



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ



Διδακτορική Διατριβή

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ
ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΤΙΤΑΝΙΟΥ"**

υπό

ΘΕΟΔΩΡΟΥ Δ. ΛΙΛΛΗ

Χειρουργού Οδοντιάτρου,

MSc (med), MSc (dent)

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2019

© 2019 Θεόδωρος Λιλλής

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (8-10-1019):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)**

Δρ. Ζωή Νταϊλιάνα
Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αναστασιος Τσίρλης
Καθηγητής Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής
Εμφυτευματολογίας & Ακτινολογίας Στόματος, Τμήμα
Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

4^{ος} Εξεταστής

Θεσσαλίας

Δρ. Κωνσταντίνος Μαλίζος
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο

5^{ος} Εξεταστής

Θεσσαλίας

Δρ. Σωκράτης Βαρυτιμίδης
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Θεόφιλος Καραχάλιος
Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Νικόλαος Νταμπαράκης
Αναπληρωτής Καθηγητής Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής,
Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας & Ακτινολογίας Στόματος,
Τμήμα Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης



*Στη μνήμη του Δασκάλου μου
Αν. Καθηγητή Αλέξανδρου Βέη*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω ένα εκ βαθέων ευχαριστώ στην επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Νταϊλιάννα Ζωή**, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αρχικά στην ανάθεση και ανάληψη της επίβλεψης της παρούσας διατριβής. Η καθοδήγησή της, η συνεχής ενθάρρυνση και η ερευνητική της εμπειρία υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες στην ολοκλήρωση, αλλά και βέλτιστη αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Σακελλαρίδη Νικόλαο** για την ουσιαστική συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, παρέχοντας τις χρήσιμες συμβουλές του, αλλά και εξομαλύνοντας με την πραότητα που τον διακρίνει την όποια δυσκολία ανέκυπτε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ κ. **Τσίρλη Αναστάσιο**, που όχι μόνο αντικατέστησε επάξια τον εκλιπόντα Αν. Καθηγητή κ. Βέη στα καθήκοντα επίβλεψης της παρούσας διατριβής, αλλά και γιατί από τα φοιτητικά μου ακόμα χρόνια, ως άλλος πνευματικός πατέρας, αποτέλεσε για μένα πρότυπο ακαδημαϊκού, επιστημονικού και επαγγελματικού ήθους.

Θα ήταν παράληψή μου να μην εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη που οφείλω στον εκλιπόντα Αν. Καθηγητή Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ κ. **Βέη Αλέξανδρο**, που αποτέλεσε αρχικά το έτερο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας διατριβής και που τόσο πρόωρα έφυγε από τη ζωή πριν την ολοκλήρωσή της. Ο Αν. Καθηγητής κ. Βέης υπήρξε για μένα πηγή επιστημονικής έμπνευσης καθώς αποτέλεσε τον Δάσκαλο που με μύησε στις τεχνικές ιστολογίας του οστού κατά τις

μεταπτυχιακές μου σπουδές. Θα ήταν παράληψη να μην αναφερθεί ότι το πρότυπο πειραματικό εργαστήριο ιστολογίας οστού, όπου και πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη, δημιουργήθηκε, οργανώθηκε και αναπτύχθηκε με πρωτοβουλίες του ιδίου, αποτελώντας σήμερα σημαντική παρακαταθήκη για το Τμήμα Οδοντιατρικής ΑΠΘ.

Τα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής ΑΠΘ κ. **Ταϊτζόγλου Ιωάννη** για την παραχώρηση χρήσης της εγκατάστασης πειραματισμού εργαστηριακών ζώων όπου πραγματοποιήθηκε το πειραματικό σκέλος της διατριβής, αλλά και τον κτηνίατρο Δρ. **Μαργαρίτη Ιωάννη** για τη βοήθειά του στην υγειονομική περίθαλψη των εργαστηριακών ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Να ευχαριστήσω επίσης, τη συνάδελφο κ. **Κυριακάκη Ιωάννα** για την συμβολή της ως δεύτερης εξετάστριας κατά την αξιολόγηση και βαθμολόγηση των ακτινογραφημάτων της μελέτης. Ευχαριστώ επίσης, τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Οδοντοφαρμακικής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ Αν. Καθηγητή κ. **Νταμπάράκη Νικόλαο** για τις διευκολύνσεις που μου παρείχε προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αγάπη και την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια, και ιδιαίτερα τον πατέρα μου **Διογένη Λιλλή**, ιατρό καρδιολόγο, χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του οποίου, το πειραματικό σκέλος της διατριβής ουδέποτε θα είχε ολοκληρωθεί.

Λιλλής Θεόδωρος
Θεσσαλονίκη, 20 Σεπτεμβρίου 2019

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	<p>Ημ. Γέννησης: 26 Οκτωβρίου 1983, Θεσσαλονίκη</p> <p>Διεύθυνση: Ικαρίας 2 με Γρ. Λαμπράκη 77, Άνω Τούμπα, Θεσσαλονίκη</p> <p>e-mail: theoilisdent@hotmail.com</p>
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ	<p>2008-2012 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ) στην Οδοντοφατνιακή Χειρουργική, Χειρουργική Εμφυτευματολογία & Ακτινολογία Τμήμα Οδοντιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης</p> <p>2008-2010 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ) στην Ιατρική Ερευνητική Μεθοδολογία με κατεύθυνση Κλινική Έρευνα Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης</p> <p>2001-2007 Πτυχίο Οδοντιατρικής Τμήμα Οδοντιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης</p>
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ	<p>2012-Σήμερα Αυτοαπασχολούμενος Οδοντίατρος Ιδιοκτήτης ιδιωτικού οδοντιατρείου στη Θεσσαλονίκη</p> <p>2008-2011 Συστεγαζόμενος Οδοντίατρος Κοινή άδεια λειτουργίας οδοντιατρείου με συνάδελφο</p>
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ	<p>Διατριβές</p> <p>2011-2012 Μεταπτυχιακή Διατριβή Οδοντιατρικής: «Η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση. Πειραματική μελέτη σε επίμυες». Επιβλέπων: Α. Τσίρλης, Καθηγητής Οδοντιατρικής ΑΠΘ</p> <p>2010-2011 Μεταπτυχιακή Διατριβή Ιατρικής: «Εξαγωγές δοντιών σε ασθενείς υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή». Επιβλέπων: Α. Ζιάκας, Καθηγητής Καρδιολογίας ΑΠΘ</p> <p>Άλλα</p> <p>2005-Σήμερα Συμμετοχή στην εκπόνηση επιστημονικών εργασιών στα αντικείμενα της Χειρουργικής Στόματος, Οδοντιατρικής Εμφυτευματολογίας, Οδοντιατρικής Αναισθησιολογίας και Οδοντιατρικής Ακτινολογίας οι οποίες ανακοινώθηκαν ή/και δημοσιεύτηκαν σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια ή περιοδικά.</p>

<p>ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ</p> <p>2015-Σήμερα</p> <p>2008-2011 & 2015-Σήμερα</p> <p>2009-2011</p>	<p>Συμμετοχή στην κλινική άσκηση των μεταπτυχιακών φοιτητών της κατεύθυνσης Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Οδοντιατρικής Α.Π.Θ. (Με σύμβαση έργου/ Κωδικός Έργου: 92007 ΕΛΚΕ ΑΠΘ)</p> <p>Συμμετοχή στην κλινική άσκηση φοιτητών του Τμήματος Οδοντιατρικής Α.Π.Θ. στα αντικείμενα της Οδοντοφατνιακής χειρουργικής, Χειρουργικής εμφυτευματολογίας και Οδοντιατρικής αναισθησιολογίας</p> <p>Συμμετοχή στην προκλινική άσκηση των προπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. στο αντικείμενο «Τοπική αναισθησία και συρραφή τραύματος» ως εκπαιδευτής του Εργαστηρίου Κλινικών Δεξιοτήτων του Τμήματος Ιατρικής ΑΠΘ. Παρακολούθηση κύκλου Εκπαίδευσης Εκπαιδευτών με αντικείμενα: «Σχεδιασμός και οργάνωση ενός εργαστηρίου κλινικών δεξιοτήτων», «Ανατροφοδότηση στην εκπαίδευση» και «Εξέταση κλινικών δεξιοτήτων – Αντικειμενικά δομημένη κλινική εξέταση OSCE»</p>
<p>ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ</p> <p>2012-Σήμερα</p> <p>2011-2012</p> <p>2008-2011</p>	<p>Αυτοαπασχολούμενος Οδοντίατρος Ιδιοκτήτης ιδιωτικού οδοντιατρείου στη Θεσσαλονίκη</p> <p>Οπλίτης Οδοντίατρος Στρατιωτική θητεία ως οπλίτης οδοντίατρος σε Μονάδα και Στρατιωτικό Νοσοκομείο</p> <p>Συστεγαζόμενος Οδοντίατρος Κοινή άδεια λειτουργίας οδοντιατρείου με συνάδελφο</p>
<p>ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ</p> <p>2017 - Σήμερα</p> <p>2017 – Σήμερα</p> <p>2016 – Σήμερα</p> <p>2009 – 2011</p>	<p>Τακτικό μέλος της Ομάδας Εργασίας για την οδοντιατρική ειδικότητα της Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής του Κεντρικού Συμβουλίου Υγείας (ΚΕΣΥ)</p> <p>Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου του Οδοντιατρικού Συλλόγου Θεσσαλονίκης</p> <p>Γενικός Γραμματέας της Ελληνικής Οδοντιατρικής Εταιρείας Χειρουργικής Στόματος</p> <p>Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου του Συλλόγου Μεταπτυχιακών Φοιτητών και Υποψηφίων διδασκόντων του Τμήματος Οδοντιατρικής Α.Π.Θ., μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ, μέλος της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ, μέλος της Γενικής Συνέλευσης του Τομέα Παθολογίας & Χειρουργικής Στόματος του Τμήματος Οδοντιατρικής ΑΠΘ</p>

<p>ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ</p>	<p>2017 1ο Βραβείο για την ανακοίνωση «Λιλλής Θ, Βέης Α, Σακελλαρίδης Ν, Νταϊλιάνα Ζ. Το αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο κλοπιδογρέλη προάγει την επούλωση οστικών ελλειμμάτων.» 23^ο κοινό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής και της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού & Άνω Άκρου, Αθήνα 2-4 Νοεμβρίου 2017</p> <p>2017 1ο Βραβείο για την ανακοίνωση «Λιλλής Θ, Βέης Α, Σακελλαρίδης Ν, Νταϊλιάνα Ζ. Το αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο κλοπιδογρέλη προάγει την επούλωση οστικών ελλειμμάτων. Ακτινολογική και ιστομορφομετρική μελέτη σε κονίκλους.» 37^ο Πανελλήνιο Οδοντιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 19-21 Οκτωβρίου 2017</p> <p>2011 1ο Βραβείο για την ανακοίνωση «Λιλλής Θ, Ζιάκας Α, Κοσκινάς Κ, Τσίρλης Α, Γιαννόγλου Γ. Ασφαλείς εξαγωγές δοντιών χωρίς τη διακοπή της μονής ή διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής.» 7ο Ετήσιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης. Θεσσαλονίκη 10-12 Μαρτίου 2011</p> <p>2010 1ο Βραβείο για την ανακοίνωση «Κασφίκης Γ, Λιλλής Θ, Κουμλελής Χ, Φαρδή Α, Τσίρλης Α. Γνώσεις των Ελλήνων οδοντιάτρων όσον αφορά την αντιμετώπιση ασθενών που λαμβάνουν διφωσφονικά». Συνέδριο Στοματολογικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδος, Αριδαία 12-14 Μαρτίου 2010</p>
<p>ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ</p>	<p>European Association for Osseointegration (Τακτικό μέλος)</p> <p>Ελληνική Οδοντιατρική Εταιρεία Χειρουργικής Στόματος (Ιδρυτικό/Τακτικό μέλος)</p> <p>Στοματολογική Εταιρεία Βορείου Ελλάδος (Τακτικό μέλος)</p>
<p>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</p>	<p>Διεθνή περιοδικά</p> <ol style="list-style-type: none"> Lillis T, Veis A, Sakellaridis N, Tsirlis A, Dailiana Z. Effect of clopidogrel in bone healing-experimental study in rabbits. <i>World J Orthop</i> 2019; <i>In press</i> Zabojszcz M, Malinowski K, Janion-Sadowska A, Lillis T, Ziakas A, Sławska A, Janion M, Siudak Z. Safety of dental extractions in patients on dual antiplatelet therapy – a meta-analysis. <i>Adv Interv Cardiol</i> 2019; 15, 1 (55): 68–73 Lyras GA, Giannakopoulou A, Lillis T, van der Geer AAE. Paradise lost: Evidence for a devastating metabolic bone disease in an insular Pleistocene deer. <i>International Journal of Paleopathology</i> 2018; 24: 213-226

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ*(συνεχ.)*

4. Theodoridis C, **Lillis T**, Tsirlis A, Kalfas S. A Randomized Clinical Trial on the Efficacy of Infiltration Versus Block Anesthesia for Dental Implant Surgery in the Posterior Mandible. *J Dent Pathol Med* 2018; 2: 1
5. **Lillis T**, Didagelos M, Lillis L, Theodoridis C, Karvounis H, Ziakas A. Impact of post-exodontia bleeding in cardiovascular patients: a new classification proposal. *Open Cardiovasc Med J* 2017; 11: 102-110
6. Fardi A, Kodonas K, **Lillis T**, Veis A. Top cited articles in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017; 32: 555-564
7. **Lillis T**. Is bleeding the only matter of worry in clopidogrel receiving dental patients?. *J Dent Health Oral Disord Ther* 2016; 4(6): 133
8. Lyras GA, Giannakopoulou A, **Lillis T**, Veis A, Papadopoulos GC. Bone lesions in a Late Pleistocene assemblage of the insular deer *Candiacervus* sp.II from Liko cave (Crete, Greece). *International Journal of Paleopathology* 2016; 14: 36-45
9. Koskinas KC, **Lillis T**, Tsirlis A, Katsiki N, Giannoglou GD, Ziakas AG. Dental management of antiplatelet-receiving patients: is uninterrupted antiplatelet therapy safe? *Angiology*. 2012; 63: 245-7
10. **Lillis T**, Ziakas A, Koskinas K, Tsirlis A, Giannoglou G. Safety of dental extractions during uninterrupted single or dual antiplatelet treatment. *American Journal of Cardiology*. 2011; 108: 964-7

Ελληνικά περιοδικά

1. Καρακώστας Π, Ζωγάκης Ι, **Λιλλής Θ**, Θεοδωρίδης Χ. Η οστεοφλοιοτομία ως μέθοδος επιτάχυνσης της ορθοδοντικής θεραπείας. *Στοματολογία* 2017; 74(3): 121-126
2. **Λιλλής Θ**. Εξαγωγές δοντιών σε ασθενείς υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή. Παρουσίαση διπλωματικής εργασίας. [Άρθρο Σύναξης]. *Αθηρολογία* 2011; 6: 1
3. Κασφίκης Γ, **Λιλλής Θ**, Αντωνιάδης Κ. Συσχέτιση περιοδοντικής νόσου και καρδιαγγειακών νοσημάτων. *Ελληνικά Στοματολογικά Χρονικά* 2011; 55(4): 295-302
4. **Λιλλής Θ**, Κασφίκης Γ. Νευραλγία του τριδύμου: Ιστορική ανασκόπηση και σύγχρονες απόψεις. *Οδοντοστοματολογική Πρόσδος* 2011; 65(3): 370-379
5. **Λιλλής Θ**, Κασφίκης Γ. «Οστεοαισθητικότητα»: Μια νέα έννοια στο χώρο της εμφυτευματολογίας. *Στοματολογία*. 2010; 67(4): 157-163

<p>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ (συνεχ.)</p>	<p>6. Ματούλας Ε, Ναζάρογλου Ι, Χαριτούδη Δ, Λιλλής Θ, Νταμπαράκης Ν. Σύγκριση αρτικάϊνης - λιδοκαΐνης στην υποβλεννογόνια αναισθησία του πρώτου μόνιμου γομφίου της κάτω γνάθου. Πιλοτική μελέτη. <i>ΣΤΟΜΑ</i> 2010; 38(1): 53-56</p> <p>7. Τσόγκα Ο, Λιλλής Θ, Λυσίτσα Σ. Η είσοδος των εμφυτευμάτων στο ιγμόρειο άντρο ως επιπλοκή στην εμφυτευματολογία. <i>Εμφυτευματολογία</i> 2010; 14(2): 171-176</p> <p>8. Ματούλας Ε, Ναζάρογλου Ι, Χαριτούδη Δ, Πιτσιάβας Σ, Λιλλής Θ. Χειρουργική στόματος σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή ή αντιπηκτική θεραπεία. <i>Στοματολογία</i> 2009; 66(2): 43-51</p> <p>9. Τσίρλης Α, Κουμλελής Χ, Λιλλής Θ. Η επίδραση του καπνίσματος στα οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα. <i>Ελληνικά Στοματολογικά Χρονικά</i> 2008; 52(4): 353-361</p> <p>10. Λιλλής Θ, Ευαγγελινάκη Ε, Καραμήτσου Ε, Ευαγγελινάκης Ν, Ζουλούμης Λ. Άμεση vs Καθυστερημένη μετεξακτική τοποθέτηση οδοντικών εμφυτευμάτων. <i>ΣΤΟΜΑ</i> 2007; 35(2): 151-160</p> <p>11. Τσίρλης Α, Λιλλής Θ. Αλλεργικές αντιδράσεις σε υλικά που χρησιμοποιούνται στην Ενδοδοντολογία. <i>Ενδοδοντολογία</i> 2006; 1(1): 53-58</p> <p>12. Τσίρλης Α, Λιλλής Θ. Οι ιδιαιτερότητες του διαβητικού ασθενούς και η αντιμετώπισή του στο οδοντιατρείο. <i>Στοματολογία</i> 2006; 63(2): 59-71</p>
<p>ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ – ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ: 12 ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ: 60 ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ: 5 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ: 10 (8 in MEDLINE) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ: 12 ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΒΙΒΛΙΩΝ: 1 ΕΤΕΡΟΑΝΑΦΟΡΕΣ: Scopus: 68 / Web of Science: 55 / Google Scholar: 131 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΟΣ IMPACT FACTOR (2018): 10,717 h – INDEX: 3</p>	

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. "Evaluation of rabbit tibia and femur as implantation sites in dental implant research." HSBLAS/ESLAV/ECLAM Meeting Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research, Athens, 22-23 September 2014
2. «Μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην επούλωση οστικών ελλειμμάτων κρανίου σε κονίκλους. Προκαταρκτικά αποτελέσματα». 72ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας, Αθήνα, 12-15 Οκτωβρίου 2016
3. Εισήγηση στο Συμπόσιο «Εφαρμογές καινοτόμων ερευνητικών αποτελεσμάτων» που διοργανώθηκε από τον Τομέα Χειρουργικής του ΤΙΠΘ, Λάρισα, 21 Νοεμβρίου 2016 με τίτλο: «Η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση – πειραματική μελέτη.»
4. «Το αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο κλοπιδογρέλη προάγει την επούλωση οστικών ελλειμμάτων.» 23ο Κοινό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού και Άνω Άκρου και της Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής, Αθήνα 3-5 Νοεμβρίου 2017. **Η ανακοίνωση τιμήθηκε με το πρώτο βραβείο.**
5. «Το αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο κλοπιδογρέλη προάγει την επούλωση οστικών ελλειμμάτων. Ακτινολογική και ιστομορφομετρική μελέτη σε κονίκλους.» 37ο Πανελλήνιο Οδοντιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 19-21 Οκτωβρίου 2017. **Η ανακοίνωση τιμήθηκε με το πρώτο βραβείο.**
6. «Το αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο κλοπιδογρέλη προάγει την οστεοενσωμάτωση εμφυτευμάτων τιτανίου» 24ο Κοινό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού και Άνω Άκρου και της Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής, Θεσσαλονίκη, 6-8 Δεκεμβρίου 2018
7. "The antiplatelet drug clopidogrel promotes osseointegration. Histomorphometric study in rabbits." 28th Annual Congress of the European Association for Osseointegration, Lisbon, 26-29 September 2019

