβάλλει στην ταχύτερη πώρωση και ανακατασκευή ενός κατάγματος που εμφανίζεται σε νέους ασθενείς [88,89].

Τα κατάγματα στα παιδιά γενικά πωρώνονται πολύ πιο γρήγορα από εκείνα στους σκελετικά ώριμους εφήβους ή ενήλικες. Το περίοστεο επιτρέπει την ταχύτερη πώρωση και μικρότερους χρόνους ακινητοποίησης. Η καθυστερημένη πώρωση και η ψευδάρθρωση αποτελούν περιστατικά σπάνια στα παιδιά. Επιπλέον, στα παιδιά η ακινητοποίηση του κατάγματος με γύψινο επίδεσμο παρουσιάζει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης δυσκαμψίας και άλλες επιπλοκές. Η φυσιολογική διαδικασία της οστικής ανακατασκευής μπορεί να διορθώσει αστοχίες κάνοντας τις ακριβείς ανατάξεις λιγότερο σημαντικές στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες [90].

Το μεγαλύτερο υπο-περιστικό αιμάτωμα και η ισχυρότερη περιοστική απόκριση στα παιδιά συμβάλλουν στον ταχύτερο σχηματισμό του πώρου και την επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας. Το υγιές και δυνατό περίοστεο είναι ζωτικής σημασίας για την επούλωση ενός κατάγματος και πρέπει να διατηρηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο μετά από κάποια χειρουργική παρέμβαση. Μεγάλα τμήματα των οστών συχνά θα αναγεννηθούν και αναδιαμορφωθούν εφ' όσον η περιοστική περιοχή παραμείνει άθικτη [91].

Τα γονίδια και οι ορμόνες που είναι απαραίτητες για την αρχική διαμόρφωση του σκελετού είναι τα ίδια, ή τουλάχιστον παρόμοια στις περισσότερες περιπτώσεις, με αυτά που χρειάζονται για την πώρωση των καταγμάτων. Αυτό το οστεογενετικό περιβάλλον του παιδιού υποδεικνύει ότι οι διαδικασίες επούλωσης του κατάγματος είναι ήδη σε εξέλιξη κατά τη στιγμή του κατάγματος, αφού ο σκελετός αναπτύσσεται και όλες οι μορφές οστεοποίησης όπως και όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια της οστεογένεσης είναι παρόντα και ενεργοποιημένα. Αντίθετα, στους ενήλικες αυτοί οι παράγοντες πρέπει να ανακληθούν, με αποτέλεσμα την πιο αργή διαδικασία πώρωσης σε αυτούς. Όταν το κάταγμα έχει πωρωθεί, ο αναπτυσσόμενος ακόμη σκελετός μπορεί να διορθώσει τυχόν ανωμαλίες της ευθυγράμμισης του κατάγματος [88,89].

Το σημαντικό με το περίοστεο στην εμβιομηχανική του κατάγματος συνήθως παραγνωρίζεται. Η κάμψη που επιφέρει το κάταγμα προκαλεί μια ελαστική δύναμη στον φλοιό του οστού από τη μία μεριά και μία συμπιεστική δύναμη του φλοιού από την αντίθετη πλευρά. Καθώς το περίοστεο είναι πλούσιο σε κολλαγόνο,

διαθέτει μία υψηλή ελαστική δύναμη. Γι' αυτό το λόγο, το περίοστεο δέχεται και ανθίσταται στην τάση που επιβάλλεται στον φλοιό και έτσι συνεισφέρει στην αύξηση της αντοχής του κατάγματος του οστού από κάμψη [91].

Το περίοστεο είναι αυτό που μπορεί να συμβάλλει στον περιορισμό αστοχιών κατά την ανάταξη αλλά μπορεί και να επιτρέψει μικρές ατέλειες. Τα παιδιά διαθέτουν πολύ πιο παχύ και πυκνό περίοστεο από τους ενήλικες. Κατανοώντας αυτό, όπως επίσης και τις αρχές που διέπουν την ανάταξη των καταγμάτων, ο Salter διευκρινίζει πως, αυτή η ιδιότητα του περιosteού επιτρέπει τους χειρισμούς κατά την ανάταξη και την χρήση διαφόρων τεχνικών τοποθέτησης γύψινων επιδέσμων, διατηρώντας μια αποδεκτή ευθυγράμμιση του τραύματος, διότι η περιεστική ευκαμψία-κάλυψη μειώνει την παρεκτόπιση του κατάγματος και αυξάνει την δυνατότητα επούλωσής του. Το συμπιεσμένο μέρος (κοίλο μέρος) του περιosteού είναι αυτό που συνήθως παραμένει ανέπαφο. Το μαλακό οστό στη συνέχεια αντικαθίσταται από σκληρότερο οστό [92]. Ίσως η πιο σημαντική ικανότητα ενός ανώριμου οστού είναι η ικανότητά του να ανακατασκευαστεί πλήρως και σε μικρό χρόνο μετά από τραυματισμό. Οι δυνατότητες της αναδόμησης ενός οστού εξαρτώνται από την ηλικία του παιδιού, τον αριθμό των ετών της ανάπτυξης που υπολείπονται, τη γειτνίαση με τη μετάφυση, το μέγεθος της γωνιώδους παραμόρφωσης και το επίπεδο της γωνίωσης σε σχέση με τις παρακείμενες αρθρώσεις [93].

#### **A2.4 Αποτυχία της πώρωσης**

Παρά τη σωστή αντιμετώπιση, κάποια κατάγματα πωρώνονται αργά ή αποτυγχάνουν να πωρωθούν. Είναι δύσκολο να προσδιορισθεί ο χρόνος που χρειάζεται ένα συγκεκριμένο κάταγμα για να πωρωθεί αλλά όταν η πώρωση προχωράει αργότερα από το μέσο όρο, τότε αναφερόμαστε σε καθυστερημένη πώρωση. Η καταγματική γραμμή παραμένει ακτινολογικά εμφανής, αλλά δεν υπάρχει πραγματικό καταγματικό κενό, οστεόλυση των επιφανειών ή σκλήρυνση. Αυτή η καθυστερημένη πώρωση του κατάγματος μπορεί να συσχετίζεται με την βαρύτητα της κάκωσης, την πτωχή αιματική παροχή, την ηλικία, την διατροφική κατάσταση του ασθενούς, το κάπνισμα, τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών ή άλλους

παράγοντες. Δεν αποτελεί ένα μη πωρωθέν κατάγμα αλλά περισσότερο μια παραλλαγή της φυσιολογικής πώρωσης. Η αποτυχία της πώρωσης ή ψευδάρθρωση οφείλεται στη διακοπή της διαδικασίας της πώρωσης [46].

#### **A2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την πώρωση του κατάγματος**

Σε πολλές περιπτώσεις παράμετροι που έχουν σχέση με τον αρχικό τραυματισμό και την ταυτότητα του ασθενούς, αναγνωρίζονται ως υπαίτιοι για την καθυστερημένη πώρωση ή την ψευδάρθρωση. Κάποιες από τις παραμέτρους αυτές έχουν μελετηθεί και αποδειχθεί πειραματικά αλλά ίσως δεν παρουσιάζουν σημαντική κλινική σημασία, ενώ άλλες δεν έχουν ερευνηθεί εκτενώς σε πειραματικά μοντέλα αλλά η κλινική εμπειρία δείχνει ότι παρεμποδίζουν την πώρωση.

Συνοπτικά, οι παράγοντες που έχουν σχέση με τον *τραυματισμό* έχουν να κάνουν με: α) τα ανοιχτά κατάγματα, β) τη διαταραχή της αιματικής παροχής, γ) την βαρύτητα της κάκωσης, δ) τα ενδαρθρικά κατάγματα και ε) την ανατομία του κατάγματος.

Επίσης, οι παράγοντες που έχουν σχέση με τον *ασθενή* και την εξέλιξη του κατάγματός του, σε γενικές γραμμές είναι οι εξής: α) ηλικία, β) γενική κατάσταση και διατροφή, γ) συστηματικές ορμόνες, δ) νευρολογικοί παράγοντες, ε) παράγοντες που έχουν σχέση με τη θεραπεία (π.χ. μηχανική φόρτιση), στ) βιοχημικοί παράγοντες, ζ) άλλοι παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία, ηλεκτρομαγνητικά πεδία, φαρμακευτικές ουσίες κ.α.) και η) άλλες συνήθειες (π.χ. κάπνισμα).

### **A3. ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ, ΑΝΑΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΩΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Η οστογενετική ανάπτυξη αρχίζει από την ώρα της γονιμοποίησης και τερματίζει με την διαφοροποίηση, ανάπτυξη και ωρίμανση των εξειδικευμένων ιστών και οργάνων. Αυτές οι αναπτυξιακές διαδικασίες χαρακτηρίζονται από μοριακή εξειδίκευση η οποία συνοδεύει την κυτταρική διαφοροποίηση και την μορφογένεση των ιστών. Οι περισσότερες από αυτές ολοκληρώνονται αμέσως μετά την γέννηση ή κατά την σεξουαλική ωρίμανση του οργανισμού αλλά κάποιες μορφογενετικές διαδικασίες είτε ενεργοποιούνται ξανά μετά από κάποιο τραυματισμό συγκεκριμένου ιστού είτε δεν σταματούν να ανανεώνονται κατά τη διάρκεια όλης της ζωής. Ο ανθρώπινος σκελετός ανανεώνεται συνεχώς και πολλές φορές η μοριακή ανάπτυξη-αναδόμηση ακολουθεί διαφορετικά μονοπάτια από αυτά της εμβρυικής και μετεμβρυικής ανάπτυξης [66,94,95].

Όσον αφορά λοιπόν τον διαρκώς ανανεούμενο ανθρώπινο οστίτη ιστό διάφορες ομάδες διαλυτών πρωτεϊνικών παραγόντων διαδραματίζουν ρόλο ως ρυθμιστές της οστεοεπαγωγικής δράσης. Μερικοί από αυτούς και κυριότεροι είναι, η υπερικογένεια του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-beta), ο άλφα παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α), αγγειογενετικοί παράγοντες και η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH, PTH/PTHrP). Ο λόγος που έχει δοθεί τόσο μεγάλη έμφαση στους παραπάνω παράγοντες είναι πως λόγω της δράσης τους στην οστεογένεση έχουν στοχοποιηθεί από τους ερευνητές με απώτερο σκοπό την χρήση τους ως θεραπευτικών παραγόντων [66,94,95].

#### **A3.1 Υπερικογένεια TGF-beta**

##### **A3.1.1 TGF-β (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β)**

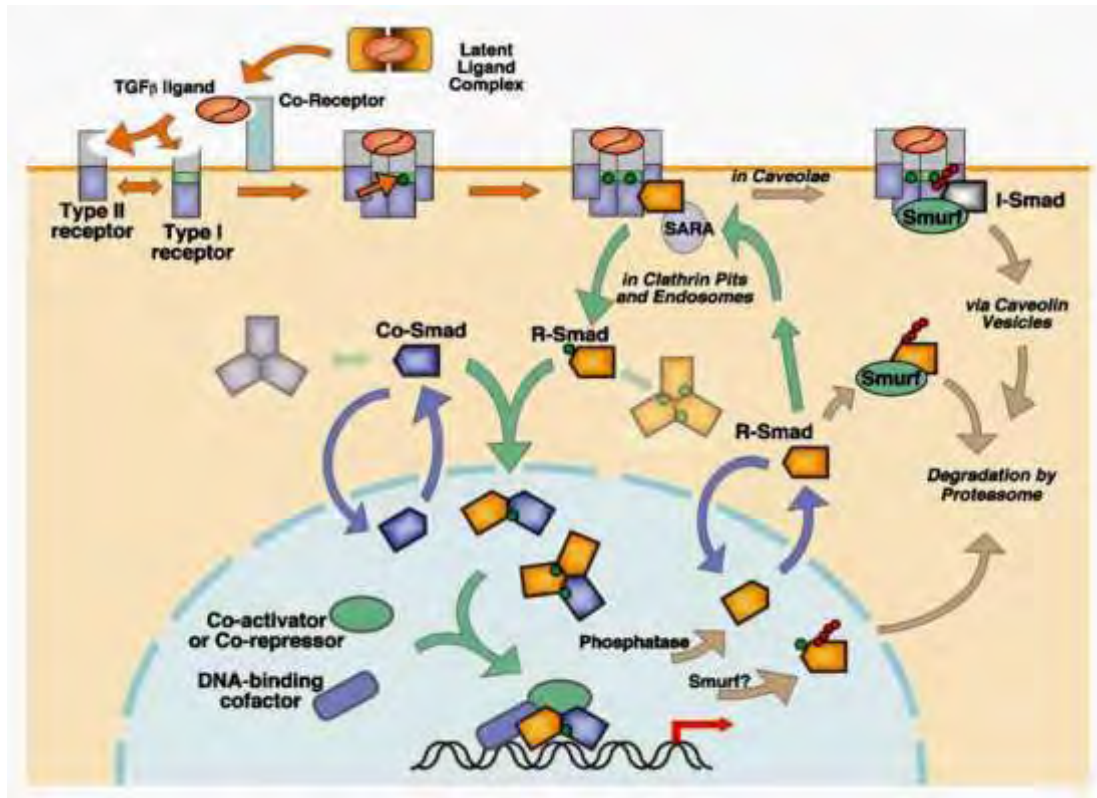
Ο TGF-β είναι μια εκκρινόμενη ομοδιμερής πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε δυο δεκαετίες πριν, ως ο παράγοντας ο οποίος επάγει την αύξηση του νεφρού του ποντικού. Από τότε μέχρι σήμερα, ο TGF-β βρέθηκε ότι είναι αρνητικός ρυθμιστής

του πολλαπλασιασμού σε ευρύ φάσμα κυτταρικών σειρών. Τελευταίες μελέτες ανέδειξαν τον TGF- $\beta$  ως ένα πολυδύναμο αναπτυξιακό παράγοντα, ο οποίος δρα σε όλο το σώμα ενώ επηρεάζει τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Η υπερικογένεια του TGF- $\beta$  αριθμεί πάνω από 30 μέλη μόνο στα σπονδυλωτά και ενέχεται σε μια πληθώρα αναπτυξιακών και μεταβολικών διεργασιών του ανθρώπινου οργανισμού. Ο ρόλος του TGF- $\beta$  έχει εμπλακεί στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης, της εναπόθεσης της εξωκυττάριας ουσίας και της απόπτωσης. Στην οικογένεια του TGF- $\beta$  ανήκουν οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (bone morphogenetic proteins, BMPs), οι ακτιβίνες (activins), οι ινχιμπίνες (inhibins) και οι παράγοντες της ανάπτυξης και διαφοροποίησης (growth and differentiation factors, GDFs) [94-97].

Στα οστά ο TGF- $\beta$  παράγεται από τους οστεοβλάστες σε ανενεργή μορφή και συγκεκριμένα σε συμπλέγματα που περιλαμβάνουν τη λεγόμενη «πρωτεΐνη σε λανθάνουσα μορφή», [latent TGF- $\beta$ -binding protein-1 (LTBP1)]. Για να προκύψει η ενεργή μορφή θα πρέπει αφενός να απελευθερωθεί από την οστική θεμέλια ουσία και αφετέρου από την LTBP1. Η ενεργοποίηση του TGF- $\beta$  γίνεται όταν βρεθεί σε όξινο περιβάλλον όπως επίσης όταν δράσουν στην λανθάνουσα μορφή του πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η πλασμίνη, η MMP-9 και η MMP-2 [98].

Οι οστεοβλάστες διαθέτουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας με τον TGF- $\beta$ , μπορούν όμως και οι ίδιοι να τον παράγουν. Ο TGF- $\beta$  όταν προστίθεται σε οστεοβλαστικά κύτταρα, προκαλεί επιπλέον παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) που προάγει με την σειρά του την τοπική αγγειογένεση. Η δράση του TGF- $\beta$  επάγεται μέσω διαμεμβρανικού υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί ενδοκυττάρια μονοπάτια, με κυριότερο αυτό των SMAD (Εικόνα A1.14). Οι SMAD διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες : τις R-SMAD (SMAD-1,-2,-3,-5,-8), την Co-SMAD (SMAD-4) και τις ανασταλτικές SMAD (SMAD-6, -7). Οι R-SMAD διεγείρονται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα του TGF- $\beta$  και σε συνεργασία με την Co-SMAD, με δεσμευτικούς του DNA παράγοντες και με μεταγραφικούς ρυθμιστές τροποποιούν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Οι ανασταλτικές SMAD ανταγωνίζονται τη δράση των R-SMAD. Άλλα ενδοκυττάρια μονοπάτια τα οποία ενεργοποιεί ο TGF- $\beta$

περιλαμβάνουν την οικογένεια των Rho GTPases, την MAPK και την πρωτεϊνική κινάση B (PKB) [99].



Εικόνα A1.14 Διάγραμμα που απεικονίζει την μεταγωγή σήματος από την κυτταρική μεμβράνη προς τον πυρήνα. Η μεταγωγή σήματος από τον TGF-β πραγματοποιείται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης. Οι I-SMADs αναστέλλουν την μεταγωγή σήματος από το σύμπλοκο R-SMAD-Co-SMAD. Τα βέλη δείχνουν την ροή του σήματος και ανάλογα με το χρώμα που έχουν αντιστοιχούν: πορτοκαλί, πρόσδεση του συνδέτη και ενεργοποίηση του υποδοχέα, γκρι, απενεργοποίηση της SMAD και του υποδοχέα, πράσινο, ενεργοποίηση της SMAD και δημιουργία του μεταγραφικού συμπλόκου, μπλε, μετακίνηση της SMAD από και προς τον πυρήνα. Οι φωσφορικές ομάδες και η ουβικιτινίωση παρουσιάζονται με πράσινους και κόκκινους κύκλους αντίστοιχα.

(Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.)

## A3.2 Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (BMPs)

### A3.2.1 Βασικές γνώσεις

Μια μακρά πορεία κατανόησης και ακολούθως εφαρμογής διαγράφεται για τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) από την δημοσίευση του Urist το 1965 στο περιοδικό Science, όπου περιγράφει

παραγωγή οστού δι' αυτεπαγωγής, στην δημοσίευσή του το 1971, όπου εμφανίζεται σε «ενικό αριθμό» η ονομασία Bone Morphogenetic Protein, την κάθαρση της πρωτεΐνης από τον Urist και την κλινική εφαρμογή της από τον Johnson. Η σειρά αυτή (Level-4) έδωσε ενθαρρυντικά κλινικά αποτελέσματα και πυροδότησε το ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα επί του θέματος. Ο Reddi και οι συνεργάτες του εν συνεχεία παρατήρησαν την ακολουθία των κυτταρικών γεγονότων μετά από εμφύτευση των BMPs σε πειραματόζωα και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προσέλκυσαν το ενδιαφέρον πολλών μοριακών βιολόγων και κυτταρολόγων γύρω από το πεδίο των BMPs και των ιδιοτήτων τους. Σήμερα, μετά από 20 χρόνια αφού τα γονίδια των BMPs αναγνωρίστηκαν, γνωρίζουμε ότι οι BMPs ενέχονται στην ανάπτυξη σχεδόν όλων των οργάνων και των ιστών των σπονδυλωτών. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι διαφορετικοί οργανισμοί αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας παρόμοια ρυθμιστικά μόρια και αναπτυξιακές στρατηγικές και ότι τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια εμφανίζονται ως βήματα κλειδιά στην ανάπτυξη του κοραλλιού, του αχινού, του σκουληκιού, της μύγας, του βατράχου, της κότας, του ποντικού και του ανθρώπινου οργανισμού. Κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών, οι BMPs, δρουν άμεσα ή έμμεσα σε κύτταρα στόχους και επιδρούν στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός πως οι BMPs αλληλεπιδρούν με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ούτως ώστε να σχηματίσουν όργανα, ιστούς αλλά και το κυριότερο να ελέγξουν την ίδια τους την λειτουργία [94,95,100].

Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως παράγοντες κυτταρικών σημάτων και χαρακτηριστικά οι BMPs παίζουν ένα κριτικό ρόλο στην διέγερση των κυττάρων για οστική παραγωγή και επούλωση. Με την σύνδεσή τους στους επιφανειακούς υποδοχείς των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενεργοποιούν ένα καταρράκτη σημάτων προς τον πυρήνα αυτών των κυττάρων. Η δραστηριότητα των γονιδίων εκφράζεται με την παραγωγή μακρομορίων που ενέχονται στην αποκατάσταση βλαβών οστού και χόνδρου και τα μεσεγχυματικά κύτταρα ακολούθως θα διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα, ή οστεοβλάστες [28,100].

Οι BMPs, εκτός της BMP-1, είναι λειτουργικοί αναπτυξιακοί παράγοντες που ανήκουν στην υπερικογένεια του TGF- $\beta$  και περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης (growth and differentiating factors,

GDFs). Συμμετέχουν τόσο στις διαδικασίες εμβρυϊκής ανάπτυξης του σκελετού και άλλων οργάνων, όσο και στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, στην απόπτωση και μορφογένεση των κυττάρων διαφορετικών οργάνων και συστημάτων αλλά και στη διαδικασία της οστικής αναδόμησης/ανακατασκευής του σκελετού του ενήλικα (bone remodeling). Υπάρχουν 43 μέλη αυτής της οικογένειας γονιδίων, τα οποία έχουν αναγνωρισθεί στα περισσότερα είδη όπως ο *Caenorhabditis elegans*, η δροσόφιλα, ο *Xenopus*, η κότα, το ποντίκι και ο άνθρωπος. Η παρουσία αυτών των υψηλά διατηρημένων μορίων σε τόσο διαφορετικά είδη, δείχνει πως προέρχονται από μια αρχαία ομάδα προγονικών γονιδίων τα οποία έχουν διπλασιαστεί με τον καιρό και των οποίων η λειτουργία έχει αλλάξει για να ανταπεξέλθει στις ανάγκες του κάθε είδους [100,101].

Τα μέλη της υπερικογένειας του TGF- $\beta$  στην προ-πρωτεϊνική τους μορφή παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομολογία μεταξύ των ειδών στην αμινοξική περιοχή και για αυτό το λόγο επιτυγχάνεται μία πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Όπως σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες της υπερικογένειας έτσι και οι BMPs περιέχουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο με επτά υψηλά διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης μέσα στο ώριμο καρβοξυτελικό άκρο απαραίτητο για το σχηματισμό και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Καθώς το καρβοξυτελικό άκρο των πρόδρομων μορίων απομακρύνεται με πρωτεόλυση, ακολουθεί ο διμερισμός και η ωρίμανση και η έκκριση δραστικών ομοδιμερών ή ετεροδιμερών BMPs [68-70]. Αυτή η τριτοταγής δομή θεωρείται σημαντική για την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων υποδοχέων. Η παρουσία των 6 από τις 7 κυστεΐνες στην ίδια περιοχή της τελικής (τριτοταγής) μορφής των BMPs προσδίδει υψηλή αντοχή των μορίων στην υψηλή θερμοκρασία, σε διάφορες χημικές ουσίες και σε ακραίες τιμές pH. Η περιοχή αυτή επίσης φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των διμερών μιας και είναι ο λόγος σχηματισμού του δισουλφιδικού δεσμού με τον οποίο ενώνονται οι δύο μεγάλες αλυσίδες πολυπεπτιδίων [100,102,103].

Περίπου 20 μέλη της οικογένειας των BMPs έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Οι BMPs συντίθενται ως μεγάλα πρόδρομα μόρια, άνω των 400 αμινοξέων και μάζας 30-38 kDa. Με την ωρίμανσή τους εμφανίζονται ως διμερή μόρια των 110-140 αμινοξέων και μάζα 15-25 kDa. Τα γονίδια που εκφράζουν τις BMP-2 και BMP-7 εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 20. Η BMP-6 εντοπίζεται στο



χρωμόσωμα 6 ενώ η BMP-4 στο χρωμόσωμα 14. Η δομή, η χημική σύσταση, η λειτουργία και ιδιαίτερα η διαφορά στην αμινομάδα που φέρει το μόριο τους, διαχωρίζουν τις μορφογενετικές πρωτεΐνες σε περισσότερες υποκατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι BMP-2 και BMP-4 με πολλές ομοιότητες στη δομή και τη χημική τους σύνθεση. Οι BMP-5, BMP-6, BMP-7 (που ονομάζεται και οστεογενετική πρωτεΐνη- 1, OP-1) και BMP-8 (OP-2) και 8b (OP-3), συνιστούν μία δεύτερη κατηγορία. Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης -5 (GDF-5 ή όπως ονομάζεται μορφογενετική πρωτεΐνη -1 προερχόμενη από χόνδρινο ιστό-CDBMP-1), ο GDF-6 (που ονομάζεται BMP-13), ο GDF-7 (ή BMP-12) και η BMP-14 ανήκουν στην τρίτη κατηγορία μορφογενετικών πρωτεϊνών, ενώ η BMP-3 και 3b (οστεογενίνη), συνιστά μια ξεχωριστή κατηγορία με αρκετές χημικές, δομικές και λειτουργικές διαφορές. Τέλος, ξεχωριστές κατηγορίες μορφογενετικών πρωτεϊνών αποτελούν οι BMP-11 και GDF-8 (μυοστατίνη) αντίστοιχα [104,105].

### **A3.2.2 Υποδοχείς Οστικών Μορφογενετικών Πρωτεϊνών (BMPs Receptors, BMPRs)**

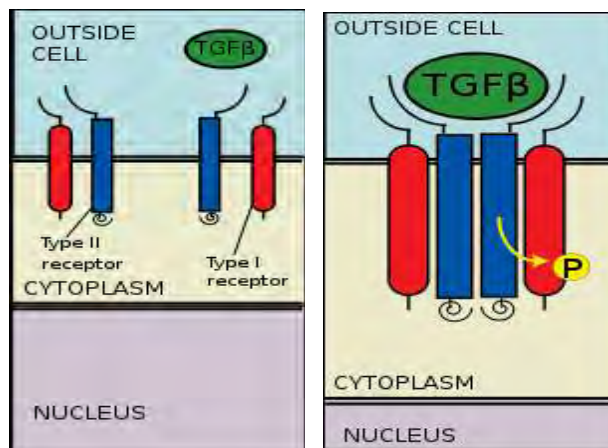
#### *A3.2.2.i Υποδοχείς TGF-β πρωτεϊνών*

Αν και οι BMPs αναγνωρίστηκαν αρχικά ως πρωτεΐνες που επάγουν την παραγωγή οστού σε εξωσκελετικές περιοχές, νεότερες έρευνες δείχνουν πως αποτελούν περίπλοκες κυτταροκίνες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των οστεοβλαστών, χονδροκυττάρων, νευρικών και επιθηλιακών κυττάρων. Οι υποδοχείς των TGF-β υποδοχέων, και των BMPs, έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Τα περισσότερα μέλη των TGF-β υποδοχέων δρουν μέσω του σχηματισμού συμπλόκων δυο διαφορετικών τύπων υποδοχέων κινάσης σερίνης-θρεονίνης: του υποδοχέα τύπου I 50-55 kDa και του υποδοχέα τύπου II 75 kDa.

Οι TGF-β υποδοχείς τύπου I και II (TβR-I, TβR-II) (Εικόνα A1.15) είναι απαραίτητοι για την επαγωγή του σήματος. Μετά την πρόσδεση του επαγωγέα σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο υποδοχέων. Οι δυο τύποι υποδοχέων αποτελούνται από τρία μέρη: μια μικρή εξωκυτταρική δομή που φέρει 10-12

κατάλοιπα κυστεΐνης, μια μεμβρανική δομή και ενδοκυτταρικές περιοχές με περιοχές πρόσδεσης κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Οι περιοχές πρόσδεσης της κινάσης σερίνης-θρεονίνης παρουσιάζουν 41% ομοιότητα ανάμεσα στους δυο τύπους υποδοχέων. Ο υποδοχέας τύπου I έχει μια περιοχή που φέρει το μοτίβο SGSGS (GS domain) και αυτό είναι που τον κάνει να διαφέρει από τον υποδοχέα τύπου II [106,107].

Η πρόσδεση της TGF- $\beta$  πρωτεΐνης στον υποδοχέα T $\beta$ R-II, που φέρει και την δραστική κινάση, επιφέρει την προσκόλληση του T $\beta$ R-I σε αυτό το σύμπλοκο. Στη συνέχεια η κινάση του T $\beta$ R-II φωσφορυλιώνει την περιοχή GS στον T $\beta$ R-I, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης του T $\beta$ R-I. Επομένως, όπως φαίνεται η εξειδίκευση του σήματος οφείλεται κυρίως στον TGF- $\beta$  υποδοχέα τύπου I. Η φωσφορυλίωση του T $\beta$ R-I είναι απαραίτητη για την επαγωγή του σήματος, καθώς η επαγωγή καταστέλλεται σε κύτταρα με ανενεργό T $\beta$ R-II, μετά από μετάλλαξη των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στη GS περιοχή του T $\beta$ R-I ή μετά από μετάλλαξη του T $\beta$ R-II που τον καθιστά ανίκανο να φωσφορυλιώσει τον T $\beta$ R-I. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως ο T $\beta$ R-II είναι η αρχική πρωτεΐνη που προσδένει την TGF- $\beta$  πρωτεΐνη και πως ο T $\beta$ R-I είναι ένας απλός επαγωγέας του σήματος [108,109].



*Εικόνα A1.15 Πρόσδεση και ενεργοποίηση των υποδοχέων T $\beta$ R-I και T $\beta$ R-II υποδοχέα.*

### A3.2.2.ii Υποδοχείς BMPs (BMP Receptors)

Η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης BMP σε έναν τουλάχιστον τύπου I και έναν τύπου II υποδοχέα (BMPR-I, BMPR-II) είναι απαραίτητη για την επαγωγή του σήματος. Υπάρχουν τρεις BMPR-I: Alk2, Alk3 (BR1a) και Alk6 (BR1b) και άλλοι τρεις

τύπου II: BRII, ActRII και ActRIIB. Οι τύπου I υποδοχείς είναι εκείνοι με την υψηλή ικανότητα πρόσδεσης, ενώ οι τύπου II προσδένουν τις BMPs με χαμηλή προσδεσιμότητα. Επίσης είναι γνωστό πως οι BMPs προσδέονται με διαφορετική ικανότητα σε ειδικούς τύπου I και II υποδοχείς. Αυτό αποδεικνύει πως η προσδεσιμότητα των BMPs στους υποδοχείς είναι σημαντική για την επαγωγή του σήματος και οδηγεί στην υπόθεση πως κάποιες BMPs προτιμούν ορισμένους τύπους υποδοχέων. Επίσης έχει γίνει γνωστό πως διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, εκφράζουν διαφορετικούς συνδυασμούς υποδοχέων και ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων που οδηγούν στην ποικιλότητα των σηματοδοτικών αντιδράσεων στα κύτταρα, όμως αυτός ο τομέας δεν έχει εξερευνηθεί πλήρως [110-112].

### **A3.2.3 Λειτουργία μονοπατιού μέσω των BMPs**

#### *A3.2.3.i Πρωτεΐνες πρόσδεσης στους BMPRs*

Σε αντίθεση με τους TGF- $\beta$  υποδοχείς, λίγες πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί που να προσδέονται στους υποδοχείς των BMPs. Οι πρωτεΐνες R-Smads μπορούν να προσδεθούν σε όλους τους τύπου I υποδοχείς και εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης των Smad. Επίσης η πρωτεΐνη XIAP είναι μια ακόμη πρωτεΐνη που προσδέεται στους BMP υποδοχείς, η οποία προσδέει την TAB1 και επομένως αποτελεί τον σύνδεσμο για το μονοπάτι TAB1/TAK1. Έχει βρεθεί μάλιστα πως η XIAP1 αλληλεπιδρά με την TAB1 και τον υποδοχέα Alk3. Μια ακόμη πρωτεΐνη που προσδέεται στους BMPRs είναι η BRAM1. Η BRAM1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και επίσης προσδέει την TAB1, γεγονός που δείχνει πως και αυτή είναι ικανή να προσδεθεί στην Alk3 και την TAB1 [110,113-115].

#### *A3.2.3.ii Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών*

Οι πρωτεΐνες Smad μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τις πρωτεΐνες Smad που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (R-Smads), τις Smad που δρουν σαν απλοί μεσολαβητές (Co-Smad) και τις κατασταλτικές Smad (I-Smad). Οι R-Smads (Smad1,

Smad5 και Smad8) φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I. Όσον αφορά τις Co-Smads, έχει απομονωθεί μόνο μια στα θηλαστικά (Smad4) και δυο στον Χερopus (Smad4α, Smad4β). Οι R-Smads και οι Co-Smads, έχουν δυο υψηλά διατηρημένες περιοχές, Mad-ομόλογες περιοχές MH1 και MH2, στην N-τελική και C-τελική περιοχή των πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Η περιοχή MH1 των R-Smads και Co-Smads χρησιμεύει στον σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών συμπλόκων. Τέλος, οι I-Smads (Smad6, Smad7) είναι πρωτεΐνες που εμποδίζουν την μεταγωγή του σήματος από τους TGF-β υποδοχείς, εμποδίζοντας τη δράση των R-Smads και Co-Smads [110,116].

### *A3.2.3.iii Οι πρωτεΐνες Smad ενέχονται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF-β/BMP*

Το μονοπάτι του TGF-β/ BMP (Εικόνα A1.16) αποτελεί μία ακόμη περίπτωση στην οποία η φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στη μεμβράνη πυροδοτεί τη μετατόπιση ενός μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα. Η οικογένεια του TGF-β περιλαμβάνει πολλούς συγγενικούς πολυπεπτιδικούς προσδέτες. Οι παράγοντες της οικογένειας του TGF-β προσδέονται σε υποδοχείς που συγκροτούνται από διαφορετικές υπομονάδες (τύπου I και II) οι οποίες έχουν ενεργότητα κινάσης, σερίνης/θρεονίνη. Στην πραγματικότητα, όλοι οι υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης, σερίνης/θρεονίνης είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TGF-β.

Αρχικά ο προσδέτης δεσμεύεται από έναν υποδοχέα τύπου II (διμερές υπομονάδων τύπου II) δημιουργώντας ένα σύμπλοκο το οποίο έχει υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα τύπου I (διμερές υπομονάδων τύπου I). Τελικά σχηματίζεται ένα τετραμερές σύμπλοκο στο οποίο ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I. Μια παραλλαγή συμβαίνει στην υποομάδα αυτών των υποδοχέων οι οποίοι προσδέουν τις BMPs. Στην περίπτωση όμως αυτή, τόσο οι υπομονάδες τύπου I όσο και υπομονάδες τύπου II έχουν χαμηλή συγγένεια για τον προσδέτη, ο συνδυασμός ωστόσο των διαφορετικών υπομονάδων έχει υψηλή συγγένεια [110,117].

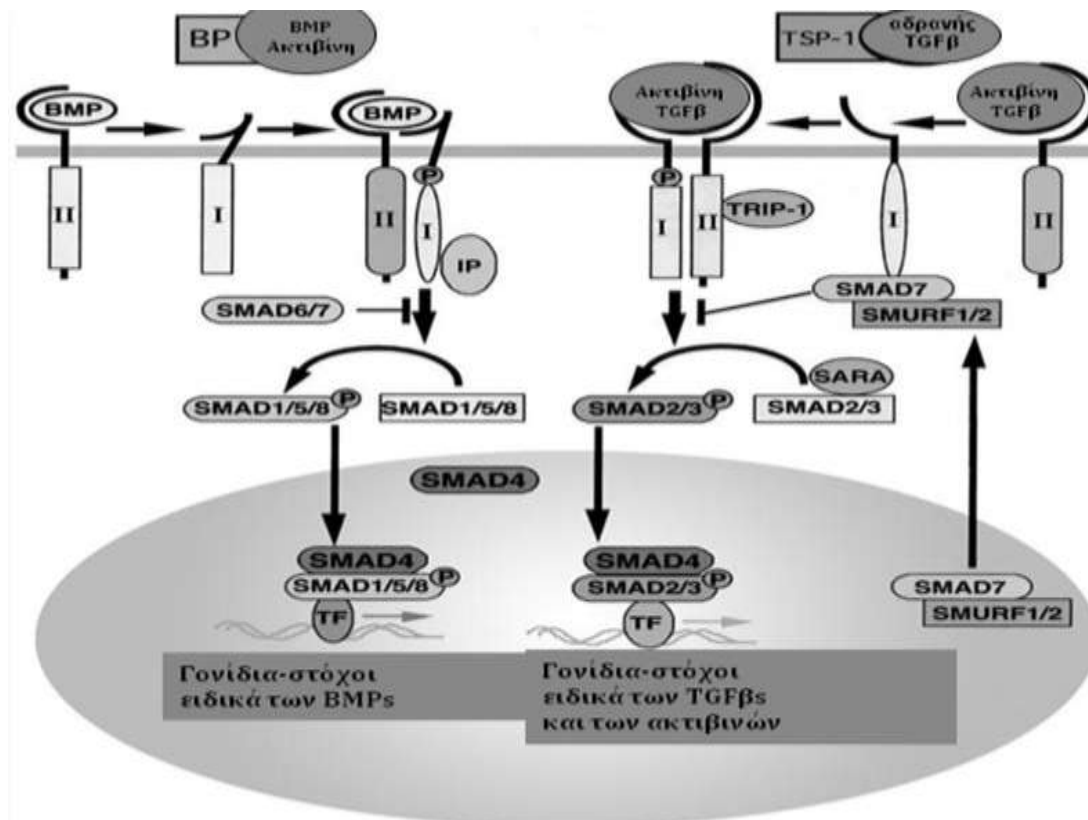
Μόλις σχηματιστεί το ενεργό, τετραμερές σύμπλοκο, ο υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει ένα μέλος της οικογένειας των κυτταροδιαλυτών παραγόντων

Smad. Πιο συγκεκριμένα όταν οι R-Smads προσδένονται στους BMPR-I ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου τους στην περιοχή SSXS. Η ενεργοποίηση του BMPR-I από τον BMPR-II είναι απαραίτητη για την άμεση ενεργοποίηση των R-Smads. Μόλις οι R-Smads ενεργοποιηθούν απελευθερώνονται από τους BMPR-I και αλληλεπιδρούν με τις Co-Smads για το σχηματισμό ετεροδιμερών και ομοδιμερών, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν στον πυρήνα για τη ρύθμιση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων στόχων. Στον πυρήνα οι Smads πρωτεΐνες ασκούν τη μεταγραφική δραστηριότητά τους είτε με άμεση πρόσδεση στο DNA είτε μέσω άλλων DNA-προσδεμένων πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων προκαλεί τις Smad πρωτεΐνες να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, τα οποία αποτελούνται είτε μόνο από R-Smads είτε από R-Smads και Co-Smads [110,118].

Υπάρχουν εννιά (9) πρωτεΐνες Smad, που διακρίνονται λειτουργικά σε τρεις κατηγορίες. Οι ενεργοποιητές που λειτουργούν αποκλειστικά σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι είναι οι Smad 2 και 3 (που μεσολαβούν στη σηματοδότηση μέσω TGF-b/ ακτιβίνης) και οι Smad 1 και 5 (που ενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω BMP). Η Smad 4 αποτελεί τον κοινό εταίρο διμερισμού για όλες τις Smad όλων των μονοπατιών. Οι κατασταλτικές Smad δρουν ως ανταγωνιστές των ενεργοποιητών Smad, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα του μονοπατιού. Στην υπεροικογένεια του TGF-b, κάθε προσδέτης ενεργοποιεί ένα συγκεκριμένο υποδοχέα που μετάγει σήματα μέσω ενός χαρακτηριστικού συνδυασμού πρωτεϊνών Smad. Διάφορες άλλες πρωτεΐνες προσδένονται στα διμερή των Smad και επηρεάζουν την ικανότητά τους να επιδρούν στη μεταγραφή [110].

Τα συστήματα σηματοδότησης αυτού του τύπου είναι σημαντικά στην πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη αφού συμμετέχουν σε μονοπάτια που καθορίζουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων ιστών (συνήθως κατά την επαγωγή του μεσοδέρματος και το σχηματισμό των οστών). Επίσης, επειδή ο TGF-b είναι ισχυρός καταστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το μονοπάτι αυτό ενέχεται και στην καταστολή όγκων [110].

Ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό του μονοπατιού του TGF- $\beta$  είναι η απλότητα της οργάνωσής του σε σύγκριση με άλλα μονοπάτια. Η εξειδίκευση του απλού αυτού μονοπατιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα συστατικά στοιχεία που συγκεντρώνονται στη μεμβράνη από τις διάφορες πρωτεΐνες Smad. Από τη στιγμή που έχει πυροδοτηθεί το μονοπάτι, λειτουργεί με έναν άμεσο, γραμμικό τρόπο. Το στοιχείο που φωσφορυλιώνεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (ο Smad) μετατοπίζεται το ίδιο στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει την μεταγραφή [110,116,117].



*Εικόνα A1.16 Η οδός διαβίβασης της των μοριακών εντολών της υπεροικογένειας των BMPs σε σχηματική αναπαράσταση.*

*(Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily. Endocrine Reviews 2002;23:787-823.)*

#### A3.2.3.iv Καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης Smad

Όταν δεν προσδένεται BMP πρωτεΐνη στον υποδοχέα, οι κατασταλτικές I-Smads εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά εξάγονται στο κυτταρόπλασμα με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Οι I-Smads ανταγωνίζονται τη σηματοδότηση μέσω των BMPs αλληλεπιδρώντας με τον ενεργοποιημένο BMPRI και εμποδίζοντας

έτσι την πρόσβαση σε αυτόν των R-Smads. Έχει επίσης δειχθεί πως η Smad6 εμποδίζει τη σηματοδότηση ανταγωνιζόμενη με τη Smad4 για το σχηματισμό ετεροδιμερών με την ενεργοποιημένη Smad1. Τέλος ένας τρίτος μηχανισμός καταστολής περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της Smad7 με τις Smurf1 και Smurf2. Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιέχει καταλυτικές περιοχές χαρακτηριστικές των E3 λιγασών της ουβικουΐνης, με τις οποίες ετοιμάζει τις Smad πρωτεΐνες για πρωτεασωματική και λυσοσωματική αποικοδόμηση [110,119].

#### *A3.2.3.v Ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAP-κινάσης μέσω του μονοπατιού TAB1/TAK1*

Η πρωτεΐνη TAB1 μπορεί να συνδεθεί στις XIAP και TAK1 αυξάνοντας έτσι τη δραστικότητα της TAK1. Επίσης μπορεί να προσδεθεί στην p38 και επίσης αυτοφωσφορυλιώνεται από την TAB1. Η TAK1 είναι μια MAP κινάση, η οποία ενεργοποιείται από την BMP-2 και την BMP-4. Αυτό δείχνει πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού p38 από τις BMP-2 και BMP-4 οφείλεται στην ενεργοποίηση των TAK1/TAB1 [120,121].

#### *A3.2.3.vi Καταστολή του μονοπατιού TAB1/TAK1*

Οι BMPs ενεργοποιούν δύο μονοπάτια, το μονοπάτι των Smad και εκείνο της p38 MAPK. Η έκφραση των Smad6 και Smad7 εμποδίζει δραματικά την επαγόμενη από την BMP-2 ανάπτυξη των νευριτών καθώς και την ενεργοποίηση του p38. Αυτό υποδεικνύει πως οι Smad6 και Smad7 έχουν κατασταλτική δράση στο μονοπάτι TAK1-p38.

Η Smad6 φυσιολογικά αλληλεπιδρά με την TAK1. Αυτό αποδείχτηκε μετά από καλλιέργεια COS7 κυττάρων και MH60/Smad6 κλώνων, όπου βρέθηκε πως η ενδογενής TAK1 συνδέεται στην Smad6. Αυτό δείχνει πως η Smad6 καταστέλλει άμεσα την δραστικότητα της TAK1 με φυσική αλληλεπίδραση [110,122,123].

### *A3.2.3.vii Συνεργάτες/καταστολείς του μονοπατιού των BMPs*

Οι πρωτεΐνες Smad1, Smad5 και Smad8 μπορούν να προσδεθούν στο DNA μέσω της περιοχής MH1. Για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων είναι απαραίτητοι κάποιοι συνεργάτες. Αυτοί είναι οι p300 και CB, οι οποίοι μπορούν να προσδένονται στην MH2 περιοχή των Smad1, Smad4 και Smad5 και να ενεργοποιούν την μεταγραφή. Οι πρωτεΐνες Tob και Ski δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής, μέσω της πρόσδεσης τους στην MH2 περιοχή των Smad1, Smad4 και Smad5 [124,125].

### **A3.2.4 Ανταγωνιστές των BMPs**

Η δραστικότητα των BMPs ρυθμίζεται για να διατηρεί τις κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις για μεταγραφική αυτορρύθμιση της έκφρασης των BMPs στις οστεοβλάστες, η οποία δρα ως μηχανισμός ρύθμισης για να μειώσει την έκθεση των κυττάρων στις BMPs. Η δραστικότητα των BMPs ελέγχεται από ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς παράγοντες. Μάλιστα οι BMPs ρυθμίζονται και σε διαφορετικά στάδια: (1) με καταστολή της αλληλεπίδρασης BMP-BMPR, (2) με την παρουσία μη σηματοδοτικών ψευδο-υποδοχέων, (3) με καταστολή της σηματοδότησης μέσω των κατασταλτικών Smads (I-Smads), (4) με καταστολή της σηματοδότησης μέσω ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που προσδένονται στις Smads και (5) με ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση των σηματοδοτικών μεσολαβητών των BMPs [126].

### *A3.2.4.i Εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs*

Οι εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές των BMPs αντιπροσωπεύουν μια ομάδα πεπτιδίων, τα οποία προσδένουν τις BMPs με υψηλή συγγένεια και εμποδίζουν την αλληλεπίδραση τους με τους υποδοχείς. Οι ανταγωνιστές των BMPs προσδένουν τις BMPs με διαφορετική συγγένεια. Τα περισσότερα που γνωρίζουμε για αυτές τις πρωτεΐνες, οφείλονται σε μελέτες στον Xenopus. Η πρωτεϊνική αλληλουχία των εξωκυτταρικών ανταγωνιστών χαρακτηρίζεται από μια συντηρημένη αλληλουχία



πλούσια σε κυστεΐνες. Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την ικανότητα των μορίων αυτών να αναδιπλώνονται και να εκθέτουν υδροφοβικά κατάλοιπα, χάρη στα οποία συμβαίνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Με βάση την αλληλουχία κυστεϊνών, διάφορες μελέτες έχουν κατατάξει αυτές τις πρωτεΐνες σε υποκατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν: (1) τη noggin, (2) την οικογένεια της chordin, (3) twisted gastrulation, (4) και την οικογένεια Dan. Αυτά τα μόρια συντίθενται στα οστεοβλαστικά κύτταρα και η έκφραση τους εξαρτάται συχνά από τις BMPs υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs [126,127].

#### *A3.2.4.ii Μη σηματοδοτικοί BMP ψευδο-υποδοχείς και ενδοκυτταρικοί ανταγωνιστές*

Ο BMP ψευδο-υποδοχέας και προσδέτης επίσης της ακτιβίνης, BAMBI είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με εξωκυτταρική περιοχή παρόμοια με εκείνη των υποδοχών TGF- $\beta$  τύπου IA και IB και εμποδίζει τη δράση των ενεργοποιημένων υποδοχών χωρίς άμεση αλληλεπίδραση με κάποια TGF- $\beta$  πρωτεΐνη ή BMP. Η BAMBI εκφράζεται μαζί με την BMP-4 κατά την εμβρυογένεση και παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και ανάπτυξη του εμβρύου. Εκφράζεται στους πλήρως διαφοροποιημένους οστεοβλάστες και τα μετάγραφα της αυξάνονται από τις BMPs, τις TGF- $\beta$  πρωτεΐνες και την Wnt.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω η λειτουργία των BMPs αναστέλλεται από τις Smad6 και Smad7 (I-Smads), οι οποίες συνδέονται στους τύπου I υποδοχείς των BMPs και εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση των Smad1/5/8 και τον ετεροδιμερισμό με την Smad4. Επίσης η Smad6 μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση των BMPs με πρόσθετους μηχανισμούς και να μεταβάλλει την αλληλεπίδραση των Smad1/5/8 με τους καταστολείς τους.

Μετά την φωσφορυλίωσή τους οι Smad1/5/8 διμερίζονται με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων των BMPs μέσω σύνδεσής τους σε GCCG,CAGA ή GC μοτίβα στην αλληλουχία του DNA στους υποκινητές των γονιδίων. Σε αυτή τη λειτουργία βοηθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες p300/CBP, c-Ski, SnoN και Tob [126,128,129].

### A3.3 BMPs: Δράση και λειτουργία

Οι BMPs κάνουν την εμφάνισή τους ήδη από τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Μετά τη γέννηση οι BMPs παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, λειτουργία και διατήρηση της οστικής μάζας. Επάγουν τη διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων του περιosteού και του μυελού προς την οστεοβλαστική σειρά και επάγουν την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, με τη σηματοδότηση που επιφέρουν μέσω των υποδοχέων τους. Η δράση των BMPs στα οστά έχει επιβεβαιωθεί με τη δημιουργία μοντέλων ποντικών στους οποίους διάφοροι προσδέτες των BMPs και των επιμέρους μεσολαβητών του σήματος έχουν τροποποιηθεί γενετικά με ιστο-ειδικό τρόπο. Επίσης προκλινικές μελέτες συνδέουν τις BMPs με την επούλωση των καταγμάτων [71].

Όταν οι BMPs εκκρίνονται από τα κύτταρα, η μοίρα τους δεν είναι προδιαγεγραμμένη. Μπορούν αμέσως να ασκήσουν την δράση τους τοπικά. Μπορεί να δεσμευτούν από εξωκυττάριους μοριακούς ανταγωνιστές στο σημείο έκκρισης τους ή μπορεί να αλληλεπιδράσουν με εξωκυττάρια πρωτεΐνες που βοηθούν στην απομόνωση ή εμπλουτίζουν την δράση των BMPs καθώς τις αγκιστρώνουν και ταυτόχρονα να τις κάνουν πιο ευάλωτες στην στοχοποίησή τους από άλλους παράγοντες.

Η δράση των BMPs είναι στενά συνδεδεμένη και σχετίζεται πάνω απ' όλα από την αναγνώρισή τους από τον κατάλληλο υποδοχέα. Ενώ είναι γνωστά τα σημεία ελέγχου που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των BMPs, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ρύθμιση της κυτταρο-ειδικής παραγωγής των BMPs και των υποδοχέων τους. Έχει γίνει ξεκάθαρο τα τελευταία χρόνια πως το διαθέσιμο ποσό των BMPs για την σηματοδότηση είναι αυστηρά ρυθμισμένο από την παρουσία διάφορων ευδιάκριτων δομικά ανταγωνιστών οι οποίοι μεταβάλλουν την ικανότητα των BMPs να προσδεθούν στους υποδοχείς τους και ουσιαστικά να μπλοκάρουν αποτελεσματικά την δράση τους. Οι ανταγωνιστές αυτοί διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Σ' αυτούς που είναι ικανοί να προσδεθούν με τις ώριμες πλέον BMPs δημιουργώντας ένα αδρανές μόριο, στους ανταγωνιστές σύνδεσης οι οποίοι επιφέρουν το ίδιο αποτέλεσμα και στους ανταγωνιστές προσδέτες που δεν επιτρέπουν την κατάληψη της θέσης πρόσδεσης στις BMPs [130].

Στα σκελετικά κύτταρα είναι παρόν ένας μηχανισμός αυτο-ρύθμισης των BMPs, και μάλιστα σε καλλιέργειες οστεοβλαστών βρέθηκε πως τα επίπεδα mRNA της BMP-4 εξαρτώνται άμεσα από τις υπόλοιπες BMPs. Οι υποκινητές των BMP-2 και BMP-4 περιέχουν αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Runx2, ο οποίος έχει βρεθεί πως ρυθμίζει την οστεοβλαστογένεση καθώς και την λειτουργία των ώριμων οστεοβλαστών [131].

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι δεν διαθέτουν όλες οι μορφογενετικές πρωτεΐνες ίδιου βαθμού οστεοεπαγωγική δράση. Οι BMP-2, BMP-6, και BMP-9 θεωρούνται ισχυρότεροι οστεοεπαγωγικοί παράγοντες δρώντας αρχικά σε αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα και στρέφοντάς τα στην οστεογενετική σειρά (οστεοπρογονικά κύτταρα), ενώ ακολούθως οι BMP-4 και BMP-7 διαδέχονται και συνδράμουν μαζί με τις προαναφερθείσες BMPs επάγοντας περαιτέρω την οστεοποιητική διαδικασία, συνεισφέροντας στην διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες κάτω πάντα υπό συγκεκριμένες συνθήκες [132]. Επιπροσθέτως οι BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 και BMP-9 αυξάνουν την έκκριση οστεοκαλσίνης και αλκαλικής φωσφατάσης στους προ-οστεοβλάστες, οδηγώντας στην ασβεστοποίηση του οστίτη ιστού. Η BMP-3 έχει οστεοεπαγωγική δράση, αλλά μπορεί επίσης να δράσει και ως αναστολέας με την παρουσία των BMP-2 και -7.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι BMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστές της οστεογενετικής σειράς διαφοροποιώντας τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα σε οστεοπρογονικά και προάγοντας περαιτέρω τα προγονικά αυτά κύτταρα σε ώριμους οστεοβλάστες μέσω ενός παρακρινούς ή/και αυτοκρινούς δρόμου [133].

### ***A3.3.1 BMPs κατά την πρόωμη ανάπτυξη***

Εάν η έκφραση ενός γονιδίου ή μιας υπερικογένειας αποτελεί τον αντικατοπτρισμό της πιθανής λειτουργίας της τότε θα είχε ευκόλως προβλεφθεί και κατανοηθεί για τις BMPs, ότι από τη στιγμή που αποδεδειγμένα επάγουν την οστεογενετική σειρά, θα εκφράζονταν, αν όχι αποκλειστικά, στις μεσεγχυματικές συμπυκνώσεις, προεικονίζοντας το μελλοντικό σκελετό, αναπτύσσοντας τα οστά και

διαφοροποιώντας χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες. Εν τούτοις, οι BMPs αποτελούν εξαίρεση σε μια τέτοια πιθανή θεωρία μιας και εκτεταμένες έρευνες έχουν συμπεράνει τον πολύπλευρο και σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι BMPs σε όλα τα στάδια της ζωής των σπονδυλωτών και ιδιαίτερα κατά την εμβρυογένεση. Παρακάτω γίνεται λόγος για τον ρόλο των σημαντικότερων από τις BMPs κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού ύστερα από μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα [105,134].

Έτσι λοιπόν η έκφραση της *BMP-2* εντοπίζεται πολύ νωρίς και ειδικά 8 μέρες μετά τη δημιουργία ζυγώτου σε μεσοδερματικά κύτταρα του άμνιου, σε χοριακά κύτταρα στο ενδόδερμα και στην αλλαντοϊδή μεμβράνη. Επίσης εντοπίζεται κατά την 9<sup>η</sup> μέρα στο εξώδερμα υπεύθυνο για τη δημιουργία του νευρικού αυλού ενώ κατά τη 10<sup>η</sup> μέρα εμφανίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του μυοκαρδίου. Τη 13<sup>η</sup> μέρα η έκφραση της *BMP-2* παρατηρείται στα μεσεγχυματικά κύτταρα υπεύθυνα για την ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης, των θωρακικών οστών, των δοντιών και των ματιών. Τέλος και κατά την προχωρημένη ανάπτυξη εντοπίζεται στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα των μακρών οστών και θεωρείται από τους ερευνητές από τους κύριους εκφραστές της έναρξης της χονδρογένεσης [101,105,134].

Η *BMP-4*, η οποία γενετικά σχετίζεται με την *BMP-2*, εμφανίζεται πολύ νωρίς κατά την δημιουργία του γαστριδίου την 7<sup>η</sup> μέρα στο άμνιο, την αλλαντοειδή μεμβράνη και το εξώδερμα. Κατά την 8<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> μέρα η έκφραση της *BMP-4* είναι ισχυρή και παρατηρείται στον νευρικό αυλό, στο μεσόδερμα, στην εξωτερική ραχιαία επιφάνεια του εξωδέρματος και στα πρώιμα νευρικά κύτταρα. Όσο η ανάπτυξη προχωρά η *BMP-4* εμφανίζεται στο αναπτυσσόμενο υπογάστριο, στο μυοκάρδιο, στα βραγχιακά τόξα, στο μάτι, στις πρώιμες κυψελίδες των αυτιών και στο νευρικό επιθήλιο. Όπως και η *BMP-2*, η *BMP-4* εντοπίζεται στο επιθήλιο και στους μεσεγχυματικούς ιστούς των άκρων και των δοντιών κατά την προχωρημένη ανάπτυξη του οργανισμού δείχνοντας τον ρόλο που παίζει στον χαρακτηρισμό και ανάπτυξη του σκελετού [101,105,134].

Η *BMP-6* έχει επίσης ένα ευρύ φάσμα έκφρασης. Την 8<sup>η</sup> μέρα εκφράζεται στον βραγχιακό σάκο και στον ενδόδερμα. Την 9<sup>η</sup> μέρα μετάγραφα του γονιδίου εντοπίζονται στον νευρικό αυλό. Κατά την περαιτέρω ανάπτυξη παρατηρείται στην

καρδιά, στο αναπτυσσόμενο νεφρό και δέρμα. Στον αναπτυσσόμενο σκελετό η BMP-6 εντοπίζεται στα υπερτροφικά χονδροκύτταρα [101,105,134].

Η BMP-7 παρατηρείται αρχικά κατά τη διάρκεια του γαστριδίου στο εξώδερμα της περιφέρειας του εμβρύου. Την 8<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> μέρα υπάρχει υψηλή έκφραση στην επιφάνεια του εξωδέρματος, της νωτιαίας χορδής, σε κύτταρα υπεύθυνα για την ανάπτυξη του υπογάστριου όπως επίσης και στον κοιλιακό θάλαμο. Κατά την ανάπτυξη παρατηρείται στο οπτικό νεύρο και τον κρυσταλλοειδή χιτώνα του ματιού. Στον αναπτυσσόμενο σκελετό, η BMP-7 εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα άκρα, στα μεσεγχυματικά κύτταρα υπεύθυνα για την ανάπτυξη του οστικού δακτυλίου και στις χονδρογενετικές ζώνες [101,105,134].

### **A3.3.2 Οι BMPs στην ανάπτυξη και αναδόμηση του σκελετού**

Ενώ ο καθορισμός του μεγέθους, της θέσης και του σχήματος των οστών συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, ο ενήλικος σκελετός υπόκειται σε συνεχή αναδιοργάνωση, μια διαδικασία γνωστή ως αναδόμηση/ανακατασκευή του οστού. Η αφαίρεση του υπάρχοντος οστού και η αντικατάστασή του από νέο οστό επιτυγχάνεται με έναν υψηλά ελεγχόμενο τρόπο και απαιτεί την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών από προγονικά κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό των οστών, το ενδόστεο και το περίοστεο. Τόσο οι οστεοβλάστες όσο και οι οστεοκλάστες φαίνεται να επηρεάζονται από μία συστηματική και τοπική σηματοδότηση όπως επίσης και από μηχανική διέγερση [94,95].

Έχει προταθεί πως οι BMPs συμπεριφέρονται ως τοπικά σηματοδοτικά μόρια που επάγουν την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοπρογονικά κύτταρα και οστεοβλάστες. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν τις BMPs να είναι παρούσες στην θεμέλια ουσία σε μία μορφή που επιτρέπει την απελευθέρωσή τους και παρουσία τους στα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες *in vitro* ύστερα από προσθήκη των BMPs. Μετά τη διαφοροποίηση, τα κύτταρα εκφράζουν αλκαλική φωσφατάση, και άλλους οστεοβλαστικούς μάρτυρες όπως το κολλαγόνο τύπου I, η οστική σιαλοπρωτεΐνη, το *osterix* και η οστεοκαλσίνη. Παρόμοια με την έκφραση των BMPs, οι ανταγωνιστές τους επίσης εμφανίζουν και αυξάνουν τα επίπεδα της

έκφρασής τους στα τελικά στάδια. Τα επίπεδα έκφρασής τους ρυθμίζονται μεταγραφικά από τις ίδιες τις BMPs και η ισορροπία μεταξύ των BMPs και των ανταγωνιστών τους καθορίζει το ρυθμό της κυτταρικής διαφοροποίησης. Παράδειγμα αποτελεί η νογκίνη (noggin), ένας από τους πιο σημαντικούς ανταγωνιστές των BMPs, η οποία είναι παρούσα στο οστό και μάλιστα επάγεται από τους οστεοβλάστες, δηλώνοντας πως η τοπική ενεργοποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό. Έχει παρατηρηθεί ότι και οι οστεοβλάστες με τη σειρά τους μπορούν να συνθέσουν και να εκκρίνουν BMPs τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι μόλις οι BMPs αρχίσουν την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, δημιουργείται μια θετική ανάδραση, επιτρέποντας την επαγωγή πρόσθετων σημάτων BMP [94,95].

Έχει αναφερθεί πως η BMP-1, το προ-κολλαγόνο-C-προπεπτίδιο, είναι ικανό να απελευθερώσει BMPs από την μήτρα του κολλαγόνου, παρέχοντας μία άλλη οδό μέσω της οποίας οι BMPs μπορούν να είναι διαθέσιμες με έναν εξειδικευμένο τρόπο κατά τη διάρκεια της αναδόμησης του οστού. Τελικά, ο σχηματισμός και απορρόφηση του οστού κατά τη διάρκεια της αναδόμησης συνδέεται μέσω των BMPs, και αυτό γιατί οι BMPs ρυθμίζουν την μεταγραφή του *Cbfa1*, έναν ειδικό οστεοβλαστικό μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος με την σειρά του φαίνεται να ρυθμίζει την μεταγραφή του υποδοχέα ενεργοποίησης του NFκB (RANK), ένα σήμα σημαντικό για την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών προγενετικών κυττάρων σε οστεοκλάστες. Έτσι οι BMPs ενέχονται άμεσα ή έμμεσα σε κάθε βήμα της διαδικασίας της ανακατασκευής του οστού. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι οιστρογόνα και γλυκοκορτικοειδή, δύο παράγοντες που είναι γνωστό πως επηρεάζουν την αναδόμηση του οστού, αυξάνουν την έκφραση της BMP-6 από τους οστεοβλάστες. Όμως, ποντίκια στα οποία το γονίδιο της BMP-6 έχει αφαιρεθεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυονικά πολυδύναμα κύτταρα, δεν εμφάνισαν σκελετικές ελλείψεις ή οστεοπενία, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση της αναδόμησης μέσω των BMPs είναι πιο πολύπλοκη περίπτωση [94,95].

### **A3.3.3 BMPs και πώρωση του κατάγματος**

Λόγω των ιδιοτήτων που διαθέτουν οι BMPs, οι ερευνητές αλληλουχοποίησαν και κλωνοποίησαν τη κάθε μία από αυτές. Η επαγόμενη έκφραση των BMPs σε ανασυνδυασμένα συστήματα επέτρεψε τη χρήση τους σε πειραματόζωα ώστε να παρατηρηθεί η διεγερτική επίδραση που έχουν στην πώρωση του κατάγματος καθώς και τη δράση τους σε διάφορες σκελετικές ανωμαλίες. Η πρώτη προσπάθεια έγινε από τον Nakase και τους συνεργάτες του [136] όπου μπόρεσαν να παρουσιάσουν την χρονική και τοπική έκφραση της BMP-4 κατά την επούλωση του κατάγματος σε ποντικούς. Σε άλλη έρευνα ο Bostrom και οι συνεργάτες του [137] χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα για τις BMP-2 και BMP-4 απεικονίζοντας την έκφραση των συγκεκριμένων BMPs για μία περίοδο 4 εβδομάδων μετά το κάταγμα. Ο Cho και οι συνεργάτες του [138] σε πειράματα με ποντικούς έδειξαν πως ορισμένα μέλη της υπερικογένειας του TGF- $\beta$ , συμπεριλαμβανομένων και των BMPs, μπορούν να δράσουν συνδυαστικά ώστε να προάγουν διάφορα στάδια της ενδομεμβρανώδους και ενδοχόνδριας οστεοποίησης κατά την επουλωτική διαδικασία.

Ο σχηματισμός νέου οστού συμβαίνει στον σκελετό του ενήλικα κατά τη διάρκεια της πώρωσης ενός κατάγματος όταν προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών που βρίσκονται στον μυελό των οστών και το περίοστεο διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Έχει βρεθεί πως οι BMPs είναι παρούσες στα μέρη του κατάγματος και υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που υποστηρίζουν το ρόλο των BMPs σε αυτή τη διαδικασία. Πρώτον, όλοι οι κυτταρικοί τύποι που συνθέτουν νέο οστό κατά την επουλωτική διαδικασία έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν στόχο για τις BMPs *in vitro* και καταλαμβάνουν-προσδένονται στους υποδοχείς των BMPs *in vivo*. Επιπροσθέτως, η ανοσοιστοχημική εντόπιση των BMP-2 και BMP-4 στην περιοχή του κατάγματος σε ποντίκια δηλώνει ότι οι BMPs απελευθερώθηκαν από την οστική θεμέλια ουσία και το περίοστεο την ώρα του κατάγματος και έπειτα είναι ικανές να δράσουν πάνω σε κύτταρα στόχους της περιοχής ή να «στρατολογήσουν» κύτταρα στο σημείο του κατάγματος όπου διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Εναλλακτικά, οι BMPs μπορούν να συντεθούν από οστεοβλάστες που προϋπάρχουν

στο οστό και το περίοστεο και να ενεργοποιηθούν από κυτταροκίνες οι οποίες απελευθερώθηκαν κατά τη διαδικασία επούλωσης [95,136,139].

