

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΜΕΓΑΛΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΜΑΚΡΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΩΛΕΝΗ**

**ΣΟΦΙΑ Ι. ΖΩΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΙΤΑΝΙΟΥ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΜΕΓΑΛΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΜΑΚΡΩΝ ΟΣΤΩΝ ΤΟΥ ΣΚΥΛΟΥ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΩΛΕΝΗ

ΣΟΦΙΑ Ι. ΖΩΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Απόστολος Δ. Γαλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής	Επιβλέπων
Σεραφείμ Α. Παπαδημητρίου, Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Νικήτας Ν. Πράσιнос, Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Λυσίμαχος Παπάζογλου, Καθηγητής	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Βασιλική Τσιώλη, Επίκουρη Καθηγήτρια	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Αικατερίνη Σιδέρη, Λέκτορας	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Δήμητρα Ψάλλα, Λέκτορας	Μέλος εξεταστικής επιτροπής

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	
1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	5
1.1. Ανατομία και φυσιολογία των μακρών οστών	5
1.2. Αιμάτωση των μακρών οστών	6
1.3. Μικροσκοπική ανατομική των μακρών οστών	7
1.3.1. Το οστό σε κυτταρικό επίπεδο	7
1.3.1.1. Οργανική ουσία	7
1.3.1.1.α. Κύτταρα	7
1.3.1.1.β. Μεσοκυττάρια ουσία	9
1.3.1.2. Ανόργανη ουσία	10
1.3.2. Το οστό ως ιστός	10
1.3.3. Το οστό ως όργανο	11
2. ΟΣΤΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ	12
2.1. Διαδικασία πάρωσης	12
2.1.1. Φλεγμονώδης αντίδραση	12
2.1.2. Επιδιόρθωση	12
2.1.3. Ανακατασκευή	14
2.2. Αποτυχία πάρωσης	14
3. ΜΕΓΑΛΑ ΟΣΤΙΚΑ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ	14
4. ΜΟΣΧΕΥΜΑ	15
4.1. Λειτουργίες των οστικών μοσχευμάτων	17
4.2. Ενσωμάτωση μοσχεύματος	18
4.3. Παράγοντες και υλικά που προάγουν την πάρωση	19
4.3.1. Βιολογικά υλικά	19
4.3.1.1. Βιολογικά υλικά με τοπική δράση	19
4.3.1.1.α. Οστεογενετικά υλικά	20
4.3.1.1.β. Οστεοκαθοδηγητικά υλικά	22
4.3.1.1.γ. Οστεοεπαγωγικά υλικά	23
4.3.1.1.δ. Άλλα μη βιολογικά υλικά	24

4.3.1.2. Βιολογικά υλικά με συστηματική δράση	24
4.3.2. Βιοφυσικές και μηχανικές μέθοδοι προαγωγής της πάρωσης	25
4.3.2.1. Μηχανικές μέθοδοι	25
4.3.2.2. Ηλεκτρικές μέθοδοι	25
4.3.2.3. Υπέρηχοι	26
5. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΜΕΓΑΛΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ	26
6. ΤΙΤΑΝΙΟ	27

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
1.1. Σκύλοι	31
1.2. Πειραματικός σχεδιασμός	31
1.2.1. Υλικά	32
1.2.1.1. Πλέγμα τιτανίου	32
1.2.1.2. Οστεομόσχευμα	32
1.2.1.3. Πλάκα οστεοσύνθεσης	32
1.3. Εκτέλεση των πειραματισμών	34
1.3.1. Αναισθητικό πρωτόκολλο, προετοιμασία πειραματόζωων, προεγχειρητική, διεγχειρητική και μετεγχειρητική αγωγή	34
1.3.2. Χειρουργικές επεμβάσεις	34
1.3.2.1. Λήψη οστεομοσχεύματος	34
1.3.2.2 Προσπέλαση της ωλένης	35
1.3.2.3. Δημιουργία ελλείμματος	35
1.3.2.4. Κάλυψη ελλείμματος	36
1.4. Παρακολούθηση των ζώων	39
1.4.1. Ακτινολογικός έλεγχος	39
1.5. Λήψη τμήματος της ωλένης	40
1.5.1. Σταθεροποίηση της ωλένης στην κερκίδα	41
1.6. Παρακολούθηση των ζώων	41
1.7. Διατήρηση και μελέτη των δειγμάτων	42
1.7.1. Σάρωση του δείγματος σε αξονικό μικροτομογράφο	42
1.7.2. Οστεομετρία	42
1.7.3. Προετοιμασία για ιστολογική μελέτη	43
1.7.4. Στατιστική ανάλυση	44

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
2.1. Ακτινολογικός έλεγχος	45
2.2. Οστεομετρία	46
2.3. Ιστολογικά αποτελέσματα	55
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
3.1. Οστικό έλλειμμα	57
3.2. Μοντέλο ωλένης	57
3.3. Μόσχευμα	59
3.4. Τιτάνιο	61
3.5. Ακτινογραφήματα	62
3.6. Οστεομετρία	63
3.7. Ιστολογικές τομές	68
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	76
ABSTRACT	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε η δυνατότητα αντιμετώπισης ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος στην ωλένη του σκύλου με χρήση πλέγματος τιτανίου. Η διατριβή εκπονήθηκε στη Χειρουργική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.).

Για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της έρευνας και στην ολοκλήρωση της διατριβής, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

- κ. Απόστολο Δ. Γαλάτο, Αναπληρωτή Καθηγητή, Διευθυντή της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. και επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής από τον Σεπτέμβριο του 2007 έως την υποστήριξή της, για τις υποδείξεις του επί της διόρθωσης του κειμένου της διατριβής αλλά και για την όλη συμπεριφορά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της
- κ. Σεραφείμ Α. Παπαδημητρίου, Επίκουρο Καθηγητή της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., επιβλέποντα της διατριβής από τον Ιούνιο του 2005 έως τον Σεπτέμβριο του 2007, και πλέον Αναπληρωτή Καθηγητή της Κλινικής Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.), για τη συνεχή συμπαράσταση, βοήθεια και υποστήριξη σε επιστημονικό, τεχνικό και συναισθηματικό επίπεδο καθώς και για την εμπιστοσύνη και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής
- κ. Νικήτα Ν. Πράσινο, Επίκουρο Καθηγητή της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. και πλέον Αναπληρωτή Καθηγητή της Κλινικής Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για τη χειρουργική γνώση και την εμπειρία που μου μετέδωσε καθώς και για τις συμβουλές και διορθώσεις στο κείμενο της διατριβής

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Λυσίμαχο Παπάζογλου, Καθηγητή της Κλινικής Ζώων Συντροφιάς του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., Βασιλική Τσιώλη, Επίκουρη Καθηγήτρια της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., Αικατερίνη Ι. Σιδέρη, Λέκτορα της ίδιας Κλινικής, και Δήμητρα Ψάλλα, Λέκτορα του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για τις συμβουλές και τις διορθώσεις τους στο κείμενο της

διατριβής. Την κ. Ψάλλα ευχαριστώ, επιπλέον, για τη συμβολή της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ιστολογικών ευρημάτων της διατριβής.

Ευχαριστώ τον κ. Ανδρέα Σταυρόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Περιοδοντολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Malmö της Σουηδίας, για την οργάνωση της δύσκολης διαδικασίας κοπής των ιστολογικών τομών, για τη στήριξη, την καθοδήγηση και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της οστεομετρικής επεξεργασίας των δειγμάτων αλλά και για τη στατιστική επεξεργασία των ευρημάτων της οστεομετρίας, καθώς και τον κ. Michael Dalstra, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ορθοδοντικής της Σχολής Οδοντικής Υγείας του Πανεπιστημίου του Aarhus της Δανίας, για τη βοήθειά του στην αξονική απεικόνιση των δειγμάτων και στην εκμάθηση του προγράμματος οστεομετρίας. Ευχαριστώ τον κ. Προκόπιο Υψηλάντη, Μηχανολόγο και Προγραμματιστή Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, για τη γνώση και την υποστήριξη τόσο κατά την εκμάθηση και χρήση του προγράμματος οστεομετρίας όσο και κατά την επεξεργασία όλων των ηλεκτρονικών αρχείων, και τον κ. Δημήτριο Γκουγκουλή, διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τις συμβουλές και λύσεις σε όσα θέματα στατιστικής επεξεργασίας ή ερμηνείας των αποτελεσμάτων προέκυψαν κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Ευχαριστώ την κ. Φρειδερίκη Ριζάβα, μέλος του παρακτηνιατρικού προσωπικού της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθειά της όσον αφορά τη φροντίδα των πειραματοζώων κατά τη διάρκεια των πειραματισμών.

Ευχαριστώ την κ. Βιργινία Γρηγοροπούλου, διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τη διαρκή, φυσική και ουσιαστική παρουσία και την απρόσκοπτη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου για την καθολική στήριξη κατά τη διάρκεια της διατριβής, όπως και σε κάθε εγχείρημά μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τρόπος διαχείρισης των μεγάλων οστικών ελλειμμάτων των μακρών οστών αποτελεί πρόκληση για τον χειρουργό. Η πληθώρα διαφορετικών μεθόδων που εφαρμόζονται στον άνθρωπο καταδεικνύει τόσο την τεχνική πολυπλοκότητα της αντιμετώπισης, όσο και τη διαρκώς υφιστάμενη ανάγκη για εναλλακτικούς τρόπους κάλυψης των ελλειμμάτων αυτών. Τα μεγάλα οστικά ελλείμματα στα ζώα συντροφιάς είναι σχετικά συχνά, συνεπεία κυρίως τραυματισμών και σωστικών επεμβάσεων. Αν και η κλινική διαχείρισή τους διαφέρει από εκείνη του ανθρώπου, κυρίως για τεχνικο-οικονομικούς λόγους, έχει δημοσιευτεί ικανός αριθμός μελετών σχετικών με τα μεγάλα οστικά ελλείμματα στον σκύλο, οι οποίες αποσκοπούν και στην εφαρμογή των ευρημάτων στην ορθοπεδική του ανθρώπου.

Η χρήση πλέγματος τιτανίου για την αντιμετώπιση μεγάλων οστικών ελλειμμάτων μακρών οστών εφαρμόστηκε κλινικά στον άνθρωπο με επιτυχία (Cobos et al 2000). Το ενδιαφέρον τόσο για την καινοτόμο τεχνική όσο και για το ίδιο το υλικό, είχε ως αποτέλεσμα τη δημοσίευση σχετικών κλινικών περιστατικών (Clements et al 2008, Segal & Shani 2010), αλλά και κλινικών μελετών (Fujibayashi et al 2003, Lindsey et al 2006) διερεύνησης της αποτελεσματικότητας του τιτανίου, πάντα σε συνδυασμό με οστεοεπαγωγικούς ή οστεοκαθοδηγητικούς παράγοντες. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία ερευνητικά δεδομένα εκτίμησης της αποτελεσματικότητας του τιτανίου με μορφή πλέγματος όταν αυτό χρησιμοποιείται για την κάλυψη ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος χωρίς την αρωγή οστεοεπαγωγικών ή οστεοκαθοδηγητικών παραγόντων.

Στην παρούσα διατριβή διερευνάται κατά πόσο το πλέγμα τιτανίου προάγει την παραγωγή νέου οστού όταν χρησιμοποιείται στη διαχείριση μεγάλου οστικού ελλείμματος. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούνται δύο καινούργιες τεχνικές για την εκτίμηση της ποσότητας του νέου οστού στο έλλειμμα: (α) η οστεομετρία με τη χρήση αξονικού μικροτομογράφου και ειδικού προγράμματος τρισδιάστατης απεικόνισης και (β) η τεχνική «κοπής και λείανσης» (Säge-Schliff technique) για την ιστολογική εκτίμηση.

Η διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος, το οποίο στηρίζεται στην ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, γίνεται αναφορά στη στοιχειώδη ανατομική, φυσιολογία και ιστολογία των μακρών οστών του σκύλου και στην

αντίδρασή τους στην οστική κάκωση. Επίσης παρατίθενται βιβλιογραφικά στοιχεία για τις μεθόδους αντιμετώπισης των μεγάλων οστικών ελλειμμάτων και τη σύγχρονη κλινική διαχείρισή τους στον άνθρωπο και στα ζώα. Τέλος, γίνεται αναφορά στο τιτάνιο και στις ιδιότητές του σε σχέση με το οστό. Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, αναλύονται ο πειραματικός σχεδιασμός και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα έρευνα. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα της διατριβής και ακολουθεί η συζήτηση επ' αυτών σε σύνδεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Τέλος παρατίθενται συνοπτικά τα συμπεράσματα της παρούσας έρευνας και ακολουθούν η ελληνική και η αγγλική περίληψη, καθώς και η βιβλιογραφία.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Το οστό αποτελεί μια μορφή συνδετικού ιστού με αναπτυγμένη αγγείωση, διαρκή τάση για ανακατασκευή και αυξημένη πυκνότητα μεταλλικών αλάτων. Διακρίνεται για τη σκληρότητα, την προσαρμοστικότητα και την αναγεννητική ικανότητά του, καθώς και για τον χαρακτηριστικό αυξητικό μηχανισμό του. Τα οστά λειτουργούν ως δομικός σκελετός, επιτρέποντας την πρόσφυση τενόντων και μυών και διευκολύνοντας τη μηχανική κίνηση του σώματος. Λειτουργούν, επίσης, προστατευτικά για τους μαλακούς ιστούς και τα ζωτικά εσωτερικά όργανα. Το οστό χρησιμεύει ως αποθήκη ανόργανων στοιχείων όπως το ασβέστιο και ο φωσφόρος, τα οποία παρέχει στον οργανισμό όταν υπάρχει ανάγκη. Παρουσιάζοντας έναν υψηλό μεταβολικό ρυθμό, το οστό βρίσκεται σε διαρκή ανακατασκευή (remodeling), με ταυτόχρονη οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα. Ένα ιδιαίτερα αναπτυγμένο αγγειακό σύστημα υποστηρίζει τις οστικές δραστηριότητες, συντηρεί την οστική ομοιοστασία και βοηθά στην αξιοσημείωτη ικανότητα των οστών να αυτοϊώνται (Remedios 1999).

1.1. Ανατομία και φυσιολογία των μακρών οστών

Τα μακρά οστά εμφανίζουν δύο άκρα και ένα επίμηκες μέσο τμήμα που ονομάζεται σώμα. Το σώμα με τα δύο άκρα οστεώνονται κατά την ενδομήτρια ζωή και αποτελούν τη διάφυση του οστού. Τα απώτερα τμήματα των δύο άκρων οστεώνονται μεταγενέστερα, συνήθως μετά τον τοκετό, και αποτελούν τις επιφύσεις του οστού. Οι επιφύσεις συνενώνονται κατά τη νεαρή ηλικία με τη διάφυση μέσω του συζευκτικού χόνδρου, ο οποίος χρησιμεύει για την κατά μήκος αύξηση των οστών. Όταν περατωθεί η αύξηση αυτή, οστεώνεται και ο συζευκτικός χόνδρος (Μιχαήλ 1985).

Τα οστά, όπως προκύπτει από τη μακροσκοπική εξέτασή τους σε διατομή, αποτελούνται από συμπαγή οστέινη ουσία, η οποία είναι πυκνή και ομοιομερής, και από σπογγώδη οστέινη ουσία, η οποία είναι αραιότερη και συγκροτείται από οστέινες δοκίδες, διατεταγμένες κατά τη φορά των μέγιστων τάσεων. Οι δοκίδες αυτές χιάζονται στην πορεία τους με άλλες που έχουν διαφορετική κατεύθυνση, έτσι ώστε ανάμεσά τους να σχηματίζονται μικρές κοιλότητες, οι μυελοκυψέλες, οι οποίες περιέχουν τον μυελό των οστών (Μιχαήλ 1985).

Οι επιφύσεις των επιμήκων οστών αποτελούνται από σπογγώδη ουσία, την οποία καλύπτει εξωτερικά μια λεπτή στοιβάδα από συμπαγή ουσία. Η διάφυση των οστών σχηματίζεται σχεδόν αποκλειστικά από συμπαγή ουσία, στο κέντρο της οποίας εκτείνεται ο μυελικός αυλός, ο οποίος περιέχει τον μυελό των οστών (Μιχαήλ 1985).

Η εξωτερική επιφάνεια των οστών, εκτός από τις αρθρικές επιφάνειες, καλύπτεται με έναν υμένα από πυκνό συνδετικό ιστό με υπόλευκη ή υποκίτρινη χροιά και πάχος 1-3 mm, το περίστυο. Στο περίστυο οδεύουν αρχικά τα αγγεία και τα νεύρα που προορίζονται για το οστό (Μιχαήλ 1985).

1.2. Αιμάτωση των μακρών οστών

Η ύπαρξη επαρκούς και απρόσκοπτης αιμάτωσης είναι θεμελιώδους σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία του οστού. Η αιμάτωση ενός μακρού οστού εξασφαλίζεται από: (1) το προσαγωγό αγγειακό σύστημα, (2) το αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού και (3) το απαγωγό σύστημα (Piermattei et al 2006). Το προσαγωγό σύστημα μεταφέρει αρτηριακό αίμα στο οστό και αποτελείται από την κύρια τροφοφόρα αρτηρία, τις αρτηρίες της μετάφυσης και τα αρτηρίδια του περιοστέου. Η τροφοφόρα αρτηρία εισέρχεται στον φλοιό μέσω του τροφοφόρου τμήματος και, εντός του αυλού, χωρίζεται σε ανιόντες και κατιόντες ενδομυελικούς κλάδους, οι οποίοι στη συνέχεια διακλαδίζονται, αιματώνοντας τις εσωτερικές στοιβάδες της φλοιώδους μοίρας της διάφυσης. Πέραν του φλοιού, η τροφοφόρα αρτηρία αιματώνει και το μυελικό αυλό με κλάδους αρτηριδίων που εισέρχονται στις μυελικές κοιλότητες (Remedios 1999). Οι αρτηρίες της μετάφυσης διασχίζουν τον φλοιό στο ύψος της άνω και κάτω μετάφυσης και στο εσωτερικό του αυλού αναστομώνονται με τελικούς κλάδους ενδομυελικών αρτηριδίων και, μέσω αυτών, συντελούν στην αιμάτωση. Σε περίπτωση κάκωσης (τραυματικής ή χειρουργικής) της τροφοφόρας αρτηρίας, οι αρτηρίες της μετάφυσης γρήγορα υπερπλάσονται και αναλαμβάνουν την αιμάτωση του οστού (Remedios 1999, Weisbrode 2004).

Στα αναπτυσσόμενα ζώα το περιοστικό αρτηριακό σύστημα είναι πολύ αναπτυγμένο σε όλη την έκταση του περιοστέου, τροφοδοτώντας κάθε επιφάνεια του μακρού οστού, εκτός από τις αρθρικές. Το αναπτυγμένο αυτό σύστημα ατροφεί κατά την ενηλικίωση, οπότε τα αρτηρίδια του περιοστέου συνιστούν μικροσκοπικά αγγεία του προσαγωγού συστήματος, τα οποία εισέρχονται στον φλοιό της διάφυσης σε σημεία κατάφυσης μυών ή ισχυρής περιτονίας και τροφοδοτούν την επιφανειακή

στοιβάδα της φλοιώδους μοίρας κατά το $1/4-1/3$ της συνολικής αιμάτωσής της (Remedios 1999, Weisbrode 2004).

Το αγγειακό σύστημα του συμπαγούς οστού παρεμβάλλεται μεταξύ προσαγωγού και απαγωγού συστήματος και λειτουργεί ως ένα αγγειακό πλέγμα μέσω του οποίου γίνονται ανταλλαγές ανάμεσα στην αιματική κυκλοφορία και στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς. Αποτελείται από τους σωλήνες του Havers και του Volkmann, καθώς και από τα μικροσκοπικά σωληνάκια που προσάγουν οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες στα οστεοκύτταρα (Piermattei et al 2006).

Η φλεβική παροχέτευση για τη φλοιώδη και τη μυελώδη μοίρα του οστού γίνεται με δύο διαφορετικά δίκτυα. Το αίμα από τον φλοιό ρέει προς την επιφάνεια του περιostίου και παροχετεύεται σε φλεβίδια, τα οποία αναστομώνονται με περιοστικές φλέβες πριν καταλήξει στη συστηματική κυκλοφορία. Μέσα στον μυελικό αυλό, φλεβικοί κλάδοι εκβάλλουν σε μικροκοιλότητες που παροχετεύονται στη συνέχεια σε μια κεντρική μυελική κοιλότητα, από όπου, με ειδικά φλεβίδια και την τροφοφόρα φλέβα που διαπερνούν τον φλοιό, το αίμα επιστρέφει στην κυκλοφορία (Remedios 1999).

Υπάρχει ένα ακόμη φλεβικό δίκτυο που παροχετεύει το αίμα του μυελικού αυλού, αλλά αυτό συνδέεται με την αιμοποιητική δραστηριότητά του (Piermattei et al 2006). Η φορά της ροής του αίματος, στο σύνολό της, είναι κυρίως φυγόκεντρη, δηλαδή από τον μυελό προς το περίostιο (Weisbrode 2004).

1.3. Μικροσκοπική ανατομική των μακρών οστών

1.3.1. Το οστό σε κυτταρικό επίπεδο

Το οστό αποτελείται από οργανική και ανόργανη ουσία. Η οργανική ουσία περιλαμβάνει τα δομικά κύτταρα του οστού και τη μεσοκυττάρια ουσία. Η ανόργανη ουσία δομείται από ασβέστιο και φωσφόρο με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (Remedios 1999).

1.3.1.1. Οργανική ουσία

1.3.1.1.α. Κύτταρα

Στα οστά απαντούν τρία είδη δομικών κυττάρων: οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες.

Οι *οστεοβλάστες* προέρχονται από πρόδρομα μεσεγχυματογενή κύτταρα (οστεοπρογονικά κύτταρα) που απαντούν στην έσω επιφάνεια του περιostίου και στην ελεύθερη επιφάνεια του ενδοostίου. Τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται κατά τη φάση ανάπτυξης του οστού, αλλά και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής (κατάγματα, μετασκευή οστίτη ιστού), πολλαπλασιάζονται και μετατρέπονται σε οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες παράγουν τα οργανικά στοιχεία της οστέινης ουσίας (κολλαγόνο, βλεννοπολυσακχαρίτες), δίνουν την εντολή για την εναπόθεση ανόργανων στοιχείων στην οστέινη ουσία και, αντιστρόφως, την εντολή για την απορρόφησή της από τους οστεοκλάστες. Στην επιφάνεια των οστεοβλαστών υπάρχει το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, ο ρόλος του οποίου σχετίζεται με την εναπόθεση ανόργανων στοιχείων και την άντληση ιόντων ασβεστίου κατά μήκος των μεμβρανών. Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν επίσης μια μη κολλαγονούχα πρωτεΐνη, την οστεοκαλσίνη, με άγνωστη λειτουργία. Έναν έμμεσο τρόπο εκτίμησης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας αποτελεί η μέτρηση στο περιφερικό αίμα των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης και της οστεοκαλσίνης (Lee et al 2000). Αυξημένα επίπεδα στο αίμα της οστεοκαλσίνης και του οστικού ισοενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης συνάδουν με αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα (Remedios 1999, Lee et al 2000, Weisbrode 2004). Οι ανενεργές οστεοβλάστες έχουν δισκοειδές σχήμα και λίγο κυτταρόπλασμα. Οι ενεργές, αντίθετα, είναι κυβοειδή κύτταρα με έντονα βασίφιλο κυτταρόπλασμα, αναπτυγμένη συσκευή του Golgi και κοκκώδες ενδοκυτταρικό δικτυωτό. Εμφανίζουν πολικότητα και επιθηλιακή διάταξη πάνω στις αναπτυσσόμενες επιφάνειες του οστίτη ιστού. Μεταξύ τους συνδέονται με λεπτές και κοντές κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Εναποθέτουν το οστεοειδές σε σχισμές κατά μήκος της επιφάνειας του οστού. Καθώς οι σχισμές γεμίζουν, ποσοστό 10% των οστεοβλαστών παγιδεύονται στην οστική ουσία (οστεοειδές στο οποίο εναποτέθηκαν ανόργανα στοιχεία) και αποτελούν τα οστεοκύτταρα (Remedios 1999, Weisbrode 2004).

Τα *οστεοκύτταρα* έχουν άφθονο και ελαφρά βασίφιλο κυτταρόπλασμα, με αναπτυγμένο ενδοπλασματικό δικτυωτό και συσκευή Golgi και άφθονα κοκκία γλυκογόνου. Κάθε οστεοκύτταρο καταλαμβάνει μια οστική κοιλότητα (lacunae) και εμφανίζει κυτταρικές προεκβολές σε ένα εκτεταμένο σύστημα αγωγών που εισέρχονται στα οστικά σωληνάκια (canaliculi) και το φέρουν σε επικοινωνία με γειτονικά οστεοκύτταρα και οστεοβλάστες. Αυτό το σύστημα αγωγών αποτελεί μια

λειτουργική μεμβράνη που φέρει σε επικοινωνία την τιτανωμένη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού με το γενικό εξωκυτταρικό υγρό και μπορεί να ρυθμίζει τη ροή ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου από και προς τον οστικό εξωκυττάριο χώρο. Η μεγάλη επιφάνεια του οστού (βοθρία και οστικά σωληνάκια) που είναι διαθέσιμη για την κινητοποίηση ιόντων μέσω του δικτύου επικοινωνίας των οστεοκυττάρων, επιτρέπει την άμεση μετακίνηση μεγάλων ποσοτήτων ασβεστίου, χωρίς να προκαλούνται σημαντικές δομικές αλλαγές στο οστό. Το ίδιο δίκτυο επικοινωνίας δίνει τη δυνατότητα στα οστεοκύτταρα να ανιχνεύουν διακυμάνσεις της ροής των υγρών στην τιτανωμένη μεσοκυττάρια ουσία, ανιχνεύοντας αλλαγές στα «δυναμικά ροής» (streaming potentials) που προκαλούνται από αυξομειούμενη τάση και πίεση στο οστό, δομικές αλλαγές ή μικρορωγμές, με αποτέλεσμα την άμεση κινητοποίηση της υποκείμενης στοιβάδας των οστεοβλαστών για τη δημιουργία ή την απορρόφηση του οστού (Weisbrode 2004).

Οι *οστεοκλάστες* είναι μεγάλα πολυπύρρηνα και ποικιλόσχημα κύτταρα, βρίσκονται στην επιφάνεια του οστού ή κοντά σε αυτή και είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση του οστού. Προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα της κοκκιοματώδους-μονοκυτταρικής σειράς (οστεοβλάστες) που συγχωνεύονται. Έχουν άφθονο εωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα (ώριμες οστεοκλάστες), πολλαπλές συσκευές Golgi, πολυπληθή μιτοχόνδρια και λυσοσωμάτια, και σαφή πολικότητα. Διαθέτουν ένα ειδικό ψηκτροειδές άκρο, αποτελούμενο από λεπτές πτυχώσεις της κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο προσκολλάται στην υπό απορρόφηση οστική επιφάνεια. Οι οστεοκλάστες δεν μπορούν να συνδεθούν σε μη επιμεταλλωμένο οστό. Η απορρόφηση του οστού γίνεται σε δύο στάδια: αρχικά διαλύονται τα ανόργανα συστατικά με την έκκριση ιόντων υδρογόνου από την αντλία πρωτονίων, που εντοπίζεται στο ψηκτροειδές άκρο των οστεοκλαστών, και στη συνέχεια οι ίνες κολλαγόνου της μεσοκυττάριας ουσίας αποδομούνται σε πολυπεπίδια, με τη μεσολάβηση κυστεΐνης, μεταλοπρωτεΐνάσης και καθεψινών που εκλύονται από τα άφθονα λυσοσωμάτια των οστεοκλαστών (Μιχαήλ 1996, Weisbrode 2004).

1.3.1.1.β. Μεσοκυττάρια ουσία

Η οργανική μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από θεμέλια ουσία (ground substance) και κολλαγόνες ίνες τύπου I. Η θεμέλια ουσία είναι οξύφιλη και αποτελείται από νερό, πρωτεογλυκάνες, γλυκοζαμινογλυκάνες, μη κολλαγόνες πρωτεΐνες

(κυτταροκίνες, οστεονεκτίνη, οστεοκαλσίνη και ένζυμα, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες και οι πυροφωσφατάσες) και λιπίδια. Κολλαγόνες ίνες παράγονται από τις οστεοβλάστες, εμποτίζονται με ανόργανα άλατα και διατάσσονται με συγκεκριμένο τρόπο, καθορίζοντας τη δομή του οστού (Kneser et al 2006).

1.3.1.2. Ανόργανη ουσία

Το ασβέστιο, ο φωσφόρος και, σε μικρότερες ποσότητες, ο άνθρακας, το μαγνήσιο, το κάλιο, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το φθόριο αποτελούν τα ανόργανα στοιχεία του οστού, τα οποία σχηματίζουν κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και ευθύνονται για τη χαρακτηριστική σκληρότητα του οστού σε σχέση με άλλες μορφές συνδετικού ιστού. Η ανόργανη ουσία αποτελεί το 65-70% του βάρους του οστού. Η εναπόθεση των ανόργανων στοιχείων (επιμετάλλωση) στο οστεοειδές γίνεται από τις οστεοβλάστες. Η διαδικασία αυτή ξεκινά σε ενδοκυτταρικά των οστεοβλαστών κυστίδια, στα οποία αρχικά συγκεντρώνονται ανόργανα στοιχεία με τη συνδρομή της αλκαλικής φωσφατάσης και της ATP-άσης και παράγεται άμορφος υδροξυαπατίτης. Ο άμορφος υδροξυαπατίτης μετατρέπεται σε κρύσταλλο όταν η μάζα του ξεπεράσει κάποιο όριο και, διά μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, εναποτίθεται στο οστεοειδές, καταλαμβάνοντας τα κενά ανάμεσα στις κολλαγόνες ίνες. Η διαδικασία αυτή, αν και είναι γρήγορη στο ξεκίνημά της (μέχρι την επιμετάλλωση του 50% της θεμέλιας ουσίας), μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες μέχρι να ολοκληρωθεί (Weisbrode 2004).