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. Lillis T, Veis A, Sakellaris N, Tsirlis A, Dailiana Z. Effect of clopidogrel in bone healing-experimental study in rabbits. *World J Orthop* 2019; *In press*
2. Lillis T, Dabarakis N, Sakellaris N, Dailiana Z. Clopidogrel promotes osseointegration of titanium implants. Histomorphometric study in rabbit. *Under consideration for publication*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	22
SUMMARY	26
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Οστική επούλωση και στεοενσωμάτωση	
1.1. Ορισμοί.....	30
1.2. Το οστό και τα κύτταρά του.....	31
1.3. Μικροσκοπική και μακροσκοπική δομή του οστού.....	33
1.4. Οστεογένεση.....	35
1.5. Οστική ανακατασκευή ή αναδιαμόρφωση (remodeling).....	39
1.6. Επουλωτικές εξεργασίες του οστίτη ιστού.....	42
1.7. Οστεοενσωμάτωση.....	46
1.8. Εμφυτευματικά υλικά.....	55
2. Σύστημα πουρινεργικής σηματοδότησης	
2.1. Εισαγωγικά.....	58
2.2. Απελευθέρωση ATP στο εξωκυττάριο υγρό.....	59
2.3. Εξωκυττάριος μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων.....	59
2.4. Πουρινεργικοί υποδοχείς.....	61
2.5. Πουρινεργική σηματοδότηση στο οστό.....	64
3. Κλοπιδογρέλη: αναστολέας του υποδοχέα P2Y12	
3.1. Εισαγωγικά.....	66
3.2. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης.....	66
3.3. Οι πλειοτροπικές δράσεις της κλοπιδογρέλης.....	67
3.4. Πιθανές επιδράσεις της κλοπιδογρέλης στο οστό.....	68
3.5. Περιεργχειρητική αντιμετώπιση ασθενών υπό αγωγή με κλοπιδογρέλη.....	72
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Σκοπός της μελέτης	78
2. Υλικό και μέθοδος	
2.1. Ζωικό πρότυπο και σχεδιασμός της μελέτης.....	80
2.2. Χειρουργικές επεμβάσεις.....	82
2.3. Ευθανασία και μονιμοποίηση των ιστών.....	88
2.4. Ακτινολογική μελέτη των ελλειμμάτων κρανίου.....	89
2.5. Ιστολογική μελέτη.....	90
2.6. Ιστομορφομετρία.....	93
2.7. Μέγεθος δείγματος.....	99
2.8. Στατιστική επεξεργασία.....	99

3. Αποτελέσματα	
3.1. Αποτελέσματα επούλωσης οστικών ελλειμμάτων κρανίου.....	102
3.2. Αποτελέσματα οστεοενσωμάτωσης εμφυτευμάτων τιτανίου....	107
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	122
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
1. Αδειοδότηση πειραματισμού για μελέτη σε εργαστηριακά ζώα.....	156
2. Περιλήψεις δημοσίευσης αποτελεσμάτων.....	158

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ
ΕΠΟΥΛΩΣΗ**

ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΤΙΤΑΝΙΟΥ"

ΘΕΟΔΩΡΟΣ Δ. ΛΙΛΛΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ζωή Νταϊλιάννα**, Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**),
2. **Νικόλαος Σακελλαρίδης**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. **Αναστάσιος Τσίρλης**, Καθηγητής Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας Στόματος, Τμήμα Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Η κλοπιδογρέλη αποτελεί ένα από τα συχνότερα συνταγογραφούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα για την πρόληψη των επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης. Συνδεδεμένη στον πουρινεργικό υποδοχέα P2Y₁₂ των αιμοπεταλίων αποτρέπει τη συγκόλλησή τους και τη δημιουργία θρόμβων. Καθώς ολοένα αυξανόμενος αριθμός ασθενών λαμβάνει το φάρμακο για νοσήματα του καρδιαγγειακού, η σύγχρονη τάση που αποτυπώνεται σε διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες είναι να μην διακόπτεται προσωρινά η αγωγή πριν από χειρουργικές επεμβάσεις, με σκοπό την αποφυγή πιθανών θρομβοεμολικών επιπλοκών. Ωστόσο, ο υποδοχέας P2Y₁₂ εκφράζεται τόσο στις οστεοβλάστες όσο και στις οστεοκλάστες, και προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι η κλοπιδογρέλη ενδέχεται να επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό άλλοτε θετικά και άλλοτε αρνητικά, δημιουργώντας προβληματισμούς για την ποιότητα της επούλωσης του οστού. Με βάση τα ανωτέρω, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση και στην ενσωμάτωση των εμφυτευμάτων τιτανίου.

Υλικό & Μέθοδος

Χρησιμοποιήθηκαν 48 κουνέλια Νέας Ζηλανδίας τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: ομάδα Α (n=8), ομάδα Β (n=8), ομάδα Γ (n=16) και ομάδα Δ (n=16). Στα κουνέλια των ομάδων Α και Γ χορηγήθηκε κλοπιδογρέλη 3 mg/kg ημερησίως από του στόματος, ενώ τα κουνέλια των ομάδων Β και Δ δεν ελάμβαναν καμία αγωγή (μάρτυρες). Η αγωγή ξεκινούσε μια εβδομάδα πριν την διενέργεια των χειρουργικών επεμβάσεων και συνεχίστηκε για έξι εβδομάδες μετεγχειρητικά. Στα κουνέλια των ομάδων Α και Β δημιουργήθηκαν χειρουργικά δύο κυκλικά οστικά ελλείμματα διαμέτρου 11 mm στα βρεγματικά οστά εκατέρωθεν της μέση οβελιαίας ραφής. Στα κουνέλια των ομάδων Γ και Δ τοποθετήθηκε ένα εμφύτευμα τιτανίου διαμέτρου 3,25 mm και μήκους 8 mm εγκαρσίως στον έσω μηριαίο κόνδυλο του αριστερού οπίσθιου σκέλους. Έξι

εβδομάδες μετεγχειρητικά πραγματοποιήθηκε ευθανασία των εργαστηριακών ζώων και συλλογή των οστικών δειγμάτων κρανίου ή μηριαίου αντίστοιχα. Στα δείγματα των ομάδων Α και Β αξιολογήθηκε το ποσοστό οστικής αναγέννησης και γεφύρωσης του ελλείμματος ακτινολογικά και ιστομορφομετρικά. Στα δείγματα των ομάδων Γ και Δ αξιολογήθηκε ιστομορφομετρικά το ποσοστό επαφής οστού-εμφυτεύματος, καθώς και η πυκνότητα του οστίτη ιστού σε εγγύτητα με το εμφύτευμα.

Αποτελέσματα

Όλα τα εργαστηριακά ζώα ανέχθηκαν καλώς τις χειρουργικές επεμβάσεις και δεν εμφάνισαν καμία επιπλοκή κατά τη μετεγχειρητική περίοδο. Όσον αφορά την επούλωση των οστικών ελλειμμάτων κρανίου φάνηκε ότι ήταν σημαντικά βελτιωμένη στην ομάδα Α (κλοπιδογρέλη) σε σχέση με τον ομάδα Β (μάρτυρες), εμφανίζοντας σημαντικά μεγαλύτερο ακτινολογικό σκορ, μεγαλύτερο ποσοστό οστικής αναγέννησης ($28,07 \pm 7,7\%$ έναντι $19,47 \pm 4,9\%$ αντίστοιχα, $p=0,018$) και μεγαλύτερο ποσοστό γεφύρωσης ($72,17 \pm 21,2\%$ έναντι $41,17 \pm 8,5$ αντίστοιχα, $p=0,004$). Όσον αφορά στην οστεοενσωμάτωση των εμφυτευμάτων τιτανίου φάνηκε ότι τα εμφυτεύματα της ομάδας Γ (κλοπιδογρέλη) σε σχέση με αυτά της ομάδας Δ (μάρτυρες) εμφάνιζαν στατιστικώς μεγαλύτερο ποσοστό επαφής οστού-εμφυτεύματος ($48,77 \pm 11,2\%$ έναντι $34,65 \pm 9,1\%$ αντίστοιχα, $p=0,001$) και μεγαλύτερη πυκνότητα οστίτη ιστού σε εγγύτητα με την επιφάνειά τους ($40,52 \pm 7,6$ % έναντι $28,74 \pm 8,8\%$ αντίστοιχα, $p=0,001$).

Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής η λήψη της κλοπιδογρέλης δεν φαίνεται να συνοδεύεται από ανεπιθύμητες ενέργειες στην οστική επούλωση και στην οστεοενσωμάτωση, και άρα ο μεγάλος όγκος των ασθενών αυτών μπορεί με ασφάλεια να συνεχίζει την αγωγή όταν υποβάλλεται σε τέτοιες επεμβάσεις χωρίς να υπονομεύονται οι επουλωτικές διαδικασίες. Τα αποτελέσματά έδειξαν επιπλέον ότι η κλοπιδογρέλη, όχι μόνο δεν επηρεάζει

αρνητικά την οστική επούλωση και την οστεοενσωμάτωση, αλλά αντιθέτως τις προάγουν σημαντικά. Το εύρημα αυτό αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ανακάλυψη, τόσο για την ορθοπαιδική όσο και για άλλες ειδικότητες όπως η νευροχειρουργική, η γναθοπροσωπική χειρουργική και η χειρουργική του στόματος, δεδομένης της αυξανόμενης ερευνητικής προσπάθειας των τελευταίων ετών για ανεύρεση νέων σκευασμάτων και μεθόδων που προάγουν και επιταχύνουν την οστική επούλωση. Περαιτέρω μελλοντική έρευνα στο ρόλο των πουρινεργικών υποδοχέων στο οστό ενδέχεται να επιφέρει καινοτόμες εφαρμογές στη βελτίωση των μεθόδων αντιμετώπισης των οστικών ελλειμμάτων.

SUMMARY

Introduction

Clopidogrel is a widely prescribed drug for prevention of myocardial infarction and stroke in patients at risk. It inhibits thrombus formation via inhibition of the P2Y₁₂ purinergic receptor on platelets, which is important in their activation by ADP. Over the past years, accumulating evidence from medical suggests perioperative maintenance of antiplatelet therapy, whenever possible, in order to avert any thrombotic risk caused by temporary antiplatelet discontinuation. However, the P2Y₁₂ receptor has also been found to be expressed in both osteoblasts and osteoclasts. Previous studies on the effect of clopidogrel on bone metabolism indicated potential harmful effects, but their results remain contrasting. Thus, clopidogrel treatment may also affect bone healing, but it has not been studied yet. The purpose of the present study was to evaluate if continuous perioperative clopidogrel treatment has any negative effect on bone healing or osseointegration of titanium implants.

Materials and methods

Forty eight New Zealand white rabbits were randomly assigned in four groups; group A (n=8), group B (n=8), group C (n=16) and group D (n=16). Rabbits for groups A and C received 3mg/kg of clopidogrel daily per os, while rabbits of groups B and D received no treatment and served as controls. Clopidogrel treatment started one week prior to the conduction of the surgical procedures and continued for six weeks postoperatively. In rabbits of groups A and B two circular cranial defects were created using a trephine burr, 11mm in diameter, on both sides of the sagittal suture. In rabbits of groups C and D a screw-shaped parallel-walled titanium implant of 3.25mm in diameter and 8.5mm in height was placed in their right medial femur condyle. After six weeks of healing period, all animals were euthanized and the portions of cranial bones containing the defects and the distal femora containing the titanium implants were block-sectioned. In the specimens from groups A and B defect

regeneration and bridging was assessed radiographically and histologically. In specimens from groups C and D osseointegration was assessed histologically by measuring bone-to-implant contact percentage and bone tissue density near the titanium surface.

Results

Both the surgical procedures and the postoperative period were uneventful and well tolerated by all the animals, without any surgical wound dehiscence, signs of infection or other complication. Concerning alveolar defect healing, group A (clopidogrel) in comparison to group B (controls) had significantly improved radiographic healing scores and histomorphometrically improved bone regeneration ($28.07 \pm 7.7\%$ vs $19.47 \pm 4.9\%$ respectively, $p=0.018$) and defect bridging ($72.17 \pm 21.2\%$ vs $41.17 \pm 8.5\%$ respectively, $p=0.004$). Concerning the osseointegration of titanium implants, group C (clopidogrel) in comparison to group D (controls) had significantly greater percentage of bone-to-implant contact ($48.77 \pm 11.2\%$ vs $34.65 \pm 9.1\%$ respectively, $p=0.001$) and improved bone tissue density near the implant surface ($40.52 \pm 7.6\%$ vs $28.74 \pm 8.8\%$ respectively, $p=0.001$).

Conclusions

The present study results indicate that continuous perioperative clopidogrel treatment does not impair bone healing; instead, it promotes new bone formation. This finding is important when dealing with skeletal surgery in patients in chronic use of this drug for cardiovascular indications. Future research may involve evaluation of the effect of other antiplatelet drugs of the same category and in different dosing and treatment duration. Moreover, further research is needed in order to evaluate if our findings can find useful implications in bone healing improvement such as topically drug releasing vehicles or drug eluting orthopedic implants.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΣΤΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ

1.1. Ορισμοί

Τα οστά αποτελούν όργανα του ερειστικού συστήματος με ποικίλες λειτουργίες όπως η στήριξη και η κίνηση του ανθρωπίνου σώματος, η προστασία ζωτικών οργάνων, η παραγωγή των έμορφων συστατικών του αίματος και η αποθήκευση ανόργανων αλάτων. Είναι σημαντικό στο σημείο αυτό να αποσαφηνιστούν κάποια ζητήματα ορολογίας σχετικά με τον όρο «**οστό**» καθώς συχνά στη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται με διαφορετικά νοήματα. Εκτός από την έννοια του οργάνου, ο όρος χρησιμοποιείται άλλοτε για να περιγράψει μόνο το ενασβεστωμένο σκληρό τμήμα των οστών (εξαιρουμένων των κυτταρικών στοιχείων και του οστεοειδούς), άλλοτε τη μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία, ενασβεστωμένη ή μη, που βρίσκεται μεταξύ των οστικών κυττάρων (συμπεριλαμβανομένου δηλαδή και του οστεοειδούς) και άλλοτε τέλος χρησιμοποιείται με την έννοια του ιστού. Κλασικά δε συγγράμματα ανατομίας-ιστολογίας περιγράφουν συνήθως υπό την έννοια του «**οστίτη ιστού**» μόνο την μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία, ενασβεστωμένη ή μη, μαζί με τα κυτταρικά στοιχεία που σχετίζονται άμεσα με αυτή (οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες), εξαιρώντας τον μυελό των οστών, τον οποίο και περιγράφουν ως διακριτό ιστό¹⁻³.

Καθώς η παρούσα διατριβή αποτελεί κατά βάση ιστολογική και ιστομορφομετρική μελέτη, θα χρησιμοποιηθεί σε αυτή η ορολογία όπως αυτή καθορίστηκε και χρησιμοποιείται ευρέως έως σήμερα από την Histomorphometry Nomenclature Committee της American Society for Bone and Mineral Research, το 1987⁴. Σύμφωνα με αυτή, υπό τον όρο «**οστό**» νοείται η ενασβεστωμένη ή μη μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία (συμπεριλαμβανομένου δηλαδή και του οστεοειδούς) που περικλείεται μεταξύ των οστικών κυττάρων (οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες). Υπό τον όρο «**οστίτης ιστός**» νοείται το είδος του εξειδικευμένου συνδετικού ιστού που αποτελείται από οστό, οστικά κύτταρα και μυελό των οστών. Πράγματι, το οστό και ο μυελός του παρόλο που συχνά περιγράφονται ως διακριτοί ιστοί,

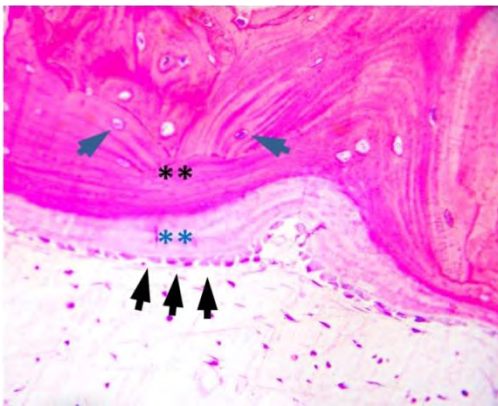
στην ουσία είναι τόσο στενά συνδεδεμένοι ανατομικά και λειτουργικά, που θα πρέπει να θεωρείται ότι αποτελούν έναν ενιαίο ιστό⁵.

1.2. Το οστό και τα κύτταρά του

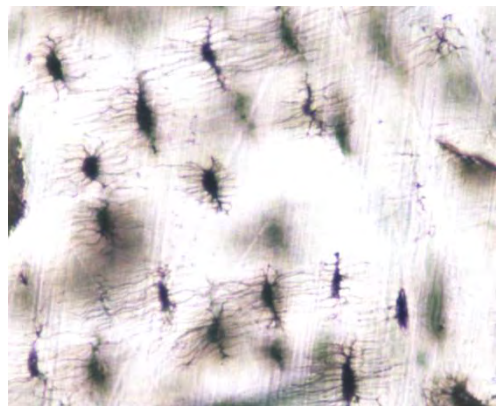
Τα οστικά κύτταρα προέρχονται από δύο κυτταρικές σειρές, τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα, επενδυματικά κύτταρα) και τα αρχέγονα αιμοποιητικά (οστεοκλάστες)⁶. Οι **οστεοβλάστες** είναι υπεύθυνες για την παραγωγή οστού και αποτελούν μονοπύρρηνα κυβοειδή κύτταρα με χαρακτηριστικά εκκριτικών κυττάρων (αναπτυγμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή του Golgi). Διατάσσονται σε μονή στιβάδα (**Εικ. 1**) που επενδύει τις επιφάνειες του οστού, στις περιοχές που υπάρχει ανάγκη εναπόθεσης νέου⁷. Στην επιφάνεια όπου διατάσσονται οι οστεοβλάστες παράγουν αρχικά το **οστεοειδές**, το οποίο είναι οργανικό (μη ενασβεστωμένο) υπόστρωμα που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I, γλυκοπρωΐνες και πρωτεογλυκάνες (**Εικ. 1**). Το οστεοειδές στη συνέχεια ενασβεστώνεται με την κατακρήμνιση των ανόργανων αλάτων (κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη), τα οποία απελευθερώνονται από κυστίδια που εκκρίνουν οι οστεοβλάστες. Κατά την ανωτέρω διαδικασία οι οστεοβλάστες διατηρούν κυτταροπλασματικές αποφυάδες εμβυθισμένες στο οστεοειδές. Καθώς προχωρά η διαδικασία της ενασβεστίωσης του οστεοειδούς και της εναπόθεσης νέας ποσότητας οστεοειδούς, οι οστεοβλάστες με τις αποφυάδες τους εσωκλείονται στο οστό και μετατρέπονται πλέον σε **οστεοκύτταρα**⁸ (**Εικ. 2**). Τα οστεοκύτταρα, τα οποία έχουν σχήμα αποπλατυσμένου αμυγδάλου, κατασκηνώνουν σε **κοιλότητες** που βρίσκονται εντός της μάζας του ενασβεστωμένου οστού. Γειτονικές κοιλότητες επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω πολυάριθμων **οστικών σωληναρίων** μέσα στα οποία βρίσκονται οι μακρινές κυτταρο-πλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων (**Εικ. 2**). Οι οστεοβλάστες που δεν θα εγκλειστούν στον οστό για να μετατραπούν σε οστεοκύτταρα, είτε αποπίπτουν είτε μετατρέπονται σε **επενδυματικά κύτταρα**. Τα τελευταία είναι πεπλατυσμένα μη εκκριτικά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν τις

επιφάνειες του οστού όπου δεν παρατηρείται ούτε οστική εναπόθεση ούτε απορρόφηση (**Εικ. 3**).