Στην πράξη, αμέσως μετά από ένα κάταγμα, ένα αιμάτωμα δημιουργείται γύρω από τις άκρες αυτού. Το γεγονός αυτό ενεργοποιεί μία φλεγμονώδη αντίδραση με την οποία αρχίζει η επουλωτική διαδικασία. Προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα και κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς στρατολογούνται και βρίσκονται άμεσα στην περιοχή του κατάγματος ώστε να λάβουν χώρα τρεις διαδικασίες: η οστεογένεση, η χονδρογένεση και η αγγειογένεση. Όλη αυτή η διαδικασία πιστεύεται ότι ενορχηστρώνεται από διάφορους τοπικούς και συστηματικούς μοριακούς παράγοντες που επηρεάζουν και επιδρούν σε κύτταρα των διαφόρων γειτονικών περιβαλλόντων ιστών. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο μυελός των οστών, το περίοστεο, το φλοιώδες οστόν, διάφοροι μαλακοί ιστοί και αιμοφόρα αγγεία. Αυτή η αρχική απόκριση λαμβάνει χώρα κατά το πρώτο 24ωρο μετά το τραυματισμό. Βασίζεται στην γρήγορη αύξηση της έκφρασης φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-5, IL-6 και ο TNF- $\alpha$  και κατόπιν στην άμεση μείωση τους μετά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Έχει βρεθεί ότι ήδη κατά τη διάρκεια αυτής της αρχικής φάσης, μέλη της υπερικογένειας του TGF- $\beta$  ενεργοποιούνται, άλλα σε μεγαλύτερο βαθμό άλλα σε μικρότερο [138,139].

Καθώς με την παρουσία των μεσεγχυματικών κυττάρων περνάμε στην φάση της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και τη δημιουργία του μαλακού πώρου, τα ίδια τα MCSs παράγουν BMP-2 και BMP-4 που βοηθούν στην σταδιακή διαφοροποίηση των χόνδρινων προγονικών κυττάρων να μετατραπούν σε ανώριμα χονδροκύτταρα. Σε αυτή τη φάση η BMP-3 (GDF10) και η BMP-6 εκφράζονται με την σειρά τους φτάνοντας στην υψηλότερη έκφρασή τους, υποδηλώνοντας συγκεκριμένη επίδραση. Επιπροσθέτως, η BMP-3a, η BMP-4, BMP-5, BMP-7 και η BMP-8 είναι παρούσες, αν και δεν φτάνουν στο απόγειο της έκφρασής τους [95,132,135]. Επίσης, ερευνητές θέλησαν να ελέγξουν τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων σε μέλη της υπερικογένειας του TGF- $\beta$  σε μία περίοδο 28 ημερών μετά από κάταγμα σε κνήμη ποντικών. Διαπίστωσαν την υπερέκφραση της BMP-2 κατά τη πρώτη ημέρα του κατάγματος ανάμεσα στις άλλες BMPs, όταν η γονιδιακή έκφραση των BMP-4, BMP-7 και BMP-8 έφτασε σε ικανοποιητικά επίπεδα την περίοδο από την 14<sup>η</sup> έως την 21<sup>η</sup> μέρα [101]. Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε και η υψηλή έκφραση της



BMP-6 κατά τις πρώτες μέρες μετά από κατάγμα αλλά όχι σε τόσο υψηλά επίπεδα όσο αυτών της BMP-2 [140].

Την ίδια ώρα που ο ενδοχόνδριος πύρος δημιουργείται, υπάρχει μία απόκριση για ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση η οποία λαμβάνει χώρα στις εγγύς και περιφερειακές περιοχές του περισστέου στο σημείο του κατάγματος. Τα πολυδύναμα και οστεοπρογονικά κύτταρα της εσωτερικής στοιβάδας του περισστέου κινητοποιούνται άμεσα για τον σχηματισμό οστού. Έχει αποδειχθεί ότι η BMP-2 και η BMP-4 έχουν υψηλή έκφραση σε αυτά τα κύτταρα και συγκεκριμένα το μέγεθος της έκφρασης της BMP-2 επηρεάζει σημαντικά την επουλωτική διαδικασία. Επιπροσθέτως, ποντικοί με έλλειψη του γονιδίου της BMP-2 δεν είχαν περισοτική αντίδραση στον τραυματισμό με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τελικά παραγωγή οστού [135]. Επιπλέον, *in vitro*, φάνηκε πως η BMP-2 διατηρούσε την ικανότητα να ελέγχει μέσω αυτογενούς ρύθμισης άλλες BMPs [135]. Υποδηλώνεται λοιπόν με αυτό τον τρόπο ότι μπορεί η BMP-2 να αποτελεί τον αναβολικό μεσολαβητή στην ακολουθία της έκφρασης των BMPs. Η έκφραση και των δύο γονιδίων στο περισστέο φαίνεται πως συνεχίζεται με το πέρασμα των ημερών αλλά κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Επιπλέον γονίδια που σχετίζονται με την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση προερχόμενη από το περισστέο είναι αυτά των γονιδίων BMP-3, BMP-6, BMP-7, και BMP-8 που ενώ παρατηρείται η έκφρασή τους, φαίνεται, σύμφωνα με κάποιες μελέτες, πως αυτή η έκφραση επιδρά κυρίως στην στρατολόγηση των οστεοβλαστών [141,142].

Κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς σταδίου οστεοποίησης του κατάγματος, και αφού έχει επέλθει ασβεστοποίηση του μαλακού πύρου μετατρέποντάς τον σε σκληρό, αναλαμβάνουν μια πληθώρα των BMPs. Συγκεκριμένα οι BMP-1, BMP-2, BMP-3a, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 και BMP-8a εκφράζονται όλες ταυτόχρονα. Μάλιστα, οι BMP3a, BMP-4, BMP-7 και BMP-8 φτάνουν στο απόγειο της έκφρασής τους, με τις τελευταίες δύο να υπερεκφράζονται σε τέτοιο βαθμό ώστε οι ερευνητές να καταλήξουν στο συμπέρασμα ότι σε αυτή τη φάση της επουλωτικής διαδικασίας είναι οι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της οστεογενετικής σειράς. Σε αντιδιαστολή όμως με τα παραπάνω, νεότερες έρευνες έδειξαν ότι ναι μεν η έκφραση της BMP-7 (όταν υπάρχει) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο αλλά η

έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου δεν είναι πάντα απαραίτητη για να συνεχισθεί η διαδικασία της επούλωσης [135,141].

Εν συνεχεία και κατά την φάση της δευτερογενούς οστεοποίησης η δραστηριότητα και η σημαντικότητα των BMPs εξετάζεται. Διακρίνεται λοιπόν πτώση η οποία φτάνει έως και μηδενική έκφραση των προαναφερθέντων (στην πρωτογενή φάση οστεοποίησης) BMPs, με μοναδική εξαίρεση αυτή των BMP-2, BMP-3b, και TGF-β1, όπου η έκφραση παραμένει σε βασικά επίπεδα. Παρόλα αυτά, μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα ζώα έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης είναι πιθανό οι BMPs να μετατρέπουν την προφανή ιδιότητά τους για οστεοεπαγωγή σε ρυθμιστικά σήματα για την ενεργοποίηση άλλων φορέων και αυξητικών παραγόντων σημαντικών για την διατήρηση της ισορροπίας της ομοιοστασίας του οστού [135].

Οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν ότι η συντονισμένη και συνεργατική έκφραση των διαφόρων BMPs και των υποδοχέων τους κατά τη διάρκεια της επούλωσης ενός κατάγματος είναι σημαντικές τόσο για την σκελετική ανάπτυξη όσο και για την σκελετική αποκατάσταση.

#### **A3.4 Παράγοντες που ενέχονται στην ανάπτυξη/αναδόμηση/αποκατάσταση του οστού**

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν τους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες, η κατεύθυνση και λειτουργία των οποίων είναι ο κύριος παράγοντας για την ανάπτυξη, αναδόμηση και αποκατάσταση του οστού, δεν είναι πλήρως καθορισμένοι κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας και πληθώρας των κυτταρικών σηματοδοτήσεων και μονοπατιών. Παρόλα αυτά η πρόοδος της επιστήμης έχει ορίσει και καθορίσει πολλές από τις βασικές λειτουργίες και τον τρόπο που αυτές εκτελούνται (περισσότερο τοπικά) παραγόντων που ενέχονται στην οστεογενετική σειρά. Σε γενικές γραμμές τέτοιοι παράγοντες είναι α) οι ορμόνες (παραθορμόνη, βιταμίνη D, αυξητική ορμόνη, οιστρογόνα, τεστοστερόνη κ.α.), β) οι παρακρινικοί παράγοντες (αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, ιντερλευκίνες κ.α.) και γ) μηχανικοί παράγοντες (πιέσεις, τάσεις, πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο κ.α.).

Στην παρούσα διατριβή δεν θα επεκταθούμε σε όλους αυτούς τους παράγοντες αλλά θα επικεντρωθούμε περιληπτικά στους πιο σημαντικούς από τους αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες. Παράγοντες που επηρεάζουν και επιδρούν με το μονοπάτι TGF- $\beta$ /BMP και το περίοστεο αλλά πάνω απ' όλα που δρουν στην αναδόμηση και επουλωτική διαδικασία μέσω της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και διεγείρουν την ενδοκυττάρια σύνθεση DNA με αποτέλεσμα την αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας και την παραγωγή οστού. Οι πιο βασικοί και με πρωταγωνιστικό ρόλο παράγοντες είναι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, (platelet-derived growth factor, PDGF), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες I και II (insulin-like growth factors, IGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF), η παραθυρεοειδής ορμόνη και το συσχετιζόμενο πεπτίδιο αυτής (PTH/PTHrP) και η οστεοπροτεγερίνη (OPG).

#### **A3.4.1 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)**

Ο PDGF είναι ένα διμερές πολυπεπτίδιο, παράγωγο δύο συσχετιζόμενων γονιδίων (PDGF-A και PDGF-B) και απαντάται σε τρεις ισομορφές (AA, AB και BB). Συμμετέχει στην ανάπτυξη, αναδόμηση και απορρόφηση των οστών. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων καθώς και την αγγειογένεση [143]. Στο οστικό μικροπεριβάλλον προωθεί την μιτογένεση των κυττάρων της οστεογενετικής σειράς του περιοστέου και των επιφανειών πλούσιων σε ινοβλάστες και ως εκ τούτου αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν τον οστεοβλαστικό φαινότυπο. Οι οστεοβλάστες αποκρίνονται στον PDGF επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την οστική απορρόφηση, την αποδόμηση του κολλαγόνου και την έκφραση κολλαγενασών [144]. Η οστική απορρόφηση διεγείρεται από τον PDGF έμμεσα μέσω ρύθμισης της έκφρασης των κυτταροκινών (π.χ. IL-6) και άμεσα από διέγερση των οστεοκλαστών. Συνδέεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα του PDGFR, ο οποίος απαντάται σε δύο τύπους, τον PDGFR $\beta$  και τον PDGFR $\alpha$  [145].

### **A3.4.2 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**

Οι αγγειογενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, πώρωση και αναδόμηση των οστών καθώς επάγουν την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, την αγγειογένεση και παρέχουν στα κύτταρα υψηλή μεταβολική δραστηριότητα αφού είναι υπεύθυνοι για την παροχή των αναγκαίων θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Ο VEGF είναι ένας παράγοντας ο οποίος προάγει την διαπερατότητα των αγγείων και διεγείρει την μιτογένεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ουσιαστικά επιδρά στην διατήρηση των κυττάρων εμποδίζοντας ταυτόχρονα την απόπτωσή τους. Επιπροσθέτως, ευθύνεται για την προσέλκυση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών στις εκάστοτε περιοχές που υπάρχει ανάγκη και επιδρά στην περαιτέρω αύξηση των τελευταίων. Οι BMPs και ο VEGF αλληλεπιδρούν. Είναι ο κύριος παράγοντας για την αύξηση και έκφραση των BMPs κατά την υποξία και οι BMPs με τη σειρά τους τον διεγείρουν μέσω των οστεοβλαστών. Τέλος, η ιστο-ειδική ρύθμιση που δέχεται ο VEGF κατά την ανάπτυξη των οστών φαίνεται να εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα «κλειδί» για αυτή τη διαδικασία, το Cbfa1/Runx2. Οι ενέργειες του επάγονται μέσω υποδοχέων όπως ο VEGFR-1 (Flt-1), ο VEGFR-2 (KDR) και VEGFR-3 [94,144,146].

### **A3.4.3 IGF (Insulin-like Growth Factors)**

Οι IGF (IGF-I και II) παράγονται από τους οστεοβλάστες και η σύνθεσή τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο TGFβ, ο FGF, ο PDGF και οι προσταγλανδίνες. Ο IGF-II κυρίως ενέχεται στην ρύθμιση της εμβρυικής ανάπτυξης, ενώ ο IGF-I μεσολαβεί στην επίδραση της αυξητικής ορμόνης στον σκελετό διεγείροντας την κυτταρική διαίρεση και επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, ενώ ρυθμίζει την οστική απορρόφηση μέσω ενεργοποίησης των υπαρχόντων οστεοκλαστών και διέγερση σχηματισμού νέων. Μελέτες δείχνουν πως επιδρά θετικά στην διόρθωση οστικών ανωμαλιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελούν τον πιο άφθονο αυξητικό παράγοντα της οστικής θεμέλιας ουσίας. Η δράση τους προϋποθέτει την ύπαρξη είτε IGF υποδοχέα είτε υποδοχέα της ινσουλίνης. Η αλληλεπίδραση IGF και υποδοχέα τελεί υπό την σκέπη μιας

ομάδας τουλάχιστον 7 πρωτεϊνών γνωστών ως IGF δεσμευτικές πρωτεΐνες (IGFBP), οι οποίες μεταφέρουν και σταθεροποιούν τις κυκλοφορούσες IGF, ρυθμίζουν την ιστική ή κυτταρική εντόπιση και βιοδιαθεσιμότητα τους και ρυθμίζουν τη διαντίδραση προσδέτη-υποδοχέα [95,147].

#### **A3.4.4 FGF (Fibroblast Growth Factor)**

Οι FGF και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους FGFR συνιστούν μια μεγάλη, πολύπλοκη οικογένεια σηματοδοτικών μορίων τα οποία ενέχονται σε ποικιλία διεργασιών όπως η εμβρυονική ανάπτυξη και η ιστική ομοιόσταση. Στον άνθρωπο απαντώνται 20 είδη FGF με ποικίλο βαθμό έκφρασης στους διάφορους ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Ο σχηματισμός του συμπλόκου FGF/FGFR προϋποθέτει και τη συνύπαρξη πρωτεογλυκάνης θειϊκής ηπαράνης (HSPG). Στον ενήλικα οι οστεοβλάστες εκφράζουν FGFR (FGFR1, FGFR2, FGFR3), παράγουν FGF, οι οποίοι στη συνέχεια αποθηκεύονται στην οστική θεμέλια ουσία (π.χ. FGF2) και ενέχονται στην οστεογένεση. Η συμβολή τους στις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο οστό περιπλέκεται και από το γεγονός ότι αλληλεπιδρά με ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του TGF- $\beta$ , του VEGF, των MMP, των IGF κ.α. Γενικότερα είναι αποδεδειγμένο σε πειράματα ζώων πως ο FGF-2 διεγείρει την ενδομεμβρανώδη και ενδοχόνδρια οστεοποίηση, βοηθά κατά την επουλωτική διαδικασία αλλά καταστέλλει την περιουσιακή αντίδραση. Ο FGF-1 επιδρά θετικά αυξάνοντας την δημιουργία νέου οστού και την πυκνότητα αυτού. Επίσης, φαίνεται να επιδρά στην μικροαρχιτεκτονική ενός τραυματισμένου οστού και προστατεύει την απώλεια οστικής μάζας εμποδίζοντας την δράση των οιστρογόνων [95,148,149].

#### **A3.4.5 PTH/PTHrP (Parathyroid Hormone/ Parathyroid Hormone-related Peptide)**

Η PTH είναι μία ορμόνη που συντίθεται από τον παραθυρεοειδή αδένα και στην ώριμη μορφή της αποτελείται από 84 αμινοξέα. Ο PTH/PTHrP είναι ένας αυτοκρινής/παρακρινής παράγοντας που στην ώριμη μορφή του αποτελείται από 141 αμινοξέα. Κανονικά εκφράζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης πολλών μετεμβρυικών ιστών συμπεριλαμβανομένου του χόνδρινου και συνδετικού ιστού. Η

PTH και ο PTHrP προσδένονται στον ίδιο υποδοχέα (PTHr1) παρά την μικρή τους ομολογία στην δομή τους. Η δράση της παραθορμόνης συνίσταται στη διατήρηση του Ca και P του αίματος σε σταθερά επίπεδα. Αυτό γίνεται κυρίως με απελευθέρωση Ca από τα οστά και κατά δεύτερο λόγο με αύξηση της απορρόφησης του από το έντερο και της επαναπορρόφησης του από τα νεφρικά σωληνάκια. Ερέθισμα για την έκκριση της παραθορμόνης αποτελεί η ελάττωση του Ca του αίματος.

Η δράση των PTH και PTHrP στο σκελετικό σύστημα έγκειται στο γεγονός πως προσδένονται στους υποδοχείς των οστεοβλαστών και παράγουν παρακρινείς παράγοντες οι οποίοι επιφέρουν την αυξημένη ενεργοποίηση και στρατολόγηση των οστεοκλαστών, γεγονός που οδηγεί σε οστεόλυση. Η οστεόλυση που γίνεται με τη βοήθεια των οστεοκυττάρων (περιοστεοκυτταρική οστεόλυση), προάγει μια ελάχιστη αύξηση της παραθορμόνης στο αίμα, πριν ακόμα ενεργοποιηθούν οι οστεοκλάστες (mini remodeling). Η καλσιτονίνη είναι ορμόνη που εκκρίνεται από ορισμένα κύτταρα του θυρεοειδούς (κύτταρα C) σε περίπτωση που αυξάνεται το Ca του αίματος και αναστέλλοντας την οστεόλυση επαναφέρει το Ca στα φυσιολογικά επίπεδα. Δρα ανταγωνιστικά προς την παραθορμόνη μαζί με την οποία ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου [94,95].

#### **A3.4.6 OPG-RANKL-RANK (Osteoprotegerin signal pathway)**

Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) γνωστή και ως παράγοντας καταστολής της οστεοκλαστογένεσης είναι ένας διαλυτός υποδοχέας κυτταροκινών και μέλος της υπερικογένειας του TNF, που εμποδίζει την οστεοκλαστογένεση με την πρόσδεση της στο RANKL (στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων και των οστεοβλαστών) παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση RANKL-RANK για την ενεργοποίηση της οστεοκλαστογένεσης. Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα του RANK παρέχει το σήμα για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών από τα αιμοποιητικά προγενετικά κύτταρα καθώς και την ενεργοποίηση της ωρίμανσης των οστεοκλαστών. Ειδικότερα το RANKL προάγει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, την ενεργοποίησή τους καθώς και προσκόλλησή τους στην επιφάνεια του οστού. Η OPG

εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ RANKL-RANK και δρα ως ένας ρυθμιστής της ωρίμανσης των οστεοκλαστών και της αποκατάστασης του οστού.

Επιγραμματικά θα αναφερθούμε και σε ένα πλήθος βιοχημικών μορίων που συμμετέχουν στην διαδικασία της πώρωσης και έχουν είτε ευνοϊκή είτε ανασταλτική δράση. Αυτές είναι οι δύο ισotyπoι κολλαγόνου (Col-I, Col-II), η αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase), ο σκελετικός αυξητικός παράγοντας (SGF), ο οστικός αυξητικός παράγοντας (BDGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), η οστεονεκτίνη (osteonectin), η οστεοποντίνη (osteopontin), η οστεοκαλσίνη (osteocalcin), η φιβρονεκτίνη (fibronectin), ο περιοστικός ενεργοποιητικός παράγοντας (PAA), ο αγγειοκινητικός ενεργοποιητής (AA), ο παράγοντας διέγερσης της χονδρικής δραστηριότητας (CSA) και οι προσταγλανδίνες (prostaglandins) [95,150-152].

### **A3.5 Παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση**

#### **A3.5.1 Κάπνισμα**

Το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας παράγοντας κινδύνου για πληθώρα ασθενειών και παθήσεων, όπως ο καρκίνος και η στεφανιαία νόσος. Σε σχέση με την διαδικασία πώρωσης του κατάγματος, η αρνητική επίδραση του καπνίσματος σχετίζεται με την αγγειοσυστολή που επιφέρει [153,154]. Οι χειρουργοί ορθοπεδικοί έχουν υποθέσει εδώ και καιρό ότι υπάρχει σχέση μεταξύ καπνίσματος και των διαφόρων επιπλοκών κατά την επούλωση των καταγμάτων. Η δυσλειτουργία και η καθυστέρηση στην πώρωση των σκελετικών καταγμάτων ως αποτέλεσμα του καπνίσματος έχουν τεκμηριωθεί με διάφορες μελέτες σε ασθενείς, ενώ οι εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η εισπνοή καπνού καθυστερεί την πώρωση σε πειράματα ζώων [155,156]. Ωστόσο, σε μοριακό επίπεδο, οι υποκείμενοι μηχανισμοί και οι αιτιολογικοί παράγοντες εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστοι, παρά τις κλινικές έρευνες, συμπεριλαμβανομένων μελετών σε ζώα και *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων υπεύθυνων για την οστεογένεση.

Διάφορες μελέτες έχουν δώσει αρχικά στοιχεία που συνδέουν το κάπνισμα με την καθυστερημένη πώρωση [157-160], την ατελή πώρωση [157], την λοίμωξη

[161], την οστεομυελίτιδα [162], και συσχετίζουν το κάπνισμα με τον κίνδυνο κατάγματος [163]. Κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι όσο υψηλότερος είναι ο αριθμός των τσιγάρων που καπνίζονται, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πώρωση ενός μακρού οστού [164]. Σε προοπτικές μελέτες, οι καπνιστές βρέθηκαν να έχουν σημαντικά μειωμένη οστική μάζα σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (που δεν είχαν καπνίσει ποτέ ή ήταν πρώην καπνιστές) σε όλα τα οστά [165]. Το κάπνισμα έχει αρνητική επίδραση στην οστική μάζα ανεξαρτήτως βάρους και σωματικής δραστηριότητας [166] και η διακοπή του φαίνεται να επιδρά θετικά στην διατήρηση ή αύξηση της μάζας των οστών [165,167]. Αν και οι επιπτώσεις του καπνίσματος έχουν αποδοθεί εν μέρει στην αγγειοσυστολή που επιφέρει, η μοριακή βάση και ιδιαίτερα η επίδραση στους αυξητικούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την οστεογενετική σειρά, όπως οι BMPs, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη.

### **A3.5.2 Φύλο**

Οι φυλογενετικές ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα) έχουν αντίκτυπο όχι μόνο στην φυλογενετική διαφοροποίηση, ωρίμανση και αναπαραγωγή του ανθρώπου αλλά διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στην ομοιοστασία και ανάπτυξη του σκελετού. Μέσω των αλληλεπιδράσεων με τα οστεογενετικά μονοπάτια προσθέτουν οστό αυξάνοντάς το (σε όγκο και σε μήκος) κατά την εφηβεία και στη συνέχεια διατηρούν την ακεραιότητα του σκελετού, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ωστόσο, οι διαφορές των δύο φύλων στην ανάπτυξη των οστών γίνεται εμφανής κατά τη διάρκεια της εφηβείας, με τους άνδρες να επιτυγχάνουν υψηλότερη οστική μάζα, μεγαλύτερο μέγεθος οστών και τελικά έναν ισχυρότερο σκελετό σε σχέση με τις γυναίκες. Παρόλα αυτά όμως, χτίζεται ένας μεγαλύτερος, αλλά όχι πυκνότερος, σκελετός στους άρρενες. Ως εκ τούτου, η ογκομετρική οστική πυκνότητα (BMD) δεν διαφέρει μεταξύ ανδρών και γυναικών.

Στην πραγματικότητα, οι άρρενες αναπτύσσουν μεγαλύτερη περισοτική διάμετρο απ' ότι οι γυναίκες από τη μέση φάση της εφηβείας. Αντιθέτως μπορεί οι γυναίκες να έχουν μικρότερη περισοτική επέκταση αλλά έχουν μεγαλύτερη εναπόθεση φλοιώδους οστού. Παραδοσιακά, οι διαφορές στον περισοτικό



σχηματισμό των οστών μεταξύ ανδρών και γυναικών έχει υποτεθεί ότι αντανακλούν δύο διαφορετικές επιδράσεις από το ενδοκρινικό σύστημα: ανδρογόνα διεγείρουν το περίοστεο για το σχηματισμό οστού στους άνδρες και οιστρογόνα επάγουν ανασταλτικούς παράγοντες στην αύξηση και επέκταση του οστού από το περίοστεο στις γυναίκες. Η υπόθεση βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται από ωθηκεκτομή και εκτομή των όρχεων σε τρωκτικά. Σύμφωνα με την έννοια αυτή, είναι δελεαστικό να εικάζεται ότι στους άνδρες υπάρχει μεγαλύτερη περισοτική εναπόθεση/επέκταση στα οστά σε σχέση με τις γυναίκες επειδή είναι πιο εκτεθειμένοι σε ενδογενή ανδρογόνα και λιγότερο σε οιστραδιόλη. Ωστόσο, μελέτες σε ανθρώπους υποστηρίζουν ότι αυτή η υπόθεση είναι ελλιπής [168-171].

Μεταξύ άλλων παραγόντων, οι διαφορές στην σκελετική ευθραυστότητα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στις παρατηρούμενες διαφορές στην εμφάνιση καταγμάτων μεταξύ ανδρών και γυναικών. Σε σύγκριση με τις γυναίκες, οι άνδρες έχουν αυξημένη αντοχή οστού, όχι εξαιτίας της αυξημένης οστικής πυκνότητας (Bone Mineral Density), αλλά λόγω του αυξημένου όγκου του οστού, που προκύπτει από την εναπόθεση οστού από την περισοτική επιφάνεια κατά την διάρκεια της εφηβείας. Το περίοστεο και η δράση του είναι ενεργή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και στους άνδρες και στις γυναίκες αλλά ο τρόπος λειτουργίας του φαίνεται να καθορίζεται σημαντικά από τις φυλογενετικές ορμόνες [172-174].

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε αποτυχία αύξησης του οστού μέσω του περιοστέου σε νεαρό άνδρα με ανεπάρκεια σε οιστρογόνα και ενώ η τεστοστερόνη ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτό το εύρημα αμφισβητεί την παραδοσιακή αρχή ότι υψηλή έκθεση σε ανδρογόνα και χαμηλή έκθεση σε οιστρογόνα αποτελούν τους βασικούς καθοριστικούς παράγοντες της περισοτικής επέκτασης στους άνδρες και ότι τα οιστρογόνα παίζουν ένα ρόλο κλειδί στην σκελετική ομοιοστασία των οστών [171,175,176].

Επιπλέον, μελέτες για τον ρόλο των φυλογενετικών ορμονών και των υποδοχέων τους στην διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών έδειξαν ότι μπορούν να επιταχύνουν και να αυξήσουν την οστεογενετική τους διαφοροποίηση μέσω της ρύθμισης πολλών οστεογενετικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των BMP-2, BMP-7 και TGF- $\beta$ 1. Το μοριακό μονοπάτι εντούτοις της σκελετογένεσης, αναδόμησης και ανακατασκευής που συνδέει τις

BMPs με τις φυλογενετικές ορμόνες και γενικότερα το φύλο του κάθε οργανισμού παραμένει περίπλοκο [177].

### **A3.5.3 Ηλικία**

Η ηλικία είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δομή και λειτουργία του περιostέου. Έχουν αναφερθεί κάποιες αλλαγές, σχετιζόμενες με την ηλικία, στο περίosteo συμπεριλαμβάνοντας την μείωση του αριθμού των ινοβλαστών, του πάχους της ινώδους στοιβάδας, του αριθμού των οστεοβλαστών, του σχηματισμού κολλαγόνου, των οστεοειδών ζωνών και της πυκνότητας των αγγείων [178-181]. Ανάλογα με τις θέσεις του σχηματισμού των οστών ή της απορρόφησης, το περίosteo δείχνει αντίστοιχες διαρθρωτικές αλλαγές με τη γήρανση [178,182]. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι οι σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές στο περίosteo οφείλονται και στην συγκεκριμένη εντόπιση αυτού [183].

Η σχετιζόμενη με την ηλικία εκφύλιση του περιostέου (εμφανίζεται ως μείωση του πάχους και του αριθμού των κυττάρων) παρατηρήθηκε στη διάφυση των οστών, όπου υπήρχε χαρακτηριστική μείωση των κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων του περιostέου στην ηλικιωμένη ομάδα ποντικών. Ωστόσο, στις περιοχές της μετάφυσης, τα ποντίκια μικρότερης ηλικίας είχαν παχύτερη και πιο κυτταροβριθή εσωτερική στοιβάδα από τα ποντίκια της ώριμης ομάδας όπως επίσης και πλουσιότερο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων (αν και η ινώδης στοιβάδα ήταν παρόμοια). Υπήρχε επίσης μια αξιοσημείωτη αλλαγή σε πληθυσμούς κυττάρων σε αυτούς τους τομείς, ιδίως αυξημένος κλασματικός αριθμός των οστεοκλαστών [183]. Παρόλα αυτά, οι λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την ηλικία του περιostέου και τη συσχέτιση αυτού με τις διαρθρωτικές και κυτταρικές αλλαγές σε διαφορετικές περιostικές περιοχές είναι ακόμα ασαφής [183].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χονδρογενετική δυνατότητα του περιostέου είναι ποιοτικά και ποσοτικά κατώτερη σε ώριμα και μεγαλύτερα κουνέλια από ό, τι σε ανώριμα και νεαρά. Αυτό σχετίζεται με την παρατήρηση ότι η βιολογική δραστηριότητα του περιostέου μειώνεται με την ηλικία μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του σκελετού. Ο Nakahara και οι συνεργάτες του ήταν σε θέση να διαπιστώσουν χονδρογενετική ικανότητα σε ανθρώπινα περιostικά κύτταρα που

λαμβάνονται από ασθενείς ηλικίας κάτω των 20 ετών όχι όμως και σε εκείνα που λαμβάνονται από ασθενείς ηλικίας άνω των 22 ετών [180,184].

Η κατανόηση της γήρανσης και των σκελετικών αποκρίσεων σε αυτήν όπως και των μηχανικών φορτίσεων που επιφέρει είναι ελλιπής. Μελέτες σε ζώα, που προσφέρουν το πλεονέκτημα της ελεγχόμενης έκθεσης στην φόρτιση, δεν είναι ομόφωνες. Πρωτόκολλα άσκησης ηλικιωμένων και νεαρών ποντικών είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα: είτε έδειξαν μειωμένη ανταπόκριση στα υπερήλικα ζώα, είτε καμία διαφορά μεταξύ των ηλικιών, ή τέλος τη βελτίωση της απόκρισης στα ηλικιωμένα ζώα [185].

Μελέτες όσον αφορά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινο οστέο έδειξαν ότι ασχέτως με την ηλικία, το οστέο του ενήλικα περιέχει κύτταρα που έχουν μεγάλη αναγεννητική ικανότητα, εκφράζουν μάρτυρες των μεσεγχυματικών κυττάρων και παρουσιάζουν δραστικότητα για την διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και μυοβλάστες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [181,186].

Το οστέο και η επέκταση των ινών του Sharpey αλλάζουν τα οργανικά και ανόργανα συστατικά με την πάροδο της ηλικίας, έχοντας αρνητικές συνέπειες στην ποιότητα της οστικής δομής [187].

Όσον αφορά την δράση των BMPs σε σχέση με την ηλικία και το οστέο φαίνεται από μελέτες να μην επηρεάζονται σημαντικά. Η απόκριση του οστέου σε υπο-περιοστική εμφύτευση BMPs ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία αν και η συνολικός όγκος του νέου σχηματιζόμενου οστού μειώθηκε με την πάροδο της ηλικίας [188].

Επίσης, άλλη έρευνα κατέληξε στο ότι η διέγερση της οστεογένεσης από τις BMPs δεν εξαρτάται από την ηλικία. Υπο-περιοστική ένεση των πρωτεϊνών αυτών σε ποντικούς ηλικίας 10, 30 και 70 εβδομάδων απέδωσαν την ίδια περιοστική απόκριση στην οστεογένεση [189]. Επιπροσθέτως, ο Pietrzak και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας του δότη των BMPs και των επιπέδων έκφρασής τους. Το μέγεθος της διαφοράς των προφίλ έκφρασης των BMPs εμφανίζεται να ανταποκρίνεται ορθά στην δυνατότητα οστεοεπαγωγής της καθεμιάς [190].

### **A3.5.4 Μηχανική φόρτιση**

Ένας φυσιολογικός αναπτυσσόμενος σκελετός δείχνει ότι τα μηχανικά σήματα διαμορφώνουν την ανάπτυξη και αποκατάσταση των σκελετικών ιστών με το να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση και τη διαφοροποίηση των ιστών. Μελέτες έδειξαν τη σημασία των μηχανικών σημάτων/φορτίσεων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των αρθρώσεων, των οστών και της επουλωτικής διαδικασίας [191]. Ειδικότερα, η οστική επούλωση του οστού παρέχει ένα εξαιρετικό *in vivo* σύστημα για τη διερεύνηση των κυτταρικών αποκρίσεων στα μηχανικά ερεθίσματα, διότι ένα βασικό στοιχείο αυτής της διαδικασίας είναι η στρατολόγηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSC). Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, ινοβλάστες, μυοβλάστες ή λιποκύτταρα ανάλογα με τα ερεθίσματα που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον. Μία τάξη διέγερσης που επηρεάζει τη μοίρα των MSC είναι η μηχανική φόρτιση [192-196].

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τις σχέσεις μεταξύ μηχανικής φόρτισης και μοριακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της οστικής επούλωσης. Κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, παρατηρήθηκε αύξηση στην γονιδιακή έκφραση των BMP-2 και BMP-4 και πολλών άλλων εξωκυττάρων πρωτεϊνών [191]. Επιπροσθέτως, διάφορα γονίδια υπεύθυνα για την χονδρογένεση όπως η BMP-6, ο GDF-5 και το κολλαγόνο τύπου II έδειξαν πρώιμη αναβολική δραστηριότητα ακολουθούμενη από μείωση της έκφρασής τους [191]. Κατά την πώρωση των καταγμάτων, λιγότερο σταθερή οστεοσύνθεση επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την χονδρογένεση, την κυτταρική διαίρεση και την φλεγμονή. Ωστόσο, η αυξημένη κίνηση και ατελής σταθεροποίηση μπορεί να μην οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της χονδρογένεσης [191,197].

Η μηχανική φόρτιση έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη του σκελετού. Η αλλαγή στο σωματικό βάρος και η προκύπτουσα μηχανική διέγερση του σκελετού είναι σημαντικές. Συνήθως ο ανδρικός σκελετός αντιμετωπίζει υψηλότερες μηχανικές απαιτήσεις απ' ό,τι ο γυναικείος. Είναι επομένως δελεαστικό να υποθέσουμε ότι αυτή η υψηλότερη φέρουσα μηχανική φόρτιση στους άνδρες διεγείρει την ανάπτυξη των οστών σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι στις γυναίκες, όπως φαίνεται και από τον μεγαλύτερο βαθμό περιοστικού σχηματισμού των οστών

κατά τη διάρκεια της εφηβείας [198]. Ο διεγερτικός ρόλος της μηχανικής φόρτισης και της σωματικής δραστηριότητας στην αύξηση/επέκταση στα οστά έχει τεκμηριωθεί σε πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες. Μια σειρά από μη επεμβατικές αξονικές φορτίσεις σε πειραματικά ζωικά μοντέλα που υπόκεινται σε διαφορετικούς σχηματισμούς ασκήσεων, παρείχαν γνώσεις σχετικά με το αναβολική ανταπόκριση του οστού με τη μηχανική φόρτιση [199]. Συνολικά, οι μελέτες σε ζώα αναφέρουν ότι η μηχανική φόρτιση επηρεάζει τη μορφολογία των οστών μέσω της αυξημένης δημιουργίας οστού σε σχέση με την απορρόφηση αυτού. Στους ανθρώπους, οι περισσότερες ενδείξεις προέρχονται από διασταυρωμένες παρατηρήσεις. Για παράδειγμα, οι παίκτες του τένις φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο πάχος του φλοιού στο κυρίαρχό τους χέρι [200]. Επιπλέον, η αύξηση της οστικής μάζας στους επαγγελματίες αθλητές παραμένει αφού αποσυρθούν από την ενεργό δράση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ευεργετικές επιδράσεις της μηχανικής φόρτισης μπορεί να προκαλέσει δια βίου οφέλη για την αντοχή των οστών. Περαιτέρω κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το μηχανικό περιβάλλον επηρεάζει τις σκελετικές δομές και τη διαφοροποίηση των ιστών δεν θα παρέχει μόνο γνώση σχετικά με την διαδικασία αποκατάστασης αλλά θα διαλευκάνει πιθανά μέσα για την ενίσχυση της ανακατασκευής μετά από κάποιο τραυματισμό ή ασθένεια [198].

## ΣΚΟΠΟΣ

Σχεδόν κάθε οστό του ανθρώπινου σώματος περιβάλλεται από το περίοστεο. Ο ρόλος και η δράση του δεν είναι πλήρως κατανοητά σε μοριακό επίπεδο και το ίδιο αποτελεί αντικείμενο αμφισβήτησης για τους επιστήμονες. Το περίοστεο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και αποκατάσταση του οστού καθώς επίσης επιδρά στην παροχή αίματος του μυο-σκελετικού συστήματος. Αν και πολλοί παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί στη διατήρηση, αύξηση και επιδιόρθωση των οστών, έχει παραβλεφθεί σε μεγάλο βαθμό η οστική αναγεννητική ικανότητα του περιοστέου. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες αξιοποίησης αυτών των δυνατοτήτων του περιοστέου αλλά οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του ρόλου του σε πειραματόζωα και όχι σε ανθρώπους. Επιπλέον λίγες είναι οι έρευνες γύρω από τη μελέτη παραγόντων του περιοστέου σε γονιδιακό επίπεδο, όπως επίσης λείπουν μελέτες σχετικά με την έκφραση των περιοστικών γονιδίων των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), πρωτεϊνών που δρουν ως παράγοντες κυτταρικών σημάτων και διαδραματίζουν ένα κριτικό ρόλο στη διέγερση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) καθώς και των οστεοπρογονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη, αναδόμηση και επουλωτική διαδικασία των οστών.

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης τεσσάρων βασικών μελών της οικογένειας των BMPs, των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7, του ανθρώπινου περιοστέου, τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων και των οστεοπρογονικών κυττάρων του περιοστέου κατά την διαδικασία της ανάπτυξης, αναδόμησης και ανακατασκευής του οστού. Η έκφραση των γονιδίων ελέγχθηκε σε δείγματα περιοστέου τα οποία ελήφθησαν κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων αποκατάστασης (φυσιολογικά δείγματα) καθώς και σε δείγματα περιοστέου που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων για αντιμετώπιση καταγμάτων, τόσο από την εστία του κατάγματος όσο και από περιοχές απομακρυσμένες από την εστία του κατάγματος. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η πιθανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση των περιοστικών BMPs

διαφόρων συνθηκών ή παραμέτρων σχετιζόμενων με τους ασθενείς (π.χ. φύλο, ηλικία, δείκτης μάζας σώματος) και τα ίδια τα δείγματα (π.χ. ημέρα κατάγματος, περιοχή λήψης δείγματος). Η χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και στατιστικών αναλύσεων των αποτελεσμάτων μας, επέτρεψε τον προσδιορισμό με μεγαλύτερη ακρίβεια της σημαντικότητας της γονιδιακής έκφρασης των περισοτικών BMPs ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

**B**

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## B1 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### B1.1 Δείγμα μελέτης

Μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, δείγματα περισσέου λήφθηκαν από ασθενείς της Ορθοπαιδικής Χειρουργικής Κλινικής κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων την περίοδο 2007 - 2010. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα δείγματα περισσέου που λήφθηκαν, μελετήθηκαν και χωρίστηκαν σε δύο κύριες ομάδες:

1. Σε φυσιολογικά δείγματα ανθρώπινου περισσέου. Τα δείγματα αυτά προήλθαν ως επί των πλείστων από επανορθωτικές χειρουργικές επεμβάσεις όπως αρθροπλαστική γόνατος, ισχίου και οστεοτομίες, από φυσιολογικά οστά
2. Σε δείγματα ανθρώπινου περισσέου που προέρχονταν από κάταγμα. Η λήψη αφορούσε είτε την εστία του κατάγματος είτε τεμάχια περισσέου σε απόσταση από την εστία.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από ενήλικα άτομα και παιδιά. Στο σύνολο τους τα δείγματα προήλθαν τόσο από μεγάλα οστά όσο και από μικρά. Οι ασθενείς δέχθηκαν να απαντήσουν σε ερωτηματολόγιο για την πλήρη καταγραφή ιστορικού και την σύσταση κατηγοριών-υποομάδων για την περαιτέρω συσχέτιση της έκφρασης των ελεγχόμενων γονιδίων με ποικίλες παραμέτρους. Κατά τη λήψη ιστορικού σημειώματος συλλέχθηκαν πληροφορίες όπως: το φύλο, η ηλικία, το κάπνισμα, το οστό δειγματοληψίας (μικρό/ μεγάλο, άνω άκρο/ κάτω άκρο), ο δείκτης μάζας σώματος [Body Mass Index, BMI=Βάρος (kg)/Υψος<sup>2</sup>(m)] όπως και όταν επρόκειτο για κάταγμα, τις ώρες ή/και τη μέρα που έγινε η δειγματοληψία μετά το κάταγμα.

Συλλέχθηκαν 314 δείγματα περισσέου, 107 χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικά και 207 ως καταγματικά εκ των οποίων 193 προήλθαν από την εστία του κατάγματος και 14 ελήφθησαν σε απόσταση (2-3 εκατοστά) από το κάταγμα. Από τα φυσιολογικά δείγματα, 82 προέρχονται από ενήλικα άτομα (μ.ο.: 55 έτη, εύρος: 19-87 έτη) και 25 από παιδιά και εφήβους (μ.ο.: 12 έτη, εύρος: 1-18 έτη), ενώ από τα δείγματα καταγμάτων 158 είναι ενηλίκων ασθενών (μ.ο.: 59 έτη, εύρος: 20-89 έτη) και 35 παιδιών και εφήβων (μ.ο.: 14 έτη, εύρος: 3-18 έτη). Στους πίνακες

που ακολουθούν (B1.1, B1.2, B1.3), όλες οι παραπάνω πληροφορίες παρουσιάζονται σχηματικά και διεξοδικά.

Πίνακας B1.1 Χαρακτηριστικά φυσιολογικών δειγμάτων.

Φυσιολογικά		Ενήλικες n=82 (μ.ο. ηλικίας)	Παιδιά n=25
Φύλο	Άρρεν	35 (53)	18
	Θήλυ	47 (58)	7
Ηλικία	< 18 ετών	-	25
	18 – 49 ετών	32 (37)	-
	> 50 ετών	50 (70)	-
Κάπνισμα	Όχι	51 (60)	25
	Ναι	31 (45)	-
Μηχανική φόρτιση	Άνω άκρο	35	10
	Κάτω άκρο	47	15
Οστούν	Μικρό	27	6
	Μεγάλο	55	19
BMI	Αδύνατος	-	-
	Φυσιολογικός	26	-
	Υπέρβαρος	28	-
	Παχύσαρκος	28	-

Πίνακας Β1.2 Χαρακτηριστικά δειγμάτων από κατάγμα.

Κατάγματα		Ενήλικες							Παιδιά	
		Σύνολο n=158 (μ.ο. ηλικίας)	1 <sup>ης</sup> ημέρας n=61	2 <sup>ης</sup> ημέρας n=25	3 <sup>ης</sup> ημέρας n=21	4 <sup>ης</sup> - 10 <sup>ης</sup> ημέρας n=26	11 <sup>ης</sup> - 30 <sup>ης</sup> ημέρας n=12	1-4 μήνες n=8	>5 μήνες n=5	Σύνολο n=35
φύλο	Άρρεν	87 (57)	40	10	8	14	6	6	3	26
	Θήλυ	71 (60)	21	15	13	12	6	2	2	9
ηλικία	< 18	-	-	-	-	-	-	-	-	35
	18 – 49	68 (35)	30	6	10	7	5	6	4	0
	> 50	90 (72)	31	19	11	19	7	2	1	0
κάπνισμα	Όχι	109 (64)	39	22	11	21	7	6	3	35
	Ναι	49 (47)	22	3	9	5	5	2	2	0
μηχανική φόρτιση	Άνω άκρο	62	23	4	5	9	8	6	5	27
	Κάτω άκρο	96	38	21	16	17	4	-	-	8
οστούν	Μικρό	19	10	1	1	1	2	4	-	2
	Μεγάλο	139	51	24	20	25	10	4	5	33
BMI	Αδύνατος	3	1	1	-	1	-	-	-	-
	Φυσιολογικός	53	20	8	7	10	4	3	1	-
	Υπέρβαρος	72	30	10	8	10	6	4	4	-
	Παχύσαρκος	30	10	6	6	5	2	1	-	-



Πίνακας Β1.3 Χαρακτηριστικά προέλευσης περισοτικών δειγμάτων.

<b>Σύνολο περισσοτικών δειγμάτων Προέλευση</b>	<b>Φυσιολογικά n=107 n,(%)</b>	<b>Κατάγματα (εστία) n=193 n,(%)</b>	<b>Κατάγματα (απόσταση) n=14 n,(%)</b>
Βραχιόνιο	2 (1,8)	16 (8,3)	1 (7,2)
Κερκίδα	14 (13,1)	38 (19,7)	6 (42,8)
Ωλένη	8 (7,5)	19 (9,8)	- (-)
Μετακάρπιο	6 (5,6)	6 (3,1)	- (-)
Σκαφοειδές	3 (2,8)	1(0,5)	- (-)
Φάλαγγα (άνω άκρο)	8 (7,5)	5 (2,6)	- (-)
Λαγόνιο	2 (1,8)	- (-)	- (-)
Μηρός	27 (25,3)	50 (25,9)	1 (7,2)
Κνήμη	15 (14,1)	25 (13,0)	2 (14,3)
Περώνη	6 (5,6)	22 (11,4)	3 (21,3)
Μετατάρσιο	10 (9,3)	7 (3,6)	1 (7,2)
Φάλαγγα (κάτω άκρο)	6 (5,6)	4 (2,1)	- (-)

## **B1.2 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης**

### **B1.2.1 Γενικά**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών στα βιολογικά συστήματα απαιτεί τη μελέτη της έκφρασης πληθώρας γονιδίων, η οποία επιτυγχάνεται με ποσοτικοποίηση του RNA [201]. Το RNA μπορεί να απομονωθεί τόσο από κύτταρα αίματος, όσο και από κύτταρα ιστών. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το κάθε περιοστικό τεμάχιο συλλέχθηκε από τους χειρουργούς, τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο συμπληρωμένο με φυσιολογικό ορό τόσο ώστε να καλύπτεται το δείγμα, και κατόπιν επεξεργάστηκε άμεσα για την απομόνωση του RNA του ιστού.

### **B1.2.2 Απομόνωση RNA από το περιοστικό τεμάχιο**

Η απομόνωση του RNA έγινε υπό συνθήκες απόλυτης αποστείρωσης, λόγω της ευαισθησίας που έχει και της εύκολης (αν δεν διατηρείται η αποστείρωση) πρόσμιξης από γενετικό υλικό του περιβάλλοντα χώρου. Κατά την επεξεργασία του, απαραίτητη είναι η χρήση γαντιών όπως και η αποκλειστική χρήση υλικών για αυτή τη διαδικασία (πιπέτες, erpendorfs, αναρροφητικών στομιών, ομογενοποιητής) και αντιδραστηρίων (ddH<sub>2</sub>O, RNazol).

#### **A. Φάση:**

*Διαδικασία σε Πάγο και Συνθήκες Αποστειρωμένες-ελεύθερες RNAσών*

#### Ημέρα πρώτη :

1. Με τη χρήση νυστεριού και μέσα σε τριβλίο Petri τεμαχίζεται σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια.
2. Τοποθετούμε τον ιστό σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon και προσθέτουμε διάλυμα RNazol (Invitrogen), έως ότου καλυφθεί το δείγμα και αναλόγως με το μέγεθος και όγκου αυτού. Το RNazol έχει την ικανότητα να διαχωρίζει το RNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά μακρομόρια, χάρη σε ένα βήμα που στηρίζεται στην αντίδραση της φαινόλης και της γουανιδίνης με τα κυτταρικά συστατικά.
3. Με ειδικό ηλεκτρικό μηχάνημα το οποίο διαθέτει μικρολεπίδες (ομογενοποιητής) κόβουμε και ομογενοποιούμε τον ιστό (Εικόνα B1.1). Ο

καθαρισμός του ομογενοποιητή, για την επαναχρησιμοποίησή του σε επόμενο δείγμα, γίνεται με διαδοχικές και εναλλασόμενες πλύσεις με διάλυμα NaOH και H<sub>2</sub>O.



*Εικόνα Β1.1. Ομογενοποίηση περιστικού τεμαχίου για απομόνωση RNA.*

4. Μεταφορά δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf όγκου 2mL και προσθήκη χλωροφορμίου, σε όγκο ίσο με το 1/10 του RNazol. Το χλωροφόρμιο βοηθά στο διαχωρισμό του RNA από τα υπόλοιπα μακρομόρια του μίγματος.
5. Παραμονή στον πάγο για 15 λεπτά με ταυτόχρονη περιοδική δυναμική ανάδευση του δείγματος με την χρήση μηχανήματος κατάλληλο για την διαδικασία αυτή (vortex).
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση. Το RNA έχει απομονωθεί στην υδατική φάση.
7. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης και τα δείγματα παραμένουν μέχρι την επόμενη μέρα (overnight) στους -20°C.

#### Ημέρα δεύτερη :

1. Φυγοκεντρούμε επί 30 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
3. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα RLN και η απομόνωση του RNA συνεχίζεται ακολουθώντας το ειδικό πρωτόκολλο RNeasy Mini Kit της QIAGEN.

## B. Φάση:

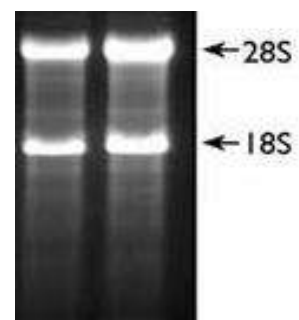
*RNeasy Mini Kit* της εταιρείας *QIAGEN*. Διαδικασία σε Θερμοκρασία Δωματίου.

1. Προστίθεται διάλυμα RLN+, που αποσκοπεί στη λύση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Αποτελείται από Tris-Cl 1,5M, NaCl 1M, MgCl<sub>2</sub> 1M, Nonidet P-40 0,5%(v/v) και ddH<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες.
2. Σύντομη φυγοκέντρηση, συλλογή υπερκείμενου και προσθήκη διαλύματος RLT. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη, που είναι εξειδικευμένη στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών και θειοκυανική γουινιδίνη, που επίσης δρα ως αποδιατακτικό των πρωτεϊνών.
3. Προσθήκη 96-100% αιθανόλης, η οποία ως οργανική ένωση διαλυτοποιεί όλα τα κυτταρικά συστατικά, εκτός των νουκλεϊκών οξέων.
4. Μεταφορά δείγματος σε στήλη καθαρισμού που αποτελείται από μεμβράνη σιλικόνης και επιτρέπει την επιλεκτική πρόσδεση του RNA σε αυτήν.
5. Σύντομη φυγοκέντρηση, το διάλυμα διηθείται από τη στήλη, το RNA προσδένεται στη μεμβράνη και τα υπόλοιπα συστατικά απορρίπτονται.
6. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις του RNA με μια σειρά διαλυμάτων, με σκοπό τη μέγιστη καθαρότητα του τελικού προϊόντος. Το πρώτο διάλυμα πλύσης είναι το RW1, που περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη και αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεϊνικά υπολείμματα. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα RPE, που περιέχει αιθανόλη και απομακρύνει οργανικά κατάλοιπα, που δεν απομακρύνθηκαν με την αρχική προσθήκη αιθανόλης. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για να επιτύχουμε τη μέγιστη καθαρότητα του RNA.
7. Η στήλη μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf όγκου 1,5 μL και προστίθεται ddH<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες πάνω στη μεμβράνη.
8. Σύντομη φυγοκέντρηση. Το RNA αποθηκεύεται στους -80oC.

#### Διαδικασία ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου

Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αγαρόζης (Εικόνα B1.2). Ο ποσοτικός έλεγχος του RNA γίνεται με φωτομέτρηση στα 260nm και 280nm. Για την φωτομέτρηση αραιώνουμε το RNA

*Εικόνα B1.2 Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA. Φωτογραφία κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)*





προσθέτοντας 6μl σε 594μl ddH<sub>2</sub>O. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280 nm πρέπει να κυμαίνεται από 1,7 έως 1,9. Αν είναι μικρότερος τότε έχουμε κακή ποιότητα RNA λόγω προσμίξεων, όπως DNA και πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του RNA (μg/ml) βρίσκεται από τον τύπο  $OD_{260} \times 40 \times$  αραιώση.

### **B1.2.3. Σύνθεση cDNA**

Το ολικό κυτταρικό RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα του ιστού (η μέθοδος περιγράφηκε παραπάνω) μεταγράφεται in vitro σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV. Η σύνθεση του cDNA έγινε με τη χρήση του First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR AMV της εταιρείας Roche. Η διαδικασία απαιτεί επώαση συγκεκριμένου όγκου RNA και ddH<sub>2</sub>O στους 65°C, ώστε να γίνει αποδιάταξη των τοπικών δίκλωνων δομών. Η αναλογία RNA/ddH<sub>2</sub>O καθορίστηκε από τη συγκέντρωση του RNA ώστε η τελική ποσότητα να είναι 1μg και τελικός όγκος του διαλύματος να μην ξεπερνά τα 8,2μL. Στη συνέχεια, προστέθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση μαζί με μίγμα αντιδραστηρίων για τον πολυμερισμό. Ο τελικός όγκος του cDNA (20 μl) αραιώνεται σε αναλογία 1:10 σε τελικό όγκο 200 μl όπως συνιστάται (Πίνακας B1.4).

#### *Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση*

- Ανάμειξη του RNA με το ddH<sub>2</sub>O.
- Επώαση στους 65 °C για 10 min.
- Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα). Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 μg RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 μl.

#### Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά.
2. 42 °C για 60 λεπτά.
3. 99°C για 5 λεπτά.
4. 4°C.

## Πίνακας Β1.4 Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
RNA	## µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4.0 µl
ddH <sub>2</sub> O	## µl
Random Primers	2.0 µl
RNAase inhibitor (50 u/µl)	1.0 µl
AMV (50 u/µl)	0.8 µl
<b>ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ</b>	<b>20 µl</b>

Έλεγχος επιτυχούς σύνθεσης cDNA

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 3µl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8, Πίνακας Β1.5). Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη PCR είναι:

RARA6 (εμπρόσθιος): 5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'

RARA8 (ανάστροφος): 5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'

Συνθήκες της αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό
- φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1 λεπτό
- φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά

*Πίνακας B1.5 Πρωτόκολλο ελέγχου σύνδεσης cDNA μέσω ενίσχυσης PCR για το γονίδιο RARα.*

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ/ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Υπόστρωμα: cDNA	3 µl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2 µl
dNTPs (40mM)	1 µl
RAR6 (10pm/µl)	2 µl
RAR8 (10pm/µl)	2 µl
Taq DNA πολυμεράση (5 units/µl)	0,4 µl
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 µl

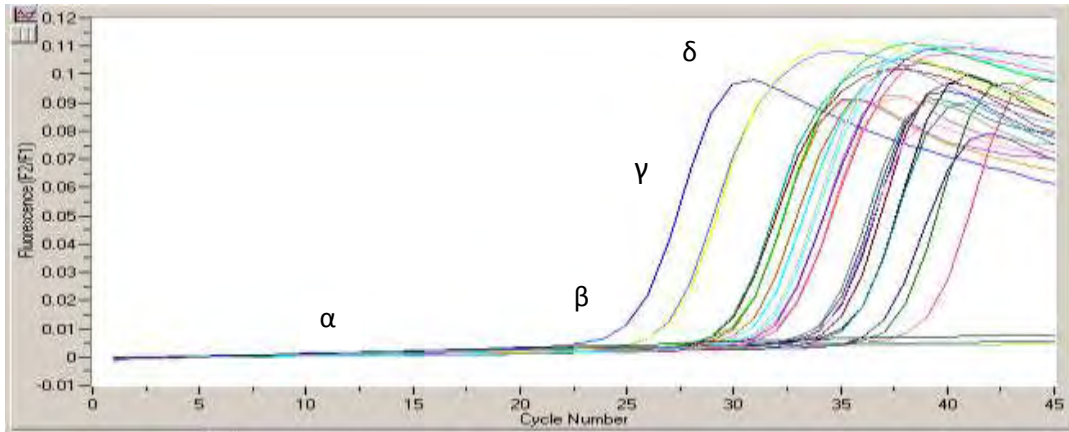
#### **B1.2.4 Ποσοτική PCR Πραγματικού χρόνου (Quantitative RT-PCR)**

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιοσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR). Παρόλο που η ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου παρέχει ακριβή ποσοτικοποίηση σε μια μεγάλη δυναμική ποικιλία επιπέδων έκφρασης, δεν είναι κατάλληλη για ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού γονιδίων. Επομένως, η ανάλυση μικροσυστοιχιών χρησιμοποιείται συχνά ως εργαλείο ώστε να βρεθούν γονίδια στόχοι που εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των βιολογικών δειγμάτων, και η PCR

πραγματικού χρόνου παρέχει ακριβή ποσοτικοποίηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μικροσυστοιχιών.

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μία διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης Real-time PCR. Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση (Εικόνα Β1.3).

Για να επιτευχθεί η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη.

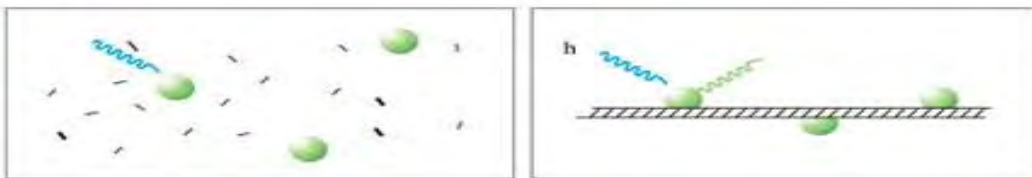


Εικόνα B1.3 Κινητική της αντίδρασης της PCR. α) Αρχική φάση αύξησης (background), β) σημείο έναρξης εκθετικής φάσης, γ) φάση εκθετικής φάσης (log phase), δ) τελική φάση αντίδρασης (plateau).

Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR) (Εικόνα B1.4):

- ❑ Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)

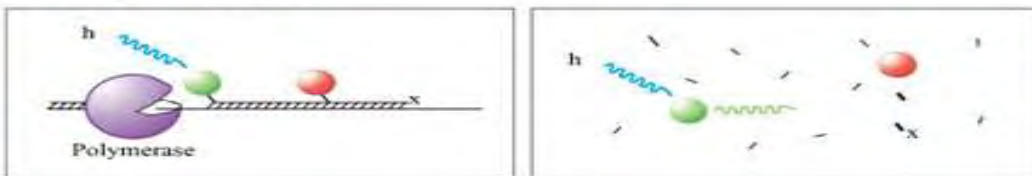
#### I. SYBR Green



#### II. Hybridization Probes



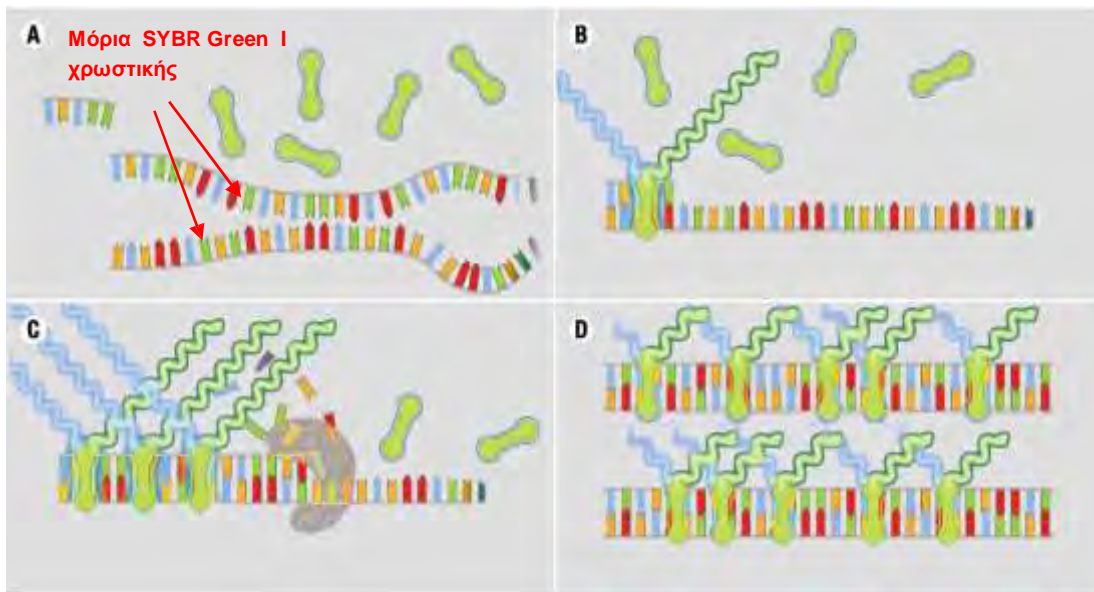
#### III. TaqMan Probes



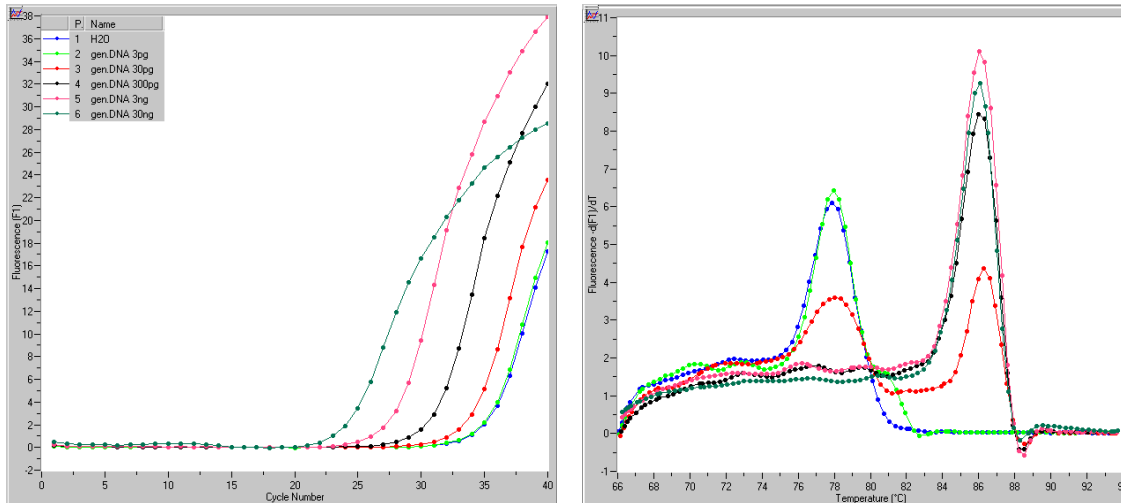
Εικόνα B1.4 Παραλλαγές PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

#### B1.2.4.i. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα B1.5). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Εικόνα B1.6) [202].



Εικόνα B1.5 Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα

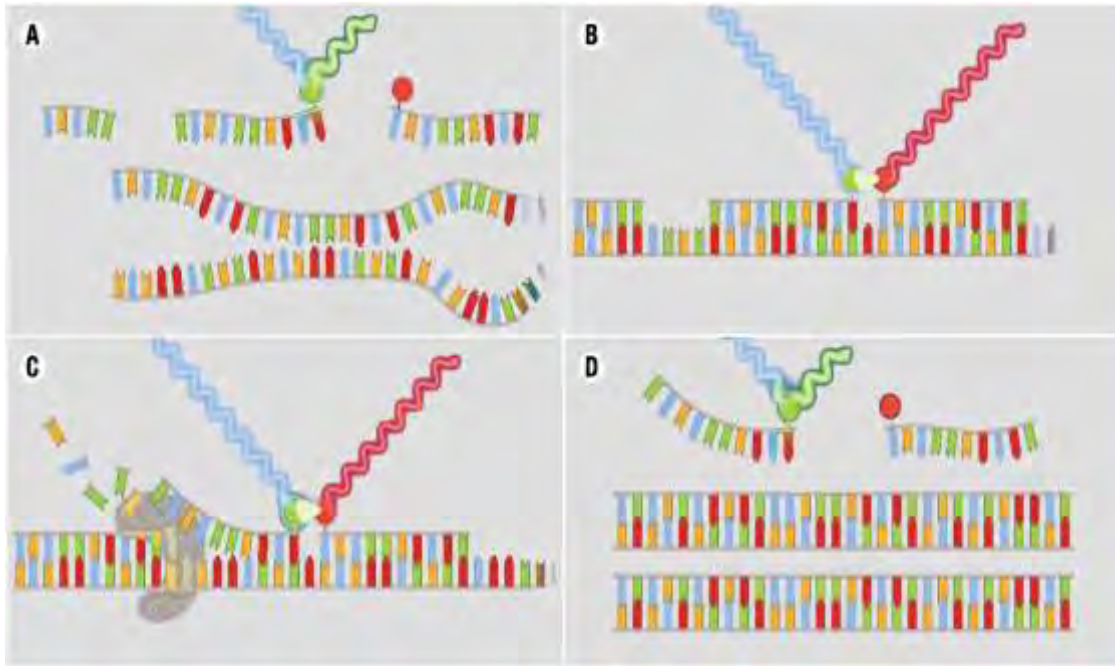


*Εικόνα B1.6 Παρακολούθηση της PCR με τη χρήση της SYBR Green I χρωστικής. Ποσοτικοποίηση (αριστερά), καμπύλη τήξης προϊόντων (δεξιά).*

#### *B1.2.4.ii Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης*

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για ν' ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς (Εικόνα B1.7) [202].