1.3.2. Το οστό ως ιστός

Η διάταξη των κολλαγόνων ινών στη μεσοκυττάρια ουσία καθορίζει τη μορφή του οστίτη ιστού. Στα θηλαστικά, η *ινώδης μορφή* (primary bone), η οποία χαρακτηρίζεται από πλεγματούδη διάταξη των κολλαγόνων ινών, παρατηρείται μόνο κατά τη διάρκεια της διάπλασης των οστών, ενώ στη συνέχεια αντικαθίσταται από την *πεταλιώδη μορφή* (lamellar/secondary bone). Στην πεταλιώδη μορφή οι κολλαγόνες ίνες συγκολλούνται μεταξύ τους με θεμελιακή τιτανωμένη ουσία, συγκροτούν λεπτότατες δεσμίδες με παράλληλη και πυκνή διάταξη και σχηματίζουν τα οστέινα πετάλια (Weisbrode 2004).

Η βασική μονάδα ιστικής οργάνωσης του συμπαγούς οστού είναι ο οστεώνας (Harvesian system). Στα φλοιώδη τμήματα του οστού, καθώς και στο υποχόνδριο

οστό, οι οστεώνες αποτελούν κυλίνδρους ομόκεντρα διατεταγμένων οστέινων πετάλων. Οι κύλινδροι αυτοί διατάσσονται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του οστού και η περιφέρειά τους αφορίζεται από μια λεπτή διακριτή ζώνη (cement line / resting line / reversal line), φτωχή σε κολλαγόνο και πλούσια σε πρωτεογλυκάνες. Ανάμεσα στους οστεώνες παρατηρούνται τα διάμεσα πέταλα (interstitial lamellae), τα οποία διατάσσονται με ακανόνιστη φορά. Στοιβάδες ομόκεντρων οστέινων πετάλων (circumferential lamellae), παράλληλων με τον επιμήκη άξονα του οστού, περιβάλλουν το σύστημα των οστεώνων, τόσο κεντρικά του περιστέου όσο και περιφερικά του ενδοστέου. Στο κέντρο κάθε οστεώνα υπάρχει ο σωλήνας του Havers, ο οποίος επικοινωνεί με γειτονικούς σωλήνες, αλλά και με την ελεύθερη επιφάνεια του οστού και τον μυελώδη αυλό, διαμέσου των σωλήνων του Volkmann (Μιχαήλ 1996, Remedios 1999, Weisbrode 2004).

Στο σπογγώδες οστό, τα οστείνα πετάλια σχηματίζουν πλατιές δοκίδες (trabeculae), οι οποίες χιάζονται, σχηματίζοντας κοιλότητες που περιέχουν το μυελό των οστών. Η φορά και η διάταξη των δοκίδων είναι το αποτέλεσμα της προσαρμογής (modeling) του οστού στις μηχανικές πιέσεις που ασκούνται σ' αυτό και ακολουθούν τη φορά των μέγιστων τάσεων (Weisbrode 2004).

1.3.3. Το οστό ως όργανο

Τα διάφορα οστά του σώματος διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο σχηματισμού, την ανάπτυξη, τη δομή και τη λειτουργία τους.

Τα πλατιά οστά του κρανίου σχηματίζονται με τη διαδικασία της υμενοστέωσης (intramembranous ossification), κατά την οποία μεσεγγυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και παράγουν οστό άμεσα. Τα περισσότερα οστά, όμως, συμπεριλαμβανομένων των μακρών οστών, αναπτύσσονται με την παρεμβολική δημιουργία χόνδρινων προπλασμάτων από υαλοειδή χόνδρο με τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστέωσης (endochondral ossification). Η έντονη αγγείωση που παρατηρείται στον υαλοειδή χόνδρο και η ανάπτυξη πρωτογενούς (διαφυσιακού) και δευτερογενών (επιφυσιακών) κέντρων οστεοποίησης είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη σε μήκος και την αύξηση της σκληρότητας του οστού (Weisbrode 2004).

2. ΟΣΤΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ

Αμέσως μόλις προκληθεί μια οστική κάκωση ξεκινάει από τον οργανισμό η διαδικασία επούλωσης. Η διαφορά σε σχέση με τους άλλους ιστούς, οι οποίοι επουλώνονται με ουλώδη ιστό, συνίσταται στο ότι ο οστίτης ιστός επουλώνεται με παραγωγή νέου οστίτη ιστού μέχρι την πλήρη αποκατάσταση του οστού και την επαναφορά του στην αρχική μορφή του.

2.1. Διαδικασία πόρωσης

Η επουλωτική διαδικασία του οστικού τραύματος (κατάγματος) καλείται πόρωση και περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές φάσεις: τη φλεγμονώδη αντίδραση, την επιδιόρθωση και την ανακατασκευή.

2.1.1. Φλεγμονώδης αντίδραση

Η οστική κάκωση αφορά τα οστικά κύτταρα και τη μεσοκυττάρια ουσία, τα αγγεία, το περίοστεο και τους περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς και μυς. Η θρόμβωση του αρχικά δημιουργούμενου αιματώματος έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση φλεγμονωδών διαβιβαστών, όπως κυτταροκίνες (ιντερλευκίνη – 1,2) και αυξητικοί παράγοντες (TGF-β, FGF, PDGF), από τα αιμοπετάλια. Η νέκρωση των οστεοκυττάρων ενεργοποιεί τους μηχανισμούς της φλεγμονής με αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή και την εξαγγείωση και μετανάστευση πολυμορφοπύρηνων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και οστεοκλαστών που απομακρύνουν τα υπολείμματα των νεκρωμένων ιστών (Καρακάσης 1986). Κάποια από τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν αγγειογενετικούς παράγοντες. Η φλεγμονή υποχωρεί με τη φαγοκυττάρωση των νεκρωμένων ιστών από τις οστεοκλάστες που βρίσκονται στην καταγματική εστία ή προκύπτουν από μεσεγχοματικές σειρές κυττάρων (Remedios 1999).

2.1.2. Επιδιόρθωση

Το αρχικό αιμάτωμα οργανοποιείται από τα αιμοπετάλια και την εναπόθεση ινικής. Οστεοπρογονικά κύτταρα μεταναστεύουν στην εστία του κατάγματος από το ενδόστεο, το μυελικό αυλό των καταγματικών άκρων και το περίοστεο και πολλαπλασιάζονται. Από τα κύτταρα αυτά δημιουργείται ο περιοστικός πόρος. Τα μακροφάγα, στις ελλειμματικές σε οξυγόνο συνθήκες του δημιουργούμενου πόρου,

παράγουν αγγειογενετικούς παράγοντες. Η νεοαγγείωση που αναπτύσσεται στην περιοχή είναι εξωοστική, φαίνεται να προέρχεται από τους γύρω μαλακούς ιστούς και αιματώνει τον περιοστικό πόρο και τυχόν ελεύθερα οστικά τεμάχια. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή πολλαπλασιάζονται και μεταπίπτουν σε ινοβλάστες, χονδροβλάστες ή οστεοβλάστες ανάλογα με την πίεση οξυγόνου που επικρατεί στην εστία του κατάγματος. Σε αυτή εναποτίθενται ίνες κολλαγόνου (αρχικά τύπου I, II και III, ενώ στη συνέχεια κυριαρχούν οι τύπου I) και ξεκινά η εναπόθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Καθώς ο χόνδρινος πόρος καλύπτει τα καταγματικά άκρα και επιμεταλλώνεται, αυξάνεται η σταθερότητα, ενώ αποκαθίσταται η ενδομυελική κυκλοφορία, η οποία αναλαμβάνει την αιμάτωση του ινοχόνδρινου πόρου. Σταδιακά, ο ινοχόνδρινος πόρος αντικαθίσταται από άωρο οστό (woven). Το άωρο οστό χαρακτηρίζεται από την παρουσία τυχαία προσανατολισμένων δοκίδων και διάσπαρτων τριχοειδών αγγείων. Σε ισχυρά σταθεροποιημένα κατάγματα, κατάγματα με διακαταγματική συμπίεση, καθώς και όταν υπάρχει απόλυτη επαφή των καταγματικών άκρων, η επιδιόρθωση γίνεται χωρίς τη δημιουργία ινοχόνδρινου πόρου, αλλά με απευθείας σχηματισμό ώριμου οστού· οι οστεοκλάστες δημιουργούν κωνικά ρήγματα (cutting cones) σχηματίζοντας νέα συστήματα Havers. Μέσα σε αυτά διεισδύουν νεοαγγεία, διά μέσου των οποίων μεταναστεύουν προ-οστεοβλάστες, οι οποίες μετατρέπονται σε οστεοβλάστες και εναποθέτουν οστεοειδές, με την επιμετάλλωση του οποίου παράγεται ώριμο (non woven) πεταλιώδες οστό (πρωτογενής / άμεση πόρωση). *Πρωτογενής πόρωση «με γεφύρωση χάσματος»* μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις χωρίς απόλυτη επαφή των καταγματικών άκρων, δηλαδή σε παρουσία κενού της τάξης των 150–200 μm. Αρχικά, δημιουργείται πρωτογενές πεταλιώδες οστό με διάταξη των πεταλιών εγκάρσια προς τον επιμήκη άξονα της διάφυσης. Σε δεύτερο χρόνο τα οστικά πετάλια αναπροσανατολίζονται παράλληλα προς τη διάφυση. Σε περίπτωση ύπαρξης οστικών κενών μεγαλύτερων από 200 μm και έως 1 mm σχηματίζεται άωρο οστό. Η *δευτερογενής / έμμεση πόρωση* αφορά κατάγματα ασταθή ή παρεκτοπισμένα, με εφίππευση, με μερική επαφή και διατήρηση των μικροκινήσεων μεταξύ των καταγματικών άκρων. Ο ινοχόνδρινος πόρος (woven bone) που δημιουργείται μετατρέπεται τελικά σε οστέινο ώριμο πεταλιώδη πόρο. Περιφερικά του κατάγματος δημιουργείται ινώδης πόρος με υμενοστέωση, ενώ κοντά και μέσα στην εστία του κατάγματος δημιουργείται χόνδρινος πόρος με ενδοχόνδρια οστέωση. Τόσο από την

υμενοστέωση όσο και από την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, τελικά προκύπτει οστέινος σκληρός πόρος (hard callus) κατόπιν επιμετάλλωσής του (Remedios 1999, Weisbrode 2004, Mills & Simpson 2012).

2.1.3. Ανακατασκευή

Το στάδιο της ανακατασκευής ξεκινά με τη μετατροπή του άωρου (woven) σε ώριμο (lamellar) οστό και την απορρόφηση του πλεονάζοντος πόρου. Η ανακατασκευή επαναφέρει το οστό στην αρχική μορφολογική κατάστασή του. Οι οστεοκλάστες απορροφούν τις κακώς προσανατολισμένες οστικές δοκίδες, ενώ οι οστεοβλάστες σχηματίζουν νέες δοκίδες κατά τον άξονα φόρτισης του οστού. Ο νόμος του Wolff εξηγεί το ρόλο των μηχανικών ερεθισμάτων στην οστική ανακατασκευή, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση των ηλεκτρικών δυναμικών στη δράση των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών (Remedios 1999, Weisbrode 2004).

2.2. Αποτυχία πώρωσης

Η αποτυχία της επιδιόρθωσης ενός οστού το οποίο έχει υποστεί κάταγμα μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη πώρωση (delayed union) ή απουσία πώρωσης (non union). Καθυστερημένη πώρωση θεωρείται η διαδικασία αποκατάστασης που ξεπερνά κάθε αναμενόμενο χρονικά όριο ολοκλήρωσης, ενώ η απουσία πώρωσης προσδιορίζει τη διακοπή κάθε επουλωτικού μηχανισμού. Οι συχνότεροι λόγοι για την αποτυχία πώρωσης σε κλινικό επίπεδο είναι η ανεπαρκής σταθεροποίηση του κατάγματος και η εκτεταμένη βλάβη στους παρακείμενους μαλακούς ιστούς και στο αγγειακό δίκτυο (Remedios 1999).

3. ΜΕΓΑΛΑ ΟΣΤΙΚΑ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ

Η ανάγκη μελέτης του τρόπου κάλυψης μεγάλων οστικών ελλειμμάτων παρήγαγε πειραματικές εργασίες, κατά τις οποίες ορίστηκε και χρησιμοποιήθηκε ο όρος «μεγάλο οστικό έλλειμμα». Ως μεγάλο οστικό έλλειμμα ενός μακρού οστού ορίζεται το μικρότερο έλλειμμα το οποίο δεν θα πωρωθεί αυτόματα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ζώου, δηλαδή θα οδηγήσει σε αποτυχία πώρωσης (Schmitz & Hollinger 1986). Πρώτος ο Key το 1934 όρισε το μεγάλο οστικό έλλειμμα (segmental bone defect – SBD, Critical Size Bone Defect - CSBD) για σκελετικά ενήλικες σκύλους, ως κάθε

έλλειμμα μακρού οστού του οποίου το μήκος είναι μεγαλύτερο από το γινόμενο: $1,5 \times$ διάμετρος της διάφυσης του οστού ($SBD > 1,5 \times 2r$) (Toombs et al 1985).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η διαδικασία της πώρωσης ενός κατάγματος, το οποίο έχει αναταχθεί και σταθεροποιηθεί, διεξάγεται απαρέγκλιτα. Όταν προκύπτει ένα μεγάλο οστικό έλλειμμα οι βιολογικές συνθήκες διαταράσσονται σε τέτοιο βαθμό, ώστε η αυτόματη πώρωση δεν είναι δυνατή, εκτός αν χρησιμοποιηθούν επικουρικά μέσα. Στα άνηβα ζώα, στα οποία οι επιφυσιακές γραμμές παραμένουν ανοιχτές, ελλείμματα ανάλογου μήκους έχουν πιθανότητες να πωρωθούν αυτόματα (Toombs et al 1985).

Οι Toombs et al (1985) χρησιμοποίησαν το μοντέλο του Key (Key's hypothesis) σε γάτες, βρίσκοντας μάλιστα ότι οι υπολογισμοί του προκαλούν έλλειμμα μεγαλύτερο από το αναγκαίο για την πρόκληση μη πώρωσης. Οι Einhorn et al (1984) απέδειξαν ότι δημιουργώντας έλλειμμα ίσο με το 20% της διάφυσης ενός μακρού οστού στον ποντικό, το οστό παρουσιάζει απουσία πώρωσης. Οι Hollinger & Kleinschmidt (1990) και οι Kroese-Deutman et al (2008) όρισαν ως μεγάλο οστικό έλλειμμα, εκείνο το οποίο δεν καλύπτεται από νέο οστό σε ποσοστό μεγαλύτερο από 10% του μήκους του, κατά τη διάρκεια της ζωής του ζώου.

Η δημιουργία ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος στα πλαίσια ενός πειραματικού μοντέλου πρέπει να συνάδει με τα παραπάνω συμπεράσματα ώστε να είναι ασφαλής ως προς το μέγεθος, το οποίο θα εξασφαλίσει την αποτυχία πώρωσης (Lansdowne 2010). Το μήκος του ελλείμματος σχετίζεται με το είδος του ζώου, αλλά και με το υποκείμενο οστό. Έχει αποδειχθεί ότι έλλειμμα μήκους 21-30 mm σε διάφυση επιμήκους οστού σκύλου είναι αρκετά μεγάλο, ώστε να χαρακτηρίζεται ως μεγάλο οστικό έλλειμμα (Brodke et al 2006, Lindsey et al 2006). Σύμφωνα με την Lansdowne (2010) μέσα στα όρια ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος, χωρίς χειρουργική διαχείριση, αναπτύσσεται ινώδης συνδετικός ιστός και όχι νέο οστό (Viateau et al 2004).

4. ΜΟΣΧΕΥΜΑ

Το *μόσχευμα* (graft) είναι ζωντανός ιστός που τοποθετείται σε σημείο διαφορετικό (λήπτρια χώρα) από εκείνο από το οποίο προέρχεται (δότηρια χώρα), στον ίδιο ή σε διαφορετικό οργανισμό, προκειμένου να καλύψει ένα ιστικό έλλειμμα. Το *εμφύτευμα* (implant) είναι μη ζωντανός ιστός που τοποθετείται σε ένα ζωντανό οργανισμό για να

καλυφθεί ένα ιστικό έλλειμμα. Τα εμφυτεύματα αποτελούνται από τσιμέντο οστού, κατεψυγμένο φλοιώδες οστό, μέταλλα ή κεραμικά υλικά (Martinez & Walker 1999).

Ανάλογα με την προέλευσή του, ένα οστικό μόσχευμα χαρακτηρίζεται ως αυτομόσχευμα, αλλομόσχευμα και ξενομόσχευμα. Αυτομόσχευμα χαρακτηρίζεται το μόσχευμα, του οποίου η δότρια και η λήπτρια χώρα βρίσκονται στον ίδιο οργανισμό, είναι απόλυτα ιστοσυμβατό και η χρήση του δεν εμπεριέχει τον κίνδυνο μετάδοσης νοσημάτων. Αντίστοιχα, στο αλλομόσχευμα η λήπτρια χώρα ανήκει σε διαφορετικό οργανισμό του ίδιου ζωικού είδους, ενώ στο ξενομόσχευμα η δότρια και η λήπτρια χώρα ανήκουν σε διαφορετικούς οργανισμούς, διαφορετικών ζωικών ειδών. Ανάλογα με τη σύστασή του, ένα οστικό μόσχευμα μπορεί να είναι σπογγώδες, φλοιώδες, σπογγο-φλοιώδες (μικτό), σύνθετο και οστεοχόνδρινο. Το μυελώδες ή σπογγώδες οστεομόσχευμα συλλέγεται από τη μεταφυσιακή περιοχή του μυελικού αυλού των μακρών οστών και περιέχει μεγάλο αριθμό οστικών κυττάρων. Αυτός ο τύπος μοσχεύματος προάγει τη δημιουργία νέου οστού, αλλά δεν παρέχει καμία άμεση μηχανική ή δομική στήριξη στο οστό. Το φλοιώδες οστεομόσχευμα αποτελείται αποκλειστικά από την πυκνή φλοιώδη μοίρα του οστού και όταν χρησιμοποιείται σε ένα έλλειμμα παρέχει δομική υποστήριξη ή παίζει το ρόλο του ικριώματος για την ανάπτυξη νέου οστού. Το σπογγο-φλοιώδες ή μικτό οστεομόσχευμα αποτελεί συνδυασμό των δύο παραπάνω τύπων μοσχεύματος. Το σύνθετο μόσχευμα αποτελεί συνδυασμό φρέσκου μυελώδους μοσχεύματος ή μυελού του οστού, με συντηρημένο φλοιώδες αλλομόσχευμα ή αλλοεμφύτευμα. Το οστεοχόνδρινο μόσχευμα περιλαμβάνει, εκτός από οστό, και αρθρικό χόνδρο (Martinez & Walker 1999). Ανάλογα με τη διατήρηση της αγγειώσής του, ένα μόσχευμα χαρακτηρίζεται ως αγγειούμενο, όταν κατά τη λήψη από τη δότρια χώρα διατηρεί την αγγείωση του και αναστομώνεται στη λήπτρια χώρα, και ως μη αγγειούμενο ή ελεύθερο, όταν μεταφέρεται χωρίς τα αγγεία του και η επαναιμάτωσή του γίνεται από τα κύτταρα της λήπτριας χώρας. Ανάλογα με το χρόνο που παρέρχεται από τη λήψη μέχρι τη χρήση ενός μοσχεύματος, αυτό καλείται φρέσκο, όταν συλλέγεται και χρησιμοποιείται άμεσα, και συντηρημένο, όταν συλλέγεται, αποστειρώνεται και αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι αποστείρωσης οστικών μοσχευμάτων είναι η αποστείρωση με οξείδιο του αιθυλενίου, η κατάψυξη, η κατάψυξη σε συνδυασμό με αποξήρανση και η ακτινοβολήση (Martinez & Walker 1999).

4.1. Λειτουργίες των οστικών μοςχευμάτων

Ως *οστεογένεση* ορίζεται η δημιουργία νέου οστού. Η οστεογένεση πραγματοποιείται από τα ζωντανά κύτταρα (οστεοβλάστες και οστεοκλάστες) του μοςχεύματος (όσα επιβιώσουν της μεταφοράς) ή από τα κύτταρα της λήπτριας περιοχής. Η οστεογένεση από ζωντανά κύτταρα επιτυγχάνεται αποκλειστικά από τα φρέσκα μυελώδη μοςχεύματα και τα μοςχεύματα μυελού των οστών. Το ποσοστό των κυττάρων που επιβιώνουν υπολογίζεται ότι δεν ξεπερνά το 60% σε ένα φρέσκο μυελώδες μοςχευμα που χρησιμοποιείται μέχρι και 3 ώρες μετά τη συλλογή του. Η έναρξη της οστεογένεσης είναι άμεση (μέσα στις πρώτες 5 ημέρες από την εφαρμογή του μοςχεύματος), αλλά η μεγαλύτερη παραγωγή νέου οστού ακολουθεί αρκετά αργότερα (8 εβδομάδες μετά την εφαρμογή) (Martinez & Walker 1999).

Ένα μοςχευμα μπορεί, επίσης, να αποτελέσει πηγή οστεογένεσης, λειτουργώντας οστεοεπαγωγικά. Ως *οστεοεπαγωγή* (osteoiduction) ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα της λήπτριας περιοχής ή/και του μοςχεύματος μεταπίπτουν σε οστεογενετικά κύτταρα όταν έρθουν σε επαφή με οστική ουσία. Ακολουθώντας τη διαδικασία της χημειοταξίας, της μίτωσης και της διαφοροποίησης, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα μετατρέπονται σε χονδροβλάστες και οστεοβλάστες, οι οποίες στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και παράγουν νέο οστό. Η οστεοεπαγωγή ρυθμίζεται από ουσίες, όπως η οστεομορφογενετική πρωτεΐνη (bone morphogenic protein-BMP), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β - TGF-β), οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες (insulin-like growth factors), οι κυτταροκίνες, ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor - PDGF), ο ογκονεκρωτικός παράγοντας (tumor necrosis factor - TNF) και η προσταγλανδίνη E₂. Οι ουσίες αυτές περιέχονται τόσο στα μυελώδη όσο και στα φλοιώδη μοςχεύματα, αν και, τουλάχιστον όσον αφορά την BMP, τα σπογγώδη μοςχεύματα υπερέχουν λόγω της αυξημένης επιφάνειας για έκκριση πρωτεϊνών που παρέχει το σπογγώδες οστό (Martinez & Walker 1999, Millis 1999).

Ένα οστικό μοςχευμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σκελετός για την ανάπτυξη νέου οστού, παρέχοντας ταυτόχρονα δομική στήριξη στην περιοχή ενός ελλείμματος. Η διεργασία ανάπτυξης νεοαγγείων, περιαγγειακού ιστού και οστεογενετικών κυττάρων από τη λήπτρια περιοχή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέου

οστού επάνω ή γύρω από ένα μόσχευμα ή εμφύτευμα, το οποίο λειτουργεί ως δομικό ικρίωμα, καλείται *οστεοκαθοδήγηση* (osteochondduction) (Millis & Martinez 2003).

4.2. Ενσωμάτωση μοσχεύματος

Η διαδικασία ενσωμάτωσης ενός μοσχεύματος αναφέρεται στις βιολογικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο υλικό του μοσχεύματος και τη λήπτρια χώρα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό οστού με επαρκείς μηχανικές ιδιότητες. Την αρχική τοποθέτηση ενός μοσχεύματος στη λήπτρια χώρα, ακολουθεί η δημιουργία αιματώματος. Τα αιμοπετάλια, όπως σε κάθε τραύμα, προσκολλούνται στις τραυματικές επιφάνειες και αποκοκκιώνονται, απελευθερώνοντας μεγάλο αριθμό πεπτιδίων αυξητικών παραγόντων (TGF- β , PDGF, ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας - FGF) στο ινώδες δίκτυο, το οποίο σχηματίζεται γύρω από το μόσχευμα από το αίμα και το εξωκυττάριο υγρό. Το αιμάτωμα απορροφάται μέσα σε 1-2 εβδομάδες. Σχεδόν ταυτόχρονα με τη δημιουργία αιματώματος (μερικά λεπτά ή λίγες ώρες από την τοποθέτηση του μοσχεύματος) ξεκινά η φλεγμονώδης αντίδραση, κατά την οποία κύτταρα (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, πλασμοκύτταρα, λεμφοκύτταρα) μεταναστεύουν μαζικά στο οργανοποιημένο αιμάτωμα. Τα ουδετερόφιλα κύτταρα της φλεγμονής εκκρίνουν κινίνες και προσταγλανδίνες, οι οποίες προάγουν την αγγειογένεση. Λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση του μοσχεύματος ξεκινά η επαναγγείωσή του. Ο ινώδης ιστός που αρχικά σχηματίζεται είναι πλούσιος σε κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεογενετικά κύτταρα. Τα διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά κύτταρα ή/και οι οστεοβλάστες που επιβίωσαν της μεταφοράς του μοσχεύματος παράγουν οστεοειδές, το οποίο καλύπτει το κενό μεταξύ του μοσχεύματος και της λήπτριας χώρας. Τα αγγεία, των οποίων ο αριθμός αυξάνεται σημαντικά, χρησιμοποιούν συχνά για την είσοδό τους στο μόσχευμα τους προϋπάρχοντες σωλήνες του Havers ή/και του Volkmann. Στις επιφάνειες του μοσχεύματος παρατηρείται εστιακή οστεοκλαστική απορρόφηση, ενώ προηγείται ή ακολουθεί, ανάλογα με το είδος του μοσχεύματος, η μετατροπή του οστεοειδούς σε νέο οστό με υμενοστέωση ή ενδοχόνδρια οστέωση. Η ταυτόχρονη απορρόφηση νεκρού οστού και η δημιουργία νέου στην ίδια ή γειτονική περιοχή καλείται «σταδιακή υποκατάσταση» (creeping substitution). Μετά την επιμετάλλωση, το οστό που προκύπτει από την ενσωμάτωση του μοσχεύματος στη λήπτρια χώρα υφίσταται

τη διαδικασία της ανακατασκευής, ανάλογα με τη μηχανική φόρτιση που δέχεται, όπως ορίζει ο νόμος του Wolff (Bauer & Muschler 2000, Hadjiargyrou et al 2002, Millis & Martinez 2003).

Η επιτυχής ενσωμάτωση ενός μοσχεύματος μπορεί να διαταραχθεί από τη λήψη φαρμάκων που επηρεάζουν τη διαδικασία της φλεγμονής. Κάποια μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα εμποδίζουν την παραγωγή προσταγλανδινών και καθυστερούν τη διαδικασία επιμετάλλωσης όταν λαμβάνονται τις πρώτες ημέρες μετά την εγκατάσταση του μοσχεύματος (Bauer & Muschler 2000, Pountos et al 2011). Η απουσία μηχανικής σταθεροποίησης ενός μοσχεύματος στη λήπτρια χώρα προκαλεί ανάπτυξη ινώδους ιστού μόνο στα σημεία επαφής του μοσχεύματος με το αρχικό οστό, εμποδίζοντας την ενσωμάτωσή του. Εξαιρετική σημασία για την επιτυχή ενσωμάτωση έχει επίσης η αγγείωση της λήπτριας χώρας και η επάρκειά της σε προγονικά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα συνδετικού ιστού (Einhorn 1995, Bauer & Muschler 2000).

4.3. Παράγοντες και υλικά που προάγουν την πόρωση

Ένα ιδανικό μόσχευμα ή υποκατάστατο μοσχεύματος πρέπει να παρέχει: (1) οστεογενετικά κύτταρα που θα παράγουν νέο οστό, (2) οστεοεπαγωγικούς παράγοντες που θα επάγουν τη διαφοροποίηση οστικών κυττάρων από αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, (3) μια οστεοκαθοδηγητική βάση που θα λειτουργήσει ως ικρίωμα για την ανάπτυξη νέου οστού και (4) δομική στήριξη του οστού κατά τον άξονα φόρτισης μέσα στο έλλειμμα (Bruder et al 1998, Millis & Martinez 2003). Τα περισσότερα είδη μοσχευμάτων, υποκατάστατων και παραγόντων πόρωσης παρέχουν μία ή περισσότερες από τις παραπάνω συνθήκες και η επιλογή τους γίνεται με βάση τις εκάστοτε ανάγκες.

4.3.1. Βιολογικά υλικά

4.3.1.1. Βιολογικά υλικά με τοπική δράση

Τα τοπικά εφαρμοζόμενα υλικά προαγωγής της πόρωσης ενός κατάγματος ή της επούλωσης ενός ελλείμματος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε οστεογενετικά, οστεοκαθοδηγητικά, οστεοεπαγωγικά και σε αυξητικούς παράγοντες (Einhorn 1995, Ragetly & Griffon 2011).

4.3.1.1.α. Οστεογενετικά υλικά

Οστεογενετικά υλικά είναι όλα τα φυσικής προέλευσης βιοϋλικά, δηλαδή τα αυτομοσχεύματα, τα αλλομοσχεύματα, το μόσχευμα από μυελό των οστών και η αλλογενής απομεταλλωμένη οστική θεμέλια ουσία (Demineralized Bone Matrix - DBM), για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν ή προάγουν τη δημιουργία νέου οστού (Einhorn 1995).

Τα *αυτόλογα μοσχεύματα* (σπογγώδη, φλοιώδη ή σπογγο-φλοιώδη) χρησιμοποιούνται στην ορθοπεδική του ανθρώπου για περισσότερο από έναν αιώνα. Θεωρείται ότι η αντίδραση της λήπτριας χώρας απέναντι στο είδος του αυτόλογου μοσχεύματος διαφέρει όσον αφορά τον βαθμό και την επάρκεια της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος. Η βιολογική υπεροχή του αυτόλογου σπογγώδους μοσχεύματος προκύπτει από την ιστοσυμβατότητά του, την επιφάνειά του, η οποία καλύπτεται σε μεγάλη έκταση από οστεοβλάστες, τις πρόδρομες μορφές τους και τη δοκιδώδη τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του. Η κύρια πηγή λήψης αυτόλογων μοσχευμάτων είναι η λαγόνια ακρολοφία και η διαδικασία αυτή στο σκύλο και στη γάτα δεν συνοδεύεται από τις επιπλοκές και τη νοσηρότητα που παρατηρούνται στον άνθρωπο (Johnson & Hulse 2002, Griffon 2005, Mills & Simpson 2012). Διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ανατομική προέλευση του αυτόλογου μοσχεύματος και η σταθερή ακινητοποίησή του επηρεάζουν τόσο το οστεογενετικό δυναμικό του, όσο και τη δημιουργία νέου οστού. Οι Phillips & Rahn (1990) παρατήρησαν ότι ισομεγέθη ελλείμματα σε γνάθο προβάτου, τα οποία καλύφθηκαν με αυτομόσχευμα οστού που δημιουργήθηκε με υμενοστέωση (π.χ. από τη λαγόνια ακρολοφία), παρουσίαζαν εντονότερη (16%) νεοαγγείωση αν το μόσχευμα είχε σταθεροποιηθεί και μικρότερη (6%) χωρίς σταθεροποίησή του. Σε ελλείμματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε αυτομόσχευμα οστού που δημιουργήθηκε με ενδοχόνδρια οστέωση (π.χ. από το άνω άκρο κνήμης), τα αντίστοιχα ποσοστά νεοαγγείωσης ήταν πολύ υψηλότερα (42% για τα σταθεροποιημένα μοσχεύματα και 24% για τα μη σταθεροποιημένα). Η ισχυρή σταθεροποίηση των μοσχευμάτων επηρεάζει επίσης την οστεογενετική ικανότητά τους (LaTrenta et al 1989). Οι Lin et al (1990) παρατήρησαν, εξάλλου, ότι τα αυτομοσχεύματα υμενοστεομένων οστών επιβίωσαν αρτιότερα από τα προερχόμενα από ενδοχόνδρια οστέωση οστών και ότι η αποτελεσματικότητα των τελευταίων εξισώνεται με τα πρώτα αν σταθεροποιηθούν ισχυρά στη λήπτρια χώρα.