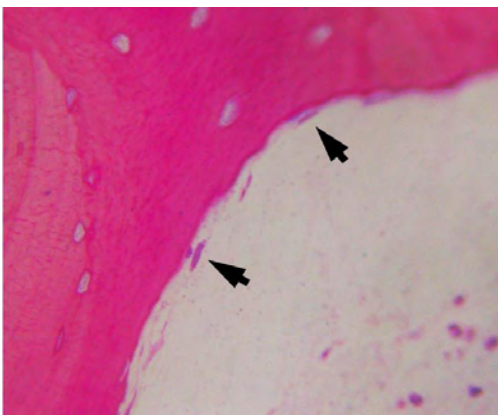
Οι **οστεοκλάστες** έχουν κοινή καταγωγή με τα μονοκύτταρα-μακροφάγα και είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του οστού⁹. Η οστεοκλάστη είναι πολυπύρρνο κύτταρο το οποίο προσκολλάται στο σημείο όπου απαιτείται να γίνει η οστική απορρόφηση και δημιουργεί μια ερμητικά κλειστή ζώνη (κοιλότητες του Howship) (**Εικ. 4**). Η επιφάνεια της οστεοκλάστης που βρίσκεται



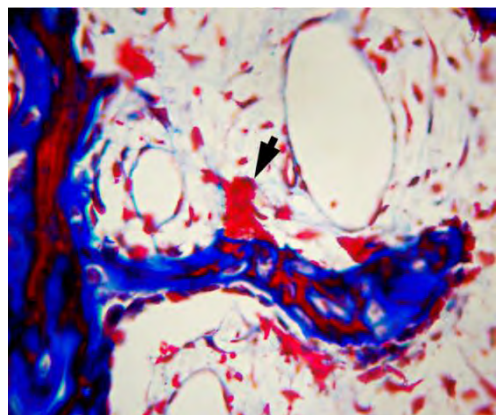
Εικόνα 1. Στιβάδα οστεοβλαστών (μαύρα βέλη), οστεοειδές (μπλε αστερίσκοι), ενασβεστωμένο οστό (μαύροι αστερίσκοι) και οστεοκύτταρα (μπλε βέλη).. (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x40)



Εικόνα 2. Οστικές κοιλότητες και οστικά σωληνάκια. Λέασμα απολιθώματος κνήμης ελαφιού. (x80)



Εικόνα 3. Επενδυματικά κύτταρα. (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x80)



Εικόνα 4. Οστεοκλάστη. (Masson's trichrome, x80)

προς τη ζώνη απορρόφησης εμφανίζει πτυχώσεις (ruffled border) και από αυτή εκκρίνονται τα διάφορα ένζυμα που προκαλούν λύση του οστού (κολλαγενάση, όξινη φωσφατάση κ.α.), καθώς και ιόντα H^+ και αντιδρώσες ρίζες οξυγόνου¹⁰.

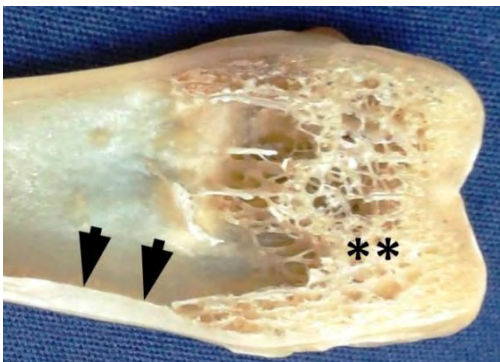
Η μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία που βρίσκεται μεταξύ των οστικών κυττάρων αποτελείται τόσο από οργανικό όσο και από ανόργανο μέρος. Το οργανικό μέρος της αποτελείται κατά 90-95% από κολλαγόνο τύπου I και το υπόλοιπο ποσοστό από μη κολλαγόνες πρωτεΐνες όπως υαλουρονικό οξύ, οστεοποντίνη, οστεοπροτεγερίνη, οστεοκαλσίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη κ.α. Το ανόργανο μέρος της μεσοκυττάριας ουσίας συνιστά περίπου τα 2/3 του βάρους της και αποτελείται κυρίως από ασβέστιο (Ca) και φώσφορο (P), και άλλα στοιχεία σε μικρότερες ποσότητες όπως νάτριο (Na), κάλιο (K) και μαγνήσιο (Mg). Το ανόργανο μέρος είναι οργανωμένο σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ και σε αυτό οφείλεται η σχετική ακαμψία που εμφανίζει ο οστίτης ιστός¹¹.

1.3. Μικροσκοπική και μακροσκοπική δομή του οστού

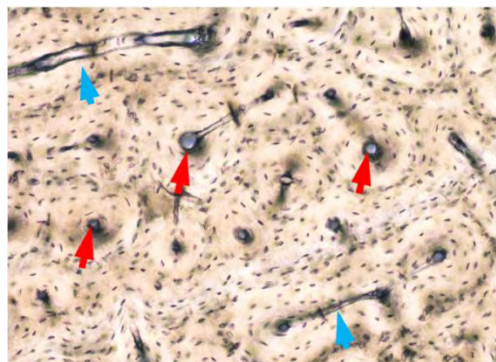
Σε μικροσκοπικό επίπεδο ανάλογα με τον προσανατολισμό των κολλαγόνων ινών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας διακρίνονται δύο μορφές οστού, η **δικτυωτή ή αδρή ινώδης ή άωρος μορφή** και η **πεταλιώδης ή λεπτή ινώδης ή ώριμη μορφή**¹². Η δικτυωτή μορφή χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι τα κολλαγόνα ινίδια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας φέρονται ακανόνιστα και διαπλέκονται μεταξύ τους και με αυτά του περιοστέου. Η μορφή αυτή σχηματίζεται όταν υπάρχει ανάγκη ταχείας εναπόθεση οστού και απαντάται κατά την διάπλαση των οστών στη εμβρυϊκή και βρεφική ηλικία, αλλά και στην ενήλικη ζωή κατά τη διάρκεια της επούλωσης του οστίτη ιστού. Το άωρο δικτυωτό οστό σταδιακά αντικαθίσταται από ώριμο πεταλιώδες οστό, που αποτελεί και την κατεξοχήν μορφή που απαντάται στον ενήλικα. Η πεταλιώδης μορφή οστού χαρακτηρίζεται από οργάνωση των κολλαγόνων ινιδίων σε δεσμίδες οι οποίες διατάσσονται κατά ομάδες, παράλληλα προς συγκεκριμένο επίπεδο, δημιουργώντας φαινομενικές στιβάδες που καλούνται **οστέινα πετάλια** (lamellae). Τα οστέινα πετάλια οργανώνονται σε **βασικές**

μικροκατασκευαστικές μονάδες (basic structural units – **BSU**), που αποτελούν και τις στοιχειώδεις ανατομικές μονάδες του οστού.

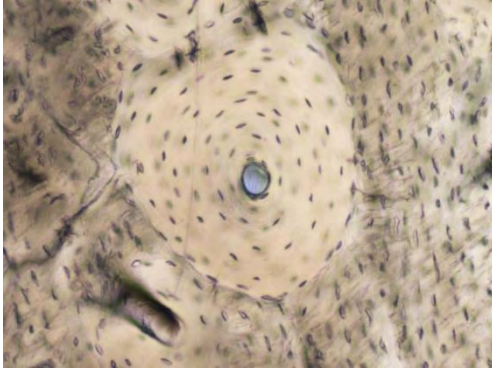
Σε μακροσκοπικό επίπεδο, ανάλογα με τον τρόπο οργάνωσης των BSUs, παρατηρούνται δύο αρχιτεκτονικές μορφές οστού, το **φλοιώδες ή συμπαγές οστό** και το **σπογγώδες ή δοκιδώδες οστό** (Εικ. 5). Το συμπαγές οστό συνιστά κατά κανόνα το εξωτερικό περίβλημα των οστών και η βασική μικροκατασκευαστική του μονάδα είναι ο **οστεώνας** ή **σύστημα του Havers**. Οι οστεώνες αποτελούνται από ομόκεντρες στιβάδες οστικών πεταλίων που διατάσσονται γύρω από ένα κεντρικό κανάλι (κανάλια του Havers) το οποίο περιέχει τροφοφόρα αγγεία (Εικ. 6). Μεταξύ των οστικών πεταλίων βρίσκονται οστικές κοιλότητες όπου εδρεύουν το σώματα των οστεοκυττάρων, ενώ οι αποφυάδες τους πορεύονται εντός των οστικών σωληναρίων. Οι οστεώνες διατάσσονται κατά ομάδες παράλληλα μεταξύ τους κατά τον επιμήκη άξονα του οστού και συνδέονται μεταξύ τους με κάθετα κανάλια (κανάλια του Volkmann) τα οποία επίσης περιέχουν τροφοφόρα αγγεία (Εικ. 6). Ιστολογικά κάθε οστεώνας φαίνεται να αφορίζεται περιφερικά από την ονομαζόμενη **θεμέλια γραμμή**, η οποία χρωματίζεται διαφορετικά διότι αποτελείται από εξωκυτάρια θεμέλια ουσία που στερεείται πλήρως κολλαγόνων ινών¹³ (Εικ. 6 και 7). Το σπογγώδες οστό στερείται οστεώνων και αποτελείται από οστικές δοκίδες ποικίλου σχήμα-



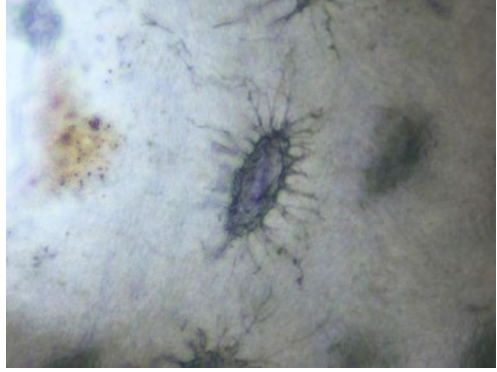
Εικόνα 5. Φλοιώδες (βέλη) και σπογγώδες οστό (αστερίσκοι) σε κατά μέτωπο τομή επίφυσης μηριαίου οστού κονίκλου. Αποξηραμένο παρασκεύασμα.



Εικόνα 6. Κανάλια του Havers (κόκκινα βέλη) και κανάλια Volkmann (γαλάζια βέλη). Απολίθωμα κνήμης ελαφιού (x40)



Εικόνα 7. Οστεώνας. Απολίθωμα κνήμης ελαφιού. (x80)



Εικόνα 8. Οστική κοιλότητα και οστικά σωληνάκια. Απολίθωμα κνήμης ελαφιού. (x100)

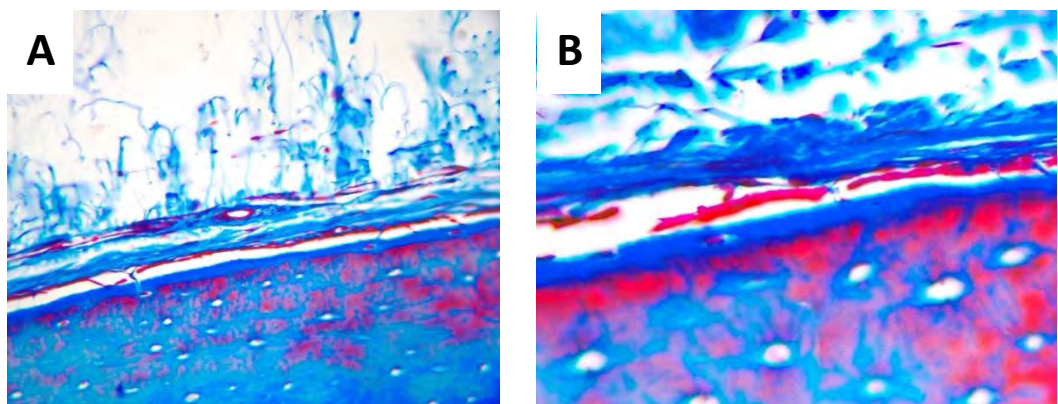
τος και πάχους που φέρονται ακανόνιστα και διασταυρώνονται. Μεταξύ των δοκίδων καταλείπονται χώροι ανώμαλου σχήματος που επικοινωνούν μεταξύ τους και περιέχουν τον μυελό των οστών (**μυελοκυψέλες**). Ως βασικές μικροκατασκευαστικές μονάδες (BSUs) στο σπογγώδες οστό θεωρούνται οι οστικές δοκίδες ή τμήματα αυτών.

1.4. Οστεογένεση

Η διαδικασία διάπλασης και σχηματισμού των οστών καλείται **οστεογένεση**. Ο οστίτης ιστός, όπως ήδη αναφέρθηκε αποτελεί είδος εξειδικευμένου συνδετικού ιστού και σχηματίζεται πάντοτε αντικαθιστώντας κάποια άλλη προϋπάρχουσα μορφή συνδετικού ιστού. Η ανωτέρω διαδικασία καλείται **οστεοποίηση ή οστέωση** (ossification). Ανάλογα με το είδος του προϋπάρχοντος ιστού που αντικαθίσταται διακρίνονται δύο τρόποι οστεοποίησης: η **υμενογενής ή ενδομεμβρανώδης**, κατά την οποία πραγματοποιείται οστέωση προϋπάρχοντος αρχέγονου συνδετικού ιστού (μεσέγχυμα) και η **χονδρογενής ή ενδοχόνδρια** κατά την οποία πραγματοποιείται οστέωση προϋπάρχοντος χόνδρινου υποστρώματος¹⁴. Κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής διάπλασης όλα τα οστά προέρχονται από τον υμενώδη σκελετό που αποτελείται από μεσέγχυμα (υμενώδες στάδιο). Σύντομα, εντός του μεσεγγυματώδους αυτού υποστρώματος αναπτύσσεται χονδρικός ιστός ώστε σταδιακά δημιουργείται ο χόνδρινος σκελετός (χόνδρινο

στάδιο). Προϊούσης της διαπλάσεως και της αυξήσεως των οστών επέρχεται τελικά η αντικατάσταση του χόνδρου από οστίτη ιστό. Κατά την ανωτέρω διαδικασία σε μικροσκοπικό επίπεδο παρατηρείται πρώτα σχηματισμός δικτυωτού και μετέπειτα αντικατάστασή του με πεταλιώδες οστό. Στην πλειονότητα των οστών ακολουθείται η ανωτέρω διαδικασία, δηλαδή η δημιουργία χόνδρινου σκελετού και η σταδιακή αντικατάστασή του με οστίτη ιστό (χονδρογενή οστά). Εξαιρέση αποτελούν τα οστά του κρανίου και η κλείδα, τα οποία φυλογενετικώς είναι αρχαιότερα, και η τελική τους διάπλαση επέρχεται χωρίς την παρουσία του χόνδρινου σταδίου (υμενογενή οστά).

Κατά την υμενογενή οστεοποίηση τα αρχέγονα μεσεγχευματικά κύτταρα που βρίσκονται διάσπαρτα στον συνδετικό ιστό αρχίζουν σταδιακά και δημιουργούν συσσωματώματα. Στη συνέχεια αρχίζει η διαφοροποίησή τους σε οστεοπρογονικά κύτταρα και μετέπειτα σε οστεοβλάστες. Η ομάδα αυτή των οστεοβλαστών δημιουργεί έναν πυρήνα οστέωσης εναποθέτοντας οστεοειδές, το οποίο στη συνέχεια ασβεστοποιείται δημιουργώντας μια αρχική μάζα δικτυωτού οστού. Κατά τη διαδικασία αυτή οι οστεοβλάστες οργανώνονται σε στιβάδα η οποία περιβάλλει τον πυρήνα οστέωσης, ενώ άλλοι εσωκλείονται στο οστεοειδές και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα.



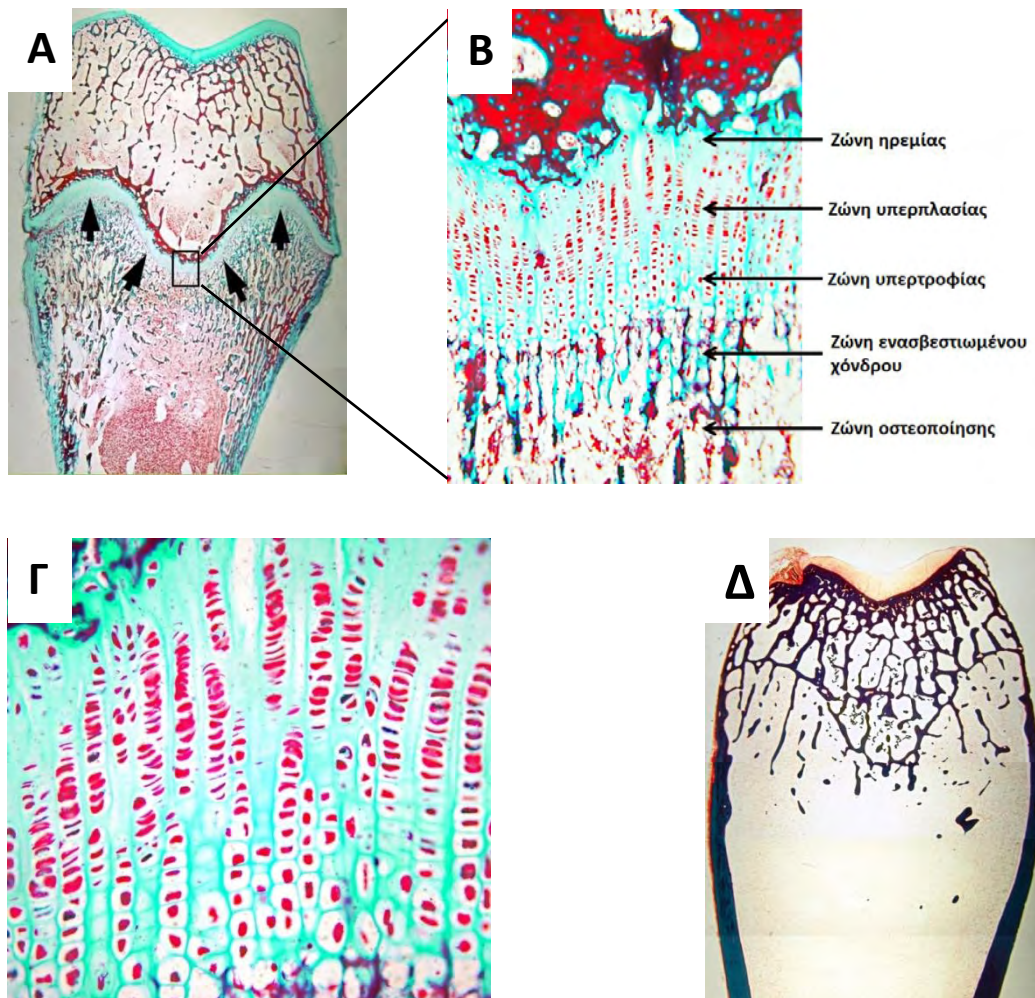
Εικόνα 9. Περίοστεο και στιβάδα οστεοβλαστών που εξυπηρετούν την υμενογενή οστεογένεση. (Masson's trichrome, **A:** x40, **B:** x80)

Κατά την χονδρογενή οστεοποίηση προϋπάρχει ο χόνδρινος σκελετός ο οποίος αποτελεί το ικρίωμα στο οποίο θα αρχίσει η οστεοποίηση. Ο χόνδρινος σκελετός αυξάνει σε μέγεθος με το συνεχή πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων μέσα στη μάζα του, με την ανάπτυξη χονδροβλαστών από το περιχόνδριο που περιβάλλει τον σκελετό, αλλά και την περαιτέρω έκκριση μεσοκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η οστεοποίηση ξεκινά από το μέσο της διάφυσης (πρωτογενής πυρήνας οστέωσης), όπου το περιχόνδριο μετατρέπεται σε περίοστεο. Το περίοστεο παρέχει στιβάδα αρχέγονων μεσεγγυματικών κυττάρων τα οποία μετατρέπονται σε οστεοβλάστες που αρχίζουν την εναπόθεση οστού δημιουργώντας ένα οστικό δακτύλιο (περίοστεος οστέωση). Στα μετακάρπια και μετατάρσια οστά, στις φάλαγγες και στις πλευρές εμφανίζεται μόνο πρωτογενής πυρήνας οστέωσης. Αντίθετα τα μακρά οστά, κατά την ανάπτυξή τους, εμφανίζουν άλλους δύο πυρήνες οστέωσης (δευτερογενείς) αντίστοιχα εντός του χόνδρου των επιφύσεων τους (**συζευκτικός χόνδρος**). Στα δευτερογενείς πυρήνες οστέωσης τα χονδροκύτταρα γίνονται υπερτροφικά και διατάσσονται σε παράλληλους επιμήκεις στοίχους. Τα χονδροκύτταρα που βρίσκονται από την πλευρά της διάφυσης σταδιακά εκφυλίζονται, αποπιτανώνονται και αντικαθίστανται από οστίτη ιστό (ενδοχόνδριος οστέωση). Αντίθετα, από την πλευρά των επιφύσεων παρατηρείται συνεχής πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση των οστών. Ο χόνδρος αυτός, μεταξύ του πρωτογενούς και του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης, καλείται αυξητική ή επιφυσιακή πλάκα και διατηρείται μέχρι το πέρας της ανάπτυξης, οπότε και οστεοποιείται (**Εικ. 10**). Κατά την ενδοχόνδρια οστέωση στις επιφύσεις των μακρών οστών, διακρίνονται ιστολογικά πέντε ζώνες:

- α) Η **ζώνη ηρεμίας**, η οποία περιέχει φυσιολογικό υαλοειδή χόνδρο.
- β) Η **ζώνη υπερπλασίας** όπου τα χονδροκύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως και σχηματίζουν παράλληλους επιμήκεις στοίχους.
- γ) Η **ζώνη υπερτροφίας**, όπου τα χονδροκύτταρα εμφανίζονται εξοιδημένα, περιέχουν μεγάλες ποσότητες γλυκογόνου και αρχίζουν να εκκρίνουν αλκαλική φωσφατάση.