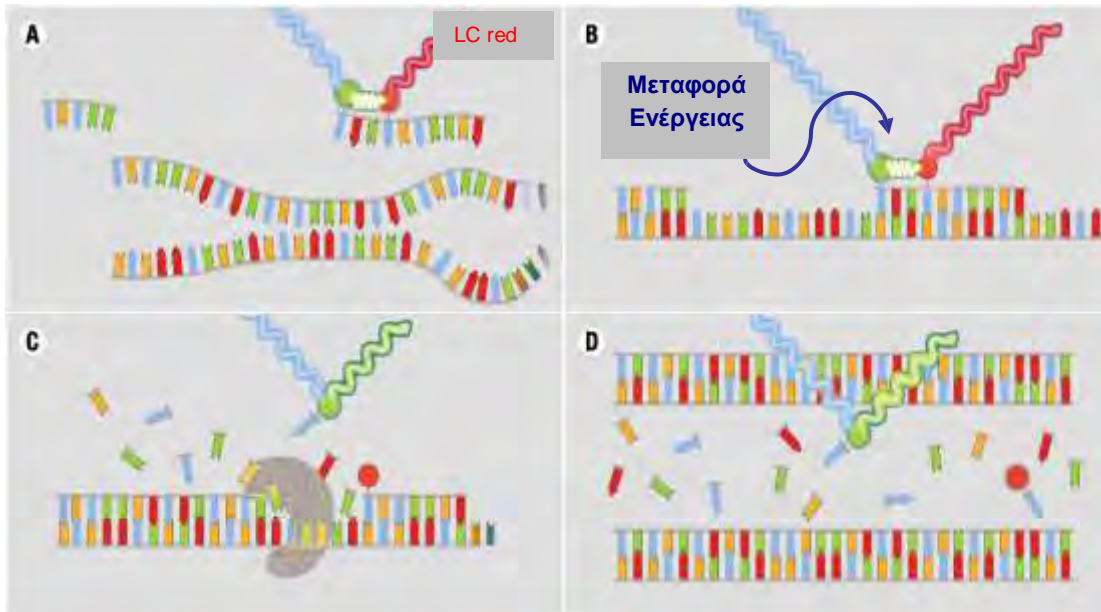


Εικόνα B1.7 Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

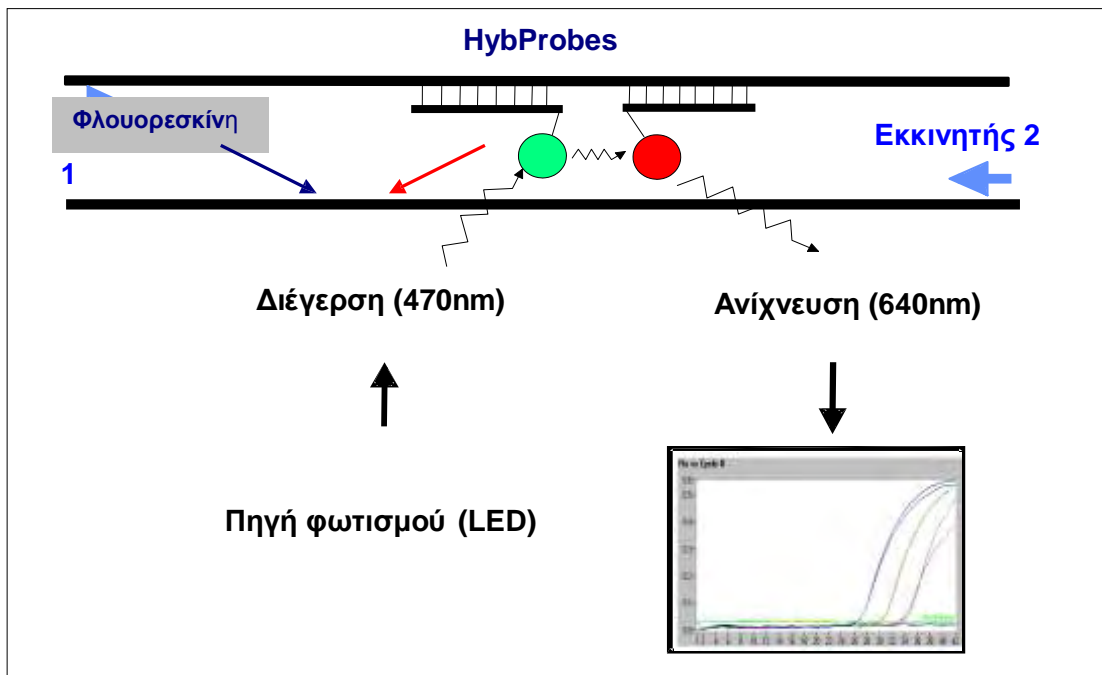
#### B1.2.4.iii Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλο-επικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικόνες B1.8, B1.9) [202].





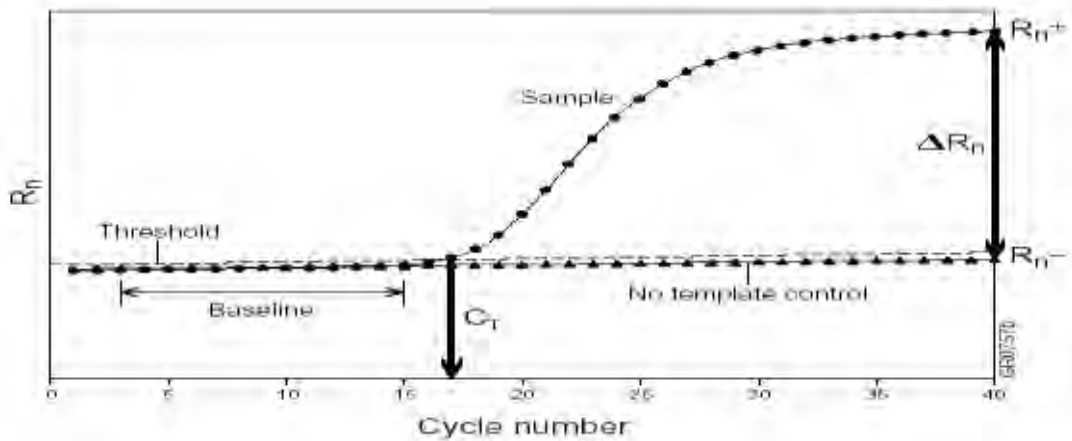
Εικόνα B1.8 Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.



Εικόνα B1.9 Ένταση σήματος φθορισμού με βάση τη φάση της αντίδρασης.

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης

(Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικόνα Β1.10).



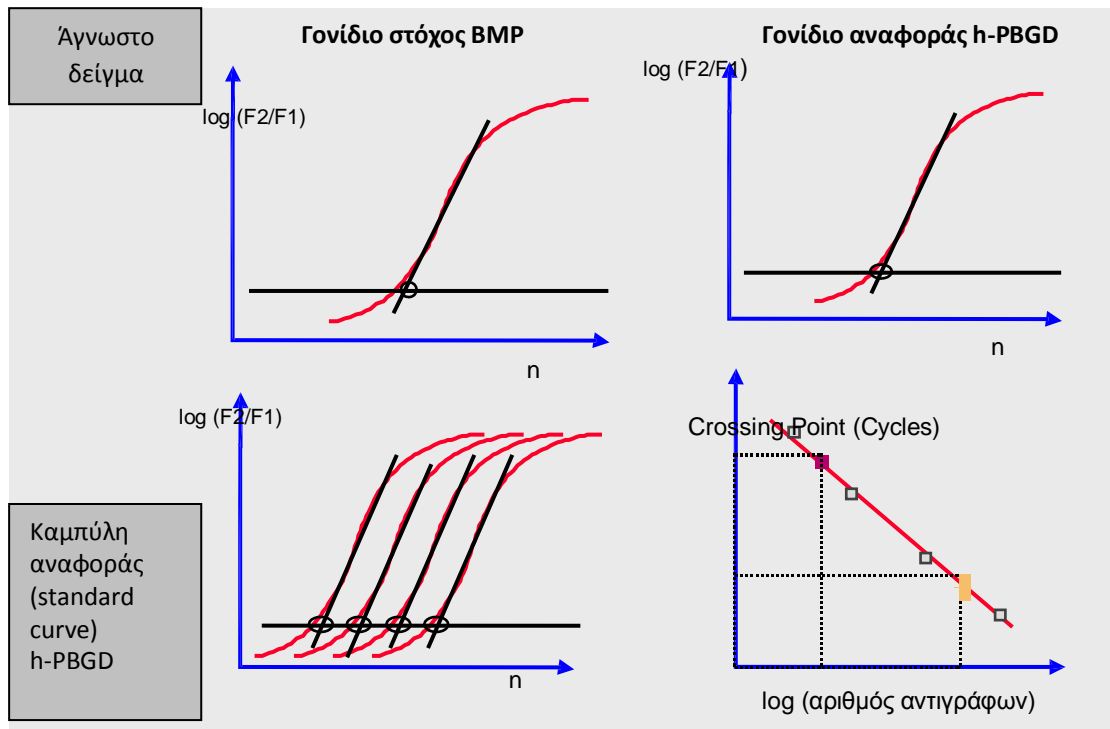
*Εικόνα Β1.10 Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή Ct), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.*

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική»

ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση [202].

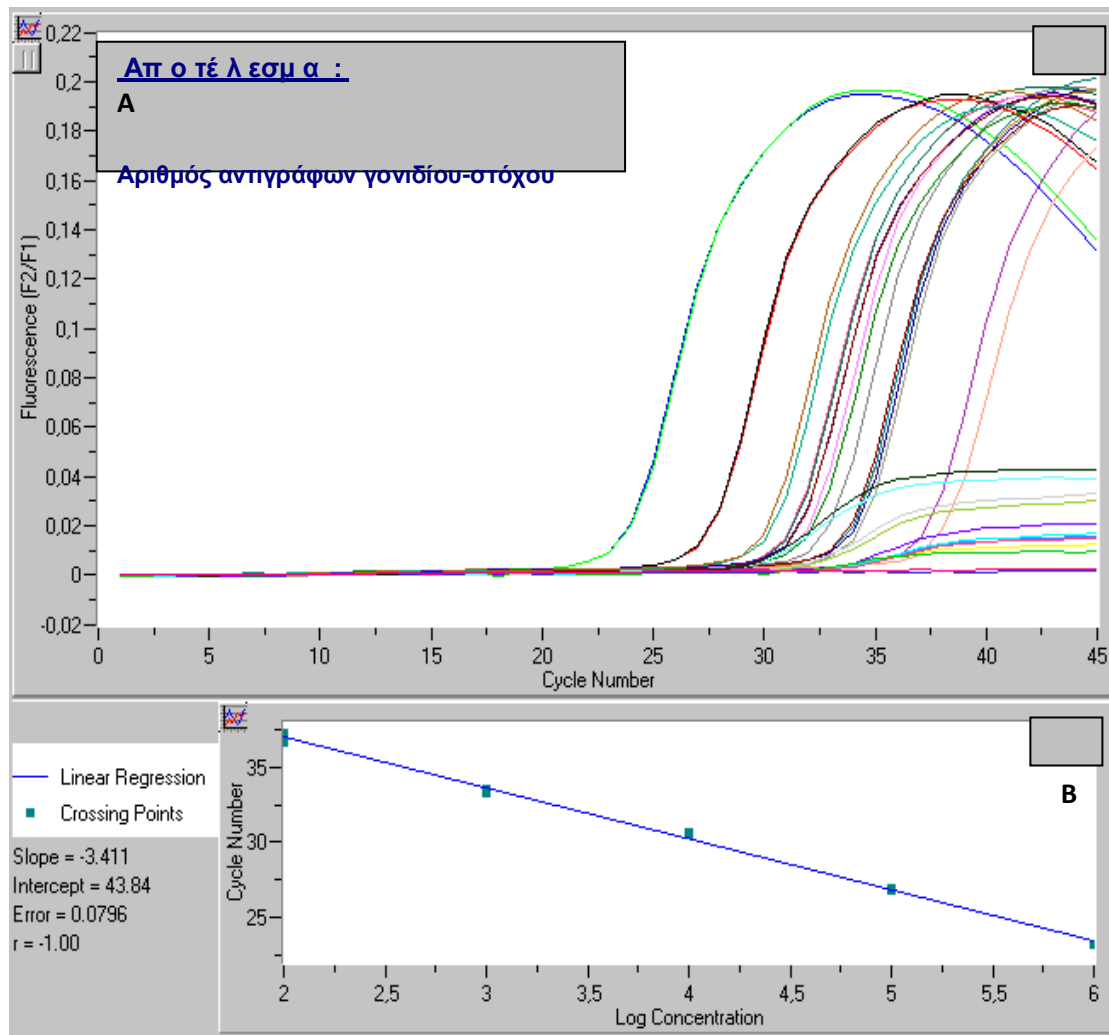
Στη *σχετική ποσοτικοποίηση* γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς (Εικόνα Β1.11). Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς [202].



*Εικόνα Β1.11 Σχετική ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.*

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης (*απόλυτη ποσοτικοποίηση*) εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων,

συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Εικόνα B1.12) [202].



*Εικόνα B1.12 Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche). A. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Η σχετική ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με το λόγο του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου που μελετάται προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. B. Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση*

#### B1.2.4.iv Γονίδιο αναφοράς h-PBGD

Για την ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping genes) το γονίδιο της απαμινάσης του πορφοχολινογόνου (h-PBGD), η έκφραση του οποίου βοήθησε στην κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Το γονίδιο

αναφοράς h-PBGD εκφράζεται σε μεγάλο εύρος ιστών σε σχετικά σταθερά επίπεδα έκφρασης. Δεν υπάρχουν γνωστά ψευδογονίδια για το h-PBGD. Κατά την επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων, λήφθηκαν υπόψη τα εξής:

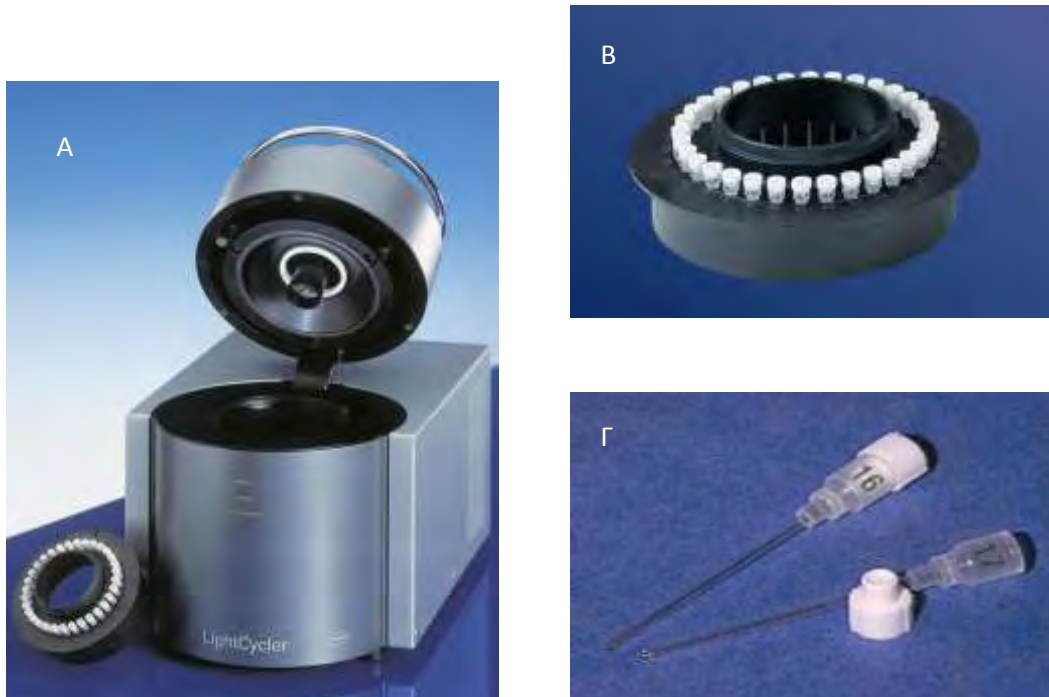
- Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς δε ρυθμίζονται στο υπό ανάλυση σύστημα, δηλαδή στον συνδεδετικό ιστό.
- Τα επίπεδα έκφρασης είναι παρόμοια με αυτά του στόχου έτσι ώστε οι μετρήσεις να μπορούν να γίνουν στην ίδια γραμμική κλίμακα.

Κατά την κανονικοποίηση, η ποσότητα του κάθε γονιδίου--στόχου όλων των δειγμάτων διαιρέθηκε με την ποσότητα του γονιδίου αναφοράς σε κάθε δείγμα, με αποτέλεσμα να αποκλειστούν ενδεχόμενα, όπως διαφοροποιήσεις που οφείλονται σε πιθανή αποικοδόμηση του RNA, στην ποιότητα του νουκλεϊκού οξέος, σε μειωμένη ποσότητα αρχικού δείγματος ή σε διαφοροποιήσεις στην αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA. Επομένως, η χρήση των γονιδίων αναφοράς εξυπηρετεί δύο κύριους σκοπούς: καθορίζει τη διαθεσιμότητα του ακέραιου cDNA σε κάθε δείγμα και κανονικοποιεί την ποσοτικοποίηση κάθε μεταγράφου-στόχου [203].

#### *B1.2.4.v Αντίδραση Q-RT-PCR*

Η διεξαγωγή της Q-RT-PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα LightCyclerR 2.0 της εταιρείας Roche (Εικόνα B1.13), που στηρίζεται σε ένα περιστροφικό σύστημα (carousel) 32 τριχοειδών δοκιμαστικών σωλήνων (capillaries), τελικού όγκου 20 µL. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 κατηγορίες δειγμάτων:

- Πέντε πρότυπα δείγματα για το γονίδιο αναφοράς.
- Δώδεκα προς μελέτη δείγματα και έναν αρνητικό μάρτυρα για το γονίδιο-στόχο.
- Δώδεκα προς μελέτη δείγματα και έναν αρνητικό μάρτυρα για το γονίδιο-αναφοράς.



*Εικόνα B1.13 A. Μηχάνημα Light Cycler (Roche). B. Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) Γ. Γάλινα τριχοειδή (Glass capillaries)*

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 χρησιμοποιήθηκε το kit “Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes. Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με “εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία”. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο PBGD. Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου h-PBGD που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων ( $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-2}$  ανά 5 μl δειγματος).

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα έκφρασης, των γονιδίων που μελετήθηκαν, αναλύθηκαν με *σχετική ποσοτικοποίηση* και τα πειράματα έγιναν εις διπλούν. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών (Probes) που

χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο μίγμα αντιδραστηρίων, τα αντίστοιχα πρωτόκολλα της Q-RT-PCR για κάθε γονίδιο καθώς επίσης και οι συνθήκες αντίδρασης (Πίνακας Β1.6), είναι:

Διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς *h-PBGD*:

- Δις απεσταγμένο νερό : 7.6 μl
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM : 2.4 μl
- Διάλυμα ανίχνευσης *h-PBGD* (10X) : 2.0 μl
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μl
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μl

Για το γονίδιο *BMP-2*

*BMP-2* Primer F: 5'-AGTTTCCTCGTGCGTACT-3' *BMP-2*

Primer R: 5'-AAACCCGTCTGTAGCTTCTTA-3' *BMP-2*

Probe FL: 5'-TGGGCTATTTGGACTGTGCTGTT--FL

*BMP-2* Probe LC: 5'-LC640-TTCAATTAGTGATAATGTATGGGAAGTCCT--PH

Προϊόν Q-RT-PCR=257bps

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο -στόχο *BMP-2*:

- Δις απεσταγμένο νερό : 5.6 μl
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM : 2.4 μl
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μl
- Εκκινητής *BMP-2* F : 1.0 μl
- Εκκινητής *BMP-2* R : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-2* FL : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-2* LC : 1.0 μl
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μl

Για το γονίδιο *BMP-4*

*BMP-4* Primer F: 5'-CTTGTTTTCTGTCAAGACACCATGATT-3'

*BMP-4* Primer R: 5'-GCAGAAGTGTGCGCCTCGAAG-3'

*BMP-4* Probe FL: 5'-CCCGTCTCAGGTATCAAAGTAGCATGGCTC--FL

*BMP-4* Probe LC: 5'-LC640-CGCCTCCTAGCAGGACTTGGCA--PH

Προϊόν Q-RT-PCR=207bps

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο -στόχο *BMP-4*:

- Δις απεσταγμένο νερό : 5.6 μl
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM : 2.4 μl
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μl
- Εκκινητής *BMP-4* S : 1.0 μl
- Εκκινητής *BMP-4* R : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-4* FL : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-4* LC : 1.0 μl
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μl

Για το γονίδιο *BMP-6*

*BMP-6* Primer F: 5'-CTCTACCCAGTCCCAGGA-3'

*BMP-6* Primer R: 5'-TCCCAGGTCTTGGAAACT-3'

*BMP-6* Probe FL: 5'-AGGCTGTTTTCAATCACTGCTGT--FL

*BMP-6* Probe LC: 5'-LC640-GTAATCTGAAGCACTGGAGACCCGC--PH

Προϊόν Q-RT-PCR=114bps

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο -στόχο *BMP-6*:

- Δις απεσταγμένο νερό : 7.2 μl
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM : 0.8 μl
- Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X) : 2.0 μl
- Εκκινητής *BMP-6* S : 1.0 μl
- Εκκινητής *BMP-6* R : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-6* FL : 1.0 μl
- Ανιχνευτής *BMP-6* LC : 1.0 μl
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG) : 1.0 μl

Για το γονίδιο *BMP-7*

*BMP-7* Primer F: 5'-CAGAGCATCAACCCAAGTT-3'



*BMP-7* Primer R: 5'-CTGACATACAGCTCGTGCTTCTTA-3'

*BMP-7* Probe FL: 5'-ACCAGGAAGCCCTGCGGATG--FL

*BMP-7* Probe LC: 5'-LC640-CCAACGTGGCAGAGAACAGCAGCA--PH

Προϊόν Q-RT-PCR=250bps

Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο -στόχο *BMP-7*:

– Δις απεσταγμένο νερό	: 7.2 μl
– MgCl <sub>2</sub> 25 mM	: 0.8 μl
– Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
– Εκκινητής <i>BMP-7</i> F	: 1.0 μl
– Εκκινητής <i>BMP-7</i> A	: 1.0 μl
– Ανιχνευτής <i>BMP-7</i> FL	: 1.0 μl
– Ανιχνευτής <i>BMP-7</i> LC	: 1.0 μl
– Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15 μl προστίθενται 5 μl cDNA του δείγματος, (αραίωση 1:10) σε όλες τις αντιδράσεις.

*Πίνακας B1.6 Συνθήκες Q-RT-PCR για κάθε γονίδιο που ελέγχθηκε.*

Γονίδιο	Αρχική αποδιάταξη	Κύκλοι	Αποδιάταξη	Annealing	Επιμήκυνση	Temp.trans. rate
BMP2	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	53°C για 10s	72°C για 10s	20°C/s
BMP4	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	57°C για 10s	72°C για 8s	20°C/s
BMP6	95°C για 10 min	45	95°C για 10s	50°C για 10s	72°C για 5s	20°C/s
BMP7	95°C για 10 min	50	95°C για 10s	55°C για 10s	72°C για 10s	20°C/s

Τα προϊόντα της Q-RT-PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% για τα γονίδια *BMP-2* και *BMP-7* και σε πηκτή αγαρόζης 3% για τα γονίδια *BMP-4* και *BMP-7*. Εν συνεχεία απεικονίστηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου, προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη μόνο ενός αντιγράφου.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται ως στρογγυλοποιημένες τιμές σε σχέση με το ενδογενώς εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς h-PBGD. Τα ποσά των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου h-PBGD καθορίζονται για κάθε δείγμα με εκτίμηση του μέσου όρου των τιμών των δύο αντιγράφων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν (γονίδιο-στόχος) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς h-PBGD.

### B1.3 Στατιστική ανάλυση

Η περιγραφή των δεδομένων έγινε με χρήση μέσων τιμών και τυπικών αποκλίσεων. Για την ανίχνευση των παραγόντων που έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στις μετρήσεις των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7, χρησιμοποιήθηκαν Γενικά Γραμμικά Μοντέλα μετά από μετασχηματισμό λογαρίθμου που εφαρμόστηκε και στις 4 μεταβλητές έκβασης. Για τα Γενικά Γραμμικά Μοντέλα που δημιουργήθηκαν δεν καταγράφηκαν ακραίες τιμές και οι προϋποθέσεις ελέγχθηκαν με χρήση του κριτηρίου Levene για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων αλλά και μέσω γραφικών ελέγχων (Normal p-p plots). Τα παρατηρούμενα επίπεδα σημαντικότητας (p-values) των διαφορών εκτιμήθηκαν με το κριτήριο Bonferroni ή το Newman – Keuls ανάλογα με την ικανοποίηση ή μη των προϋποθέσεων σε κάθε περίπτωση. Συσχετίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκαν με το συντελεστή Pearson correlation coefficient. Το επίπεδο σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε ίσο με 0.05. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA v.8.0.

## B2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### B2.1 Χαρακτηριστικά δείγματος και ανάλυσης

Στην παρούσα διατριβή, αναλύθηκαν 314 δείγματα ανθρώπινων περιοστικών δειγμάτων: 107 ελήφθησαν από φυσιολογικά οστά (χωρίς κατάγμα), 193 από την εστία κατάγματος και τα 14 από απόσταση από την εστία κατάγματος. Τα δείγματα περιστέου κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω ώστε να εξαχθούν πληρέστερα συμπεράσματα για την έκφραση σε μοριακό επίπεδο των ελεγχόμενων γονιδίων (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7) και πως επηρεάζεται αυτή από διάφορες συνθήκες - παραμέτρους των ασθενών. Οι συνθήκες - παράμετροι που μελετήθηκαν ως προς την έκφραση των ανθρώπινων περιοστικών BMPs και τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζουν σε αυτήν είναι το φύλο (άρρεν/ θήλυ), η ηλικία (18-49 έτη/ 50 έτη και άνω), το κάπνισμα (καπνιστής-ναι/ μη καπνιστής-όχι), η μηχανική φόρτιση (άνω/ κάτω άκρα), το μέγεθος του οστού (μικρό/ μεγάλο), ο δείκτης μάζας σώματος (αδύνατος/ φυσιολογικός/ υπέρβαρος/ παχύσαρκος) καθώς και οι ώρες μετά από κάθε κατάγμα των πρώτων δύο ημερών. Οι παραπάνω παράμετροι αφορούσαν τον ενήλικο πληθυσμό. Επίσης μελετήθηκαν παράμετροι όπως το αν το δείγμα προερχόταν από αριστερό ή δεξί άκρο, οι πιθανές ακραίες τιμές εάν επηρέαζαν σημαντικά κάποιο αποτέλεσμα – ανάλυση και το εάν η γονιδιακή έκφραση δειγμάτων κάποιου συγκεκριμένου οστού παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για το ίδιο το οστό.

Έτσι λοιπόν, τόσο τα *φυσιολογικά δείγματα* όσο και τα *καταγματικά* (εστία) χωρίστηκαν σε δύο μεγάλες ομάδες πληθυσμού σύμφωνα με την ηλικία. Οι επιμέρους υποομάδες είναι ο ενήλικος πληθυσμός κάθε κατηγορίας και τα παιδιά/έφηβοι αυτής. Όσον αφορά το πλήθος των ενηλίκων ατόμων, στα φυσιολογικά δείγματα δεν υπέστη κάποιο άλλο διαχωρισμό. Από την άλλη, τα *δείγματα που προήλθαν από κατάγματα* χωρίστηκαν ή/και ομαδοποιήθηκαν (ώστε να αυξηθεί το πλήθος δειγμάτων) ανάλογα με την ημέρα ή τον μήνα που συλλέχθηκαν μετά τον τραυματισμό. Η κατηγοριοποίηση παρουσιάζεται αναλυτικά στους πίνακες B1.1, B1.2 και B1.3 (βλ. B1 Υλικό και Μέθοδοι).

Στην συνέχεια του κεφαλαίου θα παρουσιαστούν με την σειρά:

- [1] στο *σύνολο των δειγμάτων*, η έκφραση των BMPs.
- [2] στα *φυσιολογικά, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας, κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας*, η έκφραση και σύγκριση των BMPs.
- [3] στον *ενήλικο πληθυσμό*, η ανάλυση και σύγκριση της έκφρασης κάθε BMP για 5 συνθήκες-παραμέτρους (ηλικία, φύλο, μέγεθος οστού, μηχανική φόρτιση, κάπνισμα).
- [4] στα *παιδιά/εφήβους και ενήλικες*, η ανάλυση και σύγκριση της έκφρασης κάθε BMP για όλες τις συνθήκες-παραμέτρους.
- [5] στα *κατάγματα*, η συσχέτιση της έκφρασης των BMPs με το *χρονικό διάστημα* από το κάταγμα.
- [6] στα *κατάγματα*, η σύγκριση της έκφρασης των BMPs δειγμάτων *διαφορετικών περιοχών* σε καταγματικό οστό (εστίας – απόστασης).
- [7] άλλες συσχετίσεις της έκφρασης των BMPs.

## B2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και στατιστική ανάλυση

Με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7. Οι τιμές που προκύπτουν από την Q-RT-PCR είναι αποτέλεσμα του λόγου των συγκεντρώσεων καθενός από τα γονίδια - στόχους προς το γονίδιο αναφοράς (h-PBGD), για κάθε δείγμα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές για την περαιτέρω στατιστική ανάλυσή τους.

Όπως αναφέρθηκε και στο δεύτερο κεφάλαιο, για την ανίχνευση των παραγόντων που έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στις μετρήσεις των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7, χρησιμοποιήθηκαν Γενικά Γραμμικά Μοντέλα μετά από μετασχηματισμό λογαρίθμου. Τα παρατηρούμενα επίπεδα σημαντικότητας ( $p$ -values) των διαφορών εκτιμήθηκαν με το κριτήριο Bonferroni ή το Newman – Keuls ανάλογα με την ικανοποίηση ή μη των προϋποθέσεων. Το επίπεδο σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε ίσο με 0.05 ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA v.8.0.

### B2.3 Ανάλυση της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των δειγμάτων (φυσιολογικά – κατάγματα, παιδιά – ενήλικες)

Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας B2.1) παρουσιάζει τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών από τα οποία προκύπτουν τα μέτρα αυτά καθώς και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για κάθε μέτρηση στο σύνολο των δειγμάτων (φυσιολογικά – κατάγματα, παιδιά – ενήλικες).

*Πίνακας B2.1 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των δειγμάτων.*

Descriptive Statistics										
Level of Factor	Level of Factor	Level of Factor	N	Value Mean	Value Std. Dev.	Value Std. Err.	Value -95.00%	Value +95.00%		
			1200	3.15786	7.28130	0.210193	2.745472	3.57025		
	BMP2		300	8.66663	12.33028	0.711889	7.265685	10.06758		
	BMP4		300	1.09158	1.91516	0.110572	0.873983	1.30918		
	BMP6		300	2.77760	3.51826	0.203127	2.377861	3.17734		
	BMP7		300	0.09562	0.48353	0.027917	0.040686	0.15056		
Παιδιά	BMP2		60	9.58700	11.23440	1.450355	6.684846	12.48915		
Παιδιά	BMP4		60	1.27960	2.74562	0.354458	0.570331	1.98887		
Παιδιά	BMP6		60	2.05210	2.22783	0.287612	1.476590	2.62761		
Παιδιά	BMP7		60	0.12057	0.27430	0.035412	0.049708	0.19143		
Ενήλικες	BMP2		240	8.43654	12.80084	0.813381	6.834231	10.03885		
Ενήλικες	BMP4		240	1.04458	1.64820	0.106391	0.834991	1.25416		
Ενήλικες	BMP6		240	2.95897	3.75436	0.242343	2.481575	3.43638		
Ενήλικες	BMP7		240	0.08939	0.52319	0.033772	0.022860	0.15592		
Φυσιολογική	BMP2		107	12.13355	16.62845	1.607533	8.946462	15.32064		
Φυσιολογική	BMP4		107	1.92449	2.62365	0.253638	1.421624	2.42735		
Φυσιολογική	BMP6		107	3.15383	3.82170	0.369457	2.421347	3.88632		
Φυσιολογική	BMP7		107	0.11988	0.35780	0.034590	0.051303	0.18846		
Κάταγμα	BMP2		193	6.74456	8.58477	0.617945	5.525726	7.96339		
Κάταγμα	BMP4		193	0.62981	1.14482	0.082406	0.467276	0.79235		
Κάταγμα	BMP6		193	2.56902	3.33022	0.239714	2.096204	3.04183		
Κάταγμα	BMP7		193	0.08218	0.54121	0.038957	0.005337	0.15902		
Φυσιολογική	Παιδιά	BMP2	25	14.04600	13.07208	2.614417	8.650109	19.44189		
Φυσιολογική	Παιδιά	BMP4	25	2.27960	4.02072	0.804143	0.619930	3.93927		
Φυσιολογική	Παιδιά	BMP6	25	2.51240	2.61819	0.523639	1.431662	3.59314		
Φυσιολογική	Παιδιά	BMP7	25	0.20951	0.40390	0.080781	0.042789	0.37624		
Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP2	82	11.55049	17.59950	1.943540	7.683453	15.41752		
Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP4	82	1.81622	2.04141	0.225436	1.367673	2.26477		
Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP6	82	3.34939	4.11295	0.454200	2.445675	4.25311		
Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP7	82	0.09255	0.34053	0.037605	0.017732	0.16738		
Κάταγμα	Παιδιά	BMP2	35	6.40200	8.56339	1.447477	3.460372	9.34363		
Κάταγμα	Παιδιά	BMP4	35	0.56531	0.63990	0.108163	0.345500	0.78513		
Κάταγμα	Παιδιά	BMP6	35	1.72331	1.87265	0.316535	1.080037	2.36659		
Κάταγμα	Παιδιά	BMP7	35	0.05704	0.07374	0.012464	0.031705	0.08237		
Κάταγμα	Ενήλικες	BMP2	158	6.82044	8.61482	0.685358	5.466730	8.17416		
Κάταγμα	Ενήλικες	BMP4	158	0.64410	1.23004	0.097856	0.450816	0.83739		
Κάταγμα	Ενήλικες	BMP6	158	2.75635	3.55085	0.282490	2.198382	3.31433		
Κάταγμα	Ενήλικες	BMP7	158	0.08775	0.59738	0.047525	-0.006125	0.18162		

Για την εκτίμηση των διαφορών πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός λογαρίθμου κατά την στατιστική ανάλυση. Έτσι, οι τιμές που παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες και γραφήματα είναι οι λογάριθμοι της κάθε BMP και όχι οι μέσες τιμές της σχετικής ποσοτικοποίησης που προέκυψαν από την Q-RT-PCR (BMP/h-PBGD).

### B2.3.1 Συσχέτιση της έκφρασης των BMPs ανεξαρτήτου κατηγοριοποίησης

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ιεραρχία στην έκφραση των ανθρώπινων περισοτικών BMPs όχι μόνο στο σύνολο των δειγμάτων αλλά και στις συγκρινόμενες υποομάδες. Έτσι, η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση ήταν αυτή της BMP-2 ακολουθούμενη από αυτή της BMP-6. Τρίτη σε έκφραση παρουσιάζεται η BMP-4 ενώ την χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία γονίδια εμφανίζει η BMP-7.

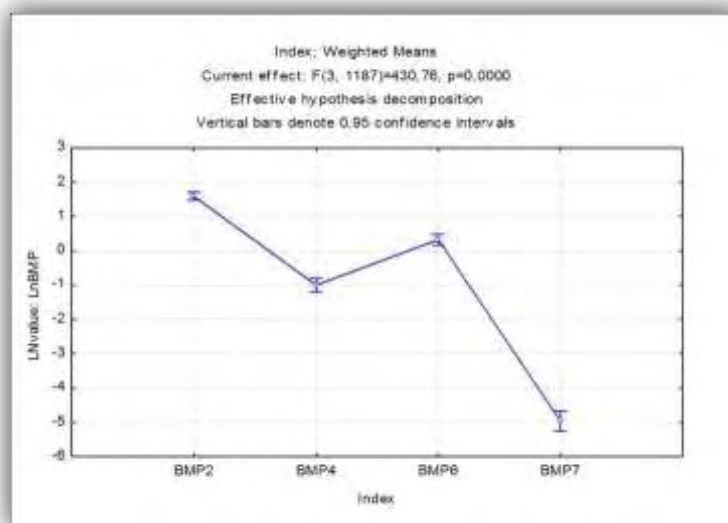
Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στο σύνολο των δειγμάτων όλες οι εκτιμώμενες διαφορές μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης των τεσσάρων ελεγμένων γονιδίων BMP-2> BMP-6> BMP-4> BMP-7 είναι **στατιστικά σημαντικές** και αυτή η σχέση αποδίδεται από τον πίνακα B2.2 και το γράφημα B2.1.

Bonferroni test; variable LNvalue					
Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MSE = 2,9173, df = 1187,0					
Cell No.	Index	{1}	{2}	{3}	{4}
1	BMP2		0,00	0,00	0,00
2	BMP4	0,00		0,00	0,00
3	BMP6	0,00	0,00		0,00
4	BMP7	0,00	0,00	0,00	

Πίνακας B2.2 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών {} και η στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισης της έκφρασης των BMPs.

Γράφημα B2.1 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs με μετασχηματισμό λογαρίθμου για τις μέσες τιμές. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



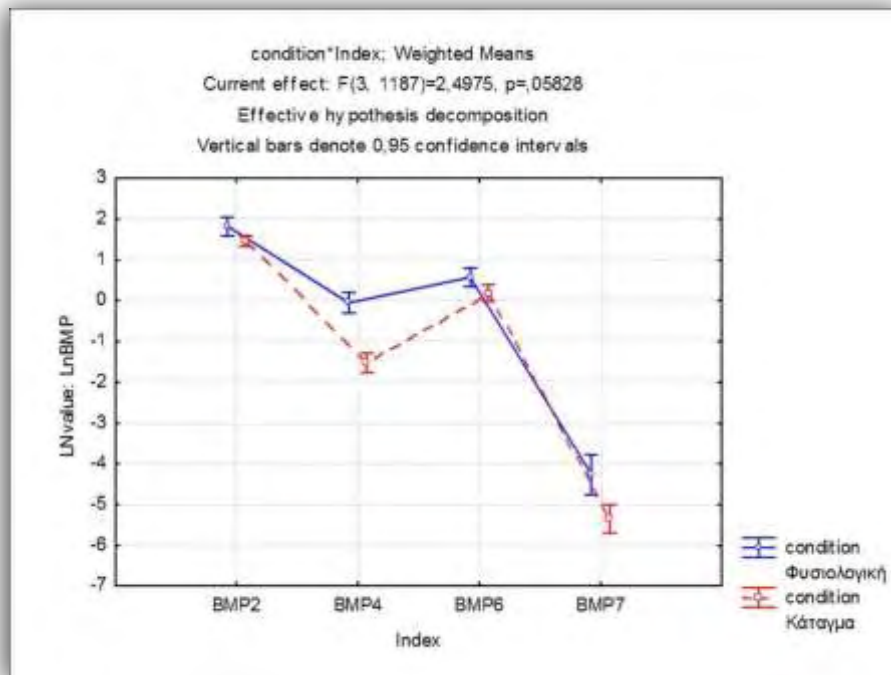


- στο σύνολο των δειγμάτων, τα φυσιολογικά δείγματα παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση από αυτή των καταγμάτων για όλες τις BMPs, ενώ η έκφραση διέφερε σημαντικά για τις BMP-4 και BMP-7. Τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα η ιεραρχία της έκφρασης ανάμεσα στις BMPs παρέμεινε. Στα φυσιολογικά δείγματα, οι τιμές των BMPs διαφέρουν σημαντικά όλες μεταξύ τους εκτός από την BMP-4 με την BMP-6. Στα κατάγματα όλες οι διαφορές ανάμεσα στις BMPs είναι **στατιστικά σημαντικές**. Η σχέση αποδίδεται από το πίνακα B2.3 και το γράφημα B2.2.

*Πίνακας B2.3 Παρουσίαση της συσχέτισης και στατιστικής σημαντικότητας της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των φυσιολογικών δειγμάτων και καταγμάτων.*

Bonferroni test; variable LNvalue										
Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MSE = 2,9173, df = 1187,0										
Cell No.	condition	Index	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
			1,8285	-,0533	,57168	-4,285	1,4538	-1,527	,18881	-5,347
1	Φυσιολογική	BMP2		0,000000	0,000003	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
2	Φυσιολογική	BMP4	0,000000		0,211362	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
3	Φυσιολογική	BMP6	0,000003	0,211362		0,000000	0,000554	0,000000	1,000000	0,000000
4	Φυσιολογική	BMP7	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
5	Κάταγμα	BMP2	1,000000	0,000000	0,000554	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
6	Κάταγμα	BMP4	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
7	Κάταγμα	BMP6	0,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
8	Κάταγμα	BMP7	0,000000	0,000000	0,000000	0,000005	0,000000	0,000000	0,000000	

*Γράφημα B2.2 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs των φυσιολογικών δειγμάτων και των καταγμάτων στο σύνολό τους. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.*

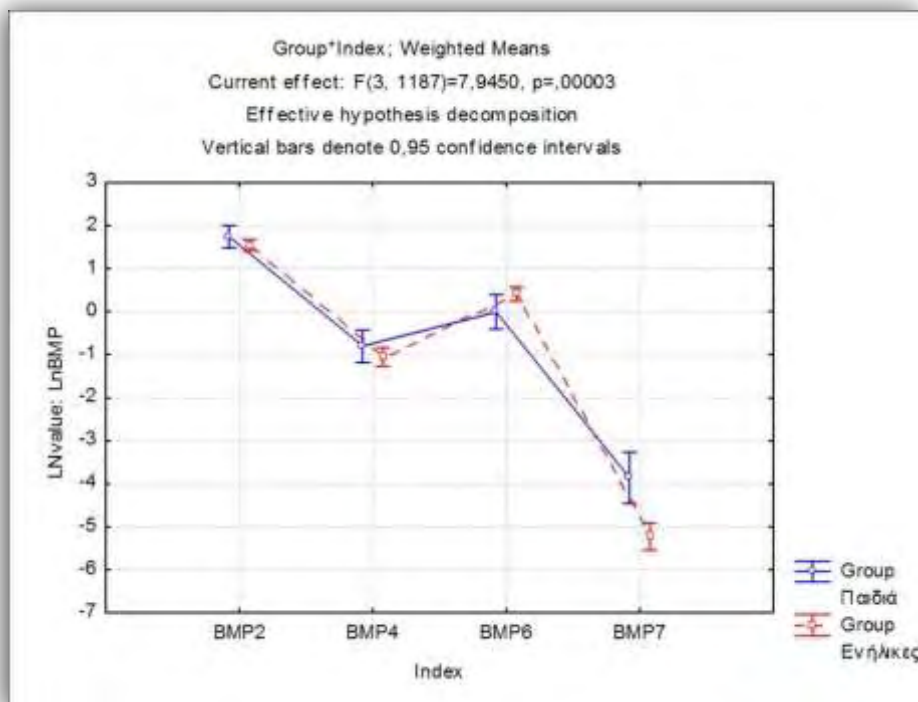


- στο σύνολο των δειγμάτων, τα παιδιά παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τους ενήλικες για τις BMP-2, BMP-4 και BMP-7, ενώ διαφέρουν σημαντικά μόνο για την BMP-7. Η ιεραρχία της έκφρασης των BMPs παραμένει τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες. Στα παιδιά οι τιμές των BMPs διαφέρουν σημαντικά όλες μεταξύ τους εκτός από την BMP-4 με την BMP-6. Στους ενήλικες όλες οι διαφορές ανάμεσα στις BMPs είναι στατιστικά σημαντικές. Η σχέση αποδίδεται από το πίνακα B2.4 και το γράφημα B2.3.

*Πίνακας B2.4 Παρουσίαση της συσχέτισης και στατιστικής σημαντικότητας της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των παιδιών και των ενηλίκων.*

Bonferroni test; variable LNvalue										
Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MSE = 2,9173, df = 1187,0										
Cell No.	Group	Index	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Παιδιά	BMP2	1,7409	-0,00000	-0,0096	-3,869	1,5482	-1,052	,40911	-5,234
2	Παιδιά	BMP4	0,000000	0,000000	0,324617	0,000000	1,000000	0,000000	0,000002	0,000000
3	Παιδιά	BMP6	0,000001	0,324617		0,000000	0,000000	0,000709	1,000000	0,000000
4	Παιδιά	BMP7	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000001
5	Ενήλικες	BMP2	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
6	Ενήλικες	BMP4	0,000000	1,000000	0,000709	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
7	Ενήλικες	BMP6	0,000002	0,000031	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
8	Ενήλικες	BMP7	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001	0,000000	0,000000	0,000000	

*Γράφημα B2.3 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs των παιδιών και των ενηλίκων. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.*

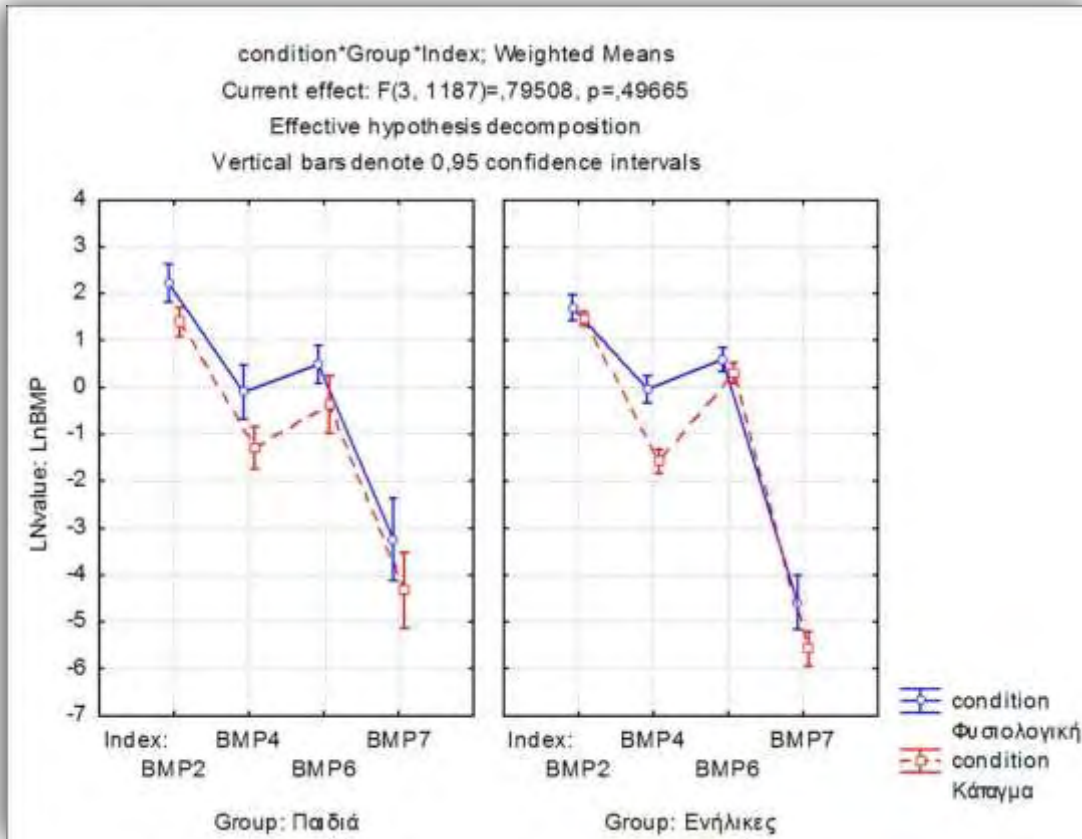


- όταν οι συγκρίσεις αφορούν την έκφραση των τεσσάρων BMPs ανά ηλικιακή ομάδα (παιδιά – ενήλικες) και κατάσταση (φυσιολογική – κάταγμα) φαίνεται ότι δεν αλλάζουν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα προηγούμενα αποτελέσματα ανεξαρτήτως κριτηρίου (Πίνακας B2.5, Γράφημα B2.4). Η ιεραρχία της έκφρασης ανάμεσα στις BMPs παραμένει τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες. Στα παιδιά, ανάμεσα σε φυσιολογικά δείγματα και κατάγματα δεν παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση των BMPs με υψηλότερη έκφραση αυτή των φυσιολογικών δειγμάτων. Στους ενήλικες, ανάμεσα σε φυσιολογικά δείγματα και κατάγματα παρατηρούνται διαφορές για τα γονίδια BMP-4 και BMP-7, ενώ η υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα για όλες τις BMPs. Στα φυσιολογικά δείγματα, τα παιδιά έχουν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τους ενήλικες αλλά όχι σημαντική διαφορά, για τα γονίδια BMP-2, BMP-4 και BMP-7, ενώ η BMP-6 είναι υψηλότερη για τους ενήλικες. Στα κατάγματα, η έκφραση των BMPs είναι παρόμοια μεταξύ παιδιών και ενηλίκων με εξαίρεση την έκφραση της BMP-7 που είναι σημαντικά υψηλότερη στα παιδιά.

**Πίνακας B2.5 Παρουσίαση της συσχέτισης και στατιστικής σημαντικότητας της έκφρασης των BMPs ανά ηλικιακή ομάδα και συνθήκη.**

Bonferroni test; variable L.N.value																			
Probabilities for Post Hoc Tests																			
Error: Between MSE = 2.9173, df = 1187,0																			
Cell No	condition	Group	Index	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
1	Φυσιολογική	Παιδιά	BMP2	2,2257	-1022	49136	-3,241	1,7048	-0,983	59017	-4,577	1,3947	-1,285	-3675	-4,318	1,4660	-1,578	31203	-5,575
2	Φυσιολογική	Παιδιά	BMP4	0,000	0,041	0,000	1,000	0,000	0,004	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	Φυσιολογική	Παιδιά	BMP6	0,041	1,000	0,000	0,000	0,230	1,000	1,000	0,000	1,000	0,006	1,000	0,000	0,969	0,000	1,000	0,000
4	Φυσιολογική	Παιδιά	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,076	0,000	0,002	0,000	1,000	0,000	0,001	0,000	0,000
5	Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP2	1,000	0,000	0,230	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
6	Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP4	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,004	0,000	0,004	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
7	Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP6	0,004	1,000	1,000	0,000	0,004	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,634	0,000	0,023	0,000	1,000
8	Φυσιολογική	Ενήλικες	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,076	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
9	Κάταγμα	Παιδιά	BMP2	1,000	0,101	1,000	0,000	1,000	0,004	1,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	1,000	0,000	0,000	0,086
10	Κάταγμα	Παιδιά	BMP4	0,000	0,931	0,000	0,002	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
11	Κάταγμα	Παιδιά	BMP6	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,634	0,000	0,002	1,000	0,000	0,000	0,000	0,019	1,000	0,000
12	Κάταγμα	Παιδιά	BMP7	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
13	Κάταγμα	Ενήλικες	BMP2	1,000	0,003	0,969	0,000	1,000	0,000	0,023	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	Κάταγμα	Ενήλικες	BMP4	0,000	0,008	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	Κάταγμα	Ενήλικες	BMP6	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,086	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
16	Κάταγμα	Ενήλικες	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000

Γράφημα Β2.4 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs ανά ηλικιακή ομάδα και συνθήκη. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



## B2.4 Ανάλυση της έκφρασης των BMPs στις μεγαλύτερες σε πλήθος δειγμάτων υποομάδες (φυσιολογικά – κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας – κατάγματα 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας)

Στη συνέχεια αναλύεται η έκφραση των ανθρώπινων περισοτικών BMPs ελέγχοντας για διαφορές μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καταγμάτων 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup>-10<sup>ης</sup> ημέρας στο σύνολο του πληθυσμού. Η ομαδοποίηση των καταγμάτων της 2<sup>ης</sup> έως και 10<sup>ης</sup> μέρας έγινε με κριτήριο το πλήθος των δειγμάτων (ανά ημέρα ήταν μικρό το δείγμα) ούτως ώστε να υπάρχουν όσο το δυνατόν πιο έγκυρα στατιστικά δεδομένα.

Η ιεραρχία της γονιδιακής έκφρασης των BMPs (BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7) παραμένει και στις 3 κατηγορίες.

Τα φυσιολογικά δείγματα είχαν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τις 2 κατηγορίες καταγμάτων για τις BMP-2, BMP-4 και BMP-7, ενώ μικρότερη έκφραση παρατηρήθηκε για την BMP-6 σε σχέση με τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας. Σημαντική ήταν η διαφορά για την BMP-7 σε σχέση και με τις 2 κατηγορίες καταγμάτων. Επιπλέον σημαντική ήταν η σχέση με τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας για την BMP-4.

Οι δύο κατηγορίες καταγμάτων παρουσίασαν παρόμοια έκφραση μεταξύ τους και στις δύο κατηγορίες με εξαίρεση την σημαντική διαφορά για την BMP-7, με υψηλότερη την έκφραση στα κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

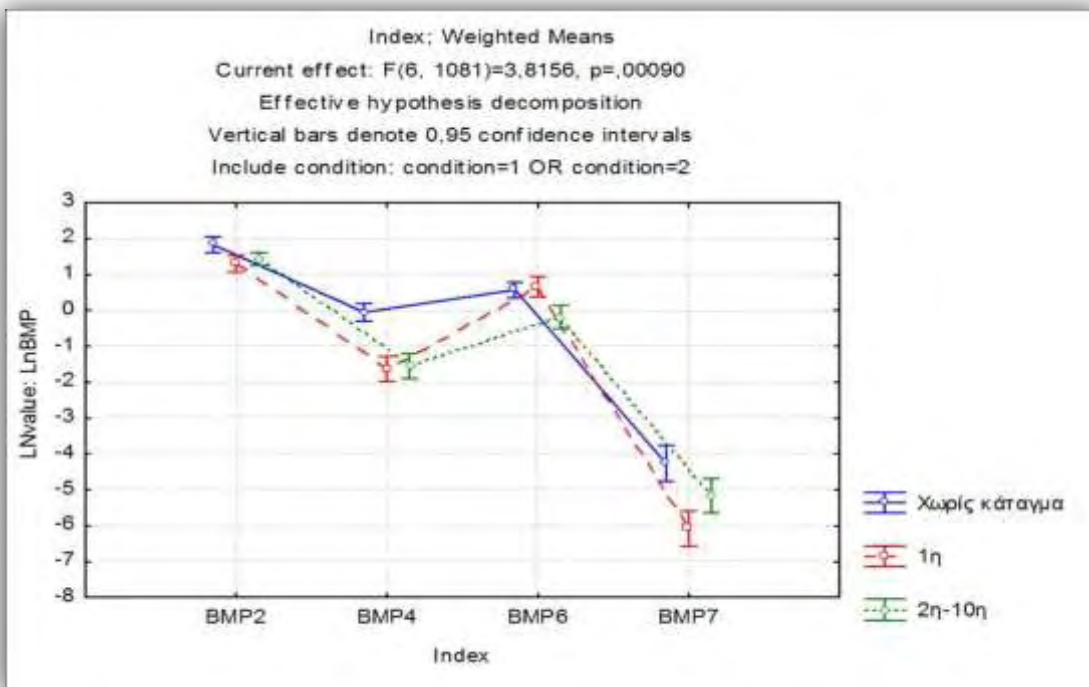
Ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα η μόνη σύγκριση έκφρασης που δεν είναι στατιστικά σημαντική είναι μεταξύ BMP-2 και BMP-6. Αναλόγως, και στα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας η σύγκριση της έκφρασης της BMP-2 με την BMP-6 δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, στα κατάγματα 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας όλες οι συγκρίσεις μεταξύ της έκφρασης των BMPs είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας B2.6, Γράφημα B2.5).



Πίνακας Β2.6 Παρουσίαση της συσχέτισης και στατιστικής σημαντικότητας της έκφρασης των BMPs στο σύνολο των δειγμάτων για τα φυσιολογικά δείγματα, τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και την ομαδοποιημένη κατηγορία καταγμάτων 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

Bonferroni test; variable LNvalue Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,8671, df = 1081,0 Include condition: condition=1 OR condition=2														
Cell No.		Index	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
1	Χωρίς κάταγμα	BMP2	1,8265	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,001	0,000	1,000	0,000	0,000	0,00
2	Χωρίς κάταγμα	BMP4	0,000	0,465	0,465	0,000	0,000	0,000	0,428	0,000	0,000	0,000	1,000	0,00
3	Χωρίς κάταγμα	BMP6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,387	0,000	1,000	0,000	0,019	0,000	0,097	0,00
4	Χωρίς κάταγμα	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,01
5	1η	BMP2	1,000	0,000	0,387	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,00
6	1η	BMP4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,00
7	1η	BMP6	0,001	0,428	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,225	0,000	0,103	0,00
8	1η	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,03
9	2η-10η	BMP2	1,000	0,000	0,019	0,000	1,000	0,000	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
10	2η-10η	BMP4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
11	2η-10η	BMP6	0,000	1,000	0,097	0,000	0,000	0,000	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
12	2η-10η	BMP7	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,00

Γράφημα Β2.5 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs στο σύνολο των δειγμάτων για τα φυσιολογικά δείγματα, τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και την ομαδοποιημένη κατηγορία καταγμάτων 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



Εξετάζεται επίσης η αλληλεπίδραση ηλικίας (παιδιά με ενήλικες) και κατάγματος 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup>-10<sup>ης</sup> ημέρας και φυσιολογικών δειγμάτων, σε κάθε BMP. Δεν παρατηρούνται αποκλίσεις στην ιεραρχία της έκφρασης των BMPs.

Στα παιδιά, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για τις BMP-4 και BMP-7 ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας. Τα φυσιολογικά δείγματα είχαν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τις 2 κατηγορίες καταγμάτων με εξαίρεση την παρόμοια έκφραση για την BMP-6 τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας.

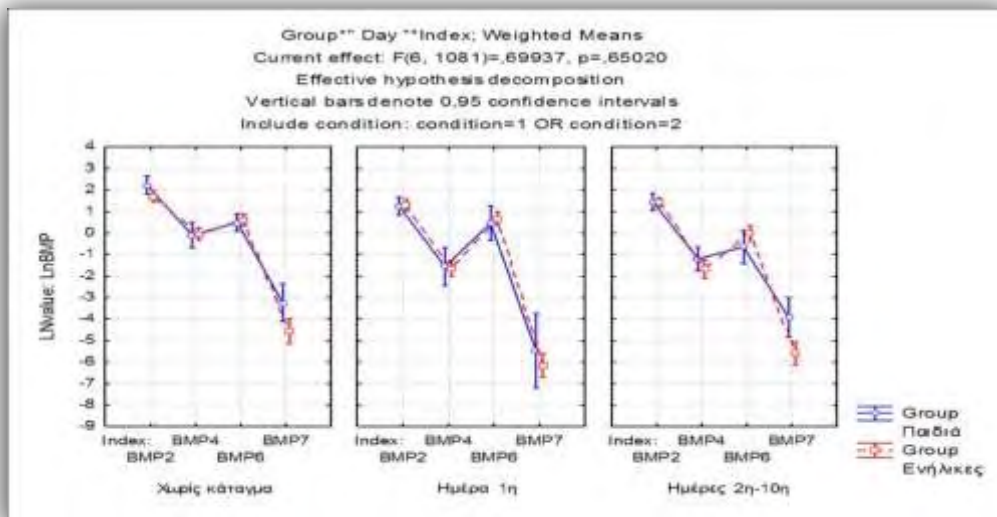
Στους ενήλικες, ανάμεσα σε φυσιολογικά δείγματα και τις 2 κατηγορίες καταγμάτων παρατηρούνται διαφορές για τα γονίδια BMP-4 και BMP-7, ενώ η υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα για όλες τις BMPs με εξαίρεση την παρόμοια έκφραση για την BMP-6 τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας.

Στα φυσιολογικά δείγματα, τα παιδιά έχουν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τους ενήλικες αλλά όχι σημαντική διαφορά, για τα γονίδια BMP-2 και BMP-7, ενώ είναι παρόμοια η έκφραση για τις BMP-4 και BMP-6.

Στα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας η έκφραση όλων των BMPs μεταξύ παιδιών και ενηλίκων είναι παρόμοια.

Στα κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας, η έκφραση των BMP-2 και BMP-4 είναι παρόμοια μεταξύ παιδιών και ενηλίκων. Μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται για την BMP-7 στα παιδιά, ενώ μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται για την BMP-6 στους ενήλικες χωρίς να είναι σημαντικές οι παραπάνω διαφορές (Γράφημα B2.6).

**Γράφημα B2.6 Απεικονιστικό διάγραμμα της γονιδιακής έκφρασης των 4 BMPs των παιδιών και των ενηλίκων στα φυσιολογικά δείγματα, τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και τα κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.**



## B2.5 Μελέτη, σύγκριση και στατιστική ανάλυση των BMPs ανά γονίδιο στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζεται η ανάλυση και σύγκριση της έκφρασης κάθε BMP για 5 συνθήκες-παραμέτρους όπως είναι η ηλικία, το φύλο, το μέγεθος οστού από το οποίο προήλθε το περισστικό δείγμα, τη μηχανική φόρτιση και το κάπνισμα, στον ενήλικο πληθυσμό.

### B2.5.1 BMP-2

Στον Πίνακα B2.7 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

*Πίνακας B2.7 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό*

Descriptive Statistics							
Level of Factor	Level of Factor	N	BMP2 Mean	BMP2 Std.Dev.	BMP2 Std.Err	BMP2 -95,00%	BMP2 +95,00%
		215	8,02651	12,16235	0,803711	6,4429	9,61016
Χωρίς κάταγμα		82	11,55049	17,59950	1,943540	7,6835	15,41752
1η		61	6,41867	8,10015	0,935324	4,5550	8,28234
2η-10η		72	5,68792	5,53601	0,652425	4,3870	6,98881
18-49	Χωρίς κάταγμα	32	8,94969	12,64154	2,234730	4,3919	13,50745
18-49	1η	31	6,13684	6,69513	1,086093	3,9362	8,33748
18-49	2η-10η	23	5,79478	3,59305	0,749203	4,2410	7,34854
50+	Χωρίς κάταγμα	50	13,21500	20,09167	2,841391	7,5050	18,92499
50+	1η	30	6,70811	9,41435	1,547710	3,5692	9,84701
50+	2η-10η	49	5,63776	6,27754	0,896791	3,8346	7,44087
Άρρεν	Χωρίς κάταγμα	35	14,55943	24,13704	4,079904	6,2681	22,85079
Άρρεν	1η	42	5,25102	7,02437	1,003482	3,2334	7,26866
Άρρεν	2η-10η	32	5,26125	3,78742	0,669527	3,8957	6,62676
Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	47	9,30979	10,13818	1,478805	6,3331	12,28647
Θήλυ	1η	19	8,61923	9,57956	1,878706	4,7500	12,48850
Θήλυ	2η-10η	40	6,02925	6,64252	1,050274	3,9049	8,15363
Μικρό	Χωρίς κάταγμα	27	9,79481	12,17581	2,343235	4,9782	14,61140
Μικρό	1η	7	2,68182	1,79269	0,540516	1,4775	3,88616
Μικρό	2η-10η	3	4,37000	5,95113	3,435884	-10,4134	19,15342
Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	55	12,41236	19,77210	2,666070	7,0672	17,75751
Μεγάλο	1η	54	7,06094	8,58494	1,073117	4,9165	9,20539
Μεγάλο	2η-10η	69	5,74522	5,55679	0,668958	4,4103	7,08010
Κάτω	Χωρίς κάταγμα	47	13,35596	20,77833	3,030831	7,2552	19,45670
Κάτω	1η	38	5,24489	5,89094	0,878169	3,4751	7,01472
Κάτω	2η-10η	54	5,00204	2,88908	0,393155	4,2135	5,79061
Άνω	Χωρίς κάταγμα	35	9,12600	11,96834	2,023019	5,0147	13,23727
Άνω	1η	23	8,17933	10,46073	1,909859	4,2732	12,08543
Άνω	2η-10η	18	7,74556	9,79787	2,309380	2,8732	12,61792
Κάπνισμα	Όχι	51	12,67647	19,75572	2,766354	7,1201	18,23286
Όχι	1η	42	6,95308	7,72125	1,103036	3,9173	8,35290
Όχι	2η-10η	54	5,95278	6,12964	0,834139	4,2797	7,62585
Κάπνισμα	Ναι	31	9,69806	13,42097	2,410478	4,7752	14,62092
Ναι	1η	19	6,13510	8,90460	1,746335	3,3564	10,54972
Ναι	2η-10η	18	4,89333	3,15733	0,744191	3,3232	6,46344



Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- η έκφραση των *φυσιολογικών δειγμάτων* είναι σαφώς υψηλότερη σε σχέση με τα *κατάγματα* 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας τα οποία μεταξύ τους έχουν παρόμοια έκφραση, έκφραση που σε γενικές γραμμές παραμένει σε όλες τις περαιτέρω συγκρίσεις. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.8. Επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων*, αν και το p value στην σύγκριση μεταξύ καταγμάτων 1<sup>ης</sup> ημέρας με τα φυσιολογικά είναι οριακό ( $p=0,067315$ ).