Τα *αλλομοσχεύματα* έχουν σαφώς μικρότερη συχνότητα εφαρμογής από τα αυτομοσχεύματα. Όσον αφορά τον άνθρωπο, η πιθανότητα μετάδοσης ασθενειών με τη χρήση αλλομοσχευμάτων και η αυστηρή νομοθεσία, η οποία διέπει τη λήψη, διατήρηση, διακίνηση και χρήση τους, αποτελούν τους κύριους λόγους. Τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα η ιστοσυμβατότητα αποτελεί έναν επιπλέον σοβαρό λόγο. Η διαδικασία κατάψυξης και ξήρανσης που εφαρμόζεται για τη διατήρηση των αλλομοσχευμάτων, μειώνει την αντιγονικότητά τους, αλλά παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη δομική ακεραιότητά τους και άρα μειώνει την ικανότητά τους για μηχανική στήριξη (Heo et al 2009, Ragetly & Griffon 2011). Επιπλέον, κατά τη διαδικασία προετοιμασίας και συντήρησης του αλλομοσχεύματος θανατώνονται τα περισσότερα κύτταρά του, ελαχιστοποιώντας την, ήδη μικρή, οστεογενετική προσφορά του (Einhorn 1995).

Τα *μοσχεύματα από μυελό οστού* περιέχουν πρόδρομα οστεογενετικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να προάγουν το σχηματισμό οστού. Αυτόλογος μυελός οστού χρησιμοποιείται, ταυτόχρονα με αλλοεμφυτεύματα ή ξενομοσχεύματα, για την ενίσχυση της οστεογένεσης. Οι Connolly et al (1989) χρησιμοποίησαν κύτταρα από μυελό οστού, μετά από φυγοκέντρηση και συμπύκνωση, μέσα σε σάκους διάχυσης, τους οποίους εμφύτευσαν τόσο ορθότοπα (σε οστά κουνελιών με καθυστερημένη πώρωση) όσο και έκτοπα (στην περινεϊκή κοιλότητα κουνελιών με καθυστερημένη πώρωση) και παρατήρησαν σαφή επιτάχυνση της οστεογένεσης στην πρώτη ομάδα και οστεογένεση στη δεύτερη. Αυτούσιος, αυτόλογος μυελός οστού χρησιμοποιείται κλινικά για τη διέγερση της παραγωγής οστού, τόσο με τοποθέτηση στην εστία ενός ελλείμματος όσο και χορηγούμενος διαδερμικά (Garg 1993, Einhorn 1995, Bruder et al 1998).

Από τον μυελό του οστού, με διαδικασίες απομόνωσης, καθαρισμού και κυτταρικού πολλαπλασιασμού, λαμβάνονται *αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα*. Προστιθέμενα σε ένα μέσο συντήρησης, το οποίο ευνοεί τον πολλαπλασιασμό αλλά όχι τη διαφοροποίησή τους, διατηρούν το εξαιρετικό οστεογενετικό δυναμικό τους (Einhorn 1995, Bruder et al 1998, Arinzeh et al 2003, Hesse et al 2010). Αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να ληφθούν, επίσης, από τον λιπώδη ιστό. Όποια και αν είναι η τοπογραφική προέλευση των μεσεγχυματικών κυττάρων, η ελεγχόμενη ανάπτυξή τους σε κυτταροκαλλιέργεια δίνει ομοιογενείς πληθυσμούς κυττάρων (Ragetly & Griffon 2011).

Η αλλογενής απομεταλλωμένη οστική θεμέλια ουσία προέρχεται από την επεξεργασία του οστού σε όξινο περιβάλλον, κατά την οποία αφαιρείται η ανόργανη ουσία του, δηλαδή αφαιρώνεται. Αποτελείται από μη κολλαγόνες πρωτεΐνες, οστικούς παράγοντες ανάπτυξης και κολλαγόνο. Προάγει τη δημιουργία νέου οστού όταν συνδυάζεται με μοσχεύματα ή εμφυτεύματα και τα οστεογενετικά χαρακτηριστικά της συγκρίνονται με εκείνα των αυτόλογων μοσχευμάτων (Tiedeman 1991, Griffon 2005). Είναι διαθέσιμη σε διάφορες μορφές, αλλά δεν υπάρχουν επαρκείς κλινικές μελέτες για τη χρήση της (Millis & Martinez 2003, Hoffer et al 2008, Hesse 2010, Aghdasi et al 2012).

4.3.1.1.β. Οστεοκαθοδηγητικά υλικά

Οι οστεοκαθοδηγητικοί παράγοντες δεν μπορούν να προκαλέσουν εξωσκελετική γένεση νέου οστού. Η εκτεταμένη χρήση τους οφείλεται στο ότι παρέχουν την κατάλληλη επιφάνεια για να δράσουν τα φυσικώς υπάρχοντα οστεοκύτταρα της λήπτριας χώρας και να δημιουργηθεί νέο οστό. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι οστεοκαθοδηγητικοί παράγοντες είναι τα *βιοενεργά κεραμικά εμφυτεύματα*. Αποτελούνται από *υδροξυαπατίτη, φωσφορικό ασβέστιο* ή συνδυασμό τους. Τα κεραμικά εμφυτεύματα είναι εύθραυστα και παρουσιάζουν μικρή αντοχή στον εφελκυσμό. Το μειονέκτημά τους αυτό οφείλεται στο ότι οι οστεώνες που αναπτύσσονται μέσα στους πόρους των κεραμικών δεν αντιστοιχούν στον άξονα φόρτισης της περιοχής εμφύτευσης και ο ρυθμός πώρωσης είναι βραδύς. Σήμερα είναι γνωστό ότι όσο αυξάνεται η πορώδης δομή ενός υλικού τόσο αυξάνεται η ικανότητα για ανάπτυξη νέου οστού εντός του μοσχεύματος, ενώ αντίθετα μειώνεται η αντοχή του στη συμπίεση. Τα κεραμικά εμφυτεύματα δεν έχουν οστεοεπαγωγικές ιδιότητες. Έχει, όμως, παρατηρηθεί ότι ο υδροξυαπατίτης (HA) παρουσιάζει σημαντική χημική συγγένεια με αυξητικούς παράγοντες του οστού, οι οποίοι επηρεάζουν τη δημιουργία νέου οστού. Η χημική σύσταση του κεραμικού υλικού, επηρεάζει τη βιοαπορρόφησή του. Το φωσφορικό ασβέστιο (TCP), καθώς είναι περισσότερο πορώδες από τον υδροξυαπατίτη, υφίσταται βιολογική διάσπαση 10-20 φορές ταχύτερα. Σε κλινικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι το φωσφορικό ασβέστιο ανακατασκευάζεται καλύτερα από τον υδροξυαπατίτη λόγω της πορώδους συστάσεώς του, αλλά εμβιομηχανικά είναι λιγότερο ισχυρό, επειδή απορροφάται ταχύτερα (περίπου 6 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του) (Podaropoulos et al 2009). Η

επίμονη ακτινοσκιερή ακτινογραφική απεικόνιση των κεραμικών δεν επιτρέπει τον καθορισμό του βαθμού οστικής παραγωγής (Κουρέας 2005, Gauthier 2011). Τα κεραμικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με μοσχεύματα ή άλλους οστεογενετικούς και οστεοεπαγωγικούς παράγοντες (Einhorn 1995, Κουρέας 2005).

4.3.1.1.γ. Οστεοεπαγωγικά υλικά

Τα οστεοεπαγωγικά υλικά μπορούν να προάγουν τη δημιουργία νέου οστού ακόμη και έκτοπα. Κάποιοι από τους παράγοντες που εκλύονται κατά τη διαδικασία πάρωσης ενός κατάγματος, οι οποίοι προκαλούν ή συμβάλουν στη συγκέντρωση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των περιαγγειακών μεσεγχυματικών κυττάρων σε προγονικά οστεοκύτταρα με τη δυνατότητα παραγωγής νέου οστού, μπορούν να χορηγηθούν εξωγενώς, με σκοπό την επίταση της δράσης τους προς όφελος της πάρωσης. Πρόκειται για ουσίες με αυξητική δράση, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες: τους *αυξητικούς παράγοντες*, στους οποίους, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνονται ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας βήτα (TGFβ), η οστεομορφογενετική πρωτεΐνη (BMP), ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και οι ανοσορρυθμιστικές *κυτταροκίνες* (ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-6) (Martinez & Walker 1999).

Οι TGFβ αποτελούν μια ομάδα αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στη μεσοκυττάρια ουσία του οστού και στα αιμοπετάλια και ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη μεταβολική δραστηριότητα των σκελετικών μεσεγχυματικών κυττάρων. Η τοπική εφαρμογή TGFβ αυξάνει αποδεδειγμένα την οστεογένεση και εφαρμόζεται με επιτυχία σε μεγάλα οστικά ελλείμματα (Martinez & Walker 1999, Millis 1999, Ragetly & Griffon 2011).

Η κύρια δράση της BMP είναι η πυροδότηση της διαδικασίας διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες. Προστιθέμενη μαζί με ένα βιολογικό ή μη φορέα (συνήθως κεραμικά ή κολλαγόνο) στην εστία ενός ελλείμματος, προάγει τόσο την άμεση οστεογένεση (με υμενοστέωση) όσο και την ενδοχόνδρια συνέχειά της (Griffon 2005, 2011, Ragetly & Griffon 2011). Η μοριακά κλωνοποιημένη ανθρώπινη BMP, ανασυνδυασμένη με τις εκφράσεις των ακολουθιών της [rBMP2, rBPM7 (recombinant Bone Morphogenic Protein, ανασυνδυασμένη μορφογενετική πρωτεΐνη) κ.ά.], μελετήθηκε κλινικά συγκρινόμενη με τα σπογγώδη

μοσχεύματα και τα αποτελέσματα εξισώνουν τις οστεοεπαγωγικές δράσεις τους (Millis 1999, Tuominen 2001, Spector et al 2007, Gauthier 2011, Kolambkar et al 2011).

Τα αιμοπετάλια, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, χρησιμοποιούνται επίσης οστεοεπαγωγικά. Στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχονται πολλοί παράγοντες ανάπτυξης (TGF-β, FGF-β, IGFs), των οποίων ο ρόλος στην επιδιόρθωση του οστού είναι σημαντικός. Η χρήση *πλάσματος αίματος πλούσιου σε αιμοπετάλια* (platelet rich plasma) λειτουργεί οστεοεπαγωγικά σε πρόσφατα κατάγματα, αλλά η ωφέλιμη χρήση του σε μεγάλα ελλείμματα και περιστατικά αποτυχημένης πώρωσης δεν έχει τεκμηριωθεί (Millis 1999, Kneser et al 2006, Ragetly & Griffon 2011, Brossi et al 2015).

4.3.1.1.δ. Άλλα μη βιολογικά υλικά

Διάφορα *πορώδη μέταλλα*, όπως εμφυτεύματα κοβαλτίου-χρωμίου, πορώδες ταντάλιο ή κράματα τιτανίου, χρησιμοποιούνται με ή χωρίς επικάλυψη υδροξυαπατίτη, επικουρικά ή ως φορείς οστεοεπαγωγικών ουσιών, στις επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής. Μικροσφαιρίδια *πολυγαλακτικού και πολυγλυκολικού οξέος* συνδυασμένα με BMP2 έχουν εξαιρετική οστεοεπαγωγική δράση, αλλά, εξαιτίας της χαμηλής οστεοκαθοδηγητικής απόδοσής τους, χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων ή αυξητικών παραγόντων (Martinez & Walker 1999).

4.3.1.2. Βιολογικά υλικά με συστηματική δράση

Η χρήση παραγόντων που χορηγούνται συστηματικά και προάγουν τη δημιουργία νέου οστού δεν είναι ευρέως διαδεδομένη. Είναι γνωστό ότι οι *προσταγλανδίνες* PGE1, PGE2 και PGF2α, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα λοιπά ζώϊκά είδη, διεγείρουν την οστεογένεση. Η χορήγησή τους όμως συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες (λήθαργος, διάρροια, έμετοι). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η χρήση αγωνιστών των υποδοχέων EP₂ και EP₄ της προσταγλανδίνης E₂ προάγει τη δημιουργία καλής ποιότητας οστού, όταν χορηγούνται τοπικά αλλά και συστηματικά (με υποδόρια έγχυση). Η χορήγηση αυτών των εξωγενώς συντιθέμενων μορίων φαίνεται να *απαλλάσσει* από τις παρενέργειες των προσταγλανδινών, διατηρώντας, αν όχι επιτείνοντας, το όφελος στη δημιουργία νέου οστού (Einhorn 1995, Chang et al 2000, Li et al 2003, 2007).

4.3.2. Βιοφυσικές και μηχανικές μέθοδοι προαγωγής της πώρωσης

4.3.2.1. Μηχανικές μέθοδοι

Ο κυριότερος τρόπος μηχανικής διέγερσης της παραγωγής νέου οστού εξακολουθεί να είναι η *μηχανική σταθεροποίηση*. Η ισχυρή ή λιγότερο ισχυρή σταθεροποίηση συμβάλλει στη δημιουργία πώρου ποικίλου μεγέθους, ανάλογα με τις δυνάμεις που ασκούνται στην εστία του κατάγματος ή του ελλείμματος, ενώ η απουσία σταθεροποίησης συχνά οδηγεί στη δημιουργία υπερτροφικού πώρου χωρίς γεφύρωση της καταγματικής εστίας (hypertrophic non-union). Η δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις εκάστοτε διακαταγματικές δυνάμεις παραμόρφωσης και η δυνατότητα του αναπτυσσόμενου πώρου να αντισταθεί σε αυτές καθορίζουν το είδος της πώρωσης και την ποιότητα του αναπτυσσόμενου πώρου (Perren 1979).

Ερευνητικά και κλινικά έχει εφαρμοστεί η χρήση *αξονικής μικροκίνησης* (0,5 hertz) σε σταθεροποιημένα κατάγματα, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της πώρωσης, χωρίς διαφορές στην ποιότητα του πώρου (Kenwright et al 1991). Όμως, η τεχνική αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε ελλείμματα ούτε σε ατελείς ή καθυστερημένες πωρώσεις (Einhorn 1995).

Η *πρώιμη ελεγχόμενη μηχανική φόρτιση* ενός σταθεροποιημένου κατάγματος μπορεί να βοηθήσει κατά τη διαδικασία της πώρωσης, καθώς η αποκατάσταση της μυϊκής μάζας και η φυσιολογική μυϊκή λειτουργία βοηθάνε στην αύξηση της αιματικής κυκλοφορίας και στην επωφελή αξονική φόρτιση στην εστία του κατάγματος. Όμως, οι ερευνητές δεν συμφωνούν απόλυτα ούτε για την πάγια εφαρμογή της ούτε για την αποτελεσματικότητά της (Brown & Urban 1969, Arnold 1984, Finsen et al 1989).

4.3.2.2. Ηλεκτρικές μέθοδοι

Η *ηλεκτρική διέγερση* στην εστία ενός ελλείμματος εφαρμόζεται κλινικά με επιτυχία. Συνεχές ρεύμα, συγκεκριμένης έντασης, με χρήση διαδερμικών ή εμφυτευμένων ηλεκτροδίων, διοχετεύεται στην περιοχή του ελλείμματος. Χρησιμοποιείται επίσης η *ηλεκτρομαγνητική διέγερση* με εναλλασσόμενο ρεύμα, το οποίο παράγεται εξωσωματικά από πυκνωτή και διοχετεύεται στην περιοχή του υπό επούλωση ελλείμματος, με συναρτώμενο χρονικά ρυθμό. Η χρήση της ηλεκτρικής και ηλεκτρομαγνητικής διέγερσης έχει εξαίρετα κλινικά αποτελέσματα σε μεγάλα

ελλείμματα ή σε προσεκτικά επιλεγμένες περιπτώσεις αποτυχημένης πώρωσης (non union), καθώς συμβάλλει στη δημιουργία νέου οστού, αντικαθιστώντας επεμβατικές μεθόδους (χρήση μοσχευμάτων), με τις οποίες μπορεί να συγκριθεί επιτυχώς. (Kenwright et al 1991, Mollon et al 2008). Πάντως, δεν υπάρχει εμπειρία από την εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε πρόσφατα κατάγματα (Einhorn 1995).

4.3.2.3. Υπέρηχοι

Η χρήση *χαμηλής έντασης* (της τάξης των mW/cm^2) *παλμικών* (0,5-1,5 millihertz) *υπερήχων* σε πρόσφατα, αναταγμένα και σταθεροποιημένα κατάγματα, επιταχύνει την πώρωση αλλά και τη συνολική κλινική ίαση, καθώς μειώνει τον πόνο και την ακαμψία των αρθρώσεων, χαλαρώνει τους μυς και βοηθάει στην κινητοποίησή τους. Η χρήση τους συνίσταται στην επαναλαμβανόμενη τοπική, διαδερμική εφαρμογή, ενός υψηλής συχνότητας, ανώδυνου, πιεσοακουστικού κύματος (Hadjiargyrou et al 1998). Κλινικές έρευνες στον άνθρωπο συμφωνούν για την αποτελεσματικότητα των χαμηλής έντασης παλμικών υπερήχων σε περιστατικά καταγμάτων με καθυστερημένη πώρωση ή αποτυχία πώρωσης (delayed union / non-union) (Hadjiargyrou et al 1998, Azuma et al 2001).

5. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΜΕΓΑΛΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

Τα μεγάλα οστικά ελλείμματα είναι συχνά στην κλινική πράξη ως αποτέλεσμα τραυματισμού, οστεομυελίτιδας, αποτυχημένης πώρωσης ή αφαίρεσης οστικών μαζών. Συνοδεύονται, συνήθως, από εκτεταμένες κακώσεις των μαλακών ιστών, απώλεια αγγείωσης και επιμολύνσεις και απαιτούν ειδική διαχείριση, καθώς οι διαταραγμένες βιολογικές συνθήκες δεν επιτρέπουν την πώρωση με συμβατικούς τρόπους οστεοσύνθεσης. Η σύγχρονη προσέγγιση των μεγάλων οστικών ελλειμμάτων στην ορθοπαιδική του ανθρώπου περιλαμβάνει (1) τη χρήση αυτόλογων δομικών μοσχευμάτων αγγειούμενων ή μη, (2) τη χρήση δομικών αλλομοσχευμάτων, (3) τη διατατική ιστογένεση και (4) τη χρήση κλωβών τιτανίου (Cobos et al 2000, Malizos et al 2004, Ghert et al 2007, Krieg & Hefti 2007, Bullens 2011).

Η χρήση *αυτόλογων μη αγγειούμενων* μοσχευμάτων (πλευράς, περόνης, ωλένης) εφαρμόζεται σε μεγάλα ελλείμματα οστών, τα οποία δεν φορτίζονται σημαντικά. Απαιτείται μεγάλος χρόνος ακινητοποίησης για την ασφαλή πώρωση και η χρήση

τους συνδέεται με υψηλά ποσοστά κατάγματος του μοσχεύματος (Krieg & Hefti 2007, Bullens 2011). Η χρήση *αγγειούμενου μοσχεύματος περόνης* εφαρμόζεται σε μεγάλα ελλείμματα μακρών οστών με αυξημένα ποσοστά επιτυχίας, αλλά η εφαρμογή της δεν είναι ευρεία επειδή απαιτεί μεγάλη χειρουργική εξειδίκευση και ειδικό εξοπλισμό (Malizos et al 2004, Ghert et al 2007, Bullens 2011). Η χρήση *δομικών αλλομοσχευμάτων* εφαρμόζεται κυρίως σε μεγάλα ελλείμματα που συνδέονται με εκτομές οστικών μαζών, εφαρμογή προθέσεων ή όπου απαιτείται άμεση δομική στήριξη, ενώ συνδυάζονται με οστεοσυνθέσεις ή χρήση *αγγειούμενων μοσχευμάτων*. Η χρήση τους συνδέεται με υψηλά ποσοστά επιμόλυνσης και η προμήθειά τους μπορεί να παρουσιάσει δυσκολίες (Bullens 2011). Η *διατακτική ιστογένεση με οστεομεταφορά* εφαρμόζεται, μεταξύ άλλων, για την κάλυψη μεγάλων οστικών ελλειμμάτων με τη χρήση ρυθμιζόμενου μήκους πλαισίων εξωτερικής οστεοσύνθεσης. Συνήθως, συνδυάζεται με την εφαρμογή σπογγώδους μοσχεύματος. Απαιτεί μεγάλους χρόνους πώρωσης και εμφανίζει σημαντικά ποσοστά επιμόλυνσεων που συνδέονται με τα υλικά της εξωτερικής οστεοσύνθεσης. Συχνά απαιτούνται περισσότερες από μία επεμβάσεις για την επίτευξη της πώρωσης (Lesser 1994, Κυριακόπουλος και συν. 2005). Η *χρήση κλωβών τιτανίου* αποτελεί μια πρόσφατα εφαρμοσμένη τεχνική για την οποία δεν υπάρχουν κλινικά στατιστικά δεδομένα. Οι Cobos et al (2000) πρώτοι χρησιμοποίησαν με επιτυχία ένα πλέγμα τιτανίου σε συνδυασμό με αυτόλογο σπογγώδες μόσχευμα και οστεοεπαγωγικά υλικά για τη διαχείριση μεγάλου ελλείμματος σε κνήμη. Πρόκειται για μια υποσχόμενη μέθοδο, η οποία πρέπει να τεκμηριωθεί και ερευνητικά.

6. ΤΙΤΑΝΙΟ

Το τιτάνιο είναι ένα μεταβατικό μέταλλο, με ατομικό αριθμό 22. Ανακαλύφθηκε το 1791. Η ιδιαίτερα αυξημένη αντοχή του στην τάση, η οποία είναι μεγαλύτερη από οποιουδήποτε άλλου μετάλλου, σε συνδυασμό με το μικρό ειδικό βάρος του, έκανε το τιτάνιο ιδιαίτερα δημοφιλές σε διάφορες εφαρμογές.

Το καθαρό τιτάνιο και τα κράματά του αποτελούν το υλικό επιλογής για την κατασκευή οδοντιατρικών εμφυτευμάτων. Η οδοντιατρική χειρουργική αποτελεί εξάλλου το ευρύτερο πεδίο χρήσης αυτού του μετάλλου. Το τιτάνιο χρησιμοποιείται, επίσης, στη χειρουργική του εγκεφαλικού και προσωπικού κρανίου με τη μορφή πλάκας οστεοσύνθεσης, καθώς και στη γναθοχειρουργική (Meffert et al 1992, Wang

& Fenton 1996). Το τιτάνιο με τη μορφή πλέγματος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990 στο προσωπικό κρανίο (Patel & Langdon 1991) και στη γνάθο για την κάλυψη ενός μεγάλου ελλείμματος (Tideman et al 1993), καθώς και στη σπονδυλική στήλη, με τη μορφή κάθετου κλωβού (Harms cage), εκκινώντας μια εφαρμογή του μετάλλου που άλλαξε την ιστορία της σπονδυλοδεσίας (McAfee & Towson 1999). Η χρήση του τιτανίου στην ορθοπεδική χειρουργική ξεκίνησε με την κατασκευή προθέσεων και τεχνητών μελών.

Η χρησιμότητα του τιτανίου στις ιατρικές και οδοντιατρικές εφαρμογές μπορεί να αποδοθεί στις μηχανικές, φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές του, συμπεριλαμβανομένων της ανοσοανοχής και της κυτταροσυμβατότητας (Donley & Gillette 1991). Το τιτάνιο και τα κράματά του (με αλουμίνιο 5,5-6,5% ή/και βανάδιο 3,5-4,5% - Ti6Al4V) θεωρούνται εξαιρετικά βιοσυμβατά (Paquay et al 1997).

Το καθαρό τιτάνιο εμφανίζει μεγάλη αντοχή στη διάβρωση/οξειδωση, επειδή η επιφάνειά του καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα οξειδίου, πάχους 2-5 nm, το οποίο δεν αντιδρά χημικά με τους περιβάλλοντες ιστούς (Stanford & Keller 1991). Το τιτάνιο εμφανίζει ελαστικότητα πέντε φορές μεγαλύτερη από την ελαστικότητα του οστού. Λόγω της μεγάλης πυκνότητάς του ($\rho = \text{kg/m}^3 = 4,540$) το τιτάνιο και τα κράματά του παρουσιάζουν αυξημένη «ειδική αντοχή» (specific strength = απαιτούμενη δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας για πρόκληση βλάβης / πυκνότητα = 288 kN x m/kg) σε σχέση με άλλα μέταλλα. Αντίθετα, το τιτάνιο έχει μικρή αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης, κάμψης και συστροφής (Cook & Dalton 1992).

Το τιτάνιο κατά τη χρήση του στην ορθοπεδική και στην οδοντιατρική χειρουργική έρχεται σε άμεση επαφή με το οστό, διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την «οστεοενσωμάτωση» (osseointegration). Η οστεοενσωμάτωση αποτελεί φαινόμενο που διαπίστωσε στη δεκαετία του 1950 ο εμβιομηχανολόγος Per-Ingvar Brånemark, ο οποίος παρατήρησε ότι, αφού εμφύτευσε κυλίνδρους τιτανίου σε μηριαία οστά κουνελιών, δεν ήταν δυνατό να αφαιρέσει τα εμφυτεύματα χωρίς να καταστρέψει το οστό. Η παρατήρηση ότι το οστό ενσωμάτωσε το τιτάνιο και δεν το απέρριψε, όπως συμβαίνει με άλλα υλικά, αποτέλεσε την αρχή της έρευνας για την οστεοενσωμάτωση και το τιτάνιο (Brånemark et al 2001). Ο όρος οστεοενσωμάτωση αρχικά ορίστηκε ως η άμεση δομική και λειτουργική σχέση ανάμεσα σε ένα διατεταγμένο οστό και στην επιφάνεια ενός φορτισμένου εμφυτευμένου ανόργανου υλικού. Αργότερα, ο ορισμός αυτός τροποποιήθηκε, ώστε σήμερα ένα εμφυτευμένο

υλικό να θεωρείται οστεοενσωματωμένο όταν δεν παρατηρείται καμία προϊούσα συναφής κινητικότητα ανάμεσα στο υλικό και στο οστό με το οποίο έρχεται σε επαφή (Brånemark 1983). Η οστεοενσωμάτωση αποτελεί, λοιπόν, ένα μηχανισμό στήριξης μέσω του οποίου ανόργανα υλικά μπορούν αξιόπιστα και προβλέψιμα να ενσωματωθούν σε ζωντανό οστό και το αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης να είναι ανθεκτικό σε κάθε φυσιολογική συνθήκη φόρτισης.

Το οξείδιο που συναντάται σε λεπτή στοιβάδα στην επιφάνεια του καθαρού τιτανίου εμποδίζει την άμεση επαφή του καθαρού μετάλλου με τα βιολογικά μόρια και μειώνει τη φλεγμονώδη αντίδραση, σηματοδοτώντας την αποδοχή του υλικού από τον οργανισμό (Albrektsson & Brånemark 1983).

Το οξείδιο του τιτανίου είναι, από χημική άποψη, από τα πλέον ανθεκτικά στη διάβρωση / οξειδωση υλικά. Ταυτόχρονα, όμως, ευθύνεται για την οστεοενσωμάτωση του τιτανίου, καθώς, σε επαφή με το οστό, καλύπτεται από μια πολύ λεπτή στοιβάδα θεμέλιας ουσίας («ενδιάμεση ζώνη» interface zone), δηλαδή μακρομόρια πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών στηριγμένων σε ένα σκελετό υαλουρονικού οξέος. Οι πρωτεογλυκάνες σχηματίζουν ένα είδος «βιολογικής κόλλας» υπεύθυνης για την προσκόλληση κυττάρων, ινιδίων και άλλων γειτονικών δομών. Νημάτια κολλαγόνου από τον περιβάλλοντα οστίτη ιστό πλησιάζουν το τιτάνιο φτιάχνοντας ένα λεπτό δικτυωτό. Σταδιακά το δικτυωτό των νηματίων αντικαθίσταται από ινίδια κολλαγόνου σε συνέχεια των ινιδίων του περιβάλλοντος οστού. Προεκβολές οστεοκυττάρων από το οστό πλησιάζουν επίσης το τιτάνιο καθώς ξεκινά η διαδικασία επιμετάλλωσης. Η οστεοενσωμάτωση του τιτανίου οφείλεται, σύμφωνα με τα παραπάνω, σε κατά τόπους μοριακούς δεσμούς βιομορίων στην επιφάνεια του εμφυτευμένου τιτανίου. Εναλλακτικά, η οστεοενσωμάτωση επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη εκτεταμένων διπολικών ή ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Συγκεκριμένα, εξαιτίας της υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς (παραπλήσια με εκείνη του νερού) το οξείδιο του τιτανίου μπορεί να επιδείξει πιο «φυσικές» αλληλεπιδράσεις με βιομόρια, σε σύγκριση με άλλα οξείδια μετάλλων (π.χ. οξείδιο του αλουμινίου). Το πιθανότερο είναι η αρχική συναρμογή στην ενδιάμεση ζώνη να αποτελεί συνδυασμό τοπικών χημικών δεσμών και εκτεταμένων διπολικών ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Albrektsson & Brånemark 1983, Refai et al 2004).

Το οξείδιο του τιτανίου δεν παρατηρείται στην επιφάνεια των κραμάτων του τιτανίου, τα οποία για τον λόγο αυτόν δεν οστεοενσωματώνονται επιτυχώς, όπως άλλωστε συμβαίνει και με άλλα μέταλλα.