δ) Η **ζώνη ενασβεστιωμένου (ή αποπιτανωμένου) χόνδρου**, όπου τα χονδροκύτταρα εκφυλίζονται και αποπίπτουν εγκαταλείποντας κοιλότητες εντός των οποίων εισέρχονται οστεοπρογονικά κύτταρα.

ε) Η **ζώνη οστεοποίησης** όπου τα οστεοπρογονικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες που αρχίζουν την εναπόθεση νέου οστού.



Εικόνα 10. Ενδοχόνδριος οστεογένεση. **A-B:** Ιστολογική τομή επίφυσης μηριαίου κονίκλου, όπου διακρίνεται ο συζευκτικός χόνδρος της αναπτυξιακής πλάκας και μεγαλύτερη μεγέθυνση της αναπτυξιακής πλάκας όπου διακρίνονται οι διάφορες ζώνες ενδοχόνδριας οστεοποίησης, **Γ:** Μεγαλύτερη μεγέθυνση του συζευκτικού χόνδρου όπου διακρίνονται διατεταγμένα τα χονδροκύτταρα σε διαφορετικά στάδια εκφύλισης, **Δ:** Ιστολογική τομή επίφυσης μηριαίου κονίκλου μετά το πέρας της ανάπτυξης, οπότε έχει επέλθει πλήρης οστεοποίηση του συζευκτικού χόνδρου. (Gomori's trichrome, A: x2,5, B: x40, Γ: x80, Δ: x2,5).

1.5. Οστική ανακατασκευή ή αναδιαμόρφωση (remodeling)

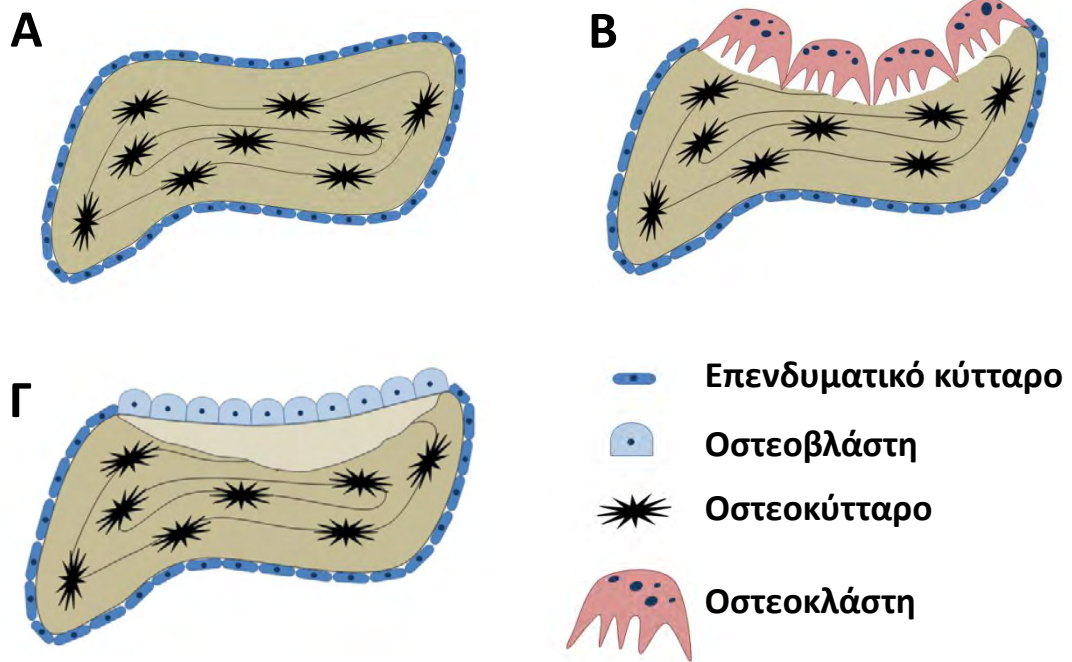
Η οστική αναδιαμόρφωση αποτελεί διαδικασία ανανέωσης και αντικατάστασης των βασικών μικροκατασκευαστικών μονάδων του οστού. Η διαδικασία αυτή γίνεται με τη μετάπτωση της βασικής μικροκατασκευαστικής μονάδας σε **βασική πολυκυτταρική ή μεταβολική μονάδα του οστού (basic multicellular or metabolic unit – BMU)**, και διαφέρει μερικώς μεταξύ συμπαγούς και σπογγώδους οστού. Η οστική αναδιαμόρφωση λαμβάνει χώρα στις εσωτερικές και εξωτερικές επιφάνειες του οστού, δηλαδή στο περίοστεο και το ενδόστεο, καθώς επίσης και εντός της συμπαγούς μάζας του φλοιώδους οστού.

Ο κύκλος της οστικής αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνει πέντε φάσεις¹⁵⁻¹⁸:

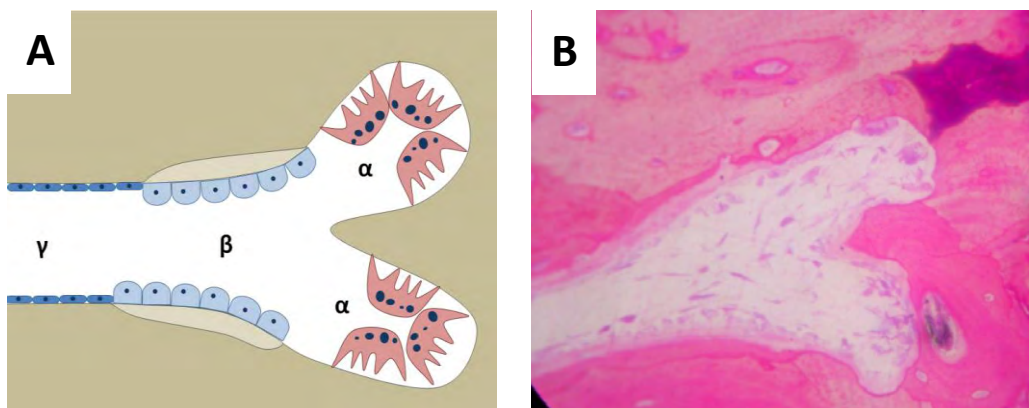
α) **Φάση ηρεμίας**: στη φάση αυτή η επιφάνεια του οστού επιστρώνεται από επενδυματικά κύτταρα τα οποία είναι ανενεργά.

β) **Φάση ενεργοποίησης**: στη φάση αυτή στρατολογούνται αρχέγονα αιμοποιητικά της σειρά των μονοπύρηνων/μακροφάγων από την κυκλοφορία, τα οποία συντηκόμενα σχηματίζουν πολυπύρηννα κύτταρα (προ-οστεοκλάστες). Τα κύτταρα αυτά συνδέονται στην επιφάνεια του οστού που πρόκειται να απορροφηθεί και διαφοροποιούνται περαιτέρω προς οστεοκλάστες. Η φάση αυτή διαρκεί 5-7 ημέρες.

γ) **Φάση απορρόφησης**: στη φάση αυτή υπό τη δράση των οστεοκλαστών αποδομείται τόσο το ανόργανο μέρος του οστού με την απελευθέρωση H^+ όσο και το οργανικό μέρος υπό την επίδραση πρωτεασών όπως η καθεψίνη K και διάφορες μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας. Στο σπογγώδες οστό η απορρόφηση συντελείται στις επιφάνειες των οστικών δοκίδων και διαρκεί 3-4 εβδομάδες (**Εικ. 11**). Αντίθετα, στο φλοιώδες οστό οι οστεοκλάστες δημιουργούν ένα μέτωπο απορρόφησης που πορεύεται εντός της μάζας του οστού (**τέμνων κώνος**), τέμνοντας τα συμπαγή συστήματα του Havers (**Εικ. 12**). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται εντός του οστού σπυραγγώδεις σχηματισμοί, ενίοτε διακλαδιζόμενοι, στην εσωτερική επιφάνεια των οποίων προπορεύονται οι οστεοκλάστες και ακολουθεί στιβάδα οστεοβλαστών που εναποθέτουν νέο οστό. Στο φλοιώδες οστό η φάση αυτή διαρκεί 6-10 εβδομάδες.



Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση οστικής αναδιαμόρφωσης σε διατομή δοκίδας του σπογγώδους οστού. **A:** Φάση ηρεμίας, **B:** Φάση απορρόφησης, **Γ:** Φάση παραγωγής.



Εικόνα 12. Τέμνοντες κώνοι στο φλοιώδες οστό. **A:** Σχηματική παράσταση όπου διακρίνονται οι περιοχές: (α) σε φάση απορρόφησης, (β) σε φάση παραγωγής και (γ) σε φάση ηρεμίας. **B:** Αντίστοιχη ιστολογική εικόνα (Τολουιδίνη-Βασική φουξίνη, x80).

δ) **Φάση αναστροφής:** στη φάση αυτή οι οστεοκλάστες αποσυνδέονται από την επιφάνεια απορρόφησης και επιστρατεύονται αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες οι οποίες εναποθέτουν το νέο οστό. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτή η κυτταρική αναστροφή οπότε και πραγματοποιείται η σύζευξη μεταξύ οστεοκλαστικής και οστεοβλαστικής δραστηριότητας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Φαίνεται πάντως ότι πρόδρομα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς συνδέονται στην επιφάνεια του οστού και εναποθέτουν ένα στρώμα ανόργανο μη-κολλαγονούχο στρώμα (**θεμέλια γραμμή**) το οποίο προάγει τη συγκόλληση των οστεοβλαστών¹⁹. Η φάση αυτή μπορεί να διαρκέσει από λίγες ημέρες έως 4-5 εβδομάδες.

ε) **Φάση παραγωγής:** στη φάση αυτή οι οστεοβλάστες παράγουν προοδευτικά νέο οστό, σχηματίζοντας πρώτα το οστεοειδές και στη συνέχεια εναποθέτοντας σε αυτό κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Καθώς η διαδικασία προχωράει το μέγεθος και ο αριθμός των κρυστάλλων που έχουν εναποτεθεί ανάμεσα στις ίνες του κολλαγόνου αυξάνει, ενώ παράλληλα διευθετείται και ο προσανατολισμός τους. Μετά την ολοκλήρωση της φάσης αυτής, οι οστεοβλάστες που δεν έχουν εγκλειστεί στο νέο οστό ώστε να μετατραπούν σε οστεοκύτταρα, μετατρέπονται σε πεπλατυσμένα επενδυματικά κύτταρα και η βασική πολυκυτταρική μονάδα επανέρχεται στη φάση της ηρεμίας. Η φάση της παραγωγής νέου οστού διαρκεί 2-3 μήνες στο σπογγώδες οστό και 4-5 μήνες στο φλοιώδες οστό.

Η οστική αναδιαμόρφωση απαιτεί τη λειτουργική σύζευξη μεταξύ δύο κυτταρικών σειρών, των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, και κατ' επέκταση της απορρόφησης και εναπόθεσης του οστού. Η ισορροπημένη συνεργασία των δύο αυτών κυτταρικών σειρών αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο της ομοιοστασίας των οστών. Η ρύθμιση της οστικής αναδιαμόρφωσης επιτυγχάνεται με την πολύπλοκη συνεργασία τόσο συστηματικών ενδοκρινικών παραγόντων (παραθορμόνη, βιταμίνη D, καλσιτονίνη κ.α.) όσο και τοπικών παρακρινικών και αυτοκρινικών παραγόντων (σύστημα OPG-RANK-RANKL, TGF-β, TNF-α, IL1, -4, -6 κ.α.).

1.6. Επουλωτικές εξεργασίες του οστίτη ιστού

Διάφορες τραυματικές κακώσεις στον οστίτη ιστό μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβες που μπορεί να κυμαίνονται από απλό ρωγμώδες κατάγμα έως επιπλεγμένα συντριπτικά κατάγματα που μπορεί να συνοδεύονται από απώλεια ιστού εγκαταλείποντας οστικά ελλείμματα διαφόρων μεγεθών. Η επιστημονική έρευνα των τελευταίων δεκαετιών έχει αποκαλύψει ότι ο οστίτης ιστός μπορεί να επουλωθεί με διαφορετικούς τρόπους κάθε φορά, συναρτήσει διαφόρων παραγόντων σημαντικότεροι από τους οποίους είναι η εμβρυολογική προέλευση (υμενογενή ή χονδρογενή οστά), το μέγεθος διάκενου ή οστικού ελλείμματος μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων του οστού, αλλά και ο βαθμός ακινητοποίησής τους. Διακρίνονται δύο μορφές επούλωσης, η **πρωτογενής ή άμεση** και η **δευτερογενής ή έμμεση**²⁰.

Η πρωτογενής επούλωση επιτυγχάνεται όταν υπάρχει πλήρης ανατομική ανάταξη του κατάγματος και απόλυτα σταθερή και στενή σχέση μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων του οστού. Στην περίπτωση αυτή η επούλωση του κατάγματος επέρχεται χωρίς την προηγούμενη δημιουργία ινοχόνδρινου συνδετικού ιστού (**πύρωσ**)²¹. Η μορφή αυτή επούλωσης είναι σπάνια καθώς είναι αρκετά δύσκολη η επίτευξη των ανωτέρω προϋποθέσεων στην κλινική πράξη. Η πρωτογενής επούλωση διακρίνεται περαιτέρω σε δύο μορφές:

α) **Επούλωση επαφής**: αυτή παρατηρείται όταν η απόσταση μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων είναι μικρότερη του 0,01 mm και η μεταξύ τους τάση μικρότερη του 2%. Στην περίπτωση αυτή οι τέμνοντες κώνοι διασταυρώνονται μεταξύ των κολοβωμάτων στο φλοιώδες οστό και καθώς προχωρά η οστική αναδιαμόρφωση και η παραγωγή νέου οστού και η δημιουργία νέων οστεώνων, επέρχεται τελικά η επανασυγκόλληση και η συνέχεια στο οστό. Με τον τρόπο αυτό επέρχεται η επούλωση μόνο μέσω της οστικής ανακατασκευής και της απευθείας εναπόθεσης πεταλιώδους οστού.

β) **Επούλωση διάκενου**: η μορφή αυτή παρατηρείται όταν η απόσταση μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων είναι 800 μm με 1 mm. Στην περίπτωση αυτή στο διάκενο πληρούται με πήγμα αίματος και στη συνέχεια παρατηρείται

μετανάστευση αρχέγονων μεσεγγυματικών κυττάρων που διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες που εναποθέτουν άωρο δικτυωτό οστό. Στη συνέχεια με τη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης το αρχικό αυτό οστό αντικαθίσταται από ώριμο πεταλιώδες οστό.

Η δευτερογενής ή έμμεση μορφή οστικής επούλωσης παρατηρείται όταν δεν υπάρχει ιδιαίτερα σταθερή ακινητοποίηση των κατεαγόντων τμημάτων και αποτελεί την πιο συχνή μορφή επούλωσης στα μακρά οστά. Η όλη διαδικασία περιγράφεται ότι περιλαμβάνει τρία έως πέντε στάδια. Στην παρούσα διατριβή θα χρησιμοποιηθεί η περιγραφή των τριών φάσεων, οι οποίες έχουν ως εξής:

α) **Φλεγμονώδης φάση:** Αμέσως μετά τον τραυματισμό εκλύεται η φλεγμονώδης απάντηση που κορυφώνεται εντός 48 ωρών και εξαλείφεται τελείως σε μια περίπου εβδομάδα μετατραυματικά. Το τραύμα πληρούται αρχικά με αίμα από τα τραυματισμένα αγγεία της περιοχής και εκλύεται ο μηχανισμός της αιμόστασης. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και συγκολλώνται προκειμένου να δημιουργηθεί ο πρωτογενής θρόμβος. Ταυτόχρονα η έκκριση κυτοκινών από τα κοκκία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων προκαλούν την χημειοταξία των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των μακροφάγων, τα οποία διηθούν το οργανωμένο πήγμα αίματος. Το πήγμα σχηματίζεται στη μυελική κοιλότητα, μεταξύ των οστικών κατεαγόντων τμημάτων και κάτω από το περίοστεο το οποίο υπεγείρεται. Το οργανωμένο πλέγμα της ινικής του αιματικού πηγματος αποτελεί το ικρίωμα πάνω στο οποίο μεταναστεύουν μετέπειτα τα αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα.

β) **Φάση επανόρθωσης:** Η φάση αυτή ξεκινά εντός μερικών ημερών από τον τραυματισμό και πριν την ολοκλήρωση της προηγούμενης φάσης, και διαρκεί μερικές εβδομάδες. Στη φάση αυτή το αιμόπηγμα αρχίζει σταδιακά να αντικαθίσταται από κοκκιώδη συνδετικό ιστό ο οποίος είναι πλούσιος σε νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία. Στη συνέχεια η μετατροπή του κοκκιώδους ιστού σε οστό θα πραγματοποιηθεί είτε με υμενογενή είτε με ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Η υμενογενής οστεοποίηση παρατηρείται στην περιοχή που βρίσκεται αμέσως κάτω από το περίοστεο, όπου νέο οστό εναποτίθεται από τη

στιβάδα των οστεοβλαστών και σχηματίζει τον **σκληρό πώρο**. Αντίθετα πιο κεντρικά στον κοκκιώδη ιστό αρχίζουν να εμφανίζονται χονδροκύτταρα το οποία δημιουργούν τον μαλακό πώρο, και ο οποίος στη συνέχεια θα οστεοποιηθεί με τη διαδικασία την ενδοχόνδριας οστεογένεσης, ακριβώς όπως συμβαίνει στην με την οστεοποίηση του συζευκτικού χονδρού κατά την ανάπτυξη. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται η σταδιακή πλήρωση με άωρο δικτυωτό οστό.

γ) **Φάση αναδιαμόρφωσης**: Στη φάση αυτή, με την επίδραση των οστεοκλαστών παρατηρείται σταδιακή απορρόφηση του άωρου δικτυωτού οστού και αντικατάστασή του με ώριμο πεταλιώδες, ενώ παράλληλα επέρχεται και η αποκατάσταση του μακροσκοπικού σχήματος του οστού²².

Σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το ανωτέρω μοντέλο δευτερογενούς επούλωσης με τη δημιουργία ινοχόνδρινου ιστού παρατηρείται στα μακρά οστά που είναι χονδρογενή και προέρχονται εμβρυολογικά από το μεσόδερμα. Αντίθετα, στα οστά του κρανίου που είναι υμενογενή και προέρχονται από την νευρική ακρολοφία δεν παρατηρείται ο σχηματισμός χόνδρου²³⁻²⁵. Στα οστά αυτά η επούλωση επέρχεται με αντικατάσταση το κοκκιώδους και ινώδους συνδετικού ιστού με άωρο δικτυωτό οστό και στη συνέχεια με δημιουργία ώριμου οστού με τη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης. Μάλιστα, οι Quarto και συν.²⁶ παρατήρησαν ότι οι οστεοβλάστες που προερχόταν από την νευρική ακρολοφία σε οστικά ελλείμματα κρανίου εμφάνιζαν ανώτερη οστεοαναγεννητική ικανότητα από τις οστεοβλάστες που προερχόταν από το μεσόδερμα στα μακρά οστά^{27, 28}. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι οι οστεοβλάστες που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία παράγουν περισσότερο ενασβεστιωμένο ιστό και προάγουν την εναπόθεση περισσότερου οστού σε σχέση με τις οστεοβλάστες που προέρχονται από το μεσόδερμα. Ωστόσο, οι Lim και συν. παρατήρησαν ότι τα κυκλικά οστικά ελλείμματα στην κνήμη παρουσιάζουν ταχύτερο ρυθμό οστικής αναγέννησης σε σχέση με τα οστικά ελλείμματα κρανίου. Οι Βέης και συν.²⁹ με ειδική πειραματική διάταξη σε οστικά ελλείμματα κνήμης κουνελιών έδειξαν ότι το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς στην άφθονη παρουσία μυελού των οστών σε αυτού του είδους τα ελλείμματα, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο

στην οστική αναγέννηση της περιοχής. Επιπλέον, οι Fujii και συν.³⁰ παρατήρησαν ότι το περίοστεο της κνήμης εμφανίζει μεγαλύτερη οστεογενετική ικανότητα, εναποθέτοντας περισσότερο νέο οστό από το περίοστεο του κρανίου.

Σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι σημαντικός παράγοντας για τον τρόπο με τον οποίο θα επέλθει η οστική επούλωση είναι η απόσταση μεταξύ των δύο κατεαγόντων τμημάτων. Σε αρκετές περιπτώσεις τραυματισμών ωστόσο, όπου υπάρχει εκτεταμένη απώλεια οστίτη ιστού και παρουσία μεγάλων οστικών ελλειμμάτων, ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να το αναπληρώσει εξ' ολοκλήρου με νέο οστό, αλλά γεφυρώνει το έλλειμμα με ινώδη συνδετικό ιστό³¹. Η δυσμενής αυτή εξέλιξη οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων. Αρχικά, στα μεγάλα οστικά ελλείμματα υπάρχει καθίζηση του περιοστέου και των υπολοίπων μαλακών μορίων προς τον χώρο που προηγουμένως καταλάμβανε ο οστίτης ιστός, μη επιτρέποντας τη διατήρηση της αρχικής αρχιτεκτονικής του οργάνου. Επιπλέον, στα μεγάλα οστικά ελλείμματα ο χώρος γεμίζει με πήγμα αίματος που στη συνέχεια θα αντικατασταθεί από κοκκιώδη συνδετικό ιστό, ο οποίος τελικώς αντικαθίσταται με ινώδη συνδετικό ιστό και όχι με οστό διότι δεν υπάρχει επαρκής τροφοδότηση σε αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες. Τα ανωτέρω γεννούν εύλογα το ερώτημα για το ποιο είναι το κρίσιμο μέγεθος του ελλείμματος το οποίο δεν καταφέρνει τελικώς να πληρωθεί πλήρως με οστίτη ιστό εάν αφευθεί προς αυθόρμητη επούλωση. Το ερώτημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό τόσο για την κλινική πράξη, όσο και για την έρευνα, όπου υπάρχει ανάγκη για τυποποίηση των πειραματικών μοντέλων προκειμένου να οδηγούν σε αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην κλινική πράξη η γνώση του μεγέθους του ελλείμματος που δεν είναι ικανό να επουλωθεί αυθόρμητα και χωρίς περαιτέρω παρέμβαση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιλογή της ενδεδειγμένης θεραπευτικής μεθόδου.

Το 1986 οι οδοντίατροι Schmitz και Hollinger³² πρότειναν έναν ορισμό, σύμφωνα με τον οποίο έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους θα πρέπει να θεωρείται «*το μικρότερο μέγεθος ενδο-οστικού τραύματος σε ένα συγκεκριμένο τύπο οστού και*

σε συγκεκριμένο ζωικό είδος, στο οποίο δεν θα καταστεί δυνατή η πλήρης αυθόρμητη επούλωσή του καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ζώου». Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές έχουν ασκήσει κριτική με τον αρχικό αυτό ορισμό του κρίσιμου μεγέθους οστικού ελλείμματος, καθώς οι περισσότερες μελέτες δεν επεκτείνονται χρονικά σε όλη της διάρκεια της ζωής του εργαστηριακού ζώου. Έτσι, με την πάροδο των ετών οι περισσότεροι ερευνητές συμπεριλαμβάνουν στον ορισμό και τον παράγοντα «χρόνο». Έτσι θεωρείται ότι κρίσιμου μεγέθους έλλειμμα είναι αυτό που δεν θα έχει πλήρως επουλωθεί σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Βέβαια, στην υποθετική περίπτωση ενός πολύ μικρού ελλείμματος που θα μελετηθεί σε αρκετά σύντομο διάστημα (πχ. μιας ώρας) μπορεί να θεωρηθεί κρίσιμου μεγέθους σύμφωνα με τον ανωτέρω ορισμό; Για παράδειγμα, οι Homma και συν.³³ διαπίστωσαν σε επίμυες ότι ανεξαρτήτως του μεγέθους του οστικού ελλείμματος η κορύφωση των επουλωτικών διεργασιών επέρχεται στις 4 εβδομάδες μετεγχειρητικά, οπότε και σταδιακά επιβραδύνονται και έχουν πλήρως ολοκληρωθεί στις 24 εβδομάδες. Συνεπώς, χρειάζεται τυποποίηση του χρόνου κατά τον οποίο διαρκούν οι επουλωτικές διαδικασίες έχοντας σαν δεδομένο τον τύπο και την ανατομική περιοχή του τραυματισμένου οστού, το ζωικό είδος, την ηλικία του ζώου και το μέγεθος του ελλείμματος.

Για τους ανωτέρω λόγους προτείνουμε τον εξής ορισμό: **«Οστικό έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους, σε δεδομένο οστό και ζωικό είδος, θεωρείται το μικρότερο μέγεθος ελλείμματος που δεν έχει την ικανότητα να επουλωθεί πλήρως με οστίτη ιστό, τόσο όσον αφορά στη γεφύρωση όσο και στην αποκατάσταση των αρχικών ανατομικών διαστάσεων, μετά το πέρας της χρονικής περιόδου που φυσιολογικά απαιτείται για την ολοκλήρωση των επουλωτικών διεργασιών».**

1.7. Οστεοενσωμάτωση

Η χειρουργική τοποθέτηση μεταλλικών εμφυτευμάτων στον οστίτη ιστό για την ακινητοποίηση καταγμάτων, την αποκατάσταση αρθρώσεων ή την αντικατάσταση απωλεσθέντων οδόντων εφαρμόζεται για περισσότερα από 150 χρόνια³⁴. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα έως τα μέσα του 20^{ου} αιώνα

χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υλικά όπως το ανοξειδωτο ασάλι, το κράμα βαναδίου-σιδήρου, ο στελλίτης (κράμα χρωμίου-κοβαλτίου), το μολυβδαίνιο, το Vitallium (κράμα χρωμίου-νικελίου) κ.α.³⁵. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα των ανωτέρω υλικών ήταν η αποτυχία πλήρους βιολογικής ενσωμάτωσης με το οστό, γεγονός που οδηγούσε σε σύντομη αφαίρεσή τους μετά την εξυπηρέτηση του αρχικού τους σκοπού. Τα υλικά αυτά εμφυτευόμενα στον οστίτη ιστό προκαλούσαν εν τέλει χρόνια αντίδραση ξένου σώματος και σταδιακά περιχαράκωνονταν από ινώδη κάψα, γεγονός που οδηγούσε σε έλλειψη στερεής σύνδεσης μεταξύ οστού και εμφυτεύματος.

Το 1940, κατά τη διάρκεια της λαίλαπας 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου, οι Bothe και συν.³⁶ παρατήρησαν για πρώτη φορά ότι το τιτάνιο έχει την τάση να «συνδέεται» με το οστό και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως προσθετικό υλικό. Μια δεκαετία αργότερα ο Leventhal GS³⁷ τοποθετώντας βίδες τιτανίου στο μηριαίο οστό επίμυων παρατήρησε ότι με την πάροδο των μετεγχειρητικών εβδομάδων οι βίδες ήταν όλο και πιο δύσκολο να αφαιρεθούν, ενώ επεσήμανε ιστολογικά την απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης από το οστό. Την ίδια περίοδο (1952) ο σουηδός ορθοπαιδικός Per-Ingvar Brånemark διεξήγαγε μια μελέτη όπου χρησιμοποιούσε ειδικούς σωληνωτούς θαλάμους κατασκευασμένους από τιτάνιο, τους οποίους εμφύτευε στην κνήμη κουνελιών προκειμένου να μελετήσει την αιματική κυκλοφορία για τις ανάγκες της διδακτορικής του διατριβής. Ο Brånemark παρατήρησε και αυτός ότι οι θάλαμοι από τιτάνιο αποκτούσαν ισχυρή σύνδεση με το οστό που καθιστούσε αδύνατη την αφαίρεσή τους, ονομάζοντας το φαινόμενο «**οστεοενσωμάτωση**». Στον **Πίνακα 1** παραθέτονται διάφοροι ορισμοί της οστεοενσωμάτωσης, όπως έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς. Ο Brånemark, αν και ορθοπαιδικός, διείδε ότι η ιδιότητα αυτή του τιτανίου θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην αποκατάσταση των απολεσθέντων δοντιών δημιουργώντας ένα σύστημα ενδοοστικής «αγκύρωσης» στις γνάθους το οποίο θα ήταν ικανό να στηρίζει οδοντικές προθέσεις³⁸. Το 1965, ο Brånemark, ως καθηγητής ανατομίας στο Πανεπιστήμιο Gothenburg της Σουηδίας, τοποθετεί τα πρώτα οστεοενσωματούμενα οδοντικά εμφυτεύματα σε ασθενή. Ο ασθενής ήταν ο

Πίνακας 1. Διάφοροι ορισμοί της «οστεοενσωμάτωσης».

«Η άμεση δομική και λειτουργική σύνδεση μεταξύ ζώντος οστού και της επιφάνειας ενός εμφυτεύματος που φέρει δυναμική φόρτιση»

Brånemark και συν. 1977³⁹

«Το φαινόμενο της επίτευξης κλινικά ασυμπτωματικής στερεής σύνδεσης ενός αλλοπλαστικού υλικού και η διατήρηση αυτού στο οστό κατά τη διάρκεια εφαρμογής λειτουργικών φορτίσεων.»

Zarb & Albertsson 1991⁴⁰

«Η φαινομενικά άμεση σύνδεση ή συγκόλληση του οστίτη ιστού με κάποιο αδρανές αλλοπλαστικό υλικό χωρίς την παρεμβολή ινώδους συνδετικού ιστού»

The Glossary of Prosthodontic Terms 9th ed. 2017⁴¹

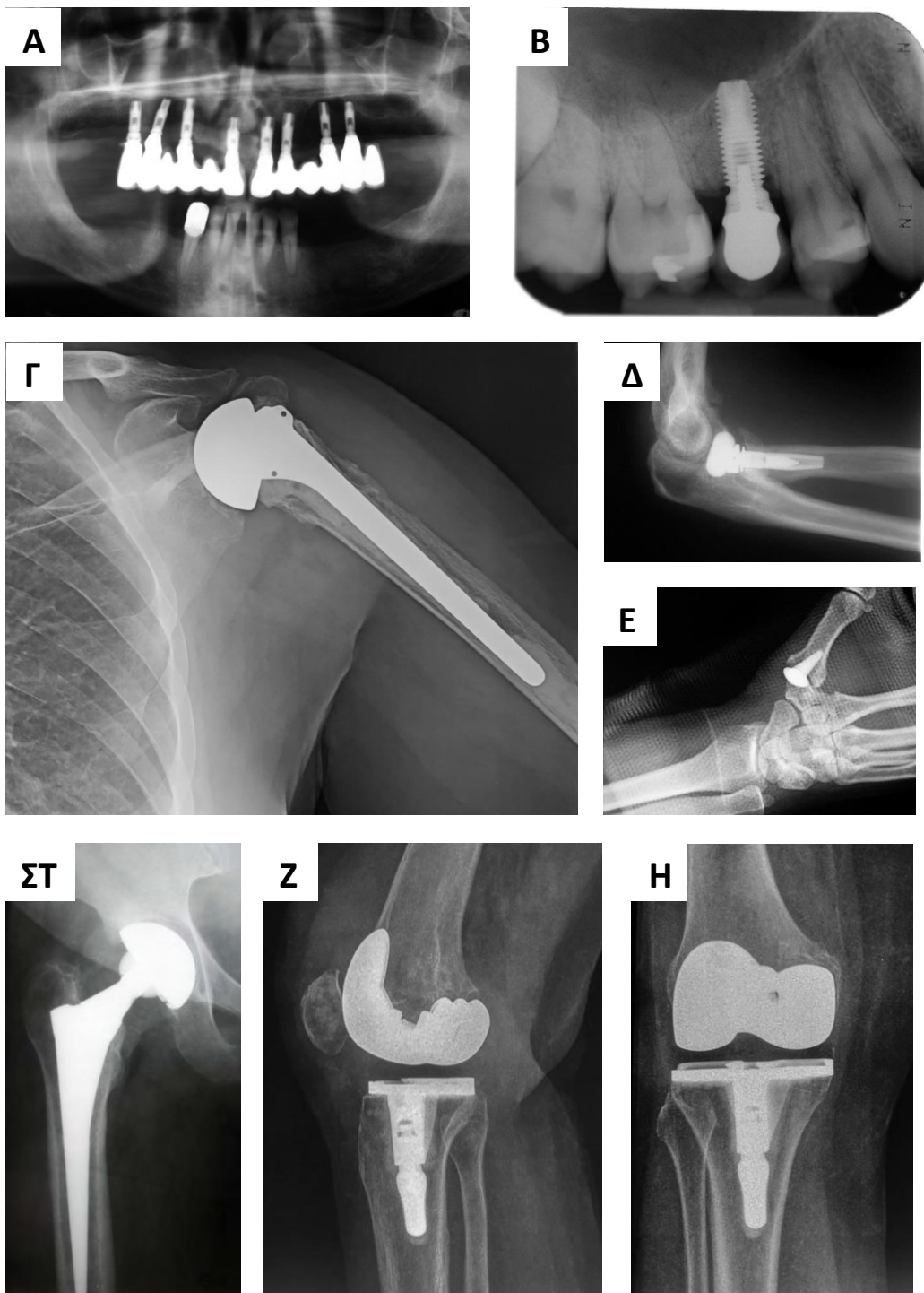


Εικόνα 13. A: Ο ασθενής G. Larsson (αριστερά) και ο καθηγητής P.I. Brånemark (δεξιά), **B:** Απόκομμα από τη σουηδική εφημερίδα Göteborgs - Tidningen (GT), όπου ασθενής περιγράφει την εμπειρία και τη χαρά του για τα νέα του δόντια που στηρίζονται σε οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα.

Gösta Larsson (**Εικ. 13**), ο οποίος είχε μεγάλο συγγενές οστικό έλλειμμα οφειλόμενο σε υπερωϊσοχιστία. Στον Larsson τοποθετήθηκαν εμφυτεύματα τιτανίου στις γνάθους του ώστε να καταστεί δυνατή η στήριξη μιας ολικής οδοντοστοιχίας που ταυτόχρονα λειτουργούσε και ως αποφρακτήρας της υπερώας. Ο Gösta Larsson πέθανε σαράντα χρόνια αργότερα, το 2005, έχοντας ακόμα τα εμφυτεύματα στις γνάθους του εν λειτουργία⁴². Παρόλο που η αρχική εφαρμογή της «οστεοενσωμάτωσης» έγινε στα οδοντικά εμφυτεύματα πολύ σύντομα πέρασε και σε εφαρμογές στην ορθοπαιδική⁴³. Στην ορθοπαιδική η διαδικασία της άμεσης λειτουργικής σύνδεσης του τιτανίου με το οστό μπορούσε να βρει πλείστες εφαρμογές για συνδέσεις προσθετικών μελών χωρίς την ανάγκη οστικού τσιμέντου (**Εικ. 14**).

Το φαινόμενο της «οστεοενσωμάτωσης» προσομοιάζει αρκετά με τη διαδικασία της άμεσης οστικής επούλωσης με διάκενο, και ακολουθεί τα ίδια στάδια που περιγράφηκαν ανωτέρω. Η διαδικασία τοποθέτησης ενός ενδοοστικού εμφυτεύματος περιλαμβάνει την δημιουργία μιας εσοχής στη δέκτρια περιοχή του οστού που θα υποδεχθεί το εμφύτευμα με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται η κατά το δυνατό στενή επαφή μεταξύ επιφάνειας του εμφυτεύματος και του οστού. Η διαδικασία της οστεοενσωμάτωσης περιγράφεται κλασικά σε τέσσερις φάσεις:

α) **Φάση της αιμόστασης**: Λαμβάνει χώρα τις πρώτες ώρες μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος⁴⁴. Η παρασκευή του οστικού φρεατίου από το τρυπάνι έχει δημιουργήσει τραυματισμό του οστού και κατ' επέκταση αιμορραγία στην περιοχή του τραύματος. Έτσι τη στιγμή της τοποθέτησης του εμφυτεύματος η οπή υποδοχής του έχει πληρωθεί με αίμα από τα τραυματισμένα τριχοειδή. Η διαδικασία της αιμόστασης ξεκινά με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα οποία συγκολλώνται και συσσωρεύονται προκειμένου να δημιουργήσουν τον αρχικό αιμοπεταλιακό θρόμβο. Ταυτόχρονα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν από τα κοκκία τους διάφορα μόρια στην περιοχή του τραύματος, όπως θρομβοξάνη (η οποία προάγει τη συγκόλληση κι άλλων αιμοπεταλίων) ή αυξητικούς παράγοντες όπως PDGF (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας) που προάγει τον πολλα-



Εικόνα 14. Διάφορα μεταλλικά ενδοοστικά εμφυτεύματα. **A-B:** οδοντικά εμφυτεύματα, **Γ:** ημιολική αρθροπλαστική ώμου, **Δ:** εμφύτευμα κεφαλής κερκίδας, **Ε:** αρθροπλαστική πολυγωνομετακαρπίου, **ΣΤ:** ολική αρθροπλαστική ισχίου, **Ζ-Η:** ολική αρθροπλαστική γόνατος.

πλασιασμό των ινοβλαστών⁴⁵. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η δευτερογενής αιμόσταση, δηλαδή ο καταρράκτης της πήξης του αίματος. Αποτέλεσμα της πήξης του αίματος είναι ο πολυμερισμός του ινώδους και η δημιουργία του πλέγματος της ινικής που αποτελεί ένα προσωρινό ικρίωμα για την μετανάστευση διαφόρων κυττάρων που λαμβάνουν μέρος στις επακόλουθες επουλωτικές διαδικασίες. Σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι οι αδροποιημένες επιφάνειες του τιτανίου προάγουν την προσκόλληση μεγαλύτερης ποσότητας ινικής επάνω τους, στοιχείο στο οποίο αποδίδεται η αυξημένη οστεοεπαγωγική τους δράση⁴⁶.