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,1016, df = 204,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	1,7048	0,067315	0,321407
2	1η	0,067315		1,000000
3	2η-10η	0,321407	1,000000	

*Πίνακας B2.8 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

- σε σχέση με την ηλικία, η έκφραση είναι υψηλότερη στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας με εξαίρεση την παρόμοια έκφραση μεταξύ των δειγμάτων της 2<sup>ης</sup> έως 10<sup>ης</sup> ημέρας. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.9. Επιπλέον, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων *ανεξαρτήτως ηλικίας*, με την σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων να κυμαίνεται σε οριακά επίπεδα ( $p=0,066060$ ).

*Πίνακας B2.9 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 ανάλογα με την ηλικία των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,1016, df = 204,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Age category	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,2876	1,2534	1,4460	1,9718	1,3384	1,4232
1	18-49	Χωρίς κάταγμα		1,000000	1,000000	0,066060	1,000000	1,000000
2	18-49	1η	1,000000		1,000000	0,050957	1,000000	1,000000
3	18-49	2η-10η	1,000000	1,000000		0,721127	1,000000	1,000000
4	50+	Χωρίς κάταγμα	0,066060	0,050957	0,721127		0,133925	0,149934
5	50+	1η	1,000000	1,000000	1,000000	0,133925		1,000000
6	50+	2η-10η	1,000000	1,000000	1,000000	0,149934	1,000000	

- σε σχέση με το φύλο, είναι χαρακτηριστική η υψηλότερη έκφραση των γυναικών σε σχέση με τους άνδρες σε όλες τις κατηγορίες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.10. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως φύλου**.

*Πίνακας B2.10 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 ανάλογα με το φύλο των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0961, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	sex	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,6112	1,1250	1,2665	1,7746	1,6234	1,5617
1	Άρρεν	Χωρίς κάταγμα		0,892693	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2	Άρρεν	1η	0,892693		1,000000	0,065277	1,000000	0,954039
3	Άρρεν	2η-10η	1,000000	1,000000		0,531756	1,000000	1,000000
4	Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,065277	0,531756		1,000000	1,000000
5	Θήλυ	1η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	Θήλυ	2η-10η	1,000000	0,954039	1,000000	1,000000	1,000000	

- σε σχέση με το μέγεθος του οστού, παραμένει σε όλες τις συγκρίσεις η υψηλότερη έκφραση στα μεγαλύτερα οστά σε σχέση με τα μικρά. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.11. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως μεγέθους οστού**.

*Πίνακας B2.11 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 ανάλογα με το μέγεθος του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0961, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Bonesize	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,6808	,78942	,75466	1,7166	1,3960	1,4599
1	Μικρό	Χωρίς κάταγμα		0,337103	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2	Μικρό	1η	0,337103		1,000000	0,160565	1,000000	0,897605
3	Μικρό	2η-10η	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,160565	1,000000		1,000000	1,000000
5	Μεγάλο	1η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	Μεγάλο	2η-10η	1,000000	0,897605	1,000000	1,000000	1,000000	

- σε σχέση με την εντόπιση, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στα δείγματα που προέρχονται από τα κάτω άκρα εκτός από αυτή της 1<sup>ης</sup> ημέρας κατάγματος. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.12. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** εντόπισης στο άνω ή κάτω άκρο και άρα φόρτισης. Εξαιρέση αποτελεί η διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων 1<sup>ης</sup> μέρας για τα κάτω άκρα.

*Πίνακας B2.12 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 ανάλογα με την εντόπιση (άνω ή κάτω άκρο) του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0961, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Extr	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,9047	1,1279	1,4690	1,4363	1,5752	1,4177
1	Κάτω	Χωρίς κάταγμα		0,012133	0,310115	0,696250	1,000000	1,000000
2	Κάτω	1η	0,012133		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Κάτω	2η-10η	0,310115	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	Άνω	Χωρίς κάταγμα	0,696250	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
5	Άνω	1η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	Άνω	2η-10η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

- σε σχέση με το κάπνισμα, υπάρχει υψηλότερη έκφραση στους μη καπνιστές σε όλα τα δείγματα. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.13. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** καπνίσματος. Εξαιρέση αποτελεί η διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων 1<sup>ης</sup> μέρας για τους μη καπνιστές.

*Πίνακας B2.13 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-2 ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι καπνιστής ή όχι και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0961, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Smoker	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,9226	1,3791	1,4941	1,3466	1,2501	1,2397
1	Όχι	Χωρίς κάταγμα		0,042857	0,560159	0,249043	0,647220	0,274238
2	Όχι	1η	0,042857		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Όχι	2η-10η	0,560159	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	Ναι	Χωρίς κάταγμα	0,249043	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
5	Ναι	1η	0,647220	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	Ναι	2η-10η	0,274238	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	



**B2.5.2 BMP-4**

Στον Πίνακα B2.14 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

*Πίνακας B2.14 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό*

Descriptive Statistics							
Level of Factor	Level of Factor	N	BMP4 Mean	BMP4 Std.Dev.	BMP4 Std.Err	BMP4 -95,00%	BMP4 +95,00%
		215	1,070310	1,653450	0,109263	0,855016	1,285604
Χωρίς κάταγμα		82	1,816220	2,041409	0,225436	1,367673	2,264766
	1η	61	0,685093	1,394170	0,160985	0,364324	1,005863
	2η-10η	72	0,622069	0,998023	0,117618	0,387545	0,856593
18-49	Χωρίς κάταγμα	32	1,282188	1,400799	0,247629	0,777146	1,787229
	1η	31	0,874184	1,825105	0,296071	0,274287	1,474081
	2η-10η	23	0,525565	0,809350	0,168761	0,175576	0,875554
50+	Χωρίς κάταγμα	50	2,158000	2,311282	0,326865	1,501141	2,814859
	1η	30	0,490892	0,703824	0,115708	0,256225	0,725558
	2η-10η	49	0,667367	1,080064	0,154295	0,357137	0,977598
Άρρεν	Χωρίς κάταγμα	35	1,382000	2,076228	0,350947	0,668791	2,095209
	1η	42	0,548429	0,767980	0,109711	0,327839	0,769018
	2η-10η	32	0,837594	1,357265	0,239933	0,348248	1,326940
Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	47	2,139574	1,975268	0,288122	1,559614	2,719535
	1η	19	0,942654	2,124943	0,416736	0,084371	1,800937
	2η-10η	40	0,449650	0,529558	0,083730	0,280289	0,619011
Μικρό	Χωρίς κάταγμα	27	2,102963	2,012864	0,387376	1,306700	2,899225
	1η	7	0,278182	0,370550	0,111725	0,029243	0,527121
	2η-10η	3	0,163333	0,214554	0,123873	-0,369648	0,696315
Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	55	1,675455	2,058871	0,277618	1,118864	2,232045
	1η	54	0,755031	1,492453	0,186557	0,382228	1,127835
	2η-10η	69	0,642014	1,014373	0,122116	0,398336	0,885693
Κάτω	Χωρίς κάταγμα	47	2,119149	2,223341	0,324308	1,466351	2,771946
	1η	38	0,756800	1,645562	0,245306	0,262419	1,251181
	2η-10η	54	0,690000	1,030462	0,140228	0,408738	0,971262
Άνω	Χωρίς κάταγμα	35	1,409429	1,715510	0,289974	0,820130	1,998727
	1η	23	0,577533	0,911795	0,166470	0,237063	0,918003
	2η-10η	18	0,418278	0,889305	0,209611	-0,023963	0,860519
Κάπνισμα Όχι	Χωρίς κάταγμα	51	2,085294	2,247845	0,314761	1,453078	2,717511
	1η	42	0,986923	0,659651	0,094236	0,335465	0,714413
	2η-10η	54	0,685500	1,085430	0,147708	0,389235	0,981765
Κάπνισμα Ναι	Χωρίς κάταγμα	31	1,373548	1,582697	0,284261	0,793010	1,954086
	1η	19	0,524939	2,184696	0,428454	0,104505	1,869341
	2η-10η	18	0,431778	0,660132	0,155595	0,103502	0,760054

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- η έκφραση των φυσιολογικών δειγμάτων είναι σαφώς υψηλότερη σε σχέση με τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας τα οποία μεταξύ τους έχουν παρόμοια έκφραση. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική διαφορά** μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξάρτητα** από την ημέρα κατάγματος. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.15.

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3405, df = 204,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day	{1}	{2}	{3}
		-,0383	-1,639	-1,671
1	Χωρίς κάταγμα		0,000000	0,000000
2	1η	0,000000		1,000000
3	2η-10η	0,000000	1,000000	

Πίνακας Β2.15 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων

- σε σχέση με την ηλικία, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στους ηλικιωμένους σε σχέση με τους νεότερους σε ηλικία ασθενείς στα φυσιολογικά και στην ομάδα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.16. Η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική** μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** ημέρας μόνο για τους ενήλικες άνω των 50.

Πίνακας Β2.16 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 ανάλογα με την ηλικία των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3405, df = 204,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Age category	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-,5857	-1,488	-1,819	,31200	-1,784	-1,602
1	18-49	Χωρίς κάταγμα		0,318910	0,053302	0,153467	0,032157	0,058016
2	18-49	1η	0,318910		1,000000	0,000012	1,000000	1,000000
3	18-49	2η-10η	0,053302	1,000000		0,000001	1,000000	1,000000
4	50+	Χωρίς κάταγμα	0,153467	0,000012	0,000001		0,000000	0,000000
5	50+	1η	0,032157	1,000000	1,000000	0,000000		1,000000
6	50+	2η-10η	0,058016	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	



- σε σχέση με το φύλο, είναι χαρακτηριστική η υψηλότερη έκφραση των γυναικών σε σχέση με τους άνδρες σε όλες τις κατηγορίες ενώ οι γυναίκες χωρίς κάταγμα έχουν μεγαλύτερες τιμές από όλες τις άλλες κατηγορίες. Η σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.17. Η διαφορά των φυσιολογικών σε σχέση με τις 2 κατηγορίες καταγμάτων είναι **στατιστικά σημαντική** τόσο για τους άνδρες όσο και για τις γυναίκες **ανεξαρτήτου** ημέρας κατάγματος.

*Πίνακας B2.17 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 ανάλογα με το φύλο των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3766, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	sex	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-,5728	-1,697	-1,868	,35969	-1,527	-1,514
1	Άρρεν	Χωρίς κάταγμα		0,028098	0,010805	0,109825	0,389459	0,134885
2	Άρρεν	1η	0,028098		1,000000	0,000000	1,000000	1,000000
3	Άρρεν	2η-10η	0,010805	1,000000		0,000000	1,000000	1,000000
4	Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	0,109825	0,000000	0,000000		0,000085	0,000001
5	Θήλυ	1η	0,389459	1,000000	1,000000	0,000085		1,000000
6	Θήλυ	2η-10η	0,134885	1,000000	1,000000	0,000001	1,000000	

- σε σχέση με το μέγεθος του οστού, παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση στα μικρά οστά σε σχέση με τα μεγάλα, στα φυσιολογικά δείγματα. Η έκφραση των μεγάλων οστών είναι υψηλότερη στα κατάγματα. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.18. Η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική** μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** μεγέθους.

*Πίνακας B2.18 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 ανάλογα με το μέγεθος του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3766, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Bonesize	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,26003	-2,042	-2,539	-,1848	-1,560	-1,634
1	Μικρό	Χωρίς κάταγμα		0,001167	0,048023	1,000000	0,000022	0,000003
2	Μικρό	1η	0,001167		1,000000	0,008451	1,000000	1,000000
3	Μικρό	2η-10η	0,048023	1,000000		0,160754	1,000000	1,000000
4	Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,008451	0,160754		0,000118	0,000007
5	Μεγάλο	1η	0,000022	1,000000	1,000000	0,000118		1,000000
6	Μεγάλο	2η-10η	0,000003	1,000000	1,000000	0,000007	1,000000	

- σε σχέση με την εντόπιση, η έκφραση των BMPs των κάτω άκρων είναι υψηλότερη από αυτή των άνω άκρων σε όλες τις κατηγορίες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.19. Η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική** μεταξύ φυσιολογικών και καταγματικών **ανεξαρτήτως** με την εντόπιση στο άνω ή κάτω άκρο.

*Πίνακας B2.19 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 ανάλογα με την εντόπιση (άνω ή κάτω άκρο) του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3766, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Extr	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,17164	-1,590	-1,453	-.3203	-1,719	-2,325
1	Κάτω	Χωρίς κάταγμα		0,000006	0,000005	1,000000	0,000042	0,000000
2	Κάτω	1η	0,000006		1,000000	0,008116	1,000000	1,000000
3	Κάτω	2η-10η	0,000005	1,000000		0,012732	1,000000	0,585860
4	Άνω	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,008116	0,012732		0,013033	0,000185
5	Άνω	1η	0,000042	1,000000	1,000000	0,013033		1,000000
6	Άνω	2η-10η	0,000000	1,000000	0,585860	0,000185	1,000000	

- σε σχέση με το κάπνισμα, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση σε όλα τα επίπεδα για τους μη καπνιστές. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.20. Η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική** μεταξύ φυσιολογικών και των 2 κατηγοριών των καταγμάτων **ανεξαρτήτως** καπνίσματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα είναι οριακό για τη διαφορά καπνιστών χωρίς κάταγμα και καπνιστών με κάταγμα 1<sup>ης</sup> μέρας ( $p=0,093764$ ).

*Πίνακας B2.20 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-4 ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι καπνιστής ή όχι και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3766, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Smoker	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,25383	-1,601	-1,580	-.5190	-1,707	-1,945
1	Όχι	Χωρίς κάταγμα		0,000001	0,000000	0,432812	0,000020	0,000007
2	Όχι	1η	0,000001		1,000000	0,059261	1,000000	1,000000
3	Όχι	2η-10η	0,000000	1,000000		0,038371	1,000000	1,000000
4	Ναι	Χωρίς κάταγμα	0,432812	0,059261	0,038371		0,093764	0,030962
5	Ναι	1η	0,000020	1,000000	1,000000	0,093764		1,000000
6	Ναι	2η-10η	0,000007	1,000000	1,000000	0,030962	1,000000	



**B2.5.3 BMP-6**

Στον Πίνακα Β2.21 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

*Πίνακας Β2.21 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό*

Descriptive Statistics							
Level of Factor	Level of Factor	N	BMP6 Mean	BMP6 Std.Dev.	BMP6 Std.Err	BMP6 -95,00%	BMP6 +95,00%
		215	3,041153	3,768340	0,249019	2,55048	3,53183
Χωρίς κάταγμα		82	3,349390	4,112953	0,454200	2,44568	4,25311
1η		61	3,632267	4,123939	0,476191	2,68343	4,58110
2η-10η		72	2,074361	2,673969	0,315130	1,44601	2,70271
18-49	Χωρίς κάταγμα	32	2,294688	2,982943	0,527315	1,21922	3,37015
18-49	1η	31	3,480263	4,309611	0,699111	2,06373	4,89680
18-49	2η-10η	23	2,529087	3,650123	0,761103	0,95066	4,10752
50+	Χωρίς κάταγμα	50	4,024400	4,598163	0,650279	2,71762	5,33118
50+	1η	30	3,788378	3,977497	0,653896	2,46221	5,11454
50+	2η-10η	49	1,860918	2,079437	0,297062	1,26363	2,45820
Άρρεν	Χωρίς κάταγμα	35	2,886286	4,146865	0,700948	1,46179	4,31078
Άρρεν	1η	42	3,803265	4,136675	0,590954	2,61507	4,99146
Άρρεν	2η-10η	32	2,168656	3,204763	0,566527	1,01322	3,32410
Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	47	3,694255	4,097853	0,597733	2,49108	4,89743
Θήλυ	1η	19	3,310000	4,161709	0,816178	1,62905	4,99095
Θήλυ	2η-10η	40	1,998925	2,199999	0,347850	1,29533	2,70252
Μικρό	Χωρίς κάταγμα	27	3,460370	4,470437	0,860336	1,69192	5,22882
Μικρό	1η	7	2,310909	2,618119	0,789393	0,55203	4,06979
Μικρό	2η-10η	3	2,110000	3,412272	1,970076	-6,36655	10,58655
Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	55	3,294909	3,967756	0,535012	2,22227	4,36754
Μεγάλο	1η	54	3,859375	4,304771	0,538096	2,78408	4,93467
Μεγάλο	2η-10η	69	2,072812	2,668902	0,321298	1,43167	2,71395
Κάτω	Χωρίς κάταγμα	47	3,542766	3,856898	0,562586	2,41034	4,67519
Κάτω	1η	38	4,439333	4,629067	0,690061	3,04861	5,83006
Κάτω	2η-10η	54	2,160333	2,091972	0,284681	1,58933	2,73133
Άνω	Χωρίς κάταγμα	35	3,089714	4,478147	0,756945	1,55142	4,62801
Άνω	1η	23	2,421667	2,891053	0,527832	1,34213	3,50120
Άνω	2η-10η	18	1,816444	4,015520	0,946467	-0,18043	3,81332
Κάπνισμα Όχι	Χωρίς κάταγμα	51	4,004902	4,537559	0,635385	2,72869	5,28111
Όχι	1η	42	4,312692	3,302670	0,471810	2,32259	4,21986
Όχι	2η-10η	54	2,658444	2,007675	0,273210	1,33168	2,42766
Κάπνισμα Ναι	Χωρίς κάταγμα	31	2,270968	3,070222	0,551428	1,14480	3,39713
Ναι	1η	19	3,271224	5,353569	1,049921	2,15034	6,47505
Ναι	2η-10η	18	1,879667	4,100501	0,966497	0,61931	4,69758



Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- η έκφραση των φυσιολογικών δειγμάτων είναι παρόμοια με αυτή των καταγμάτων 1<sup>ης</sup> ημέρας ενώ και οι δύο προαναφερθείσες κατηγορίες έχουν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας και αυτή η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική**. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.8.

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7193, df = 204,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day	{1}	{2}	{3}
		,59617	,68693	-,0147
1	Χωρίς κάταγμα		1,000000	0,013029
2	1η	1,000000		0,007187
3	2η-10η	0,013029	0,007187	

*Πίνακας B2.22 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

- σε σχέση με την ηλικία, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στους ηλικιωμένους σε σχέση με τους νεότερους σε ηλικία ασθενείς στα φυσιολογικά και στα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.16. Η διαφορά των καταγμάτων 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας με αυτή των φυσιολογικών και των καταγμάτων 1<sup>ης</sup> ημέρας είναι **στατιστικά σημαντική**.

*Πίνακας B2.23 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 ανάλογα με την ηλικία των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7193, df = 204,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Age category	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,14310	,52126	,11511	,88614	,84725	-,0756
1	18-49	Χωρίς κάταγμα		1,000000	1,000000	0,196413	0,514375	1,000000
2	18-49	1η	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,764347
3	18-49	2η-10η	1,000000	1,000000		0,308635	0,656524	1,000000
4	50+	Χωρίς κάταγμα	0,196413	1,000000	0,308635		1,000000	0,005023
5	50+	1η	0,514375	1,000000	0,656524	1,000000		0,036868
6	50+	2η-10η	1,000000	0,764347	1,000000	0,005023	0,036868	

- σε σχέση με το φύλο, παρατηρείται η υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.24. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως φύλου**. Εξαιρέση αποτελεί η διαφορά μεταξύ καταγμάτων 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> - 10<sup>ης</sup> μέρας για τους άνδρες.

*Πίνακας B2.24 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 ανάλογα με το φύλο των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7038, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	sex	Day	{1} ,22273	{2} ,68995	{3} ,2789	{4} ,87427	{5} ,68117	{6} ,19671
1	Άρρεν	Χωρίς κάταγμα		1,000000	1,000000	0,397005	1,000000	1,000000
2	Άρρεν	1η	1,000000		0,030156	1,000000	1,000000	1,000000
3	Άρρεν	2η-10η	1,000000	0,030156		0,002336	0,142346	1,000000
4	Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	0,397005	1,000000	0,002336		1,000000	0,250722
5	Θήλυ	1η	1,000000	1,000000	0,142346	1,000000		1,000000
6	Θήλυ	2η-10η	1,000000	1,000000	1,000000	0,250722	1,000000	

- σε σχέση με το μέγεθος του οστού, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στα μεγάλα οστά στα κατάγματα και παρόμοια έκφραση μικρών και μεγάλων στα φυσιολογικά. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.25. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως μεγέθους οστού**. Εξαιρέση αποτελεί η διαφορά μεταξύ μεγάλων οστών καταγμάτων 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> - 10<sup>ης</sup> μέρας.

*Πίνακας B2.25 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 ανάλογα με το μέγεθος του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7038, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Bonesize	Day	{1} ,62847	{2} ,16705	{3} ,7264	{4} ,58031	{5} ,78886	{6} ,01629
1	Μικρό	Χωρίς κάταγμα		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,601469
2	Μικρό	1η	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Μικρό	2η-10η	1,000000	1,000000		1,000000	0,781206	1,000000
4	Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,266178
5	Μεγάλο	1η	1,000000	1,000000	0,781206	1,000000		0,023536
6	Μεγάλο	2η-10η	0,601469	1,000000	1,000000	0,266178	0,023536	

- σε σχέση με την εντόπιση, υπάρχει υψηλότερη έκφραση των κάτω άκρων σε σχέση με τα άνω άκρα σε όλες τις κατηγορίες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.26. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** εντόπισης στο άνω ή κάτω άκρο.

*Πίνακας Β2.26 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 ανάλογα με την εντόπιση (άνω ή κάτω άκρο) του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7038, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Extr	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,81640	,88030	,22467	,30043	,36743	-,7326
1	Κάτω	Χωρίς κάταγμα		1,000000	0,361651	1,000000	1,000000	0,000430
2	Κάτω	1η	1,000000		0,279353	0,890352	1,000000	0,000369
3	Κάτω	2η-10η	0,361651	0,279353		1,000000	1,000000	0,114565
4	Άνω	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,890352	1,000000		1,000000	0,103789
5	Άνω	1η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,120209
6	Άνω	2η-10η	0,000430	0,000369	0,114565	0,103789	0,120209	

- σε σχέση με το κάπνισμα, είναι χαρακτηριστική η υψηλότερη έκφραση όλων των μη καπνιστών σε σχέση με τους καπνιστές. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.27. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** καπνίσματος με εξαίρεση να αποτελεί η διαφορά των μη καπνιστών χωρίς κάταγμα με τους μη καπνιστές με κάταγμα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> μέρας.

*Πίνακας Β2.27 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-6 ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι καπνιστής ή όχι και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,7038, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Smoker	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,89177	,75294	,07184	,10985	,56990	,0435
1	Όχι	Χωρίς κάταγμα		1,000000	0,004683	0,137802	1,000000	0,344712
2	Όχι	1η	1,000000		0,061504	0,628541	1,000000	1,000000
3	Όχι	2η-10η	0,004683	0,061504		1,000000	0,969518	1,000000
4	Ναι	Χωρίς κάταγμα	0,137802	0,628541	1,000000		1,000000	1,000000
5	Ναι	1η	1,000000	1,000000	0,969518	1,000000		1,000000
6	Ναι	2η-10η	0,344712	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	



**B2.5.4 BMP-7**

Στον Πίνακα B2.28 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό σε φυσιολογικά δείγματα, κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας.

*Πίνακας B2.28 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό*

Descriptive Statistics							
Level of Factor	Level of Factor	N	BMP7 Mean	BMP7 Std.Dev.	BMP7 Std.Err	BMP7 -95,00%	BMP7 +95,00%
		215	0,047625	0,212068	0,014014	0,020012	0,075238
Χωρίς κάταγμα		82	0,092554	0,340528	0,037605	0,017732	0,167376
1η		61	0,012399	0,025342	0,002926	0,006568	0,018229
2η-10η		72	0,033151	0,087200	0,010277	0,012660	0,053642
18-49	Χωρίς κάταγμα	32	0,034902	0,062157	0,010988	0,012492	0,057312
18-49	1η	31	0,010343	0,018201	0,002953	0,004360	0,016325
18-49	2η-10η	23	0,014182	0,031243	0,006515	0,000671	0,027692
50+	Χωρίς κάταγμα	50	0,129451	0,430910	0,060940	0,006987	0,251914
50+	1η	30	0,014510	0,031154	0,005122	0,004123	0,024897
50+	2η-10η	49	0,042056	0,102696	0,014671	0,012558	0,071553
Άρρεν	Χωρίς κάταγμα	35	0,049945	0,117034	0,019782	0,009743	0,090148
Άρρεν	1η	42	0,012813	0,026734	0,003819	0,005134	0,020492
Άρρεν	2η-10η	32	0,017020	0,033796	0,005974	0,004835	0,029204
Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	47	0,124283	0,437784	0,063857	-0,004255	0,252822
Θήλυ	1η	19	0,011618	0,022973	0,004505	0,002339	0,020897
Θήλυ	2η-10η	40	0,046057	0,112029	0,017713	0,010228	0,081885
Μικρό	Χωρίς κάταγμα	27	0,149334	0,572826	0,110240	-0,077269	0,375936
Μικρό	1η	7	0,005027	0,003858	0,001163	0,002435	0,007619
Μικρό	2η-10η	3	0,002847	0,003598	0,002077	-0,006092	0,011785
Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	55	0,064680	0,116392	0,015694	0,033215	0,096145
Μεγάλο	1η	54	0,013665	0,027219	0,003402	0,006866	0,020465
Μεγάλο	2η-10η	69	0,034469	0,088863	0,010698	0,013122	0,055816
Κάτω	Χωρίς κάταγμα	47	0,060814	0,111929	0,016327	0,027950	0,093677
Κάτω	1η	38	0,016568	0,031525	0,004699	0,007097	0,026040
Κάτω	2η-10η	54	0,029450	0,066812	0,009092	0,011214	0,047686
Άνω	Χωρίς κάταγμα	35	0,135176	0,506007	0,085531	-0,038644	0,308995
Άνω	1η	23	0,006144	0,007963	0,001454	0,003170	0,009117
Άνω	2η-10η	18	0,044256	0,132914	0,031328	-0,021841	0,110353
Κάπνισμα Όχι	Χωρίς κάταγμα	51	0,117004	0,421491	0,059021	-0,001542	0,235551
Όχι	1η	42	0,014562	0,029939	0,004277	0,005963	0,023162
Όχι	2η-10η	54	0,040995	0,098887	0,013457	0,014004	0,067986
Κάπνισμα Ναι	Χωρίς κάταγμα	31	0,052329	0,119626	0,021486	0,008449	0,096208
Ναι	1η	19	0,008321	0,012390	0,002430	0,003317	0,013325
Ναι	2η-10η	18	0,009621	0,022112	0,005212	-0,001375	0,020617

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- η έκφραση των φυσιολογικών δειγμάτων είναι σαφώς υψηλότερη σε σχέση με τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> - 10<sup>ης</sup> ημέρας τα οποία μεταξύ τους έχουν παρόμοια έκφραση. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων ανεξάρτητα από την ημέρα κατάγματος. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.29.

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,6184, df = 204,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day	{1}	{2}	{3}
		-4,577	-6,167	-5,604
1	Χωρίς κάταγμα		0,000302	0,023818
2	1η	0,000302		0,520328
3	2η-10η	0,023818	0,520328	

*Πίνακας Β2.29 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα **φυσιολογικά δείγματα** και τις **ομάδες καταγμάτων***

- σε σχέση με την ηλικία, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στους ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα Β2.30. Η διαφορά είναι **στατιστικά σημαντική** μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων 1<sup>ης</sup> ημέρας μόνο για τους ενήλικες άνω των 50.

*Πίνακας Β2.30 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 ανάλογα με την ηλικία των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,6184, df = 204,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Age category	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-4,982	-6,334	-6,328	-4,318	-6,005	-5,263
1	18-49	Χωρίς κάταγμα		0,387416	0,584440	1,000000	1,000000	1,000000
2	18-49	1η	0,387416		1,000000	0,004428	1,000000	0,790145
3	18-49	2η-10η	0,584440	1,000000		0,013678	1,000000	1,000000
4	50+	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,004428	0,013678		0,031750	0,729577
5	50+	1η	1,000000	1,000000	1,000000	0,031750		1,000000
6	50+	2η-10η	1,000000	0,790145	1,000000	0,729577	1,000000	

- σε σχέση με το φύλο, η έκφραση παραμένει υψηλότερη σε φυσιολογικά και κατάγματα 2<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> ημέρας για τις γυναίκες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.31. Δεν υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως φύλου**. Εξάιρεση αποτελεί η διαφορά των γυναικών χωρίς κάταγμα και αυτών με κάταγμα 1<sup>ης</sup> μέρας.

*Πίνακας B2.31 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 ανάλογα με το φύλο των ασθενών και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5530, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	sex	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-5,177	-5,957	-6,135	-4,131	-6,567	-5,179
1	Άρρεν	Χωρίς κάταγμα		1,000000	1,000000	0,720888	0,506791	1,000000
2	Άρρεν	1η	1,000000		1,000000	0,005944	1,000000	1,000000
3	Άρρεν	2η-10η	1,000000	1,000000		0,004010	1,000000	1,000000
4	Θήλυ	Χωρίς κάταγμα	0,720888	0,005944	0,004010		0,001688	0,598952
5	Θήλυ	1η	0,506791	1,000000	1,000000	0,001688		0,449212
6	Θήλυ	2η-10η	1,000000	1,000000	1,000000	0,598952	0,449212	

- σε σχέση με το μέγεθος του οστού, παρόμοια είναι η έκφραση των μικρών και μεγάλων οστών σε όλες τις κατηγορίες. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.32. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως μεγέθους**. Εξάιρεση αποτελεί η διαφορά μεταξύ 1<sup>ης</sup> ημέρας καταγμάτων σε σχέση με τα φυσιολογικά στα μεγάλα οστά.

*Πίνακας B2.32 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 ανάλογα με το μέγεθος του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5530, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Bonesize	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-4,143	-5,798	-6,439	-4,790	-6,239	-5,567
1	Μικρό	Χωρίς κάταγμα		0,889506	1,000000	1,000000	0,003626	0,125821
2	Μικρό	1η	0,889506		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Μικρό	2η-10η	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	Μεγάλο	Χωρίς κάταγμα	1,000000	1,000000	1,000000		0,026995	1,000000
5	Μεγάλο	1η	0,003626	1,000000	1,000000	0,026995		1,000000
6	Μεγάλο	2η-10η	0,125821	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	



- σε σχέση με την εντόπιση, υψηλότερη είναι έκφραση για τα δείγματα που προέρχονται από τα κάτω άκρα σε σχέση με τα άνω. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.33. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** θέσης. Εξάιρεση αποτελεί η διαφορά των τιμών χωρίς κάταγμα και αυτών με κάταγμα 1<sup>ης</sup> μέρας για τα κάτω άκρα.

*Πίνακας B2.33 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 ανάλογα με την εντόπιση (άνω ή κάτω άκρο) του οστού από όπου προήλθε το κάθε δείγμα και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5530, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Extr	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-4,474	-6,075	-5,379	-4,715	-6,320	-6,277
1	Κάτω	Χωρίς κάταγμα		0,031796	0,834551	1,000000	0,035671	0,094795
2	Κάτω	1η	0,031796		1,000000	0,219832	1,000000	1,000000
3	Κάτω	2η-10η	0,834551	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	Άνω	Χωρίς κάταγμα	1,000000	0,219832	1,000000		0,179488	0,350869
5	Άνω	1η	0,035671	1,000000	1,000000	0,179488		1,000000
6	Άνω	2η-10η	0,094795	1,000000	1,000000	0,350869	1,000000	

- σε σχέση με το κάπνισμα, είναι χαρακτηριστική η υψηλότερη έκφραση στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές. Η παραπάνω σχέση αποδίδεται στον πίνακα B2.34. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτως** καπνίσματος. Εξάιρεση αποτελεί η διαφορά των τιμών για μη καπνιστές χωρίς κάταγμα και με κάταγμα 1<sup>ης</sup> μέρας.

*Πίνακας B2.34 Παρουσιάζεται ο μετασχηματισμός λογαρίθμου των μέσων τιμών της έκφρασης της BMP-7 ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι καπνιστής ή όχι και η στατιστική σημαντικότητα της έκφρασης της ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τις ομάδες καταγμάτων*

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5530, df = 202,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Smoker	Day	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			-4,091	-5,954	-5,334	-5,378	-6,287	-6,413
1	Όχι	Χωρίς κάταγμα		0,000283	0,112146	0,260565	0,033157	0,006133
2	Όχι	1η	0,000283		0,834334	1,000000	1,000000	1,000000
3	Όχι	2η-10η	0,112146	0,834334		1,000000	1,000000	1,000000
4	Ναι	Χωρίς κάταγμα	0,260565	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
5	Ναι	1η	0,033157	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	Ναι	2η-10η	0,006133	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

## B2.6 Μελέτη, σύγκριση και στατιστική ανάλυση ανά γονίδιο BMP στο σύνολο των δειγμάτων, στον ενήλικο πληθυσμό και στα παιδιά

### B2.6.1 BMP-2

#### A. Σύνολο δειγμάτων

Στον πίνακα B2.35 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-2 στα παιδιά και τους ενήλικες τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα.

Πίνακας B2.35 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-2 στο σύνολο των δειγμάτων

				BMP-2			
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Ομάδα	Παιδιά			9,59	11,23	1,45	60
ασθενών	Ενήλικες			8,30	12,32	,77	240
Κατάσταση	Φυσιολογική			12,13	16,63	1,61	107
	Κάταγμα			6,74	8,58	,62	193
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ομάδα	Παιδιά	14,05	13,07	2,61	25
		ασθενών	Ενήλικες	11,55	17,60	1,94	82
	Κάταγμα	Ομάδα	Παιδιά	6,40	8,56	1,45	35
		ασθενών	Ενήλικες	6,82	8,61	,69	158

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *παιδιών και ενηλίκων*, η γονιδιακή έκφραση είναι υψηλότερη στα παιδιά ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 1 [Παράρτημα -BMP-2].
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων*, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές για τα φυσιολογικά δείγματα και υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 2 [Παράρτημα -BMP-2].
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων στα παιδιά και στους ενήλικες*, η έκφραση στα φυσιολογικά δείγματα είναι υψηλότερη σε σχέση με τα κατάγματα. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων στην ηλικιακή ομάδα των παιδιών και όχι στους ενήλικες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 3 [Παράρτημα -BMP-2].



### B. BMP-2 ενήλικες

Στον πίνακα Β2.36 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό. Ο πίνακας παρουσιάζει το σύνολο της έκφρασης βάσει των διαφόρων παραμέτρων (π.χ. μέγεθος οστού).

*Πίνακας Β2.36 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η κατάσταση του δείγματος*

		BMP-2			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	7,28	9,90	1,44	40
	Μεγάλο	8,53	12,81	,89	200
Άκρο	Κάτω	7,72	12,70	1,04	143
	Άνω	9,14	11,75	1,15	97
Κάπνισμα	Όχι	8,53	12,48	,96	163
	Ναι	8,19	12,06	1,32	77
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	11,55	17,60	1,94	82
	1η	6,42	8,10	,94	61
	2η	6,63	8,37	1,67	25
	3η	5,21	3,29	,72	21
	4η-10η	5,17	3,12	,61	26
	11η-30η	5,31	2,06	,59	12
	1ο-4ο μήνα μετά τον 5ο μήνα	13,88	9,65	3,41	8
	19,10	27,42	12,26	5	
BMI	Αδύνατος	5,03	4,10	2,05	4
	Φυσιολογικός	7,42	9,54	1,05	76
	Υπέρβαρος	9,04	15,58	1,51	102
	Παχύσαρκος	8,42	9,35	1,19	58
Φύλο	Άρρεν	8,02	14,97	1,31	124
	Θήλυ	8,56	8,70	,78	116
Ηλικία	18-49	7,48	10,56	1,03	98
	50+	9,09	10,66	1,34	142
Κατάσταση	Φυσιολογική	11,55	17,60	1,94	82
	Κάταγμα	6,82	8,61	,69	158

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενήλικων δειγμάτων χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.36).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα από τα μεγάλα οστά σε σχέση με τα μικρά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 4 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν

υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *μεγάλου και μικρού* μεγέθους στα οστά.

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα των *άνω άκρων* σε σχέση με τα *κάτω άκρα*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 5 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εντόπιση στα *άνω και κάτω άκρο* των οστών.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους *μη καπνιστές* σε σχέση με τους *καπνιστές*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 6 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *καπνιστών και μη καπνιστών*.
- παρατηρείται σταδιακή πτώση της έκφρασης μέχρι και την τριακοστή ημέρα μετά το *κάταγμα* σε σχέση με τα *φυσιολογικά δείγματα*. Φαίνεται όμως ότι μετά τον 1<sup>ο</sup> μήνα η έκφραση αυξάνεται σε επίπεδα υψηλότερα των φυσιολογικών αλλά το δείγμα πληθυσμού για αυτή την περίοδο είναι μικρό και η στατιστική ανάλυση αναπόφευκτα δεν παρουσιάζει σημαντικότητα στην οποιαδήποτε διαφορά έκφρασης. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 7 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές *μεταξύ των ημερών του κατάγματος*.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους *παχύσαρκους* σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες BMI. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 8 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές *ανάλογα με το BMI*.
- μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στις *γυναίκες* σε σχέση με τους *άνδρες*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 9 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά *μεταξύ ανδρών και γυναικών*.
- η έκφραση είναι υψηλότερη στους ασθενείς *μεγαλύτερης ηλικίας* σε σχέση με αυτούς *νεότερης ηλικίας*. Η σχέση αποδίδεται από τη Γράφημα 10 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *ηλικιακής κατανομής ενήλικων ασθενών ηλικίας από 18 – 49 ετών και ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας*.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα *φυσιολογικά δείγματα* σε σχέση με τα *κατάγματα*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 11 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων* αλλά η τιμή θεωρείται οριακή ( $p=0.088679$ ). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι σε

πραιτέρω ανάλυση σύμφωνα με το κριτήριο Newman Keuls είναι οριακά στατιστικά σημαντική ( $p=0.051322$ ).

Στον πίνακα B2.37 φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό βάσει της κατάστασης (φυσιολογικό - κάταγμα) και των διαφόρων παραμέτρων.

Πίνακας B2.37 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-2 στον ενήλικο πληθυσμό λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατάσταση των δειγμάτων

				BMP-2					
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N		
Κατάσταση	Φυσιολογική	Μέγεθος οστού	Μικρό	9,79	12,18	2,34	27		
			Μεγάλο	12,41	19,77	2,67	55		
	Κάταγμα	Μέγεθος οστού	Μικρό	4,01	3,66	,84	19		
			Μεγάλο	7,20	9,03	,77	139		
Κατάσταση	Φυσιολογική	Άκρο	Κάτω	13,36	20,78	3,03	47		
			Άνω	9,13	11,97	2,02	35		
	Κάταγμα	Άκρο	Κάτω	5,02	4,29	,44	96		
			Άνω	9,61	12,22	1,55	62		
Κατάσταση	Φυσιολογική	Κάπνισμα	Όχι	12,68	19,76	2,77	51		
			Ναι	9,70	13,42	2,41	31		
	Κάταγμα	Κάπνισμα	Όχι	7,84	11,55	,66	109		
			Ναι	6,36	6,92	1,65	49		
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	11,55	17,60	1,94	82		
			Κάταγμα	Ημέρα κατάγματος	1η	6,52	8,65	1,11	61
					2η	6,63	8,37	1,67	25
					3η	5,21	3,29	,72	21
					4η-10η	5,17	3,12	,61	26
					11η-30η	5,31	2,06	,59	12
					1ο-4ο μήνα μετά τον 5ο μήνα	13,88	9,65	3,41	8
						19,10	27,42	12,26	5
Κατάσταση	Φυσιολογική	BMI	Αδύνατος	.	.	.	0		
			Φυσιολογικός	9,70	13,79	2,70	26		
			Υπέρβαρος	14,76	25,16	4,75	28		
			Κάταγμα	BMI	Παχύσαρκος	10,06	10,20	1,93	28
					Αδύνατος	5,97	4,46	2,57	3
					Φυσιολογικός	6,37	6,67	,92	53
Κατάσταση	Φυσιολογική	Φύλο	Άρρεν	9,31	24,14	4,08	35		
			Θήλυ	14,56	10,14	1,48	47		
	Κάταγμα	Φύλο	Άρρεν	6,46	9,23	,99	87		
			Θήλυ	7,26	7,84	,93	71		
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ηλικία	18-49	8,13	19,33	3,78	32		
			50+	13,21	14,65	3,87	50		
			Κάταγμα	Ηλικία	18-49	6,74	7,90	,82	66
50+	6,87	8,46			,88	92			

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενηλίκων δειγμάτων λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.37).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, σύμφωνα με το κριτήριο Newman Keuls οι τιμές των καταγμάτων σε μικρά οστά είναι σημαντικά χαμηλότερες από όλες τις άλλες τιμές που καταγράφονται. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 12 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού **ανεξαρτήτως μεγέθους**.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, παρατηρείται σημαντική διαφορά στα κάτω άκρα μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων με τα φυσιολογικά να έχουν σαφώς μεγαλύτερες τιμές. Η διαφορά δεν εντοπίζεται στα άνω άκρα. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι σύμφωνα με το κριτήριο Newman Keuls είναι στατιστικά σημαντική (οριακά όμως) και η διαφορά μεταξύ άνω και κάτω άκρων στα φυσιολογικά. Παρατηρείται το οξύμωρο φαινόμενο όπου στα φυσιολογικά δείγματα τα κάτω άκρα έχουν υψηλότερη έκφραση ενώ στα δείγματα που προέρχονται από κατάγματα υψηλότερες είναι οι τιμές των άνω άκρων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 13 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού και την εντόπιση στα άκρα.
- στη σύγκριση μεταξύ *καπνιστών και μη καπνιστών*, παρατηρείται **σημαντική διαφορά** στα φυσιολογικά οστά των μη καπνιστών συγκριτικά με όλες τις άλλες κατηγορίες αν και ορισμένα αποτελέσματα είναι οριακά. Οι μη καπνιστές τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα κατάγματα έχουν υψηλότερες τιμές από τους καπνιστές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 14 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού και του καπνίσματος και οι διαφορές είναι περισσότερες σύμφωνα με το κριτήριο Newman Keuls.
- στη σύγκριση μεταξύ των *κατηγοριών BMI*, παρατηρούνται υψηλότερες τιμές στους υπέρβαρους και παχύσαρκους στα φυσιολογικά δείγματα απ' ότι στα καταγματικά. Από τα συμπεράσματα εξαιρείται η κατηγορία των αδύνατων λόγω απουσίας παρατηρήσεων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 15 [Παράρτημα -

BMP-2]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού **ανεξαρτήτως** των τιμών του *BMI*.

- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καταγματικά δείγματα αλλά δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού **ανεξαρτήτως** φύλου. Συνεπώς το αποτέλεσμα ότι οι άνδρες διαφέρουν από τις γυναίκες παύει να ισχύει αν τα δύο φύλα εξεταστούν λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση του οστού. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 16 [Παράρτημα -BMP-2].
- στη σύγκριση μεταξύ της *ηλικιακής κατανομής*, η έκφραση των φυσιολογικών και ειδικά αυτή της ηλικίας άνω των 50 ετών υπερέχει των καταγμάτων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 17 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων* για τους ενήλικες ηλικίας άνω των 50 ετών καθώς επίσης παρατηρείται διαφορά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων για τα φυσιολογικά δείγματα.
- στο Γράφημα 18 [Παράρτημα -BMP-2] παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης έχοντας αλλάξει την ομαδοποίηση σχετικά με *την ημέρα που παρατηρείται το κάταγμα*. Σε όλες τις ομαδοποιήσεις παρατηρείται υψηλότερη έκφραση των *φυσιολογικών δειγμάτων* σε σχέση με τα κατάγματα μέχρι και 30<sup>ης</sup> ημέρας, ενώ σε όλες τις συγκρίσεις υψηλότερη έκφραση παρουσιάζουν τα *κατάγματα μετά το 1<sup>ο</sup> μήνα*, μεγαλύτερη και από τα φυσιολογικά. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομαδοποιήσεων.

## Γ. BMP-2 στα παιδιά

Στον πίνακα B2.38 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-2 στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών .

Πίνακας B2.38 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-2 στα παιδιά

		BMP-2			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	17,77	18,03	6,38	8
	Μεγάλο	8,33	9,45	1,31	52
Άκρο	Κάτω	10,50	10,72	2,24	23
	Άνω	9,02	11,65	1,92	37
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	14,05	13,07	2,61	25
	1η	3,90	1,83	,61	9
	2η-10η	7,27	9,78	1,92	26
Φύλο	Άρρεν	9,22	11,77	1,77	44
	Θήλυ	10,59	9,88	2,47	16
Κατάσταση	Φυσιολογική	14,05	13,07	2,61	25
	Κάταγμα	6,40	8,56	1,45	35

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα μικρά οστά. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ *μεγάλου και μικρού μεγέθους*.. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 19 [Παράρτημα -BMP-2].
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα κάτω άκρα σε σχέση με τα άνω. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 20 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *εντόπισης στο άνω και κάτω άκρο*.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων ανάλογα με την ημέρα κατάγματος*, οι τιμές που παρατηρούνται στα φυσιολογικά δείγματα είναι **σημαντικά υψηλότερες** σε σχέση με τα κατάγματα. Δεν εντοπίζονται όμως

διαφορές ανάλογα με την *ημέρα* του κατάγματος. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 21 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά *ανάλογα με την κατάσταση*.

- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα κορίτσια. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 22 [Παράρτημα -BMP-2]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *αγοριών και κοριτσιών*.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και του συνόλου των καταγμάτων*, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 23 [Παράρτημα -BMP-2]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά *ανάλογα με την κατάσταση*.

***Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.***

Η υποκατηγοριοποίηση λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό / κάταγμα δεν επιτρέπει την σωστή αποτύπωση των στατιστικών αναλύσεων λόγω του μικρού πληθυσμού κάθε υποκατηγορίας παρά τις πιθανά παρατηρούμενες διαφορές στις μέσες τιμές ορισμένων μεταβλητών.



**B2.6.2 BMP-4****A. Σύνολο δειγμάτων**

Στον πίνακα Β2.39 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-4 στα παιδιά και τους ενήλικες τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα.

Πίνακας Β2.39 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-4 στο σύνολο των δειγμάτων

		BMP-4			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Ομάδα ασθενών	Παιδιά	1,28	2,75	,35	60
	Ενήλικες	1,05	1,62	,10	240
Κατάσταση	Φυσιολογική	1,92	2,62	,25	107
	Κάταγμα	,63	1,14	,08	193
Κατάσταση	Φυσιολογική	2,28	4,02	,80	25
	Ομάδα ασθενών Παιδιά				
	Ενήλικες	1,82	2,04	,23	82
	Κάταγμα	,57	,64	,11	35
	Ομάδα ασθενών Παιδιά				
	Ενήλικες	,64	1,23	,10	158

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *παιδιών και ενηλίκων*, η γονιδιακή έκφραση είναι υψηλότερη στα παιδιά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 1 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων*, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές για τα φυσιολογικά δείγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 2 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καταγματικών.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων στα παιδιά και στους ενήλικες*, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές έκφρασης του γονιδίου για τα φυσιολογικά δείγματα και στα παιδιά και στους ενήλικες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 3 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων και στις δύο ηλικιακές ομάδες.

## B. BMP-4 ενήλικες

Στον πίνακα B2.40 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό. Ο πίνακας παρουσιάζει το σύνολο της έκφρασης βάσει των διαφόρων παραμέτρων (π.χ. μέγεθος οστού).

Πίνακας B2.40 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η κατάσταση του δείγματος

		BMP-4			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	1,37	1,77	,26	40
	Μεγάλο	,97	1,58	,11	200
Άκρο	Κάτω	1,16	1,77	,14	143
	Άνω	,88	1,36	,13	97
Κάπνισμα	Όχι	1,09	1,62	,12	163
	Ναι	,95	1,62	,18	77
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	1,82	2,04	,23	82
	1η	,69	1,39	,16	75
	2η	,60	,68	,14	25
	3η	,45	,47	,10	21
	4η-10η	,78	1,47	,29	26
	11η-30η	,45	,47	,14	12
	1ο-4ο μήνα	1,06	1,39	,49	8
	μετά τον 5ο μήνα	1,29	2,08	,93	5
BMI	Αδύνατος	1,86	2,97	1,49	4
	Φυσιολογικός	,99	1,51	,17	76
	Υπέρβαρος	1,01	1,75	,17	102
	Παχύσαρκος	1,13	1,44	,18	58
Φύλο	Άρρεν	,86	1,42	,12	124
	Θήλυ	1,24	1,79	,16	116
Ηλικία	18-49	,91	1,62	,17	98
	50+	1,14	1,81	,56	142
Κατάσταση	Φυσιολογική	1,82	2,04	,23	82
	Κάταγμα	,64	1,23	,10	158

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενηλίκων δειγμάτων χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.40).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές όσον αφορά τα δείγματα για τα μικρά οστά συγκριτικά με τα μεγάλα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 4 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ μεγάλου και μικρού μεγέθους στα οστά.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα των κάτω άκρων σε σχέση με τα άνω άκρα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 5 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εντόπιση στα άνω και κάτω άκρο των οστών.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 6 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών.
- παρατηρείται σταδιακή πτώση της έκφρασης μέχρι και την τριακοστή ημέρα μετά το κάταγμα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Φαίνεται όμως ότι μετά τον 1<sup>ο</sup> μήνα η έκφραση αυξάνεται σε επίπεδα παρόμοια με των φυσιολογικών αλλά το δείγμα πληθυσμού για αυτή την περίοδο είναι μικρό και η στατιστική ανάλυση αναπόφευκτα δεν παρουσιάζει σημαντικότητα στην οποιαδήποτε διαφορά έκφρασης. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 7 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών του κατάγματος.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους παχύσαρκους σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες BMI. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 8 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού ανεξαρτήτως των τιμών του BMI.
- μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 9 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών.
- η έκφραση είναι υψηλότερη στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας σε σχέση με αυτούς νεότερης ηλικίας. Η σχέση αποδίδεται από τη Γράφημα 10 [Παράρτημα -

BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ηλικιακής κατανομής ενήλικων ασθενών ηλικίας από 18 – 49 ετών και ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας.

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με τα κατάγματα. . Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 11 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων.

Στον πίνακα B2.41 φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό βάσει της κατάστασης (φυσιολογικό - κάταγμα) και των διαφόρων παραμέτρων.

*Πίνακας B2.41 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-4 στον ενήλικο πληθυσμό λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατάσταση των δειγμάτων*

				BMP-4			
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Κατάσταση	Φυσιολογική	Μέγεθος οστού	Μικρό	2,10	2,01	,39	27
			Μεγάλο	1,68	2,06	,28	55
	Κάταγμα	Μέγεθος οστού	Μικρό	,40	,51	,12	19
			Μεγάλο	,68	1,30	,11	139
Κατάσταση	Φυσιολογική	Άκρο	Κάτω	2,12	2,22	,32	47
			Άνω	1,41	1,72	,29	35
	Κάταγμα	Άκρο	Κάτω	,67	1,32	,13	96
			Άνω	,60	1,09	,14	62
Κατάσταση	Φυσιολογική	Κάπνισμα	Όχι	2,09	2,25	,31	51
			Ναι	1,37	1,58	,28	31
	Κάταγμα	Κάπνισμα	Όχι	,65	1,03	,10	109
			Ναι	,64	1,60	,23	49
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	1,82	2,04	,23	82
			Κάταγμα	Ημέρα κατάγματος	1η	,60	1,47
2η	,60	,68			,14	25	
3η	,45	,47			,10	21	
4η-10η	,78	1,47			,29	26	
11η-30η	,45	,47			,14	12	
1ο-4ο μήνα	1,06	1,39			,49	8	
μετά τον 5ο μήνα	1,29	2,08			,93	5	
Κατάσταση	Φυσιολογική	BMI	Αδύνατος	.	.	.	0
			Φυσιολογικός	1,84	2,07	,41	26
	Κάταγμα	BMI	Υπέρβαρος	1,91	2,31	,44	28
			Παχύσαρκος	1,71	1,78	,34	28
	Κάταγμα	BMI	Αδύνατος	2,18	3,55	2,05	3
			Φυσιολογικός	,58	,97	,13	53
	Κάταγμα	BMI	Υπέρβαρος	,63	1,37	,16	72
			Παχύσαρκος	,63	,89	,16	30
Κατάσταση	Φυσιολογική	Φύλο	Άρρεν	1,38	2,08	,35	35
			Θήλυ	2,14	1,98	,29	47
	Κάταγμα	Φύλο	Άρρεν	,63	1,03	,11	87
			Θήλυ	,66	1,45	,17	71
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ηλικία	18-49	1,28	1,02	,43	32
			50+	2,15	2,63	,77	50
	Κάταγμα	Ηλικία	18-49	,72	1,34	,54	66
			50+	,58	1,09	,42	92

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενήλικων δειγμάτων λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.41).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, οι τιμές των δειγμάτων των μικρών και των μεγάλων οστών δε διαφέρουν ούτε στα κατάγματα, ούτε στα φυσιολογικά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 12 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την *κατάσταση του οστού* και **ανεξάρτητα** από το μέγεθος.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, παρατηρείται σημαντική διαφορά στα κάτω άκρα μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων με τα φυσιολογικά να έχουν σαφώς μεγαλύτερες τιμές. Το ίδιο ισχύει και για τα άνω άκρα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 13 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την *κατάσταση του οστού ανεξαρτήτως* της *εντόπισης*.
- στη σύγκριση μεταξύ *καπνιστών και μη καπνιστών*, οι μη καπνιστές τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα κατάγματα έχουν υψηλότερες τιμές από τους καπνιστές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 14 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την *κατάσταση του οστού ανεξαρτήτως καπνίσματος*.
- στη σύγκριση μεταξύ των *κατηγοριών BMI*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στους φυσιολογικούς από τις άλλες κατηγορίες. Από τα συμπεράσματα εξαιρείται η κατηγορία των αδύνατων λόγω απουσίας παρατηρήσεων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 15 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την *κατάσταση του οστού ανεξαρτήτως της κατηγορίας BMI*.
- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καταγματικά δείγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 16 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την *κατάσταση του οστού και του φύλου*. Οι διαφορές είναι σε όλες τις περιπτώσεις στατιστικά σημαντικές εκτός από τη σύγκριση μεταξύ ανδρών και γυναικών στα κατάγματα. Συνεπώς το αποτέλεσμα ότι

οι άνδρες διαφέρουν από τις γυναίκες παύει να ισχύει στην περίπτωση οστών με κάταγμα.

- στη σύγκριση μεταξύ της *ηλικιακής κατανομής*, η έκφραση των φυσιολογικών και ειδικά αυτή της ηλικίας άνω των 50 ετών υπερέρχει των καταγμάτων και οι διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων ανά ηλικία είναι **στατιστικά σημαντικές**. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 17 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα φυσιολογικά και καταγματικά δείγματα **ανεξαρτήτου** ηλικίας.
- Στο Γράφημα 18 [Παράρτημα -BMP-4] παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης έχοντας αλλάξει την ομαδοποίηση σχετικά με *την ημέρα που παρατηρείται το κάταγμα*. Σε όλες τις ομαδοποιήσεις παρατηρείται υψηλότερη έκφραση των *φυσιολογικών δειγμάτων* σε σχέση με τα κατάγματα. Οι διαφορές των φυσιολογικών ισχύουν μέχρι και τις τιμές που καταγράφονται μέχρι τη 10<sup>η</sup> μέρα. Μετά την 11<sup>η</sup> παύουν να υπάρχουν. Στην τελευταία ομαδοποίηση από αυτές που παρουσιάζονται, το αποτέλεσμα αλλάζει δείχνοντας διαφορές και μετά την 11<sup>η</sup> μέρα έως την 30<sup>η</sup> μέρα, το αποτέλεσμα όμως είναι οριακό.

## Γ. BMP-4 στα παιδιά

Στον πίνακα B2.42 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-4 στο σύνολο των δειγμάτων των παιδιών.

Πίνακας B2.42 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-4 στα παιδιά

		BMP-4			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	3,39	5,69	2,01	8
	Μεγάλο	,96	1,86	,26	52
Άκρο	Κάτω	,84	,93	,19	23
	Άνω	1,55	3,41	,56	37
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	2,28	4,02	,80	25
	1η	,39	,56	,19	9
	2η-10η	,62	,66	,13	26
Φύλο	Άρρεν	1,40	3,17	,48	44
	Θήλυ	,96	,80	,20	16
Κατάσταση	Φυσιολογική	2,28	4,02	,80	25
	Κάταγμα	,57	,64	,11	35

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα μικρά οστά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 19 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ μεγάλου και μικρού μεγέθους.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα άνω άκρα σε σχέση με τα κάτω. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 20 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *εντόπισης στο άνω και κάτω άκρο*.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων ανάλογα με την ημέρα κατάγματος*, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 21 [Παράρτημα



-BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά ανάλογα με την κατάσταση. Δεν εντοπίζονται όμως διαφορές ανάλογα με την ημέρα του κατάγματος.

- στη σύγκριση μεταξύ των δύο φύλων, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα αγόρια. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 22 [Παράρτημα -BMP-4]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αγοριών και κοριτσιών.
- στη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και του συνόλου των καταγμάτων, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 23 [Παράρτημα -BMP-4]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά ανάλογα με την κατάσταση.

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Η υποκατηγοριοποίηση λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό / κάταγμα δεν επιτρέπει την σωστή αποτύπωση των στατιστικών αναλύσεων λόγω του μικρού πληθυσμού κάθε υποκατηγορίας παρά τις πιθανά παρατηρούμενες διαφορές στις μέσες τιμές ορισμένων μεταβλητών.

**B2.6.3 BMP-6****A. Σύνολο δειγμάτων**

Στον πίνακα B2.43 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-6 στα παιδιά και τους ενήλικες τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα.

Πίνακας B2.43 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-6 στο σύνολο των δειγμάτων

				BMP-6			
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Ομάδα	Παιδιά			2,05	2,23	,29	60
ασθενών	Ενήλικες			2,99	3,73	,23	240
Κατάσταση	Φυσιολογική			3,15	3,82	,37	107
	Κάταγμα			2,57	3,33	,24	193
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ομάδα	Παιδιά	2,51	2,62	,52	25
		ασθενών	Ενήλικες	3,35	4,11	,45	82
	Κάταγμα	Ομάδα	Παιδιά	1,72	1,87	,32	35
		ασθενών	Ενήλικες	2,76	3,55	,28	158

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *παιδιών και ενηλίκων*, η έκφραση είναι υψηλότερη στον ενήλικο πληθυσμό. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 1 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων*, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές για τα φυσιολογικά δείγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 2 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων στα παιδιά και στους ενήλικες*, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές στους ενήλικες στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με τα κατάγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 3

[Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων μόνο στα κατάγματα.

#### BMP-6 ενήλικες

Στον πίνακα B2.44 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό. Ο πίνακας παρουσιάζει το σύνολο της έκφρασης βάσει των διαφόρων παραμέτρων (π.χ. μέγεθος οστού).

*Πίνακας B2.44 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η κατάσταση του δείγματος*

		BMP-6			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	2,89	3,74	,55	47
	Μεγάλο	3,01	3,74	,26	207
Άκρο	Κάτω	3,28	3,66	,30	150
	Άνω	2,55	3,81	,37	104
Κάπνισμα	Όχι	3,07	3,39	,26	170
	Ναι	2,94	4,36	,48	84
Ημέρα κατάγματος 1,2,3, - 4-10	Χωρίς κάταγμα	3,35	4,11	,45	82
	1η	3,63	4,12	,48	75
	2η	2,32	1,93	,39	25
	3η	2,38	3,67	,80	21
	4η-10η	1,59	2,36	,46	26
	11η-30η	1,44	1,04	,30	12
	1ο-4ο μήνα	4,04	5,44	1,92	8
	μετά τον 5ο μήνα	2,46	2,51	1,12	5
BMI	Αδύνατος	2,64	1,55	,77	4
	Φυσιολογικός	2,55	3,47	,38	82
	Υπέρβαρος	3,01	3,70	,36	106
	Παχύσαρκος	3,54	4,18	,53	62
Φύλο	Άρρεν	2,95	3,95	,35	131
	Θήλυ	3,01	3,50	,32	123
Ηλικία	18-49	2,79	3,68	,81	98
	50+	3,06	4,51	,65	142
Κατάσταση	Φυσιολογική	3,35	4,11	,45	82
	Κάταγμα	2,76	3,55	,28	158

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενήλικων δειγμάτων χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.44).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα από τα μεγάλα οστά σε σχέση με τα μικρά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 4 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μεγάλου και μικρού μεγέθους στα οστά.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρούνται στα κάτω άκρα σε σχέση με τα άνω άκρα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 5 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά στην εντόπιση στα άνω και κάτω άκρο των οστών.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 6 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών.
- παρατηρείται σταδιακή πτώση της έκφρασης μέχρι και την τριακοστή ημέρα μετά το κάταγμα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Φαίνεται όμως ότι μετά τον 1<sup>ο</sup> μήνα η έκφραση αυξάνεται σε επίπεδα υψηλότερα των φυσιολογικών αλλά το δείγμα πληθυσμού για αυτή την περίοδο είναι μικρό και η στατιστική ανάλυση αναπόφευκτα δεν παρουσιάζει σημαντικότητα στην οποιαδήποτε διαφορά έκφρασης. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 7 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές μεταξύ των ημερών του κατάγματος.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους παχύσαρκους σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες BMI. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 8 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με το BMI.
- μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 9 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών.
- η έκφραση είναι υψηλότερη στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας σε σχέση με αυτούς νεότερης ηλικίας. Η σχέση αποδίδεται από τη Γράφημα 10 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ηλικιακής κατανομής ενήλικων ασθενών ηλικίας από 18 – 49 ετών και ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας.

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα *φυσιολογικά δείγματα* σε σχέση με τα *κατάγματα*. Η τιμή θεωρείται οριακή και περαιτέρω ανάλυση με το κριτήριο Newman Keuls παραμένει οριακή. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 11 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων*.

Στον πίνακα Β2.45 φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό βάσει της κατάστασης (φυσιολογικό - κάταγμα) και των διαφόρων παραμέτρων.

*Πίνακας Β2.45 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-6 στον ενήλικο πληθυσμό λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατάσταση των δειγμάτων*

				BMP-6						
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N			
Κατάσταση	Φυσιολογική	Μέγεθος οστού	Μικρό	3,46	4,47	,86	27			
			Μεγάλο	3,29	3,97	,54	55			
	Κάταγμα	Μέγεθος οστού	Μικρό	2,21	2,38	,55	19			
			Μεγάλο	2,83	3,68	,31	139			
Κατάσταση	Φυσιολογική	Άκρο	Κάτω	3,54	3,86	,56	47			
			Άνω	3,09	4,48	,76	35			
	Κάταγμα	Άκρο	Κάτω	2,99	3,53	,36	96			
			Άνω	2,39	3,59	,46	62			
Κατάσταση	Φυσιολογική	Κάπνισμα	Όχι	4,00	4,54	,64	51			
			Ναι	2,27	3,07	,55	31			
	Κάταγμα	Κάπνισμα	Όχι	3,44	2,64	,25	109			
			Ναι	2,45	4,99	,71	49			
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	3,35	4,11	,45	82			
			Κάταγμα	Ημέρα κατάγματος						
			Χωρίς κάταγμα	.	.	.	0			
			1η	3,68	4,30	,55	61			
			2η	2,32	1,93	,39	25			
			3η	2,38	3,67	,80	21			
			4η-10η	1,59	2,36	,46	26			
			11η-30η	1,44	1,04	,30	12			
			1ο-4ο μήνα μετά τον 5ο μήνα	4,04	5,44	1,92	8			
			2,46	2,51	1,12	5				
			Κατάσταση	Φυσιολογική	BMI	Αδύνατος	.	.	.	0
						Φυσιολογικός	3,28	4,61	,90	26
Υπέρβαρος	2,88	3,47				,66	28			
Κάταγμα	BMI	Παχύσαρκος				3,89	4,30	,81	28	
Αδύνατος	2,29	1,69				,97	3			
Φυσιολογικός	2,25	2,84				,39	53			
	Κάταγμα	BMI	Υπέρβαρος	2,93	3,74	,44	72			
			Παχύσαρκος	3,28	4,31	,79	30			
			Κατάσταση	Φυσιολογική	Φύλο	Άρρεν	2,89	4,15	,70	35
						Θήλυ	3,69	4,10	,60	47
				Κάταγμα	Φύλο	Άρρεν	2,96	3,88	,42	87
						Θήλυ	2,50	3,11	,37	71
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ηλικία	18-49	2,29	1,78	,92	32			
			50+	4,02	5,02	1,43	50			
			Κάταγμα	Ηλικία	18-49	3,02	4,75	,68	66	
			50+	2,56	3,64	,74	92			

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενήλικων δειγμάτων λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας B2.45).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, παρατηρείται η υψηλότερη έκφραση στα δείγματα που προέρχονται από τα μεγαλύτερα οστά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 12 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού και **ανεξάρτητα** από το μέγεθος.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, η έκφραση των κάτω άκρων τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα δείγματα που προέρχονται από κάταγμα είναι υψηλότερη από αυτή των άνω άκρων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 13 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατάσταση του οστού και την εντόπιση στα άκρα.
- στη σύγκριση μεταξύ *καπνιστών και μη καπνιστών*, παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά ανάμεσα στους καπνιστές και μη με τους τελευταίους να έχουν πολύ υψηλότερη έκφραση. Οι μη καπνιστές τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα κατάγματα έχουν υψηλότερες τιμές από τους καπνιστές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 14 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού και του καπνίσματος.
- στη σύγκριση μεταξύ των *κατηγοριών BMI*, παρατηρούνται πιο υψηλές τιμές στους υπέρβαρους και παχύσαρκους στα φυσιολογικά δείγματα απ' ότι στα καταγματικά. Από τα συμπεράσματα εξαιρείται η κατηγορία των αδύνατων λόγω απουσίας παρατηρήσεων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 15 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού **ανεξαρτήτως** της κατηγορίας BMI.
- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καταγματικά δείγματα αλλά δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού **ανεξαρτήτως** φύλου. Συνεπώς το αποτέλεσμα ότι οι άνδρες διαφέρουν από τις γυναίκες παύει να ισχύει αν τα δύο φύλα εξεταστούν λαμβάνοντας υπόψη την

κατάσταση του οστού. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 16 [Παράρτημα -BMP-6].