Όλα τα είδη κυττάρων που εμπλέκονται στη δημιουργία νέου οστού επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας των εμφυτευμάτων και για τον λόγο αυτόν η μορφολογία της επιφάνειας θεωρείται σημαντικός παράγοντας σε μια επιτυχημένη οστεοενσωμάτωση εμφυτεύματος. Προκειμένου να βελτιωθεί η οστεοενσωμάτωση ενός εμφυτεύματος τιτανίου, η επιφάνειά του καθίσταται τεχνητά αδρή με αμμοβολισμό, με διάβρωση από οξύ ή καθιστώντας το πορώδες (Albrektsson & Brånemark 1983, Fujibayashi et al 2004, Refai et al 2004, Veis et al 2004, 2007, Hederstierna 2008).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Χειρουργική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατόπιν έγκρισης του ερευνητικού πρωτοκόλλου από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Καρδίτσας (Αρ. πρωτ.: 2571, 5/7/2006).

1.1. Σκύλοι

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 32 ενήλικοι, αρσενικοί, στερημένοι σκύλοι, φυλής Beagle. Οι σκύλοι προέρχονταν από την εκτροφή πειραματόζωων της Χειρουργικής Κλινικής, ήταν εμβολιασμένοι, απαλλαγμένοι εξωπαρασίτων και ενδοπαρασίτων και περιορισμένοι σε κλειστή εκτροφή κατ' ελάχιστο για 2 χρόνια. Κάθε σκύλος διέμενε σε χωριστό διαμέρισμα και είχε ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Η ηλικία των ζώων ήταν 2-5 ετών και το σωματικό βάρος τους 12-21 κιλά. Η ορχεκτομή των σκύλων είχε γίνει κατά την ηλικία των 12-14 μηνών.

Πριν συμπεριληφθούν στις ομάδες πειραματισμού οι σκύλοι εξετάστηκαν κλινικά και εργαστηριακά και βρέθηκαν υγιείς, χωρίς αιματολογικές ή βιοχημικές διαταραχές και αρνητικοί στον ορολογικό έλεγχο για αντισώματα *Leishmania* spp. και *Ehrlichia canis*, καθώς και για αντιγόνα ενήλικων θηλυκών σκωλήκων *Dirofilaria immitis*. Στη συνέχεια ακτινογραφήθηκε το αντιβράχιό τους, σε δύο λήψεις (προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια), για να επιβεβαιωθεί η σύγκλιση των επιφυσιακών γραμμών και να διερευνηθούν δυσμορφίες, τυχόν παλαιά τραύματα, φλεγμονές ή οτιδήποτε θα μπορούσε να αποκλίνει από το φυσιολογικό στη μορφολογία των οστών και των εκατέρωθεν παρακείμενων αρθρώσεων.

1.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες πειραματισμού αποτελούμενες από 8 ζώα η καθεμιά. Σε όλα τα ζώα, όλων των ομάδων, δημιουργήθηκε οστικό έλλειμμα στο μέσο της διάφυσης της αριστερής ωλένης. Η επιλογή του αριστερού άκρου ήταν τυχαία. Στην ομάδα Α το έλλειμμα έμεινε κενό και οστεοσυντέθηκε με μεταλλική πλάκα και κοχλίες. Στην ομάδα Β το έλλειμμα πληρώθηκε με φρέσκο αυτόλογο οστεομόσχευμα από τη λαγόνια ακρολοφία και οστεοσυντέθηκε με μεταλλική πλάκα

και κοχλίες. Στην ομάδα Γ το έλλειμμα καλύφθηκε με πλέγμα τιτανίου και οστεοσυντέθηκε με μεταλλική πλάκα και κοχλίες. Στα ζώα της ομάδας Δ το έλλειμμα πληρώθηκε με φρέσκο αυτόλογο οστεομόσχευμα από την λαγόνια ακρολοφία, καλύφθηκε με πλέγμα τιτανίου και οστεοσυντέθηκε με μεταλλική πλάκα και κοχλίες (Σχήμα 1).

1.2.1. Υλικά

1.2.1.1. Πλέγμα τιτανίου

Σε δύο από τις τέσσερις πειραματικές ομάδες επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί χειρουργικό πλέγμα τιτανίου (Lorenz Plating System, BIOMET Microfixation) μήκους 203 mm, πλάτους 127 mm και πάχους 2 mm, με οπές διαμέτρου 1mm.

Κάθε κομμάτι πλέγματος συσκευάστηκε εκ νέου και αποστειρώθηκε, πριν από τη χρήση του, σε υγρό κλίβανο στους 120°C για 40 min.

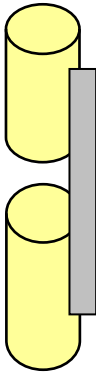
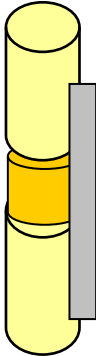
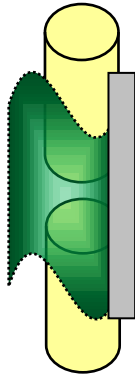
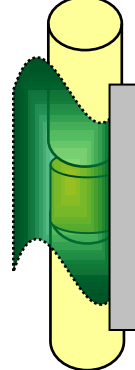
1.2.1.2. Οστεομόσχευμα

Χρησιμοποιήθηκε μικτό (φλοιώδες και σπογγώδες) φρέσκο αυτομόσχευμα από την ομοπλάγια λαγόνια ακρολοφία. Η λήψη του έγινε με τη χρήση στρογγυλής εγγλυφίδας κοπής οστού, σε χειρολαβή χαμηλών ταχυτήτων και ταυτόχρονο καταιονισμό με φυσιολογικό ορό.





Το οστεομόσχευμα από τη λήψη μέχρι την τοποθέτησή του στο μεγάλο οστικό έλλειμμα, διατηρήθηκε καλυμμένο με αποστειρωμένη και εμποτισμένη με φυσιολογικό ορό γάζα.

1.2.1.3. Πλάκα οστεοσύνθεσης

Αρχικά, ως πλάκα οστεοσύνθεσης επιλέχθηκε μια πλάκα τιτανίου (16-hole straight, midface 1,5 mm / 2,0 mm Titanium System, BIOMET Microfixation). Η πλάκα από εύκαμπτο τιτάνιο δίνει πολλαπλές δυνατότητες στο χειρισμό της και πλεονεκτεί όσον αφορά την εφαρμογή της επάνω στο οστό, σε σχέση με τις ανοξειδωτες πλάκες οστεοσύνθεσης. Όμως, κατά τη διάρκεια του πειραματισμού παρουσιάστηκαν επιπλοκές εξαιτίας της χρήσης της πλάκας αυτής και έτσι, τελικά, η οστεοσύνθεση έγινε με κτηνιατρική πλάκα ανακατασκευής από ανοξειδωτο ατσάλι (2 mm cuttable plate, Veterinary Instrumentation).

Ομάδα Α	Πλάκα οστεοσύνθεσης	
Ομάδα Β	Πλάκα οστεοσύνθεσης + Οστεομόσχευμα	
Ομάδα Γ	Πλάκα οστεοσύνθεσης + Πλέγμα τιτανίου	
Ομάδα Δ	Πλάκα οστεοσύνθεσης + Οστεομόσχευμα + Πλέγμα τιτανίου	

Σχήμα 1. Πειραματικός σχεδιασμός κάλυψης οστικού ελλείμματος

 διάφυση ωλένης,
  πλάκα οστεοσύνθεσης,
  πλέγμα τιτανίου,
  οστεομόσχευμα

1.3. Εκτέλεση των πειραματισμών

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

Προεγχειρητικά κάθε ζώο υποβλήθηκε σε δωδεκάωρη στέρηση τροφής και εξάωρη στέρηση νερού. Προαναισθητικά, χορηγήθηκε ξυλαζίνη¹ (0,7 mg/kg Σ.Β.) και μορφίνη² (0,5 mg/kg) ενδομυϊκά, και κεφουροξίμη³, ενδοφλέβια (25 mg/kg Σ.Β.). Η εγκατάσταση της γενικής αναισθησίας έγινε με ενδοφλέβια χορήγηση διαλύματος 2,5% νατριούχου θειοπεντάλης⁴ (5-7 mg/kg Σ.Β.). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε ενδοτραχειακός καθετήρας και η γενική αναισθησία διατηρήθηκε με μίγμα ισοφλουρανίου⁵ (2%) και οξυγόνου με ροή 1-1,5 l/min, σε ημίκλειστο αναπνευστικό κύκλωμα. Για την αντισηψία του χειρουργικού πεδίου χρησιμοποιήθηκε αντισηπτικό σαπούνι γλυκονικής χλωρεξιδίνης⁶ και αλκοολικό διάλυμα χλωρεξιδίνης⁷.

Από την έναρξη της επέμβασης και σε όλη τη διάρκειά της, σε κάθε σκύλο γινόταν συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση γαλακτικούχου διαλύματος Ringer's⁸ και φεντανύλης⁹ (0,1-0,2 μg/kg/λεπτό) για τη διασφάλιση ικανοποιητικής διεγχειρητικής αναλγησίας. Μετεγχειρητικά χορηγήθηκε μορφίνη ενδομυϊκά κάθε 4 ώρες κατά τις δύο πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες και κάθε 6 ώρες κατά τις επόμενες 4 μετεγχειρητικές ημέρες, καθώς και αμοξυκιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ¹⁰ (20 mg/kg) υποδόρια δύο φορές την ημέρα για 7 μετεγχειρητικές ημέρες.

1.3.2. Χειρουργικές επεμβάσεις

1.3.2.1. Λήψη οστεομοσχεύματος

Για την κάλυψη του οστικού ελλείμματος, στις ομάδες που προβλεπόταν, προηγήθηκε της δημιουργίας του ελλείμματος η λήψη οστεομοσχεύματος από την ομοπλάγια λαγόνια ακρολοφία. Το μόσχευμα αφορούσε το τμήμα από την πρόσθια ραχιαία άκανθα μέχρι την οπίσθια ραχιαία άκανθα του λαγονίου και είχε πλάτος 8-10

¹ Rompun (xylazine hydrochloride) inj. sol. 20 mg/ml, Bayer, Germany

² Morphine; Demo SA, Athens, Greece

³ Zinacef, GlaxoSmithKlein Hellas, Athens, Greece

⁴ Pentothal Sodium, dr.pd. inj.1g, Abbott Laboratories, Greece

⁵ Isoflo; Abbott Laboratories Hellas, Athens, Greece

⁶ Hibitane scrub 4% w/v, CANA AE, Greece

⁷ Hibitane αλκοολικό διάλυμα, CANA AE, Greece

⁸ Lactated Ringer's inj. iv infusion, BIOSEP AE, Greece

⁹ Fentanyl; Janssen-Cilag, Beerse, Belgium

¹⁰ Synulox RTU, 140+35 mg/ml, Pfizer Health Care Hellas, Greece

mm και μήκος περίπου 25 mm. Μετά τη λήψη του το μόσχευμα διατηρούνταν τυλιγμένο με αποστειρωμένες γάζες, οι οποίες διαβρέχονταν με χλιαρό φυσιολογικό ορό¹¹, μέχρι τη στιγμή της χρήσης του, 35-45 λεπτά της ώρας αργότερα.

1.3.2.2. Προσπέλαση της ωλένης

Το ζώο τοποθετούνταν σε πλάγια κατάκλιση και διενεργούνταν τομή του δέρματος επάνω στην πλάγια έξω επιφάνεια του αριστερού αντιβραχίου, ανάμεσα στην κερκίδα και στην ωλένη. Η τομή ξεκινούσε από το ύψος της κεφαλής της κερκίδας και επεκτεινόταν μέχρι το περιφερικό άκρο του αντιβραχίου. Τέμνοντας την εν τω βάθει περιτονία, κατά μήκος του πρόσθιου χείλους του κοινού εκτείνοντος τα δάχτυλα μύος, και έλκοντας περιφερικά τις γαστέρες του κοινού εκτείνοντος και του έξω εκτείνοντος τα δάχτυλα μυών, διενεργούνταν τομή ανάμεσα στον μακρό καμπήτρα του δακτύλου I, κοντά στην έκφυσή του στην ωλένη και παράλληλα με τον μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους I & II. Έλκοντας περιφερικά τους εκτείνοντες μυς, αποκαλυπτόταν στο μεγαλύτερο μέρος της η διάφυση της ωλένης (Piermattei et al 2004).

1.3.2.3. Δημιουργία ελλείμματος

Για τη δημιουργία του ελλείμματος επιλέχθηκε το κεντρικό τμήμα της διάφυσης της ωλένης. Η δημιουργία ενός μεγάλου ελλείμματος έγινε με βάση την υπόθεση του Key, σύμφωνα με την οποία, μεγάλο οστικό έλλειμμα θεωρείται εκείνο του οποίου το μήκος υπερβαίνει κατά μιάμιση φορά τη διάμετρο ενός μακρού οστού (Key 1934, Toombs et al 1985). Με βάση τα παραπάνω, υπολογίστηκε η διάμετρος της ωλένης στο μέσο της, αρχικά, με χρήση μαλακού πολύκλωνου ράμματος, προκειμένου να μετρηθεί η περίμετρός της και, στη συνέχεια, με τη χρήση του γεωμετρικού τύπου: περίμετρος κύκλου = $2\pi r$ (r = ακτίνα κύκλου, π = 3,14). Αποφασίστηκε να δημιουργηθεί έλλειμμα 2 φορές μεγαλύτερο της διαμέτρου της ωλένης και τα όριά του σημειώθηκαν με χειρουργικό μαρκαδόρο¹². Για τη δημιουργία του ελλείμματος χρησιμοποιούνταν εγγλυφίδα κοπής οστού, σε χειρολαβή χαμηλών ταχυτήτων, με ταυτόχρονο καταιονισμό φυσιολογικού ορού. Μετά την αφαίρεση του τμήματος της

¹¹ NaCl 0,9%, inj. iv infusion, ΒΙΟΣΕΡ ΑΕ, Greece

¹² Surgical Skin Marker, Securline, Aspen Surgical, USA

ωλένης, μετρήθηκε με ακρίβεια το μήκος του ελλείμματος, το οποίο και καταγράφηκε.

1.3.2.4. Κάλυψη ελλείμματος

Ομάδα Α

Στην ομάδα αυτή, η οποία συνιστά την ομάδα των «απόλυτων» μαρτύρων, το έλλειμμα έμεινε κενό.

Μετά τη δημιουργία του ελλείμματος και την πλύση της περιοχής με φυσιολογικό ορό, προκειμένου να απομακρυνθούν τα τεμάχια οστού και αίματος που προέκυψαν κατά τη δημιουργία του ελλείμματος, τα καταγματικά άκρα ακινητοποιήθηκαν με πλάκα οστεοσύνθεσης που τοποθετήθηκε στην έξω πλάγια επιφάνεια της ωλένης και αυτοβυθιζόμενους κοχλίες (διάμετρος 2 mm, Veterinary Instrumentation, UK). Η επιλογή εύκαμπτης πλάκας επέτρεψε την προσαρμογή της πλάκας με βάση το σχήμα της ωλένης, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη επαφή οστού και υλικών οστεοσύνθεσης, ενώ, ανάλογα με το μέγεθος του οστού, η πλάκα κόπηκε στο κατάλληλο μήκος. Για τη δημιουργία των οπών στην ωλένη χρησιμοποιήθηκε τρυπάνι οστού με διάμετρο 1,5 mm (drill bit, Veterinary Instrumentation) και τοποθετήθηκαν τρεις κοχλίες εκατέρωθεν του ελλείμματος. Μετά τη σταθεροποίηση των καταγματικών άκρων μετρήθηκε με ακρίβεια η μεταξύ του περιφερικού άκρου του ελλείμματος (περιφερικό καταγματικό άκρο) και του πλησιέστερου κοχλίου, καθώς και η απόσταση μεταξύ του κεντρικού άκρου του ελλείμματος (κεντρικό καταγματικό άκρο) και του πλησιέστερου κοχλίου, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην οστεομετρία.

Στη συνέχεια, το χειρουργικό πεδίο πλύθηκε με φυσιολογικό ορό και συρράφτηκε η περιτονία του αντιβραχίου με συνεχή ραφή και συνθετικό πολύκλωνο απορροφήσιμο ράμμα 2/0 από πολυγλακτίνη 910¹³. Με το ίδιο ράμμα συρράφτηκε ο υποδόριος ιστός, επίσης με συνεχή ραφή, ενώ το δέρμα συρράφτηκε με ενδοδερμική ραφή και συνθετικό μονόκλωνο απορροφήσιμο ράμμα 3/0 από πολυγλυκαπρόνη 25¹⁴.

¹³ Vicryl, Ethicon Inc., Johnson & Johnson

¹⁴ Monocryl, Ethicon Inc., Johnson & Johnson

Ομάδα Β

Στη δεύτερη ομάδα το έλλειμμα της ωλένης καλύφθηκε με οστεομόσχευμα από τη λαγόνια ακρολοφία και σταθεροποιήθηκε με πλάκα οστεοσύνθεσης. Η ομάδα αυτή συνιστά και την ομάδα μαρτύρων της τέταρτης ομάδας.

Σε κάθε ζώο, μετά τη δημιουργία του ελλείμματος και την έκπλυση της περιοχής με φυσιολογικό ορό, τοποθετήθηκε το οστεομόσχευμα της ομοπλάγιας λαγόνιας ακρολοφίας. Το μόσχευμα μετρήθηκε με την βοήθεια ορθοπεδικού χάρακα και το μήκος και το σχήμα του προσαρμόστηκαν σε εκείνα του ελλείμματος της ωλένης.

Αρχικά, το οστεομόσχευμα τοποθετήθηκε στο έλλειμμα της ωλένης και συγκρατήθηκε στο μέσο της πλάκας οστεοσύνθεσης με τη χρήση δύο αυτοβυθιζόμενων κοχλιών διαμέτρου 2 mm. Στη συνέχεια, η πλάκα σταθεροποιήθηκε στην ωλένη, όπως στην προηγούμενη ομάδα. Ακολούθως μετρήθηκε η απόσταση των άκρων του ελλείμματος από τον πλησιέστερο κοχλία (βλέπε ομάδα Α), καθώς και η απόσταση του κοχλία σταθεροποίησης του οστεομοσχεύματος από τα άκρα του. Τέλος, έγινε η συρραφή του χειρουργικού τραύματος όπως στην προηγούμενη ομάδα.

Ομάδα Γ

Στην ομάδα αυτή το έλλειμμα καλύφθηκε με τεμάχιο πλέγματος τιτανίου. Σε κάθε ζώο, μετά τη δημιουργία του ελλείμματος και την έκπλυση της περιοχής με φυσιολογικό ορό, ένα τεμάχιο πλέγματος τιτανίου μετρήθηκε και κόπηκε ώστε να ταιριάζει στις διαστάσεις του ελλείμματος, υπερκαλύπτοντας μετά την τοποθέτησή του τα καταγματικά άκρα κατά 5 mm.

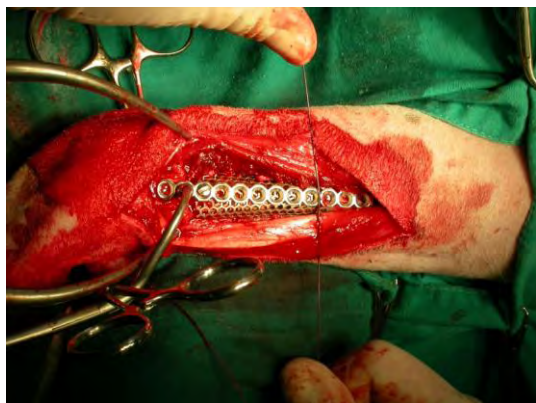
Η τοποθέτηση του πλέγματος γύρω από την ωλένη διευκολύνθηκε με την προηγούμενη τοποθέτηση αποστειρωμένου τεμαχίου ακτινογραφικού φιλμ γύρω της, απομονώνοντας το οστό από τους γύρω μαλακούς ιστούς. Στη συνέχεια, το πλέγμα ωθήθηκε μεταξύ του φιλμ και της ωλένης και, χωρίς να αλλοιωθεί το σχήμα του, περιέβαλε την ωλένη. Στη συνέχεια, το φιλμ αφαιρέθηκε και, προκειμένου να σταθεροποιηθεί το πλέγμα γύρω από την ωλένη, δύο τεμάχια εύκαμπτου πολύκλωνου ράμματος περάστηκαν εξωτερικά του πλέγματος και τυλίχτηκαν γύρω από το οστό και το πλέγμα (Εικόνα 1). Τα τεμάχια του ράμματος αφαιρέθηκαν αφού το πλέγμα σταθεροποιήθηκε με την πλάκα οστεοσύνθεσης και δύο ελεύθερους κοχλίες στα άκρα της ωλένης. Σημειώνεται ότι ο κεντρικότερος και ο περιφερικότερος κοχλίας της μεταλλικής πλάκας συγκρατούσαν το πλέγμα, περνώντας μέσα από τις οπές του.

Τέλος, μετρήθηκαν οι αποστάσεις των κοχλιών από τα άκρα του ελλείμματος και έγινε η συρραφή του χειρουργικού τραύματος όπως στις προηγούμενες ομάδες.

Ομάδα Δ

Στην ομάδα αυτή το έλλειμμα καλύφθηκε με οστεομόσχευμα από την ομοπλάγια λαγόνια ακρολοφία, αλλά και με τεμάχιο πλέγματος τιτανίου.

Αρχικά τοποθετήθηκε το οστεομόσχευμα, όπως στη δεύτερη ομάδα, και στη συνέχεια το πλέγμα τιτανίου (Εικόνες 1 & 2) όπως στην τρίτη ομάδα. Η συρραφή του χειρουργικού τραύματος, καθώς και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όπως σε όλες τις προηγούμενες ομάδες.



Εικόνα 1. Τοποθέτηση πλέγματος τιτανίου με μόσχευμα (σκύλος ν. 2, ομάδα Δ).



Εικόνα 2. Τοποθετημένο πλέγμα και σταθεροποιημένο μόσχευμα (σκύλος ν. 2, ομάδα Δ).

1.4. Παρακολούθηση των ζώων

Η ανάνηψη των ζώων ήταν φυσιολογική. Κανένα ζώο δεν παρουσίασε διαταραχές όρεξης ή διάθεσης κατά τη μετεγχειρητική περίοδο.

Κάθε ζώο διατηρήθηκε σε περιορισμό κίνησης για 8 εβδομάδες, ενώ κατά τις πρώτες 10 μετεγχειρητικές ημέρες ελεγχόταν καθημερινά για ενδείξεις φλεγμονής, πόνου, μετατόπισης ή θραύσης των υλικών οστεοσύνθεσης και διάσπασης του τραύματος. Ακολούθως και για έξι μήνες, κάθε ζώο εξεταζόταν κλινικά σε εβδομαδιαία βάση.

Μετεγχειρητικά, όλα τα ζώα παρουσίασαν διόγκωση του αντιβραχίου που θεωρήθηκε μετεγχειρητικό οίδημα. Δεν χορηγήθηκαν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζουν την οστεογένεση (Bauer & Muschler 2000, Chang et al 2007, Pountos et al 2011). Το οίδημα υποχωρούσε τη 2^η ή 3^η μετεγχειρητική ημέρα, ενώ τα ζώα παρουσίαζαν χωλότητα του αριστερού άκρου για 3-7 ημέρες.

Μετά την πάροδο 7 ημερών όλα τα ζώα χρησιμοποιούσαν το άκρο τους, φέροντας βάρος σε αυτό. Δεν υπήρξαν επιπλοκές σε σχέση με το τραύμα ή τα υλικά οστεοσύνθεσης.

1.4.1. Ακτινολογικός έλεγχος

Μετά το τέλος της επέμβασης, η οποία αποσκοπούσε στην κάλυψη του ελλείμματος της ωλένης, κάθε σκύλος ελέγχθηκε ακτινολογικά αφενός για να ελεγχθεί η θέση των υλικών οστεοσύνθεσης και αφετέρου για να χρησιμοποιηθούν οι ακτινογραφίες ως μέτρο σύγκρισης για την απεικονιστική παρακολούθηση της διαδικασίας της πώρωσης. Για κάθε αντιβράχιο πραγματοποιούνταν δύο λήψεις (προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια) (Εικόνες 3 & 4).

Ο ακτινολογικός έλεγχος της εξέλιξης της πώρωσης γινόταν 4, 8 και 12 εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, με τα ζώα σε βαθιά ηρέμηση, ύστερα από ενδομυϊκή χορήγηση μεδετομιδίνης¹⁵ (30 μg/kg Σ.Β.).

1.5. Λήψη τμήματος της ωλένης

Έξι μήνες μετά την αρχική επέμβαση αφαιρέθηκε από κάθε ζώο το τμήμα της ωλένης που εμπεριείχε το αρχικό έλλειμμα και τα υλικά οστεοσύνθεσης (Εικόνα 5). Κάθε

¹⁵ Domitor, inj. 1 mg/ml, Pfizer Health Care Hellas, Greece

ζώο υποβλήθηκε σε γενική αναισθησία με το ίδιο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην αρχική επέμβαση και η ωλένη προσπελάστηκε με τον ίδιο τρόπο. Η αποκάλυψη του τμήματος της ωλένης που εμπεριείχε το αρχικό έλλειμμα παρουσίαζε δυσκολίες, λόγω πρόσφυσης των μαλακών μορίων στα υλικά οστεοσύνθεσης, κυρίως στα ζώα της 3^{ης} και της 4^{ης} ομάδας, στα οποία, για την κάλυψη του ελλείμματος, είχε χρησιμοποιηθεί πλέγμα τιτανίου.



3



4

Εικόνα 3. Άμεσα μετεγχειρητική πλαιοπλάγια ακτινογραφία (σκύλος ν. 3, ομάδα Γ)

Εικόνα 4. Προσθιοπίσθια ακτινογραφία 4 εβδομάδες μετεγχειρητικά (σκύλος ν. 4, ομάδα Γ).



Εικόνα 5. Λήψη τμήματος ωλένης μαζί με τα υλικά οστεοσύνθεσης και το πλέγμα τιτανίου (σκύλος ν. 8, ομάδα Δ)

Μετά την αποκάλυψη της ωλένης χρησιμοποιήθηκε εγγλυφίδα κοπής οστού, σε χειρολαβή χαμηλών ταχυτήτων, με ταυτόχρονο καταιονισμό φυσιολογικού ορού και

αφαιρέθηκε το επιθυμητό τμήμα του οστού. Τα όρια λήψης του τμήματος της ωλένης ορίστηκαν στα 4 mm περιφερικά των άκρων της πλάκας οστεοσύνθεσης. Στα σημεία επαφής του πλέγματος με το περίοστεο της κερκίδας στις ομάδες Γ και Δ, η λήψη του τμήματος της ωλένης ήταν δύσκολη και διευκολύνθηκε με τη χρήση αποκολλητή περιστέου για το διαχωρισμό τους. Διαπιστώθηκε ότι το εντύπωμα της μορφολογίας του πλέγματος ήταν εμφανές στο περίοστεο της κερκίδας μετά την αφαίρεση του τμήματος της ωλένης.

1.5.1. Σταθεροποίηση της ωλένης στην κερκίδα

Η λήψη του μεγαλύτερου μέρους της διάφυσης της ωλένης αποσταθεροποίησε το αντιβράχιο. Προκειμένου να διασφαλιστεί η άμεση, ανώδυνη και ακίνδυνη χρήση του άκρου, τα εναπομείναντα τμήματα της ωλένης σταθεροποιήθηκαν στην κερκίδα. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν αυτοβυθιζόμενοι κοχλίες διαμέτρου 2,7 mm (Veterinary Instrumentation). Με τρυπάνι οστού και μύτη τρυπανιού διαμέτρου 2,2 mm έγιναν οπές, στο μεν περιφερικό τμήμα της ωλένης και της κερκίδας, παράλληλα με τον καρπό και σε απόσταση τουλάχιστον 1 cm από την αρθρική επιφάνεια της κερκίδας, στο δε κεντρικό τμήμα της ωλένης, από την οπίσθια επιφάνεια της ωλένης προς την κερκίδα, σε αναπλήρωση του κερκίδο-ωλένιου συνδέσμου, και σε απόσταση τουλάχιστον 1 cm από την άρθρωση του αγκώνα (Εικόνες 4 & 5). Η συρραφή του χειρουργικού τραύματος έγινε όπως και κατά την πρώτη χειρουργική επέμβαση. Σε όλα τα ζώα χορηγήθηκαν αντιμικροβιακά και αναλγητικά φάρμακα, σύμφωνα με το αρχικό πρωτόκολλο.

1.6. Παρακολούθηση των ζώων

Η ανάνηψη των ζώων μετά το χειρουργείο ήταν ομαλή. Κανένα ζώο δεν παρουσίασε διαταραχές όρεξης ή διάθεσης κατά την μετεγχειρητική περίοδο. Κάθε ζώο διατηρήθηκε σε περιορισμό κίνησης για 4 εβδομάδες και ελεγχόταν κλινικά, καθημερινά, κατά τις πρώτες 7 μετεγχειρητικές ημέρες και σε εβδομαδιαία βάση κατά τις επόμενες τρεις εβδομάδες.

Κάποια ζώα παρουσίασαν μετεγχειρητικό οίδημα, το οποίο υποχώρησε τη δεύτερη μετεγχειρητική ημέρα. Όλα τα ζώα παρουσίαζαν χωλότητα για 3-7 μέρες. Μετά την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα όλα τα ζώα χρησιμοποιούσαν το άκρο τους φέροντας βάρος σε αυτό, χωρίς ενδείξεις άλγους. Στο τέλος της περιόδου

παρακολούθησης των τεσσάρων εβδομάδων όλα τα ζώα κινούνταν φυσιολογικά χωρίς διαταραχές στην κίνηση.

1.7. Διατήρηση και μελέτη των δειγμάτων

Το τμήμα της ωλένης που λήφθηκε από κάθε ζώο εκπλύθηκε με φυσιολογικό ορό και τοποθετήθηκε σε ατομικό περιέκτη με διάλυμα φορμαλδεΐδης 4%. Μετά το πρώτο εικοσιτετράωρο κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε νέο διάλυμα φορμαλδεΐδης ίδιας πυκνότητας.

1.7.1. Σάρωση του δείγματος σε αξονικό μικροτομογράφο

Κάθε τμήμα ωλένης, προκειμένου να προετοιμαστεί για την οστεομετρία, εισήχθη σε επιτραπέζιο αξονικό τομογράφο (micro CT-40, Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland) με κυλινδρική βάση συγκράτησης του δείγματος (36 μm , 70 kVp, 113 μA , integration time 200 ms, average data 2) και σαρώθηκε σε εγκάρσιες τομές πάχους 0,33 μm κατά τον επιμήκη άξονά του. Αποτέλεσμα της σάρωσης ήταν η λήψη σειράς ψηφιακών δεδομένων, τα οποία, στη συνέχεια, εισήχθησαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και μετατράπηκαν σε εικόνες κατάλληλης μορφής (tiff) για το πρόγραμμα οστεομετρίας. Η σάρωση στον αξονικό τομογράφο πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Οστεομετρίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Århus της Δανίας.