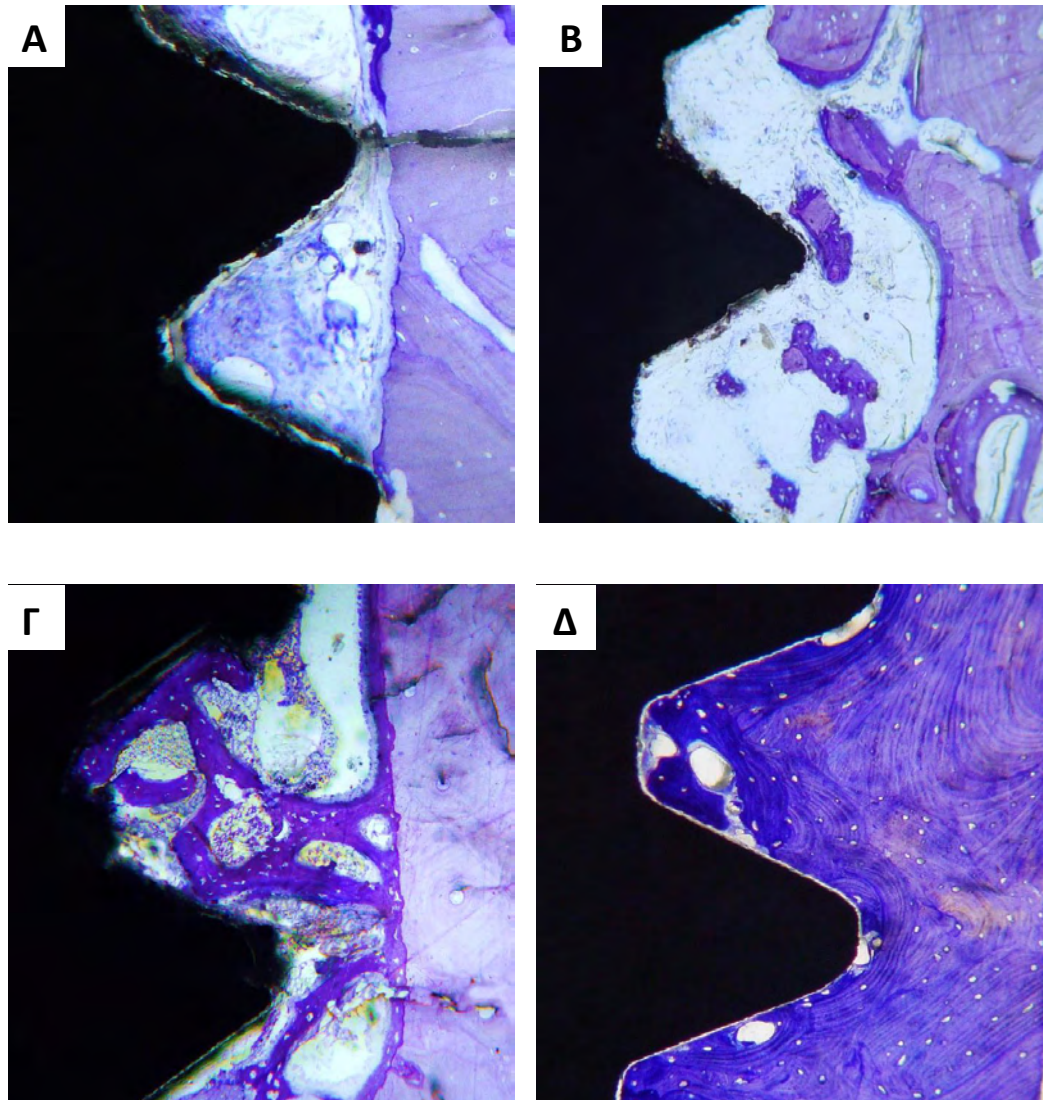
β) **Φλεγμονώδης φάση:** Λαμβάνει χώρα από τις πρώτες ώρες έως 2-3 ημέρες μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος⁴⁴. Κατά το στάδιο αυτό τα αμυντικά κύτταρα καθαρίζουν το τραύμα από τα μικροσκοπικά οστικά τεμάχια, του νεκρωμένους ιστούς και τα βακτήρια που παρέμειναν μετά τη χειρουργική διαδικασία. Αρχικά η βραδυκίνη των αιμοπεταλίων αυξάνει τη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων και ως αποτέλεσμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαχωρίζονται ελαφρώς. Στο εσωτερικό του αγγειακού τοιχώματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν την προσκόλληση των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων τα οποία στη συνέχεια διαπηδούν προς το τραύμα. Τα πολυμορφοπύρηννα ταξιδεύουν χημειοτακτικά μέσα στο τραύμα προς περιοχές με αυξημένη συγκέντρωση συγκεκριμένων μορίων, όπως βακτηριακές πρωτεΐνες, ινωδοπεππίδια και προ-φλεγμονώδεις ιντερλευκίνες⁴⁴. Μόλις φτάσουν, σκοτώνουν τα βακτήρια με την απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου και ταυτόχρονα απελευθερώνουν επίσης ισχυρά πεπτικά ένδυμα όπως κολλαγενάσες και ελαστάσες. Το σημείο αυτό είναι αρκετά κρίσιμο καθώς είτε το τραύμα θα προχωρήσει απρόσκοπτα στην επουλωτική διαδικασία είτε θα δημιουργηθεί ένα τοξικό περιβάλλον με αυξημένο αριθμό βακτηρίων και τοξικών υπο-προϊόντων που μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν σε χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση, κατάρρευση της επούλωσης και απώλεια του εμφυτεύματος. Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα απελευθερώνουν επίσης τη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοπύρηνων (MCP-1), η οποία προσελκύει στο τραύμα τα μονοπύρηννα

μακροφάγα των ιστών τα οποία εξουδετερώνουν τα βακτήρια με φαγοκύτωση⁴⁷. Τα μακροφάγα συνθέτουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και πρωτεάσες και γενικώς κυριαρχούν μέχρι την όψιμη φλεγμονώδη φάση⁴⁸. Επιπλέον, τα μακροφάγα χρησιμοποιώντας παράγοντες που αναστέλλουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες των ιστών, τους επονωμαζόμενους TIMP's (inhibitor of metalloproteinase), βοηθούν να σταματήσει ο κύκλος της ιστικής καταστροφής που άρχισε από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα⁴⁹. Η διαδικασία αυτή προστατεύει τις πρωτεΐνες του ικρίωματος και τις πρωτεογλυκάνες μέσα στο τραύμα οι οποίες με τη σειρά τους προστατεύουν σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες. Σηματοδοτικά μόρια όπως ο VEGF, ο PDGF και ο FGF ενεργοποιούν τις ινοβλάστες και την αγγειογένεση, γεγονός που σηματοδοτεί το πέρασμα στην επόμενη φάση (διηθητική)^{50, 51}.

γ) **Διηθητική φάση:** Λαμβάνει χώρα τις πρώτες ημέρες μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος. Στη φάση αυτή (που ονομάζεται αλλιώς και ινοπλαστική), αρχίζουν τα εμφανίζονται οι ινοβλάστες, οι οποίες κινούνται μέσα στο τραύμα με αμοιβαδοειδείς κινήσεις επάνω στο πλέγμα της ινικής που προς το παρόν λειτουργεί ως ένα προσωρινό ικρίωμα του εξωκυττάριου χώρου⁵². Οι ινοβλάστες συνθέτουν τα προστατευτικά και σταθεροποιητικά συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως κολλαγόνο, ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες. Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στους ιστούς, επηρεάζει τόσο τα μακροφάγα όσο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα που τα ενεργοποιεί ώστε να εκφράσουν τον ενδοκυττάριο υποξικό παράγοντα (HIF)⁴⁸. Η ταυτόχρονη παραγωγή VEGF επηρεάζει τα περικύτταρα των αγγείων τα οποία είναι αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα⁵³. Τα περικύτταρα μεταναστεύουν προς περιοχές αυξημένης συγκέντρωσης VEGF και με χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, όπου σχηματίζουν νέα αγγεία τα οποία τελικά συνδέονται με το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο. Η νέο-αγγειογένεση αποκαθιστά την παροχή οξυγόνου και γίνεται η πηγή της οστικής επούλωσης. Παράλληλα, στην αρχή της 7ης ημέρας, ενεργοποιημένες οστεοκλάστες συνδέονται στην επιφάνεια του προϋπάρχοντος οστού και το απορροφούν δημιουργώντας χώρο για την οστική επούλωση. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή θα μειώσει προσωρινά την αρχική σταθερότητα του

εμφυτεύματος. Με την αποδόμηση από τις οστεοκλάστες του οστού και των οστικών ρινισμάτων που παρέμειναν στο τραύμα από τη διαδικασία του τρυπανισμού, απελευθερώνονται οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP's), TGF-β και PDGF, τα οποία με τη σειρά τους δίνουν το έναυσμα για τη δημιουργία νέου οστού. Τα περικύτταρα δεν δημιουργούν μόνο νέα αγγεία, αλλά επίσης μεταναστεύουν προς τις υπάρχουσες οστικές δοκίδες και στην επιφάνεια του εμφυτεύματος, όπου διαφοροποιούνται προς νέες οστεοβλάστες υπό την επίδραση των BMP's του αποδομημένου οστού⁵⁴. Οι διαλυτές πρωτεΐνες όπως η ινωδονεκτίνη, έχουν σημαντική συμβολή στην προσκόλληση των αρχέγονων οστεογενετικών κυττάρων στην επιφάνεια του εμφυτεύματος⁵⁵. Οι οστεοβλάστες σχηματίζουν αρχικά πάνω στην επιφάνεια του εμφυτεύματος μια λεπτή πρωτεϊνική ζώνη πάχους η οποία στερείται κολλαγόνων ινών, ανάλογη της θεμέλιας γραμμής που σχηματίζεται μεταξύ των οστικών πεταλίων. Στη συνέχεια, με τη συνεχή δράση των οστεοβλαστών αρχίζει η εναπόθεση νέου άωρο δικτυωτού οστού που γεφυρώνει το κενό μεταξύ επιφάνειας εμφυτεύματος και του τοιχώματος του προϋπάρχοντος οστού. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αύξηση της δευτερογενούς σταθερότητας του εμφυτεύματος επανορθώνοντας έτσι τη σταδιακή απώλεια της αρχικής σταθερότητας που επήλθε προηγουμένως από τη δράση των οστεοκλαστών. Έχουν περιγραφεί δύο μηχανισμοί με τους οποίους επέρχεται τελικώς η πλήρωση του αρχικού διάκενου μεταξύ οστού και εμφυτεύματος με νέο οστό, και άρα η επίτευξη του βιολογικού φαινομένου της οστεοενσωμάτωσης. Οι δύο τρόποι αναφέρονται ως **οστεογένεση αποστάσεως** και **οστεογένεση επαφής**. Γενικά, κατά την οστεογένεση αποστάσεως το νέο οστό που γεμίζει το διάκενο δημιουργείται από τα τοιχώματα του προϋπάρχοντος οστού προς την επιφάνεια του εμφυτεύματος, ενώ κατά την οστεογένεση επαφής το νέο οστό δημιουργείται απευθείας επάνω στην επιφάνεια του εμφυτεύματος και σταδιακά συνενώνεται με το προϋπάρχον οστό⁵⁶. Θεωρείται ότι η οστεογένεση επαφής, δηλαδή η *de novo* δημιουργία οστού στην επιφάνεια του εμφυτεύματος, είναι ο επιθυμητός τρόπος οστεοενσωμάτωσης καθώς οδηγεί σε περισσότερο στενή σύνδεση μεταξύ οστού και εμφυτεύματος⁵⁷. Ωστόσο, στην πραγματικότητα οι

δύο διαδικασίες παρατηρούνται ταυτόχρονα, στα διάφορα τμήματα της επιφάνειας του ίδιου εμφυτεύματος.



Εικόνα 15. Ιστολογικές φάσεις της οστεοενσωμάτωσης. **A:** τη 2^η ημέρα μετά την τοποθέτηση (διηθητική φάση), **B:** τη 1^η εβδομάδα μετά την τοποθέτηση όπου παρατηρείται ήδη η εναπόθεση ανώριμου δικτυωτού οστού. **Γ:** 4^η εβδομάδα μετά την τοποθέτηση νέο ανώριμο δικτυωτό οστού έχει γεφυρώσει το κενό μεταξύ εμφυτεύματος και προϋπάρχοντος οστού, **Δ:** 8-12 εβδομάδες μετά την τοποθέτηση το ανώριμο δικτυωτό οστό έχει αντικατασταθεί πλήρως με ώριμο πεταλιώδες οστό με τη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης. (Τολουϊδίνη, x10)

δ) **Φάση αναδιαμόρφωσης:** Λαμβάνει χώρα 6-12 εβδομάδες μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος και διαρκεί εφ' όρου ζωής. Η προσαρμογή στις φορτίσεις είναι ζωτικής σημασίας σε αυτή τη φάση. Αρχικά το άωρο δικτυωτό οστό που σχηματίστηκε στις εσοχές της επιφάνειας του εμφυτεύματος και παράλληλα με αυτό, μετά την αναδιαμόρφωση θα έχει αντικατασταθεί με ώριμο πεταλιώδες οστό που προσανατολίζεται κάθετα στην επιφάνεια των ακμών των σπειρών του εμφυτεύματος. Με τον τρόπο αυτό η δομή του οστού γύρω από το εμφύτευμα μπορεί να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των δυνάμεων που μεταφέρονται μέσω του εμφυτεύματος. Η οστική αναδιαμόρφωση, όπως ήδη περιγράφηκε ανωτέρω, επιτυγχάνεται με τη συνεργασία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών⁵⁸. Οι οστεοκλάστες ενεργοποιημένες από τον αγγελιοφόρων των οστεοβλαστών RANKL, απορροφούν το άωρο δικτυωτό οστό, και στη συνέχεια οι οστεοβλάστες σχηματίζουν το εξαιρετικά οργανωμένο ώριμο πεταλιώδες οστό⁵⁹. Η εργασία των δύο κυτταρικών σειρών συντονίζεται κυρίως από τα οστεοκύτταρα και τους αγγελιοφόρους τους, όπως η σκληροστίνη⁶⁰.

1.8. Εμφυτευματικά υλικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε διάφορα υλικά, μέταλλα, κεραμικά ή πολυμερή, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εμφυτευματικά υλικά στο οστό. Η ιστοσυμβατότητα των υλικών αυτών εξαρτάται από την παρουσία ή όχι φλεγμονώδους αντίδρασης τύπου ξένου σώματος η οποία θα οδηγήσει τελικά στην περιχάρκωση του υλικού από ινώδη κάψα ή στην ενσωμάτωσή του αντίστοιχα⁶¹. Αναφέρεται ότι και η οστεοενσωμάτωση αποτελεί ουσιαστικά μια ιδιαίτερου τύπου φλεγμονώδη αντίδραση προς ένα ξένο σώμα η οποία καταλήγει σε εναπόθεση οστού επάνω στην επιφάνεια του εμφυτεύματος⁶². Την ιδιότητα αυτή, εκτός από το τιτάνιο, την εμφανίζουν κι άλλα υλικά όπως το ταντάλιο, η ζirkονία, το PEEK κ.α.

Ιδιαίτερο ρόλο στην διαδικασία της ενσωμάτωσης ή όχι των εμφυτευματικών υλικών παίζει η φλεγμονώδης φάση που διαρκεί λίγες ημέρες μετά την εμφύτευση. Πρόσφατες έρευνες⁶³⁻⁶⁵ έχουν δείξει ότι η αντίδραση των μακροφάγων ελέγχει τελικά τις διαδικασίες ενσωμάτωσης ή ινώδους

περιχαράκωσης του υλικού. Φαίνεται ότι κατά τη φλεγμονώδη φάση εμφανίζονται δύο φαινότυποι μακροφάγων, τα M1 (φλεγμονώδη) και τα M2 (επανορθωτικά). Τα μακροφάγα είναι επίσης στενά συνδεδεμένα με τη βιολογία του οστού, καθώς κατά την εναπόθεση οστού αλληλεπιδρούν με τις οστεοβλάστες, αλλά επίσης συντήκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας είτε οστεοκλάστες είτε πολυπύρηνια γιγαντοκύτταρα σχετιζόμενα με το ξένο σώμα. Έχει φανεί ότι το τιτάνιο, σε αντίθεση με άλλα μη βιοσυμβατά μέταλλα όπως ο χαλκός, έχουν την ιδιότητα να προκαλούν μικρότερης διάρκειας φλεγμονώδη αντίδραση κατά την οποία επικρατούν τα M2 μακροφάγα σε σχέση με τα M1. Επιπλέον, οι Shayan M και συν.⁶⁶ έδειξαν ότι διαφορές στη νανο-μορφολογία της επιφάνειας του εμφυτεύματος είναι δυνατό να επηρεάσουν την εμφάνιση ή όχι των μακροφάγων M2.

Πράγματι οι ιδιότητες της επιφάνειας του τιτανίου παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της οστεοενσωμάτωσης. Διαφορετικά υλικά είναι δυνατό να προάγουν την έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών από τα γύρω κύτταρα, οδηγώντας σε διαφορές στην ικανότητα προσκόλλησης των οστεοβλαστών στις επιφάνειες αυτές⁶⁷, και άρα στην εναπόθεση νέου οστού επάνω στην επιφάνεια του εμφυτευματικού υλικού. Η επιφάνεια του εμφυτευματικού υλικού φαίνεται επίσης να έχει ανάλογες επιδράσεις και στη λειτουργία των οστεοκλαστών και στην απορρόφηση του οστού⁶⁸⁻⁷⁰.

2. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΟΥΡΙΝΕΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

2.1. Εισαγωγικά

Η πουρινεργική σηματοδότηση αποτελεί ένα αρχέγονο σύστημα διακυτταρικής επικοινωνίας όπου τα νουκλεοτίδια ATP, ADP, UTP και UDP, καθώς και τα νουλεοσίδια Αδενοσίνη (Ado) και Ινοσίνη (Ino) δρουν ως εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια. Παρόλο που το ATP ανακαλύφθηκε σχεδόν έναν αιώνα πριν^{71, 72} και σύντομα έγινε γνωστός ο ρόλος του ως μόριο μεταφοράς ενέργειας ενδοκυτταρίως⁷³, ο ρόλος του ως εξωκυττάριο σηματοδοτικό μόριο άρχισε να διαφαίνεται πολλά χρόνια αργότερα. Έτσι, στις αρχές της δεκαετίας του 1970 προτάθηκε αρχικά ο ρόλος του ATP ως διαβιβαστή του αυτόνομου νευρικού συστήματος, από τον νευροβιολόγο Geoffrey Burnstock^{74, 75}. Σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι το πουρινεργικό σύστημα χρησιμοποιείται για αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδότηση όχι μόνο στον νευρικό ιστό, αλλά σε όλους σχεδόν τους ιστούς ελέγχοντας σημαντικές λειτουργίες. Ο G. Burnstock αφιέρωσε την έως σήμερα 40ετή επιστημονική του σταδιοδρομία στη μελέτη της πουρινεργικής σηματοδότησης (όνομα που απέδωσε ο ίδιος ήδη από το 1972) και πολλά από τα οποία γνωρίζουμε σήμερα οφείλονται στο έργο του, για το οποίο έχει τιμηθεί πολλακίς⁷⁶.

Η αποδοχή της πρότασης του G. Burnstock περί εμπλοκής του ATP σε κάποιο σύστημα διακυτταρικής επικοινωνίας βρήκε αρχικά αντίσταση, καθώς το ATP είχε εδραιωθεί στην επιστημονική κοινότητα ως ένα μόριο ενδοκυττάριας αποθήκευσης ενέργειας, το οποίο όντας πανταχού παρόν θεωρείτο αδύνατο να συμμετέχει ως διαβιβαστής για εκλεκτική διακυτταρική επικοινωνία⁷⁷. Ωστόσο, το ATP είναι ένα από τα πρώτα βιολογικά μόρια που εμφανίστηκαν κατά την εξέλιξη, και ίσως δεν θα έπρεπε να αποτελεί έκπληξη ότι τα κύτταρα ενδέχεται να το χρησιμοποίησαν και ως σηματοδοτικό μόριο από νωρίς στην ιστορία της εξέλιξης. Η ανακάλυψη της παρουσίας στο εξωκυττάριο υγρό ενζύμων που ελέγχουν τις συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων και νουλεοσιδίων που είναι διαθέσιμες για σηματοδότηση, αλλά και των αντίστοιχων πουρινεργικών υποδοχέων όπου δρουν, συνέβαλαν σημαντικά στην αποδοχή της θεωρίας.

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι η πουρινεργική σηματοδότηση βασίζεται σε τρεις βασικούς πυλώνες: α) την απελευθέρωση ATP στο εξωκυττάριο μικρο-περιβάλλον, β) στον εξωκυττάριο μεταβολισμό του ATP και των υπολοίπων νουκλεοτιδίων και γ) στους πουρινεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων.

2.2. Απελευθέρωση ATP στο εξωκυττάριο υγρό

Υπό φυσιολογικές συνθήκες στο εξωκυττάριο υγρό το ATP βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (400-700 nM), ενώ αντίθετα απαντάται σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις (3-10 mM) μέσα στα κύτταρα⁷⁸. Για αρκετά χρόνια επικρατούσε η πεποίθηση ότι το ATP διαχέεται προς το εξωκυττάριο υγρό μόνο από κατεστραμμένα ή αποπεπτωκότα κύτταρα. Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι τα κύτταρα μεταφέρουν συνεχώς ATP προς το εξωκυττάριο υγρό μέσω εξωκύττωσης ή διαμέσου διαμεμβρανικών πόρων⁷⁹. Διάφορα τοπικά ή συστηματικά ερεθίσματα μπορεί να αυξήσουν την απελευθέρωση ATP. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση τόσο του ATP όσο και της Ado είναι δυνατό να αυξηθούν εξαιρετικά κάτω από διάφορες συνθήκες όπως ο τραυματισμός των ιστών, η φλεγμονή, η υποξία, η ισχαιμία ή ο μηχανικός ερεθισμός⁸⁰.