- στη σύγκριση μεταξύ της *ηλικιακής κατανομής*, η έκφραση της ηλικίας άνω των 50 ετών των φυσιολογικών δειγμάτων υπερέχει των υπολοίπων. Τα φυσιολογικά δείγματα των νεότερων σε ηλικία ενηλίκων παρουσιάζουν παρόμοια έκφραση με τα κατάγματα και των δύο ηλικιακών ομάδων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 17 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών και καταγμάτων ανεξαρτήτου ηλικίας*.
- Στο Γράφημα 18 [Παράρτημα-BMP-6] παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης έχοντας αλλάξει την ομαδοποίηση σχετικά με την ημέρα που παρατηρείται το κάταγμα. Τα κατάγματα 1-4 μηνών παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση από όλες τις κατηγορίες σε όλες τις ομαδοποιήσεις. Επιπλέον, η 1<sup>η</sup> ημέρα κατάγματος παρουσιάζει υψηλότερη έκφραση από τα φυσιολογικά δείγματα. Όταν όμως ομαδοποιείται με τα κατάγματα 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας τότε παρουσιάζεται χαμηλότερη. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομαδοποιήσεων με εξαίρεση της διαφοράς της ομάδας καταγμάτων 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας σε σχέση με τα φυσιολογικά και καταγματικά δείγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας κατά την 2<sup>η</sup> ομαδοποίηση.



## Γ. BMP-6 στα παιδιά

Στον πίνακα Β2.46 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-6 στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών.

Πίνακας Β2.46 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-6 στα παιδιά

		BMP-6			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	3,72	2,10	,74	8
	Μεγάλο	1,80	2,15	,30	52
Άκρο	Κάτω	1,89	2,81	,59	23
	Άνω	2,15	1,81	,30	37
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	2,51	2,62	,52	25
	1η	2,44	2,30	,77	9
Φύλο	2η-10η	1,47	1,68	,33	26
	Άρρεν	2,03	2,39	,36	44
Κατάσταση	Θήλυ	2,12	1,76	,44	16
	Φυσιολογική	2,51	2,62	,52	25
	Κάταγμα	1,72	1,87	,32	35

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα μικρά οστά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 19 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ *μεγάλου και μικρού μεγέθους*.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα άνω άκρα σε σχέση με τα κάτω. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 20 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *εντόπισης στο άνω και κάτω άκρο*.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων ανάλογα με την ημέρα κατάγματος*, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα όπως και αυτές των καταγμάτων 1<sup>ης</sup> ημέρας είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που καταγράφονται τη 2<sup>η</sup> – 10<sup>η</sup> ημέρα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 21

[Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά ανάλογα με την κατάσταση.

- στη σύγκριση μεταξύ των δύο φύλων, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα κορίτσια. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 22 [Παράρτημα -BMP-6]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αγοριών και κοριτσιών.
- στη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και του συνόλου των καταγμάτων, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 23 [Παράρτημα -BMP-6]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά ανάλογα με την κατάσταση.

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Η υποκατηγοριοποίηση λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό / κάταγμα δεν επιτρέπει την σωστή αποτύπωση των στατιστικών αναλύσεων λόγω του μικρού πληθυσμού κάθε υποκατηγορίας παρά τις πιθανά παρατηρούμενες διαφορές στις μέσες τιμές ορισμένων μεταβλητών.

**B2.6.4 BMP-7****A. Σύνολο δειγμάτων**

Στον πίνακα B2.47 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-7 στα παιδιά και τους ενήλικες τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα.

Πίνακας B2.47 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-7 στο σύνολο των δειγμάτων

				BMP-7			
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Ομάδα ασθενών	Παιδιά			,12	,27	,04	60
	Ενήλικες			,09	,51	,03	240
Κατάσταση	Φυσιολογική			,12	,36	,03	107
	Κάταγμα			,08	,54	,04	193
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ομάδα	Παιδιά	,21	,40	,08	25
		ασθενών	Ενήλικες	,09	,34	,04	82
	Κάταγμα	Ομάδα	Παιδιά	,06	,07	,01	35
		ασθενών	Ενήλικες	,09	,60	,05	158

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ παιδιών και ενηλίκων, η γονιδιακή έκφραση είναι υψηλότερη στα παιδιά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 1 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ παιδιών και ενηλίκων.
- στη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων, καταγράφονται μεγαλύτερες τιμές για τα φυσιολογικά δείγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 2 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων.
- στη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων στα παιδιά και στους ενήλικες, η έκφραση στα φυσιολογικά δείγματα είναι υψηλότερη σε σχέση με τα κατάγματα και ιδιαίτερα για τα παιδιά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 3 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά για όλες τις κατηγορίες στους ενήλικες με κάταγμα.

## B. BMP-7 ενήλικες

Στον πίνακα B2.48 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό. Ο πίνακας παρουσιάζει το σύνολο της έκφρασης βάσει των διαφόρων παραμέτρων (π.χ. μέγεθος οστού).

Πίνακας B2.48 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η κατάσταση του δείγματος

		BMP-7			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	,10	,44	,06	40
	Μεγάλο	,08	,52	,04	200
Άκρο	Κάτω	,04	,08	,01	143
	Άνω	,16	,79	,08	97
Κάπνισμα	Όχι	,11	,62	,05	163
	Ναι	,04	,10	,01	77
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	,09	,34	,04	82
	1η	,01	,03	,00	61
	2η	,07	,14	,03	25
	3η	,02	,04	,01	21
	4η-10η	,01	,03	,01	26
	11η-30η	,02	,03	,01	12
	1ο-4ο μήνα μετά τον 5ο μήνα	1,27	2,50	,88	8
	5ο μήνα	,09	,06	,03	5
BMI	Αδύνατος	,01	,02	,01	4
	Φυσιολογικός	,04	,09	,01	76
	Υπέρβαρος	,08	,37	,04	102
	Παχύσαρκος	,16	,91	,12	58
Φύλο	Άρρεν	,09	,63	,05	124
	Θήλυ	,09	,34	,03	116
Ηλικία	18-49	,08	,57	,06	98
	50+	,08	,14	,01	142
Κατάσταση	Φυσιολογική	,09	,34	,04	82
	Κάταγμα	,09	,60	,05	158

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενήλικων δειγμάτων χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας B2.48).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα από τα μικρά οστά σε σχέση με τα μεγάλα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 4 [Παράρτημα -BMP-7]. Η διαφορά είναι οριακά στατιστικά σημαντική.

- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα των *άνω άκρων* σε σχέση με τα *κάτω άκρα*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 5 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εντόπιση στα *άνω και κάτω άκρο* των οστών.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους *μη καπνιστές* σε σχέση με τους *καπνιστές*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 6 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη ( $p=0.065715$ ), αν και η τιμή είναι οριακή.
- παρατηρείται πολύ υψηλότερη έκφραση για τα κατάγματα κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα έως τον 4<sup>ο</sup> σε σχέση με όλες τις κατηγορίες. Οι διαφορές είναι **στατιστικά σημαντικές** με τα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας, 4<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> και 11<sup>ης</sup> -30<sup>ης</sup>. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 7 [Παράρτημα -BMP-7].
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στους *παχύσαρκους* σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες BMI. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 8 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές *ανάλογα με το BMI*.
- μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται στις *γυναίκες* σε σχέση με τους *άνδρες*. Η διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών οριακή ( $p=0.061265$ ). Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 9 [Παράρτημα -BMP-7].
- η έκφραση είναι παρόμοια ανάμεσα στους ασθενείς *μικρότερης ηλικίας* σε σχέση με αυτούς *μεγαλύτερης ηλικίας*. Η σχέση αποδίδεται από τη Γράφημα 10 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ηλικιακής κατανομής *ενήλικων ασθενών ηλικίας από 18 – 49 ετών* και *ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας*.
- υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα *φυσιολογικά δείγματα* σε σχέση με τα *κατάγματα*. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 11 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ *φυσιολογικών δειγμάτων* και *καταγμάτων*.

Στον πίνακα Β2.49 φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό βάσει της κατάστασης (φυσιολογικό - κάταγμα) και των διαφόρων παραμέτρων.

Πίνακας Β2.49 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-7 στον ενήλικο πληθυσμό λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατάσταση των δειγμάτων

				BMP-7			
				Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Κατάσταση	Φυσιολογική	Μέγεθος οστού	Μικρό	,15	,57	,11	27
			Μεγάλο	,06	,12	,02	55
	Κάταγμα	Μέγεθος οστού	Μικρό	,04	,13	,03	19
			Μεγάλο	,09	,64	,05	139
Κατάσταση	Φυσιολογική	Άκρο	Κάτω	,06	,11	,02	47
			Άνω	,14	,51	,09	35
	Κάταγμα	Άκρο	Κάτω	,02	,05	,01	96
			Άνω	,19	,95	,12	62
Κατάσταση	Φυσιολογική	Κάπνισμα	Όχι	,12	,42	,06	51
			Ναι	,05	,12	,02	31
	Κάταγμα	Κάπνισμα	Όχι	,11	,72	,07	109
			Ναι	,03	,09	,01	49
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	,09	,34	,04	82
			Κάταγμα	Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα		
					1η	,01	,03
			2η	,07	,14	,03	25
			3η	,02	,04	,01	21
			4η-10η	,01	,03	,01	26
			11η-30η	,02	,03	,01	12
			1ο-4ο μήνα	1,27	2,50	,88	8
			μετά τον 5ο μήνα	,09	,06	,03	5
Κατάσταση	Φυσιολογική	BMI	Αδύνατος	.	.	.	0
			Φυσιολογικός	,04	,08	,01	26
	Κάταγμα	BMI	Υπέρβαρος	,16	,57	,11	28
			Παχύσαρκος	,07	,10	,02	28
	Κάταγμα	BMI	Αδύνατος	,00	,00	,00	3
			Φυσιολογικός	,03	,10	,01	53
			Υπέρβαρος	,06	,27	,03	72
			Παχύσαρκος	,27	1,30	,24	30
Κατάσταση	Φυσιολογική	Φύλο	Άρρεν	,05	,12	,02	35
			Θήλυ	,12	,44	,06	47
	Κάταγμα	Φύλο	Άρρεν	,11	,77	,08	87
			Θήλυ	,06	,28	,03	71
Κατάσταση	Φυσιολογική	Ηλικία	18-49	,09	,10	,01	32
			50+	,10	,21	,02	50
	Κάταγμα	Ηλικία	18-49	,07	,25	,06	66
			50+	,08	,11	,01	92

**Αποτελέσματα στο σύνολο των ενηλίκων δειγμάτων λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα (Πίνακας Β2.49).**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στα φυσιολογικά δείγματα απ' ότι στα καταγματικά, ενώ οι τιμές των καταγμάτων σε μεγάλα οστά είναι χαμηλότερες από όλες τις άλλες τιμές που καταγράφονται. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 12 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές *ανάλογα με την κατάσταση του οστού και το μέγεθος*.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, παρατηρείται σημαντική διαφορά στο φυσιολογικό κάτω άκρο, με το κάτω άκρο με κάταγμα, με τα φυσιολογικά να έχουν μεγαλύτερες τιμές. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 13 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές *ανάλογα με την κατάσταση του οστού και σε σχέση με την εντόπιση στο κάτω άκρο*.
- στη σύγκριση μεταξύ *καπνιστών και μη καπνιστών*, οι μη καπνιστές των φυσιολογικών δειγμάτων έχουν υψηλότερες τιμές από όσους έχουν κάταγμα που είναι ή δεν είναι καπνιστές. Παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στους μη καπνιστές σε κάθε περίπτωση. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 14 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχουν **στατιστικά σημαντικές** διαφορές *ανάλογα με την κατάσταση του οστού και του καπνίσματος*.
- στη σύγκριση μεταξύ των *κατηγοριών BMI*, παρατηρούνται υψηλότερες τιμές στους φυσιολογικούς, υπέρβαρους και παχύσαρκους στα φυσιολογικά δείγματα απ' ότι στα καταγματικά. Από τα συμπεράσματα εξαιρείται η κατηγορία των αδύνατων λόγω απουσίας παρατηρήσεων. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 15 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές *ανάλογα με την κατάσταση του οστού ανεξαρτήτως της κατηγορίας BMI*.
- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καταγματικά δείγματα. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 16 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων στις γυναίκες*.

- στη σύγκριση μεταξύ της *ηλικιακής κατανομής*, η έκφραση των φυσιολογικών και καταγμάτων είναι παρόμοια. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 17 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων **ανεξαρτήτου** ηλικίας.
- Στο Γράφημα 18 [Παράρτημα -BMP-7] παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης έχοντας αλλάξει την ομαδοποίηση σχετικά με την ημέρα που παρατηρείται το κάταγμα. Παρατηρείται πολύ υψηλότερη έκφραση για τα κατάγματα κατά τον 1<sup>ο</sup> μήνα έως τον 4<sup>ο</sup> σε σχέση με όλες τις κατηγορίες. Οι διαφορές των καταγμάτων 1<sup>ος</sup> έως 4<sup>ων</sup> μηνών είναι **στατιστικά σημαντικές** με τις περισσότερες κατηγορίες σε όλες τις ομαδοποιήσεις.



## Γ. BMP-7 στα παιδιά

Στον πίνακα B2.50 που ακολουθεί φαίνεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, το τυπικό σφάλμα και το πλήθος των τιμών που διαμορφώνουν το κάθε αποτέλεσμα για τη BMP-7 στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών.

Πίνακας B2.50 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων της έκφρασης της BMP-7 στα παιδιά

		BMP-7			
		Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Valid N
Μέγεθος οστού	Μικρό	,32	,41	,15	8
	Μεγάλο	,09	,24	,03	52
Άκρο	Κάτω	,12	,35	,07	23
	Άνω	,14	,22	,04	37
Ημέρα κατάγματος	Χωρίς κάταγμα	,21	,40	,08	25
	1η	,02	,03	,01	9
	2η-10η	,07	,08	,02	26
Φύλο	Άρρεν	,14	,31	,05	44
	Θήλυ	,07	,10	,03	16
Κατάσταση	Φυσιολογική	,21	,40	,08	25
	Κάταγμα	,06	,07	,01	35

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Από το στατιστικό κριτήριο Bonferroni φαίνεται ότι:

- στη σύγκριση μεταξύ *μεγάλου και μικρού* οστού, υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα δείγματα που προέρχονται από τα μικρά οστά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 19 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά μεταξύ *μεγάλου και μικρού μεγέθους*.
- στη σύγκριση μεταξύ *εντόπισης (άνω κα κάτω άκρα)*, η έκφρασή τους είναι παρόμοια και δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *εντόπισης στο άνω και κάτω άκρο*, αν και η διαφορά κινείται οριακά. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 20 [Παράρτημα -BMP-7].
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων ανάλογα με την ημέρα κατάγματος*, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα όπως και αυτές των καταγμάτων 2<sup>ης</sup> ημέρας και μετά είναι σημαντικά υψηλότερες

από αυτές που καταγράφονται την 1η. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 21 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** ανάλογα με την κατάσταση.

- στη σύγκριση μεταξύ των *δύο φύλων*, Υψηλότερη έκφραση παρατηρείται στα αγόρια. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 22 [Παράρτημα -BMP-7]. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *αγοριών και κοριτσιών*.
- στη σύγκριση μεταξύ *φυσιολογικών και του συνόλου των καταγμάτων*, οι τιμές που παρατηρούνται στους ασθενείς χωρίς κάταγμα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η σχέση αποδίδεται από το Γράφημα 23 [Παράρτημα -BMP-7]. Υπάρχει **στατιστικά σημαντική** διαφορά *ανάλογα με την κατάσταση*.

**Αποτελέσματα στο σύνολο δειγμάτων των παιδιών λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό /κάταγμα.**

Η υποκατηγοριοποίηση λαμβάνοντας υπόψιν την κατάσταση φυσιολογικό / κάταγμα δεν επιτρέπει την σωστή αποτύπωση των στατιστικών αναλύσεων λόγω του μικρού πληθυσμού κάθε υποκατηγορίας παρά τις πιθανά παρατηρούμενες διαφορές στις μέσες τιμές ορισμένων μεταβλητών.

## B2.7 Συσχέτιση έκφρασης και χρονικού διαστήματος από στιγμή κατάγματος

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των ωρών από το κάταγμα και της έκφρασης των γονιδίων των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7. Όσον αφορά τις δύο πρώτες ημέρες των καταγμάτων παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο για την έκφραση του γονιδίου BMP-7, η οποία είναι θετική, γεγονός που σημαίνει ότι οι τιμές της έκφρασης της BMP-7 μεγαλώνουν όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος καταγραφής, όμως η συσχέτιση είναι ασθενής. Ανάλογη θετική συσχέτιση δεν παρουσίασε καμία άλλη από τις BMPs, των οποίων οι τιμές της έκφρασης δεν αυξάνονταν όσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος καταγραφής. Η τιμή της συσχέτισης και το p value φαίνονται στον πίνακα B2.51 που ακολουθεί.

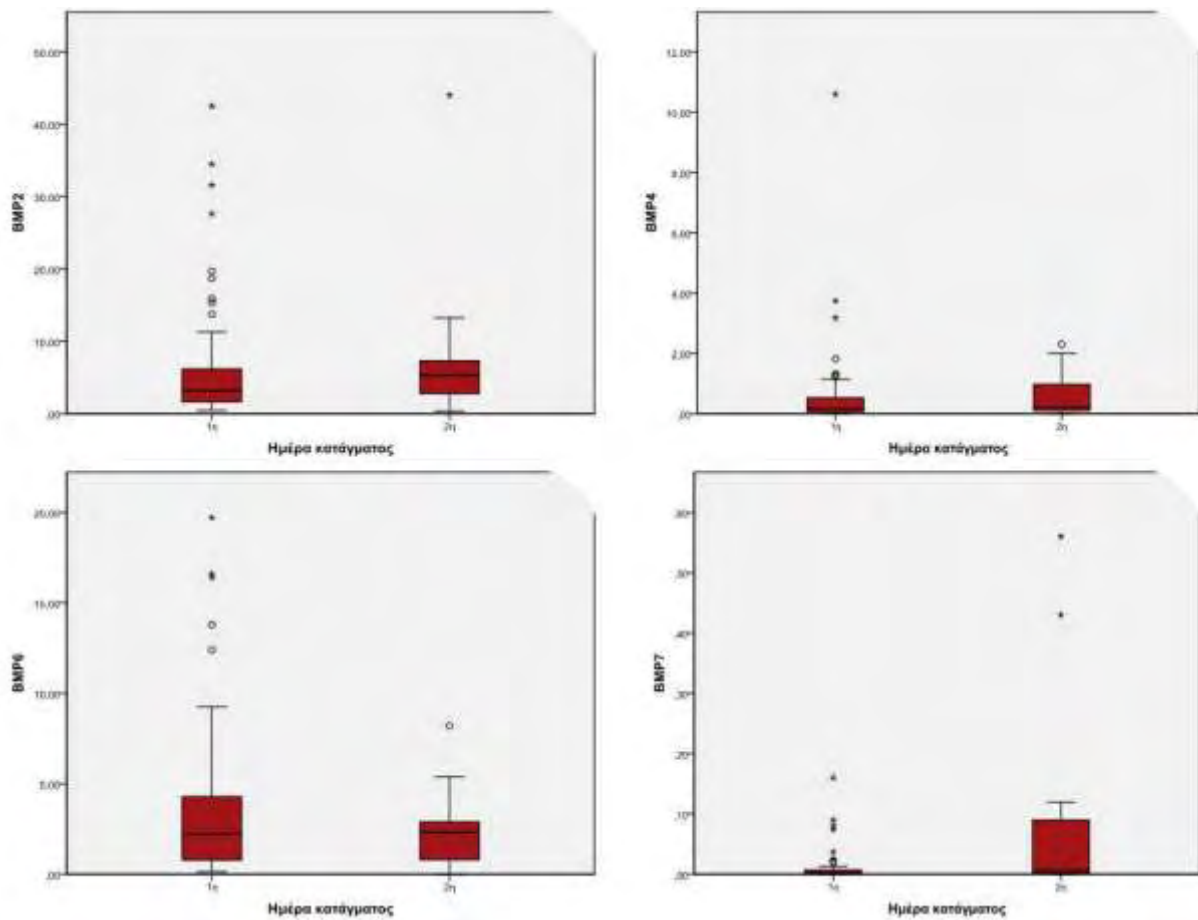
Πίνακας B2.51 Η τιμή της συσχέτισης της γονιδιακής έκφρασης των BMPs σε σχέση με τις ώρες μετά από κάταγμα όπως εκτιμήθηκαν από το συντελεστή συσχέτισης (Pearson correlation coefficient). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο επίπεδο 0.05 (Sig. 2-tailed)

	BMP-2	BMP-4	BMP-6	BMP-7
Συντελεστής συσχέτισης	,127	,109	-,107	<b>,253</b>
Sig. (2-tailed)	,244	,316	,328	<b>,019</b>
N	86	86	86	86

Επίσης συγκρίνοντας τις τιμές των BMPs στις δύο πρώτες ημέρες φαίνεται ότι μόνο για τη BMP-7 παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μεγαλύτερες είναι οι τιμές που καταγράφονται τη 2<sup>η</sup> ημέρα (Πίνακας B2.52, Γράφημα B2.7).

Πίνακας B2.52 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων (μέση τιμή, τυπική απόκλιση, τυπικό σφάλμα, επίπεδο σημαντικότητας) της έκφρασης των BMPs της 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> ημέρας κατάγματος και στατιστική διαφορά αυτής.

Ημέρα κατάγματος		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p, (2-tailed)
BMP-2	1η	61	6,5220	8,65428	1,10807	0.242
	2η	25	6,6340	8,37178	1,67436	
BMP-4	1η	61	,6007	1,46885	,18807	0.313
	2η	25	,6045	,67505	,13501	
BMP-6	1η	61	3,6775	4,29758	,55025	0.325
	2η	25	2,3207	1,92657	,38531	
BMP-7	1η	61	,0110	,02652	,00340	<b>0.020</b>
	2η	25	,0664	,13694	,02739	



Γράφημα B2.7 Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των BMPs προς το γονίδιο αναφοράς h-PBGD των δύο πρώτων ημερών του κατάγματος. Το θηκόγραμμα (boxplot) παρουσιάζει τις στατιστικές τιμές σε εύρος 25%-75% των τιμών. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Η οριζόντια γραμμή δείχνει την διάμεσο.

## B2.8 Συσχέτιση έκφρασης διαφορετικών περιοχών (δείγμα εστίας – δείγμα απόστασης) ίδιου οστού σε κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας (εστία) με δείγμα από απόσταση από το ίδιο οστό

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 28 περισοτικά δείγματα από 14 ασθενείς (9 άνδρες/ 5 γυναίκες, 55 έτη μ.ο. ηλικίας) με κάταγμα 1<sup>ης</sup> ημέρας, 14 εκ των οποίων ήταν δείγματα που προέρχονταν από την εστία του κατάγματος [1<sup>ης</sup> ημέρας, κερκίδα (6), περόνη (4), μηρός (2), κνήμη (1), βραχιόνιο (1)] και 14 τα οποία συλλέχθηκαν από το ίδιο τραυματισμένο οστό σε απόσταση περίπου 2-3 εκατοστών από την εστία του κατάγματος.

Παρατηρήθηκε υψηλότερη γονιδιακή έκφραση όλων των BMPs στα περισοτικά δείγματα που προέρχονται από απόσταση αλλά στην συσχέτισή τους με τα δείγματα από την εστία του κατάγματος μόνο για την BMP-7 υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά όπως παρατηρούμε και στον πίνακα B2.53.

*Πίνακας B2.53 Περιγραφή στατιστικών δεδομένων (μέση τιμή, τυπική απόκλιση, τυπικό σφάλμα, επίπεδο σημαντικότητας) της έκφρασης των BMPs στα 14 δείγματα «ζευγάρια» από κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας (σύγκριση εστίας και δείγματος σε απόσταση).*

	Συνθήκη	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p, (2-tailed)
BMP-2	εστία	14	5,9380	7,66628	1,19449	0.289
	απόσταση	14	6,2342	7,34678	1,64438	
BMP-4	εστία	14	,9707	,89985	,11227	0.364
	απόσταση	14	1,0545	,85885	,12281	
BMP-6	εστία	14	3,4365	4,29758	,57525	0.125
	απόσταση	14	5,4107	5,97887	,97631	
BMP-7	εστία	14	,0024	,00676	,00089	<b>0.042</b>
	απόσταση	14	,0186	,02011	,00121	

## B2.9 Λοιπές συσχετίσεις

Και για τις τέσσερις μετρήσεις έκβασης που αφορούν τα γονίδια περισσέτου που ελέγχθηκαν (BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7), πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ακραίων τιμών. Οι έλεγχοι (Shapiro-Wilk και P-P plots) δεν έδειξαν συσχέτιση των τιμών αυτών με συγκεκριμένους τύπους οστών (π.χ. μηρός, κερκίδα) ούτε με κάποια άλλη παράμετρο από αυτές που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, για τις διαφορές μεταξύ μετρήσεων δειγμάτων που συλλέχθηκαν και χωρίστηκαν ανάλογα με το αν προέρχονταν από *αριστερό οστό ή από δεξί*, οι προκαταρκτικοί έλεγχοι (T-test ή Mann Whitney Test ανάλογα με την προϋπόθεση της ομοσκεδαστικότητας) δεν έδειξαν σε καμία μέτρηση πιθανές διαφορές. Παράλληλα, δε βρέθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα που να υποδεικνύουν μορφολογικές διαφορές ή διαφορά στην έκφραση γονιδίων και επομένως η συγκεκριμένη παράμετρος (αριστερό/ δεξί) δε συμπεριλήφθηκε στα Γενικά Γραμμικά Μοντέλα που αναπτύχθηκαν. Στη μοντελοποίηση δε συμπεριλήφθηκαν επίσης ούτε οι *διαφορετικοί τύποι των οστών*, αφενός λόγω της απουσίας στατιστικά σημαντικών διαφορών κατά τους ελέγχους ANOVA ή Kruskal Wallis (ανάλογα με την προϋπόθεση της ομοσκεδαστικότητας) και αφετέρου λόγω της περιορισμένης δειγματοληψίας ανά τύπο οστού, που δεν επιτρέπει επαρκή ισχύ στους στατιστικούς ελέγχους.

## B2.10 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των ανθρώπινων περισοτικών BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7) στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρείχε συνοπτικά τα εξής αποτελέσματα:

- Παρατηρήθηκε ιεραρχία της γονιδιακής έκφρασης των τεσσάρων μελετώμενων BMPs [BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7] σε όλες τις κατηγορίες, συνθήκες-παραμέτρους.
- Η έκφραση για το γονίδιο της BMP-2 ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες BMPs.
- Τα φυσιολογικά δείγματα υπερέιχαν σε έκφραση σε σχέση με τα καταγματικά για τις BMP-2, BMP-4, BMP-7.
- Ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και τα καταγματικά, η γονιδιακή έκφραση της BMP-6 ήταν παρόμοια.
- Η γονιδιακή έκφραση τριών από τις τέσσερις ελεγμένες BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-7) ήταν υψηλότερη στα παιδιά απ' ό τι στους ενήλικες στα φυσιολογικά δείγματα, ενώ στα κατάγματα παρατηρήθηκε παρόμοια έκφραση για όλες τις BMPs .
- Η κατηγοριοποίηση των ημερών του κατάγματος καθώς και οι ομαδοποιήσεις των ημερών, σε πολλές συγκρίσεις μέχρι και την 30<sup>η</sup> ημέρα μετά το κάταγμα, έδειξαν στο σύνολο των BMPs, χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.
- Οι κατηγορίες των καταγματικών δειγμάτων μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα για όλες τις BMPs, παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε σχέση με τις προηγούμενες καταγματικές ημέρες, αγγίζοντας ή ξεπερνώντας κατά περίπτωση την έκφραση των φυσιολογικών δειγμάτων.
- Κατά τις 48 πρώτες ώρες μετά το κάταγμα δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης των BMPs, πλην της BMP-7 όπου διαπιστώθηκε μικρή αλλά θετική συσχέτιση στην έκφραση με την πάροδο του χρόνου.
- Παρατηρήθηκε υψηλότερη γονιδιακή έκφραση (όχι σημαντική) όλων των BMPs στα περισοτικά δείγματα που προήλθαν από απόσταση σε σχέση με τα καταγματικά δείγματα που προήλθαν από την εστία του κατάγματος.

- Παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές σε όλα τα γονίδια που ελέγχθηκαν και σε όλες τις κατηγορίες.
- Παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες σε όλες τις BMPs που ελέγχθηκαν. Στα παιδιά, η έκφραση των γονιδίων των BMPs ήταν υψηλότερη στα κορίτσια για τις BMP-2 και BMP-6, και υψηλότερη για τα αγόρια για τις BMP-4 και BMP-7, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.
- Στον ενήλικο πληθυσμό, στα φυσιολογικά δείγματα παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στους ηλικιωμένους απ' ότι στους νεότερους σε ηλικία. Στα καταγματικά δείγματα η διαφορά της έκφρασης ανάμεσα στους ηλικιωμένους και τους νεότερους εξισορροπήθηκε.
- Στη σύγκριση μεταξύ εντόπισης (άνω ή κάτω άκρο), παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στα κάτω άκρα σε σχέση με τα άνω στις περισσότερες κατηγορίες χωρίς όμως οι διαφορές να είναι σημαντικές, τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά.
- Στον ενήλικο πληθυσμό, στα φυσιολογικά δείγματα δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην γονιδιακή έκφραση μεταξύ μικρού και μεγάλου οστού προέλευσης του περισστικού τεμαχίου. Στα κατάγματα, υψηλότερη έκφραση διαπιστώθηκε στα μεγαλύτερα οστά απ' ότι στα μικρά. Στα παιδιά, υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στα μικρά οστά.
- Στον ενήλικο πληθυσμό, οι ασθενείς με μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος (υπέρβαρος, παχύσαρκος), στις περισσότερες συγκρίσεις, έδειξαν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικό BMI, χωρίς να είναι σημαντικές οι διαφορές.
- Δεν βρέθηκαν ακραίες τιμές δειγμάτων που να επηρεάζουν το αποτέλεσμα των αναλύσεων.
- Δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη έκφραση ανάλογα με το οστό δειγματοληψίας του αποκτηθέντος περισστικού δείγματος.



## B3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### B3.1 Γενικά

Η διατήρηση της οστικής μάζας και της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του οστού είναι σημαντική σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Τα οστά επενδύονται τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική τους επιφάνεια από στοιβάδες ιστού που περιέχουν οστεοπαραγωγά κύτταρα, το ενδόστεο και το περίοστεο, αντίστοιχα. Το περίοστεο αποτελείται από δύο στοιβάδες: την έξω ή ινοελαστική (outer or fibrous layer) που είναι ο φορέας των αγγείων και των νεύρων και χρησιμεύει στην πρόσφυση των μυών και των τενόντων, και την έσω ή οστεογενετική (cambium or osteogenic layer), μια κυτταροβριθέστερη στοιβάδα που αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και ονομάζονται οστεοπρογονικά κύτταρα. Αυτά έχουν την δυνατότητα να διαιρούνται και να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες [20,26].

Οι κυριότερες λειτουργίες του περιόστεου και του ενδόστεου είναι η υποστήριξη του οστίτη ιστού και η εξασφάλιση συνεχούς παροχής νέων οστεοβλαστών για την επιδιόρθωση ή αύξηση του οστού. Κατά την ενηλικίωση, η έσω ή οστεογενετική στιβάδα υποστρέφει αλλά κάποια οστεοπρογονικά κύτταρα παραμένουν και διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησής τους σε οστεοβλαστικά κύτταρα, ειδικότερα όταν λαμβάνει χώρα η αποκατάσταση του οστού μετά από κάταγμα [20,54,95].

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τα οστεοπρογονικά κύτταρα που απαντώνται στο ενήλικο οστό ή στο περίοστεο, αυτό καθαυτό το περίοστεο διατηρεί επίσης πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs). Αυτό έχει δώσει τη δυνατότητα στους επιστήμονες υπό κατάλληλες συνθήκες *in vitro* να στρέψουν τα MSCs του περιόστεου στην οστεογενετική γραμμή. Η *in vivo* εναπόθεση υγιούς τμήματος περιόστεου σε παθολογική επιφάνεια οστού ή περιοχή κατάγματος συμβάλλει στην αναγέννηση και επιδιόρθωση αυτού αντιστοίχως [242], ενώ η ετεροτοπική εμφύτευση αγγειούμενου περιοστέου μέσα σε μύες, σε μορφή σάκου, οδηγεί σε νεο-οστεογένεση [20]. Επίσης μελέτες σε πειραματόζωα τα οποία

βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης, όπου το περίοστεο διατηρεί παχύτερη έσω στοιβάδα, δείχνουν μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα στην αναγέννηση και επιδιόρθωση του οστού [132, 242].

Η παρουσία πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων στο περίοστεο συμβάλει στην αποκατάσταση του ιδίου του χόνδρου και επίσης επάγει και την χονδρογένεση, την πρόδρομη διαδικασία αύξησης και επούλωσης τραυμάτων, στο οστό. Τα πρόδρομα κύτταρα των χονδροκυττάρων (chondrocyte precursor cells) απαντώνται στην έσω στοιβάδα, όπου η παρουσία ορμονών και μεταγραφικών παραγόντων, με κυρίαρχη την παρουσία των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), τα οδηγούν στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους [132,243], ακολουθώντας την οστεογενετική διαδικασία με στόχο τον σχηματισμό ώριμου οστού μέσω της παρουσίας των διαφοροποιημένων οστεοβλαστών [132,243].

Ο ρόλος του περιόστεου στην πώρωση του οστού ύστερα από κάταγμα ή οστεοτομία είναι σημαντικός. Ο σχηματισμός του «πώρου-κάλου» (callus) κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης ύστερα από κάταγμα είναι αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης διαφόρων κυτταρικών τύπων (αγγειοβλάστες, ινοβλάστες, χονδροβλάστες, οστεοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα) όπως και παραγόντων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και χημειο-εκλυτικών παραγόντων βοηθούν και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του περιόστεου [4,6].

Πρωταρχικό ρόλο σε όλη αυτή τη διαδικασία διαδραματίζουν οι BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9) που επιδρούν στα προγονικά κύτταρα και επάγουν διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες και χονδροβλάστες. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως παράγοντες κυτταρικών σημάτων και χαρακτηριστικά οι BMPs παίζουν ένα κριτικό ρόλο στην διέγερση των κυττάρων για οστική παραγωγή και επούλωση. Με την σύνδεσή τους στους επιφανειακούς υποδοχείς των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενεργοποιούν ένα καταρράκτη σημάτων προς τον πυρήνα αυτών των κυττάρων. Η δραστηριότητα των γονιδίων εκφράζεται με την παραγωγή μακρομορίων που ενέχονται στην αποκατάσταση βλαβών οστού και χόνδρου και τα μεσεγχυματικά κύτταρα ακολούθως θα διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα ή οστεοβλάστες. Οι BMPs έχουν μερίδιο δράσης, μαζί με μια σειρά από άλλα μέλη της υπερικογένειας TGF-β, στην ομοιοστασία των οστών, ενώ η δράση τους φαίνεται

να είναι ανώτερη και πολύ εξειδικευμένη [101,132]. Οι επιστήμονες προσπάθησαν να κατηγοριοποιήσουν την οστεοεπαγωγική δραστηριότητα των BMPs στα μεσεγχυματικά προγονικά και οστεοβλαστικά κύτταρα μετρώντας την επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης και της οστεοκαλσίνης, μορίων που χαρακτηρίζουν την διαδικασία της οστεογένεσης. Έδειξαν ότι οι BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 είναι υπεύθυνες για την αύξηση είτε της αλκαλικής φωσφατάσης ή της οστεοκαλσίνης σε πολυδύναμα ή προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών. Ο Cheng και οι συνεργάτες του [132] έχουν αναφέρει ότι σε καλλιέργειες κυττάρων με ανασυνδυασμένες ανθρώπινες BMPs (rhBMPs) παρατηρήθηκε ένα οστεογενετικό ιεραρχικό μοντέλο όπου η BMP-2 και η BMP-6 μπορεί να αποτελούν δύο από τους πιο ισχυρούς παράγοντες για την επαγωγή της οστεοβλαστικής σειράς μέσω της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ οι περισσότερες BMPs μπορούν να προάγουν αποτελεσματικά την τελική διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων.

Αν και πολλοί παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί στη διατήρηση, αύξηση και επιδιόρθωση των οστών, οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του ρόλου τους σε πειραματόζωα και όχι σε ανθρώπους [26]. Σχεδόν κάθε οστό του ανθρώπινου σώματος περιβάλλεται από το περιόστεο. Ο ρόλος και η δράση του όμως δεν είναι πλήρως κατανοητά σε μοριακό επίπεδο και το ίδιο αποτελεί αντικείμενο διαμάχης και αμφισβήτησης για τους ερευνητές. Παρά την σημαντικότητά του, δεν έχει λάβει την απαιτούμενη προσοχή από τους επιστήμονες σύμφωνα με την παγκόσμια βιβλιογραφία.

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης τεσσάρων βασικών μελών της οικογένειας των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), τα γονίδια BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 του ανθρώπινου περιόστεου που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων καθώς και των οστεοπρογονικών κυττάρων του περιοστέου σε οστεοβλάστες και άρα στη δημιουργία οστίτη ιστού. Η έκφραση των γονιδίων ελέγχθηκε σε φυσιολογικά δείγματα περιοστέου (που ελήφθησαν από φυσιολογικά οστά κατά τη διάρκεια ορθοπαιδικών επεμβάσεων αποκατάστασης) και σε δείγματα περιοστέου που προήλθαν από κατάγματα, τόσο από την εστία του κατάγματος όσο και απομακρυσμένα από την εστία του κατάγματος. Αναλύθηκε η έκφραση των

γονιδίων ανάλογα με τον χρόνο και τις συνθήκες έκφρασής τους και σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά των ασθενών (π.χ. φύλο, ηλικία) και αυτών καθ' αυτών των δειγμάτων (π.χ. περιοχή λήψης δείγματος), με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και στατιστικών αναλύσεων που μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια την σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της γονιδιακής έκφρασης ώστε να οδηγηθούμε σε ασφαλή και αξιόπιστα συμπεράσματα.

### **B3.2 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των περισοτικών BMPs στα φυσιολογικά δείγματα και τα κατάγματα**

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων της έκφρασης των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 γονιδίων στα ανθρώπινα περισοτικά κύτταρα τόσο σε δείγματα που ήταν φυσιολογικά όσο και σε δείγματα που προέρχονταν από κάταγμα. Η υποκατηγοριοποίηση ανέδειξε τον διαχωρισμό τόσο των φυσιολογικών δειγμάτων όσο και των καταγματικών σε ενήλικες και παιδιά. Επιπλέον, ο πληθυσμός των καταγμάτων διαιρέθηκε σε έξι κατηγορίες ανάλογα με την ημέρα συλλογής του περισοτικού δείγματος. Αυτές διαμορφώθηκαν σε κατάγματα 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup>, 3<sup>ης</sup>, 4<sup>ης</sup>-10<sup>ης</sup>, 11<sup>ης</sup>-30<sup>ης</sup> ημέρας, ενός έως τεσσάρων μηνών και 5 μηνών και έπειτα. Επιπροσθέτως μελετήθηκαν 14 δείγματα (από κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας) τα οποία συλλέχθηκαν από απόσταση περίπου 2-3 εκατοστών από την εστία του κατάγματος, και αναλύθηκε η έκφρασή τους σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα εστίας του ίδιου ασθενούς.

Αρχικά, το σύνολο των αποτελεσμάτων και στατιστικών αναλύσεων έδειξαν μια συγκεκριμένη γονιδιακή έκφραση των BMPs σε όλες τις κατηγορίες των δειγμάτων που προέκυψαν. Παρατηρήθηκε λοιπόν, μια ιεραρχία της γονιδιακής έκφρασης των τεσσάρων μελετώμενων BMPs. Η υψηλότερη ήταν αυτή της BMP-2 ακολουθούμενη από αυτή της BMP-6. Τρίτη σε έκφραση παρουσιάστηκε η BMP-4 ενώ την χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία γονίδια εμφάνισε το γονίδιο της BMP-7. Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση του συνόλου των περισοτικών δειγμάτων μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων χαρακτηρίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Συγκρίνοντας τα *φυσιολογικά δείγματα*

με τα κατάγματα οι εκτιμώμενες διαφορές ήταν σε πολλές περιπτώσεις σημαντικές όπου: α) σε όλες τις BMPs η έκφραση στα φυσιολογικά δείγματα ήταν υψηλότερη από τα κατάγματα και διέφεραν σημαντικά για τα γονίδια BMP-4 και BMP-7, β) στα φυσιολογικά δείγματα, οι τιμές των BMPs διέφεραν όλες μεταξύ τους, εκτός από την BMP-4 με την BMP-6 και γ) στα κατάγματα, όλες οι διαφορές των BMPs ήταν σημαντικές. Τα παραπάνω πρωταρχικά αποτελέσματα συνάδουν με έρευνες που έχουν δείξει ότι δεν διαθέτουν όλες οι μορφογενετικές πρωτεΐνες ίδιου βαθμού οστεοεπαγωγική δράση [132]. Οι BMP-2 και BMP-6 θεωρούνται ισχυρότεροι οστεοεπαγωγικοί παράγοντες και αναλαμβάνουν δράση αρχικά σε αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα στρέφοντάς τα σε οστεοπρογονικά κύτταρα, ενώ ακολούθως οι BMP-4 και BMP-7 έρχονται να συνδράμουν με τις προαναφερθείσες BMPs επάγοντας περαιτέρω την οστεοποιητική διαδικασία, μέσω της διαφοροποίησης των οστεοπρογονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες [132].

Όταν το σύνολο των δειγμάτων χωρίστηκε σε παιδιά και ενήλικες, παρατηρήθηκαν τα εξής: α) οι 3 από τις 4 BMPs (BMP-2, BMP-4 και BMP-7), παρουσίασαν υψηλότερη γονιδιακή έκφραση στα παιδιά απ' ότι στους ενήλικες, ενώ για την BMP-6 υπήρχε παρόμοια έκφραση, β) μεταξύ παιδιών και ενηλίκων οι τιμές διέφεραν σημαντικά μόνο για τη BMP-7, γ) στα παιδιά οι τιμές των BMPs διέφεραν σημαντικά όλες μεταξύ τους εκτός από την BMP-4 με την BMP-6 (BMP-2 > BMP-4 = BMP-6 > BMP-7), δ) στους ενήλικες όλες οι διαφορές των BMPs ήταν σημαντικές (BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7).

Επιπλέον, όταν οι συγκρίσεις αφορούσαν την έκφραση των τεσσάρων BMPs ανά ηλικιακή ομάδα (παιδιά – ενήλικες), αλλά και κατάσταση (φυσιολογική – κάταγμα), δεν άλλαξαν στατιστικά οι διαφορές στα φυσιολογικά δείγματα και στα κατάγματα, όπου παρέμεινε το ίδιο πρότυπο έκφρασης μεταξύ παιδιών και ενηλίκων. Από την άλλη όμως, στα κατάγματα παρατηρήθηκε μείωση της διαφοράς της έκφρασης όλων των γονιδίων μεταξύ παιδιών και ενηλίκων. Τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες οι περισσότερες διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων ήταν σημαντικές (εκτός από την BMP-6 στους ενήλικες και την BMP-7 στα παιδιά, όπου και πάλι όμως η διαφορά της έκφρασης ήταν μεγάλη με υψηλότερη έκφραση αυτή των φυσιολογικών δειγμάτων. Έτσι, φαίνεται πως το γεγονός του οστικού τραυματισμού επιδρά, πιθανά, στην γονιδιακή έκφραση των

περιστικών BMPs ανεξαρτήτως ηλικιακής κατανομής όσον αφορά παιδιά και ενήλικες. Καμία από τις παραπάνω κατηγοριοποιήσεις δεν παρέκκλιε από την ιεραρχία στην γονιδιακή έκφραση των BMPs όπως σημειώθηκε αρχικά.

Ολοκληρώνοντας την ανάλυση όσον αφορά το σύνολο των δειγμάτων που συγκεντρώθηκαν και μελετήθηκαν, ελέγχθηκε η έκφραση των ανθρώπινων περιστικών BMPs για διαφορές μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καταγμάτων 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup>-10<sup>ης</sup> ημέρας. Η ομαδοποίηση των καταγμάτων της 2<sup>ης</sup> έως και 10<sup>ης</sup> μέρας έγινε με κριτήριο το πλήθος των δειγμάτων (ανά ημέρα ήταν μικρό το δείγμα) ούτως ώστε να υπάρχουν όσο το δυνατόν πιο έγκυρα στατιστικά δεδομένα για το μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων. Επίσης, δεν ήταν άτοπη η ομαδοποίηση μιας και βιβλιογραφικά οι πρώτες μέρες της επουλωτικής διαδικασίας ενός κατάγματος αναφέρονται στην ίδια περίοδο, αυτή της φάσης της φλεγμονώδους αντίδρασης. Επίσης, η συνένωση της 1<sup>ης</sup> ημέρας με την ομάδα «2<sup>η</sup> – 10<sup>η</sup>», όπως και ο διαχωρισμός της 2<sup>ης</sup> ημέρας από την προαναφερθείσα ομάδα, έδειξαν σε περαιτέρω αναλύσεις ότι δεν οδηγούν σε σημαντικές διαφορές. Θεωρήθηκε λοιπόν σωστό να εξεταστεί αυτοτελώς η 1<sup>η</sup> ημέρα των καταγμάτων αφενός επειδή είχε μεγάλο αριθμό δειγμάτων (καλύτερη στατιστική ανάλυση), αφετέρου διότι κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα ειδικά, μετά από ένα κάταγμα, δημιουργείται στην τραυματισμένη περιοχή οίδημα-αιμάτωμα ενώ σταδιακά προάγεται και η φλεγμονώδης αντίδραση.

Η ιεραρχία της γονιδιακής έκφρασης των BMPs (BMP-2 > BMP-6 > BMP-4 > BMP-7) παρέμεινε σε όλες τις ομάδες. Ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα μόνο η σύγκριση της έκφρασης της BMP-2 με την BMP-6 δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αναλόγως, και στα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας, αντιθέτως, στα κατάγματα 2<sup>ης</sup> -10<sup>ης</sup> ημέρας όλες οι συγκρίσεις μεταξύ της έκφρασης των BMPs ήταν στατιστικά σημαντικές. Η έκφραση των ελεγμένων γονιδίων δεν απόκλιε από τις διαφορές που αρχικά παρατηρήθηκαν μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων. Η ουσιώδης ωστόσο παρατήρηση έγκειται στο γεγονός ότι ανάμεσα στα κατάγματα 1<sup>ης</sup> ημέρας και αυτά της 2<sup>ης</sup> - 10<sup>ης</sup> δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (πλην της BMP-7), τόσο σε επίπεδο σημαντικότητας όσο και ύψους γονιδιακής έκφρασης (μέσες τιμές). Επιπλέον παρουσιάζεται ένα plateau έκφρασης κατά την διάρκεια των πρώτων 10 ημερών έπειτα από κάταγμα. Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύεται και από το γεγονός πως όταν παρατηρήσουμε μεμονωμένα το ύψος της έκφρασης κάθε

BMP ανά ημέρα έως και την 10<sup>η</sup> ημέρα, φαίνεται ότι η γονιδιακή έκφραση κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα. Επιπλέον, αν και ο αριθμός δειγμάτων μετά την πάροδο των πρώτων 10 ημερών από το κατάγμα είναι περιορισμένος σχετικά με το πλήθος δειγμάτων που συγκεντρώθηκε την πρώτη περίοδο, παρατηρήθηκε παρόμοια έκφραση που έφτανε μέχρι και την 30<sup>η</sup> ημέρα μετά το κατάγμα. Έντονο ενδιαφέρον όμως προκύπτει από την απότομη και μεγάλη αύξηση στην έκφραση των BMPs μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα και επαναφορά αυτής περίπου στα επίπεδα των φυσιολογικών δειγμάτων, μερικές φορές ακόμη και μεγαλύτερη. Μπορεί ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων μετά από την 30<sup>η</sup> ημέρα του κατάγματος να είναι μικρός και να περιορίζει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, η κοινή αύξηση όμως που παρατηρείται στο σύνολο των BMPs που ελέγχθηκαν, αποτελεί τουλάχιστον ένδειξη για την αυξητική τάση των επιπέδων mRNA των περισσοτέρων BMPs κατά την επουλωτική διαδικασία με την πάροδο του χρόνου.

Τα πολύ υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της BMP-2 σε σχέση με τις υπόλοιπες BMPs στου ανθρώπινου περιostέου στο σύνολο των υποκατηγοριών που μελετήθηκαν, τόσο σε φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα, δείχνει τον πρωταγωνιστικό και πρώιμο ρόλο της BMP-2 στην οστεογενετική σειρά [101,102,132]. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της BMP-6, αν και παρουσιάστηκαν χαμηλότερα από αυτά της BMP-2, ήταν επίσης υψηλά, ειδικά σε σχέση με αυτά της BMP-4 και BMP-7. Ωστόσο, η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκε στις BMP-2, BMP-4 και BMP-7 στην ομάδα καταγμάτων σε σύγκριση με την φυσιολογική ομάδα δεν παρατηρήθηκε σε τέτοιο βαθμό στην έκφραση της BMP-6. Τα παρόμοια επίπεδα mRNA της BMP-6 μεταξύ φυσιολογικών και καταγματικών δειγμάτων υποδεικνύουν τον δυνητικό ρόλο της BMP-6 στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών-οστεοπρογονικών κυττάρων του ανθρώπινου περιostέου. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα [141] ότι η BMP-6 εμφανίζεται ως η πιο σημαντικά και έντονα ενεργοποιημένη BMP κατά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, όπως και κατά την επουλωτική διαδικασία του κατάγματος, ειδικά σε σχέση με την BMP-7, με την οποία η BMP-6 είναι γονιδιακά το πιο στενό μέλος της οικογένειας των BMPs. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση της BMP-4 παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα σε κάθε υποομάδα. Όπως είναι γνωστό, τα επίπεδα του mRNA της BMP-4 είναι εξαρτώμενα από την γενικότερη έκφραση των BMPs τοπικά. Η

παροδική αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της BMP-4 μπορεί να είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε λειτουργικούς οστεοβλάστες, ενώ η καταστολή της δείχνει την παρουσία ενός τοπικού ελεγκτικού μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης [142]. Έτσι, όπως φαίνεται στη μελέτη μας, η χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου της BMP-4 θα μπορούσε να είναι αναμενόμενη από τη στιγμή που τα επίπεδα του mRNA της BMP-2 ήταν πολύ υψηλά. Επιπλέον, οι πολύ χαμηλές τιμές της γονιδιακής έκφρασης της BMP-7 που εντοπίστηκαν στη μελέτη μας, σε αντίθεση με το γνωστό ρόλο της BMP-7 στην αναγέννηση των οστών και στην ομοίωση, δείχνουν ότι κατά τα πρώτα στάδια της οστεογενετικής σειράς, η γονιδιακή έκφραση της BMP-7 είναι σε καταστολή [126,132,213]. Την αναγνωρισμένη δράση της, η BMP-7 την θυμίζει όταν παρατηρούμε την αύξησή της μετά την 30<sup>η</sup> μέρα κατάγματος σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά δείγματα, και πλέον η έκφρασή της είναι ισοδύναμη με αυτή της BMP-4. Από την άλλη όμως, ερευνητές έχουν δείξει ότι η έκφραση της BMP-7, όταν υπάρχει διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αλλά η παρουσία και η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου δεν είναι πάντα απαραίτητη για τη συνέχιση της διαδικασίας της επούλωσης [135].

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των ωρών από το κάταγμα και της έκφρασης των γονιδίων των BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 για τις 2 πρώτες ημέρες μετά από ένα οστικό τραυματισμό. Όσον αφορά τις δύο πρώτες ημέρες των καταγμάτων παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο για την έκφραση του γονιδίου BMP-7, η οποία είναι θετική, γεγονός που σημαίνει ότι οι τιμές της έκφρασης της BMP-7 μεγαλώνουν όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος καταγραφής, όμως η συσχέτιση είναι ασθενής. Επίσης συγκρίνοντας τις τιμές των BMPs στις δύο πρώτες ημέρες φαίνεται ότι μόνο για τη BMP-7 παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μεγαλύτερες μάλιστα είναι οι τιμές που καταγράφονται τη 2<sup>η</sup> ημέρα. Φαίνεται λοιπόν ότι παρά την μικρή έκφραση στο περίοστεο, το γονίδιο της BMP-7 είναι πιο ενεργό συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια που ελέγχθηκαν κατά την 2<sup>η</sup> ημέρα μετά από ένα κάταγμα, και αυτά τα ευρήματα μπορούν να συνδυαστούν με την σημαντική αύξηση που σημειώνεται στο γονίδιο μετά το πέρας της 30<sup>ης</sup> ημέρας ενός κατάγματος, αναλογικά πάντα με την δική του αρχική έκφραση. Επιπλέον, η γονιδιακή έκφραση των δειγμάτων σε



απόσταση από την εστία του κατάγματος, αν και υψηλότερη από αυτή των δειγμάτων εστίας, δεν έφτασε τα επίπεδα των φυσιολογικών δειγμάτων σε καμία περίπτωση. Άρα, μπορεί να θεωρηθεί πως το τραυματισμένο οστό επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση του περιosteού όχι μόνο στο σημείο τραυματισμού αλλά φαίνεται να επιδρά στην ευρύτερη περιοχή αυτού. Το μικρό δείγμα που αναλύθηκε περιορίζει τα ασφαλή συμπεράσματα αλλά σαφώς παρουσιάζει ενδείξεις για το ότι επηρεάζεται όλη η περιοχή τοπικά, σε μοριακό επίπεδο.

Πρόσθετη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των ανθρώπινων περιosteικών BMPs έγινε με βάση τα χαρακτηριστικά των ασθενών ούτως ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση που μπορεί να έχουν στη διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Οι κύριες συνθήκες που μελετήθηκαν αφορούσαν το κάπνισμα, το φύλο, την ηλικία, τη μηχανική φόρτιση (άνω ή κάτω άκρο), το μέγεθος του οστού από όπου προερχόταν το δείγμα, τον δείκτη μάζας σώματος και άλλες συσχετίσεις.

### **B3.3 Επίδραση του καπνίσματος στην γονιδιακή έκφραση των περιosteικών BMPs**

Διάφορες μελέτες έχουν δώσει προκαταρκτικά στοιχεία μιας συσχέτισης ανάμεσα στο κάπνισμα και την καθυστερημένη πώρωση, την μη πώρωση (ψευδάρθρωση), την λοίμωξη, την οστεομυελίτιδα, και την σχέση του καπνίσματος με ένα πιθανό κάταγμα. Οι γιατροί ανά τον κόσμο υποθέτουν ότι το κάπνισμα επηρεάζει τη φυσιολογία των οστών, δεδομένου ότι οδηγεί σε αγγειοσυστολή και στερεί τα οστά από την παροχή αίματος που είναι ζωτικής σημασίας για την ομοίωσή του. Οι περισσότερες από τις μελέτες σχετικά με την επίδραση του καπνίσματος στην οστική μάζα και την πώρωση των καταγμάτων παρέχουν αποδείξεις αυτής της αρνητικής συσχέτισης [206-208]. Επιπλέον, οι ερευνητές, θεωρώντας τη νικοτίνη ως το πιο σημαντικό συστατικό στα προϊόντα των τσιγάρων έχουν εκπονήσει αρκετές μελέτες προσπαθώντας να εκτιμήσουν την επίδραση της νικοτίνης στην πώρωση των καταγμάτων και την αναγέννηση τους, σε μοριακό επίπεδο. Σε ζωικά μοντέλα, έχει αποδειχθεί ότι η νικοτίνη αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την οστεογενετική δραστηριότητα (BMPs, TGF-

beta, ALP, PDGF, VEGF, RANKL, OPG), ειδικά όταν παρέχονται σε υψηλές δόσεις [209-212].

Οι BMPs, φαίνεται να διαφοροποιούν την έκφρασή τους όσον αφορά το κάπνισμα. Αρκετές μελέτες για την επίδραση του καπνίσματος και των τοξικών ουσιών του καπνού των τσιγάρων σε BMPs σε ζώα, έδειξαν μείωση στις περισσότερες περιπτώσεις της έκφρασης των γονιδίων τους. Ο Ma και οι συνεργάτες του [209] επεσήμαναν τον μηχανισμό με τον οποίο θα μπορούσε να επιδράσει η νικοτίνη στον σχηματισμό των οστών και στην αναδιαμόρφωσή τους επηρεάζοντας την έκφραση των οστεογενετικών και αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου και της BMP-2. Ο Giorgetti και οι συνεργάτες του [212] έδειξαν ότι υψηλότερα επίπεδα mRNA της BMP-2 διατηρήθηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην ομάδα ελέγχου, ενώ το κάπνισμα οδήγησε σε μια απότομη μείωση κατά την 10<sup>η</sup> ημέρα. Ωστόσο, στην ίδια μελέτη, η έκφραση της BMP-7 φαίνεται να έχει παρόμοια πορεία και στις δύο ομάδες ελέγχου και σύμφωνα με τους συγγραφείς τα υψηλότερα επίπεδα της BMP-7 θα μπορούσαν να υποδεικνύουν μια απόκριση στην απότομη μείωση της γονιδιακής έκφρασης της BMP-2, ώστε να διατηρηθεί η διαδικασία σχηματισμού των οστών, η οποία φέρεται να περιορίζεται αντί να διακόπτεται. Επίσης, ο Theiss [213] και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η νικοτίνη καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση των BMP-2, BMP-4 και BMP-6, ενώ ο Zheng [214] και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η νικοτίνη μείωσε σημαντικά την γονιδιακή έκφραση της BMP-2 στα οστεοβλαστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ενεργού οστικής αναγέννησης σε κουνέλια.

Στην παρούσα διατριβή δόθηκε έμφαση στην επίδραση του καπνίσματος στην έκφραση των γονιδίων με οστεογενετική δράση στα ανθρώπινα περισοτικά δείγματα. Έτσι, κατηγοριοποιήθηκαν όλα τα δείγματα μας σε καπνιστές και μη καπνιστές στα δείγματα ενηλίκων, ανεξάρτητα από την ύπαρξη κατάγματος. Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα mRNA των BMPs των καπνιστών ήταν χαμηλότερα από εκείνα των μη καπνιστών. Οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές για τις BMP-2, BMP-4 και BMP-6, ενώ για την BMP-7 η τιμή είχε οριακή στατιστική σημαντικότητα. Όταν όμως τα δείγματα μας κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω σε φυσιολογικά και κατάγματα η στατιστική σημαντικότητα άλλαξε για τα γονίδια μέσα στις υποομάδες. Γενικότερα διαπιστώθηκε μία τάση υψηλότερης έκφρασης,

αυτή των φυσιολογικών δειγμάτων στους μη καπνιστές, σε όλα ανεξαιρέτως τα γονίδια να εμφανίζει σημαντική διαφορά με όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες και κυρίως με τους μη καπνιστές και καπνιστές των καταγμάτων των πρώτων ημερών. Φαίνεται εκ πρώτης ότι από τη μια υπάρχει διαφορά μεταξύ καπνιστών και μη, αλλά από την άλλη το φαινόμενο του κατάγματος να υπερκαλύπτει την πιθανή επίδραση του καπνίσματος. Παρατηρώντας όμως πιο προσεκτικά στις υποκατηγορίες των φυσιολογικών δειγμάτων και καταγμάτων η πλειοψηφία της γονιδιακής έκφρασης των BMPs μειώθηκε, σε μερικές περιπτώσεις ακόμη και πάνω από 2 φορές (BMP-7), σε όλα τα δείγματα μας στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές, εκτός από την γονιδιακή έκφραση της BMP-4 στα κατάγματα όπου η έκφραση ήταν παρόμοια. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η μείωση αυτή παρατηρήθηκε κυρίως στην έκφραση των γονιδίων των δύο πιο οστεοεπαγωγικών BMPs, την BMP-2 και την BMP-6, τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα. Ειδικότερα, τα επίπεδα mRNA της BMP-2 μειώθηκαν σχεδόν κατά το ένα τέταρτο στην ομάδα των καπνιστών για τα φυσιολογικά δείγματα, και αυτή η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική. Τα επίπεδα του mRNA της BMP-6 μειώθηκαν ελαφρώς λιγότερο από το ήμισυ τόσο στα κατάγματα όσο και στα φυσιολογικά δείγματα με τη διαφορά της έκφρασης στα τελευταία να είναι σημαντική. Η μείωση της έκφρασης των γονιδίων, ιδιαίτερα εκείνων της BMP-2, BMP-6 και BMP-7, στα περισοτικά κύτταρα των καπνιστών συγκριτικά με τους μη καπνιστές, ειδικά στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων, αλλά και η γενικότερη μείωση της έκφρασης των καπνιστών στο σύνολο των υποομάδων, δείχνει τη συσχέτιση του καπνίσματος με τη μείωση των mRNA μεταγράφων των περισοτικών BMPs.

### **B3.4 Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των περισοτικών BMPs με το φύλο**

Οι φυλογενετικές ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα) έχουν αντίκτυπο όχι μόνο στην φυλογενετική διαφοροποίηση, ωρίμανση και αναπαραγωγή του ανθρώπου αλλά διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στην ομοιοστασία και ανάπτυξη του σκελετού. Μέσω των αλληλεπιδράσεων με τα οστεογενετικά μονοπάτια προσθέτουν οστό αυξάνοντάς το (σε όγκο και σε μήκος) κατά την εφηβεία και στη συνέχεια διατηρούν την ακεραιότητα του σκελετού, τόσο στους

άνδρες όσο και στις γυναίκες. Οι άνδρες επιτυγχάνουν υψηλότερη οστική μάζα, μεγαλύτερο μέγεθος οστών και τελικά έναν ισχυρότερο αλλά όχι πυκνότερο σκελετό σε σχέση με τις γυναίκες. Στην πραγματικότητα, οι άρρενες αναπτύσσουν μεγαλύτερη επιφάνεια περισσέου απ' ότι οι γυναίκες από τη μέση φάση της εφηβείας. Όμως αν και οι γυναίκες έχουν μικρότερη επιφάνεια περισσέου έχουν μεγαλύτερη εναπόθεση φλοιώδους οστού γεγονός που αναδεικνύει την επίδραση των φυλογενετικών ορμονών [168-171].

Μέσω της υποκατηγοριοποίησης των δειγμάτων της παρούσας διατριβής σε άνδρες και γυναίκες, προσπαθήσαμε να εξετάσουμε τον ενδεχόμενο ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει η διαφορά του φύλου στην γονιδιακή έκφραση των ανθρώπινων περισστικών BMPs. Έτσι λοιπόν στο σύνολο των ενηλίκων δειγμάτων παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους άνδρες και τις γυναίκες, με κυρίαρχη την έκφραση των γυναικών. Πιο συγκεκριμένα οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές για την BMP-2, την BMP-4 και την BMP-6 ενώ για την BMP-7 η τιμή ήταν οριακή. Το παράδοξο όμως με την συγκεκριμένη κατηγορία έγκειται στο γεγονός πως όταν κατηγοριοποιούμε το πλήθος περαιτέρω, σε φυσιολογικά δείγματα και κατάγματα αλλάζουν οι διαφορές, όχι όμως σε όλες τις BMPs. Τουτέστιν, δεν υπάρχουν πλέον στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με την κατάσταση του οστού και ανεξαρτήτως φύλου, για την BMP-2, την BMP-6 και την BMP-7. Συνεπώς το αποτέλεσμα ότι οι άνδρες διαφέρουν από τις γυναίκες παύει να ισχύει αν τα δύο φύλα εξεταστούν λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση του οστού. Από τη άλλη βέβαια, η γονιδιακή έκφραση παραμένει υψηλότερη στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα για όλες τις BMPs. Όσον αφορά επίσης την επίδραση του κατάγματος στην γονιδιακή έκφραση σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές είτε στους άνδρες είτε στις γυναίκες με πιο αυξημένες πάντα τις τιμές των φυσιολογικών δειγμάτων. Εξάιρεση αποτέλεσε η BMP-4 και για τα δύο φύλα, ενώ η BMP-7 έδειξε σημαντική διαφορά για τις γυναίκες στη σύγκρισή τους μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και καταγμάτων. Η ανάλυση που έγινε στα παιδιά διακρίνοντας τα σε αγόρια και κορίτσια δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η γονιδιακή έκφραση των περισστικών BMPs δεν διαμορφώθηκε ανάλογα με αυτή των ενηλίκων. Στα παιδιά, τα κορίτσια παρουσίασαν υψηλότερη

έκφραση στην BMP-2 και την BMP-6, ενώ η BMP-4 και BMP-7 έδειξαν μεγαλύτερη έκφραση στα αγόρια.