1.7.2. Οστεομετρία

Για την οστεομετρία (van Eijden et al 2004, Bagi et al 2006, Schmidhammer et al 2006) χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα τρισδιάστατης απεικόνισης (Mimics V.13, Materialise NV, Leuven, Belgium). Το σύνολο των εικόνων κάθε δείγματος εισήχθη στο πρόγραμμα και δημιουργήθηκε μια τρισδιάστατη ηλεκτρονική απεικόνιση του δείγματος.

Στην τρισδιάστατη εικόνα ορίστηκε ο προσανατολισμός κάθε δείγματος (κεντρικό και περιφερικό άκρο). Στη συνέχεια μετρήθηκε, με ανθρώπινο χειρισμό, το μήκος του **αρχικού ελλείμματος (AE)** σε κάθε δείγμα, με σημεία αναφοράς τους δύο πλησιέστερους στο έλλειμμα κοχλίες, κυρίως για τις ομάδες Β και Δ, όπου, λόγω της ενσωμάτωσης του οστεομοσχεύματος, τα όρια δεν ήταν ευδιάκριτα. Επίσης, μετρήθηκε το **υπολειπόμενο έλλειμμα (YE)**, δηλαδή το τμήμα του ελλείμματος το

οποίο δεν καλύφθηκε από νέο οστό. Ακολούθως, με σκοπό τη μέτρηση της ποσότητας του οστού που δημιουργήθηκε μέσα στα όρια του αρχικού ελλείμματος, ορίστηκαν «περιοχές ενδιαφέροντος» (ΠΕ). Στα σημεία που αντιστοιχούσαν στο 20, 40, 60 και 80% της απόστασης από το κεντρικό άκρο του αρχικού ελλείμματος προστέθηκαν δέκα τομές πάχους 0,33 μ περιφερικά και κεντρικά του κάθε σημείου και το σύνολο των είκοσι μία τομών αποτέλεσε την κάθε ΠΕ. Έτσι οι ΠΕ αποτελούσαν τρισδιάστατα τμήματα απεικονισθέντος ιστού, μέσα στο αρχικό έλλειμμα. Η οστεομέτρηση των ψηφιακών εικόνων κάθε ΠΕ μας έδωσε στοιχεία για την ποσότητα του οστίτη ιστού και άρα του πόρου που δημιουργήθηκε μέσα στο έλλειμμα. Με τη χρήση του ψηφιακού προγράμματος τρισδιάστατης απεικόνισης και επεξεργασίας των εικόνων υπολογίστηκαν με ακρίβεια τόσο η επιφάνεια της εγκάρσιας τομής του οστού, όσο και ο όγκος της στις ΠΕ. Οι προβολές που αφορούσαν αυξημένη ηχογένεια, λόγω της παρουσίας του πλέγματος ή της μεταλλικής πλάκας, αφαιρέθηκαν από τους υπολογισμούς.

Όλες οι μετρήσεις που έγιναν στις τρισδιάστατες εικόνες, καθώς και τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας και του όγκου οστού στις ΠΕ, καταχωρήθηκαν σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστικό φύλλο για στατιστική επεξεργασία. Στο ίδιο φύλλο καταχωρήθηκαν και όλες οι αρχικές κλινικές μετρήσεις.

1.7.3. Προετοιμασία για ιστολογική μελέτη

Λόγω του μεγέθους των δειγμάτων, αλλά και του γεγονότος ότι για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ήταν απαραίτητο η κοπή να γίνει χωρίς να αφαιρεθούν τα υλικά οστεοσύνθεσης και το πλέγμα τιτανίου, δεν ήταν δυνατή η χρήση της κλασικής μεθόδου έγκλεισής τους σε παραφίνη και κοπής τους με μικροτόμο για ιστολογική μελέτη.

Συνεπώς, τα δείγματα, χωρίς να προηγηθεί διαδικασία αφαλάτωσής τους, αφού παρέμειναν σε διαλύματα αλκοόλης με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (50% για 3 ημέρες, 75% για 3 ημέρες, 95% για 3 ημέρες και 100% για 1 ημέρα), μονιμοποιήθηκαν με γλυκολομεθακρυλάτη¹⁶ (glycolmethacrylate). Ακολούθως, με ισχυρό μικροτόμο κατάλληλου μεγέθους¹⁷, κάθε δείγμα κόπηκε κατά μήκος με οδηγό το μέσο της πλάκας οστεοσύνθεσης, ώστε να προκύψουν δύο τεμάχια, από τα οποία

¹⁶ Technovit 7200 VLC, Kulzer GmbH, Bereich Technik, Wehrheim/Ts, Germany

¹⁷ Exact-Apparatebau, D-200, Norderstedt, Germany

στη συνέχεια λήφθηκαν δύο επιμήκεις και παράλληλες τομές πάχους 200 μm από το κεντρικό τμήμα κάθε δείγματος. Κάθε τομή μειώθηκε σε πάχος μέχρι τα 20-30 μm με τεχνική λείανσης (Säge-Schliff technique) (Donath & Breuner 1982) και βάφθηκε με Toluidine Blue. Η κάθε τομή εξετάστηκε κατά τμήματα σε οπτικό μικροσκόπιο, φωτογραφήθηκε και οι εικόνες μεταφέρθηκαν σε υπολογιστή, όπου η κάθε επιμήκης τομή ανασυστάθηκε στο σύνολό της.

Η συνολική ιστολογική εικόνα της κάθε τομής επέτρεψε τη μελέτη του ελλείμματος σε όλο το μήκος του, καθώς και σε τρία διαφορετικά επίπεδα όσον αφορά το εύρος του.

1.7.4. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) και το t κριτήριο (t-test) για τα ανεξάρτητα δείγματα. Για την μεταξύ των ομάδων σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης δοκιμές Post-Hoc. Η σημαντικότητα ελέγχθηκε σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Οι διαφορές στις τιμές των μετρήσεων του ελλείμματος κλινικά και οστεομετρικά εκτιμήθηκε με το t κριτήριο (t-test) με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Για την αναπαραξιμότητα των μετρήσεων (reproducibility) πραγματοποιήθηκε Wilcoxon τεστ για ζεύγη μετρήσεων ($p=0,280$).

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Ακτινολογικός έλεγχος

Ομάδα Α

Η προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια ακτινογράφιση του άκρου, αμέσως μετά το τέλος της χειρουργικής επέμβασης, επιβεβαίωσε τη σωστή τοποθέτηση των υλικών οστεοσύνθεσης σε όλα τα ζώα της ομάδας Α. Τέσσερις εβδομάδες μετά, σε όλα τα ζώα, στην προσθιοπίσθια λήψη, ήταν ευδιάκριτη η ανάπτυξη πόρου στο κεντρικό άκρο του ελλείμματος. Το ζώο Α3 εμφάνισε πόρο καλά αναπτυγμένο πέραν του κεντρικού και στο περιφερικό άκρο του ελλείμματος. Οκτώ και δώδεκα εβδομάδες μετά την αρχική επέμβαση δεν παρουσιάστηκαν διαφορές, ούτε περαιτέρω ανάπτυξη του πόρου, σε σχέση με την προηγούμενη ακτινογράφιση. Στο ζώο Α3 ο πόρος, τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό άκρο του ελλείμματος, εμφανίστηκε πιο ακτινοσκιερός και αυξημένος σε διαστάσεις. Σε κανένα ζώο της ομάδας Α το έλλειμμα δεν γεφυρώθηκε ακτινολογικά.

Ομάδα Β

Στις ακτινογραφίες των ζώων της ομάδας Β, αμέσως μετά το τέλος της χειρουργικής επέμβασης, παρατηρήθηκε πλήρωση του ελλείμματος από το μόσχευμα. Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, σε όλα τα ζώα, παρατηρήθηκε αύξηση της απόστασης (> 2 mm) ανάμεσα στο μόσχευμα και στην ωλένη, ενδεικτική της απορρόφησης που είχε υποστεί το μόσχευμα. Αντίθετα, οκτώ εβδομάδες μετά την τοποθέτηση του μοσχεύματος, το διάστημα αυτό εμφανίστηκε μειωμένο (περίπου 1 mm) και ακτινοσκιερό. Στις δώδεκα εβδομάδες μετεγχειρητικά εξακολουθούσε να είναι εμφανές το όριο μεταξύ ωλένης και μοσχεύματος, αν και το εύρος του ήταν πολύ μειωμένο.

Ομάδα Γ

Η προσθιοπίσθια και πλαγιοπλάγια ακτινογράφιση του άκρου, αμέσως μετά το τέλος της χειρουργικής επέμβασης, επιβεβαίωσε τη σωστή τοποθέτηση του πλέγματος σε όλα τα ζώα της ομάδας Γ. Τέσσερις εβδομάδες μετεγχειρητικά, σε τρεις σκύλους στους οποίους είχαν χρησιμοποιηθεί πλάκες τιτανίου, παρατηρήθηκε ότι αυτές είχαν σπάσει. Το σημείο της θραύσης ήταν πάντα το ίδιο (περιφερικά του κεντρικότερου

κοιλία στο κεντρικό καταγματικό άκρο) και για τον λόγο αυτόν οι συγκεκριμένοι σκύλοι αποκλείστηκαν από τη μελέτη και αντικαταστάθηκαν από άλλους. Στα οκτώ ζώα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε πλάκα από ανοξείδωτο χάλυβα, δεν παρατηρήθηκε θραύση ή άλλη απώλεια υλικών τέσσερις εβδομάδες μετά την επέμβαση. Επίσης, η ύπαρξη πώρου ήταν ελάχιστη διακριτή, αφορούσε τα άκρα του ελλείμματος και είχε μικρό εύρος (1-2 mm). Οκτώ εβδομάδες μετά την επέμβαση δεν παρατηρήθηκε απώλεια ή θραύση των υλικών, αλλά ούτε επιπλέον ανάπτυξη πώρου. Εξαιρέση αποτέλεσε το ζώο Γ4, στο οποίο παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη πώρου (6-8 mm) τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό άκρο του αρχικού ελλείμματος. Δώδεκα εβδομάδες μετά την επέμβαση δεν υπήρξαν αλλαγές στην ακτινολογική εικόνα. Σε τρία ζώα αναπτύχθηκε πώρος μικρών διαστάσεων έξω από το πλέγμα και κατά μήκος της επιφάνειάς του κοντά στα άκρα του ελλείμματος. Το ζώο Γ4 παρουσίασε πώρο μέσα στο πλέγμα σε όλο το μήκος του ελλείμματος και ακτινολογικά ήταν το μόνο που εμφάνισε γεφύρωση του ελλείμματος.

Ομάδα Δ

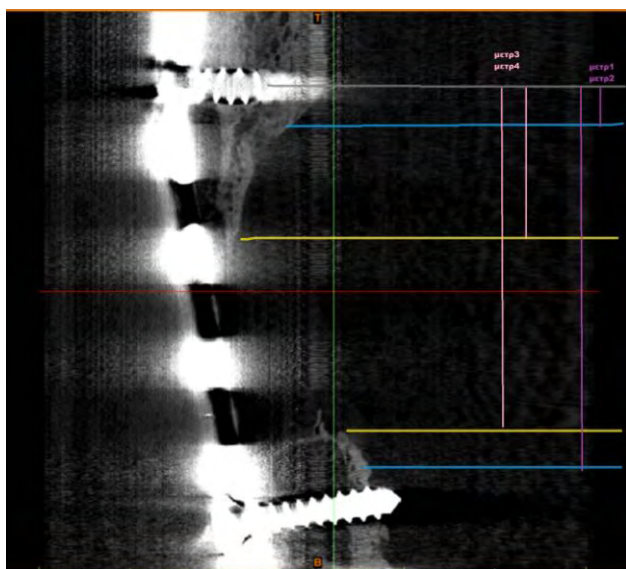
Στα ζώα της ομάδας Δ ο ακτινολογικός έλεγχος, αμέσως μετά το τέλος της χειρουργικής επέμβασης, επιβεβαίωσε τη σωστή τοποθέτηση των υλικών οστεοσύνθεσης και τη σταθεροποίηση του μοσχεύματος. Εξαιρέση αποτέλεσε το ζώο Δ7, το οποίο λόγω θραύσης της πλάκας, αποκλείστηκε από τη μελέτη και αντικαταστάθηκε από άλλο. Τέσσερις και δώδεκα εβδομάδες αργότερα δεν παρατηρήθηκε απώλεια ή θραύση των υλικών οστεοσύνθεσης. Η παρουσία του πλέγματος δεν επέτρεψε τη διαπίστωση τυχόν μείωσης του μεγέθους του μοσχεύματος λόγω απορρόφησης. Σε δύο ζώα, κατά τον έλεγχο των δώδεκα εβδομάδων, το κεντρικό τμήμα του μοσχεύματος εμφάνιζε αυξημένη ακτινοσκοπιότητα σε σχέση με το υπόλοιπο τμήμα του.

2.2. Οστεομετρία

Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων (Εικόνα 6) καταγράφηκαν σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστικό φύλλο (excel).

Στην τρισδιάστατη απεικόνιση κάθε δείγματος μετρήθηκε το **αρχικό έλλειμμα (ΑΕ)**. Έγινε μέτρηση της απόστασης του κεντρικού άκρου του αρχικού ελλείμματος από το άνω άκρο του δείγματος και αυτή η μέτρηση αποτέλεσε τη μέτρηση (μετρ.) 1

(Πίνακας 1, Στήλη Β). Η μέτρηση της απόστασης του περιφερικού άκρου του ελλείμματος από το άνω άκρο του δείγματος αποτέλεσε τη μέτρηση 2 (Στήλη C). Η αφαίρεση της τιμής της πρώτης μέτρησης από εκείνη της δεύτερης, αποτελεί το υπολογισμένο αρχικό έλλειμμα (μετρ. 2 - μετρ. 1 = Αρχικό Έλλειμμα ΑΕ, στήλη Η). Στη στήλη Ι, καταγράφηκε για κάθε δείγμα η τιμή του μήκους του **κλινικού ελλείμματος (ΚΕ)** τη στιγμή της δημιουργίας του, κατά το αρχικό χειρουργείο. Ακολούθως, για κάθε δείγμα υπολογίστηκε το **υπολειπόμενο έλλειμμα (ΥΕ)** με τον ίδιο τρόπο. Η απόσταση του κεντρικού άκρου του υπολειπόμενου ελλείμματος από το άνω άκρο του δείγματος αποτέλεσε τη μέτρηση 3 (Στήλη D) και η μέτρηση του περιφερικού άκρου του υπολειπόμενου ελλείμματος από το άνω άκρο του δείγματος τη μέτρηση 4 (Στήλη E). Στις δύο αυτές στήλες δεν υπάρχουν μετρήσεις για τα δείγματα των ομάδων Β και Δ, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε οστικό μόσχευμα για την κάλυψη του αρχικού ελλείμματος. Στη στήλη Κ καταγράφηκαν οι τιμές του υπολειπόμενου ελλείμματος (μετρ. 4 - μετρ. 3 = Υπολειπόμενο Έλλειμμα – ΥΕ). Στη στήλη L καταγράφηκαν οι τιμές που προκύπτουν από τον λόγο (ΥΕ/ΑΕ): όσο μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει ο λόγος ΥΕ/ΑΕ, για ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερο είναι το υπολειπόμενο έλλειμμα και, αντίστοιχα, τόσο μικρότερος ο πάρος στα όρια του ελλείμματος. Στα δείγματα των ομάδων που χρησιμοποιήθηκε οστεομόσχευμα οι τιμές ΥΕ/ΑΕ είναι 0.



Εικόνα. 6. Μετρήσεις οστεομετρίας

- ___ Άνω άκρο δείγματος
- Κεντρικό και περιφερικό άκρο **αρχικού ελλείμματος**
- Κεντρικό και περιφερικό άκρο **υπολειπόμενου ελλείμματος**
- Μέτρηση 1 και 2, — Μέτρηση 3 και 4

Πίνακας 1. Κλινικές και οστεομετρικά υπολογισμένες μετρήσεις του ελλείμματος (τμήμα υπολογιστικού φύλου Excel)

A	B	C	D	E	H	I	K	L
δείγμα	μετρ1	μετρ2	μετρ3	μετρ4	ΑΕ	ΚΕ	ΥΕ	ΥΕ/ΑΕ
A1	6,69	34,20	9,48	22,17	27,51	25,00	12,69	0,46
B1	4,86	33,18			28,32	28,00	0	0
Δ1	4,20	31,26			27,06	28,00	0	0
Γ2	1,23	27,60	6,90	20,91	26,37	26,00	14,01	0,53
A2	7,20	29,67	9,60	21,84	22,47	24,00	12,24	0,54
Δ2	7,92	38,28			30,36	31,00	0	0
Γ4	10,05	32,04	0,00	0,00	21,99	22,00	0	0
A3	7,11	26,28	8,07	15,63	19,17	22,00	7,29	0,38
Δ3	5,64	29,79			24,15	25,00	0	0
Δ4	1,35	25,62			24,27	22,00	0	0
Γ5	5,28	25,32	11,10	15,00	20,04	20,00	3,9	0,19
Δ5	0,18	24,00			23,82	22,00	0	0
Γ6	9,27	29,49	17,31	24,21	20,22	20,00	6,9	0,34
A4	6,03	28,17	6,09	16,47	22,14	24,00	10,38	0,47
Γ7	8,19	27,27	12,21	26,31	19,08	19,00	14,1	0,74
A5	6,18	24,60	21,03	25,83	18,42	18,00	4,8	0,26
B2	4,83	24,72			19,89	18,00	0	0
A6	9,96	29,94	11,19	30,42	19,98	20,00	19,23	0,96
Γ8	6,99	26,85	8,46	25,02	19,86	20,00	16,56	0,83
B3	6,69	27,57			20,88	19,70	0	0
B4	13,53	30,78			17,25	17,00	0	0
Δ6	12,42	32,43			20,01	19,00	0	0
B5	8,16	30,39			22,23	22,00	0	0
B6	7,26	27,27			20,01	21,00	0	0
Γ9	3,90	24,30	14,67	15,39	20,40	18,50	0,72	0,04
Δ8	10,17	29,85			19,68	19,00	0	0
Δ9	6,93	31,92			24,99	23,00	0	0
B7	9,57	27,24			17,67	18,40	0	0
A7	5,43	25,65	19,95	25,44	20,22	19,00	5,49	0,27
B8	4,77	22,65			17,88	18,00	0	0
Γ11	11,28	28,20	11,46	12,39	16,92	16,00	0,93	0,055
A8	6,54	24,42	7,41	18,75	17,88	18,00	11,34	0,63

ΑΕ: αρχικό έλλειμμα κατά την μέτρηση στην οστεομετρία, **ΚΕ:** κλινικό έλλειμμα όπως υπολογίστηκε διεγχειρητικά, **ΥΕ:** υπολειπόμενο έλλειμμα κατά την οστεομετρία, **ΥΕ/ΑΕ:** ο λόγος υπολειπόμενου προς το αρχικό έλλειμμα

Πίνακας 1Α

	H	K	L
δείγμα	ΑΕ	ΥΕ	ΥΕ/ΑΕ
A1	27,51	12,69	0,46
A2	22,47	12,24	0,54
A3	19,17	7,29	0,38
A4	22,14	10,38	0,47
A5	18,42	4,8	0,26
A6	19,98	19,23	0,96
A7	20,22	5,49	0,27
A8	17,88	11,34	0,63

Πίνακας 1Β

	H	K	L
δείγμα	ΑΕ	ΥΕ	ΥΕ/ΑΕ
B1	28,32	0	0
B2	19,89	0	0
B3	20,88	0	0
B4	17,25	0	0
B5	22,23	0	0
B6	20,01	0	0
B7	17,67	0	0
B8	17,88	0	0

Πίνακας 1Γ

	H	K	L
δείγμα	ΑΕ	ΥΕ	ΥΕ/ΑΕ
Γ2	26,37	14,01	0,53
Γ4	21,99	0	0
Γ5	20,04	3,9	0,19
Γ6	20,22	6,9	0,34
Γ7	19,08	14,1	0,74
Γ8	19,86	16,56	0,83
Γ9	20,40	0,72	0,04
Γ11	16,92	0,93	0,055

Πίνακας 1Δ

	H	K	L
δείγμα	ΑΕ	ΥΕ	ΥΕ/ΑΕ
Δ1	27,06	0	0
Δ2	30,36	0	0
Δ3	24,15	0	0
Δ4	24,27	0	0
Δ5	23,82	0	0
Δ6	20,01	0	0
Δ8	19,68	0	0
Δ9	24,99	0	0

Με τη βοήθεια του προγράμματος οστεομετρίας υπολογίστηκε στις ΠΕ η επιφάνεια του οστού (20_E, 40_E, 60_E, 80_E, στήλες S, U, W και Y του Πίνακα 2) και ο όγκος του (20_O, 40_O, 60_O, 80_O, στήλες R, T, V και X του Πίνακα 3).

Πίνακας 2. Οστεομετρικά υπολογισμένες μετρήσεις επιφάνειας οστού στις ΠΕ (τμήμα υπολογιστικού φύλλου Excel)

A	S	U	W	Y
δείγμα	20_E	40_E	60_E	80_E
A1	2,49	0,15	11,84	50,14
B1	182,68	177,93	211,84	218,80
Δ1	97,96+86,42	147,60	168,62	201,01
Γ2	15,17	0	0	85,20
A2	0	0	0	76,97
Δ2	321,99	471,75	267,34	202,47+153,50
Γ4	340,34	252,06	201,52	185,90
A3	114,67	126,03	143,38	147,75
Δ3	366,31	390,30	620,77	567,94
Δ4	241,68	172,17	459,33	450,68
Γ5	34,64	23,36	101,77	190,68
Δ5	106,55	99,83+89,58	204,26	283,00
Γ6	255,35	58,01	0	116,30
A4	0	11,83	45,04	150,09
Γ7	20,73	0	0	0
A5	140,58	190,17	151,15	42,00
B2	239,86	196,99	149,38+119,57	179,85
A6	0	0	0	0
Γ8	0	0	0	162,89+145,79
B3	290,73	196,71+172,37	365,06	511,92
B4	368,60	350,63	289,78	323,42
Δ6	437,67	276,52+281,10	551,33	632,27
B5	451,78	514,06	283,71	137,96
B6	282,71	229,85	252,82	197,44
Γ9	186,70	50,25	163,15	216,73
Δ8	298,45	135,57	188,13	120,03
Δ9	162,59	258,88	172,13	141,52+131,95
B7	185,03	274,69	403,51	386,47
A7	402,51	329,85	227,63	65,46
B8	167,67	110,03+135,44	243,49	187,56
Γ11	247,11	94,80	208,76	161,04
A8	0	0	0	39,86

20_E: επιφάνεια οστού υπολογισμένη κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 20 (στο 20% του συνολικού μήκους του Αρχικού Ελλείμματος), **40_E:** επιφάνεια οστού υπολογισμένη κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 40, **60_E:** επιφάνεια οστού υπολογισμένη κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 60, **80_E:** επιφάνεια οστού υπολογισμένη κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 80

Πίνακας 2Α

	S	U	W	Y
δείγμα	20_E	40_E	60_E	80_E
A1	2,49	0,15	11,84	50,14
A2	0	0	0	76,97
A3	114,67	126,03	143,38	147,75
A4	0	11,83	45,04	150,09
A5	140,58	190,17	151,15	42,00
A6	0	0	0	0
A7	402,51	329,85	227,63	65,46
A8	0	0	0	39,86

Πίνακας 2Β

	S	U	W	Y
δείγμα	20_E	40_E	60_E	80_E
B1	182,68	177,93	211,84	218,80
B2	239,86	196,99	149,38+119,57	179,85
B3	290,73	196,71+172,37	365,06	511,92
B4	368,60	350,63	289,78	323,42
B5	451,78	514,06	283,71	137,96
B6	282,71	229,85	252,82	197,44
B7	185,03	274,69	403,51	386,47
B8	167,67	110,03+135,44	243,49	187,56

Πίνακας 2Γ

	S	U	W	Y
δείγμα	20_E	40_E	60_E	80_E
Γ2	15,17	0	0	85,20
Γ4	340,34	252,06	201,52	185,90
Γ5	34,64	23,36	101,77	190,68
Γ6	255,35	58,01	0	116,30
Γ7	20,73	0	0	0
Γ8	0	0	0	162,89+145,79
Γ9	186,70	50,25	163,15	216,73
Γ11	247,11	94,80	208,76	161,04

Πίνακας 2Δ

	S	U	W	Y
δείγμα	20_E	40_E	60_E	80_E
Δ1	97,96+86,42	147,60	168,62	201,01
Δ2	321,99	471,75	267,34	202,47+153,50
Δ3	366,31	390,30	620,77	567,94
Δ4	241,68	172,17	459,33	450,68
Δ5	106,55	99,83+89,58	204,26	283,00
Δ6	437,67	276,52+281,10	551,33	632,27
Δ8	298,45	135,57	188,13	120,03
Δ9	162,59	258,88	172,13	141,52+131,95

Πίνακας 3. Οστεομετρικά υπολογισμένες μετρήσεις όγκου οστού στις ΠΕ (τμήμα υπολογιστικού φύλου Excel)

	R	T	V	X
δείγμα	20_O	40_O	60_O	80_O
A1	0,17	0	0,92	3,91
B1	12,59	12,34	14,31	15,56
Δ1	8,67	10,38	11,53	13,20
Γ2	0,85	0	0	4,84
A2	0	0	0	3,72
Δ2	13,98	15,09	13,49	11,27
Γ4	18,19	17,27	12,29	11,04
A3	4,86	3,34	7,13	7,82
Δ3	24,06	15,28	24,98	23,61
Δ4	11,33	7,95	14,91	18,34
Γ5	1,02	0,92	3,17	5,59
Δ5	3,62	3,67	5,26	9,16
Γ6	7,93	1,38	0	3,88
A4	0	0,30	1,41	5,16
Γ7	1,32	0	0	0
A5	10,00	5,33	5,76	1,29
B2	10,58	6,32	7,47	7,37
A6	0	0	0	0
Γ8	0	0	0	9,02
B3	9,92	10,94	16,84	18,33
B4	22,40	21,12	22,45	16,79
Δ6	14,06	13,75	18,97	20,78
B5	22,45	20,82	12,15	8,24
B6	10,36	10,60	11,23	8,94
Γ9	7,27	1,36	4,47	6,88
Δ8	10,18	8,85	7,05	5,62
Δ9	6,83	13,73	8,05	9,28
B7	7,69	10,30	11,59	14,22
A7	14,44	16,95	6,41	1,50
B8	7,23	6,47	8,59	6,89
Γ11	8,71	3,82	9,91	9,24
A8	0	0	0	2,06

20_O: όγκος οστού υπολογισμένος κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 20, **40_O:** όγκος οστού υπολογισμένος κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 40, **60_O:** όγκος οστού υπολογισμένος κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 60, **80_O:** όγκος οστού υπολογισμένος κατά την οστεομετρία στην ΠΕ 80

Πίνακας 3Α

	R	T	V	X
δείγμα	20_O	40_O	60_O	80_O
A1	0,17	0	0,92	3,91
A2	0	0	0	3,72
A3	4,86	3,34	7,13	7,82
A4	0	0,30	1,41	5,16
A5	10,00	5,33	5,76	1,29
A6	0	0	0	0
A7	14,44	16,95	6,41	1,50
A8	0	0	0	2,06

Πίνακας 3Β

	R	T	V	X
δείγμα	20_O	40_O	60_O	80_O
B1	12,59	12,34	14,31	15,56
B2	10,58	6,32	7,47	7,37
B3	9,92	10,94	16,84	18,33
B4	22,40	21,12	22,45	16,79
B5	22,45	20,82	12,15	8,24
B6	10,36	10,60	11,23	8,94
B7	7,69	10,30	11,59	14,22
B8	7,23	6,47	8,59	6,89

Πίνακας 3Γ

	R	T	V	X
δείγμα	20_O	40_O	60_O	80_O
Γ2	0,85	0	0	4,84
Γ4	18,19	17,27	12,29	11,04
Γ5	1,02	0,92	3,17	5,59
Γ6	7,93	1,38	0	3,88
Γ7	1,32	0	0	0
Γ8	0	0	0	9,02
Γ9	7,27	1,36	4,47	6,88
Γ11	8,71	3,82	9,91	9,24

Πίνακας 3Δ

	R	T	V	X
δείγμα	20_O	40_O	60_O	80_O
Δ1	8,67	10,38	11,53	13,20
Δ2	13,98	15,09	13,49	11,27
Δ3	24,06	15,28	24,98	23,61
Δ4	11,33	7,95	14,91	18,34
Δ5	3,62	3,67	5,26	9,16
Δ6	14,06	13,75	18,97	20,78
Δ8	10,18	8,85	7,05	5,62
Δ9	6,83	13,73	8,05	9,28

Ομάδα Α

Σε όλα τα δείγματα της ομάδας Α παρουσιάστηκε μικρή ανάπτυξη νέου οστού στα άκρα του ελλείμματος. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα δείγματα Α3 και Α7 στα οποία παρατηρήθηκε ανάπτυξη οστού σε όλο το μήκος του ελλείμματος και γεφύρωση των καταγματικών άκρων. Ωστόσο, στις τομές που αντιστοιχούν στα επίπεδα των ΠΕ το οστό αυτό παρουσιάστηκε πορώδες και όχι συμπαγές.

Ομάδα Β

Στα δείγματα της ομάδας Β παρατηρήθηκε ανάπτυξη οστού σε όλο το μήκος του ελλείμματος. Σε μερικά δείγματα παρατηρήθηκε μικρής έκτασης απορρόφηση του μοσχεύματος στα σημεία επαφής του με την πλάκα οστεοσύνθεσης.

Ομάδα Γ

Στα δείγματα της ομάδας Γ ήταν εμφανής η ανάπτυξη νέου οστού μέσα στα όρια του ελλείμματος. Το νέο οστό ήταν ανομοιόμορφα αναπτυγμένο, βρισκόταν σε απόσταση από το πλέγμα τιτανίου και στις εγκάρσιες τομές των ΠΕ ήταν μη συμπαγές. Σε τρία δείγματα ήταν εμφανής η ανάπτυξη νέου οστού επάνω στο πλέγμα, αλλά έξω από τα όρια του ελλείμματος ή κοντά σε αυτά. Σε κανένα δείγματα δεν εμφανίστηκε γεφύρωση του ελλείμματος, με εξαίρεση το Γ4 στο οποίο παρατηρήθηκε ανάπτυξη νέου οστού σε όλο το μήκος του ελλείμματος, χωρίς όμως το οστό αυτό να εμφανίζεται συμπαγές. Στις εγκάρσιες τομές των ΠΕ φάνηκε ανομοιογενής ανάπτυξη οστού κατά νησίδες.