2.3. Εξωκυττάρια μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων

Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων νουκλεοτιδίων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ελέγχονται από ένζυμα τα οποία βρίσκονται είτε στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων είτε σε διαλυτή μορφή στο εξωκυττάριο υγρό (εξω-ένζυμα) και που καταλύουν τις χημικές αντιδράσεις μετατροπής του ATP στα προϊόντα αποδόμησής του (ADP, AMP και Ado)⁸¹. Τα ένζυμα τα οποία είναι γνωστό ότι καταλύουν τις αντιδράσεις εξωκυττάριας αποδόμησης του ATP υπάγονται σε τέσσερις οικογένειες⁸² (**Εικ.16**):

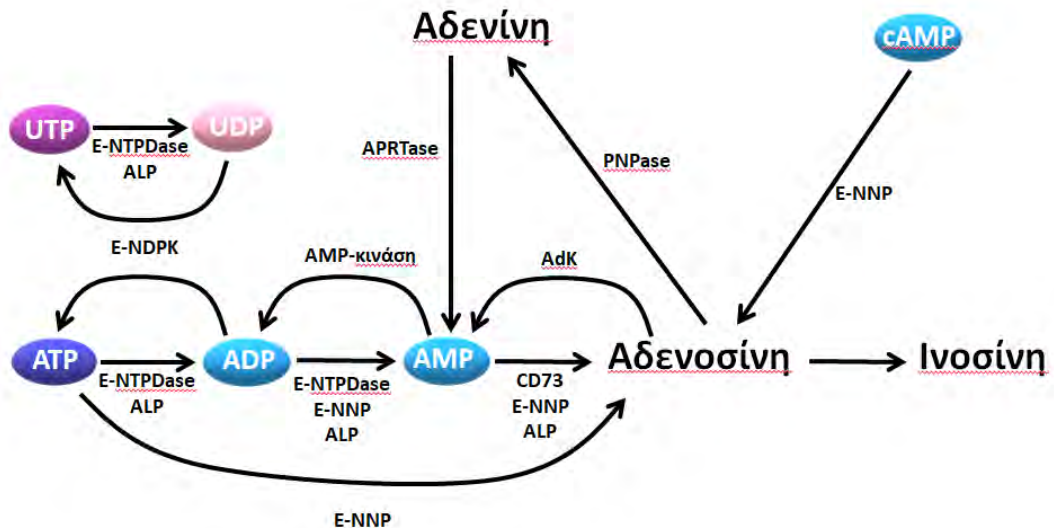
α) Εξω-νουκλεοσιδικές τριφωσφορικές δι-φωσφουδρολάσες (E-NTPDase) οι οποίες μετατρέπουν το ATP σε ADP και το ADP σε AMP.

β) Εξω-νουκλεοτιδικές πυροφωσφατάσες/φωσφοδιεστεράσες (E-NNP) που καταλύουν τις αντι-δράσεις υδρόλυσης του cAMP σε AMP, του ATP σε AMP, του ADP σε AMP και του AMP σε Ado.

γ) Αλκαλικές φωσφατάσες (ALP) οι οποίες καταλύουν την αποδόμηση των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων σε , δι- και μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια, και

δ) Έξω-5-νουκλεοτιδάσες (CD73) οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση του AMP σε Ado.

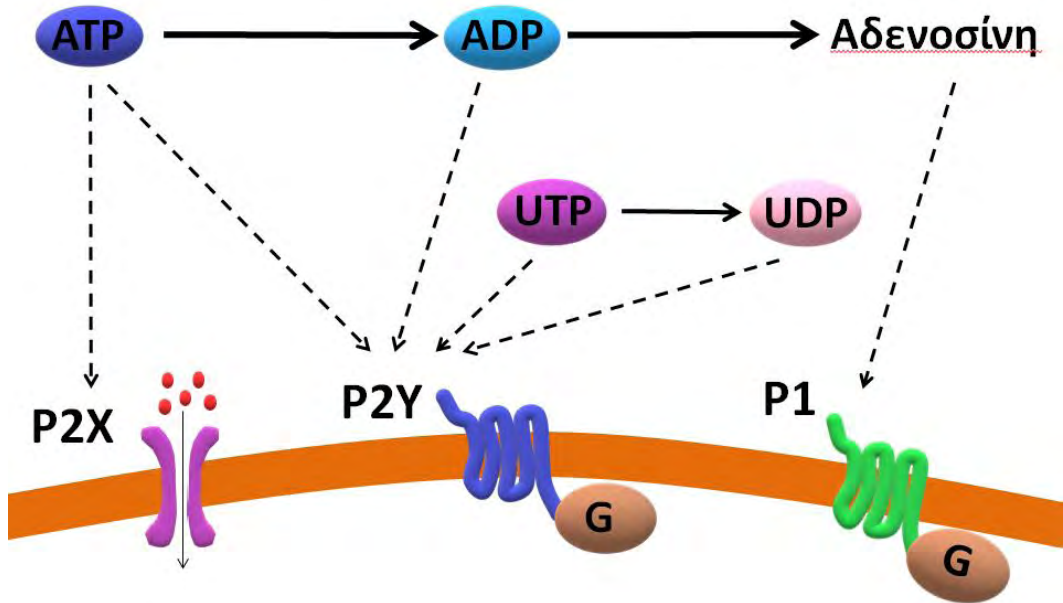
Στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων στο εξωκυττάριο υγρό συμμετέχουν επίσης διάφορα άλλα ένζυμα τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις σύνθεσης ή μετατροπής των διαφόρων νουκλεοτιδίων αδενίνης και ουριδίνης, όπως η αδενοσινική δεαμινάση (ADA), η αδενοσινική κινάση (AdK), αδενινική φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση (APRTase) και η πουρινική νουκλεοσιδική φωσφορυλάση (PNPase) (Εικ.16).



Εικόνα 16. Εξωκυττάριος μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων και νουκλεοσιδίων.

2.4. Πουρινεργικοί υποδοχείς

Οι πιθανές δράσεις των διαφόρων ενώσεων της αδενίνης στους ιστούς (και ιδιαίτερα στην καρδιά) περιγράφηκαν πρώτα από τους Drury και Szent-Györgyi το 1929⁸³, χωρίς ωστόσο να ήταν τότε γνωστό σε ποιούς υποδοχείς επιδρούν. Η περιγραφή των πουρινεργικών υποδοχέων έλαβε χώρα αρκετά χρόνια αργότερα από τον G. Burnstock το 1976⁸⁴, ο οποίος σύντομα, το 1978, πρότεινε και τον βασικό διαχωρισμό τους σε υποδοχείς P1 (για την Αδο) και σε υποδοχείς P2 (για το ATP και το ADP)⁸⁵. Κατά τη δεκαετία του 1990 αναγνωρίστηκαν και περιγράφηκαν τέσσερα υποείδη υποδοχέων P1 και δύο υποείδη υποδοχέων P2 (P2X και P2Y)⁸⁶⁻⁹⁰. Σήμερα πλέον είναι γνωστό ότι στον άνθρωπο υπάρχουν περαιτέρω επτά υποτύποι υποδοχέων P2X και οκτώ υποτύποι υποδοχέων P2Y⁹¹ (Εικ. 17).



Εικόνα 17. Πουρινεργικοί υποδοχείς με τους διάφορους αγωνιστές τους.

Οι P1 υποδοχείς διακρίνονται σε τέσσερα υποείδη (A_1 , A_{2A} , A_{2B} και A_3), ενώ επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί και κάποιοι πολυμορφισμοί των A_1 και των A_3 ⁹². Οι P1 είναι υποδοχείς συζευγμένοι με G – πρωτεΐνες οι οποίες είναι συζευγμένες με την δράση της αδενυλικής κυκλάσης και την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP. Οι A_1 και A_3 υποδοχείς αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση και την παραγωγή cAMP, ενώ οι A_{2A} και A_{2B} την ενεργοποιούν και κατ' επέκταση αυξάνουν την παραγωγή cAMP⁹³. Κύριος ενδογενής αγωνιστής των υποδοχέων P1 είναι η Ado, ενώ έχουν επιπλέον ανακαλυφθεί δεκάδες συνθετικοί εκλεκτικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές για τα τέσσερα υποείδη τους⁹⁴. Η καφεΐνη και η θεοφυλλίνη είναι οι πιο γνωστοί μη-εκλεκτικοί ανταγωνιστές των υποδοχέων A_1 και A_{2A} ⁹⁵.

Οι P2 υποδοχείς, όπως ήδη αναφέρθηκε, διακρίνονται σε P2X και P2Y. Οι P2X είναι υποδοχείς συζευγμένοι με διαύλους ιόντων και διακρίνονται σε επτά υποτύπους (P2X1-7) (**Πίνακας 2**). Οι P2X αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές μονάδες (TM1 και TM2), έναν μεγάλο εξωκυττάριο βρόγχο και δύο ενδοκυττάρια τερματικά άκρα (ένα καρβοξυτελικό και ένα αμινοτελικό)⁹⁶. Κύριος ενδογενής αγωνιστής των υποδοχέων P2X είναι το ATP, ενώ έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί εκλεκτικοί και μη-εκλεκτικοί συνθετικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές. Θεωρείται ότι υπάρχουν τρεις θέσεις σύνδεσης με το ATP στον εξωκυττάριο βρόγχο οι οποίες πρέπει να καλυφθούν όλες ώστε να ανοίξει ο δίαυλος⁹⁷. Οι δίαυλοι αυτοί σχετίζονται με την ενδοκυττάρια μεταφορά ιόντων Ca^{2+} κυρίως, αλλά και Na^+ , η είσοδος των οποίων προκαλεί την ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυττάριων διεργασιών. Το ενδοκυττάριο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα διαθέτει θέση πρόσδεσης για φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), γεγονός που υποδεικνύει ότι το επίπεδο φωσφορυλίωσης του υποδοχέα παίζει ρόλο στη λειτουργικότητά του, καθώς η PKC ενεργοποιείται από την αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} ⁹⁸. Επιπλέον, η ευαισθησία των υποδοχέων P2X μεταβάλλεται σημαντικά από μεταβολές του εξωκυττάριου pH (φλεγμονή) και από την παρουσία βαρέων μετάλλων (π.χ. ψευδάργυρος, κάδμιο).

Πίνακας 2. Κατηγορίες πουρινεργικών υποδοχέων με τα χαρακτηριστικά τους.

Υποδοχείς		Αγωνιστής	Είδος	Κυρίως κατανομή
P1	A₁	Ado	Πρωτεΐνη G	ΚΝΣ, καρδιά, όρχεις, οστικά κύτταρα
	A_{2A}	Ado	Πρωτεΐνη G	ΚΝΣ, καρδιά, πνεύμονες, σπλήνας, οστικά κύτταρα
	A_{2B}	Ado	Πρωτεΐνη G	Παχύ έντερο, ουροδόχος κύστη, οστικά κύτταρα
	A₃	Ado	Πρωτεΐνη G	Πνεύμονες, ήπαρ, εγκέφαλος, όρχεις, καρδιά, οστικά κύτταρα
P2X	P2X1	ATP	Κανάλι ιόντων	Λείες μυϊκές ίνες, αιμοπετάλια, ΚΝΣ, οστικά κύτταρα
	P2X2	ATP	Κανάλι ιόντων	Λείες μυϊκές ίνες, ΚΝΣ, πάγκρεας, οστικά κύτταρα
	P2X3	ATP	Κανάλι ιόντων	ΚΝΣ, οστικά κύτταρα
	P2X4	ATP	Κανάλι ιόντων	ΚΝΣ, όρχεις, ενδοθηλιακά κύτταρα, μικρογλοία, οστικά κύτταρα
	P2X5	ATP	Κανάλι ιόντων	Κύτταρα δέρματος, έντερο, ουροδόχος κύστη, θύμος αδένας, ΚΝΣ, καρδιά, οστικά κύτταρα
	P2X6	Λειτουργεί μόνο ως ετερο-πολυμερές	Κανάλι ιόντων	ΚΝΣ, κινητικοί νευρώνες
	P2X7	ATP	Κανάλι ιόντων	Κύτταρα ανοσοποιητικού (δενδριτικά, μαστοκύτταρα, μακροφάγα), πάγκρεας, δέρμα, μικρογλοία, οστικά κύτταρα
P2Y	P2Y₁	ATP>ADP	Πρωτεΐνη G	Επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, κύτταρα ανοσοποιητικού, εγκέφαλος, οστεοκλάστες
	P2Y₂	UTP	Πρωτεΐνη G	Κύτταρα ανοσοποιητικού, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, νεφρικά σωληνάκια, οστεοβλάστες
	P2Y₄	UTP≥ATP	Πρωτεΐνη G	Ενδοθηλιακά κύτταρα, πλακούντας, σπλήνας, θύμος αδένας, οστεοβλάστες
	P2Y₆	UDP>UTP>ATP	Πρωτεΐνη G	Επιθηλιακά κύτταρα, πλακούντας, θύμος αδένας, Τ λεμφοκύτταρα, μικρογλοία, οστικά κύτταρα
	P2Y₁₁	ATP	Πρωτεΐνη G	Σπλήνας, έντερο, κοκκιοκύτταρα
	P2Y₁₂	ADP>ATP	Πρωτεΐνη G	Αιμοπετάλια, νευρογλοιακά κύτταρα, οστικά κύτταρα
	P2Y₁₃	ADP>ATP	Πρωτεΐνη G	Σπλήνας, εγκέφαλος, μυελός των οστών, ερυθροκύτταρα
	P2Y₁₄	UDP	Πρωτεΐνη G	Πλακούντας, λιποκύτταρα, στόμαχος, οστικά κύτταρα

Οι P2Y είναι υποδοχείς συζευγμένοι με G – πρωτεΐνες και έχουν βρεθεί στον άνθρωπο οκτώ υποτύποι (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄). Οι ελλείποντες αριθμοί οφείλονται είτε σε υποτύπους που δεν απαντώνται στον άνθρωπο είτε σε υποδοχείς που είναι ανενεργοί ή δεν ανταποκρίνονται στα νουκλεοτίδια. Κύριοι ενδογενείς αγωνιστές των P2Y είναι το ATP, το ADP, το UTP και το UDP (Πίνακας), ενώ και σε αυτήν την περίπτωση έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί εκλεκτικοί και μη-εκλεκτικοί συνθετικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι P2Y υποδοχείς διαθέτουν εντελώς διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων στις θέσεις πρόσδεσης του ATP, απ' ότι όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που συνδέονται με το ATP⁹⁹. Οι διάφοροι υποτύποι P2Y υποδοχέων είναι δυνατό να είναι συζευγμένοι με τη λειτουργία είτε ιοντικών διαύλων Ca²⁺ και K⁺, είτε ενζύμων όπως την ενεργοποιημένη με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK), είτε άλλων πουρινεργικών ή μη υποδοχέων¹⁰⁰⁻¹⁰².

2.5. Πουρινεργική σηματοδότηση στο οστό

Η παρουσία πουρινεργικής σηματοδότησης στο οστό προτάθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990, με την παρατήρηση ότι το εξωκυττάριο ATP είναι δυνατό να προκαλέσει αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺ και να ενεργοποιήσει ενδοκυτταρικές διεργασίες σημαντικές για τη λειτουργία των οστεοβλαστών^{103, 104}. Έως σήμερα έχει διαφανεί ότι οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα εκφράζουν σχεδόν όλα τα είδη πουρινεργικών υποδοχέων, οι οποίοι ελέγχουν πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση¹⁰⁵.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση της φόρτισης των οστών που οδηγεί σε μετακίνηση του υγρού που περιέχεται στα οστικά σωληνάρια μπορεί να οδηγήσει σε δραματική αύξηση της απελευθέρωσης εξωκυτταρίου ATP από τα οστεοκύτταρα^{106, 107}. Επιπλέον, έχει φανεί ότι οι οστεοκλάστες απελευθερώνουν επίσης ATP και ότι οι ενεργοποιημένες οστεοκλάστες εμφανίζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις διακυμάνσεις της πίεσης εντός των

οστικών σωληναρίων¹⁰⁸. Η άποψη ότι οι οστεοκλάστες ενδέχεται να εμπλέκονται άμεσα στην αντίληψη των μηχανικών φορτίσεων του οστού μέσω της απελευθέρωσης ATP φαίνεται να υποστηρίζεται και από την πρόσφατη μελέτη των Brandao-Burch και συν.¹⁰⁹ οι οποίοι παρουσίασαν στοιχεία σχετικά με την εμπλοκή του πουρινεργικού μηχανοϋποδοχέα P2X7 στην απελευθέρωση ATP από τις οστεοκλάστες.

Οι λειτουργίες της πουρινεργικής σηματοδότησης στο οστό φαίνεται να εξαρτώνται γενικώς από το είδος των υποδοχέων που εκφράζονται στα διάφορα κύτταρά του. Ο υποδοχέας P2Y₂ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του σχηματισμού πυρήνων ενασβεστίωσης, καθώς έχει φανεί ότι ένας αγωνιστής του συγκεκριμένου υποδοχέα αναστέλλει τη διαδικασία αυτή σε καλλιέργειες οστεοβλαστών¹¹⁰. Επιπλέον, ποντίκια με γενετική έλλειψη του υποδοχέα P2Y₂ εμφανίζουν σχετική αύξηση της οστικής πυκνότητας¹¹¹, γεγονός που δείχνει ότι την εμπλοκή του υποδοχέα στην διαδικασία της οστικής ενασβεστίωσης. Αντίθετα, ποντίκια με γενετική έλλειψη του υποδοχέα P2X7 εμφανίζουν σημαντική μείωση της υποπεριοστικής εναπόθεσης οστού στο μηριαίο, εκτεταμένη απορρόφηση του σπογγώδους οστού στην κνήμη και ευρείες ραφές στο κρανίο^{112, 113}. Επιπλέον, τα ποντίκια με έλλειψη του P2X7 εμφανίζουν μειωμένη έκκριση προσταγλαδίνης E2 από τους οστεοβλάστες του κρανίου και μειωμένη οστεογένεση σε απάντηση των μηχανικών φορτίσεων¹¹⁴.

Παρόλο που πλήθος μελετών έχει καταδείξει ότι η πουρινεργική σηματοδότηση ελέγχει σημαντικές λειτουργίες στο οστό, δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί οι ακριβείς λειτουργίες όλων των υποδοχέων καθώς και το πώς αυτοί συνεργάζονται στην επίτευξη της ομοιοστασίας του οστού.

3. ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗ: ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ P2Y₁₂

3.1. Εισαγωγικά

Η κλοπιδογρέλη αποτελεί ένα από τα συχνότερα συνταγογραφούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα για την πρόληψη των επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης και σύμφωνα με τον WHO συμπεριλαμβάνεται στον κατάλογο με τα αναγκαία φάρμακα ενός εθνικού συστήματος υγείας¹¹⁵. Χορηγείται είτε ως μονοθεραπεία για την πρωτογενή ή δευτερογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου, είτε σε συνδυασμό με την ασπιρίνη (διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή) μετά από διαδερμική στεφανιαία αγγειοπλαστική με τοποθέτηση ενδοαγγειακής πρόθεσης για την πρόληψη θρόμβωσής της.

3.2. Η αντιαιμοπεταλική δράση της κλοπιδογρέλης

Η κλοπιδογρέλη παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1982 και εγκρίθηκε η χρήση στον άνθρωπο για ιατρικούς σκοπούς το 1998¹¹⁶. Φαρμακολογικά ανήκει στην οικογένεια των θειοπυρινιδίων και αποτελεί προφάρμακο το οποίο μετά τον μεταβολισμό πρώτης διόδου από το ήπαρ, εισέρχεται στην κυκλοφορία με τη μορφή του ενεργού μεταβολίτη (CAM). Ο ενεργός μεταβολίτης συνδέεται προκαλεί μόνιμη αναστολή του πουρινεργικού υποδοχέα P2Y₁₂ των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησής τους από το ADP¹¹⁷. Η συνήθης ημερήσια δόση της ανέρχεται στα 75mg και η αναστολή της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων αρχίζει να παρατηρείται με αργούς ρυθμούς δύο περίπου ώρες μετά τη λήψη της. Για το λόγο αυτό όταν απαιτείται η ταχεία επίτευξη ικανοποιητικών επιπέδων στο αίμα (πχ. σε περιπτώσεις πρωτογενούς στεφανιαίας αγγειοπλαστικής) χορηγείται δόση εφόδου 300-600 mg. Η δράση της κλοπιδογρέλης στη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων μετράται με την διαφορά του ποσοστού συγκόλλησης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη χορήγηση 5 μM, 10 μM ή 20 μM ADP πριν και μετά τη χορήγησή της. Η συνήθης δόση των 75 mg ημερησίως προκαλεί αναστολή του 30-40% των αιμοπεταλίων¹¹⁸. Ωστόσο, το επίπεδο της δράσης της κλοπιδογρέλης μπορεί διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών,

λόγω διαφόρων παραγόντων όπως το γενετικό προφίλ, η λήψη άλλων φαρμάκων κτλ. Σε ένα ποσοστό περίπου 14% των ασθενών εμφανίζονται ανθεκτικοί στη δράση της κλοπιδογρέλης καθώς δεν μπορούν να τη μεταβολίσουν επαρκώς, λόγω πολυμορφισμού στο κυτόχρωμα CYP2C19, και εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ενεργού μεταβολίτη στο αίμα¹¹⁹. Ως ανθεκτικοί μπορούν να θεωρηθούν οι ασθενείς που εμφανίσουν >70% συγκόλληση των αιμοπεταλίων μετά από χορήγηση 10 μM ADP ή >50% μετά από χορήγηση 5 μM ADP¹²⁰.