Παραδοσιακά, οι διαφορές στον περιοστικό σχηματισμό των οστών μεταξύ ανδρών και γυναικών έχει υποτεθεί ότι αντανakλούν δύο διαφορετικές επιδράσεις από το ενδοκρινικό σύστημα: ανδρογόνα διεγείρουν το περίοστεο για το σχηματισμό και επέκταση του οστού στους άνδρες και οιστρογόνα επάγουν ανασταλτικούς παράγοντες στην αύξηση και επέκταση του οστού από το περίοστεο στις γυναίκες [168-171]. Θα ήταν λοιπόν αναμενόμενο να υπάρχει στους άνδρες μεγαλύτερη περιοστική εναπόθεση/επέκταση στα οστά σε σχέση με τις γυναίκες καθώς είναι πιο εκτεθειμένοι σε ενδογενή ανδρογόνα και όχι σε οιστρογόνα. Ωστόσο, φαίνεται ότι και στα δύο φύλα ο τρόπος λειτουργίας του περιοστέου να καθορίζεται σημαντικά από τις φυλογενετικές ορμόνες και άλλες κυτταρικές διαδικασίες [172-174]. Στην δική μας μελέτη, όσον αφορά την διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών στην γονιδιακή έκφραση των περιοστικών BMPs δείξαμε κατά κόρον ότι η έκφραση στις γυναίκες ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των ανδρών με σημαντικές τις διαφορές σε μερικές συγκρίσεις τους. Φαίνεται λοιπόν ότι άσχετα με την μεγαλύτερη και υποτιθέμενη περιοστική εναπόθεση στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες, η υψηλότερη έκφραση περιοστικών BMPs δεν αντανakλάται σε μοριακό επίπεδο στους άνδρες.

### **B3.5 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των BMPs του περιοστέου σε σχέση με την ηλικία**

Η ηλικία είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δομή και λειτουργία του περιοστέου. Μερικές σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές στο περίοστεο έχουν αναφερθεί, συμπεριλαμβάνοντας την μείωση του αριθμού των ινοβλαστών του περιοστέου και την μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών [178,179]. Ανάλογα με τις θέσεις του σχηματισμού των οστών ή της απορρόφησης, το περίοστεο δείχνει αντίστοιχες διαρθρωτικές αλλαγές με τη γήρανση [178,182]. Παρόλα αυτά, οι λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την ηλικία του περιοστέου και τη συσχέτιση αυτού με τις διαρθρωτικές και κυτταρικές αλλαγές σε διαφορετικές οστικές περιοχές είναι ακόμα ασαφείς [183]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η

χονδρογενετική δυνατότητα του περιostίου είναι ποιοτικά και ποσοτικά κατώτερη σε ώριμα και μεγαλύτερα κουνέλια από ό, τι σε ανώριμα και νεαρά. Αυτό σχετίζεται με την παρατήρηση ότι η βιολογική δραστηριότητα του περιostίου μειώνεται με την ηλικία μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του σκελετού [180].

Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκε ο τρόπος έκφρασης των γονιδίων των BMPs σε περιostικά δείγματα ανάλογα με την ηλικία. Ο πρώτος μεγάλος διαχωρισμός του πλήθους των δειγμάτων αφορούσε το σύνολο των παιδιών συγκρινόμενο με το σύνολο των ενηλίκων ανεξαρτήτως εάν είχαν χαρακτηριστεί ως φυσιολογικά δείγματα ή κατάγματα. Η γονιδιακή έκφραση ήταν υψηλότερη στα παιδιά για την BMP-2, την BMP-4 και την BMP-7, ενώ μεγαλύτερη για τους ενήλικες ήταν η έκφραση της BMP-6. Για την BMP-6 και BMP-7 στην σύγκριση μεταξύ παιδιών και ενηλίκων παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά. Όταν οι συγκρίσεις αφορούσαν την έκφραση των τεσσάρων BMPs ανά ηλικιακή ομάδα (παιδιά – ενήλικες) και κατάσταση (φυσιολογική – κάταγμα) φαίνεται ότι δεν άλλαξαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Εν μέρει λοιπόν μπορεί να διατυπωθεί η άποψη και σε γονιδιακό επίπεδο πως το περίostιο των παιδιών είναι πιο ισχυρό, πιο ανθεκτικό και ενεργά μεταβολικό σε σχέση με των ενηλίκων καθώς εκφράζει σε μεγαλύτερο βαθμό τις περιostικές BMPs.

Δευτερευόντως, το σύνολο του ενήλικου πλήθους χωρίστηκε σε δύο ηλικιακές κατηγορίες, των ενηλίκων έως 49 ετών, και των ενηλίκων άνω των 50 ετών. Χωρίς να παρατηρείται κάποια στατιστική διαφορά, η γονιδιακή έκφραση των πιο ηλικιωμένων ανθρώπων υπερέτρησε των νεότερων στις BMP-2, BMP-4 και BMP-6. Όταν ταξινομήθηκαν και με βάση την κατάσταση φυσιολογικό – κάταγμα, σε όλα τα φυσιολογικά δείγματα υπήρχε υψηλότερη γονιδιακή έκφραση των BMPs (χωρίς να είναι σημαντική η διαφορά) στα άτομα άνω των 50 ετών ενώ στα κατάγματα παρατηρήθηκε μειωμένη αντίδραση των ηλικιωμένων σε σχέση με τους νεότερους. Η γονιδιακή έκφραση στα κατάγματα αυξήθηκε στους νεότερους σε ηλικία ασθενείς σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα και εξισορροπήθηκε σε σχέση με την ηλικιακή ομάδα άνω των 50 ετών. Η τελευταία παρατήρηση, με την αντιστροφή της έκφρασης έπειτα από κάταγμα για τους νεότερους σε ηλικία ασθενείς είναι πολύ σημαντική.

Μελέτες έχουν δείξει πως η δράση των BMPs (σε σχέση με την ηλικία και το περίσσειο) δεν επηρεάζεται σημαντικά [188]. Επίσης, έρευνες έδειξαν ότι η απόκριση του περιστέου σε υπο-περιοστική εμφύτευση των BMPs ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία αλλά ο συνολικός όγκος του νεο-σχηματιζόμενου οστού μειώθηκε με την πάροδο της ηλικίας, δείχνοντας πως το ηλικιωμένο περίσσειο διατηρεί ακόμη την οστεογενετική του ικανότητα αλλά σε μικρότερο βαθμό [188]. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες όπου έδειξαν ότι δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας του δότη των BMPs και των επιπέδων έκφρασής τους [190]. Τα αποτελέσματά μας παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση των ανθρώπινων περιοστικών BMPs στους ηλικιωμένους στα φυσιολογικά δείγματα αλλά οι νεότεροι σε ηλικία ενήλικες «αντέδρασαν» στο κάταγμα αυξάνοντας την γονιδιακή έκφραση των BMPs σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι οι ηλικιωμένοι.

### **B3.6 Σχέση της μηχανικής φόρτισης με την γονιδιακή έκφραση των BMPs του περιστέου**

Ένα φυσιολογικό αναπτυσσόμενο σώμα δείχνει ότι τα μηχανικά σήματα διαμορφώνουν την ανάπτυξη και ανακατασκευή των σκελετικών ιστών μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και της διαφοροποίησης των ιστών. Μελέτες έδειξαν τη σημασία των μηχανικών σημάτων/φορτίσεων κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης των οστών και της επουλωτικής διαδικασίας [191]. Ειδικότερα, η επούλωση του οστού παρέχει ένα εξαιρετικό *in vivo* σύστημα για τη διερεύνηση των κυτταρικών αποκρίσεων στα μηχανικά ερεθίσματα, διότι ένα βασικό στοιχείο αυτής της διαδικασίας είναι η στρατολόγηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSC). Μία τάξη διέγερσης που επηρεάζει τη μοίρα των MSC είναι η μηχανική φόρτιση [192-196]. Ο διεγερτικός ρόλος της μηχανικής φόρτισης και της σωματικής δραστηριότητας στην αύξηση σε μήκος και διάμετρο στα οστά έχει τεκμηριωθεί σε πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες. Συνολικά, οι μελέτες σε ζώα αναφέρουν ότι η μηχανική φόρτιση επηρεάζει τη μορφολογία των οστών μέσω της αύξησης της δημιουργίας οστού σε μεγαλύτερο βαθμό από την απορρόφηση αυτού [199].

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την προέλευση των ανθρώπινων περιοστικών δειγμάτων για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, αυτά χωρίστηκαν σε δείγματα που προερχόταν από τα άνω άκρα και σε δείγματα από τα κάτω άκρα. Στο σύνολο του ενήλικου πληθυσμού παρατηρήθηκε υψηλότερη γονιδιακή έκφραση στα άνω άκρα για την BMP-2 και την BMP-7 ενώ μεγαλύτερη ήταν η έκφραση στα κάτω άκρα για την BMP-4 και την BMP-6, με την έκφραση της BMP-6 να είναι σημαντική σε σχέση με αυτή των άνω άκρων. Όταν στην σύγκριση των δειγμάτων εισάγαμε και την κατάσταση φυσιολογικό δείγμα και κατάγμα, ποικίλα αποτελέσματα εξήχθησαν. Σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα κατάγματα για τα κάτω άκρα για τις BMP-2, BMP-4 και BMP-7. Η έκφραση της BMP-6 ήταν υψηλότερη στα φυσιολογικά δείγματα αλλά μη σημαντική η διαφορά της με αυτή των καταγμάτων. Ανάλογη σημαντική διαφορά για τα άνω άκρα όμως, μεταξύ φυσιολογικών και καταγμάτων, είχαμε μόνο για την έκφραση της BMP-4. Όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ των άνω και κάτω άκρων, τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στα κατάγματα κυμάνθηκαν σε μη στατιστικά επίπεδα εκτός από τα φυσιολογικά δείγματα της BMP-2 όπου τα κάτω άκρα παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση. Επιπροσθέτως, στη σύγκριση μεταξύ άνω και κάτω άκρων στα παιδιά, υψηλότερη έκφραση εκδηλώθηκε στα άνω άκρα για τις BMP-4 και BMP-6, ενώ παρουσιάστηκε υψηλότερη έκφραση στα κάτω άκρα για την BMP-2 και την BMP-7. Σε γενικές γραμμές, η έκφραση των δειγμάτων της παρούσας μελέτης όσον αφορά στην διαφορά της μηχανικής φόρτισης δίνοντας βαρύτητα στην εντόπιση του άκρου (άνω ή κάτω άκρο) του κάθε δείγματος δεν μας έδωσε σαφή κατεύθυνση και χαρακτήρα της γονιδιακής έκφρασης των περιοστικών BMPs. Γενικά, αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τις σχέσεις μεταξύ μηχανικής διέγερσης και μοριακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης και πώρωσης των καταγμάτων. Κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση στην γονιδιακή έκφραση των BMP-2 και BMP-4 και πολλών άλλων εξωκυττάρων πρωτεϊνών [191]. Επιπροσθέτως, διάφορα γονίδια υπεύθυνα για την χονδρογένεση όπως η BMP-6 έδειξαν πρώιμη αναβολική δραστηριότητα ακολουθούμενη από μείωση της έκφρασής τους [191]. Κατά την διαδικασία πώρωσης των καταγμάτων, λιγότερο σταθερή ακινητοποίηση επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την χονδρογένεση, την κυτταρική διαίρεση και την φλεγμονή. Ωστόσο, η αυξημένη



κίνηση και ατελής σταθεροποίηση μπορεί να μην οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της χονδρογένεσης [191,197].

### **B3.7 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των περιοστικών BMPs ανάλογα με το μέγεθος του οστού δότη του περιοστικού δείγματος**

Βιβλιογραφικά δεν αναφέρεται συσχέτιση του περιεστέου ή των BMPs με το οστό το οποίο μελετάται, ιδιαίτερα με το μέγεθος αυτού, και τον τρόπο που επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση ή άλλα μονοπάτια που άπτονται της μοριακής βιολογίας των οστών. Στην παρούσα διατριβή το πλήθος των δειγμάτων μας επέτρεψε να εστιάσουμε στη γονιδιακή έκφραση των περιοστικών BMPs ανάλογα με το μέγεθος του οστού-δότη κάθε δείγματος. Όπως και στις προηγούμενες αναλύσεις μας, αρχικά αναλύσαμε το σύνολο των δειγμάτων, χωρίζοντάς το σε περιοστικά δείγματα τα οποία προέρχονταν είτε από μικρό είτε από μεγάλο οστό. Έτσι, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στα δείγματα μικρών οστών απ' ότι στην μεγάλων στην BMP-4 (σημαντική διαφορά) και BMP-7. Αντίθετη έκφραση υπήρχε στην BMP-2 όπου τα μεγάλα οστά υπερείχαν έναντι των μικρών, ενώ για το γονίδιο της BMP-6 η έκφραση ήταν παρόμοια. Ελέγχοντας τα δείγματα περαιτέρω και διαχωρίζοντάς τα σε φυσιολογικά και κατάγματα διαπιστώθηκε κάτι σημαντικό. Ανεξαιρέτως, όταν προέκυψε ένα κάταγμα, όλες οι BMPs (πλην της BMP-7, είχε παρόμοια έκφραση αλλά αυξήθηκε αυτή των «μεγάλων») επέδειξαν υψηλότερη γονιδιακή έκφραση στα δείγματα προερχόμενα από μεγαλύτερα οστά σε σχέση με αυτά που προέρχονταν από μικρότερα, με τη διαφορά έκφρασης της BMP-2 να είναι στατιστικά σημαντική. Στα φυσιολογικά δείγματα δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ «μικρών» και «μεγάλων» δειγμάτων. Η μείωση της έκφρασης για τα δείγματα από μικρά οστά διαπιστώνεται και από την χαρακτηριστική μείωση της που παρουσιάζεται στα κατάγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά σε όλες τις BMPs με σημαντικές τις διαφορές για τα γονίδια της BMP-2 και BMP-4. Επιπλέον, εξετάστηκαν και τα δείγματα που προέρχονταν από παιδιά. Τα αποτελέσματα δεν άφησαν περιθώρια για περαιτέρω ερμηνείες. Για όλες τις BMPs διαπιστώθηκε η υψηλότερη γονιδιακή τους έκφραση στα δείγματα προερχόμενα από τα μικρά οστά και όλες οι συγκρίσεις με την έκφραση των

δειγμάτων από τα μεγαλύτερα οστά ήταν στατιστικά σημαντικές. Συνεπώς, μην έχοντας βιβλιογραφικά δεδομένα για την σωστή ερμηνεία ή σύγκριση των αποτελεσμάτων μας όσον αφορά το μέγεθος του οστού και την επίδρασή του στα επίπεδα mRNA των BMPs, μπορούμε απλά να εστιάσουμε στο γεγονός ότι τα μεγαλύτερα οστά «αντιδρούν» σε ένα πιθανό κατάγμα αυξάνοντας την γονιδιακή έκφραση των περισστικών BMPs σε σχέση με τα μικρότερα. Επιπλέον, πιθανότατα λόγω της ιδιαίτερης πάχυνσης του περισστέου στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες, και πόσο μάλλον στα μικρότερα οστά απ' ότι στα μεγαλύτερα, η συγκέντρωση των μοριακών και αυξητικών παραγόντων είναι μεγαλύτερη και πιο συμπυκνωμένη, γεγονός που μπορεί να εξηγεί σε ένα βαθμό τα παραπάνω αποτελέσματά μας.

### **B3.8 Δείκτης μάζας σώματος και συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των περισστικών BMPs**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μηχανική φόρτιση έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη του σκελετού. Παράλληλα το σωματικό βάρος και η εκάστοτε αλλαγή αυτού κατά τη διάρκεια της ζωής μεταβάλλει κάθε φορά την προκύπτουσα μηχανική διέγερση του σκελετού η οποία είναι σημαντική [198]. Δεν υπάρχουν μελέτες που να συνδέουν το σωματικό βάρος και δει τον δείκτη μάζας σώματος με την λειτουργία του περισστέου και την έκφραση γονιδίων του. Αποπειραθήκαμε να μελετήσουμε τις επιπτώσεις που θα μπορούσαν να υπάρξουν στα επίπεδα των mRNA μεταγράφων των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών του περισστέου ανάμεσα σε αδύνατους ανθρώπους, φυσιολογικούς, υπέρβαρους και παχύσαρκους. Στην συγκεκριμένη ανάλυση υπάρχει περιορισμός λόγω του μικρού αριθμού στο σύνολο των αδύνατων. Παρόλα αυτά, όταν μελετήθηκαν τα δείγματα στο σύνολό τους δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε όλα τα γονίδια που ελέγχθηκαν και μάλλον η έκφρασή τους χαρακτηρίζεται παρόμοια. Όταν χωρίστηκαν σε φυσιολογικά δείγματα και κατάγματα διαπιστώθηκε η συνολικά υψηλότερη γονιδιακή έκφραση στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με τα κατάγματα σε όλες τις BMPs, όπου για την BMP-4 η συσχέτιση ήταν σημαντική. Ανάμεσα στις κατηγορίες και πάλι δεν ξεχώρισε η έκφραση κάποιας ομάδας με συγκεκριμένο

δείκτη μάζας σώματος. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το σωματικό βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος επηρεάζει τις σκελετικές δομές και τη διαφοροποίηση των ιστών, κατ' επέκταση και σε μοριακό επίπεδο, θα πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα ώστε να παραχθεί γνώση γύρω από την αντιμετώπιση συγκεκριμένων ομάδων, με συγκεκριμένο δείκτη μάζας σώματος, σε περίπτωση οστικών ανωμαλιών, παθήσεων και καταγμάτων.

### **B3.9 Λοιπές συσχετίσεις της γονιδιακής έκφρασης των BMPs του περιostίου**

Και για τις τέσσερις μετρήσεις έκβασης που αφορούν τα γονίδια περιostίου που ελέγχθηκαν (BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7), πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ακραίων τιμών. Οι έλεγχοι δεν έδειξαν συσχέτιση των τιμών αυτών με συγκεκριμένους τύπους οστών (π.χ. μηρός, κερκίδα) ούτε με κάποια άλλη παράμετρο από αυτές που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, για τις διαφορές μεταξύ μετρήσεων δειγμάτων που συλλέχθηκαν και χωρίστηκαν ανάλογα με το αν προέρχονταν από τα αριστερά άκρα ή από τα δεξιά, οι προκαταρκτικοί έλεγχοι δεν έδειξαν σε καμία μέτρηση πιθανές διαφορές.

### **B3.10 Συμπεράσματα και προτάσεις για επόμενες μελέτες**

Ο ρόλος του περιostίου είναι γνωστός. Υποστηρίζει τον οστίτη ιστό και εξασφαλίζει συνεχή παροχή νέων οστεοβλαστών για την αύξηση, αποκατάσταση και ομοιοστασία του οστού. Επιπλέον, είναι γνωστή η παρουσία στο περιostίο πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων, οστεοπρογονικών κυττάρων και αυξητικών παραγόντων, υπεύθυνων για την δράση του. Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες, BMPs, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο μεταξύ των αυξητικών παραγόντων στην ανάπτυξη των οστών, τον ανασχηματισμό και την επουλωτική διαδικασία.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναλύθηκαν οι ανθρώπινες περιostικές BMPs και συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7. Παρατηρήθηκε ένα ιεραρχικό μοντέλο έκφρασης σε όλες τις συγκρίσεις και

αναλύσεις που εκπονήθηκαν, παρουσιάζοντας την υψηλότερη έκφραση ανάμεσα στα γονίδια για αυτό της BMP-2, αναδεικνύοντας και επιβεβαιώνοντας τον πρωταγωνιστικό και πρώιμο ρόλο που διαδραματίζει στην οστεογενετική σειρά το συγκεκριμένο γονίδιο στο ανθρώπινο περιόστεο. Η δεύτερη σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης BMP-6, διακρίθηκε ανάμεσα στις άλλες BMPs πρωτίστως για την διατήρηση της έκφρασής της στα κατάγματα σε επίπεδο παρόμοιο με τα φυσιολογικά, υποδεικνύοντας τον πρώιμο ρόλο που της έχει αποδοθεί κατά την οστεοεπαγωγική διαδικασία. Τρίτο στην ιεραρχία της έκφρασης αποτέλεσε το γονίδιο της BMP-4, δείχνοντας μάλλον να επηρεάζεται από την υψηλή έκφραση της BMP-2, μιας και έχει αποδειχθεί ότι η BMP-4 έχει συνεργατική δράση με την πιο συγγενική της γονιδιακά BMP-2. Παρόλα αυτά όμως, η έκφραση της δεν ήταν η χαμηλότερη και γενικά σε όλες τις συγκρίσεις είχε σταθερή έκφραση, ενώ μελέτες έχουν αποδείξει την δράση της στην διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες. Τελευταία στην ιεραρχία και με πολύ μικρή έκφραση παρουσιάστηκε η BMP-7. Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει σημαντική δράση της BMP-7 αλλά στην παρούσα διατριβή η BMP-7 αναδείχθηκε για την μεγάλη αύξηση της έκφρασής της μετά την 30<sup>η</sup> μέρα σε σχέση με την έκφρασή της τις προηγούμενες ημέρες των καταγμάτων. Επιπλέον ήταν η μοναδική BMP της οποίας η έκφραση συσχετίστηκε θετικά με την πάροδο του χρόνου μετά από κάταγμα.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε γενική καταστολή της έκφρασης των γονιδίων των BMPs στα κατάγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, δείχνοντας πως το γεγονός του οστικού τραυματισμού επηρεάζει αρνητικά την γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, ενδεικτική ήταν η αύξηση της έκφρασης μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα του κατάγματος για όλες τις BMPs, αγγίζοντας τα επίπεδα των αντίστοιχων φυσιολογικών δειγμάτων τους κάθε μια ξεχωριστά. Ακόμη, σε ζευγάρια δειγμάτων από κατάγματα από την εστία του κατάγματος και από απόσταση 2-3 εκατοστών ενδεικτικό αλλά αρκετά σημαντικό ήταν το γεγονός πως τα απομακρυσμένα περισοτικά δείγματα να μην είχαν υψηλότερη έκφραση από τα αντίστοιχα της εστίας του κατάγματος, αλλά η έκφρασή τους παρέμεινε επηρεασμένη από τον τραυματισμό, αφού σε καμία περίπτωση δεν άγγιξαν τα επίπεδα των φυσιολογικών δειγμάτων για καμία από τις BMPs.

Όσον αφορά τις αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης των περισοτικών BMPs σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων και των ασθενών ήταν τα εξής:

- το κάπνισμα φάνηκε ότι επηρεάζει την έκφρασή τους, κυρίως αυτή των BMP-2, BMP-6 και BMP-7.
- οι γυναίκες έδειξαν να έχουν υψηλότερη έκφραση στο σύνολο των γονιδίων σε σχέση με τους άνδρες, όσον αφορά τα δείγματα ενηλίκων. Στα παιδιά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.
- τα παιδιά σε σύγκριση με τους ενήλικες είχαν μεγαλύτερη γονιδιακή έκφραση στις 3 από τις 4 περισοτικές BMPs. Ανάμεσα στις ομάδες των ενηλίκων παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση στους μεγαλύτερους σε ηλικία στα φυσιολογικά δείγματα αλλά οι νεότεροι ανταποκρίθηκαν σε ένα πιθανό κατάγμα καλύτερα, αυξάνοντας περισσότερο την έκφραση των BMPs σε σχέση με τους μεγαλύτερους σε ηλικία.
- η μηχανική φόρτιση δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση.
- το μέγεθος του οστού επηρέασε την γονιδιακή έκφραση στα κατάγματα αλλά όχι στα φυσιολογικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, τα μεγάλα οστά αύξησαν την έκφρασή τους σε σχέση με τα μικρά όταν το οστό έσπασε. Στα παιδιά η έκφραση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα μικρά οστά.
- ο δείκτης μάζας σώματος δεν επηρέασε την έκφραση των BMPs.
- δεν βρέθηκαν ακραίες τιμές δειγμάτων που να επηρεάζουν το αποτέλεσμα των αναλύσεων.
- δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη έκφραση ανάλογα με το οστό δειγματοληψίας του αποκτηθέντος περισοτικού δείγματος.

Περαιτέρω έρευνες με κύριο θέμα το περίοστεο και απώτερο στόχο την πληρέστερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος στο επίπεδο του περιοστέου θα μπορούσαν να εστιάσουν στην *in vitro* μελέτη της αναγεννητικής και οστεογενετικής ικανότητας του ανθρώπινου περιοστέου και των κυττάρων αυτού στην πώρωση των καταγμάτων. Επίσης ο έλεγχος σε γονιδιακό επίπεδο όσο και πρωτεϊνικό (μετα-μεταγραφικό στάδιο) για την παρουσία ή απουσία παραγόντων που λαμβάνουν μέρος στις διάφορες φάσεις του κατάγματος

και ιδιαίτερα στην περίοδο του οιδήματος, της φλεγμονώδους αντίδρασης και της φάσης της πώρωσης, όπως επίσης το χρονικό διάστημα δράσης των παραγόντων αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει σε θεραπείες ταχύτερης πώρωσης των καταγμάτων. Στα πλαίσια ενός τέτοιου ελέγχου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η σύγχρονη τεχνική των μικροσυστοιχιών (microarrays) όπου θα λαμβάνονταν κυρίως ενδείξεις για τον αριθμό των στοιχείων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών και οστεοπρογονικών κυττάρων προς την οστεοβλαστική σειρά. Επιπλέον θα μπορούσε να ελεγχθεί in vitro η παρουσία ή απουσία παραγόντων-ουσιών που μπορούν να ενισχύσουν την οστεογενετική ικανότητα των κυττάρων του περιόστεου ώστε να συμβάλουν στην αποτελεσματικότερη επούλωση των καταγμάτων. Αυτή η εργαστηριακή σχεδίαση θα αποτελέσει πρόδρομο στάδιο για την μετέπειτα προσπάθεια in vivo (κλινική εφαρμογή) αποτελεσματικότερης χρήσης των κυττάρων του περιόστεου πρωτογενώς ή μετά από καλλιέργεια και κατ' επέκταση την ταυτοποίηση του καταλληλότερου χρόνου επέμβασης στη διάρκεια της πώρωσης των καταγμάτων, παρουσία ή απουσία διαφοροποιητικών ουσιών - παραγόντων.

### **B3.11 Κλινικές εφαρμογές του περιόστεου και των BMPs - Ανασκόπηση**

#### **B3.11.1 Περίοστεο**

Τα τελευταία χρόνια έχουν αξιοποιηθεί πολλά από τα σύγχρονα ιατρικά δεδομένα στην αναγεννητική ιατρική ώστε να προαχθεί και να τελεσφορήσει αποτελεσματικά η αποκατάσταση των τραυμάτων του μυοσκελετικού. Παράδειγμα αποτελούν τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών και το περιόστεο, που αναγνωρίζεται πλέον ως μια ελκυστική πηγή κυττάρων για την σύγχρονη και μεταγενέστερη μοριακή ιατρική. Κατά την τελευταία δεκαετία, ζωικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για να αξιολογηθεί η επιστράτευση των μηχανισμών των σκελετικών πολυδύναμων οστεοπρογονικών κυττάρων κατά την επουλωτική διαδικασία και να δοκιμασθούν οι θεραπευτικές δράσεις τους. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδογενής αναγεννητική δυναμική

του περιostέου είναι ανώτερη συγκρίνοντάς την με αυτή του μυελού των οστών καθώς και άλλων τύπων κυττάρων.

Το περίostεο είναι ένας σύνθετος ιστός που παρέχει ένα υπόβαθρο για την παρουσία πολυδύναμων οστεοπρογονικών κυττάρων και παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να παράγει οστό *de novo* στο πλαίσιο της οστικής ανακατασκευής κρίσιμων [20]. Οι χειρουργοί έχουν αξιοποιήσει αυτή την αναγεννητική ικανότητα του για περισσότερο από ένα αιώνα. Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στους μηχανισμούς που διέπουν την αξιολογη αναγεννητική ικανότητα του περιostέου, και ιδίως το ρόλο των μηχανικών και μηχανικά διαφοροποιημένων σημάτων αυτής της διαδικασίας [35].

#### *Αναγεννητική ικανότητα του περιostέου*

Μελέτη της τελευταίας δεκαετίας ανέδειξε την νεο-οστεογενετική ικανότητα του αγγειούμενου περιostέου μετά από ετεροτοπική εμφύτευσή του σε πειραματόζωα [20]. Πρόσφατη μελέτη περιγράφει [215] και αποδεικνύει την ικανότητα του περιostέου για *in situ* ανάπλαση ενός τμήματος αρκετών εκατοστών χειρουργημένης περόνης παρέχοντας την έμπνευση και προϋπόθεση για την διαδικασία της οστεομεταφοράς [216], το οποίο προσέφερε μια νέα πλατφόρμα για τη διευκρίνιση του ρόλου των ιδιαίτερων βιολογικών και μηχανικών καταγμάτων στην ανακατασκευή-επούλωση μεγάλων καταγμάτων στα θηλαστικά [217,218]. Σε αυτή τη διαδικασία, ένας στερεός, διάτρητος ενδομυελικός ήλος γεμίζει την κοιλότητα του μυελού και σταθεροποιεί το μηριαίο οστόν. Εγγύς του κατάγματος, το περίostεο προσεκτικά ανασηκώνεται και τραβιέται προς τα πίσω, διατηρώντας το παροχή αίματος αλλά διαρρηγνύοντας τις ίνες του Sharpey που ουσιαστικά προσδέουν το περίostεο στο υποκείμενο οστό. Η οστεοτομία τότε παρέχει ένα απογυμνωμένο τμήμα περιostέου, που μεταφέρεται και προσδέεται περιφερικά ώστε να καλύψει το κάταγμα. Το περίostεο ράβεται επί τόπου γύρω από τη νεοσύστατη ζώνη του κατάγματος και του απογυμνωμένου τμήματος του οστού, σχηματίζοντας ουσιαστικά ένα κάλυμμα γύρω από το αιμάτωμα [216]. Όταν αντιμετωπίζεται με αυτόν τον τρόπο, η *de novo* αναγέννηση του οστού γεφυρώνει

το κάταγμα μετά από 16 εβδομάδες, ακόμα και στην απουσία της ενδομυελικής κοιλότητας η οποία έχει γεμίσει από τον ήλο.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως συμπληρώνοντας με αυξητικούς παράγοντες και επιπρόσθετα μόσχευματα το ήδη προϋπάρχον περιοστικό μοντέλο, η διαδικασία της επούλωσης καθυστερεί [215,217]. Η επιβράδυνση της επουλωτικής απόκρισης μπορεί να αποδοθεί, αφενός, σε αυξημένη αντίσταση των κυττάρων κατά την μεταφορά τους από το περίοστεο στην περιοχή του κατάγματος, αφετέρου, στο ότι το οστικό μόσχευμα συμπληρώνοντας το κάταγμα πρέπει να απορροφηθεί πριν την αγγείωση της περιοχής και αυτή η νέα παράθεση οστικής ουσίας απαιτεί πρόσθετο «επουλωτικό» χρόνο [215].

Κλινικές μελέτες και πρόσφατες εκθέσεις δείχνουν ότι η μηχανική φόρτιση ενισχύει την αναγεννητική ικανότητα του περιοστέου. Σε μελέτες που χρησιμοποιούν την προαναφερθείσα περιοστική πλατφόρμα, η επικράτηση μηχανικών φορτίων και η εγγύτητα στο περίοστεο υποτέθηκε ότι θα διαμόρφωνε αρχικά νέα οστεογενετική γενιά στην περιοχή του κατάγματος και αργότερα θα ερχόταν η επούλωση και η αναδόμηση από το μόσχευμα (προερχόμενο από το απογυμνωμένο τμήμα πλέον του οστού) [216,217]. Για αυτό το λόγο λοιπόν, στην συνέχεια του πειράματος και για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων ποσοτικοποιείται η περιοχή και η συγκέντρωση της πράσινης φθορίζουσας καλσεΐνης, η οποία χορηγήθηκε τις 2 πρώτες εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, που επιτρέπει τη συσχέτιση του νέο-σχηματιζόμενου οστού με το ιστορικό φόρτισης και την εγγύτητα στο περίοστεο. Έπειτα χρησιμοποιείται λέιζερ ομοεστιακό μικροσκόπιο ως φασματοσκόπιο για τη μέτρηση της έντασης του σήματος της φθορίζουσας ουσίας. Τελικά, η χωρική κατανομή του νέου οστού που σχηματίστηκε κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση συσχετιζόταν σημαντικά με την απόσταση από το περίοστεο όπου επικρατούν οι μηχανικές φορτίσεις [218]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως αν και το περίοστεο αναγεννάται στο απογυμνωμένο τμήμα του οστού μετά το στάδιο της οστεομεταφοράς, το πάχος του αναγεννημένου περιοστέου δεν συσχετίζεται με τις επικρατούσες μηχανικές φορτίσεις [219]. Μελέτες σε εξέλιξη έχουν ως στόχο να διαφωτίσουν τις σχέσεις μεταξύ της μηχανικής φόρτισης, της μεταφορά των



κυττάρων και μοριακούς παράγοντες καθώς και την de novo δημιουργία των ιστών σε σοβαρούς τραυματισμούς των οστών.

Η αναγεννητική ικανότητα του περισσέου είναι υποσχόμενη για την κλινική θεραπεία των ψευδαρθρώσεων και των ελλειμμάτων μετά από εκτομή όγκου, λοίμωξη, τραύμα και συγγενείς ανωμαλίες. Η παραπάνω προσέγγιση εξηγείται από το γεγονός ότι η διαδικασία της οστεομεταφοράς έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιορισμένο αριθμό κλινικών περιπτώσεων κατά τις οποίες οι άλλες μέθοδοι θεραπείας δεν ήταν εφικτές [220]. Η δημιουργία περισστικού υποκατάστατου με μεθόδους βιο-ιατρικής μηχανικής είναι ένας πολλά υποσχόμενος τομέας της έρευνας για την θεραπεία οστικών ελλειμμάτων και σε συνδυασμό με την παρούσα προοπτική και προσέγγιση των ερευνητών για την δημιουργία φορέων από έξυπνα υλικά μπορεί να ανατρέψει τα σημερινά δεδομένα της αποκατάστασης των σκελετικών ελλειμμάτων [221].

### *Συμπερασματικά*

Η ανακατασκευή και επούλωση των οστών είναι μια δυναμική διαδικασία που αρχίζει με την στρατολόγηση των σκελετικών μεσεγχυματικών πολυδύναμων / οστεοπρογονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους φάσης, ακολουθούμενη από τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Κάτω όμως υπό ορισμένες συνθήκες, όπως τα τραύματα υψηλής ενέργειας, η λοίμωξη, ή η επιβαρυσμένη κατάσταση της υγείας του ασθενή, η θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη πώρωση ή ψευδάρθρωση. Οι ορθοπαιδικές παρεμβάσεις για τη θεραπεία των παραπάνω στοχεύουν στην μηχανική υποστήριξη της πώρωσης αλλά και στο βιολογικό παράγοντα δηλαδή τη διέγερση της ενδογενούς επουλωτικής απόκρισης και άρα βασίζεται στην εγγενή αναγεννητική ικανότητα των οστών. Όταν οι αναγεννητική ικανότητα μειώνεται, πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι απαραίτητες. Αν και οι BMPs καθώς και άλλα μόρια μπορούν να ενισχύσουν και να προάγουν την ανακατασκευή των οστών θεραπευτικά, είναι υπαρκτή η αυξανόμενη ζήτηση για κυτταρικές θεραπείες υποβοηθούμενες με νέα προηγμένα υλικά (εμφυτεύματα) ώστε να παρέχονται τα αναγκαία κύτταρα και οι αυξητικοί παράγοντες άμεσα, στοχευόμενα και αποτελεσματικά στην τραυματική

περιοχή. Η ανάγκη για πρόσθετες πηγές κυττάρων είναι ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση σοβαρού τραυματισμού, στην θεραπεία των οστικών όγκων και στην επανορθωτική χειρουργική. Σκελετικά νοσήματα, όπως η ατελής οστεογένεση και η οστεοπόρωση, θα μπορούσαν επίσης να αποτελέσουν στόχους για θεραπεία βασιζόμενη στα πολυδύναμα και οστεοπρογονικά κύτταρα. Οι προσπάθειες είναι τώρα επικεντρωμένες στο σχεδιασμό νέων ικριωμάτων-μεταφορέων, στα υλικά που θα δημιουργήσουν ένα βιο-συμβατό περιβάλλον και στη διαμόρφωση των μεταφορέων ώστε να αποδίδουν επιτυχώς χωρο-χρονικά τα πολυδύναμα κύτταρα. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες προσεγγίσεις σχετίζονται με τα κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία είναι εύκολα προσβάσιμα και έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Η ανασκόπηση αυτή ανέδειξε το δυναμικό του περισσέου και των κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό ως νέα πηγή έμπνευσης και πρώτων υλών για τη αναγεννητική ιατρική.

### **B3.11.2 Χρήση και θεραπευτικές ιδιότητες των BMPs**

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των περισστικών BMPs. Οι BMPs επιλέχθηκαν ανάμεσα σε άλλους παράγοντες που εκφράζονται στο περισσέο διότι αποτελούν πρωτεΐνες που δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής σηματοδότησης και διαδραματίζουν κριτικό ρόλο στην διέγερση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs) καθώς και των οστεοπρογονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη, αναδόμηση και επουλωτική διαδικασία των οστών. Τα τελευταία χρόνια, ενώ γίνονται προσπάθειες αξιοποίησης της αναγεννητικής ικανότητας του περισσέου, απουσιάζουν έρευνες που συσχετίζουν τις οστεοεπαγωγικές ιδιότητες των παραγόντων του *περισσέου* με σκοπό την χρήση τους στην κλινική εφαρμογή. Ωστόσο, οι επιστήμονες έχουν αναγνωρίσει το σημαντικό ρόλο που παίζουν οι BMPs στην οστεογένεση και έχουν καταφέρει να χρησιμοποιήσουν τις θεραπευτικές τους ιδιότητες κλινικά σε διαφόρων τύπων ορθοπαιδικές επεμβάσεις.

Είναι γεγονός ότι οι περισσότερες BMPs έχουν οστεοεπαγωγική δράση αλλά έως σήμερα έχουν παραχθεί και χρησιμοποιούνται με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, μέσω της τεχνικής του ανασυνδυασμού του DNA, μόνο δύο μορφές: η

ανασυνδυασμένη ανθρώπινη οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (rhBMP-2) και -7 (rhBMP-7 ή OP-1). Η χρήση των rhBMP-2 και -7 έχει δοκιμαστεί με επιτυχία τόσο σε μελέτες σε ζώα όσο και σε ανθρώπους για τη θεραπεία καταγμάτων, ψευδαρθρώσεων σε επεμβάσεις σπονδυλοδεσίας και διατακτικής οστεογένεσης, αλλά και για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων μεγάλου μεγέθους τόσο σε μακρά οστά όσο και στις γνάθους [222].

Η διαδικασία παραγωγής των ανασυνδυασμένων αυτών οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών έχει καταδείξει δύο σημαντικές παραμέτρους. Πρώτα, ότι η καθαρή μορφή των BMPs είναι υδρόφοβη και επομένως αναποτελεσματική, και δεύτερον ότι η οστεοεπαγωγική δράση μιας BMP είναι ανάλογη της τοπικής της συγκέντρωσης [223]. Η γρήγορη τοπική και συστηματική διάσπαση των BMPs επιβάλλουν, τέτοια δοσολογία της τοπικής εφαρμογής τους ώστε να ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο όριο, πέρα από το οποίο αποκτούν την επιθυμητή οστεοεπαγωγική δράση. Μικρότερη συγκέντρωση οδηγεί σε ανεπαρκή παραγωγή οστού, ενώ μεγαλύτερη οδηγεί σε ανεξέλεγκτη οστεογένεση και αφενός τη μετατροπή της επιθυμητής ενδοχόνδριας οστεογένεσης σε ενδομεμβρανώδη αφετέρου την έναρξη τοπικής οστεόλυσης με την κινητοποίηση οστεοκλαστικής δραστηριότητας μέσω των μηχανισμών της οστικής ομοιόστασης και αναδόμησης (remodeling) [224].

Έτσι, η χρήση των διαφόρων συστημάτων μεταφοράς (carriers), στα πλαίσια των εφαρμογών της ιστικής μηχανικής, έρχεται να επιλύσει αυτά τα προβλήματα, δημιουργώντας συνθήκες σταθερής και σταδιακής απελευθέρωσης της μορφογενετικής πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσης της στη βλάβη, πάνω από το κρίσιμο όριο δράσης της για περισσότερο διάστημα, αυξάνοντας την οστεοεπαγωγική της ικανότητα [225,226]. Βέβαια οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των φορέων θα πρέπει να συνυπολογισθούν στην διαδικασία της οστεογένεσης και ανακατασκευής [227-234].

### *Μεταφορείς*

Σημαντικό μέρος της σύγχρονης έρευνας για τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες αφορά στη δημιουργία του ιδανικού μεταφορέα. Οι McKay και Sandhu [235], κατέδειξαν τρεις βασικές τους λειτουργίες. Πρώτα, ο μεταφορέας θα πρέπει

να δρα ως τρισδιάστατο πλαίσιο στήριξης, κατά μήκος του οποίου επάγεται ο σχηματισμός του νέου οστού. Κατόπιν, θα πρέπει να διατηρείται σταθερή και ικανή συγκέντρωση της BMP καθ' όλη τη διάρκεια της οστεογένεσης και τέλος, ο μεταφορέας θα πρέπει να διατηρεί στο εσωτερικό του όλη την ποσότητα της πρωτεΐνης, αποτρέποντας οποιαδήποτε έκτοπη οστεοποίηση. Έτσι είναι απαραίτητο, ο μεταφορέας να είναι βιο-συμβατός, βιο-αποδομούμενος, και να διαθέτει οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες. Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά βιο-υλικά ως μεταφορείς των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων απομεταλλωμένη οστική θεμέλια ουσία [236], παράγωγα κολλαγόνου [237], πολυγαλακτικό οξύ [238], πολυμερή πολυγαλακτικού-γλυκονικού οξέως [239], φωσφορικό τριασβέστιο με υδροξυαπατίτη [240], καθώς και συνδυασμός των παραπάνω. Συχνότερα και ίσως με τα καλύτερα αποτελέσματα, έχει χρησιμοποιηθεί το βόειο κολλαγόνο τύπου-I είτε σε μορφή σπόγγου ως μεταφορέας rhBMP-2 είτε σε μορφή κόκκων ως μεταφορέας rhBMP-7.

#### *Ασφάλεια των BMPs - Πιθανές παρενέργειες*

Είναι γεγονός ότι η συγκέντρωση των BMPs κατά την θεραπευτική κλινική εφαρμογή, μπορεί συχνά να φθάνουν το τετραπλάσιο έως εξαπλάσιο των φυσιολογικών συγκεντρώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Πέραν τούτου, αναφέρονται παρενέργειες οφειλόμενες στα έκδοχα των σκευασμάτων των BMPs, καθώς και στα προϊόντα διάσπασής τους, αλλά και στο γεγονός ότι πολλά από αυτά τα έκδοχα στοχεύουν στην βραδεία αποδέσμευση των BMPs, γεγονός που συνεπάγεται την επί μακρόν παρουσία τους στον οργανισμό. Όλα αυτά θα πρέπει να συνεκτιμώνται όταν χορηγούνται οι BMPs.

- Παραγωγή έκτοπου οστίτη ιστού ή υπερβολική παραγωγή οστού τοπικά, έχει αναφερθεί με την εφαρμογή υπερβολικής δόσεως BMP-2 και BMP-7. Πάντως, χρησιμοποιώντας θεραπευτικές δόσεις, φαίνεται να υπάρχει σχετικά μικρός κίνδυνος εκσεσημασμένης οστεοποίησης και συνήθως η περίσσεια ανακατασκευάζεται με την πάροδο του χρόνου, στα όρια της μορφής του οστού [223].

- Η συστηματική κάθαρση των ανασυνδυσασμένων ανθρώπινων BMPs είναι ταχεία και μέχρι στιγμής δεν έχει εμφανιστεί συστηματική τοξική δράση.
- Οι κολλαγονικοί φορείς των BMPs φαίνεται να επάγουν παραγωγή αντισωμάτων σε ποσοστό 5-20% των ασθενών σε μία σειρά, ενώ αντισώματα έναντι των BMPs φαίνεται να σχηματίζονται σε ποσοστό 6-10%, σε άλλη μελέτη [241].
- Μακροπρόθεσμα γενετικά προβλήματα στον άνθρωπο, δεν είναι αυτή την στιγμή γνωστά.
- Οι μελέτες δεν έχουν καταδείξει περιπτώσεις καρκινογένεσης. Πάντως, ως παράγοντες διαφοροποίησης οι BMPs, δεν φαίνεται πιθανόν να προκαλούν καρκινική εξαλλαγή σε χαμηλότερα διαφοροποιημένο ιστό. Σε περιπτώσεις ήδη εγκαταστημένης νεοπλασματικής νόσου, δεν είναι γνωστό το αποτέλεσμα δράσης τους [242].
- Η χρήση τους σε περίπτωση εγκυμοσύνης αντενδίδνυται και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγάλη επιφύλαξη στα παιδιά [243].

#### *Κλινική αξία των BMPs*

Από τις πλέον των 40 απομονωθεισών BMPs, οι περισσότερες ξεχωρίζουν για την δυνατότητά τους να επάγουν παραγωγή νέου οστού. Από αυτές, οι ανασυνδυσασμένες ανθρώπινες BMP-2 και BMP-7 (rhBMP-2 και rhBMP-7, ή Osteogenic protein-1, OP-1) φαίνεται να είναι οι πλέον δραστικές και είναι οι μόνες που μέχρι αυτή τη στιγμή αναπτύχθηκαν για κλινική χρήση με βάση τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες. Αυτές απέδειξαν την BMP-7 τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματική με αυτόλογο οστικό μόσχευμα στην θεραπεία της ψευδαρθρώσεως της κνήμης [244]. Η BMP-2 ενισχύει την πώρωση των ανοικτών καταγμάτων κνήμης και αποδεικνύεται τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματική με αυτόλογο οστικό μόσχευμα στην πρόσθια σπονδυλοδεσία για την θεραπεία της εκφυλιστικής δισκικής νόσου και την πλήρωση οστικών κενών. Ενδείξεις για άλλες κλινικές εφαρμογές έχουν ληφθεί από μελέτες με άλλοτε άλλο βαθμό συστάσεως (recommendation grade) [245].

Γενικά θα μπορούσαμε να αποπειραθούμε μια κατηγοριοποίηση των ενδείξεων εφαρμογής των BMPs. Οι ενδείξεις εφαρμογής των BMPs είναι οι εξής:

- Η επιτάχυνση της πώρωσης των καταγμάτων.
- Η οστική επαγωγή σε περιπτώσεις οστικών ελλειμμάτων και επιμηκύνσεων.
- Η οστική επαγωγή σε ειδικές ή αντίξοες βιολογικά περιπτώσεις, τοπικά ή συστηματικά για υποβοήθηση της διαδικασίας της πώρωσης (κακοήθεια, ακτινοβολία, κάπνισμα, λοίμωξη, καθήλωση εμφυτευμάτων με χρήση οστικών μοσχευμάτων, ή δια οστικής διεισδύσεως).

#### *Μελέτες σε ανθρώπους*

Οι μελέτες χρήσης των BMPs σε ανθρώπους είναι ιδιαίτερα περιορισμένες, δημιουργούν όμως νέες προοπτικές στην αποκατάσταση οστικών βλαβών. Οι κυριότερες από αυτές αφορούν σε επεμβάσεις σπονδυλοδεσίας στην Ορθοπαιδική και στη Νευροχειρουργική, όπου χρησιμοποιήθηκε τόσο η rhBMP-2 σε σπόγγο κολλαγόνου με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα [246] όσο και η OP-1 με επίσης αξιολογα αποτελέσματα [247]. Αυτές οι μελέτες καθώς και άλλες κλινικές και προκλινικές σε μοντέλα ζώων, παρέχουν αρκετές ενδείξεις για την επιτυχή χρήση των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών στην κρανιοπροσωπική χειρουργική.

#### *Γονιδιακή θεραπεία*

Η μεταφορά στη θέση της βλάβης BMP γονιδίων μέσα σε διάφορα πλαίσια στήριξης και η έκφραση τους για παραγωγή οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών, προσφέρει μια νέα και ιδιαίτερα ελπιδοφόρα θεραπευτική προσέγγιση της οστικής αποκατάστασης. Αυτό επιτυγχάνεται μέχρι σήμερα με δυο τρόπους, είτε με την απευθείας εισαγωγή του DNA του γονιδίου σε ανάλογα κύτταρα, είτε με τη χρήση ενδιάμεσου ξενιστή, ο οποίος κατά κανόνα είναι ένας ιός [248]. Αρκετά ερευνητικά δεδομένα έχουν αποδείξει ότι η εισαγωγή BMP γονιδίων σε συγκεκριμένα κύτταρα είτε *in vivo* είτε *ex vivo* με μεθόδους κυτταροκαλλιέργειας, μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών πολυδύναμων κυττάρων σε οστεοβλάστες, με αποτέλεσμα την παραγωγή ορθοτοπικού ή έκτοπου οστού [249]. Ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος ενδιάμεσος ξενιστής είναι ο αδενοϊός, που έχει χρησιμοποιηθεί ως φορέας BMP γονιδίων (BMP-2, BMP-7, BMP-9) σε αρκετές μελέτες σε μοντέλα

ζών. Επίσης μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός BMP γονιδίων έχει καλύτερα ακόμη αποτελέσματα, ενώ ο περαιτέρω έλεγχος της οστικής αναγέννησης μέσω συγκεκριμένων γονιδιακών επαγωγέων μπορεί να ρυθμίσει τόσο τη διάρκεια όσο και την ένταση της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων [249].

### *Οικονομική συνιστώσα*

Λαμβάνοντας υπόψη, ότι με βάση τα τρέχοντα δεδομένα, α) επιπέδου I σύσταση για κλινική χρήση μόνο των rhBMP-7 και rhBMP-2 υποστηρίζεται από εργασίες με μεγάλο αριθμό περιστατικών, προοπτικές, τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες, εν μέρει τυφλές, πολυκεντρικές, που αφορούν σε ψευδαρθρώσεις καταγμάτων κνήμης τουλάχιστον 9 μηνών, όπως και ανοιχτών καταγμάτων κνήμης κατά την αρχική θεραπευτική αντιμετώπιση, καθώς επίσης ότι, β) επειδή η χρήση της τεχνολογίας των BMPs πιθανόν να συνοδεύεται από κάποιου βαθμού κίνδυνο για τον ασθενή οι rhBMPs κατατάσσονται από τον FDA στην κατηγορία της «συσκευής/ κατασκευάσματος» (Class III devices) [250], το κόστος διάθεσής τους παραμένει σχετικά υψηλό.

Η χρήση των BMPs σε απλά κατάγματα, που σύμφωνα με τις υπάρχουσες γνώσεις αναμένεται σε μεγάλο ποσοστό να πωρωθούν χωρίς προβλήματα, καθώς και σε πλείστες άλλες εφαρμογές όπου η οστική επαγωγή και η ταχεία αποκατάσταση οστικής συνέχειας είναι εξαιρετικά επιθυμητή, είναι μία πρόκληση και η εξισορρόπηση του κόστους μελετάται θετικά.

### *Συμπεράσματα*

Η χρήση των BMPs στη θεραπεία οστικών ελλειμμάτων, καταγμάτων και ψευδαρθρώσεων στα πλαίσια της ιστικής μηχανικής έφερε σημαντικά αποτελέσματα ιδιαίτερα στην αποκατάσταση ελλειμμάτων μεγάλου μεγέθους. Μία και μόνο BMP, είναι ικανή στην πράξη να εκκινήσει την διαδικασία πώρωσης του κατάγματος και τούτο αποτελεί μια σαφή ένδειξη της χρησιμότητάς τους στην χειρουργική ορθοπαιδική. Η BMP-7 απέδειξε τις ικανότητές της στις ψευδαρθρώσεις, ενώ η BMP-2, στα πρόσφατα κατάγματα και στις σπονδυλοδεσίες.

Η μετα - ανάλυση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων φανερώνει ρυθμούς πώρωσης ισοδύναμους, αν όχι ταχύτερους από εκείνους της τοπικής εφαρμογής αυτόλογων οστικών μοσχευμάτων. Οι μελέτες ασφάλειας χορήγησης των BMPs είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικές, με εμφάνιση ελάχιστης τοξικότητας, ή παρενεργειών. Τα κυριότερα προβλήματα που πρέπει να επιλυθούν στην θεραπευτική χορήγηση των BMPs είναι οι μέθοδοι και οι φορείς για την μεταφορά και εφαρμογή τους τοπικά, ο βέλτιστος χρόνος αποδέσμευσής τους στον τόπο δράσης και οι θεραπευτικές δόσεις. Η μείωση όμως του κόστους παραγωγής των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών είναι επιβεβλημένη, προκειμένου να προχωρήσει η χρήση τους τόσο σε ερευνητικό, όσο και σε κλινικό-θεραπευτικό επίπεδο, σε ευρεία κλίμακα

### ***B3.11.3 Περίοστεο και BMPs στην αναγεννητική ιατρική***

Η αναγεννητική ικανότητα του περιοστέου και των κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό αποτελούν νέα πηγή έμπνευσης και πρώτων υλών για τη αναγεννητική ιατρική. Επιπλέον, είναι γνωστή η δράση και η συμβολή των περιοστικών BMPs στην οστική ανάπτυξη, ομοιοστασία και πώρωση του κατάγματος. Η μεταφορά και επαγωγή αυξητικών παραγόντων της οστεογενετικής σειράς όπως οι BMPs στην επιθυμητή περιοχή οστικής αποκατάστασης θα μπορούσε να επιτευχθεί εμμέσως προάγοντας και επάγοντας τους ενδογενείς παράγοντες του περιοστέου είτε του ήδη υπάρχοντος περιοστέου στη συγκεκριμένη περιοχή είτε μέσω μεταφοράς περιοστικού μοσχεύματος. Τα τελευταία χρόνια έχει εντατικοποιηθεί η έρευνα γύρω από την χρήση του περιοστέου στην αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων. Η χρήση περιοστικού ιστού σε συνδυασμό με παράγοντες που θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν αλλά και να αυξήσουν τοπικά την έκφραση των περιοστικών BMPs θα αποτελούσε ιδανικό σενάριο για την διαδικασία αποκατάστασης. Μια άλλη διαδρομή με τον ίδιο απώτερο στόχο θα ήταν η επεξεργασία και καλλιέργεια κυττάρων του περιοστέου για την αύξηση, πολλαπλασιασμό, απομόνωση αυτόλογων περιοστικών BMPs και ακολούθως την έγχυση τους, στην επιθυμητή περιοχή του οστού. Η εκμετάλλευση των ενδογενών περιοστικών BMPs και παραγόντων του ίδιου του περιοστέου για την πώρωση των καταγμάτων και την αποκατάσταση ελλειμμάτων θα μπορούσε να παρακάμψει την χρήση των



ανθρώπινων ανασυνδυασμένων BMPs και όλων των πιθανών παρενεργειών τους, ενώ το κόστος θα μπορούσε να είναι μικρότερο συγκριτικά με το κόστος της χορήγησης ανασυνδυασμένων BMPs.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Συμεωνίδης Π.** Ορθοπαιδική – Κακώσεις και παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος, 1996:48-51, *University Studio Press, Θεσσαλονίκη*.
- [2] **Van De Graaf K.M.** Human Anatomy. 2001 (6<sup>th</sup>). *McGraw-Hill Publishing Co, Boston*.
- [3] **Junqueira L.** Basic Histology: Text & Atlas 2005, 11<sup>th</sup> edition, *Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*.
- [4] **Urist M.R.** Fundamental and Clinical Bone Physiology. *Ann Intern Med 1980:95-248*.
- [5] **Ducy P., Schinke T., Karsenty G.** The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science 2000:(289):1501-4*.
- [6] **Bostrom M., Boskey A., Kaufman J. Einhorn T.** Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2000 *Chapter 13 - Form and function of bone, American Academy of Orthopaedic Surgeons*.
- [7] **Yang Y.J., Damron T.** Histology of Bone. 2002 *eMedicine*  
<http://www.emedicine.com/orthoped/topic403.htm2>
- [8] **Marotti G.** The osteocyte as a wiring transmission system. *J Muskuloskel Neuron Interact 2000:(2):133-136*.
- [9] **Manolagas S.C.** Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews 2000:21:115-137*.
- [10] **Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science 2000:289:1504-8*.
- [11] **Post T.M., Cremers S.M., Kerbusch T.** Bone Physiology, Disease and Treatment: Towards Disease System Analysis in Osteoporosis. *Clin Pharmacokinet. 2010:49(2):89-118*.
- [12] **Young B., Deakin P.J.** Wheather's functional histology : a text and color atlas (5<sup>th</sup> edition). 2006 Churchill Livingstone/Elsevier.
- [13] **Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones S.P., Roberts I.** The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev 2006:20(3):161-171*.
- [14] **Heino T.J., Hentunen T.A.** Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther 2008:3(2):131-145*.
- [15] **Jung Y., Song J., et al.** Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells 2008:26(8):2042-2051*.
- [16] **Roda B. et al.** A Novel Stem Cell Tag-Less Sorting Method. *Humana Press 2009*.
- [17] **Boyce B.F., Xing L.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res 2007:9:1:S1*.

- [18] **Walsh M.C., Kadono K.Y., Rho J., Lee S.Y., Lorenzo J., Choi Y.** Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006;24:33-63.
- [19] **Tominaga H., Maeda S., Miyoshi H., Miyazono K., Komiya S., Takeshi T.** Imamura Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Metab* 2009;27:236-245.
- [20] **Dailiana ZH, Shiamishis G, Niokou D, Ioachim E, Malizos KN.** Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periosteum and bone grafts. *J Trauma* 2002;53:934-938.
- [21] **Allen M. et al.** Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 2004;35:1003– 1012.
- [22] **Orwoll E.** Toward an Expanded Understanding of the Role of the Periosteum in Skeletal Health. *J Bone Min Res* 2003 Vol.18, No 6.
- [23] **Whiteside LA.** Circulation in bone. In *Surgery of the Musculoskeletal System*. 1983;1:51-1:63. Edited by C. McC. Evarts. New York, Churchill Livingstone.
- [24] **Fang J., Hall BK.** Chondrogenic cell differentiation from periosteal membrane bone. *Anat Embryol* 1997;196(5):349-362.
- [25] **Ito Y., Fitzsimmons J.S., Sanyal A. et al.** Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:215-23.
- [26] **Malizos K.N., Papatheodorou L.** The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005; 36S:S13-S19.
- [27] **Li M., Amizuka N., Oda K. et al.** Histological evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. *Microsc Res Tech* 2004;1(4):330-342.
- [28] **O'Driscoll SW., Fitzsimmons JS.** The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop* 2001;(S391):S190-207.
- [29] **Scott-Savage P., Hall BK.** Differentiative ability of the tibial periosteum for the embryonic chick. *Acta Anat* 1980;106:129-40.
- [30] **Jacobsen F.S.** Periosteum: Its relation to pediatric Fractures. *J Pediatric Orthopaedics Part B* 1997;6:84-90.
- [31] **Dwek J. R.** The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol* 2010;39:319–323.
- [32] **Seeman E.** The periosteum - a surface for all seasons. *Osteoporos Int* 2007;18:123-128.
- [33] **Rodan G.A., Raisz L.G.** Pathophysiology of Osteoporosis. *Principles of bone biology* 2002:1275-1289.

- [34] **Κουσουλάκος Σ.Λ.** «Εισαγωγή στην Αναπτυξιακή Βιολογία και Ιστολογία». *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου*, 2007:304-305.
- [35] **Colnot C. et al.** RESEARCH PERSPECTIVE Current Insights on the Regenerative Potential of the Periosteum: Molecular, Cellular, and Endogenous Engineering Approaches. *J Ortho Res June 2012:1-10*.
- [36] **Kronenberg HM.** Developmental regulation of the growth plate. *Nature 200:423:332-336*.
- [37] **Du X., Xie Y., Xian C.J. et al.** Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol. 2012 in press, DOI: 10.1002/jcp.24083*.
- [38] **Zanotti S., Canalis E.** Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcif Tissue Int 2012:90:69-75*.
- [39] **Zelzer E., Mamluk R., Ferrara N. et al.** VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development 2004:131:2161-2171*.
- [40] **Mundy GR., Boyce B., Hughes D., Wright K., Bonewald L., Dallas S. et al.** The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone 1995:17:71-79*.
- [41] **Ross P., Davis J., Wasnich R.** Bone mass and beyond: risk factors for fractures. *Calcified tissue international 1993:53:134-7*.
- [42] **Day S. et al.** Orthopaedic basic science: Biology and biomechanics of the musculoskeletal system. *Chapter 14 – Bone Injury, Regeneration and repair, AAOS 2000*.
- [43] **Webb J., Tricker J.** A review of fracture healing. *Curr Orthop 2000:14:458-463*
- [44] **Ott S.M.** Bone Remodeling. *Dynamics of Encyclopedia of endocrine diseases 2004: 386-391*.
- [45] **Apley G. Solomon L.** System of Orthopaedics and Fractures. *Ορθοπαιδική, 7<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Γιαννακόπουλος, Αθήνα*.
- [46] **Buckwalter J.A., Einhorn A., Bolander E. et al.** Healing of musculoskeletal tissues. *In: Rockwood CA, Green D, eds. Fractures. Philadelphia: Lippincott, 1996:261-304*.
- [47] **Leung K.S., Sher A.H., Lam T.S.W., Leung P.C.** Energy metabolism in fracture healing. *J Bone Joint Surg 1989:71:567-660*.
- [48] **Mark H., Pennington A., Nannmark U. et al.** Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats. *Bone 2004:35:535-42*.
- [49] **Wildemann B., Schmidmaier G., Brenner N., et al.** Quantification, localization, and expression of IGF-1 and TGF-beta 1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int 2004:74:388-97*.
- [50] **Grundnes O., Reikaras O.** The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand 1993:64:340-2*.

- [51] **Grundnes O., Reikaras O.** The role of the hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1993;64:47-9.
- [52] **Hulth A.** Current Concepts of Fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1989;249:265-284.
- [53] **Ozaki A. et al.** Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000;5:64-70.
- [54] **Vaccaro A.R. Orthopaedic Knowledge Update.** AAOS 2005, *Library of Congress Cataloging.*
- [55] **Colnot C, Thompson Z, Miclau T, et al.** Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 2003;130:4123–4133.
- [56] **Lu C, Miclau T, Hu D, et al.** Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 2005;23: 1300–1307.
- [57] **Thompson Z, Miclau T, Hu D, et al.** A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 2002; 20:1091–1098.
- [58] **Yu YY, Lieu S, Lu C, et al.** Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* 2010;47:65–73.
- [59] **Xie C, Liang B, Xue M, et al.** Rescue of impaired fracture healing in COX-2<sup>-/-</sup> mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol* 2009;175:772–785.
- [60] **Xie C, Ming X, Wang Q, et al.** COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone* 2008; 43:1075–1083.
- [61] **Colnot C.** Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2009;24:274–282.
- [62] **Chang H, Knothe Tate ML.** The periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1:480–491.
- [63] **Colnot C.** Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:449– 457.
- [64] **Robey PG.** Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:423–430.
- [65] **Sandberg MJ, Aro HT, Vuorio EL** Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 1993;289:292-312.
- [66] **Browner, Jupiter, Levine, Trafton.** Skeletal Trauma. Basic science, management and reconstruction. *Elsevier* 2003 (3<sup>rd</sup> edition).
- [67] **Karlsson M.K., Nilsson B.E., Obrant K.J.** Bone Mineral loss after lower extremity trauma: 62 cases followed for 15-38 years. *Acta Orthop Scand* 1993;64:362-4.

- [68] **Marsh J., Buckwalter J., Evarts C.** Nonunion, delayed union, malunion and avascular necrosis. In: *Epps CH, ed. Complications in orthopaedic surgery. Philadelphia: Lippincott, 1994:183-211.*
- [69] **Zhang X., Awad H.A., O'Keefe R.J. et al.** A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clin Orthop Relat Res 2008. 466:1777–1787.*
- [70] **Xie C., Xue M., Wang Q. et al.** Tamoxifen-inducible CreER-mediated gene targeting in periosteum via bonegraft transplantation. *J Bone Joint Surg Am 2008;90:9–13.*
- [71] **Wang Q., Huang C., Xue M. et al.** Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing. *Bone 2011;48:524–53.*
- [72] **Yu Y., Lieu S., Lu C. et al.** Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone 2010;46:841–851.*
- [73] **Long F., Chung U.I., Ohba S. et al.** Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development 2004;131:1309–1318.*
- [74] **Long F., Zhang X.M., Karp S. et al.** Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development 2001; 128:5099–6108.*
- [75] **St-Jacques B., Hammerschmidt M., McMahon A.P.** Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev 1999;13:2072–2086.*
- [76] **Wang Q., Huang C., Zeng F. et al.** Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol 2010;177:3100–3111.*
- [77] **Chikazu D., Li X., Kawaguchi H. et al.** Bone morphogenetic protein 2 induces cyclooxygenase 2 in osteoblasts via a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res 2002; 17:1430–1440.*
- [78] **Karachalios T., Boursinos L.A., Poultsides L., Khaldi L., Malizos K.N.** The effects of short term administration of low therapeutic doses of anti-COX-2 agents on the healing of fractures: An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br. 2007 Sep;89(9):1253-60.*
- [79] **Tai H., Miyaura C., Pilbeam C.C. et al.** Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology 1997;138:2372–2379.*
- [80] **Kawaguchi H., Pilbeam C.C., Gronowicz G. et al.** Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest 1995;96:923– 930.*

- [81] **Min Y.K., Rao Y., Okada Y. et al.** Regulation of prostaglandin G/H synthase-2 expression by interleukin-1 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1998;13:1066–1075.
- [82] **Naik A.A., Xie C., Zuscik M.J. et al.** Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *J Bone Miner Res* 2009;24:251–264.
- [83] **Akiyama H., Lyons J.P., Mori-Akiyama Y. et al.** Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 2004;18:1072–1087.
- [84] **Day T.F., Guo X., Garrett-Beal L. et al.** Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739–750.
- [85] **Li X., Grisanti M., Fan W. et al.** Dickkopf-1 regulates bone formation in young growing rodents and upon traumatic injury. *J Bone Miner Res* 2011;26:2610–262.
- [86] **Hu H., Hilton M.J., Tu X. et al.** Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 2005;132:49–60.
- [87] **Banu S.K., Lee J., Speights Jr. et al.** Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 induces apoptosis of human endometriotic cells through suppression of ERK1/2, AKT, NFkappaB, and beta-catenin pathways and activation of intrinsic apoptotic mechanisms. *Mol Endocrinol* 2009;23:1291–1305.
- [88] **Gladden P., Wilson C., Suk M.** Pediatric Orthopedic Trauma: Principles of Management *Seminars in Pediatric Surgery, Vol 13, No 2 (May), 2004:119-125.*
- [89] **Staheli L.T.** Practice of pediatric orthopaedics. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001.*
- [90] **Murray D., Wilson-MacDonald J., Morscher E., Rahn A., Kaslin M.** Bone growth and remodeling after fracture. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br.)* 1996; 78: 42–50.
- [91] **Price C.T., Phillips J.H., Devito D.P.** Management of fractures. In *Lovell & Winter's pediatric orthopaedics* (4<sup>th</sup> ed., pp. 1320–1412). *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001.*
- [92] **Einhorn T.A.** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research, 1996: 355(Suppl.): S7–S21.*
- [93] **Perona, P.G., Light T.R.** Remodeling of the skeletally immature distal radius. *Journal of Orthopaedic Trauma, 1990:4(3):356–361.*
- [94] **Bronner F., Farach-Carson M., Mikos A.G.** Engineering of Functional Skeletal Tissues. 2007 *Vol. 3, Springer.*
- [95] **Canalis E.** Skeletal Growth Factors. 1<sup>st</sup> edition, *Lippincott Williams and Wilkins 2000.*
- [96] **Massague J., Chen Y. G.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14, 627-644.
- [97] **Dijke P., Hill C.S.** New insights into TGF-beta-SMAD signalling. *Biochem Sci* 2004:265-273.