Σε όλα τα δείγματα η ανάπτυξη νέου οστού αφορούσε κυρίως το κεντρικό τμήμα του ελλείμματος. Εξαιρέση αποτέλεσε το δείγμα Γ8, για το οποίο στην ΠΕ στο 20% της απόστασης από το κεντρικό άκρο του ελλείμματος υπήρχε μηδενική ανάπτυξη οστού. Στα άλλα δείγματα μηδενική ανάπτυξη οστού παρατηρήθηκε στην ΠΕ που αντιστοιχούσε στο 80% της απόστασης από το κεντρικό άκρο του ελλείμματος και άρα εγγύτερα στο περιφερικό άκρο.

Τα δείγματα Γ1, Γ3 και Γ10, τα οποία αποκλείστηκαν από τη μελέτη, λόγω θραύσης της πλάκας τιτανίου, δεν παρουσίαζαν διαφορετική εικόνα από τα υπόλοιπα.

Ομάδα Δ

Τα δείγματα της ομάδας Δ εμφανίστηκαν ομοιογενή στην τρισδιάστατη απεικόνισή τους, με ενσωμάτωση του μοσχεύματος και απουσία οστικού ελλείμματος. Στις εγκάρσιες τομές των ΠΕ παρατηρήθηκε συμπαγές οστό. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα δείγματα Δ4 και Δ5. Το πρώτο παρουσίαζε μικρό οστικό έλλειμμα στο κεντρικό τμήμα του ελλείμματος, ενώ στο δεύτερο παρατηρήθηκε μεγάλο οστικό έλλειμμα και μείωση των διαστάσεων του μοσχεύματος.

2.3. Ιστολογικά αποτελέσματα

Ο τρόπος κοπής και επεξεργασίας των δειγμάτων (πάχος τομών 20-30 μ) επιτρέπουν παρατήρηση σε επίπεδο ιστού και όχι κυττάρου (Donath & Breuner 1982).

Ομάδα Α

Στα δείγματα της ομάδας Α παρατηρήθηκε περιορισμένη ανάπτυξη ινώδους πώρου, ενώ το οστικό έλλειμμα παρέμεινε μεγάλο. Η ανάπτυξη νέου οστού ήταν μικρή. Στο δείγμα Α3 παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη πώρου, παρουσία ώριμου οστού και σημαντική μείωση του οστικού ελλείμματος.

Ομάδα Β

Στα δείγματα της ομάδας Β παρατηρήθηκε ώριμο οστό. Η πώρωση ήταν πλήρης, ενώ απουσίαζε το οστικό έλλειμμα και παρατηρήθηκε άφθονο νέο οστό και ενσωμάτωση του μοσχεύματος.

Ομάδα Γ

Τα περισσότερα δείγματα της ομάδας Γ εμφάνιζαν περιορισμένη ανάπτυξη ινώδους πώρου, μεγάλο οστικό έλλειμμα και μέτρια ποσότητα νέου οστού. Στο δείγμα Γ8 δεν παρατηρήθηκε ινώδης πώρος, ενώ υπήρχε μεγάλο οστικό έλλειμμα και απουσία νέου οστού. Στο δείγμα Γ5 υπήρχε ινώδης πώρος, ενώ το οστικό έλλειμμα ήταν μέτριο, όπως και η ποσότητα του νέου οστού.

Ομάδα Δ

Τα δείγματα της ομάδας Δ εμφάνιζαν ώριμο οστό, άφθονο νέο οστό και απουσία οστικού ελλείμματος, ενδεικτική της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος. Το δείγμα Δ4

παρουσίαζε μικρό οστικό έλλειμμα, παρά την παρουσία ώριμου οστού και ικανοποιητικού πόρου. Στο δείγμα Δ5 απουσίαζε ο ινώδης πόρος, παρατηρήθηκε μεγάλο οστικό έλλειμμα και απουσίαζε η ανάπτυξη νέου οστού.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Οστικό έλλειμμα

Η επιλογή να εφαρμοστεί η υπόθεση του Key (1934) στην παρούσα έρευνα στηρίχθηκε στη βιβλιογραφική επιβεβαίωση της ορθότητάς της, ως προς το μέγεθος του ελλείμματος σε σχέση με το οστό (Mills & Simpson 2012). Η υιοθέτηση του τύπου «οστικό έλλειμμα = διάμετρος ωλένης x 2» θεωρήθηκε ορθότερη από την επιλογή ενός σταθερού μήκους οστικού ελλείμματος, καθώς το βάρος των ζώων και ο σωματότυπός τους διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Συνέπεια των διαφορών αυτών ήταν οι σημαντικές αποκλίσεις στις διαστάσεις της ωλένης των σκύλων που συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα.

Η χρονική διάρκεια παρακολούθησης της εξέλιξης της πώρωσης στο μεγάλο οστικό έλλειμμα δεν είναι τεκμηριωμένη. Ο ορισμός του μεγάλου οστικού ελλείμματος δέχεται ως χρόνο μη πώρωσης την υπόλοιπη ζωή του ζώου, αλλά, για τα πειραματικά μοντέλα, κατά κοινή παραδοχή, ο χρόνος παρακολούθησης είναι 16 εβδομάδες (Mills & Simpson 2012). Στην παρούσα έρευνα η παρακολούθηση παρατάθηκε έως τους 6 μήνες.

3.2. Μοντέλο ωλένης

Τα πειραματικά μοντέλα μεγάλων οστικών ελλειμμάτων έχουν εφαρμοστεί σε όλα τα μακρά οστά. Το μοντέλο της ωλένης θεωρείται ένα καλά τεκμηριωμένο μοντέλο για την εφαρμογή μεγάλου οστικού ελλείμματος (Lindsey et al 1993).

Ο Key (1934) στήριξε την υπόθεσή του χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ωλένης σε σκύλο, το οποίο, άλλωστε, χρησιμοποιήθηκε σε πολλές μελέτες τα επόμενα χρόνια με διάφορους τρόπους οστεοσύνθεσης και διαχείρισης του υφιστάμενου ελλείμματος (Heiple et al 1963, Nilsson et al 1986, Johnson et al 1989, Grundel et al 1991).

Η διάφυση της ωλένης του σκύλου είναι εύκολα προσπελάσιμη και η δημιουργία ελλείμματος δεν παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες. Η παρουσία της κερκίδας στον ίδιο άξονα φόρτισης με την ωλένη μειώνει την ένταση των αξονικών δυνάμεων που ασκούνται στο δημιουργούμενο έλλειμμα της ωλένιας διάφυσης, επιτρέποντας εξαιρετική εμβιομηχανική παρακολούθηση της πορείας της πώρωσης του ελλείμματος ακόμη και με την παρουσία μοσχεύματος (Lindsey et al 1993). Η γειτνίαση της ωλένης με την κερκίδα επιτρέπει, επίσης, τη σχεδόν άμεση

κινητοποίηση του άκρου μετά τη δημιουργία του ελλείμματος, και, με αυτόν τον τρόπο, την επιθυμητή πρόωμη φόρτιση. Όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποίησαν το άκρο τους 7-10 ημέρες μετά την επέμβαση.

Θεωρώντας δεδομένη τη στήριξη του αντιβραχίου από την κερκίδα, αρκετοί ερευνητές που εφάρμοσαν το μοντέλο της ωλένης, επέλεξαν να μην οστεοσυνθέσουν το έλλειμά της, χωρίς να παρατηρήσουν προβλήματα στη διαδικασία πάρωσης (Heiple et al 1963, dos Santos Neto & Volpon 1984, Nilsson et al 1986, Cook et al 1994, Cook et al 1998). Με την εξέλιξη αυτή φαίνεται να είναι σύμφωνη και η παρατήρησή μας πως στα δείγματα Γ1, Γ3 και Γ10, παρά τη θραύση της πλάκας τιτανίου που χρησιμοποιήθηκε για τη σταθεροποίηση, δεν υπήρξε διαφορά στην πάρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα οκτώ δείγματα της ομάδας Γ. Σε άλλες μελέτες εφαρμόζεται συστηματικά σταθεροποίηση των καταγματικών άκρων εκατέρωθεν του ελλείμματος, είτε με ενδομυελικούς ήλους τύπου Steinmann (Moore et al 1987, Grundel et al 1991) είτε με πλάκες οστεοσύνθεσης (Johnson et al 1989, Schwarz et al 1991, Itoh et al 1998). Η τελευταία τεχνική εξασφαλίζει βέλτιστη σταθεροποίηση και περιορίζει τις μικροκινήσεις που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή του ελλείμματος, παρέχοντας την αναγκαία συνθήκη για πάρωση αν έχει χρησιμοποιηθεί μόσχευμα.

Παρά την ύπαρξη της κερκίδας, η οποία συμβάλλει στον μέγιστο βαθμό στη στήριξη του αντιβραχίου, η κατανομή των δυνάμεων φόρτισης στην κερκίδα και στην ωλένη δεν είναι σταθερή και οι μεταβολές της δεν είναι προβλέψιμες (Lindsey et al 1993). Είναι σαφές, ότι η δημιουργία ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος στη διάφυση της ωλένης διαταράσσει την υπάρχουσα ισορροπία ανάμεσα στα δύο οστά του αντιβραχίου. Στο ξεκίνημα αυτής της μελέτης, η θραύση της πλάκας τιτανίου σε τρία ζώα της ομάδας Γ, δημιούργησε το εύλογο ερώτημα «τι είδους δυνάμεις αναπτύσσονται στην ωλένη, αλλά και ανάμεσα στα δύο οστά, ώστε να προκαλέσουν τη θραύση της;». Όπως προαναφέρθηκε, το τιτάνιο έχει μικρή αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης, κάμψης και συστροφής (Cook & Dalton 1992). Η ακέραιη κερκίδα δίπλα στο ωλένιο έλλειμμα λειτουργεί ως νάρθηκας που εξουδετερώνει τις δυνάμεις κάμψης και συμπίεσης σε αυτό. Αυτό όμως δεν ισχύει για τις δυνάμεις συστροφής, οι οποίες απλώς περιορίζονται από τους μεσόστεους συνδέσμους (Kotha et al 2004, Knothe Tate et al 2012, Bitton et al 2013). Θα μπορούσε λοιπόν να διατυπωθεί η άποψη ότι οι δυνάμεις συστροφής που ασκούνται στην περιοχή του ελλείμματος είναι αυτές που προκάλεσαν τη θραύση της «εύθραυστης» πλάκας τιτανίου. Αυτό

ενισχύεται από το ότι σε κανένα ζώο δεν παρατηρήθηκε θραύση της ισχυρότερης πλάκας από ανοξείδωτο χάλυβα, η οποία προφανώς εξουδετέρωσε και τις δυνάμεις συστροφής. Οι δυνάμεις που ασκούνται στην ωλένη κατά τη χρήση του πρόσθιου άκρου, αλλά και εκείνες που αναπτύσσονται ανάμεσα στην κερκίδα και στην ωλένη, οι μεταβολές τους και η προσαρμογή τους στις εμβιομηχανικές αλλαγές που προκαλεί η δημιουργία ενός ελλείμματος σε ένα από τα δύο οστά, φαίνεται να αποτελούν αστάθμητο παράγοντα του μοντέλου αλλά και ευρύ πεδίο μελλοντικής έρευνας.

3.3. Μόσχευμα

Η χρήση αυτόλογου μοσχεύματος για την κάλυψη ενός οστικού ελλείμματος αποτελεί τη «χρυσή σταθερά» της κλασσικής ορθοπαιδικής χειρουργικής. Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά κλινικής χρήσης μικτού (φλοιώδους και σπογγώδους) μοσχεύματος γίνεται στα μέσα του προηγούμενου αιώνα (Spira 1954). Η επιλογή χρήσης μικτού μοσχεύματος στην παρούσα έρευνα έγινε με κριτήριο την ανάγκη για στήριξη που παρέχει ένα φλοιώδες μόσχευμα και την πυκνότητα οστεογενετικών κυττάρων που διατηρεί ένα φρέσκο μυελώδες μόσχευμα.

Τόσο η λήψη του μοσχεύματος και η διατήρησή του, όσο και η προετοιμασία της λήπτριας χώρας πρέπει να γίνονται με τρόπο που να εξασφαλίζει τη μέγιστη επιβίωση των οστεογενετικών κυττάρων (Gray & Elves 1981). Η λαγόνια ακρολοφία αποτελεί την πιο διαδεδομένη λήπτρια χώρα για μικτά μοσχεύματα στο σκύλο και στη γάτα, λόγω της εύκολης προσπέλασης και της απουσίας επιπλοκών λόγω της λήψης. Στη βιβλιογραφία, για τη λήψη του μοσχεύματος, συχνά χρησιμοποιείται πριόνι Gigli, ηλεκτρικό παλλόμενο πριόνι ή αδαμάντινος δίσκος κοπής με χειρολαβή. Η λήψη του έγινε με τη χρήση στρόγγυλης εγγλυφίδας κοπής οστού, με χειρολαβή χαμηλών ταχυτήτων και ταυτόχρονο καταιονισμό με φυσιολογικό ορό. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο η διαδικασία λήψης είναι συντομότερη, οι βλάβες στους γύρω μαλακούς ιστούς ελάχιστες και η κοπή του μοσχεύματος γίνεται με μεγάλη ακρίβεια (Mills & Simpson 2012).

Το μόσχευμα, από τη λήψη μέχρι την τοποθέτησή του στο μεγάλο οστικό έλλειμμα, διατηρήθηκε καλυμμένο με αποστειρωμένη και εμποτισμένη με φυσιολογικό ορό γάζα. Αυτό εξασφαλίζει τη βιωσιμότητα μικτού ή φλοιώδους μοσχεύματος για 1-2 ώρες (Gray & Elves 1981).

Οι διαστάσεις του μοσχεύματος κατά τη λήψη, υπολογίζονται με βάση τις διαστάσεις του ελλείμματος που πρέπει να καλυφθεί. Είναι απαραίτητο, ωστόσο, να λαμβάνεται μόσχευμα μεγαλύτερο του ελλείμματος και οι διαστάσεις του να διαμορφώνονται λίγο πριν από την εφαρμογή του στη λήπτρια χώρα. Δεδομένου ότι ακόμη και τα μοσχεύματα, τα οποία λαμβάνονται, διατηρούνται και σταθεροποιούνται με τον πιο ενδεδειγμένο τρόπο στη λήπτρια χώρα, παρουσιάζουν ένα βαθμό απορρόφησης, ο υπολογισμός των διαστάσεων είναι σημαντικός για την επιβίωση του μοσχεύματος και την επιζητούμενη πάρωση (Barbieri et al 1997). Στο δείγμα Δ4 η ύπαρξη μικρού οστικού ελλείμματος στο πέρας της μελέτης, πιθανότατα οφειλόταν σε κακό υπολογισμό των διαστάσεων του μοσχεύματος ή/και σε απορρόφηση του, δεδομένης της ιστολογικά και οστεομετρικά επιβεβαιωμένης ύπαρξης ώριμου οστού. Σύμφωνα με τον Basset (1972) η μικρότερη από τις διαστάσεις ενός μοσχεύματος καθορίζει τη βιωσιμότητά του, καθώς καθορίζει την έκταση της αναμενόμενης επαναγγείωσης, αλλά και το μέγεθος της κάκωσης που έχει προκληθεί στα οστεογενετικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της λήψης και της προετοιμασίας του μοσχεύματος. Ιδανικά, η διάσταση αυτή δεν μπορεί να είναι μικρότερη από 5 mm, συνθήκη που, κατά περίπτωση, επιβάλλει διαστάσεις μοσχεύματος μεγαλύτερες από το αναγκαίο, προκειμένου να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα και η περαιτέρω λειτουργικότητά του. Τα μοσχεύματα στην παρούσα μελέτη, κατά τη λήψη, είχαν πάχος 8-10 mm, μήκος 25 mm και πλάτος αυτό της λαγόνιας ακρολοφίας. Κατά την προετοιμασία οι διαστάσεις μειώθηκαν στις, κατά περίπτωση, αναγκαίες, με εξαίρεση τη μικρότερη διάσταση. Στο δείγμα Δ5, παρά την εφαρμογή του μοσχεύματος, οστεομετρικά και ακτινολογικά παρατηρήθηκαν οστικό έλλειμμα και απουσία πάρου, τα οποία οφείλονται σε απορρόφηση του μοσχεύματος πριν από την έναρξη της επαναγγείωσης. Η απορρόφηση αυτή πιθανότατα οφείλεται σε μειωμένη βιωσιμότητα του μοσχεύματος, λόγω του ότι η μικρότερη διάστασή του στο συγκεκριμένο δείγμα (πλάτος της λαγόνιας ακρολοφίας) ήταν μικρότερη των 5 mm, εξαιτίας του μικρού μεγέθους του ζώου.

Τα τρι-φλοιώδη μικτά μοσχεύματα που προέρχονται από τη λαγόνια ακρολοφία παρέχουν το βέλτιστο συνδυασμό στήριξης και οστεογενετικής ικανότητας. Η χρήση τους, όμως, απαιτεί σταθεροποίηση στην εστία του ελλείμματος όπου τοποθετούνται (Einhorn 1995, Barbieri et al 1997, Bullens et al 2009a). Τα φλοιώδη μοσχεύματα καθυστερούν να επαναγγειωθούν, λόγω της φυσιολογικά μικρής ωφέλιμης επιφάνειάς

τους, σε σχέση με τα μυελώδη μοσχεύματα, και της σκληρότητάς τους, η οποία εμποδίζει την εκτεταμένη μικρο-νεοαγγείωση (Bauer & Muschler 2000). Η σταθεροποίηση του μοσχεύματος έγινε με δύο μη συμπίεστικούς κοχλίες (neutral), ακόμη και διαμέσου του πλέγματος τιτανίου (ομάδα Δ), εμποδίζοντας την κίνηση του μοσχεύματος μέσα στο έλλειμμα, ειδικά στην περίοδο απορρόφησης πριν από τη δημιουργία περιστικού πόρου, οπότε οι διαστάσεις του μοσχεύματος μειώνονται (Barbieri et al 1997).

3.4. Τιτάσιο

Το πλέγμα τιτανίου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, πέραν της, από κατασκευής, αδρής επιφάνειάς του, ήταν, λόγω των μικρών οπών του, διάτρητο και, επομένως, ιδανικό για οστεοενσωμάτωση. Το συγκεκριμένο πλέγμα έχει διαστάσεις και διάμετρο οπών μικρότερες από το μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενο σε μακρά οστά πλέγμα (DePuy, Motech) και δεν συνοδεύεται από δακτυλίους στήριξης (Cobos et al 2000, Attias et al 2005). Η επιλογή του βασίστηκε στο μέγεθος του οστού στο οποίο επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί. Η ωλένη του σκύλου είναι κατά πολύ μικρότερη, σε διάμετρο και μήκος, από τα μακρά οστά του ανθρώπου και συνεπώς η χρήση διαφορετικού πλέγματος θα ήταν τεχνικά δύσκολη.

Το σχήμα του κλωβού που σχηματίζεται με το πλέγμα τιτανίου έχει μελετηθεί, επίσης, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το κυλινδρικό ή το κυβοειδές σχήμα εμφανίζει πλεονεκτήματα όσον αφορά την κατανομή των δυνάμεων φόρτισης που υφίσταται το οστό. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι το κυλινδρικό σχήμα παρέχει καλύτερη κατανομή δυνάμεων ακόμη κι όταν δεν χρησιμοποιείται σε μακρά οστά (σπονδυλική στήλη, γνάθος) (Clements et al 2008).

Στην παρούσα μελέτη το πλέγμα τιτανίου οστεοενσωματώθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, στα οστά των ζώων των ομάδων Γ και Δ, όπου χρησιμοποιήθηκε. Η οστεοενσωμάτωση ήταν μακροσκοπικά εμφανής διεγχειρητικά, κατά τη διάρκεια λήψης της ωλένης και προκάλεσε τεχνική δυσκολία στην αποκόλλησή της από την κερκίδα, λόγω του ινώδους πόρου που είχε αναπτυχθεί μέσω των οπών του πλέγματος ανάμεσα στα δύο οστά. Ανάλογη δυσκολία δεν υπήρξε κατά τη λήψη της ωλένης από τα ζώα των ομάδων Α και Β.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, στην ομάδα Δ παρουσιάστηκε σε δύο από τα οκτώ ζώα μικρό (Δ4) ή μεγάλο (Δ5) οστικό έλλειμμα.

Αντίθετα σε όλα τα ζώα της ομάδας Β, στα οποία δεν τοποθετήθηκε πλέγμα τιτανίου, η πόρωση ήταν πλήρης. Αν και στατιστικώς δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, η παρατήρηση αυτή είναι πιθανώς σημαντική, καθώς ενδέχεται το πλέγμα τιτανίου να παρεμποδίζει μερικώς την επαναγγείωση του μοσχεύματος. Εάν συμβαίνει κάτι τέτοιο, η τοποθέτηση κλωβού τιτανίου, ο οποίος καλύπτει μικτό οστικό μόσχευμα, μπορεί να οδηγήσει σε διάφορου βαθμού απορρόφηση του μοσχεύματος.

3.5. Ακτινογραφήματα

Όπως αναφέρεται στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι», σε όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής πορείας των ζώων, η περιοχή του ελλείμματος ελεγχόταν ακτινολογικά σε τακτά χρονικά διαστήματα. Για την εκτίμηση της ανάπτυξης του νέου οστού στα πειραματικά μοντέλα μελέτης ελλειμμάτων, με βάση την ακτινολογική εξέλιξη και κατάληξή τους, έχουν προταθεί διάφορα συστήματα αξιολόγησης της ποσότητας του οστού που δημιουργείται, με σκοπό τη λήψη συγκρίσιμων δεδομένων για στατιστική ανάλυση. Η αξιολόγηση της ποσότητας του νέου οστού γίνεται με βαθμολόγηση σε κλίμακα 3-7, εκτιμώντας το ποσοστό του ελλείμματος που έχει καλυφθεί (0-100%) (Delloye et al 1992, Cook et al 1994, Boström et al 1996, Kirker-Head et al 1998). Άλλοι ερευνητές προτείνουν την ταυτόχρονη βαθμολόγηση της ποσότητας του νέου οστού, του βαθμού πόρωσης και του βαθμού ανακατασκευής του οστού (Grundel et al 1991, Schwarz et al 1991). Σύμφωνα με το συχνότερα χρησιμοποιούμενο σύστημα αξιολόγησης, το οποίο προτάθηκε από τους Johnson et al (1996), βαθμολογούνται ξεχωριστά η δημιουργία νέου οστού και ο βαθμός πόρωσης και το άθροισμά τους αποτελεί το δείκτη ακτινολογικής πόρωσης.

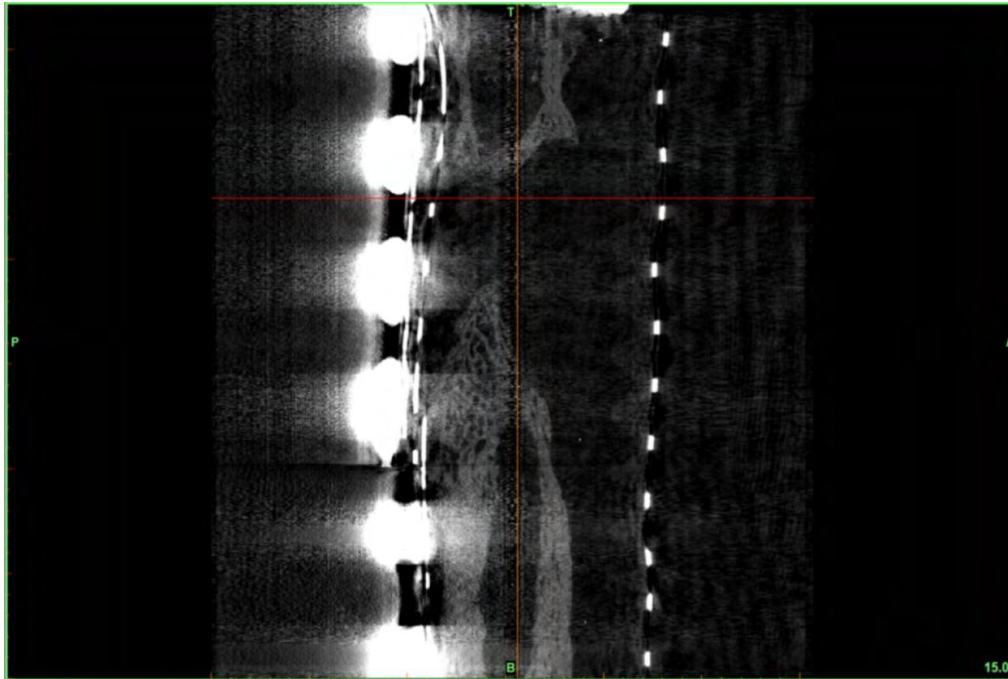
Η ακτινολογικός έλεγχος των ζώων στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης της παρούσας έρευνας, πραγματοποιούνταν με σκοπό τον τακτικό έλεγχο της σταθερότητας των υλικών και, δευτερευόντως, τον έλεγχο της πόρωσης και της ανάπτυξης νέου οστού. Ο τελευταίος αποδείχθηκε εξαιρετικά δύσκολος στα ζώα των ομάδων Γ και Δ, εξαιτίας της χρήσης του πλέγματος τιτανίου. Τα πλέγματα τιτανίου με μεγαλύτερες οπές δεν είναι ακτινοσκοπικά σε όλη την έκτασή τους και οι οπές τους επιτρέπουν την ακτινολογική εκτίμηση της ανάπτυξης νέου οστού. Το πλέγμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, λόγω του μικρού μεγέθους των οπών του

αλλά και της μικρής διαμέτρου της ωλένης γύρω από την οποία τοποθετήθηκε σχηματίζοντας κλωβό, με τις αντιδιαμετρικές επιφάνειές του να συνπροβάλλουν, εμφανίζεται ακτινοσκιερό. Επιπλέον, η ύπαρξη της πλάκας οστεοσύνθεσης στην ορθοπεδικά ενδεδειγμένη έξω επιφάνεια της ωλένης παρακωλύει την ακτινολογική παρατήρηση του ελλείμματος στα πλαγιοπλάγια ακτινογραφήματα των πειραματόζωων, όλων των ομάδων (Mills & Simpson 2012). Η παρατήρηση των προσθοπίσθιων ακτινογραφημάτων στα ζώα των ομάδων Γ και Δ εμφανίζει επιπλέον δυσκολία, καθώς το κεντρικό τμήμα του πλέγματος και του ελλείμματος εντοπίζονται στο τμήμα της ωλένης που στις συγκεκριμένες λήψεις συνπροβάλλει με την κερκίδα. Η βαθμολόγηση της πώρωσης με βάση τα ακτινολογικά ευρήματα στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε επισφαλής. Ο ακτινολογικός έλεγχος εφαρμόστηκε επικουρικά.

3.6. Οστεομετρία

Όπως προαναφέρθηκε, η *in vitro* εκτίμηση της οστικής δομής και της πώρωσης των οστικών ελλειμμάτων πραγματοποιήθηκε, εκτός από τη συμβατική μέθοδο της ιστολογικής εξέτασης, και με την τρισδιάστατη μικροτομογραφική απεικόνιση (3D-μCT). Η αξονική τομογραφία συνδυάζει την ποσοτική μορφομετρική εκτίμηση της δομής του οστού σε τρεις διαστάσεις με τη διατήρηση της ακεραιότητας των μαλακών μορίων, καθώς είναι μη επεμβατική. Η αποτελεσματικότητα της τρισδιάστατης μικροτομογραφικής απεικόνισης (3D-μCT) για την *in vitro* εκτίμηση της οστικής δομής και της πώρωσης προκύπτει από τη χρήση της σε ανάλογα πειραματικά πρωτόκολλα (van Eijden et al 2004, Bagi et al 2006, Schmidhammer et al 2006), με πρώτους μεταξύ αυτών τους Feldkamp et al (1989). Σε σχέση με την κλινικά χρησιμοποιούμενη δισδιάστατη τομογραφία (2D-CT), η τρισδιάστατη απεικόνιση καταλήγει σε ένα άμεσα διαθέσιμο και επεξεργάσιμο τρισδιάστατο είδωλο (Εικόνα 7).

Η επεξεργασία του ειδώλου της 3D-μCT δίνει τη δυνατότητα πρόσβασης στις δομικές παραμέτρους του σπογγώδους και του φλοιώδους οστού και αποτελεί την ακριβέστερη, μη καταστροφική για τους ιστούς, μέθοδο υπολογισμού του επιμεταλλωμένου οστού με αυτόματες διαδικασίες τρισδιάστατων μορφομετρικών δεικτών (Schmidhammer et al 2006). Επίσης, με τη χρήση προγραμμάτων τρισδιάστατης απεικόνισης μπορεί αξιόπιστα να πραγματοποιηθεί η εκτίμηση της επιμετάλλωσης του οστού, δηλαδή της ποσότητας του νέου ώριμου οστού.



Εικόνα 7. Στιγμιότυπο από την 3D επεξεργασία. Διακρίνεται η πλάκα οστεοσύνθεσης και το πλέγμα τιτανίου. Μέσα στα όρια του πλέγματος και του οστικού ελλείμματος διακρίνεται νέο οστό (σκύλος ν. 5, ομάδα Γ).