- [98] **Dallas S.L., Rosser J.L., Mundy G.R., Bonewald L.F.** Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J. Biol. Chem.* (2002):277: 21352-21360.
- [99] **Attisano L., Wrana J.L.** Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002: 296: 1646-1647.
- [100] **Chena D., Zhaob M., Mundy G.** Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 2004: 22(4):233-24.
- [101] **Matthews S.J.E** Biological activity of bone morphogenetic proteins. *Injury, Int. J. Care Injured* 2005:36S:S34-37.
- [102] **Wonzey J.M., Rosen V.** Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein Gene Family in Bone Formation and Repair *Clin Orthop Relat Res* 1998: 346, 26-37.
- [103] **Hruska K.A., Mathew S., Saab G.** Bone morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circ Res* 2005:97(2):105-114.
- [104] **Wang E.A., Rosen V., Cordes P. et al.** Purification and characterization of other distinct bone inducing factors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988:85:9484-9488.
- [105] **Ducy P., Karsenty G.** The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International* 2000:2207-2214.
- [106] **Yamashita H., Duke P.T., Miyazono K.** Bone Morphogenetic Receptors *Bone* 1996:19(6):569-574.
- [107] **Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994:370(6488):341-7.
- [108] **Cárcamo J., Weis F.M., Ventura F., Wieser R., Wrana J.L., Attisano L., Massagué J.** Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol.* 1994:4(6):3810-21.
- [109] **Cárcamo J., Zentella A., Massagué J.** Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol.* 1995:15(3):1573-81.
- [110] **Nohe A., Keating E., Knaus P., Peterson N.O.** Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors *Cel Signal* 2004:16:291-299.
- [111] **Rosenzweig BL et al.** Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995:92(17):7632-6.
- [112] **Dijke T. et al.** Identification of Type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein -4 *J Biol Chem* 1994:269:16985-16988.



- [113] **Chen Y.G., Massagué J.** Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem.* 1999: 274(6):3672-7.
- [114] **Ebisawa T., Tada K., Kitajima I., Tojo K., Sampath T.K., Kawabata M., Miyazono K., Imamura T.** Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation *J Cell Sci.* 1999:112:3519-27.
- [115] **Aoki H., Fujii M., Imamura T., Yagi K., Takehara K., Kato M., Miyazono K.** Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci.* 2001:114:1483-9.
- [116] **Lagna G., Hata A., Hemmati-Brivanlou A., Massagué J.** Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996: 383(6603):832-6.
- [117] **Lewin B.** Genes 8<sup>th</sup> edition 2004 Pearson Inc.
- [118] **Zawel L., Dai J.L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Kern S.E.** Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell.* 1998:1(4):611-7.
- [119] **Zhu H.J., Iaria J., Sizeland A.M.** Smad7 differentially regulates transforming growth factor beta-mediated signaling pathways. *J Biol Chem.* 1999:274(45):32258-64.
- [120] **Yamaguchi K. et al.** Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science.* 1995:270(5244):2008-11.
- [121] **Shirakabe K. et al.** TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1997:272(13):8141-4.
- [122] **Kimura N. et al.** BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem.* 2000:275(23):17647-52.
- [123] **Yanagisawa M. et al.** Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes Cells.* 2001:6(12):1091-9.
- [124] **Pouponnot C., Jayaraman L., Massagué J.** Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem.* 1998:273(36):22865-8.
- [125] **Topper J.N., DiChiara M.R., Brown J.D., Williams A.J., Falb D., Collins T., Gimbrone M.A Jr.** CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998:95(16):9506-11.
- [126] **Gazzerro E., Canalis E.** Bone morphogenetic proteins and their antagonists *Rev Endocr Metab Disord* 2006:7:51-56.
- [127] **Avsian-Kretchmer O., Hsueh A.J.** Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004:18(1):1-12.

- [128] **Kalajzic I. et al.** Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *Biol Chem.* 2005; 280(26):24618-26.
- [129] **Ishida W. et al.** Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6075-9.
- [130] **Rosen V.** BMP and BMP Inhibitors in bone. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006;1068:19-25.
- [131] **Helvering L.M., Sharp R.L., Ou X., Geiser A.G.** Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes *Gene.* 2000;256(1-2):123-38.
- [132] **Cheng H. et al.** Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 2003;(85-A):1544-52.
- [133] **Yamaguchi A., Komori T. Suda T.** Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa1. *Endocrine Reviews* 2005;21(4):393-411.
- [134] **Li X., Cao X.** BMP signaling and Skeletogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006;1068:26-40.
- [135] **Marsell R., Einhorn T.** The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009;40:S3,S4-7.
- [136] **Nakase T., Nomura S. et al.** Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994;9:651-659.
- [137] **Bostrom MP. et al.** Immunolocalization and expression of bone morphogenetic protein 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13:357-367.
- [138] **Cho T-J. et al.** Tumor necrosis factor alpha activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum* 2003;48:2845-2854.
- [139] **Ishidou Y. et al.** Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Min Res* 1995;10:1651-1659.
- [140] **Kang Q., Sun M., Cheng H. et al.** Prevention of atrophic non union development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Ortho Res* 2005;23(3):632-8.
- [141] **Lissenberg-Thunnissen S.N., De Gorter D., Sier C., Schipper I.** Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics (SICOT)* 2011;35:1271-1280.
- [142] **Cho T.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A.** Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-520.
- [143] **Heldin C.H., Westermark B.** Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 1999;79:1283-1316.

- [144] **David Roodman G.** Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis. *Cancer* 2003;97:733-738.
- [145] **Zhang, Z., Chen, J., and Jin, D.** Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly: the role of receptor beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;251:190-194.
- [146] **Krupski, T. et al.** The role of vascular endothelial growth factor in the tissue specific in vivo growth of prostate cancer cells. *Growth Factors* 2001;18:287-302.
- [147] **Hoeflich A. et al.** Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60:834-838.
- [148] **Dailey L., Ambrosetti D., Mansukhani A., Basilico C.** Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:233-247.
- [149] **Marie P.J.** Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003;316:23-32.
- [150] **Hofbauer L.C., Heufelder A.E.** Osteoprotegerin: a novel local player in bone metabolism *Eur J Endocrin* 1997;137:345-346.
- [151] **Kostenuik P.J., Shalhoub V.** Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Cur Pharmacol Design* 2001;7:613-635.
- [152] **Kostenuik P.J.** Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength *Current Opinion in Pharmacology* 2005;5:618-625.
- [153] **Castillo R et al.** Impact of Smoking on Fracture Healing and Risk of Complications in Limb-Threatening Open Tibia Fractures. *J Orthop Trauma* 2005;19:151–157.
- [154] **Kuper H., Boffetta P., Adami H.O.** Tobacco use and cancer causation: association by tumor type. *J Intern Med.* 2002;252:206–224.
- [155] **Anderson T., Christensen F.B., Laursen M.** Smoking as a predictor of negative outcome in lumbar spinal fusion. *Spine* 2001;26:2623–2628.
- [156] **Ueng S.W., Lee S.S., Lin S.S.** Hyperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing of tibial lengthening: an experimental study on rabbits. *J Trauma* 1999;47:752–759.
- [157] **Adams C.I., Keating J.F., Court-Brown C.M.** Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury* 2001;32:61–65.
- [158] **Harvey E.J., Agel J., Selznick H.S.** Deleterious effect of smoking on healing of open tibia-shaft fractures. *Am J Orthop.* 2002;31:518–521.

- [159] **Hoogendoorn J.M., Van der Werken C.** The adverse effects of smoking on healing of open tibial fractures. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002;146:1640 – 1644.
- [160] **Schmitz M.A., Finnegan M., Natarajan R.** Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clin Orthop.* 1999;365:184–200.
- [161] **Marsh D.R., Shah S., Elliott J.** The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79:273–279.
- [162] **Siegel H.J., Patzakis M.J., Holtom P.D.** Limb salvage for chronic tibial osteomyelitis: an outcomes study. *J Trauma* 2000;48:484–489.
- [163] **Vestergaard P. & Mosekilde.** Fracture risk associated with smoking: a meta-analysis *Journal of Internal Medicine* 2003;254:572–583.
- [164] **Schmitz M.A., Finnegan M.A., Champine J.** Effect of smoking on the clinical healing of tibial shaft fractures. *Presented at: AAOS Meeting; 1995:Orlando, Florida.*
- [165] **Ward K., Klesges R.** A Meta-Analysis of the Effects of Cigarette Smoking on Mineral Density. *Calcif. Tissue Int.* 2001;68:259-270.
- [166] **Gerdhem P., Obrant K.J.** Effects of cigarette smoking on bone mass as assessed by dual-energy x-ray absorptiometry and ultrasound. *Osteoporos Int.* 2002;13:932–93.
- [167] **Ortego-Centeno N. et al.** Effect of tobacco consumption on bone mineral density in healthy young males. *Calcif. Tissue Int.* 1997;60:496-5.
- [168] **Zhang X.Z. et al.** The effects of gonadectomy on bone size, mass, and volumetric density in growing rats are gender-, site-, and growth hormone-specific. *J Bone Miner Res* 1999;14:802–809.
- [169] **Turner R.T. et al.** Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. *J Bone Miner Res* 1989;4:557–563.
- [170] **Kim B.T. et al.** The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats. *J Bone Miner Res* 2003;18:150–155.
- [171] **Vanderschueren D. et al.** Clinical Review: Sex Steroids and the Periosteum-Reconsidering the Roles of Androgens and Estrogens in Periosteal Expansion. *J Clin Endo & Met* 2000;91(2):378–382.
- [172] **Seeman E.** Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 2002;359:1841–1850.
- [173] **Seeman E.** Clinical review: sexual dimorphism in skeletal size, density, and strength. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4576–4584.
- [174] **Callewaert F. et al.** Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *Journal of Endocrinology* 2010;207:127–134.

- [175] **Bouillon R. et al.** Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. *J Clin Endo Met* 2004;89:6025-6029.
- [176] **Rochira V. et al.** Skeletal effects of long-term estrogen and testosterone replacement treatment in a man with congenital aromatase deficiency: evidences of a priming effect of estrogen for sex steroids action on bone. *Bone* 2007;40:1662–1668.
- [177] **Hong L. et al.** Steroid Regulation of Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells: A Gender Difference *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(3-5):180–185.
- [178] **Tonna EA.** Electron microscopic study of bone surface changes durin gaging. The loss of cellular control and biofeedback. *J Gerontol* 1978;33:163–77.
- [179] **Squier C.A., Ghoneim S., Kremenak C.R.** Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat* 1990;171:233–9.
- [180] **O'Driscoll SW et al.** The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res* 2001;19:95–103.
- [181] **De Bari C., Dell'Accio .F, Luyten F.P.** Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001;44:85–95.
- [182] **Tonna EA.** Periosteal osteoclasts, skeletal development and ageing. *Nature* 1960;185:405–7.
- [183] **Fan W. et al.** Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats. *Bone* 2008;42:81–89.
- [184] **Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI.** Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 1991;9(4):465-76.
- [185] **Brodt M. et al.** Mice Have Enhanced Endocortical Response and Normal Periosteal Response Compared With Young-Adult Mice Following 1 Week of Axial Tibial Compression. *J Bone Min Res* 2010;9:2006–2015.
- [186] **De Bari C. et al.** Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell Lineage Analysis. *Arth Rheuml* 2006;54(4):1209–1221.
- [187] **Al-Qtaitat A. et al.** Structural changes in the ageing periosteum using collagen III immunostaining and chromium labelling as indicators. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010;10(1):112-123.
- [188] **Matsumoto A. et al.** Effect of aging on bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with fibrous collagen membranes at subperiosteal sites. *J Periodont Res* 2001; 36: 175-182.
- [189] **Krzysztof H. et al.** Senescence of osteogenic cells. Review. *Medsportpress* 2007;1(6):63-67.

- [190] **Pietrzak W.S., Woodell-May J., McDonald N.** Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg.* 2006;17(1):84-90.
- [191] **Salisbury-Palomares K.** Mechanical stimulation alters tissue differentiation and molecular expression during bone healing. *Orthop Res.* 2009;27(9):1123–1132.
- [192] **Caplan AI.** The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 1994;21(3):429–435.
- [193] **Day T.F. et al.** Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005;8(5):739–750.
- [194] **Wan M., Cao X.** BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):651–657.
- [195] **French D.M., Kaul R.J., D'Souza A.L. et al.** WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am J Pathol.* 2004;165(3):855–867.
- [196] **Gerstenfeld L.C., Cruceta J., Shea C.M. et al.** Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17(2):221–230.
- [197] **Heiner D.E., Meyer M.H., Frick S.L. et al.** Gene expression during fracture healing in rats comparing intramedullary fixation to plate fixation by DNA microarray. *J Orthop Trauma.* 2006;20(1):27–38.
- [198] **Callewaert F. et al.** Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinology* 2010;207:127–134.
- [199] **Srinivasan S. et al.** Low magnitude mechanical loading becomes osteogenic when rest is inserted between each load cycle. *J Bone Min Res* 2002;17:1613–1620.
- [200] **Bass S.L. et al.** The effect of mechanical loading on the size and shape of bone in pre-, peri-, and postpubertal girls: a study in tennis players. *J Bone Min Res* 2002;17:2274–2280.
- [201] **Bustin S.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endo* 2000;25(2):169-193.
- [202] **Roche Applied Science,** “The LightCycler System”, [http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcyclerdocs/brochures/lc\\_instrument\\_brochure.pdf](http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcyclerdocs/brochures/lc_instrument_brochure.pdf)
- [203] **Roche Applied Science,** “Selection of housekeeping genes”. *Technical Note No. LC 15/2005*
- [204] **Shimizu T., Sasano Y.** Osteoblastic differentiation of periosteum derived-cells is promoted by the physical contact with the bone matrix in vivo. *The Anatomical Record* 2001;264:72-81.

- [205] **De Biase P., Capanna R.** Clinical applications of BMPs. *Injury, Int. J. Care Injured* 2005;36S:543—546.
- [206] **Gaston MS, Simpson AH.** Inhibition of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(12):1553-60.
- [207] **El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ.** Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res.* 2006;24(12): 2150-8.
- [208] **Kyrö A, Usenius JP, Aarnio M, Kunnamo I, Avikainen V.** Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol.* 1993;82(4):254-62.
- [209] **Ma Li, Sham MH, Zheng LW, Cheung LK.** Influence of Low-Dose Nicotine on Bone Healing. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care* 2011;70(6):E117-E121.
- [210] **Ma Li, Zwahlen RA, Zheng LW, Sham MH.** Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research* 2011;22(3): 338-342.
- [211] **Yamano S, Berley JA, Kuo W, Gallucci GO, Weber H-P, Sukotjo C.** Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical Oral Implants Research* 2010;21(12):1353-1359.
- [212] **Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr.** Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* 2010;110(4):447-452.
- [213] **Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J.** The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine* 2000;25:2588-94.
- [214] **Zheng LW, Ma L, Cheung LK.** Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone* 2008;43:355-61. **Knothe T., Springfield D.** A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects. *World J Surg Oncol* 2005;3:7.
- [215] **Knothe T., Springfield D.** A novel surgical procedure for bridging of massive bone defects. *World Surg Oncol* 2005;3:7.
- [216] **Knothe T. et al.** Testing of a new one-stage bone-transport surgical procedure exploiting the periosteum and bone transport for repair of long bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:307–316.
- [217] **Knothe T. et al.** Multiscale mechanobiology of de novo bone generation as well as remodeling & adaptation of autograft—an integrative review. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;4:829–840.
- [218] **Knothe T. et al.** Role of mechanical loading in healing of massive bone autografts. *J Orth*

- Res* 2010;28:1657–1684.
- [219] **Merritt F., Erinc A.M., Knothe T.** Periosteum regenerates on periosteum-denuded, transported bone segment. *Trans Orth Res Soc* 2012;50:1570.
- [220] **Sauser B.** Faster healing for severe fractures. *MIT Tech Rev* 2011;113:88.
- [221] **Knothe T.** Top down and bottom up engineering of bone. *J Biomech* 2011;44:304–312.
- [222] **Boden S.** The ABCs of BMPs. *Orthop Nurs.* 2005;24(1):49-52.
- [223] **Valentin-Opran A., Wonzey J., Csimma C., Lilly L., Riedel G.E.** Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;395:110-20.
- [224] **Canalis E., Economides A., Gazzero E.** Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24:218-35.
- [225] **Einhorn T.A. et al.** A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:1425-3.
- [226] **Sumner Dr., Turner T.M. et al.** Additive enhancement of implant fixation following combined treatment with rhTGF- $\beta$ 2 and rhBMP-2 in a canine model. *JBJS Am* 2006;88(4):806-17.
- [227] **Kuboki Y., Jin Q, et al.** Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP - induced osteogenesis and chondrogenesis. *Conect Tiss Res* 2002;43(2-3):529-534.
- [228] **Gao T.J., Kousinioris N.A. et al.** Synthetic thermoreversible polymers are compatible with osteoinductive activity of rhBMP-2. *Tissue Engin* 2002;8(3):429-440.
- [229] **Alden T.D., Varady P. et al.** BMP gene therapy. *Spine* 2002;27(16):S87-93.
- [230] **Chen Y.** Orthopaedic application of gene therapy. *J Orth Sci.* 2001;6(2):199-207.
- [231] **Tsuda H., Wada T., Ito Y., et al.** Efficient BMP-2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber mutant adenoviral vector. *Mol Ther* 2003;7(3):354-365.
- [232] **Partridge K., Yang X., Clarke N.M. et al.** Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Bioch Biophys Res Commun* 2002;292(1):144-152.
- [233] **Musgrave D.S., Pruchnik R., Bosch P. et al.** Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver BMP-2. *JBJS Br* 2002;84(1):120-127.
- [234] **Ripamonti U., Van De Heever B. et al.** Complete regeneration of bone in the baboon by rhOP-1(BMP-7). *Growth Factors* 1996;13(3-4):273-289.



- [235] **McKay B., Sandhu H.S.** Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in signal fusion applications. *Spine* 2002;27:S66-S85.
- [236] **Den Boer F.C., Bramer J.A., Blokhuis T.J., Van Soest E.J., Jenner J.M., Patka P. et al:** Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone* 2002;31:158-64.
- [237] **Sciadini M.F., Johnson K.D.** Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as bone graft substitute in a canine segmental defect model. *J. Orthop Res.* 2002;18:289-302.
- [238] **Miyamoto S. et al.** Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;278:274-85.
- [239] **Heckman J.D.** Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:1717-29.
- [240] **Minamide A. et al.** Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for signal fusion. *Spine* 2001;26:933-9.
- [241] **Friedlaender G.E. et al.** OP-1(BMP-7) in the treatment of tibial nonunions. *JBJS Am* 2001;83-A:5151-8.
- [242] **Wait K.A., Eng C.** From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP / TGF- $\beta$  family. *Nat Rev Gen* 2003;4(10):763-773.
- [243] **McKee M.D. et al.** The Canadian Orthopaedic Trauma Society. The effect of rhBMP-7 on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi - center, prospective, randomized clinical trial. *In: Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association Toronto, Ontario, Canada 2002 Oct 11-13;p. 157-8.*
- [244] **Hidaka C., Goshi K., Rawlins B.** 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.
- [245] **Burkus J.K., Transfeldt E.E., Kitchel S.H.** Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech.* 2002;15:337-34.
- [246] **Luo J. et al.** Gene Therapy for bone regeneration. *Curr Gene Ther.* 2005;5(2):167-79.
- [247] **Franceschi R.T. et al.** Gene therapy approaches for bone regeneration. *Cells Tiss Org* 2004;176(1-3):95-108.
- [248] **Glaser D., Economides A., Wang L., Liu X., Kimble R.D., Fandl J.P. et al.** In vivo somatic cell gene transfer of an engineered noggin mutein prevents BMP4 induced heterotopic

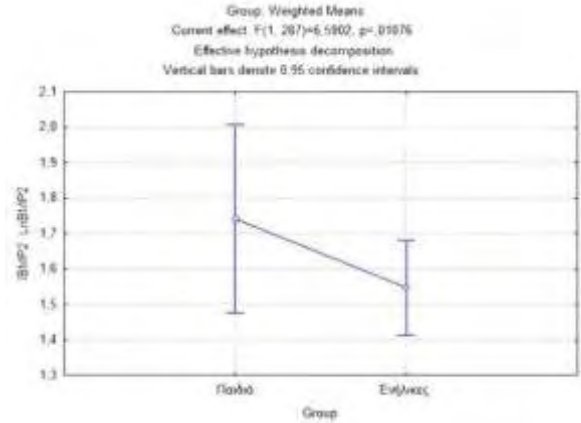
ossification. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:2332-42.

- [249] **Govender S., Csimma C., Genant H.K., Valentin-Opran A., Amit Y., Arbel R. et al:** BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. 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;84:2123-34.
- [250] **DeLong W.G. Jr., Einhorn T.A., et al.** Bone grafts and bone substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *JBJS Am.* 2007;89:649-658.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΒΜΡ-2

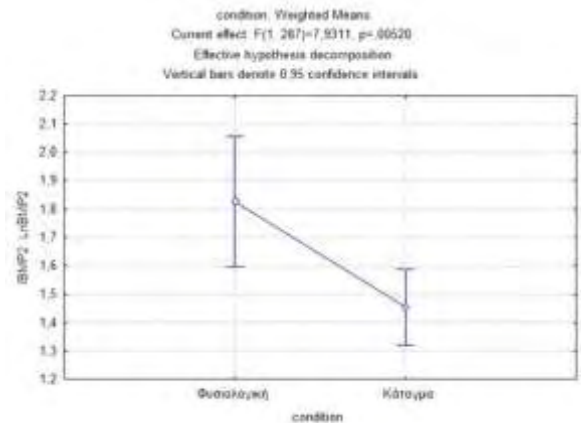
Γράφημα 1

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0419, df = 287,00			
Cell No.	Group	{1}	{2}
1	Παιδιά	1,7410	0,191547
2	Ενήλικες	0,191547	



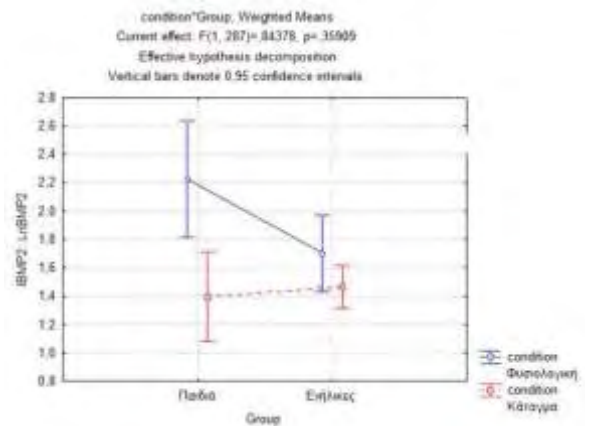
Γράφημα 2

Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0419, df = 287,00			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	1,8265	0,002672
2	Κάταγμα	0,002672	1,4538



Γράφημα 3

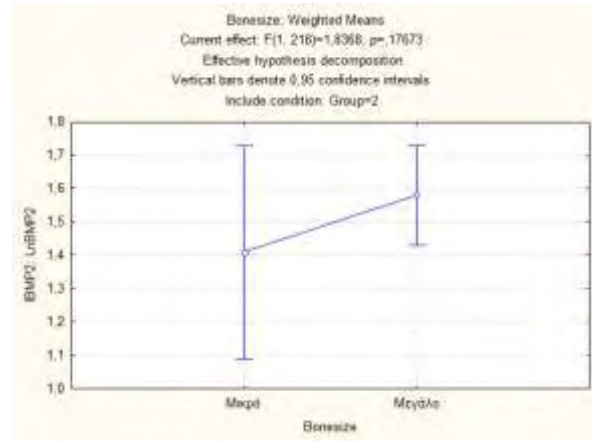
Bonferroni test; variable IBMP2 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0419, df = 287,00						
Cell No.	condition	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Παιδιά	2,2257	1,7048	1,3948	1,4669
2	Φυσιολογική	Ενήλικες	0,157629	0,157629	0,801908	0,526950
3	Κάταγμα	Παιδιά	0,012412	0,801908	0,000000	1,000000
4	Κάταγμα	Ενήλικες	0,003814	0,526950	1,000000	1,000000



## Γράφημα 4

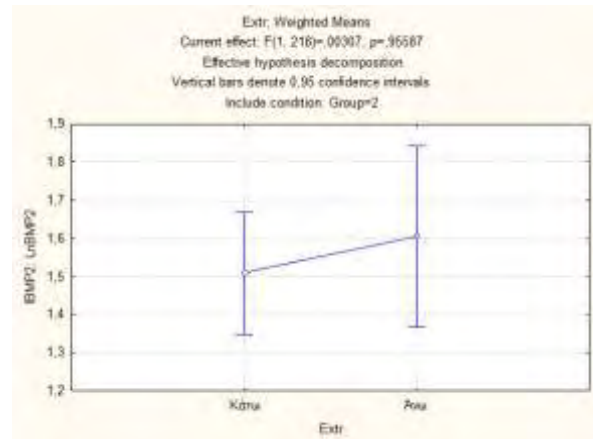
224

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό	1,4091	0,306030
2	Μεγάλο	0,306030	



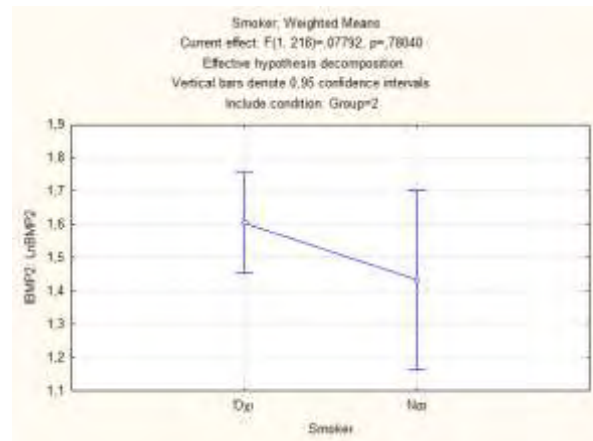
## Γράφημα 5

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω	1,5092	0,474338
2	Άνω	0,474338	



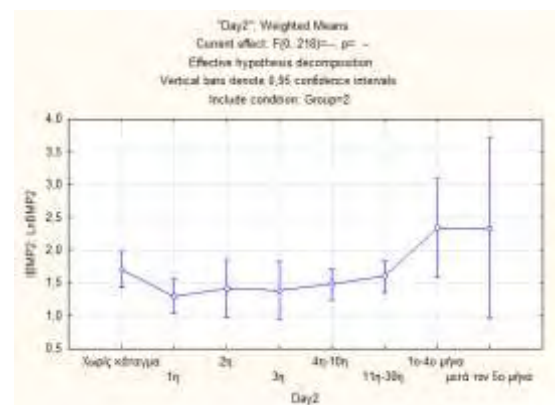
## Γράφημα 6

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Smoker	{1}	{2}
1	Όχι	1,6054	0,221097
2	Ναι	0,221097	



## Γράφημα 7

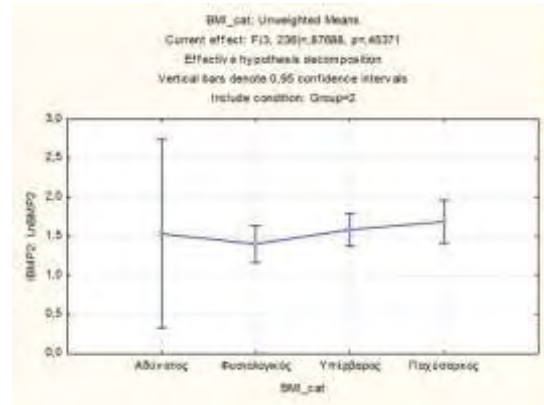
Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2									
Cell No.	Day2	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
1	Χωρίς κάταγμα	1,7048	1,2988	1,4153	1,3868	1,4804	1,6051	2,3406	2,3383
2	1η	0,534260	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	2η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,200103	0,827606
4	3η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,753256	1,000000
5	4η-10η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,721186	1,000000
6	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
7	1ο-4ο μήνα	1,000000	0,200103	0,753256	0,721186	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
8	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	0,827606	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000



## Γράφημα 8

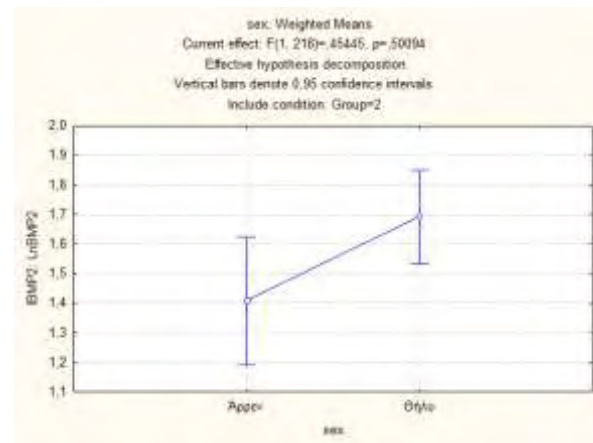
225

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00					
Cell No.	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Αδύνατος	1,5313	1,4012	1,5844	1,6868
2	Φυσιολογικός	1,000000		1,000000	0,645731
3	Υπέρβαρος	1,000000	1,000000		1,000000
4	Παχύσαρκος	1,000000	0,645731	1,000000	



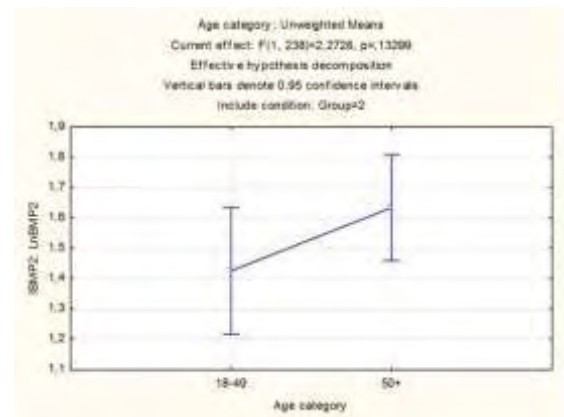
## Γράφημα 9

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν	1,4086	0,032564
2	Θήλυ	0,032564	



## Γράφημα 10

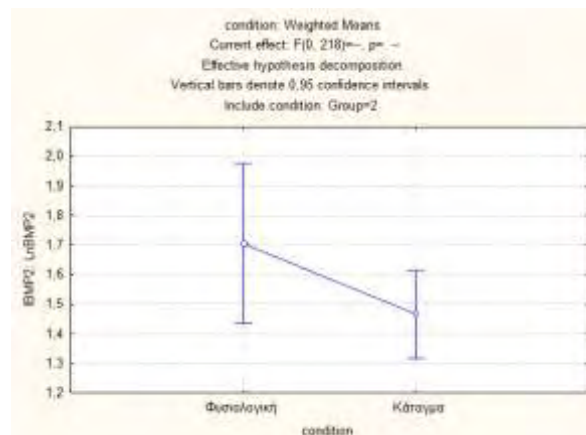
Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,1150, df = 238,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Age category	{1}	{2}
1	18-49	1,4255	0,132988
2	50+	0,132988	



## Γράφημα 11

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	1,7048	0,088679
2	Κάταγμα	0,088679	

Newman-Keuls test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	1,7048	0,087259
2	Κάταγμα	0,087259	





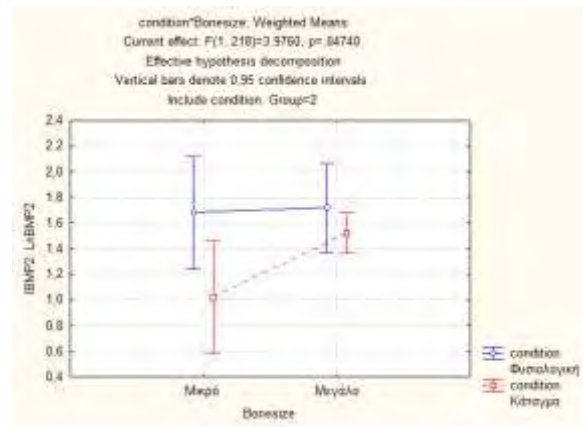
### Γράφημα 12

Bonferroni test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	condition	Bonesize	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Μικρό	1,6808	1,000000	0,196685	1,000000
2	Φυσιολογική	Μεγάλο	1,000000		0,068889	1,000000
3	Κάταγμα	Μικρό	0,196685	0,068889		0,269283
4	Κάταγμα	Μεγάλο	1,000000	1,000000	0,269283	

Newman-Keuls test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	condition	Bonesize	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Μικρό	1,6808	0,883862	0,020008	0,531957
2	Φυσιολογική	Μεγάλο	0,883862		0,024191	0,720781
3	Κάταγμα	Μικρό	0,020008	0,024191		0,039654
4	Κάταγμα	Μεγάλο	0,531957	0,720781	0,039654	



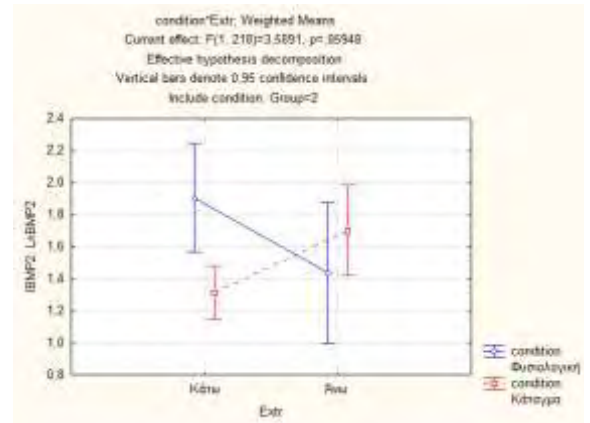
### Γράφημα 13

Bonferroni test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	condition	Extr	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Κάτω	1,9047	1,4363	1,3156	1,7011
2	Φυσιολογική	Άνω	0,248148	0,248148	0,008374	1,000000
3	Κάταγμα	Κάτω	0,008374	1,000000		0,129348
4	Κάταγμα	Άνω	1,000000	1,000000	0,129348	

Newman-Keuls test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	condition	Extr	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Κάτω	1,9047	1,4363	1,3156	1,7011
2	Φυσιολογική	Άνω	0,049938	0,049938	0,016840	0,308204
3	Κάταγμα	Κάτω	0,016840	0,545555		0,130355
4	Κάταγμα	Άνω	0,308204	0,185099	0,130355	



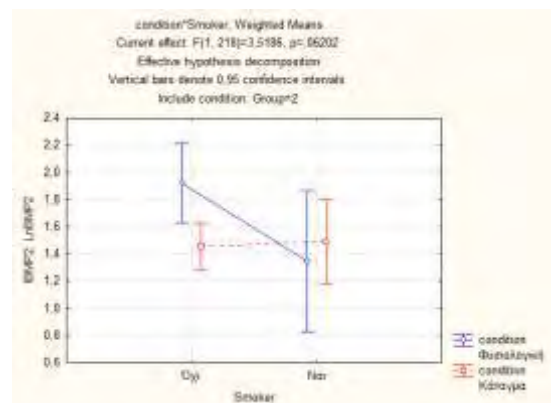
### Γράφημα 14

Bonferroni test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	condition	Smoker	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Όχι	1,9226	1,3466	1,4571	1,4887
2	Φυσιολογική	Ναι	0,084842	0,084842	0,047029	0,210118
3	Κάταγμα	Όχι	0,047029	1,000000		1,000000
4	Κάταγμα	Ναι	0,210118	1,000000	1,000000	

Newman-Keuls test: variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

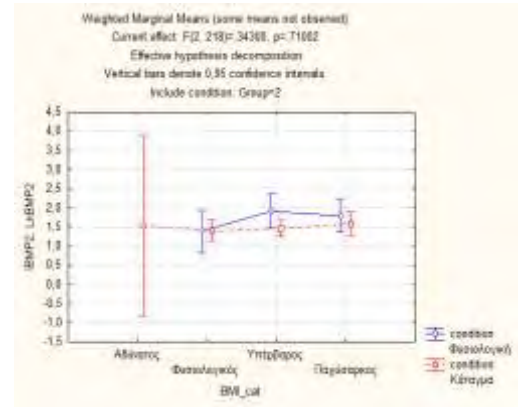
Cell No.	condition	Smoker	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Όχι	1,9226	1,3466	1,4571	1,4887
2	Φυσιολογική	Ναι	0,026951	0,026951	0,062146	0,035484
3	Κάταγμα	Όχι	0,062146	0,592451		0,770117
4	Κάταγμα	Ναι	0,035484	0,770117	0,878113	



### Γράφημα 15

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

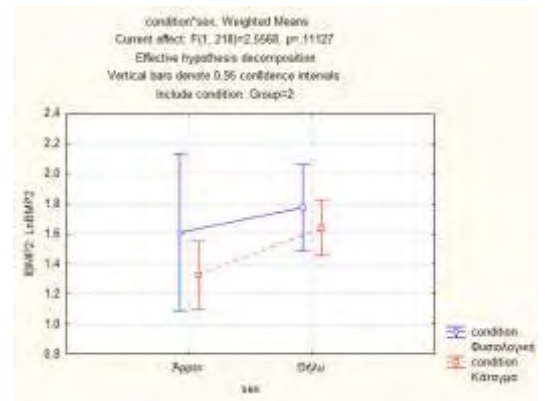
Cell No.	condition	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Φυσιολογική	Αδύνατος	---	1,3840	1,9118	1,7959	1,5313	1,4096	1,4571	1,5850
2	Φυσιολογική	Φυσιολογικός			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Φυσιολογική	Υπέρβαρος		1,000000		1,000000	1,000000	0,771310	0,990860	1,000000
4	Φυσιολογική	Παχύσαρκος		1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	Κάταγμα	Αδύνατος		1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
6	Κάταγμα	Φυσιολογικός		1,000000	0,771310	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
7	Κάταγμα	Υπέρβαρος		1,000000	0,990860	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
8	Κάταγμα	Παχύσαρκος		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	



### Γράφημα 16

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0452, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

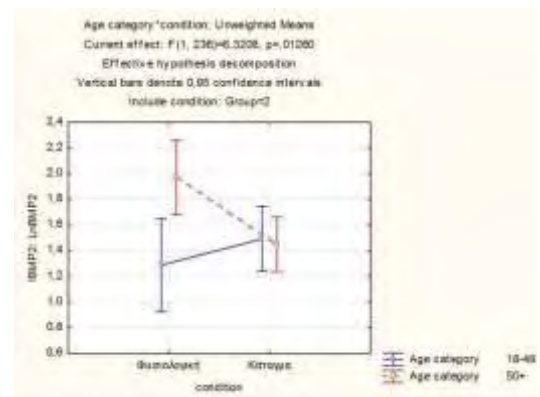
Cell No.	condition	sex	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Άρρεν	1,6112	1,7746	1,3270	1,6382
2	Φυσιολογική	Θήλυ	1,000000		0,998753	1,000000
3	Κάταγμα	Άρρεν	0,998753	0,098553		0,350190
4	Κάταγμα	Θήλυ	1,000000	1,000000	0,350190	



### Γράφημα 17

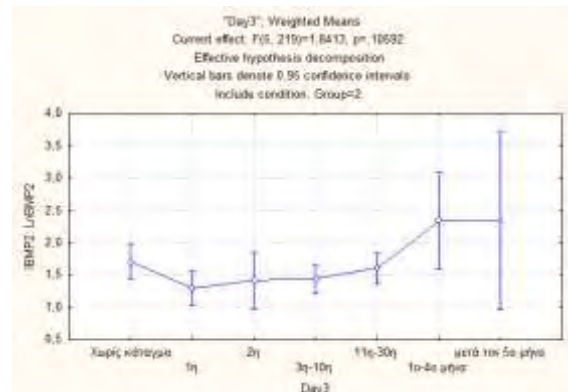
Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,0832, df = 236,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	Age category	condition	{1}	{2}	{3}	{4}
1	18-49	Φυσιολογική	1,2876	1,4914	1,9718	1,4486
2	18-49	Κάταγμα	1,000000		0,024199	1,000000
3	50+	Φυσιολογική	0,024199	0,085324		0,026138
4	50+	Κάταγμα	1,000000	1,000000	0,026138	

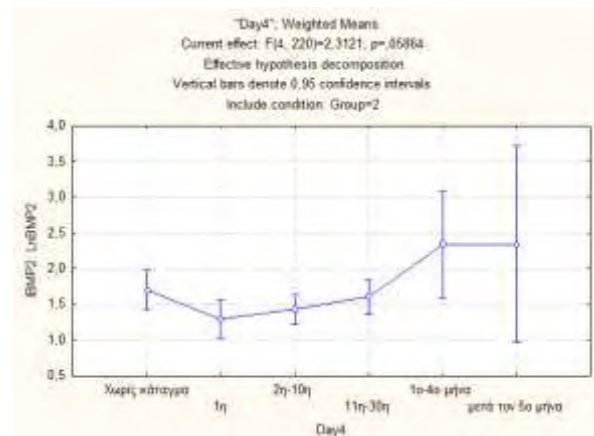


## Γράφημα 18

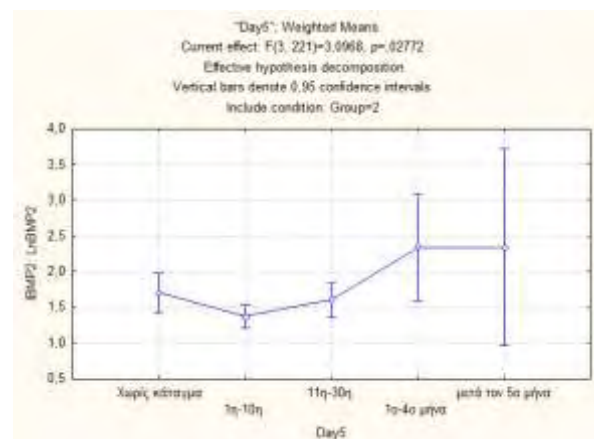
Bonferroni test, variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1.0419, df = 219,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Day3	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1	Χωρίς κάταγμα	1.7048	1.2966	1.4153	1.4386	1.6051	2.3406	2.3383
2	1η	0.396634	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
3	2η	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.148128	0.615195
4	3η-10η	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.559775	1.000000
5	11η-30η	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.457696	1.000000
6	1ο-4ο μήνα	1.000000	0.148128	0.559775	0.457696	1.000000	1.000000	1.000000
7	μετά τον 5ο μήνα	1.000000	0.615195	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000



Bonferroni test, variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1.0372, df = 220,00 Include condition: Group=2							
Cell No.	Day4	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	Χωρίς κάταγμα	1.7048	1.2966	1.4305	1.6051	2.3406	2.3383
2	1η	0.279255	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
3	2η-10η	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.103866	0.433911
4	11η-30η	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	0.259935	0.828199
5	1ο-4ο μήνα	1.000000	0.103866	0.259935	1.000000	1.000000	1.000000
6	μετά τον 5ο μήνα	1.000000	0.433911	0.828199	1.000000	1.000000	1.000000



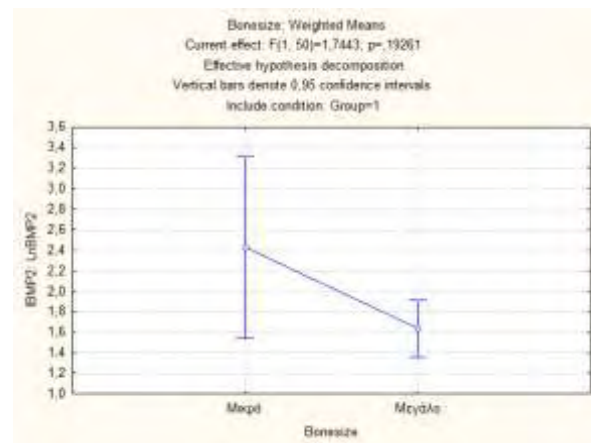
Bonferroni test, variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1.0325, df = 221,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	Day5	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	Χωρίς κάταγμα	1.7048	1.3691	1.6051	2.3406	2.3383
2	1η-10η	0.194864	1.000000	1.000000	0.925995	1.000000
3	11η-30η	1.000000	1.000000	1.000000	0.092341	0.374077
4	1ο-4ο μήνα	0.925995	0.092341	1.000000	1.000000	1.000000
5	μετά τον 5ο μήνα	1.000000	0.374077	1.000000	1.000000	1.000000





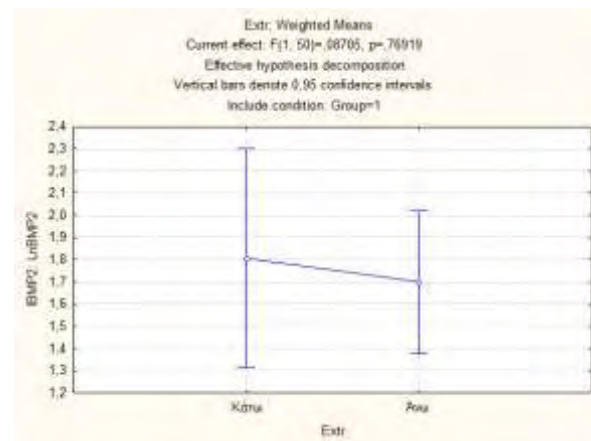
## Γράφημα 19

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,88376, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό		0,031302
2	Μεγάλο	0,031302	



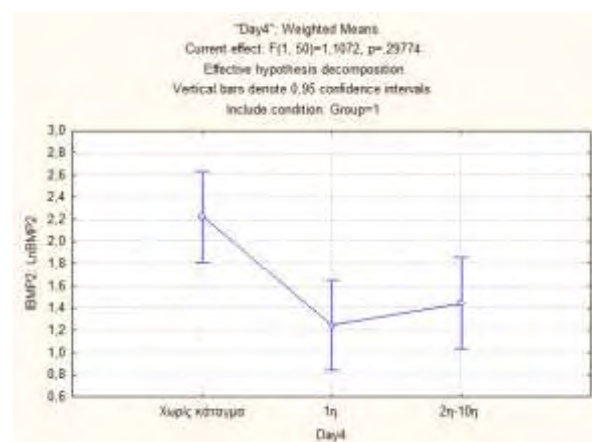
## Γράφημα 20

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,88376, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω		0,666868
2	Άνω	0,666868	



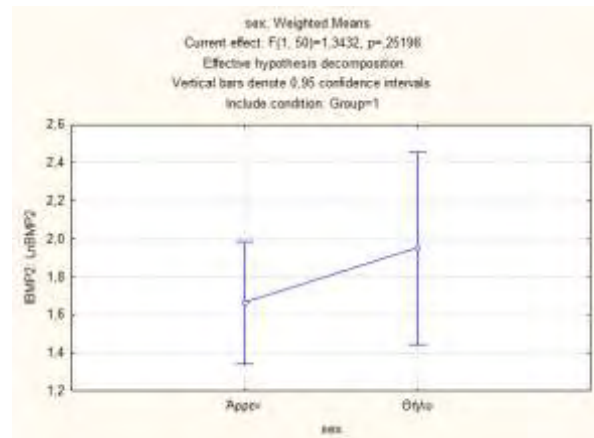
## Γράφημα 21

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,88376, df = 50,000 Include condition: Group=1				
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα		0,030375	0,013946
2	1η	0,030375		1,000000
3	2η-10η	0,013946	1,000000	



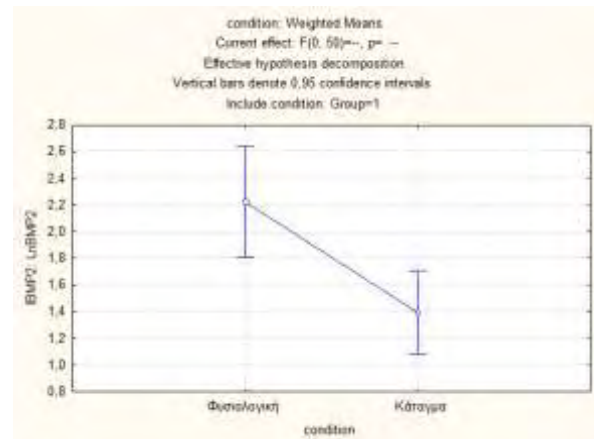
## Γράφημα 22

Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,88376, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν	1,6644	0,300283
2	Θήλυ	0,300283	



## Γράφημα 23

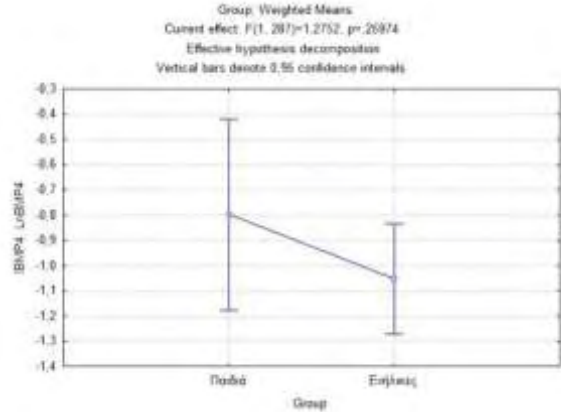
Bonferroni test; variable IBMP2 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = ,88376, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	2,2257	0,001433
2	Κάταγμα	0,001433	



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΒΜΡ-4

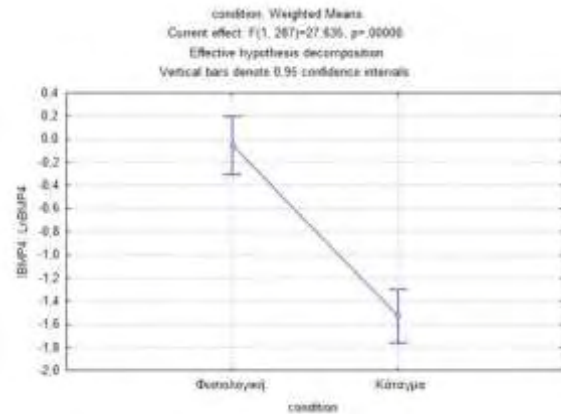
Γράφημα 1

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,1989, df = 287,00			
Cell No.	Group	{1}	{2}
1	Παιδιά		0,236507
2	Ενήλικες	0,236507	



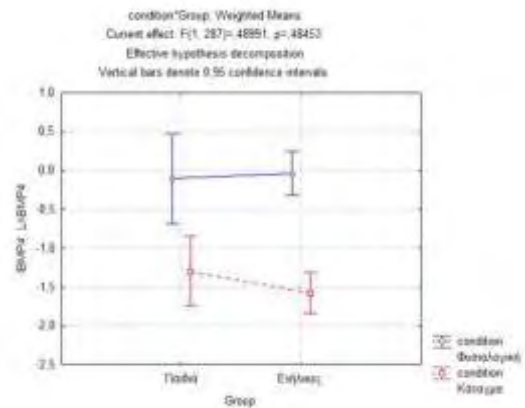
Γράφημα 2

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,1989, df = 287,00			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική		0,000000
2	Κάταγμα	0,000000	



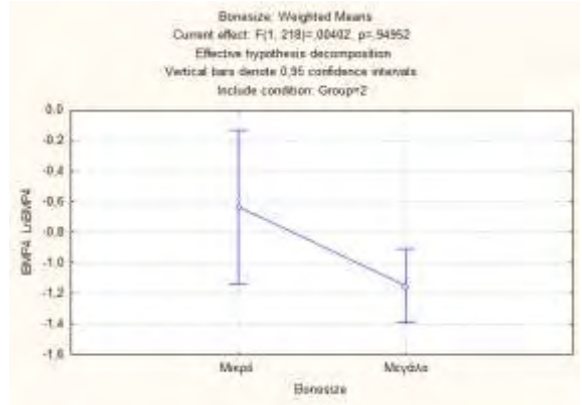
Γράφημα 3

Bonferroni test; variable IBMP4 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,1989, df = 287,00						
Cell No.	condition	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Παιδιά		1,000000	0,013951	0,000034
2	Φυσιολογική	Ενήλικες	1,000000		0,000215	0,000000
3	Κάταγμα	Παιδιά	0,013951	0,000215		1,000000
4	Κάταγμα	Ενήλικες	0,000034	0,000000	1,000000	



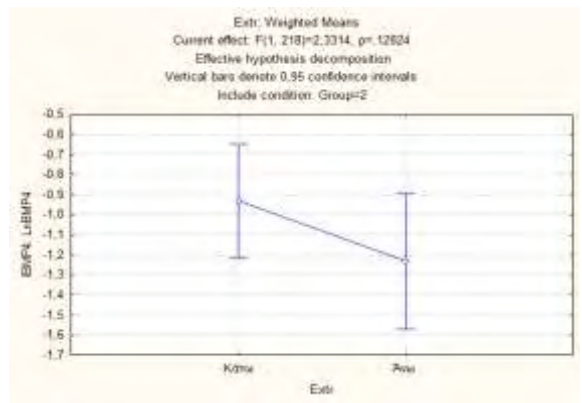
### Γράφημα 4

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό	-,6342	0,042000
2	Μεγάλο	0,042000	



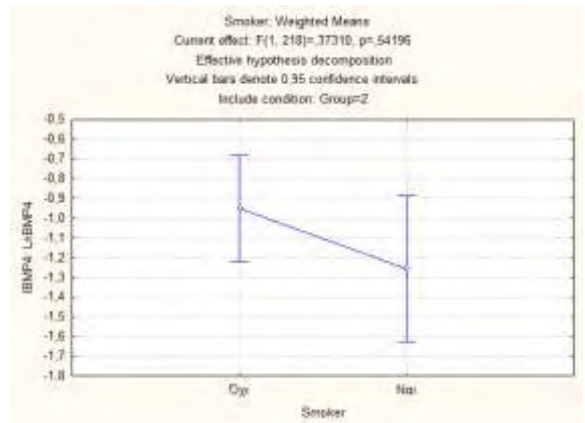
### Γράφημα 5

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω	-,9306	0,139526
2	Ανω	0,139526	



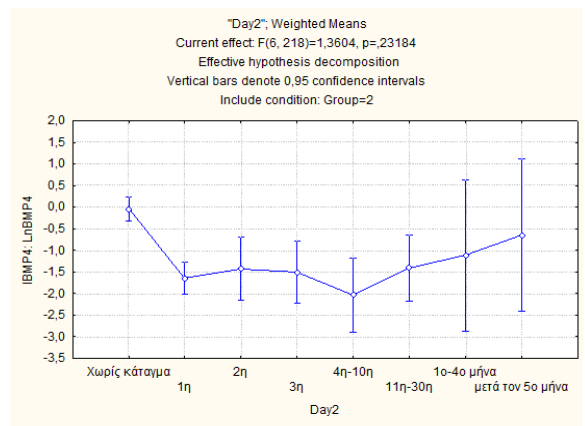
### Γράφημα 6

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Smoker	{1}	{2}
1	Όχι	-,9503	0,149235
2	Ναι	0,149235	



### Γράφημα 7

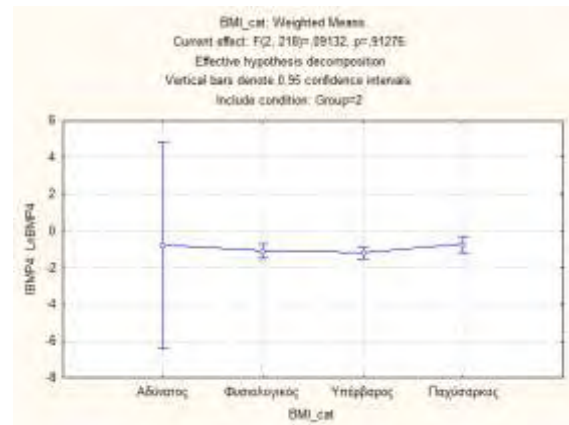
Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2									
Cell No.	Day2	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Χωρίς κάπνα	-,0383	-1,639	-1,433	-1,500	-2,039	-1,407	-1,121	-6,430
2	1η	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	2η	0,002821	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	3η	0,003897	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	4η-10η	0,000001	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
6	11η-30η	0,125176	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
7	1η-4η μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
8	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000





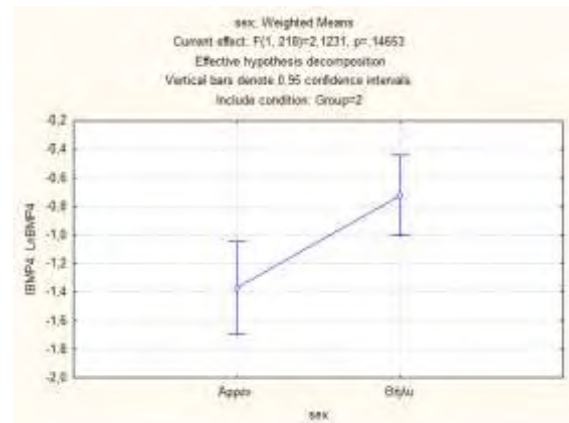
## Γράφημα 8

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2					
Cell No.	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Αδύνατος	-.7659	-1,099	-1,204	-.7408
2	Φυσιολογικός	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Υπέρβαρος	1,000000	1,000000		0,419872
4	Παχύσαρκος	1,000000	1,000000	0,419872	



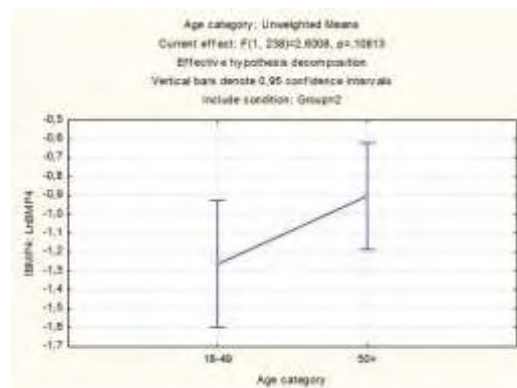
## Γράφημα 9

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν	-1,371	-7,228
2	Θήλυ	0,001309	0,001309



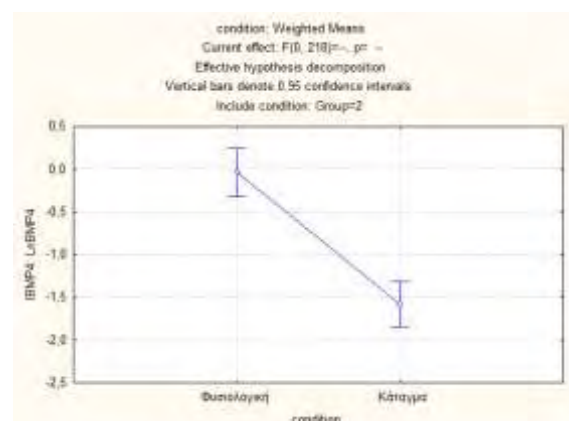
## Γράφημα 10

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,8975, df = 238,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Age category	{1}	{2}
1	18-49	-1,264	-.9038
2	50+	0,108132	0,108132



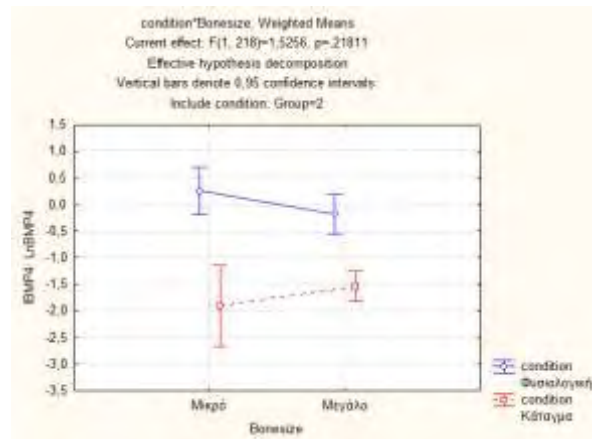
## Γράφημα 11

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	-.0383	-1,578
2	Κάταγμα	0,000000	0,000000



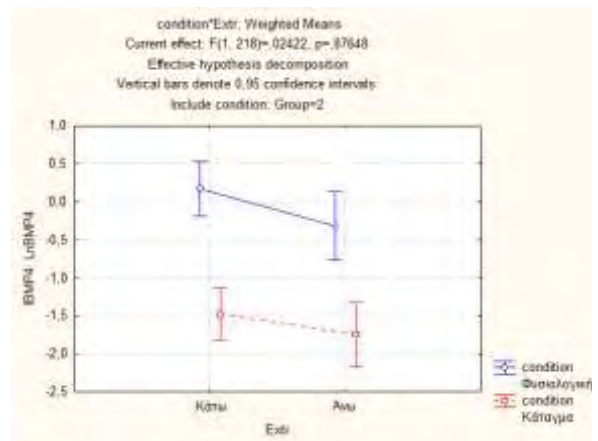
### Γράφημα 12

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Bonesize	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Μικρό	26003	1,000000	0,000029	0,000001
2	Φυσιολογική	Μεγάλο	1,000000		0,000238	0,000001
3	Κάταγμα	Μικρό	0,000029	0,000238		1,000000
4	Κάταγμα	Μεγάλο	0,000001	0,000001	1,000000	



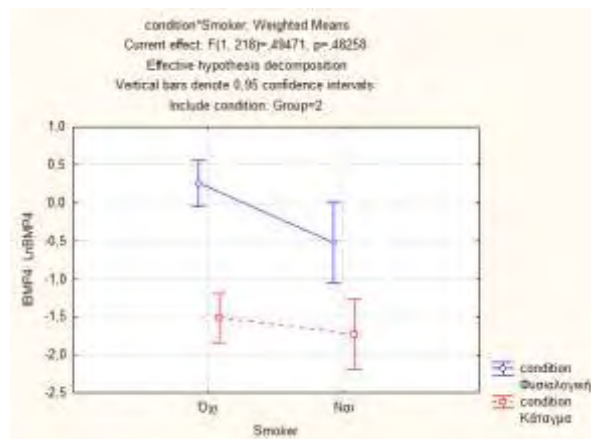
### Γράφημα 13

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Extr	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Κάτω	,17164	0,925222	0,000000	0,000000
2	Φυσιολογική	Άνω	0,925222		0,001218	0,000113
3	Κάταγμα	Κάτω	0,000000	0,001218		1,000000
4	Κάταγμα	Άνω	0,000000	0,000113	1,000000	



### Γράφημα 14

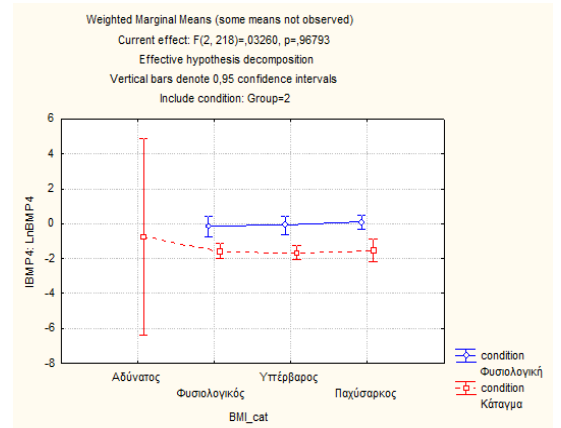
Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Smoker	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Όχι	,25383	0,172239	0,000000	0,000000
2	Φυσιολογική	Ναι	0,172239		0,010420	0,004789
3	Κάταγμα	Όχι	0,000000	0,010420		1,000000
4	Κάταγμα	Ναι	0,000000	0,004789	1,000000	



Γράφημα 15

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 2,3746, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

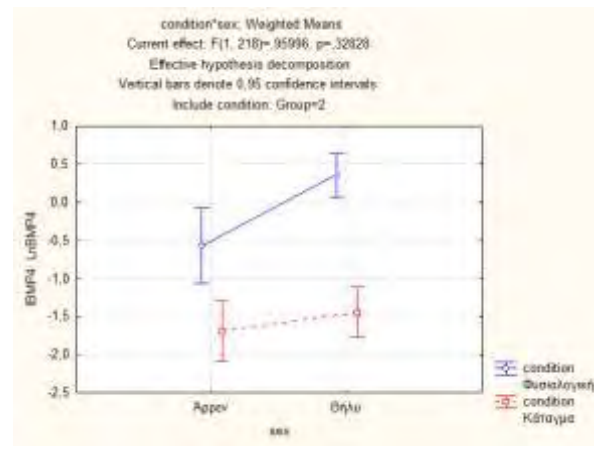
Cell No.	condition	BMI_cat	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
1	Φυσιολογική	Αδύνατος								
2	Φυσιολογική	Φυσιολογικός		1,000000	1,000000	1,000000	0,003129	0,000653	0,021089	
3	Φυσιολογική	Υπερβαρος	1,000000		1,000000	1,000000	0,000896	0,000168	0,009104	
4	Φυσιολογική	Παχύσαρκος	1,000000	1,000000		1,000000	0,000139	0,000018	0,001906	
5	Κάταγμα	Αδύνατος	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	
6	Κάταγμα	Φυσιολογικός	0,003129	0,000653	0,000139	1,000000		1,000000	1,000000	
7	Κάταγμα	Υπερβαρος	0,000653	0,000168	0,000018	1,000000	1,000000		1,000000	
8	Κάταγμα	Παχύσαρκος	0,021089	0,009104	0,001906	1,000000	1,000000	1,000000		



Γράφημα 16

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 2,3449, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

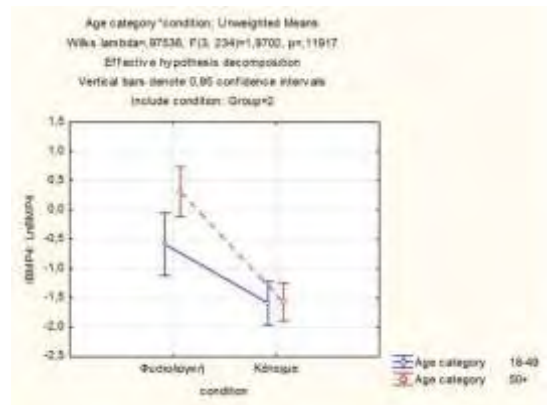
Cell No.	condition	sex	(1)	(2)	(3)	(4)
1	Φυσιολογική	Άρρεν		0,043531	0,002142	0,042017
2	Φυσιολογική	Θήλυ	0,043531		0,000000	0,000000
3	Κάταγμα	Άρρεν	0,002142	0,000000		1,000000
4	Κάταγμα	Θήλυ	0,042017	0,000000	1,000000	



Γράφημα 17

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 2,3449, df = 236,00  
 Include condition: Group=2

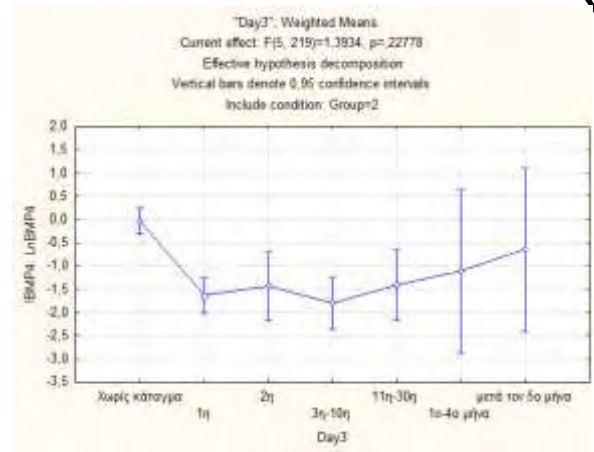
Cell No.	Age category	condition	(1)	(2)	(3)	(4)
1	18-49	Φυσιολογική		0,015803	0,061238	0,011720
2	18-49	Κάταγμα	0,015803		0,000000	1,000000
3	50+	Φυσιολογική	0,061238	0,000000		0,000000
4	50+	Κάταγμα	0,011720	1,000000	0,000000	



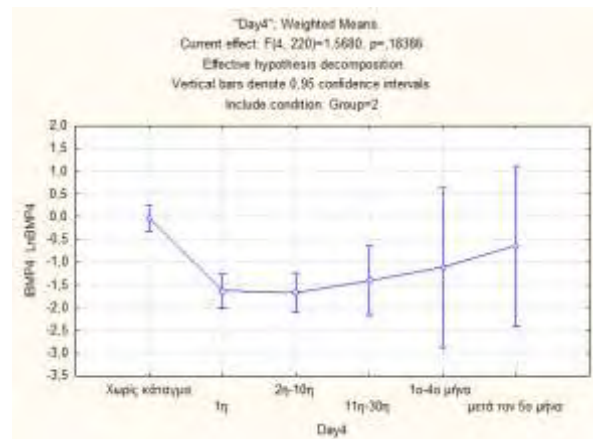


## Γράφημα 18

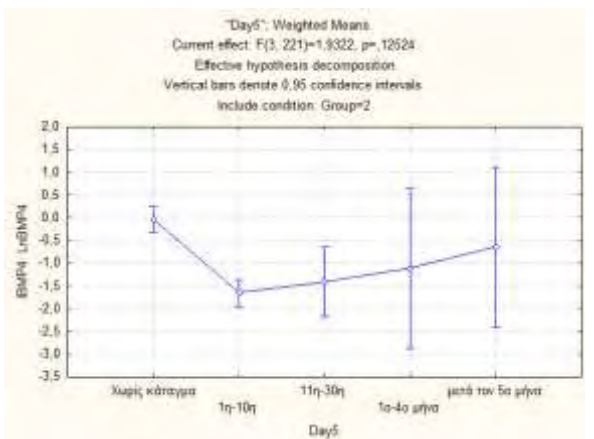
Bonferroni test; variable lBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3767, df = 219,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Day3	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1	Χωρίς κάταγμα	-0,0383	-1,639	-1,433	-1,798	-1,407	-1,121	-6430
2	1η	0,000000	0,000000	0,002127	0,000000	0,094199	1,000000	1,000000
3	2η	0,002127	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	3η-10η	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	11η-30η	0,094199	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
6	1α-4α μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
7	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000



Bonferroni test; variable lBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3735, df = 220,00 Include condition: Group=2							
Cell No.	Day4	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	Χωρίς κάταγμα	-0,0383	-1,639	-1,671	-1,407	-1,121	-6430
2	1η	0,000000	0,000000	0,000000	0,066861	0,886726	1,000000
3	2η-10η	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	11η-30η	0,066861	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	1α-4α μήνα	0,886726	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
6	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000



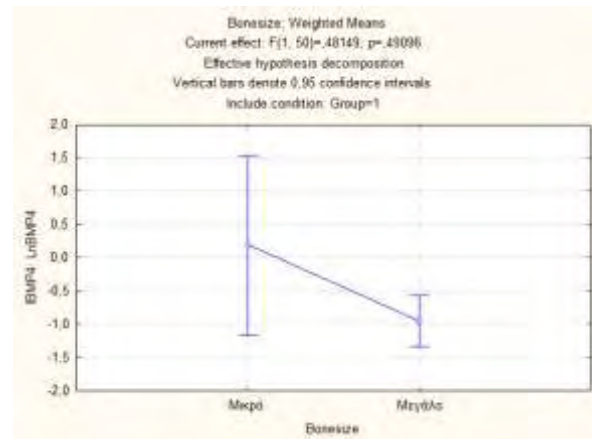
Bonferroni test; variable lBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 2,3680, df = 221,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	Day5	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	Χωρίς κάταγμα	-0,0383	-1,656	-1,407	-1,121	-6430
2	1η-10η	0,000000	0,000000	0,044105	0,588180	1,000000
3	11η-30η	0,044105	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	1α-4α μήνα	0,588180	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000





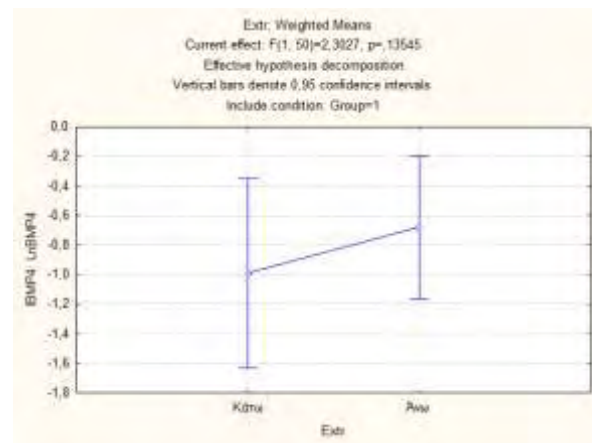
## Γράφημα 19

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5338, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό		0,018613
2	Μεγάλο	0,018613	



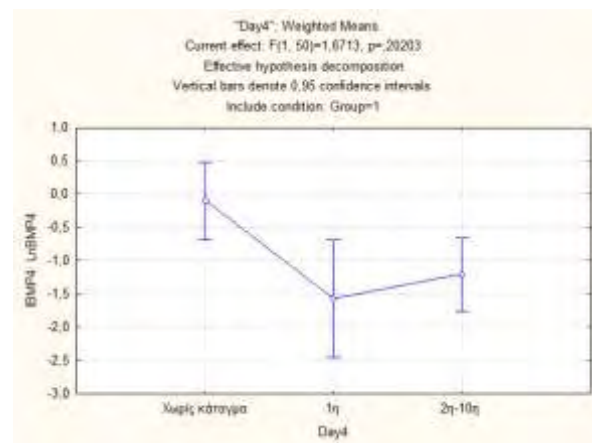
## Γράφημα 20

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5338, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω		0,344243
2	Ανω	0,344243	



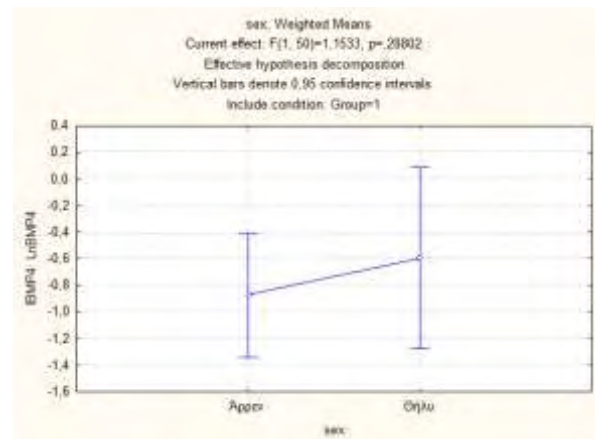
## Γράφημα 21

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5338, df = 50,000 Include condition: Group=1				
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα		0,011362	0,007789
2	1η	0,011362		1,000000
3	2η-10η	0,007789	1,000000	



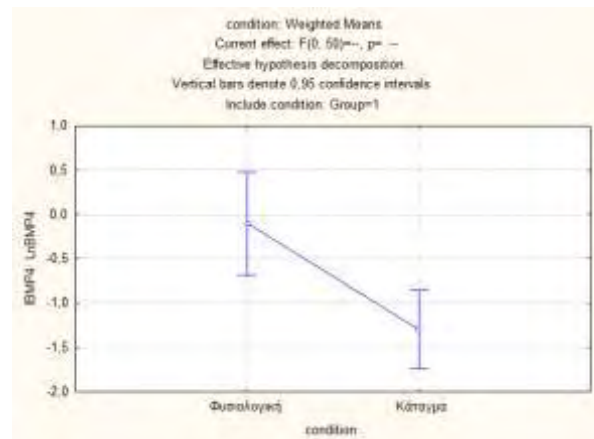
## Γράφημα 22

Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5338, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν	-0,8725	0,444235
2	Θήλυ	0,444235	



## Γράφημα 23

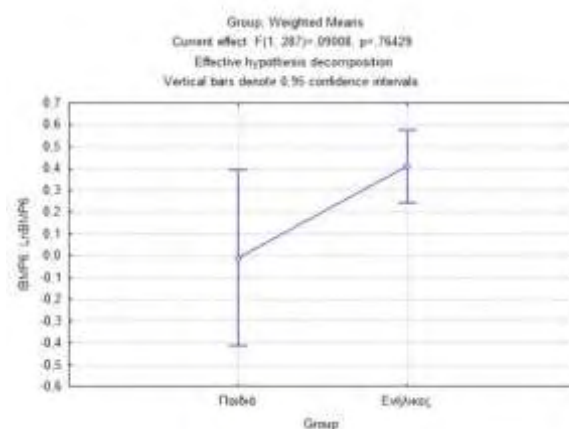
Bonferroni test; variable IBMP4 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5338, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	-1,1022	0,000573
2	Κάταγμα	0,000573	



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΒΜΡ-6

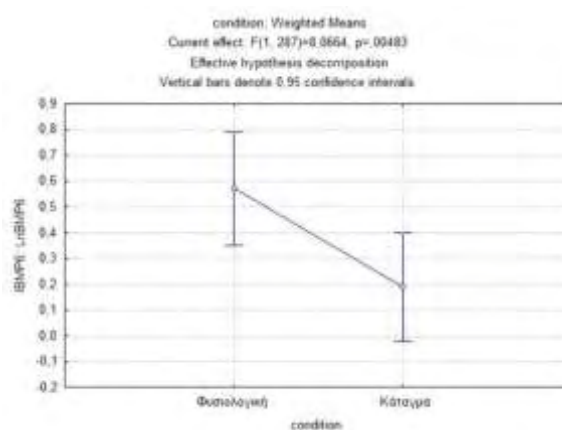
Γράφημα 1

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6968, df = 287,00			
Cell No.	Group	{1}	{2}
1	Παιδιά	-,0096	,40911
2	Ενήλικες	<b>0,026708</b>	



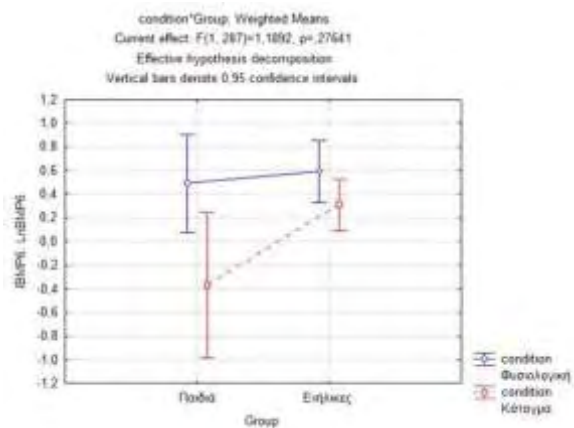
Γράφημα 2

Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6968, df = 287,00			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	,57168	,18880
2	Κάταγμα	<b>0,015346</b>	



Γράφημα 3

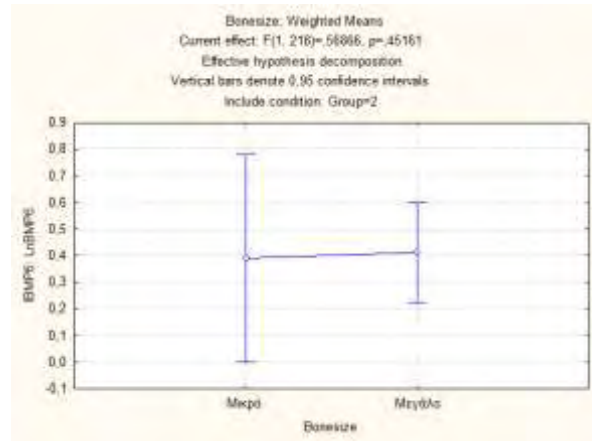
Bonferroni test; variable IBMP6 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6968, df = 287,00						
Cell No.	condition	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Παιδιά	,49136	,59617	-,3675	,31203
2	Φυσιολογική	Ενήλικες	1,000000		<b>0,001774</b>	<b>0,660647</b>
3	Κάταγμα	Παιδιά	0,074099	<b>0,001774</b>		<b>0,033498</b>
4	Κάταγμα	Ενήλικες	1,000000	0,660647	<b>0,033498</b>	



### Γράφημα 4

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

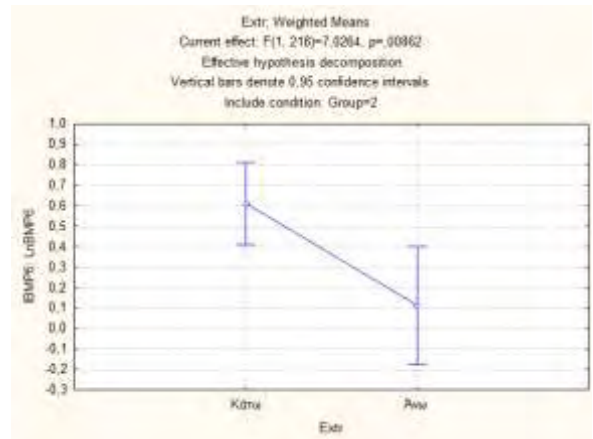
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό	,39061	,41350
2	Μεγάλο	0,911814	



### Γράφημα 5

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

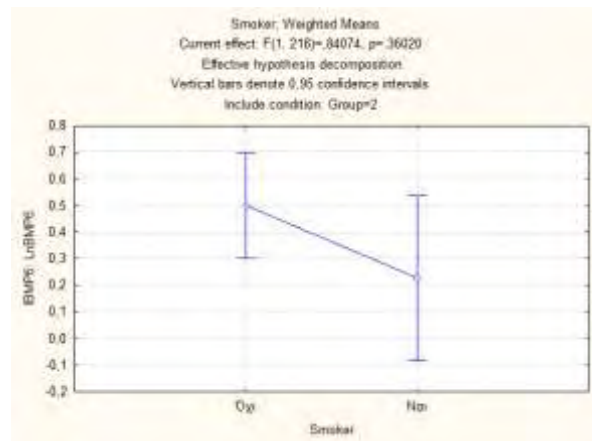
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω	,61037	,11241
2	Άνω	0,002947	



### Γράφημα 6

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

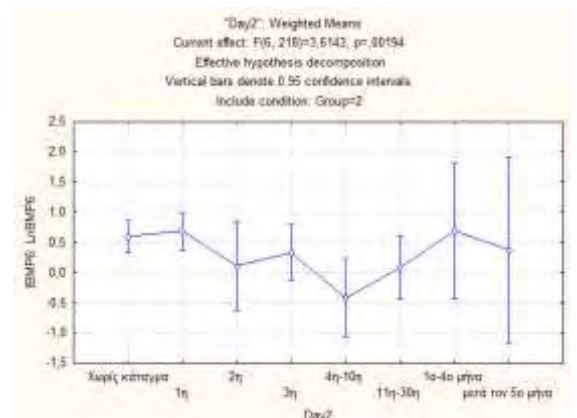
Cell No.	Smoker	{1}	{2}
1	Όχι	,49986	,22761
2	Ναι	0,115726	



### Γράφημα 7

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

Cell No.	Day2	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
1	Χωρίς κάπνισμα	,59817	,69693	,11468	,33105	-,4182	,08641	,69012	,37907
2	1η	1,000000		1,000000	1,000000	0,011857	1,000000	1,000000	1,000000
3	2η	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	3η	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	4η-10η	0,011857	0,006390	1,000000	1,000000		1,000000	0,854380	1,000000
6	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
7	1ο-4ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,854380	1,000000		1,000000
8	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

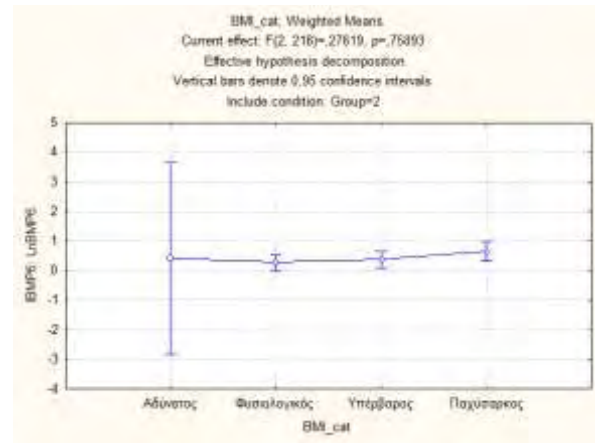




### Γράφημα 8

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

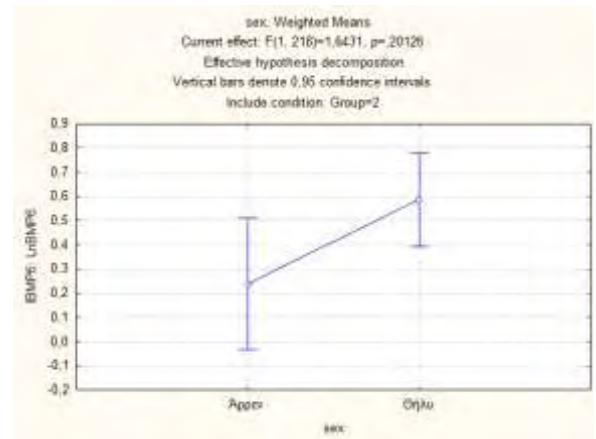
Cell No.	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Αδύνατος		1,000000	1,000000	1,000000
2	Φυσιολογικός	1,000000		1,000000	0,619553
3	Υπέρβαρος	1,000000	1,000000		1,000000
4	Παχύσαρκος	1,000000	0,619553	1,000000	



### Γράφημα 9

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

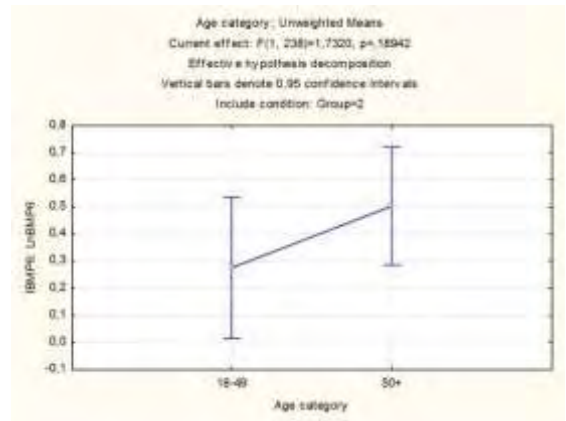
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν		0,033914
2	Θήλυ	0,033914	



### Γράφημα 10

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,7335, df = 238,00  
 Include condition: Group=2

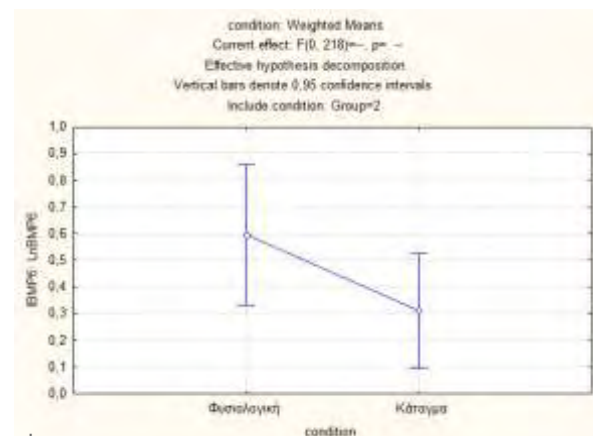
Cell No.	Age category	{1}	{2}
1	18-49		0,189421
2	50+	0,189421	



### Γράφημα 11

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

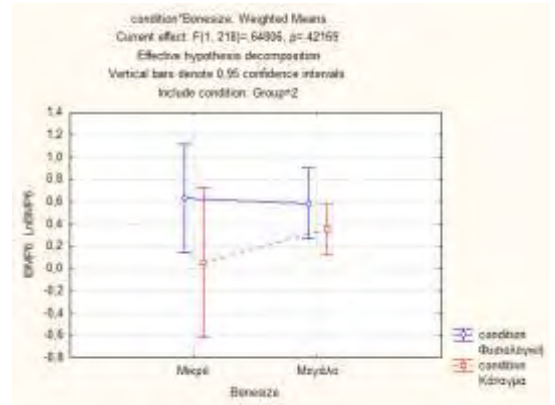
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική		0,098697
2	Κάταγμα	0,098697	



### Γράφημα 12

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

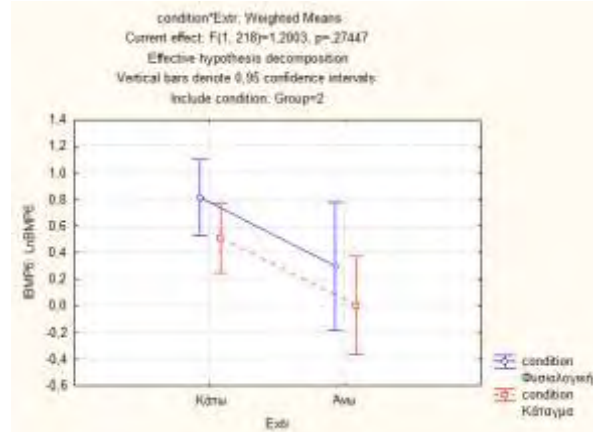
Cell No.	condition	Bonesize	{1}	{2}	{3}	{4}
			.62847	.58031	.05259	.34749
1	Φυσιολογική	Μικρό		1,000000	0,768346	1,000000
2	Φυσιολογική	Μεγάλο	1,000000		0,699900	1,000000
3	Κάταγμα	Μικρό	0,768346	0,699900		1,000000
4	Κάταγμα	Μεγάλο	1,000000	1,000000	1,000000	



### Γράφημα 13

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

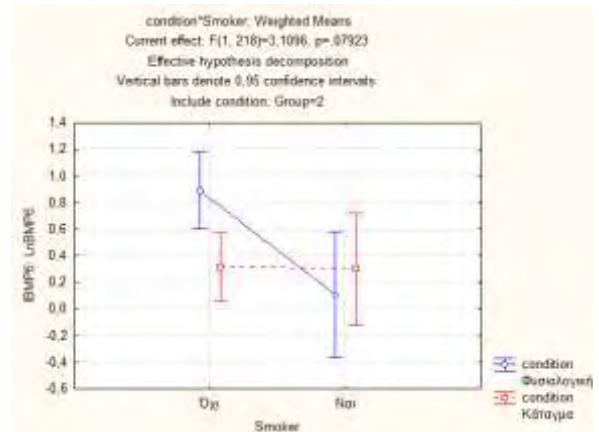
Cell No.	condition	Extr	{1}	{2}	{3}	{4}
			.81640	.30043	.50950	.00626
1	Φυσιολογική	Κάτω		0,406584	1,000000	<b>0,006176</b>
2	Φυσιολογική	Άνω	0,406584		1,000000	1,000000
3	Κάταγμα	Κάτω	1,000000	1,000000		0,089610
4	Κάταγμα	Άνω	<b>0,006176</b>	1,000000	0,089610	



### Γράφημα 14

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

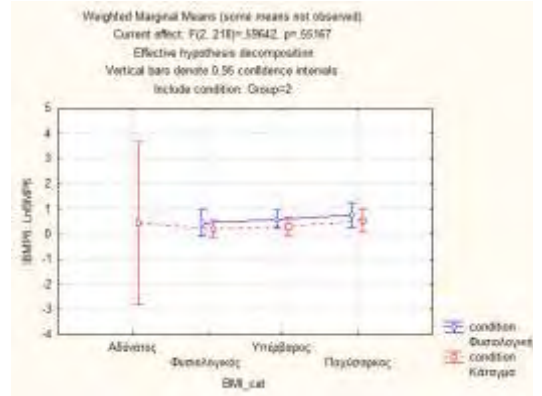
Cell No.	condition	Smoker	{1}	{2}	{3}	{4}
			.89177	.10985	.31649	.30212
1	Φυσιολογική	Όχι		<b>0,041444</b>	<b>0,045720</b>	0,120676
2	Φυσιολογική	Ναι	<b>0,041444</b>		1,000000	1,000000
3	Κάταγμα	Όχι	<b>0,045720</b>	1,000000		1,000000
4	Κάταγμα	Ναι	0,120676	1,000000	1,000000	



### Γράφημα 15

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

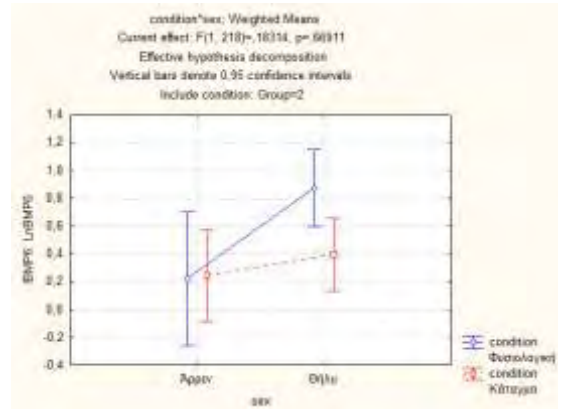
Cell No.	condition	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Φυσιολογική	Αδύνατος								
2	Φυσιολογική	Φυσιολογικός			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Φυσιολογική	Υπέρβαρος	1,000000			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	Φυσιολογική	Παχυσαρκός	1,000000	1,000000			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	Κάταγμα	Αδύνατος	1,000000	1,000000	1,000000			1,000000	1,000000	1,000000
6	Κάταγμα	Φυσιολογικός	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			1,000000	1,000000
7	Κάταγμα	Υπέρβαρος	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			1,000000
8	Κάταγμα	Παχυσαρκός	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		



### Γράφημα 16

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,5849, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

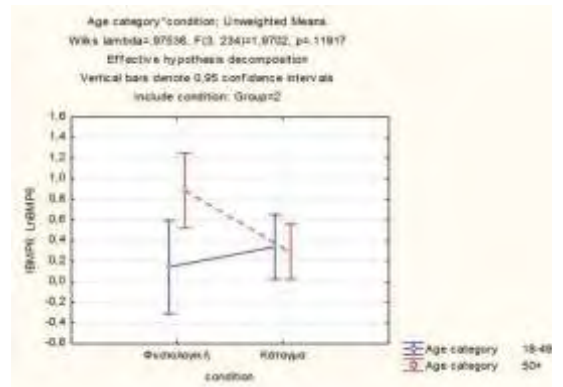
Cell No.	condition	sex	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Άρρεν				
2	Φυσιολογική	Θήλυ	0,22273	0,87427	1,000000	1,000000
3	Κάταγμα	Άρρεν	1,000000	0,037442	0,037442	0,263084
4	Κάταγμα	Θήλυ	1,000000	0,263084	1,000000	



### Γράφημα 17

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 1,6964, df = 236,00  
 Include condition: Group=2

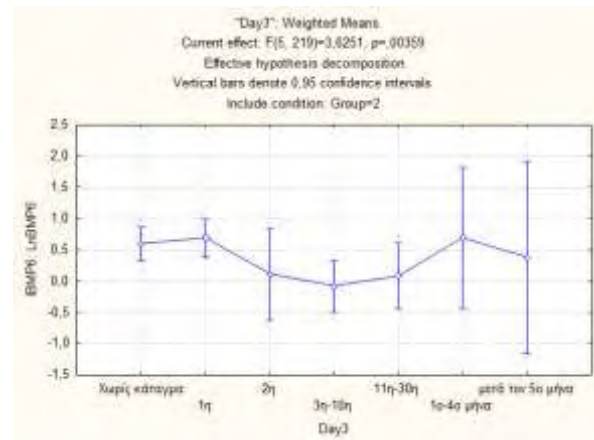
Cell No.	Age category	condition	{1}	{2}	{3}	{4}
1	18-49	Φυσιολογική				
2	18-49	Κάταγμα	0,14310	0,33893	0,88614	0,29223
3	50+	Φυσιολογική	1,000000		0,074388	1,000000
4	50+	Κάταγμα	1,000000	0,074388	0,152967	0,061119



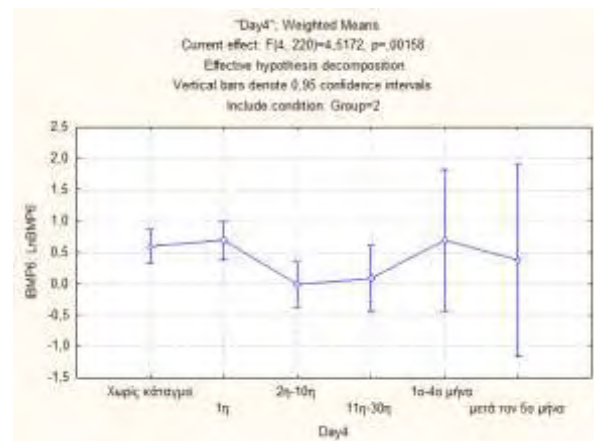


## Γράφημα 18

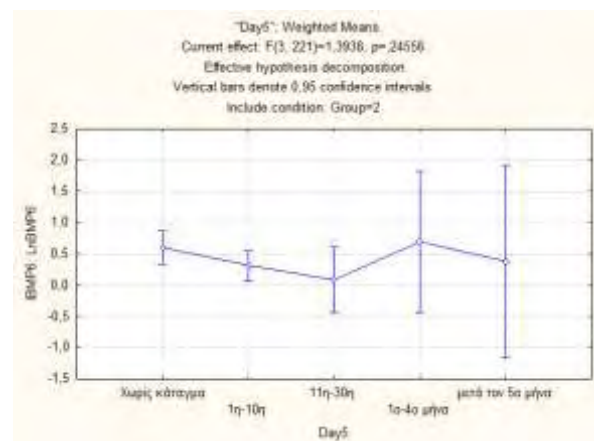
Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6020, df = 219,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day3	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	,59617	,68693	,11468
2	1η	1,000000	1,000000	1,000000
3	2η	1,000000	1,000000	1,000000
4	3η-10η	0,077539	<b>0,040909</b>	1,000000
5	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000
6	1ο-4ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000
7	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000



Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,5957, df = 220,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	,59617	,68693	-,0147
2	1η	1,000000	1,000000	<b>0,048022</b>
3	2η-10η	<b>0,048022</b>	<b>0,024324</b>	<b>0,024324</b>
4	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000
5	1ο-4ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000
6	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000



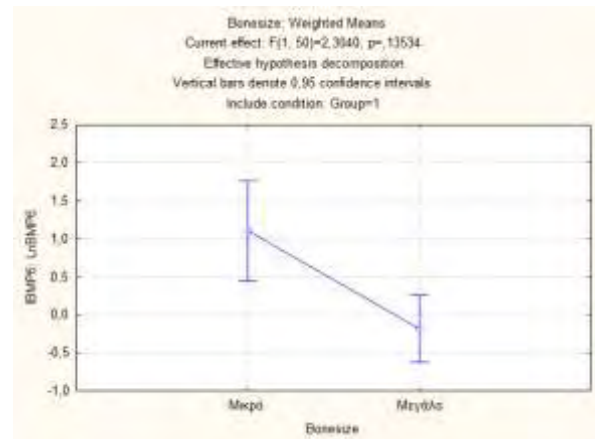
Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6870, df = 221,00 Include condition: Group=2				
Cell No.	Day5	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	,59617	,30712	,08641
2	1η-10η	1,000000	1,000000	1,000000
3	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000
4	1ο-4ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000
5	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	1,000000	1,000000





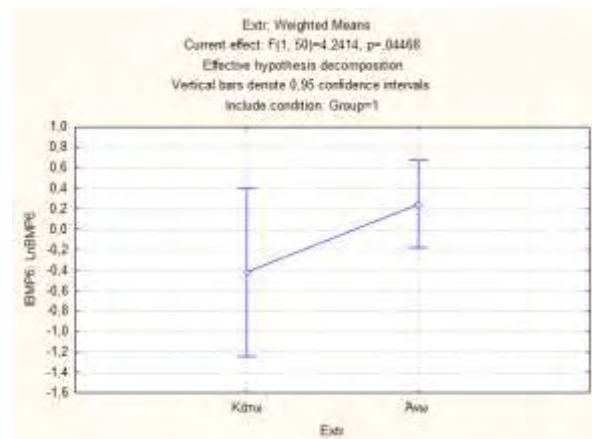
## Γράφημα 19

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6828, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό		0,012024
2	Μεγάλο	0,012024	



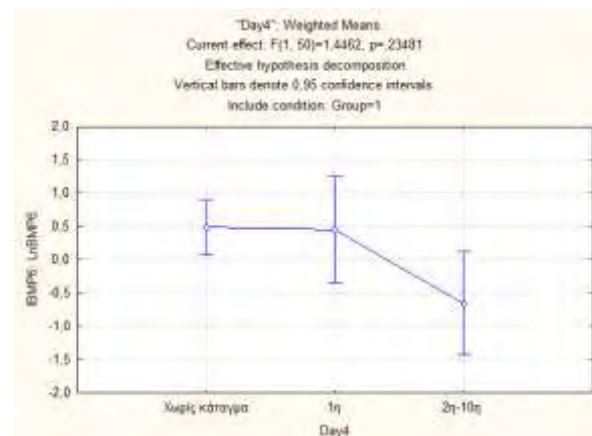
## Γράφημα 20

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6828, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω		0,060805
2	Άνω	0,060805	



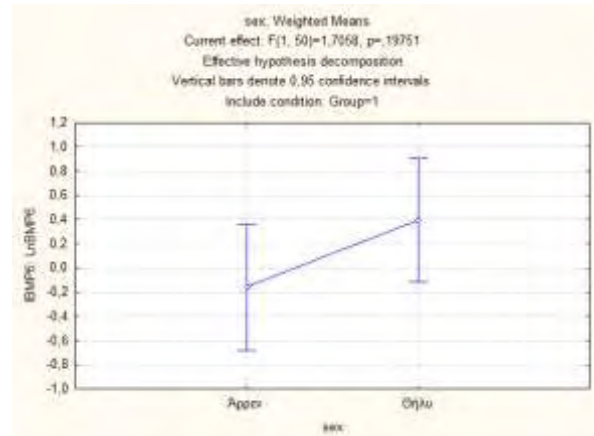
## Γράφημα 21

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6828, df = 50,000 Include condition: Group=1				
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	,49136	,45222	0,008395
2	1η	1,000000		0,097482
3	2η-10η	0,008395	0,097482	



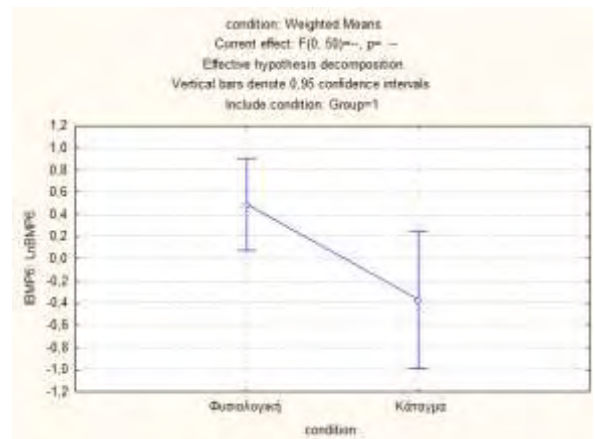
## Γράφημα 22

Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6828, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν		0,151556
2	Θήλυ	0,151556	



## Γράφημα 23

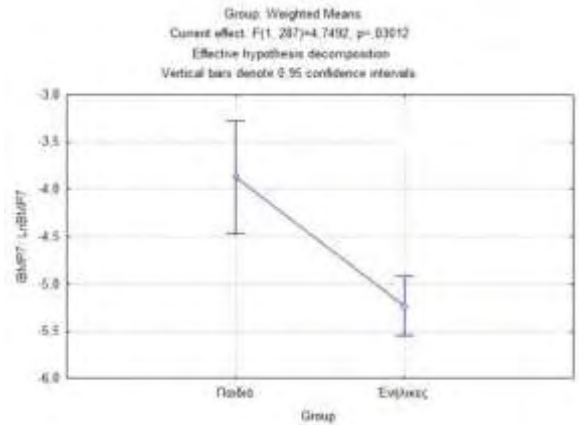
Bonferroni test; variable IBMP6 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 1,6828, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική		0,014663
2	Κάταγμα	0,014663	



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΒΜΡ-7

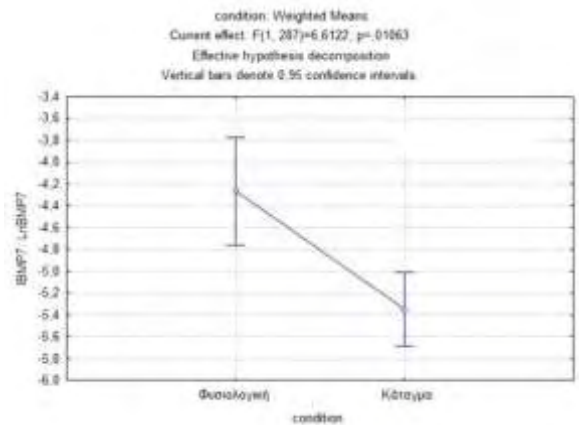
Γράφημα 1

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,7667, df = 287,00			
Cell No.	Group	{1}	{2}
1	Παιδιά		0,000103
2	Ενήλικες	0,000103	



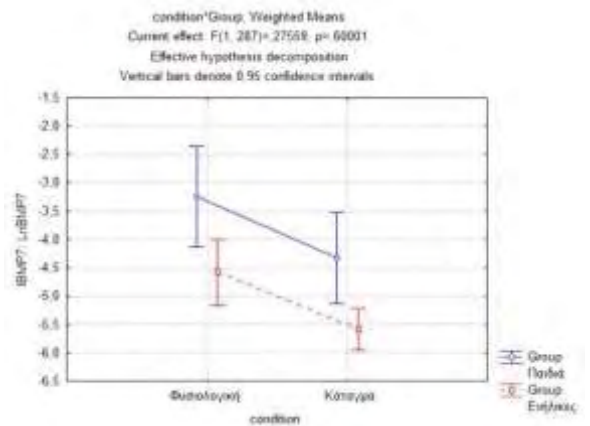
Γράφημα 2

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,7667, df = 287,00			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική		0,000223
2	Κάταγμα	0,000223	



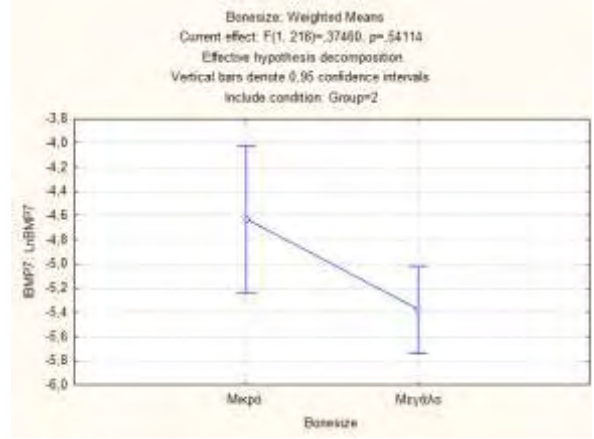
Γράφημα 3

Bonferroni test; variable IBMP7 Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,7667, df = 287,00						
Cell No.	condition	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Παιδιά		0,092691	0,526007	0,000055
2	Φυσιολογική	Ενήλικες	0,092691		1,000000	0,014884
3	Κάταγμα	Παιδιά	0,526007	1,000000		0,032616
4	Κάταγμα	Ενήλικες	0,000055	0,014884	0,032616	



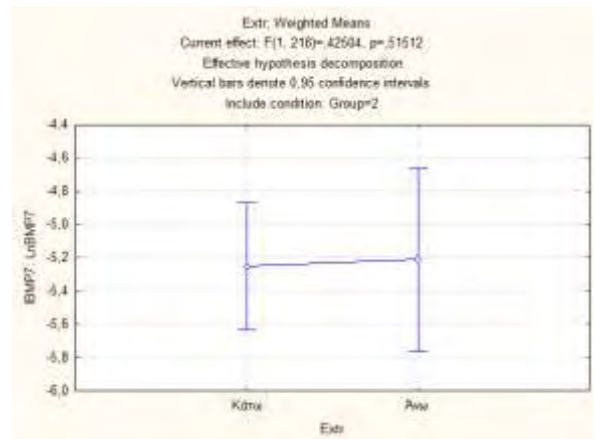
### Γράφημα 4

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό	-4,629	0,053428
2	Μεγάλο	0,053428	-5,377



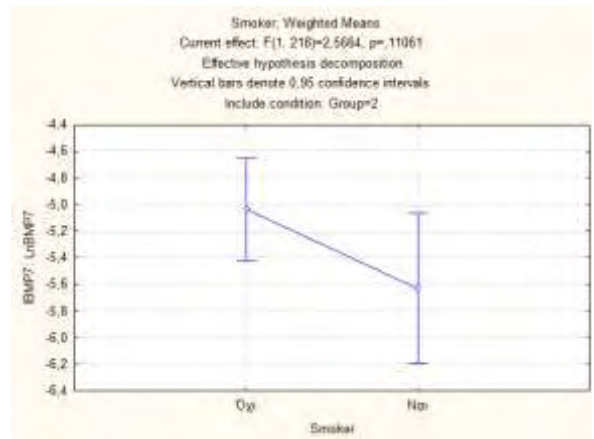
### Γράφημα 5

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω	-5,250	0,896437
2	Άνω	0,896437	-5,210



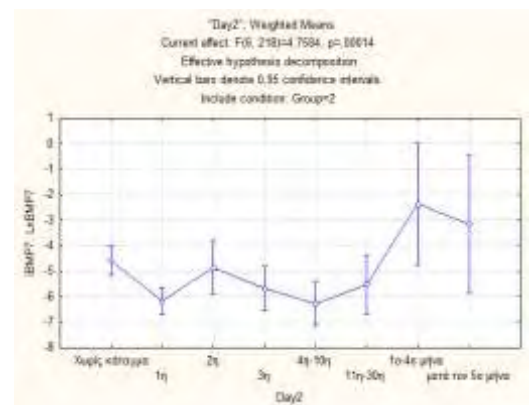
### Γράφημα 6

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Smoker	{1}	{2}
1	Όχι	-5,036	0,065715
2	Ναι	0,065715	-5,631



### Γράφημα 7

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2									
Cell No.	Day2	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
1	Χωρίς κάπνισμα	-4,577	0,002395	1,000000	1,000000	0,045563	1,000000	0,340910	1,000000
2	1η	0,002395	0,554903	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000750	0,181984
3	2η	1,000000	0,554903	1,000000	1,000000	0,943825	1,000000	0,279131	1,000000
4	3η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,024255	0,921894
5	4η-10η	0,045563	1,000000	0,943825	1,000000	1,000000	1,000000	0,001683	0,208061
6	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,101985	1,000000
7	1η-4η μήνα	0,340910	0,000750	0,279131	0,024255	0,001683	0,101985	1,000000	1,000000
8	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	0,181984	1,000000	0,921894	0,208061	1,000000	1,000000	1,000000

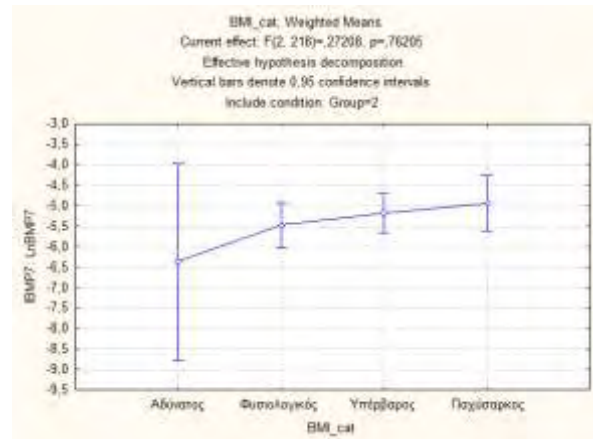




## Γράφημα 8

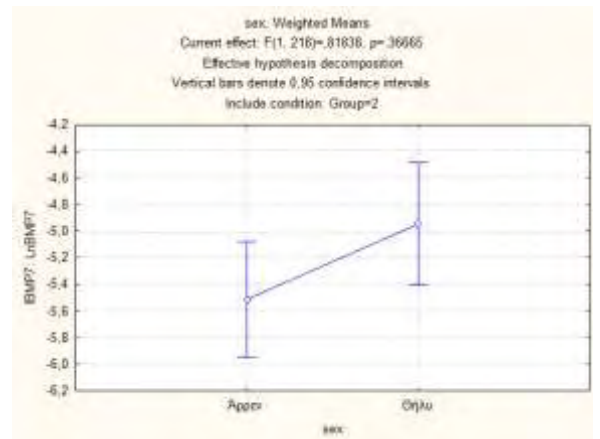
249

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2					
Cell No.	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Αδύνατος	-6.369	1,000000	1,000000	1,000000
2	Φυσιολογικός	1,000000		1,000000	1,000000
3	Υπέρβαρος	1,000000	1,000000		1,000000
4	Παχύσαρκος	1,000000	1,000000	1,000000	



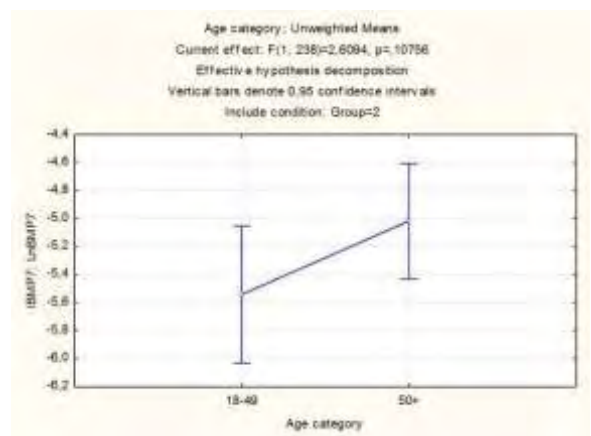
## Γράφημα 9

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Άρρεν	-5,515	0,061265
2	Θήλυ	0,061265	



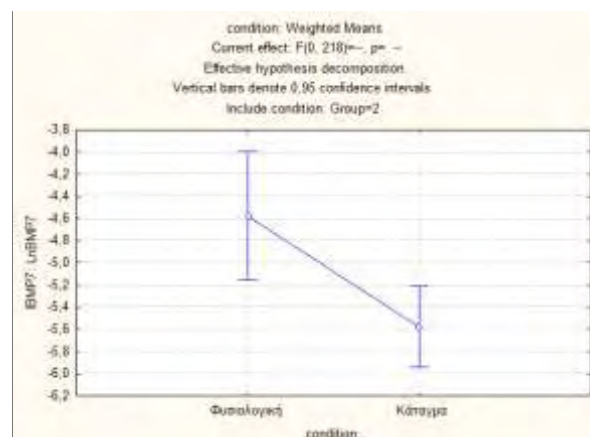
## Γράφημα 10

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 6,1306, df = 238,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	Age category	{1}	{2}
1	18-49	-5,542	0,107556
2	50+	0,107556	



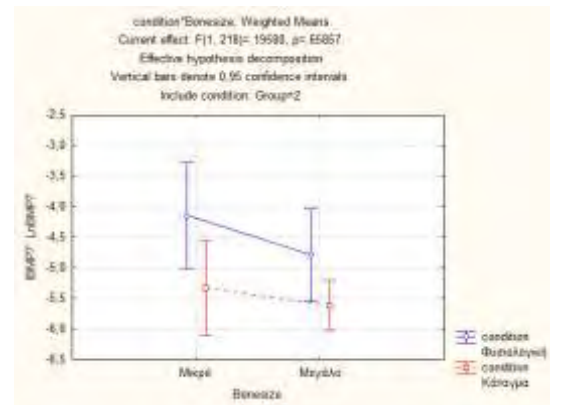
## Γράφημα 11

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	-4,577	0,002044
2	Κάταγμα	0,002044	



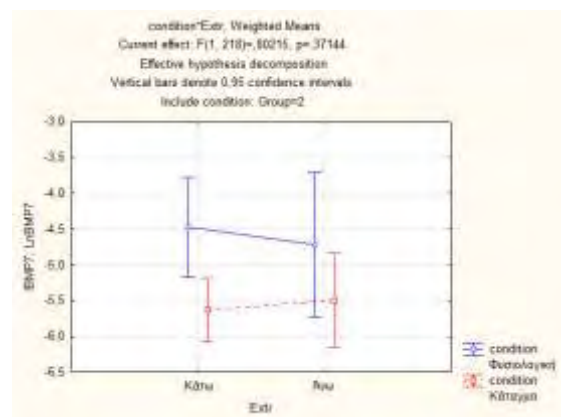
## Γράφημα 12

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Bonesize	{1}	{2}	{3}	{4}
			-4,143	-4,790	-5,321	-5,610
1	Φυσιολογική	Μικρά		1,000000	0,573176	<b>0,019919</b>
2	Φυσιολογική	Μεγάλο	1,000000		1,000000	0,177373
3	Κάταγμα	Μικρά	0,573176	1,000000		1,000000
4	Κάταγμα	Μεγάλο	<b>0,019919</b>	0,177373	1,000000	



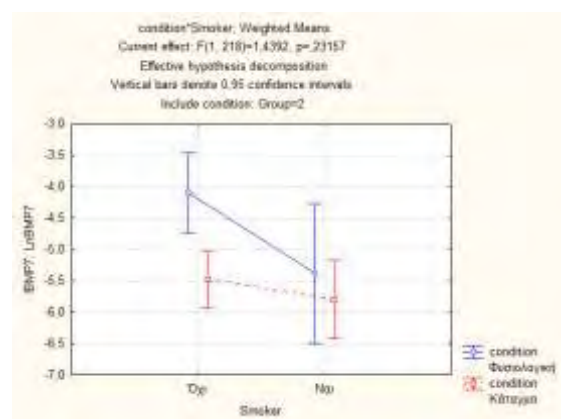
## Γράφημα 13

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Extr	{1}	{2}	{3}	{4}
			-4,474	-4,715	-5,630	-5,489
1	Φυσιολογική	Κάτω		1,000000	<b>0,037088</b>	0,158726
2	Φυσιολογική	Άνω	1,000000		0,298729	0,723473
3	Κάταγμα	Κάτω	<b>0,037088</b>	0,298729		1,000000
4	Κάταγμα	Άνω	0,158726	0,723473	1,000000	



## Γράφημα 14

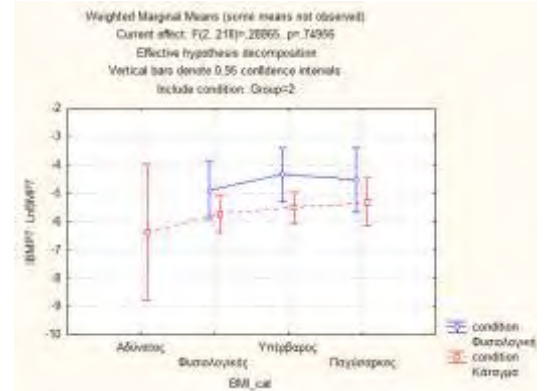
Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	condition	Smoker	{1}	{2}	{3}	{4}
			-4,091	-5,378	-5,478	-5,791
1	Φυσιολογική	Όχι		0,101598	<b>0,003604</b>	<b>0,002210</b>
2	Φυσιολογική	Ναι	0,101598		1,000000	1,000000
3	Κάταγμα	Όχι	<b>0,003604</b>	1,000000		1,000000
4	Κάταγμα	Ναι	<b>0,002210</b>	1,000000	1,000000	



Γράφημα 15

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

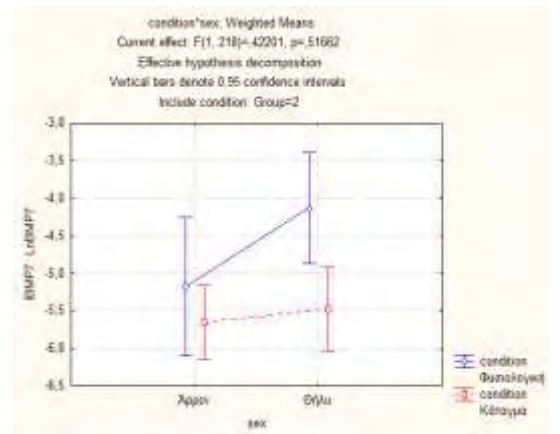
Cell No.	condition	BMI_cat	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Φυσιολογική	Αδύνατος								
2	Φυσιολογική	Φυσιολογικός		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Φυσιολογική	Υπερβαρικός	1,000000		1,000000	1,000000	0,224450	0,549613	1,000000	1,000000
4	Φυσιολογική	Παχύσαρκος	1,000000	1,000000		1,000000	0,542361	1,000000	1,000000	1,000000
5	Κάταγμα	Αδύνατος	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
6	Κάταγμα	Φυσιολογικός	1,000000	0,224450	0,542361	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
7	Κάταγμα	Υπερβαρικός	1,000000	0,549613	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
8	Κάταγμα	Παχύσαρκος	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000



Γράφημα 16

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 5,5155, df = 218,00  
 Include condition: Group=2

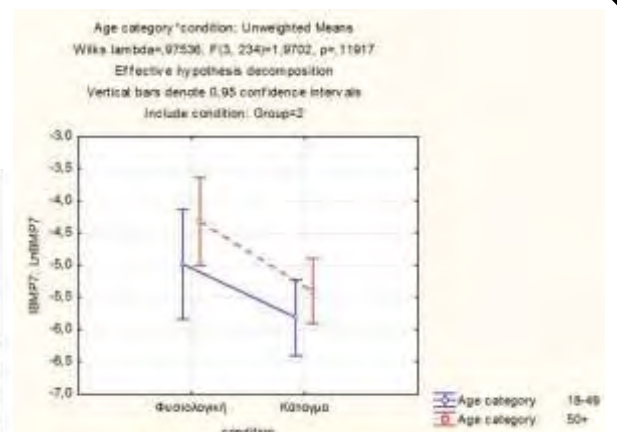
Cell No.	condition	sex	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Φυσιολογική	Άρρεν		0,283288	1,000000	1,000000
2	Φυσιολογική	Θήλυ	0,283288		0,002590	0,014879
3	Κάταγμα	Άρρεν	1,000000	0,002590		1,000000
4	Κάταγμα	Θήλυ	1,000000	0,014879	1,000000	



Γράφημα 17

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd)  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MSE = 5,9590, df = 236,00  
 Include condition: Group=2

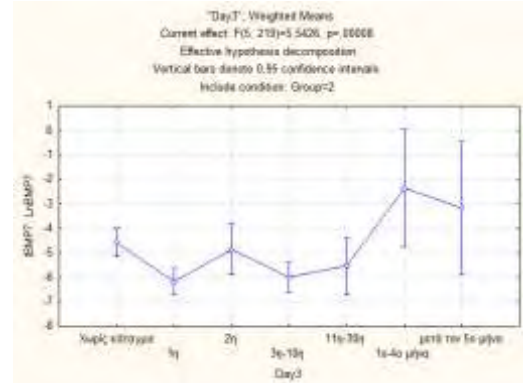
Cell No.	Age category	condition	{1}	{2}	{3}	{4}
1	18-49	Φυσιολογική		0,694976	1,000000	1,000000
2	18-49	Κάταγμα	0,694976		0,007430	1,000000
3	50+	Φυσιολογική	1,000000	0,007430		0,073954
4	50+	Κάταγμα	1,000000	1,000000	0,073954	



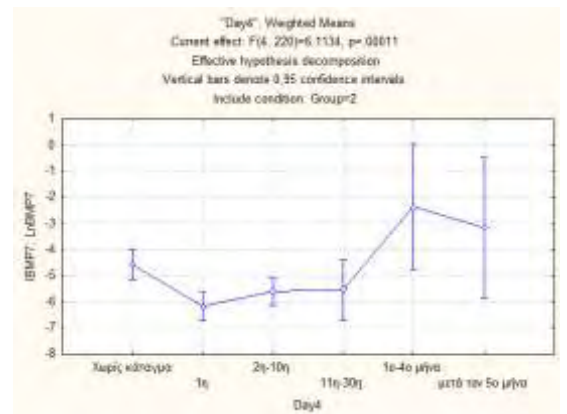


## Γράφημα 18

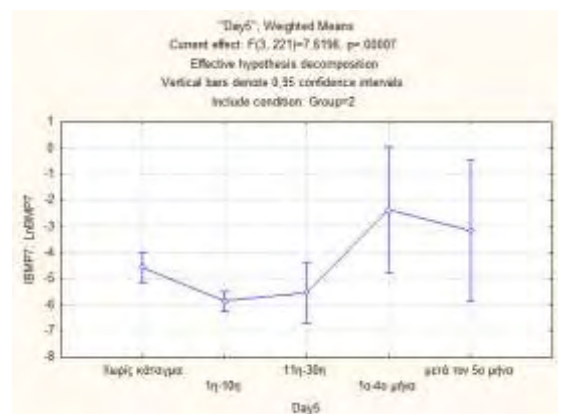
Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5119, df = 219,00 Include condition: Group=2								
Cell No.	Day3	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
1	Χωρίς κάταγμα	-4,577	-6,167	-4,858	-6,000	-5,529	-2,378	-3,165
2	1η	0,001784	0,001784	1,000000	0,022693	1,000000	0,255025	1,000000
3	2η	1,000000	0,415249	1,000000	1,000000	1,000000	0,000558	0,136060
4	3η-10η	0,022693	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001592	0,229248
5	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,076224	1,000000
6	1ο-4ο μήνα	0,255025	0,000558	0,208780	0,001592	0,076224	1,000000	1,000000
7	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	0,136060	1,000000	0,229248	1,000000	1,000000	1,000000



Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5628, df = 220,00 Include condition: Group=2							
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	Χωρίς κάταγμα	-4,577	-6,167	-5,604	-5,529	-2,378	-3,165
2	1η	0,001368	0,001368	0,113930	1,000000	0,188045	1,000000
3	2η-10η	0,113930	1,000000	1,000000	1,000000	0,000432	0,100826
4	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,004572	0,395649
5	1ο-4ο μήνα	0,188045	0,000432	0,004572	0,056745	1,000000	1,000000
6	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	0,100826	0,395649	0,915253	1,000000	1,000000



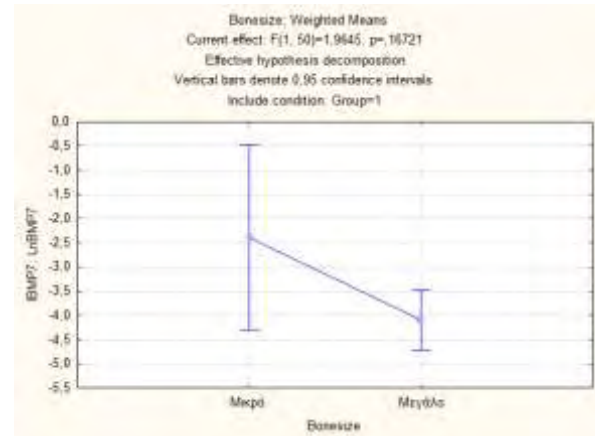
Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 5,5764, df = 221,00 Include condition: Group=2						
Cell No.	Day5	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1	Χωρίς κάταγμα	-4,577	-5,862	-5,529	-2,378	-3,165
2	1η-10η	0,001406	0,001406	1,000000	0,126394	1,000000
3	11η-30η	1,000000	1,000000	1,000000	0,000701	0,128884
4	1ο-4ο μήνα	0,126394	0,000701	0,038232	1,000000	1,000000
5	μετά τον 5ο μήνα	1,000000	0,128884	0,613238	1,000000	1,000000





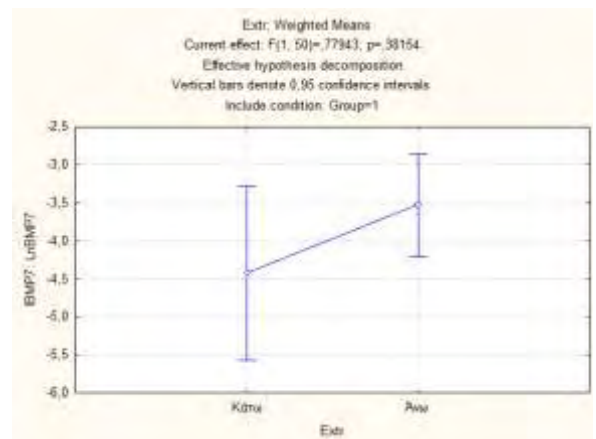
## Γράφημα 19

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 3,7309, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Bonesize	{1}	{2}
1	Μικρό	-2,391	0,024191
2	Μεγάλο	0,024191	



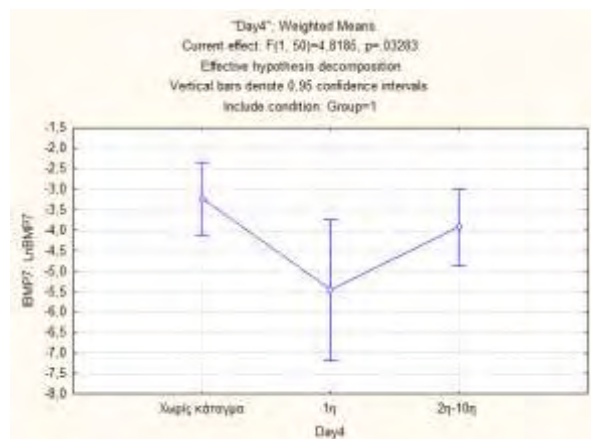
## Γράφημα 20

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 3,7309, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	Extr	{1}	{2}
1	Κάτω	-4,420	0,087502
2	Άνω	0,087502	



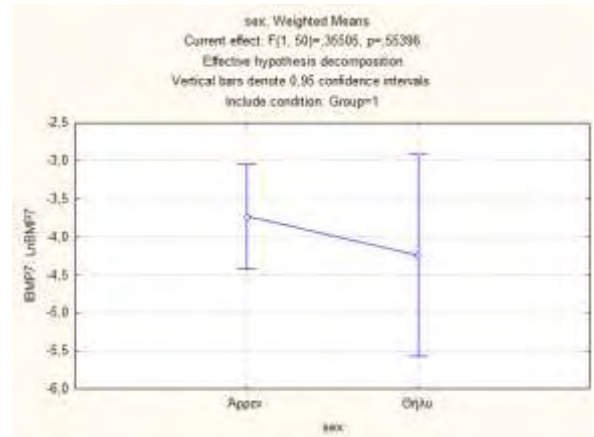
## Γράφημα 21

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 3,7309, df = 50,000 Include condition: Group=1				
Cell No.	Day4	{1}	{2}	{3}
1	Χωρίς κάταγμα	-3,241	0,014068	0,641521
2	1η	0,014068		0,132810
3	2η-10η	0,641521	0,132810	



## Γράφημα 22

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 3,7309, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	sex	{1}	{2}
1	Αρρεν	-3,731	-4,248
2	Θήλυ	0,364169	



## Γράφημα 23

Bonferroni test; variable IBMP7 (xasanidisphd) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MSE = 3,7309, df = 50,000 Include condition: Group=1			
Cell No.	condition	{1}	{2}
1	Φυσιολογική	-3,241	0,038070
2	Κάταγμα	0,038070	