Πίνακας 4. Τρόπος υπολογισμού της οστικής πυκνότητας

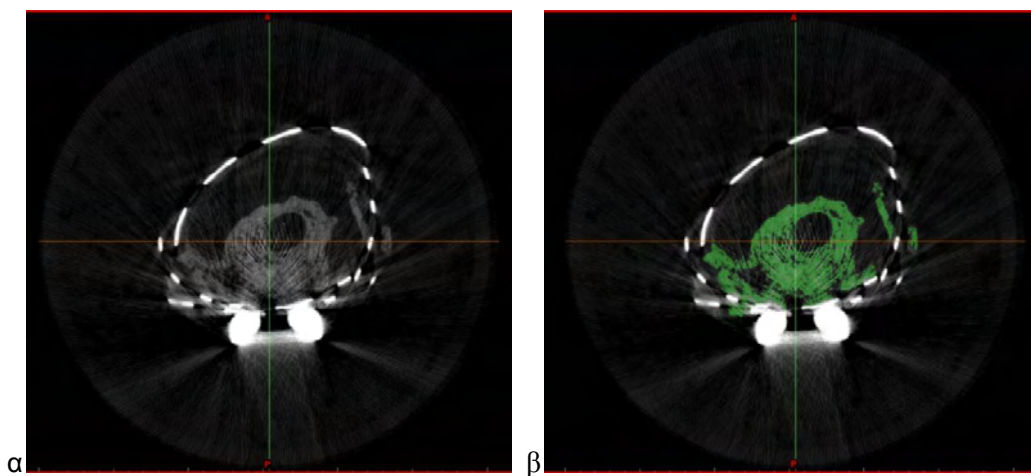
Επίπεδο επιμετάλλωσης	Μέγιστο %ποσοστό επιμετάλλωσης	Διακύμανση χρωματομετρικού συντελεστή (cm^{-1})
0	0	$0 < \mu < 1,1$
1	0-25	$1,1 < \mu < 2,2$
2	25-50	$2,2 < \mu < 3,3$
3	50-75	$3,3 < \mu < 4,4$
4	>75	$\mu > 4,4$

Stock et al (2003)

μ : χρωματομετρικός γραμμικός συντελεστής = ρ : οστική πυκνότητα. Οι τιμές του μ πάνω από το 1,1 ορίζουν τα επίπεδα επιμετάλλωσης του οστίτη ιστού. Το μ ορίζεται από το πρόγραμμα οστεομετρίας και με βάση την τιμή του στις ΠΕ εκτιμάται η ποσότητα του επιμεταλλωμένου οστού.

Οι Stock et al (2003) όρισαν πέντε ποσοτικά επίπεδα οστικής επιμετάλλωσης, χρησιμοποιώντας ένα χρωματομετρικό γραμμικό συντελεστή (linear attenuation coefficient = μ , cm^{-1}), ο οποίος ισούται με την οστική πυκνότητα (ρ = bone density,

g/cm^3). Ο χρωματομετρικός γραμμικός συντελεστής ορίζει ως επιμεταλλωμένο οστό τη μέση τιμή όλων των γκρι αποχρώσεων των pixel του οστού (gray values), σε μια επιλεγμένη περιοχή ενδιαφέροντος της τρισδιάστατης απεικόνισης. Τιμές μ μεγαλύτερες από $1,1 \text{ cm}^{-1}$ θεωρούνται επιμεταλλωμένες, ενώ κάθε μικρότερη τιμή θεωρείται κενός χώρος (Πίνακας 4). Ο λόγος μ/ρ (cm^2/g) ορίζεται ως *μαζικός χρωματομετρικός συντελεστής*. Οι τιμές μ και ρ ορίζονται από το πρόγραμμα επεξεργασίας αυτόματα και μέσω αυτών αναγνωρίζεται και καταμετράται η παρουσία επιμεταλλωμένου οστού (Mazess 1983).

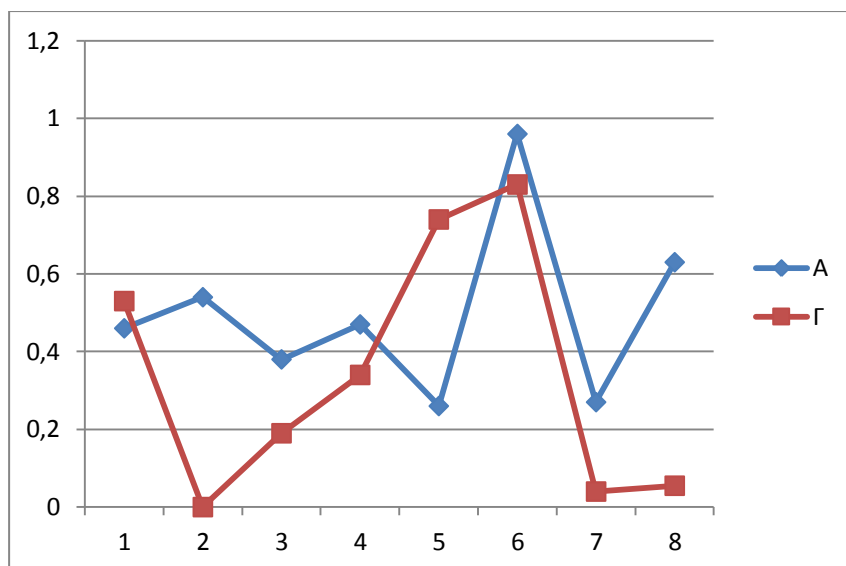


Εικόνα 8. (α) Στιγμιότυπο από την ποσοτική μέτρηση οστού σε ΠΕ. Διακρίνονται η πλάκα οστεοσύνθεσης και το κυκλικό πλέγμα τιτανίου. Νέο οστό παρατηρείται μέσα στο πλέγμα αλλά και πάνω σε αυτό, κοντά στην πλάκα. Η ηχογένεια της πλάκας επιπλέκει την μέτρηση του οστού. Ομάδα Γ, δείγμα ν.5. (β) Φίλτρο απομόνωσης οστίτη ιστού (threshold). Ίδια τομή με της Εικόνας 8 (α).

Ένα από τα ερωτήματα στα οποία κλήθηκε να απαντήσει η παρούσα διατριβή ήταν κατά πόσο τα μεταλλικά στοιχεία, και ειδικά το πλέγμα τιτανίου, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον πειραματισμό θα δημιουργούσαν αλλοίωση της εικόνας που θα προέκυπτε από τον αξονικό μικροτομογράφο. Όπως αποδείχτηκε, το πλέγμα τιτανίου δεν προκαλεί μεγάλες παρεμβολές και τεχνουργήματα στη διαδικασία σάρωσης με το παραπάνω όργανο. Αντίθετα, οι ανοξειδωτες πλάκες και οι κοχλίες οστεοσύνθεσης προκαλούν έντονα τεχνουργήματα ηχογένειας τα οποία χρειάστηκε, κατά την επεξεργασία των τρισδιάστατων εικόνων με το πρόγραμμα Mimics, να αφαιρεθούν μηχανικά με χρήση φίλτρου αργής επεξεργασίας (low pass). Η αφαίρεση

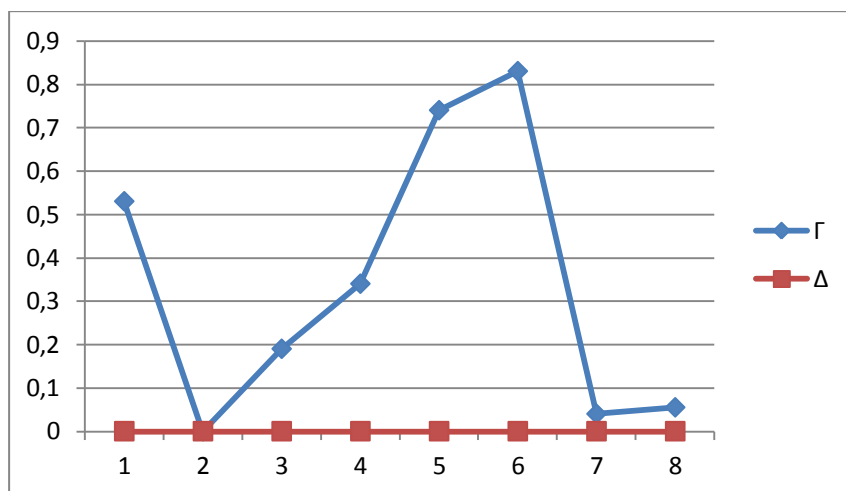
των τεχνουργημάτων ηχογένειας δεν προκάλεσε, όμως, αλλοίωση της τρισδιάστατης εικόνας, καθώς προκειμένου να απομονωθεί για μελέτη η απεικόνιση του νέου οστού στο σύνολό του, εφαρμόστηκε ένα δεύτερο, σταθερής διάβασης (threshold), φίλτρο (Εικόνα 8). Η μελέτη της τρισδιάστατης απεικόνισης, η οποία προκύπτει σε κάθε δυνατό οπτικό πεδίο της περιμέτρου και με κάθε γωνία παρατήρησης σε σχέση με τον επιμήκη άξονα, είναι αποδεδειγμένα μια πλήρης και ολοκληρωμένη τεχνική για το σωστό διαχωρισμό πώρωσης και μη πώρωσης (Schmidhammer et al 2006, Ebina et al 2009, Armstrong et al 2010).

Ένα από τα ζητούμενα της παρούσας μελέτης ήταν και ο ποσοτικός προσδιορισμός του νέου οστού. Όπως προαναφέρθηκε, αυτός πραγματοποιείται με τον ορισμό περιοχών ενδιαφέροντος (ΠΕ). Η τρισδιάστατη προβολή των ΠΕ δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης της ποιότητας και καταμέτρησης της ποσότητας του οστού που έχει ή δεν έχει αναπτυχθεί. Η σύγκριση του όγκου του οστού (Όγκος Ενδιαφέροντος – ΟΕ) που δημιουργήθηκε στις ΠΕ ανάμεσα στις ομάδες Α και Γ και ανάμεσα στις ομάδες Β και Δ δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η απόσταση από τα άκρα του ελλείμματος δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο, καθώς η σύγκριση των ΟΕ στις ΠΕ20 (20_O) μεταξύ των ομάδων Α και Γ όπως και Β και Δ, δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά από την αντίστοιχη σύγκριση στις ΠΕ40 (40_O), ΠΕ60 (60_O) και ΠΕ80 (80_O). Το σημαντικά διαφορετικό σωματικό μέγεθος των σκύλων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη συνεπάγεται, επίσης, διαφορετικές διαστάσεις της ωλένης, καθώς και του ελλείμματος που δημιουργήθηκε σε αυτή. Για τον λόγο αυτόν η σύγκριση του αρχικού (κλινικού) μήκους του ελλείμματος (ΑΕ) με το μήκος που προέκυψε στο τέλος του πειραματισμού (ΥΕ) έγινε με σύγκριση του λόγου των δύο μετρήσεων (ΥΕ/ΑΕ) για κάθε δείγμα, συνθήκη που επιτρέπει την ασφαλή σύγκριση μεταξύ ελλειμμάτων ανόμοιου μήκους (Schmidhammer et al 2006). Η σύγκριση των λόγων ΥΕ/ΑΕ δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Γ και στις Β και Δ. Είναι προφανές ότι η αντίστοιχη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες Γ και Δ έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,02$) (Πίνακες 1, 1Α, 1Β, 1Γ και 1Δ, Γραφήματα 1 και 2).



Γράφημα 1. Σύγκριση του λόγου YE/AE. Ομάδες Α και Γ

Κάθετος άξονας: λόγος YE/AE, **Οριζόντιος άξονας:** Αριθμός δείγματος, **YE:** υπολειπόμενο έλλειμμα όπως μετρήθηκε κατά την οστεομετρία, **AE:** αρχικό έλλειμμα όπως μετρήθηκε κατά την οστεομετρία. Ο λόγος **YE/AE** δείχνει το ποσοστό του ελλείμματος που καλύφθηκε από νέο οστό. Οι τιμές των δειγμάτων προέρχονται από τους Πίνακες 1Α και 1Γ.



Γράφημα 2. Σύγκριση του λόγου YE/AE. Ομάδες Γ και Δ.

Κάθετος άξονας: λόγος YE/AE, **Οριζόντιος άξονας:** Αριθμός δείγματος, **YE:** υπολειπόμενο έλλειμμα όπως μετρήθηκε κατά την οστεομετρία, **AE:** αρχικό έλλειμμα όπως μετρήθηκε κατά την οστεομετρία. Ο λόγος **YE/AE** δείχνει το ποσοστό του ελλείμματος που καλύφθηκε από νέο οστό. Οι τιμές των δειγμάτων προέρχονται από τους Πίνακες 1Β και 1Δ.

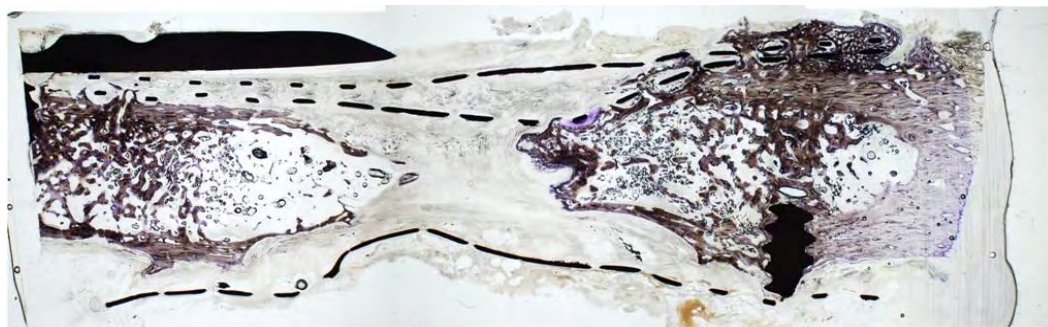
Η γεωμετρία και η αντοχή των οστών εκτιμάται παραδοσιακά με ιστομορφομετρικές τεχνικές και εμβιομηχανικές δοκιμασίες. Η τρισδιάστατη

τομογραφία καθορίζει, μη επεμβατικά, την αντοχή ενός οστού με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του. Τα αποτελέσματα της γεωμετρικής ανάλυσης της 3D απεικόνισης του φλοιού ενός οστού συμπίπτουν με τα αντίστοιχα ευρήματα μηχανικής υποβολής του οστού σε δοκιμασίες αντοχής (Bagi et al 2006). Η παρατήρηση των τρισδιάστατων απεικονίσεων των συνοστεωμένων δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από τα ευρήματα της οστεομετρίας. Σε όσα δείγματα ενσωματώθηκε το μόσχευμα η παρουσία συμπαγούς οστού είναι εύκολα διακριτή, τόσο στην συνολική εικόνα των δειγμάτων, όσο και στις ΠΕ.

3.7. Ιστολογικές τομές

Η παρατήρηση ιστολογικών τομών αφαλατωμένου οστού εγκλεισμένου σε παραφίνη πάχους λίγων (3-6) μm , δίνουν πολύτιμες πληροφορίες για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και την κατανομή των κυττάρων, αλλά αυτός ο κλασικός τρόπος επεξεργασίας του ιστού επιτρέπει την μελέτη ιστοτεμαχίων μικρού μόνο μεγέθους. Συνεπώς, καθίσταται αδύνατη η μελέτη, χωρίς κατάτμηση, τμήματος μακρού οστού, κάτι που ήταν ζητούμενο στην παρούσα μελέτη. Ταυτόχρονα απαιτείται αφαίρεση των υλικών οστεοσύνθεσης, κάτι που στην παρούσα μελέτη ήταν, εκτός από τεχνικά πολύ δύσκολο έως αδύνατο (π.χ. πλέγμα τιτανίου), χωρίς να καταστραφούν οι ιστοί, και μη επιθυμητό. Η μέθοδος και η διαδικασία κοπής οστού χωρίς την αφαίρεση των υλικών οστεοσύνθεσης δεν είναι καινούργια. Η πρώτη προσπάθεια λήψης τομών μη αφαλατωμένου οστού για ιστολογική μελέτη καταγράφεται βιβλιογραφικά το 1958 από τον Frost. Η μέθοδός του, όπως και μεταγενέστερων ερευνητών (Eger et al 1964, Smith & Karagianes 1974, Duker 1979), παρά το γεγονός ότι παρείχε πληροφορίες που δεν λαμβάνονται από την παρατήρηση αφαλατωμένων τομών, δεν βρήκε εφαρμογή λόγω του μη ικανοποιητικού αποτελέσματος κυτταρολογικά (Donath & Breuner 1982). Οι Donath & Breuner (1982) παρουσίασαν τη βελτιωμένη τεχνική «Säge-Schliff» (τεχνική κοπής και λείανσης) που επιτρέπει την παρασκευή τομών μεγάλων ιστοτεμαχίων από μη αφαλατωμένο οστό, χωρίς την αφαίρεση υλικών οστεοσύνθεσης, εμφυτευμάτων, κεραμικών, δοντιών ή μαλακών ιστών. Η ιστολογική εικόνα που παράγεται μετά την κοπή, λείανση, μονιμοποίηση και χρώση έχει την απαιτούμενη ποιότητα για την παρατήρηση της φυσιολογικής ή μη μορφολογίας του ιστού. Οι τομές μπορούν να είναι της τάξης των 5-10 μm ή παχύτερες (Viateau et al 2004). Στην παρούσα μελέτη οι αρχικές τομές πάχους 200 μm λειάνθηκαν μέχρι

πάχους 50 μm (Εικόνα 9). Η μικροσκόπηση τομών τέτοιου πάχους επιτρέπει, μετά τη χρώση, την εξακρίβωση του είδους του ιστού που αναπτύσσεται στο έλλειμμα. Η μελέτη των ιστολογικών τομών έδειξε, επιπλέον της τρισδιάστατης ανασύστασης, τον ινοχόνδρινο ιστό όπου αναπτύχθηκε, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα της οστεομετρίας. Η ανάπτυξη ινώδους πόρου σε κάποια από τα δείγματα της ομάδας Γ, με εξαίρεση το Γ8, από το οποίο απουσίαζε τόσο ο ινώδης πόρος όσο και νέο οστό, δημιουργεί ερωτήματα σε σχέση με τη χρονική διάρκεια παρακολούθησης. Θα μπορούσε ο ινώδης ιστός να επιμεταλλωθεί αν η παρακολούθηση επιμηκυνόταν χρονικά και πόσο επιπλέον χρόνο θα απαιτούσε; Η εξάμηνη παρακολούθηση κρίνεται βιβλιογραφικά επαρκής για τον έλεγχο της οστεοεπαγωγικότητας ή/και της οστεοκαθοδηγητικότητας των υλικών (Mills & Simpson 2012), ενώ δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα υπ' όψιν μας που να αναφέρουν μεγαλύτερο ή μέγιστο χρόνο παρακολούθησης πόρωσης ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος. Επίσης, μπορεί να θεωρηθεί ότι η απουσία πόρωσης στα δείγματα της ομάδας Α (μάρτυρες της ομάδας Γ) καθιστά στατιστικώς ασφαλή τη σύγκριση.



Εικόνα 9. Ιστολογική τομή. Διακρίνεται η πλάκα οστεοσύνθεσης, τμήμα ενός κοχλία και το πλέγμα τιτανίου. Μέσα στα όρια του ελλείμματος παρατηρείται ανάπτυξη ινώδους πόρου και μικρή ποσότητα οστού. Ομάδα Γ, δείγμα ν.5.

Η οστεοενσωμάτωση του πλέγματος ήταν εμφανής στις ιστολογικές τομές των δειγμάτων των ομάδων Γ και Δ. Αφορούσε κυρίως την περιφέρεια του ελλείμματος στην ομάδα Γ, όπου νέο οστό είχε αναπτυχθεί εντός αλλά και εκτός του κλωβού τιτανίου. Στα δείγματα της ομάδας Δ, όσον αφορά τα άκρα του ελλείμματος, η εικόνα έμοιαζε με τα δείγματα της ομάδας Γ. Στο μέσο του ελλείμματος, το οποίο αντιστοιχούσε στη θέση του μοσχεύματος, παρατηρήθηκε ανάπτυξη οστού με λωρίδες προσκολλημένες στο πλέγμα και στον ινώδη ιστό εκτός του πλέγματος. Από

τις παρατηρήσεις αυτές προκύπτει ότι το τιτάνιο δεν χαρακτηρίζεται από οστεοεπαγωγικές ιδιότητες, ενώ ο οστεοκαθοδηγητικός ρόλος του φαίνεται να περιορίζεται στην επιφάνειά του πλέγματος.

Σε αντίθεση με τα καταγεγραμμένα ευρήματα σε δημοσιευμένα κλινικά περιστατικά (Cobos et al 2000, Ostermann 2002, Attias et al 2005, Attias & Lindsey 2006, Shilov 2006, Clements et al 2008) και στις περισσότερες κλινικές μελέτες (Lindsey et al 2006), τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της χρήσης πλέγματος τιτανίου και της μη χρήσης του για την κάλυψη ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος.

Παρά το γεγονός ότι το πλέγμα τιτανίου οστεοενσωματώθηκε επιτυχώς, η οστεοκαθοδηγητική ιδιότητά του, όπως αυτή περιγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία (Lindsey et al 2006, Kroese-Deutman et al 2008), δεν αποδείχθηκε στατιστικώς. Ο τύπος πλέγματος που χρησιμοποιήθηκε διέφερε από το χρησιμοποιηθέν στις προηγούμενες αναφορές (Harms cage, DePuy Spine, Warsaw, IN). Το πλέγμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν εύκαμπτο και διαχειρίσιμο, αλλά παρείχε ασθενέστερη μηχανική στήριξη. Οι Bullens et al (2009b) σε μια συγκριτική μελέτη των δύο τύπων πλέγματος (Harms cage και Stryker mesh) συμπέραναν ότι το εύκαμπτο πλέγμα (Stryker mesh) που διαμορφώνεται για χρήση παρέχει μικρότερη στήριξη, αλλά, λόγω της ευελιξίας που διαθέτει για την εκάστοτε αναγκαία διαμόρφωση, θεωρείται προτιμητέο.

Η πλάκα οστεοσύνθεσης, η οποία επιλέχθηκε μεταξύ άλλων και για τον παραπάνω λόγο, παρείχε την αναγκαία στήριξη και την ισχυρή ακινητοποίηση που απαιτείται για την πόρωση. Οι εύκαμπτες πλάκες τιτανίου που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχή της μελέτης έσπασαν κατά τον πρώτο μετεγχειρητικό μήνα, αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα ισχυρής οστεοσύνθεσης ακόμη και σε ένα οστό που δεν δέχεται ισχυρή αξονική φόρτιση, όπως είναι η ωλένη. Ορισμένοι ερευνητές (Lazarides et al 1998) υποστηρίζουν ότι η προνομιούχα ημισταθερή στήριξη που προσφέρει το τιτάνιο, επιτρέποντας κάποιο βαθμό μικροκίνησης, ευνοεί την παραγωγή νέου οστού. Αντιθέτως, η ισχυρή οστεοσύνθεση με πλάκα από ανοξείδωτο χάλυβα προκαλεί ισχαιμία στην περιοχή του δημιουργούμενου πόρου ή του μοσχεύματος που εφάπτεται σε αυτήν (Remedios 1999, Millis & Martinez 2003, Griffon 2005). Είναι προφανές ότι τα συμπεράσματα των Lazarides et al (1998) δεν συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Σε κανένα από τα δείγματα της

ομάδας Β δεν παρατηρήθηκε ισχαιμική νέκρωση ή απορρόφηση του μοσχεύματος σε επαφή με την πλάκα οστεοσύνθεσης. Στα δείγματα της ομάδας Δ, όπου συνυπήρχαν το πλέγμα τιτανίου και το μόσχευμα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη οστού μέσα στα όρια του ελλείμματος, σε σύγκριση με τα δείγματα της Γ ομάδας, παρά την οστεοενσωμάτωση του πλέγματος. Μάλιστα, σε δύο από τα δείγματα (Δ4, Δ5) παρουσιάστηκε μικρότερο ή μεγαλύτερο οστικό έλλειμμα.

Η λήψη των δειγμάτων από κάθε πειραματόζωο, κατά το τέλος της περιόδου παρακολούθησης, εμφάνισε ιδιαίτερες δυσκολίες στις ομάδες που χρησιμοποιήθηκε πλέγμα τιτανίου. Είναι προφανές, τόσο από τις συναφείς μελέτες όσο και από τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, ότι το πλέγμα τιτανίου ενσωματώνεται στα μακρά οστά και η οστεοενσωμάτωση δημιουργεί ένα σταθερό σύμπλεγμα. Αυτή η ιδιότητα του τιτανίου μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην κλινική πράξη, καθώς το δημιουργούμενο σύμπλεγμα κλωβού και οστού ενισχύει τη σταθερότητα της περιοχής. Η χρήση οστεογενετικών ή/και οστεοεπαγωγικών παραγόντων, σε συνδυασμό με τη συγκράτηση που προσφέρει το πλέγμα τιτανίου, είναι πιθανό να επιταχύνουν την πόρωση. Στις κλινικές μελέτες το πλέγμα τιτανίου χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με αλλομόσχευμα και DBM (Lindsey et al 2006). Στα δημοσιευμένα κλινικά περιστατικά το πλέγμα χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με αυτόλογο σπογγώδες μόσχευμα (Ostermann 2002, Shilov 2006), αυτόλογο σπογγώδες μόσχευμα και DBM (Cobos et al 2000, Attias et al 2005, Attias & Lindsey 2006) ή αυτόλογο τεμαχισμένο μικτό μόσχευμα και αλλομόσχευμα (Clements et al 2008) και σταθεροποιήθηκε με ενδομυελική ήλωση (Cobos et al 2000, Attias et al 2005, Attias & Lindsey 2006), εξωτερική οστεοσύνθεση (Shilov 2006) ή ασφαλιζόμενο ενδομυελικό ήλο (Ostermann 2002, Clements et al 2008). Στο μόνο κλινικό περιστατικό, στο οποίο έχει περιγραφεί χρήση πλέγματος για την κάλυψη μεγάλου οστικού ελλείμματος σε μηριαίο οστό σκύλου, οι Segal & Shani (2010) αναπαρήγαγαν την τεχνική των Cobos et al (2000) χρησιμοποιώντας ίδιου τύπου πλέγμα (Harms cage) και συνδυάζοντάς το με κεραμικό (ss-tricalcium phosphate crystals) και αυτόλογο σπογγώδες μόσχευμα, με πολύ καλά κλινικά και ακτινολογικά αποτελέσματα. Για τα κλινικά περιστατικά δεν μπορεί να αποδειχθεί αν η επιτυχής πόρωση οφείλεται στους οστεοεπαγωγικούς παράγοντες ή στο συνδυασμό τους με το πλέγμα. Είναι όμως προφανές ότι ο συνδυασμός τους είναι τελικά αποδοτικός.

Οι Fujibayashi et al (2003) σε μια κλινική μελέτη μεγάλου οστικού ελλείμματος σε μηριαίο οστό κουνελιών σύγκριναν ένα ιδιοκατασκευασμένο πλέγμα τιτανίου με ένα θερμικά και αλκαλικά επεξεργασμένο ίδιου τύπου πλέγμα, τα οποία σταθεροποιήθηκαν με ενδομυελική ήλωση. Παρατήρησαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη νέου οστού στα ελλείμματα που διαχειρίστηκαν με το επεξεργασμένο πλέγμα τιτανίου, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο πλέγμα. Στα ζώα της δεύτερης ομάδας το πλέγμα ενσωματώθηκε, χωρίς όμως παραγωγή επιμεταλλωμένου οστού και χωρίς γεφύρωση του ελλείμματος. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας. Πρόκειται εξάλλου για τη μόνη δημοσιευμένη πειραματική μελέτη, στην οποία το πλέγμα τιτανίου εξετάζεται χωρίς επικουρικά οστεογενετικά ή οστεοκαθοδηγητικά μέσα.

Η κάλυψη μεγάλων οστικών ελλειμμάτων του αντιβραχίου και ειδικά της ωλένης στο σκύλο αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας, όσο και πειραματικό μοντέλο, σε πολλές έρευνες. Οι προτεινόμενες βιβλιογραφικά τεχνικές διαχείρισης των ελλειμμάτων της ωλένης στον σκύλο περιλαμβάνουν χρήση φρέσκων αλλομοσχευμάτων, κατεψυγμένων και αποξηραμένων αλλομοσχευμάτων, μερικώς αφαλατωμένων αλλομοσχευμάτων (Delloye et al 1992), χρήση rhOP-1 σε φορέα από BMP και κολλαγόνο (Cook et al 1994, 1998), χρήση σπόγγου ζελατίνης με rBMP-2 (Itoh et al 1998), καθώς και χρήση συνδυασμού αυτόλογου μυελοφλοιώδους και μυελώδους μοσχεύματος με rBMP-2 (Caro et al 2011) με εξαιρετικά αποτελέσματα. Η οστεομεταφορά σε συνδυασμό με εξωτερική οστεοσύνθεση τύπου Pizaron, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε ένα κλινικό περιστατικό, δεν οδήγησε σε δημιουργία πόρου (Rahal et al 2003).

Οι προτεινόμενες τεχνικές, οι οποίες συχνά είναι αποτέλεσμα ερευνών στον σκύλο με σκοπό την ασφαλή εφαρμογή τους στον άνθρωπο, παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, πλην όμως είναι κοστοβόρες και δυσεφάρμοστες στην κτηνιατρική ορθοπεδική πράξη. Η χρήση φρέσκου αυτόλογου μικτού τρι-φλοιώδους μοσχεύματος για την κάλυψη μεγάλων οστικών ελλειμμάτων στην ωλένη του σκύλου, όπως περιγράφεται στην παρούσα μελέτη, αποτελεί μια «κλασική» και τεκμηριωμένα επιτυχή μέθοδο. Η λήψη του μικτού μοσχεύματος από την λαγόνια ακρολοφία του σκύλου δεν συνοδεύεται από μετεγχειρητικές παρενέργειες (πόνος, οίδημα, αιμάτωμα, νευραπραξία) με τη συχνότητα που παρατηρούνται στον άνθρωπο, καθιστώντας τη λήψη σχετικά ασφαλή.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα εξής:

1. Το πλέγμα τιτανίου με τη μορφή κλωβού για την κάλυψη ενός μεγάλου οστικού ελλείμματος μακρού οστού δεν παρουσιάζει οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες.
2. Η κλινική χρήση του πλέγματος τιτανίου, λόγω της ικανότητας οστεοενσωμάτωσής του, πιθανότατα προάγει τη σταθερότητα του συμπλέγματος οστού και υλικών οστεοσύνθεσης, αλλά δεν συνιστάται να χρησιμοποιείται χωρίς επικουρικά οστεοεπαγωγικά ή/και οστεοκαθοδηγητικά υλικά ή ουσίες επειδή μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία πάρωσης.
3. Το πλέγμα τιτανίου οστεοενσωματώνεται ικανοποιητικά στα μακρά οστά. Η αφαίρεσή του μετά το πέρας της οστεοενσωμάτωσης είναι τεχνικά δύσκολη.
4. Η δημιουργία ελλείμματος με βάση την υπόθεση του Key είναι λειτουργική και αναπαράξιμη.
5. Το πειραματικό μοντέλο της ωλένης είναι αξιόπιστο και με πολλά πλεονεκτήματα για τη μελέτη μεγάλων ελλειμμάτων σε μακρά οστά. Η χρήση πλάκας οστεοσύνθεσης, ως μεθόδου οστεοσύνθεσης της ωλένης στην περιοχή του ελλείμματος, προσφέρει εξαιρετική ακινητοποίηση εφόσον όμως είναι αρκετά ισχυρή.
6. Οι δυνάμεις που ασκούνται στην ωλένη κατά την κίνηση του ζώου δεν είναι σταθερές και εύκολα υπολογίσιμες.
7. Η χρήση μικτού τρι-φλοιώδους μοσχεύματος από τη λαγόνια ακρολοφία και πλάκας οστεοσύνθεσης για τη διαχείριση των μεγάλων οστικών ελλειμμάτων της ωλένης και κατ' επέκταση των μακρών οστών στον σκύλο, αποτελεί μια εύκολα εφαρμόσιμη, ιδιαίτερα αποτελεσματική, οικονομική και χωρίς επιπλοκές λύση.
8. Η τρισδιάστατη τομογραφία αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο ποιοτικής εκτίμησης της πάρωσης και ποσοτικού υπολογισμού της ανάπτυξης νέου οστού. Ο μη επεμβατικός χαρακτήρας της την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλινική πράξη. Η πλήρης συμφωνία των αποτελεσμάτων της με εκείνα της ιστολογικής μελέτης αποδεικνύει πως σε πειραματισμούς σχετικούς με οστικά ελλείμματα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως μοναδική μέθοδος *in vitro* εκτίμησης της οστικής δομής και της πάρωσης.

9. Η ιστολογική τεχνική κοπής και λείανσης αποτελεί, ίσως, το μοναδικό τρόπο μελέτης ιστολογικών τομών μεγάλων οστικών ελλειμμάτων σε όλο τους το μήκος, χωρίς την αφαίρεση των υλικών οστεοσύνθεσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεγάλα οστικά ελλείμματα, λόγω τραυματισμού ή σωστικών επεμβάσεων, είναι συχνά τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική ορθοπεδική κλινική πράξη. Για τη διαχείρισή τους εφαρμόζονται πολλές μέθοδοι και αναζητούνται συνεχώς νέες. Η πρόσφατη εφαρμογή πλέγματος τιτανίου σε επιπλεγμένα κατάγματα με μεγάλο οστικό έλλειμμα στον άνθρωπο, πυροδότησε έρευνες για την αποτελεσματικότητά του, σε συνδυασμό με παράγοντες ή υλικά που προάγουν την πάρωση.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του τιτανίου, όταν αυτό χρησιμοποιείται με τη μορφή πλέγματος, για την κάλυψη μεγάλων οστικών ελλειμμάτων στον σκύλο, χωρίς την αρωγή οστεοεπαγωγικών ή οστεοκαθοδηγητικών παραγόντων.

Για τους σκοπούς της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν 32 ενήλικες, αρσενικοί, ορχεκτομημένοι σκύλοι, φυλής Beagle, προερχόμενοι από την εκτροφή πειραματοζώων της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Π.Θ., οι οποίοι χωρίστηκαν σε 4 ομάδες των 8 ζώων. Σε όλους τους σκύλους δημιουργήθηκε ένα μεγάλο οστικό έλλειμμα, σύμφωνα με την υπόθεση του Key (δύο φορές μεγαλύτερο από τη διάμετρο του οστού), στη διάφυση της αριστερής ωλένης. Η επιλογή του μοντέλου της ωλένης έγινε με βάση την εύκολη προσπέλαση και τη σταθερότητα του αντιβραχίου, τη δυνατότητα για πρόωμη φόρτιση και την ελαχιστοποίηση της τελικής βλάβης στη χρησιμοποίηση του άκρου από τα πειραματόζωα. Στις ομάδες Α και Β, το έλλειμμα έμεινε κενό και οστεοσυντέθηκε με πλάκα και κοχλίες, ενώ στην ομάδα Γ χρησιμοποιήθηκε πλέγμα τιτανίου που τυλίχθηκε και σταθεροποιήθηκε γύρω από το οστό. Στις ομάδες Δ και Ε χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη του ελλείματος φρέσκο, αυτόλογο, τρι-φλοιώδες μόσχευμα που λήφθηκε από την ομοπλάγια λαγόνια ακρολοφία. Το μόσχευμα σταθεροποιήθηκε στο έλλειμμα με πλάκα οστεοσύνθεσης και κοχλίες, ενώ στην ομάδα Δ, εφαρμόστηκε επίσης πλέγμα τιτανίου γύρω από το μόσχευμα και το οστό, το οποίο σταθεροποιήθηκε με την πλάκα οστεοσύνθεσης. Μετεγχειρητικά οι σκύλοι παρακολούθηθηκαν κλινικά και ακτινολογικά για 6 μήνες, στο πέρας των οποίων εξαιρέθηκε χειρουργικά το τμήμα της ωλένης που περιείχε το έλλειμμα μαζί με τα υλικά οστεοσύνθεσης και το πλέγμα. Στα τμήματα της ωλένης που λήφθηκαν έγινε επεξεργασία με αξονικό μικροτομογράφο και πρόγραμμα τρισδιάστατης απεικόνισης,

με σκοπό τη μέτρηση του οστού που δημιουργήθηκε στα όρια του αρχικού ελλείμματος. Η μέτρηση του όγκου του νέου οστού πραγματοποιήθηκε με ορισμό περιοχών ενδιαφέροντος (ΠΕ) σε αποστάσεις 20, 40, 60 και 80% από το κεφαλικό άκρο του ελλείμματος, στις οποίες το οστό απομονώθηκε, βάφτηκε και υπολογίστηκε η επιφάνεια και ο όγκος του με το πρόγραμμα 3D απεικόνισης. Για την ιστολογική επεξεργασία εφαρμόστηκε τεχνική «κοπής και λείανσης», προκειμένου να μελετηθεί το έλλειμμα σε σχέση με το πλέγμα και τα υλικά οστεοσύνθεσης.

Η μελέτη των αποτελεσμάτων της οστεομετρίας κατά την 3D επεξεργασία, έδειξε πως δεν υπάρχει διαφορά στην ανάπτυξη νέου οστού με τη χρήση πλέγματος τιτανίου ανάμεσα στις ομάδες Α και Γ καθώς και Β και Δ. Στα δείγματα της ομάδας Γ, όπου χρησιμοποιήθηκε πλέγμα, παρατηρήθηκε ανάπτυξη κυρίως ινώδους πόρου και εστιών νέου οστού, μέσα στα όρια του αρχικού ελλείμματος, χωρίς να παρατηρηθεί γεφύρωσή του. Σε ένα δείγμα παρατηρήθηκε γεφύρωση χωρίς ανάπτυξη συμπαγούς νέου οστού. Στα δείγματα της ομάδας Α, όπου το έλλειμμα έμεινε κενό, αναπτύχθηκε νέο οστό μόνο στα άκρα του αρχικού ελλείμματος ενώ ανάμεσα στα δείγματα των ομάδων Α και Γ, όσον αφορά την ανάπτυξη νέου οστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στα δείγματα των ομάδων Β και Δ, όπου χρησιμοποιήθηκε μόσχευμα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην απορρόφηση του μοσχεύματος σε σχέση με το πλέγμα και στα περισσότερα δείγματα των δύο ομάδων το μόσχευμα οστεοενσωματώθηκε. Δύο δείγματα της ομάδας Δ (Δ4 & Δ5) παρουσίασαν απορρόφηση του μοσχεύματος και μείωση των διαστάσεών του. Η σύγκριση του όγκου οστού στις ΠΕ ανάμεσα στις ομάδες Α και Γ καθώς και Β και Δ δεν παρουσίαζε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Η παρατήρηση των ιστολογικών τομών επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της οστεομετρίας και έδειξε την ανάπτυξη ινοχόνδρινου πόρου μέσα στα όρια του ελλείμματος στα δείγματα των ομάδων Α και Γ.

Συμπεραίνεται ότι η χρήση πλέγματος τιτανίου στα μεγάλα οστικά ελλείματα των μακρών οστών δεν επηρεάζει την ανάπτυξη νέου οστού, όταν δεν χρησιμοποιούνται επικουρικά μέσα. Η επιτυχής οστεοενσωμάτωση, που χαρακτηρίζει την εφαρμογή του σε επαφή με το οστό, το καθιστά δυνητικά χρήσιμο στην κλινική πράξη. Τέλος, το πειραματικό μοντέλο της ωλένης στο σκύλο είναι αξιόπιστο και αναπαράξιμο.

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF SURGERY**

**USE OF TITANIUM MESH FOR THE
MANAGEMENT OF SEGMENTAL LONG BONE
DEFECTS IN DOGS: AN EXPERIMENTAL
STUDY IN AN ULNAR MODEL**

**SOFIA J. ZOI
DVM**

PhD THESIS

KARDITSA 2015

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the influence of the titanium mesh on bone formation by using a newly established critical-size canine ulnar defect model. The defect was used as a space providing device for guided bone regeneration, either alone or in combination with autogenous bone block graft.

Thirty two, purpose bred, adult (2-5 years old), castrated male, laboratory Beagles (16 ± 4 kg of body weight) were used in the study.

Under general anesthesia, a unilateral, segmental mid-diaphyseal, ulnar osteo-periosteal critical-size defect was created in each animal. The length of the defect was calculated individually for each site based on Key's hypothesis on critical size defect dimensions, i.e., defect length = 2 x ulnar diameter. The residual ulnar segments were stabilized with a veterinary stainless-steel plate and appropriate screws. Each defect was managed with one of the following approaches: a) a bone block graft harvested from the ipsilateral iliac crest was trimmed and adapted to fit into the defect achieving continuity and a commercially titanium mesh extending beyond the defect margins was wrapped around the ulna (Group D; 8 animals), b) only a titanium mesh was placed similarly to above (Group C; 8 animals); c) only a bone block graft was placed similarly to above (Group B; 8 animals), and d) no treatment (Group A; 8 animals).

After six months of healing all animals underwent a second surgical procedure and block biopsies consisting of the experimental sites and portion of the pristine ulnar segments were retrieved. Following specimen fixation, the blocks were scanned using a μ CT table-top scanner, and the data-sets were exported in TIF-format and imported in a special 3D-visualization software. The dimensions of the original and the residual defect in each specimen were linearly measured after identifying their margins by browsing the entire stack of images. Then regions-of-interest (ROI), perpendicular to the long-axis of the specimen and comprising the entire cross-section of the defect space x 0.33 mm thick were determined at a level corresponding to the 20, 40, 60 and 80% of defect length. For these ROI, mineralized bone tissue was isolated by manual segmentation and its volume was automatically calculated by the software.

The specimens were histotechnically processed and qualitative histological evaluation was performed on two non-decalcified longitudinal sections from each block, representing central aspects of the defect space.

Statistical evaluation was performed with one way analysis of variance (ANOVA) and the student's t-test for independent samples. The level of significance was set to $P < 0.05$.

No significant complications related to the surgical procedures were observed and all animals were fully ambulatory on their operated limb approximately 10 days (range 7-14) after surgery.

Analysis of the μ CT images revealed no significant differences in the originally created defect dimensions among the four experimental groups. Complete bone bridging had occurred in the two groups where a bone graft was used –two specimens excepted (D4 & D5) where graft absorption was marked. Most specimens in the two other groups did not show complete bridging (C4 and A3 excepted) and the residual defect averaged 7.7 mm in the titanium mesh group and 10.5 mm in the no treatment group. The observed difference between Groups A & C in residual defect length was not statistically significant.

No statistically significant differences in terms of mineralized bone volume in the various ROI were detected between the grafted sites (Groups B & D) or between the non-grafted ones (Groups A & C). Significantly larger amounts of bone were present at the various ROI in Groups B & D when compared with Groups A & C.

The histological evaluation indicated good integration of the bone blocks irrespective of the use of a titanium mesh. In the non-grafted sites, small amount of new bone had formed in the margins of the defect, but a major portion of the original defect space was occupied by soft fibrovascular connective tissue. Occasionally, some new bone formation could be observed within the titanium mesh structure, mostly in aspects close to the original defect margins.

The use of titanium mesh does not influence significantly the amount of bone formation, in non-grafted and grafted long bone critical-size defects.

The described canine ulnar critical size defect model seems to be a reliable model to use in experimental studies.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καρακάσης ΔΘ (1986).** Μαθήματα Οδοντογναθικής Χειρουργικής, μέρος Γ. Εκδόσεις Α.Α. Αλτιντζή, Θεσσαλονίκη
- Κουρέας ΓΠ (2005).** Συγκριτική μελέτη της πορείας πώρωσης οπισθοπλάγιας σπονδυλοδεσίας σε ασθενείς με εκφυλιστική νόσο σπονδυλικής στήλης. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 49-53
- Κυριακόπουλος ΧΚ, Μαυρογένης ΑΦ, Μπάμπης Γ, Νικολόπουλος Κ, Κοκορογιάννης Κ, Παπαϊωάννου Ν (2005).** Διατακτική οστεογένεση. EEXOT 56: 101-109
- Μιχαήλ Σ (1985).** Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών. 2^η έκδοση, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 5-6, 186-195
- Μιχαήλ Σ (1996).** Ιστολογία, 2^η έκδοση, Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 122-137
- Aghdasi B, Montgomery SR, Daubs MD, Wang JC (2012).** A review of demineralized bone matrices for spinal fusion: the evidence for efficacy. Surgeon 11: 39-48
- Albrektsson T, Brånemark PI (1983).** The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone. Ann Biomed Engin 11: 1-27
- Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S (2003).** Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. J Bone Joint Surg (Am) 85: 1927-1935
- Armstrong JK, Han B, Kuwahara K, Yang Z, Magyar CE, Dry SM, Atti E, Tetradis S, Fisher TC (2010).** The effect of three hemostatic agents on early bone healing in an animal model. BMC Surg 10 (37): 1-12
- Arnold WD (1984).** The effect of early weight-bearing on the stability of femoral neck fractures treated with Knowles pins. J Bone Joint Surg (Am) 66: 847-852
- Attias N, Lehman RE, Bodell LS, Lindsey RW (2005).** Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: A case Report. J Orthop Trauma 19: 211-216
- Attias N, Lindsey RW (2006).** Management of large segmental tibial defects using a cylindrical mesh cage. Clin Orthop Relat Res 450: 259-266

- Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S (2001).** Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res* 16: 671-680
- Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A (2006).** The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone* 38: 136-144
- Barbieri CH, Mazzer N, Aranda CA, de O Pinto MM (1997).** Use of a bone block graft from the iliac crest with rigid fixation to correct diaphyseal defects of the radius and ulna. *J Hand Surg (Br)* 22: 395-401
- Bassett CAL (1972)** Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop* 87: 49-59
- Bauer TW, Muschler GF (2000).** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 371: 10-27
- Bitton E, Joseph R, Portman L, Segev G, Meiner Y, Shipov A, Milgram J (2013).** The effect of extension and loading of the carpus on radial rotation. *Vet Surg* 42: 909-917
- Boström M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T (1996).** Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 327: 272-282
- Brånemark PI (1983).** Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50: 399-410
- Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B, Myers RR (2001).** Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. *J Rehabil Res Dev* 38: 175-181
- Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, Holy CE, Kadiyala S, Bruder SP (2006).** Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. *J Orthop Res* 24: 857-866
- Brossi PM, Moreira JJ, Machado TSL, Baccarin RYA (2015).** Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res* 11: 98

- Brown PW, Urban JG (1969).** Early weight-bearing treatment of open fractures of the tibia. *J Bone Joint Surg (Am)* 51: 59-75
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998).** The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg (Am)* 80: 985-996
- Bullens PHJ, Schreuder PHW, de Waal Malefijt MC, Verdonschot N, Buma P (2009a)** Is an impacted morselized graft in a cage an alternative for reconstructing segmental diaphyseal defects? *Clin Orthop Relat Res* 467: 783-791
- Bullens PHJ, Schreuder PHW, de Waal Malefijt MC, Veth RPH, Buma P, Verdonschot N (2009b)** The stability of impacted morsellized bone grafts in a metal cage under dynamic loaded conditions: an in vitro reconstruction of a segmental diaphyseal bone defect. *Arch Orthop Trauma Surg* 129: 575-581
- Bullens PHJ (2011).** Reconstruction of segmental long bone defects. Thesis for Doctor of Medicine, Nijmegen University, The Netherlands
- Capo JT, Marcus MS, Shamian B (2011).** Treatment of a segmental defect in open radial and ulnar shaft fractures using rhBMP-2 and iliac crest bone graft: a case report. *Hand* 6: 424-428
- Chang JK, Li CJ, Wu SC, Yeh CH, Chen CH, Fu YC, Wang GJ, Ho ML (2007).** Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol* 74: 1371-1382
- Chang WHS, Hwang IM, Mak OT (2000).** Effects of Prostaglandin E₂ on bone fracture healing enhanced by capacitively coupled electric field and pulsed electromagnetic field. *J Med Biol Engin* 20: 225-230
- Clements JR, Carpenter BB, Pourciau JK (2008).** Treating segmental bone defects: a new technique. *J Foot Ankle Surg* 47: 350-356
- Cobos JA, Lindsey RW, Gugala Z (2000).** The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J. Orthop Trauma* 14: 54-59
- Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC (1994).** Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop* 301: 302-312

- Cook SD, Dalton JE (1992).** Biocompatibility and biofunctionality of implanted materials. *Alpha Omegan* 85: 41-47
- Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, Wolfe MW, Rueger DC (1998).** Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in healing large segmental bone defects. *J Orthop Trauma* 12: 407-412
- Connolly J, Lippiello L, Dehne R (1989).** Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg (Am)* 71: 684-691
- Delloye C, Verhelpen M, d'Hemricourt J, Govaerts B, Bourgois R (1992).** Morphometric and physical investigations of segmental cortical bone autografts and allografts in canine ulnar defects. *Clin Orthop* 282: 273-292
- Donath K, Breuner G (1982).** A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11: 318-326
- Donley TG, Gillette WB (1991).** Titanium endosseous implant-soft tissue interface: a literature review. *J Periodontol* 62: 153-160
- dos Santos Neto FL, Volpon JB (1984).** Experimental nonunion in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 187: 260-271
- Duker J (1979).** Die Kombination von Polarisation und Fluoreszenzmarkierung - eine mikroskopische Technik zur tierexperimentellen Untersuchung von Umbauvorgängen im dento-alveolaren Bereich. *Disch Zahnarzt Z* 34: 532-535
- Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y (2009).** Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Dis* 15: 273-280
- Eger, W, Gotz F, Kammerer H (1964)** Herstellung von dünnsehliffen aus Knochen und Weichgeweben nach Markierung mit Tetraeyclinen. *Langenbeck's Arch Klin Chir* 306: 205-214
- Einhorn TA (1995).** Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg (Am)* 77: 940-956
- Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ (1984).** The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix: a radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg (Am)* 66: 274-279

- Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M (1989).** The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4: 3-11
- Finsen V, Saetermo R, Kibsgaard L, Farran K, Engebretsen L, Bolz KD, Benum P (1989).** Early postoperative weight-bearing and muscle activity in patients who have a fracture of the ankle. *J Bone Joint Surg (Am)* 71: 23-27
- Fujibayashi S, Kim HM, Neo M, Uchida M, Kokubo T, Nakamura T (2003).** Repair of segmental long bone defect in rabbit femur using bioactive titanium cylindrical mesh cage. *Biomaterials* 24: 3445-3451
- Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T (2004).** Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 25: 443-450
- Garg NK, Gaur S, Sharma S (1993).** Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand* 64: 671-672
- Gauthier O (2011).** Stimulation of bone healing. Latest developments. In *ECVS proceedings 7-9/7/2011 Ghent, Belgium*, 121-126
- Ghert M, Colterjohn N, Manfrini M (2007).** The use of free vascularized fibular grafts in skeletal reconstruction for bone tumors in children. *J Am Acad Orthop Surg* 15: 577-587
- Gray JC, Elves MW (1981).** Osteogenesis in bone grafts after short term storage and topical antibiotic treatment. An experimental study in rats. *J Bone Joint Surg (Br)* 63: 441-445
- Griffon DJ (2005).** Fracture healing. In: Johnson AJ, Houlton JE, Vannini R (eds) *AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat*. AO Publishing, Davos, 73-97.
- Griffon DJ (2011):** Enhancing bone healing in practice. In *ECVS proceedings 7-9/7/2011 Ghent, Belgium*, 131-133
- Grundel RE, Chapman MW, Yee T, Moore DC (1991).** Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. *Clin Orthop* 266: 244-258
- Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT (2002).** Transcriptional profiling of bone regeneration. *J Biol Chem* 277: 30177-30182

- Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C (1998).** Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. *Clin Orthop Relat Res* 355: 216-229
- Hederstierna K (2008).** Methods for evaluation of early bone healing at titanium implants. Academic Dissertation. Institute of Biomedicine, Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, The Sahlgrenska Academy, Göteborg, Sweden
- Heiple KG, Chase SW, Herndon CH (1963).** A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg (Am)* 45: 1593-1616
- Heo SY, Lee HB, Lee KC, Kim MS, Na CS, Kim NS (2009).** Biomechanical assessment of freeze-dried allograft cortical bone plate graft in canine bone defect model. *Veterinari Medicina*, 54: 183-190
- Hesse E, Kluge G, Atfi A, Correa D, Haasper C, Berding G, Shin H, Viering J, Länger F, Vogt PM, Krettek C, Jagodzinski M (2010).** Repair of a segmental long bone defect in human by implantation of a novel multiple disc graft. *Bone* 46: 1457-1463
- Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, Johnson AL, Thomas MW (2008).** Clinical applications of demineralized bone matrix: A retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Vet Surg* 37: 639-647
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990).** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1: 60-68
- Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, Matsunaga S, Kadosawa T, Kokubo S, Yokota S, Sasaki N (1998).** Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 60: 451-458
- Johnson AL, Hulse DA (2002).** Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management, bone grafts. In: Fossum TW, *Small Animal Surgery*, 2nd edition, St. Louis, Mosby
- Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP, Chotivichit A, Huang HK, Finerman GAM (1989).** Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. *Clin Orthop* 243: 254-265
- Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, Meyers L, Sciadini MF (1996).** Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone

defects: a biomechanical, histological and radiographic analysis. *J Orthop Res* 14: 351-369

Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, White SH, Goodship AE, Adams MA, Magnussen PA, Newman JH (1991). Axial movement and tibial fractures.

A controlled randomized trial of treatment. *J Bone Joint Surg (Br)* 73: 654-659

Key JA (1934). The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures. *J Bone Joint Surg* 16: 176-184

Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, Schelling SH, Carmel LA (1998).

Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop* 349: 205-217

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 10: 7-19

Knothe Tate ML, Tami AE, Netrebko P, Milz S, Docheva D (2012). Multiscale computational and experimental approaches to elucidate bone and ligament mechanobiology using the ulna-radius-interosseous membrane construct as a model system. *Technology and health care: official journal of the European Society for Engineering and Medicine* 20: 363-378.

Kolambkar YM, Boerckel JD, Dupont KM, Bajin M, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, Guldberg RE (2011). Spatiotemporal delivery of bone morphogenetic protein enhances functional repair of segmental bone defects.

Bone 49: 485-492

Kotha SP, Hsieh YF, Strigel RM, Müller R, Silva MJ (2004). Experimental and finite element analysis of the rat ulnar loading model-correlations between strain and bone formation following fatigue loading. *J Biomech* 37: 541-548.

Krieg AH, Hefti F (2007). Reconstruction with non-vascularised fibular grafts after resection of bone tumours. *J Bone Joint Surg (Br)* 89: 215-221

Kroese-Deutman HC, Vehof JWM, Spauwen PHM, Stoelinga PJW, Jansen JA (2008). Orthotopic bone formation in titanium fiber mesh loaded with platelet-rich plasma and placed in segmental defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37: 542-

549

Lansdowne JL (2010) Preclinical Models for Bone Defects, OTA Basic Science Focus Forum, AO Research Institute Davos, Davos Platz 7270, Switzerland

- LaTrenta GS, McCarthy JG, Breitbart AS, May M, Sissons HA (1989).** The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 84: 578-588
- Lazaridis N, Makos Gh, Iordanidis S, Zouloumis L (1998).** The use of titanium mesh sheet in the frontozygomatico-orbital region. *Aust Dent J* 43: 223-228
- Lee JA, Hodges S, Eastell R (2000).** Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 37: 432-446
- Lesser A (1994).** Segmental bone transport for the treatment of bone deficits. *J Am An Hosp Assoc* 30: 322-330
- Li M, Ke HZ, Qi H, Healy DR, Li Y, Crawford DT, Paralkar VM, Owen TA, Cameron KO, Lefker BA, Brown TA, Thompson DD (2003).** A novel, non-prostanoid EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist stimulates local bone formation and enhances fracture healing. *J Bone Miner Res* 18: 2033-2042
- Li M, Thompson DD, Paralkar VM (2007).** Prostaglandin E2 receptors in bone formation. *Int Orthop* 31: 767-772
- Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA (1990).** The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 86: 449-456.
- Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL (2006).** The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res* 24: 1438-1453
- Lindsey RW, Miclau T, Probe R, Perren S (1993).** A defect-in-continuity in the canine femur: an in-vivo experimental model for the study of bone graft incorporation. *Yale J Biol Med* 66: 157-163
- Malizos KN, Zalavras CG, Soucacos PN, Beris AE, Urbaniak JR (2004).** Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. *J Am Acad Orthop Surg* 12: 360-369.
- Martinez SA, Walker T (1999).** Bone grafts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1208-1219
- Mazess RB (1983).** Errors in measuring trabecular bone by computed tomography due to marrow and bone composition. *Calcif Tissue Int* 35: 148-152
- McAfee PC, Towson MD (1999).** Current concepts review: Interbody fusion cages in reconstructive operations on the spine. *J Bone Joint Surg (Am)* 81: 859-880

- Meffert RM, Langer B, Fritz ME (1992).** Dental implants: A review. *J Periodontol* 63: 859-870
- Millis DL (1999).** Bone and non-bone derived growth factors and effects on bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1221-1246
- Millis DL, Martinez SA (2003).** Bone grafts. In: *Textbook of Small Animal Surgery*, 3rd edition, Saunders, 1875-1891
- Mills LA, Simpson AH (2012).** In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg (Br)* 94: 865-874
- Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M (2008).** Electrical stimulation for long-bone fracture-healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg (Am)* 90: 2322-2330
- Moore DC, Chapman MW, Manske D (1987).** The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *J Orthop Res* 5: 356-365
- Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, Finerman GA (1986).** Bone repair induced by morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg (Br)* 68: 635-642
- Paquay YCGJ, de Ruijter JE, van der Waerden JPCM, Jansen JA (1997).** Wound healing phenomena in titanium fibre mesh: the influence of the length of implantation. *Biomaterials* 18: 161-166
- Patel MF, Langdon JD (1991).** Titanium mesh (Ti Mesh) osteosynthesis: a fast and adaptable method of semi-rigid fixation. *Br J Oral Maxillofac Surg* 29: 316-324.
- Perren SM (1979).** Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res* 138: 175-196
- Phillips JH, Rahn BA (1990).** Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg* 85: 891-897
- Piermattei DL, Johnson KA (2004).** *Surgical Approaches to the Bones and Joints of the Dog and Cat*, 4th edition, Saunders, 240-245, 250-253
- Piermattei DL, Flo GL, De Camp CE (2006):** *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*, 4th edition, Saunders, 30-31

- Podaropoulos L, Veis A, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D (2009).** Bone regeneration using Gb-Tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *J Oral Impl.* Vol. XXXV: 28-36
- Pountos I, Giannoudis PV, Jones E, English A, Churchman S, Field S, Ponchel F, Bird H, Emery P, McGonagle D (2011).** NSAIDS inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man. *J Cell Mol Med* 15: 525-534
- Ragetly GR, Griffon DJ (2011).** The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Vet Comp Orthop Traumatol* 24: 1-8
- Rahal SC, Volpi RS, Vulcano LC, Ciani RB, Mannarino R (2003).** Large segmental radius and ulna defect treated by bone transportation with the Ilizarov technique. *Aust Vet J* 81: 677-680
- Refai AK, Textor M, Brunette DM, Waterfield JD (2004)** Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res A* 70: 194-205
- Remedios A (1999).** Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1030-1044
- Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, Kroepfl A, Redl H (2006).** Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma* 61: 199-205
- Schmitz JP, Hollinger JO (1986).** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205: 299-308
- Schwarz N, Schlag G, Thurnher M, Eschberger J, Dinges HP, Redl H (1991).** Fresh autogeneic, frozen allogeneic, and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg (Br)* 73: 787-790
- Segal U, Shani J (2010).** Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog: through use of a cylindrical titanium mesh cage and a cancellous bone graft. *Vet Comp Orthop Traumatol* 23: 66-70
- Shilov B (2006).** The first case of primary metacarpal V restoration with titanium mesh and cancellous bone graft. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 59: 1391-1393
- Smith LG, Karagianes M.T (1974):** Histological preparations of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calc Tissue Res* 14, 333-337

- Spector DI, Keating JH, Boudrieau RJ (2007).** Immediate mandibular reconstruction of a 5 cm defect using rhBMP-2 after partial mandibulectomy in a dog. *Vet Surg* 36: 752-759
- Spira E (1954).** Bridging of bone defects in the forearm with iliac graft combined with intramedullary nailing. *J Bone Joint Surg (Br)* 36: 642-646
- Stanford CM, Keller JC (1991).** The concept of osseointegration and bone matrix expression. *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 83-101
- Stock SR, Blackburn D, Gradassi M, Simon HG (2003),** Bone formation during forelimb regeneration: a microtomography (microCT) analysis. *Dev Dyn* 226: 410-417
- Tideman H, Samman N, Cheung LK (1993).** Immediate reconstruction following maxilectomy: a new method. *Int J Oral Maxillofac Surg* 22: 221-225
- Tiedeman JJ (1991)** Treatment of non union by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 268: 294-302
- Toombs JP Wallace LJ, Bjorling DE, Rowland GN (1985).** Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res* 46: 513-518
- Tuominen T (2001).** Native bovine bone morphogenetic protein in the healing of segmental long bone defects. Academic Dissertation. Division of Orthopaedic and Trauma Surgery, University of Oulu, Finland. 19-25, 58-61
- van Eijden TMGJ, van Ruijven LJ EBW (2004).** Bone tissue stiffness in the mandibular condyle is dependent on the direction and density of the cancellous structure. *Calcif Tissue Int* 75: 502-508
- Veis AA, Papadimitriou S, Trisi P, Tsirlis AT, Parissis NA, Kenealy JN (2007).** Osseointegration of osseotites and machined-surfaced titanium implants in membrane-covered critical-sized defects: a histologic and histometric study in dogs. *Clin Oral Impl Res* 18: 153-160
- Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris A, Lazzara R (2004).** Osseointegration of osseotites and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Impl Res* 15: 54-61

- Viateau V, Guillemin G, Yang YC, Bensaïd W, Reviron T, Oudina K, Meunier A, Sedel L, Petite H (2004).** A technique for creating critical size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long bone defects. *Am J Vet Res* 65: 1653-1657
- Wang RR, Fenton A (1996).** Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence In* 27: 401-408
- Weisbrode SE (2004).** Bone and joints. In: McGavin D.M., Zachary J.F., *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th edition, Mosby, 1049-1050