3.3. Οι πλειοτροπικές δράσεις της κλοπιδογρέλης

Ενώ η αρχική ένδειξη χρήσης της κλοπιδογρέλης ήταν η πρόληψη των επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης μέσω της αναστολής της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, με την πάροδο των ετών η επιστημονική έρευνα έφερε στο φως διάφορες επιπλέον δράσεις της. Το γεγονός αυτό είναι απολύτως λογικό, καθώς όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα οι πουρινεργικοί υποδοχείς, όπου ανήκει και ο P2Y_{12} , είναι παρόντες σε όλους σχεδόν τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος και εμπλέκονται σε ποικιλία φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών. Αυτές οι πλειοτροπικές δράσεις της κλοπιδογρέλης μπορούν να είναι είτε ευνοϊκές είτε ανεπιθύμητες.

Οι Warnholtz και συν.¹²¹ έδειξαν ότι η φόρτιση με κλοπιδογρέλη με δόσεις 300-600 mg βελτιώνει την λειτουργία του ενδοθηλίου, μετρώντας την υπό ροή συντηρούμενη διάταση της βραχιονίου αρτηρίας (flow-mediated dilatation). Πράγματι, έχει φανεί ότι στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης καθοριστικό παράγοντα δεν παίζει μόνο ο υποδοχέας P2Y_{12} των αιμοπεταλίων, αλλά και ο ίδιος υποδοχέας των ενδοθηλιακών κυττάρων¹²². Ωστόσο, περαιτέρω διερεύνηση της μακροπρόθεσμης παρουσίας αυτής της ευνοϊκής δράσης, έδειξε ότι μετά την πάροδο 28 ημερών υπό συνεχή ημερήσια αγωγή με δόση κλοπιδογρέλης 75 mg, αυτή παρέρχεται¹²³. Η αναστροφή αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια, διαθέτουν πυρήνα και είναι πιθανό μετά την μόνιμη αναστολή των υποδοχέων P2Y_{12} από την κλοπιδογρέλη, να εκφράζουν νέους υποδοχείς και

σε σύντομο χρονικό διάστημα να τους αποκαθιστούν με νέους και λειτουργικούς. Η κλοπιδογρέλη φαίνεται επίσης ότι αναστέλλει την αγγειοσύσπασση που επέρχεται ως απάντηση στον τραυματισμό¹²⁴ και προκαλεί αγγειοχάλαση με μηχανισμό ανεξάρτητο του ενδοθηλιακού NO, των β αδρενεργικών υποδοχέων ή των P2 πουρινεργικών υποδοχέων¹²⁵.

Μια άλλη κατηγορία δράσεων της κλοπιδογρέλης είναι η μείωση των επιπέδων των διαμεσολαβητών της φλεγμονής. Στους ασθενείς με non-STEMI οξεία στεφανιαία σύνδρομα, η κλοπιδογρέλη φαίνεται να μειώνει την έκφραση της P-σελεκτίνης και τα επίπεδα στο πλάσμα του CD40L¹²⁶. Ενώ ταυτόχρονα έχει φανεί ότι ελαττώνει την επίδραση του ADP και του TRAP στο σχηματισμό συμπλεγμάτων αιμοπεταλίων-μονοπύρηνων και αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων. Επιπλέον, ασθενείς υπό μακροχρόνια αγωγή με κλοπιδογρέλη εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως IL-α, IL-2, IL-6, IL-13, TNF-α και TNF-β¹²⁷.

3.4 Πιθανές επιδράσεις της κλοπιδογρέλης στο οστό

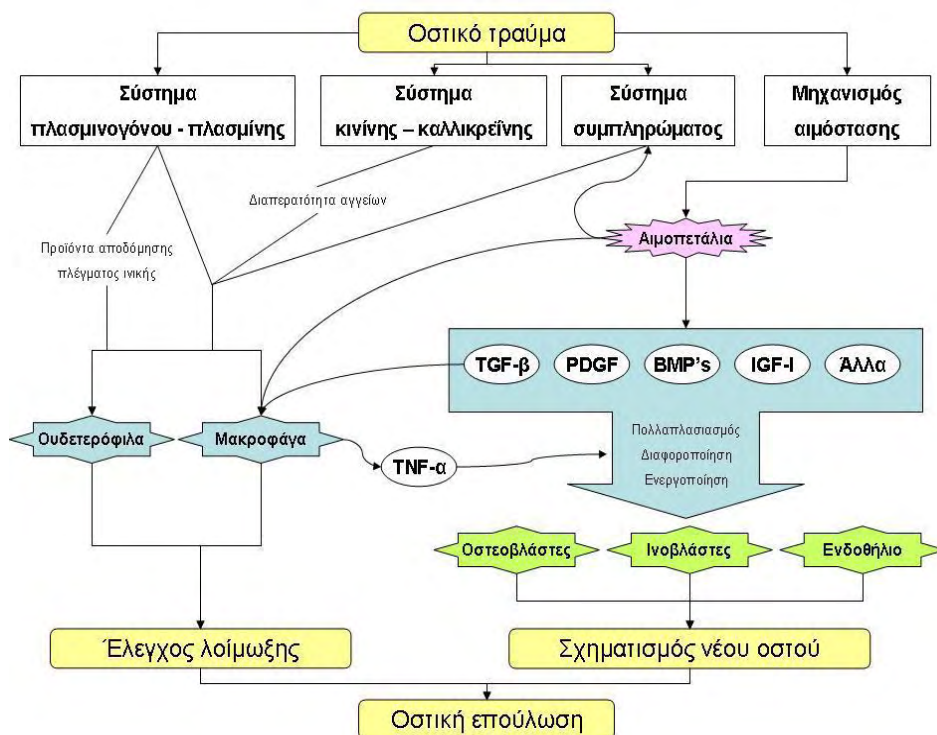
Η κλοπιδογρέλη ενδέχεται να επηρεάζει τόσο τον οστικό μεταβολισμό όσο και την οστική επούλωση. Διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει την παρουσία του υποδοχέα P2Y₁₂ τόσο στις οστεοβλάστες όσο και στις οστεοκλάστες. Επιπλέον, έχει φανεί in vitro ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό και οδηγεί σε αλλαγές στις ιστομορφομετρικές παραμέτρους των μακρών οστών (οστική πυκνότητα, πάχος των οστικών δοκίδων του σπογγώδους οστού κ.α.). Ωστόσο, οι λίγες υπάρχουσες μελέτες εμφανίζουν αντιφατικά αποτελέσματα καθώς άλλες βρίσκουν ότι προάγει την εναπόθεση νέου οστού^{128, 129} και άλλες ότι οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση αυτού^{130, 131}. Βέβαια αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μελέτες χρησιμοποιούν διαφορετικές ημερήσιες δοσολογίες. Το ζήτημα αυτό έχει επισημανθεί κι από μια πρόσφατη μεγάλη κλινική μελέτη όπου φάνηκε πως οι ασθενείς υπό χρόνια αγωγή με κλοπιδογρέλη εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων, ενώ αντίθετα αυτοί που

εκτίθενται στο φάρμακο για μικρό χρονικό διάστημα φαίνεται να προστατεύονται περισσότερο από τον γενικό πληθυσμό.

Η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση είναι επίσης πιθανή, είτε άμεσα είτε έμμεσα. Ο άμεσος τρόπος έγκειται στο γεγονός ότι ο υποδοχέας εκφράζεται στις οστεοβλάστες και στις οστεοκλάστες, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Ο έμμεσος τρόπος έγκειται στην αναστολή της συγκόλλησης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων τα οποία είναι γνωστό ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στα αρχικά στάδια της επούλωσης. Συγκεκριμένα, στα κοκκία των αιμοπεταλίων βρίσκονται αποθηκευμένες και απελευθερώνονται περισσότερες από 300 βιολογικά δραστικές ουσίες όπως αυξητικοί παράγοντες, χημειοκίνες και κυττοκίνες. Καθώς τα αιμοπετάλια προάγουν την αιμόσταση, διαφαίνεται επιπλέον ότι μέσω των ανωτέρω ουσιών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, στην ανοσιακή απάντηση, στην επούλωση, στην αγγειογένεση και στον οστικό μεταβολισμό. Το έκκριμα των αιμοπεταλίων δρα υποστηρικτικά στην οστική αναγέννηση ενισχύοντας την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεογεννητικών κυττάρων, προάγοντας τη σύνθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και αυξάνοντας την νεοαγγειογένεση. Έχει βρεθεί ότι ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) και ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF- β) που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια αποτελούν τους βασικότερους παράγοντες που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την έναρξη σχηματισμού νέου οστού^{132, 133}. Σε περίπτωση κατάγματος αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου PDGF-A σε διάφορες κυτταρικές σειρές και ιδιαίτερα στις οστεοβλάστες. Ο παράγοντας PDGF, που εκκρίνεται τόσο από τα αιμοπετάλια όσο και από τις οστεοβλάστες, συνδέεται στους υποδοχείς α και β της επιφανείας των οστεοβλαστών, η έκφραση των οποίων επίσης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της οστικής επούλωσης^{134, 135}. Ο PDGF προάγει επίσης την αύξηση του δικτύου των τριχοειδών αγγείων και ενεργοποιεί τα μακροφάγα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον «καθαρισμό» του οστικού τραύματος¹³⁶. Ο TGF- β συντίθεται σε αρκετούς ιστούς, αλλά τα

αιμοπετάλια και το οστό αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής του. Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων και των προστεοβλαστών, την σύνθεση κολλαγόνου από τις ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα προς αγγειογένεση¹³⁷. Έχει βρεθεί επίσης ότι ο TGF-β προάγει τη σύνθεση της οστεοπροτεγερίνης (OPG) η οποία αναστέλλει τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεοκλάστες και μειώνει τη δραστικότητα των ώριμων οστεοκλαστών. Η δράση της OPG οφείλεται στην παρεμπόδιση της σύνδεσης του Συνδέτη του Ενεργοποιητή του Υποδοχέα του Πυρηνικού Παράγοντα κΒ (RANKL). Ο RANKL συνδέεται στον Ενεργοποιητή του Υποδοχέα του Πυρηνικού Παράγοντα κΒ (RANK) που βρίσκεται στους προστεοκλάστες και προκαλεί τη διαφοροποίησή τους προς ώριμους οστεοκλάστες, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τους ώριμους οστεοκλάστες για την έναρξη απορρόφησης οστού. Οι διαφοροποιήσεις στην αναλογία RANKL/OPG αποτελούν βασικό ρυθμιστικό παράγοντα απορρόφησης – εναπόθεσης οστού κατά τη διαδικασία του οστικού ανασχηματισμού (remodeling).

Ένας άλλος ρόλος των αιμοπεταλίων είναι η έμμεση εμπλοκή τους στην επούλωση μέσω της συμμετοχής τους στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την διαδικασία της επούλωσης. Μελέτες έχουν επισημάνει ότι τα αιμοπετάλια στην περιοχή του τραύματος αλληλεπιδρούν με τα αμυντικά κύτταρα μέσω ειδικών σηματοδοτικών μεμβρανικών μορίων, όπως η Ρ-σελεκτίνη και ο CD40L¹³⁸. Επιπλέον, ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) προάγει την διαπίδυση των μακροφάγων στην περιοχή του τραύματος¹³⁹. Η αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με τα μακροφάγα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως παράγοντα νέκρωσης των όγκων -α (TNF-α), ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και ιντρελευκίνης-6 (IL-6), οι οποίοι έχει αποδειχτεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον οστικό μεταβολισμό^{140, 141}. Ιδιαίτερα ο TNF-α φαίνεται ότι έχει δόσο-εξαρτώμενη δράση στον οστικό μεταβολισμό, με μικρές ποσότητες να προάγουν την δημιουργία νέου οστού ενώ μεγαλύτερες να οδηγούν σε αναστολή της εναπόθεσής του και οστική απορρόφηση¹⁴².



Εικόνα 18. Σχηματική παράσταση της εμπλοκής των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση, στις φλεγμο-νώδεις αντιδράσεις και την οστεογένεση κατά τα αρχικά στάδια της οστικής επούλωσης. (Από Λιλλής 2012)

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικός όχι μόνο στην οστική επούλωση αλλά και στην οστεοενσωμάτωση. Η παρουσία ενός βιοϋλικού, όπως το τιτάνιο, μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό και το ποσοστό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων¹⁴³⁻¹⁴⁶. Έχει βρεθεί ότι η επιφάνεια του τιτανίου απορροφά ινωδογόνο από την εξωκυττάρια ουσία, το οποίο με τη σειρά του έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών GPIIb-IIIa της μεμβράνης του αιμοπεταλίου¹⁴⁷. Η σύνδεση αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την έκκριση του περιεχομένου των α-κοκκίων. Οι Davies και Park¹⁴⁸ θεωρούν ότι η αύξηση της αδρότητας της επιφάνειας του εμφυτεύματος οδηγεί σε μεγαλύτερη απορρόφηση ινωδογόνου και συνεπώς ενεργοποίηση περισσότερων αιμοπεταλίων επί της επιφάνειας του τιτανίου και

έκκριση μεγαλύτερης ποσότητας αυξητικών παραγόντων, επιταχύνοντας έτσι την επούλωση.

3.5. Περιεγχειρητική αντιμετώπιση ασθενή υπό αγωγή με κλοπιδογρέλη

Την τελευταία δεκαετία απασχολεί ιδιαίτερα το ζήτημα του ορθού τρόπου περιεγχειρητικής αντιμετώπισης των ασθενών που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, καθώς η προκαλούμενη διαταραχή στο μηχανισμό της αιμόστασης είναι δυνατό να οδηγήσει σε αύξηση της πιθανότητας κάποιας σοβαρής διεγχειρητικής ή μετεγχειρητικής αιμορραγικής επιπλοκής. Κατά τα πρώτα χρόνια χρήσης του φαρμάκου είχε επικρατήσει η πρακτική της προσωρινής διακοπής του πριν από την εκτέλεση χειρουργικών επεμβάσεων προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος των αιμορραγικών επιπλοκών. Η πρακτική αυτή ωστόσο δεν ήταν τεκμηριωμένη και βασίστηκε περισσότερο σε εμπειρικές παρατηρήσεις και στην αντιστοιχία με το τι γινόταν έως τότε με τους ασθενείς υπό αντιπηκτική αγωγή. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι καρδιαγγειακοί ασθενείς βρισκόταν υπό χρόνια αντιαιμοπεταλιακή αγωγή δεν κίνησε τις υποψίες ότι η προσωρινή διακοπή της για 5-7 ημέρες ενέχει κάποιο κίνδυνο.

Ωστόσο, διάφορες μελέτες έδειξαν ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 2000 ότι η προσωρινή διακοπή της αγωγής είναι δυνατό να οδηγήσει σε περιεγχειρητικά μικρή αύξηση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων, τα οποία όμως είναι δυνητικά θανατηφόρα. Το 1999, οι Mitchell S.M. και Sethia K.¹⁴⁹ παρατήρησαν ότι μια σειρά ασθενών που διέκοψαν προσωρινά την αντιαιμοπεταλιακή αγωγή για να υποβληθούν σε διουρηθρική προστατεκτομή εμφάνισαν θρομβοεμβολικές επιπλοκές. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από μετέπειτα μεγαλύτερες κλινικές μελέτες^{150, 151}. Σε μια σχετικά πρόσφατη μετα-ανάλυση, με συνολικό μέγεθος δείγματος 50.279 ασθενείς, βρέθηκε ότι η προσωρινή διακοπή της αγωγής αυξάνει κατά 3 φορές την πιθανότητα ισχαιμικού επεισοδίου¹⁵². Η κατάσταση αυτή αναφέρεται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στο φαινόμενο αναπήδησης (rebound effect) που εμφανίζεται έπειτα από προσωρινή διακοπή των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων¹⁵³. Επίσης, ιδιαίτερα στους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε διαδερμική στεφανιαία

αγγειοπλαστική με τοποθέτηση ενδοστεφανιαίας πρόθεσης (stent) οι οποίοι λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή τον πρώτο χρόνο, η προσωρινή διακοπή της μπορεί να αυξήσει σημαντικά την πιθανότητα θρόμβωσης¹⁵⁴. Οι ανωτέρω μελέτες οδήγησαν σε επανεκτίμηση της πρακτικής της προσωρινής διακοπής των αντιαιμοπεταλιακών πριν από χειρουργικές επεμβάσεις και επαναπροσδιορισμό των οφελών και των κινδύνων που συνεπάγεται αυτή η πρακτική.

Σε μια μετα-ανάλυση 41 κλινικών μελετών από διάφορες χειρουργικές ειδικότητες οι Burger και συν.¹⁵⁵ βρήκαν ότι σε ασθενείς που λαμβάνουν μονοθεραπεία με ασπιρίνη υπάρχει αυξημένη πιθανότητα αιμορραγίας κατά 1,5 φορά εάν δεν διακοπεί η ασπιρίνη, χωρίς ωστόσο να αυξάνεται η νοσηρότητα και η θνητότητα της επέμβασης. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η πιθανότητα σοβαρής αιμορραγικής επιπλοκής εξαρτάται από το είδος της επέμβασης που εκτελείται. Για παράδειγμα, σε ενδοκρανιακές επεμβάσεις¹⁵⁶ ή προστατεκτομές¹⁵⁷ ο κίνδυνος φαίνεται να είναι πιο αυξημένος σε σχέση με δερματολογικές επεμβάσεις¹⁵⁸. Για την περίπτωση της κλοπιδογρέλης υπάρχουν αμφιλεγόμενες απόψεις, με ορισμένες μελέτες να υποστηρίζουν αυξημένα ποσοστά εμφάνισης σοβαρής αιμορραγίας και άλλες το αντίθετο¹⁵⁹⁻¹⁶². Σε πρόσφατες ανασκοπήσεις αναφέρεται ότι στην περίπτωση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής η ανάγκη για μετάγγιση αίματος αυξάνεται κατά 50% περίπου, αλλά χωρίς να συνδυάζεται από αύξηση της νοσηρότητας ή της θνητότητας, εκτός από την περίπτωση ενδοκρανιακών επεμβάσεων^{163, 164}.

Όσον αφορά τη χειρουργική του στόματος, που ασχολείται κατά κανόνα με ελάχιστον χειρουργικές επεμβάσεις υπό τοπική αναισθησία, σε προηγούμενη μεταπτυχιακή διπλωματική του υποψηφίου διδάκτορα¹⁶⁵, η οποία αποτέλεσε διεθνώς την πρώτη σχετική προοπτική μελέτη που περιελάμβανε και ασθενείς υπό διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, βρέθηκε ότι η μη διακοπή της αγωγής (μονής ή διπλής) πριν από εξαγωγές δοντιών, δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών αιμορραγικών επιπλοκών. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια από πλήθος άλλων μελετών¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ αλλά και συστηματικών ανασκοπήσεων¹⁷⁰⁻¹⁷³. Όσον αφορά την ορθοπαιδική χειρουργική

το ζήτημα βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση¹⁷⁴. Ωστόσο, ολοένα και αυξανόμενος αριθμός μελετών υποστηρίζουν ότι και στην περίπτωση της ορθοπαιδικής η αγωγή δεν θα πρέπει να διακόπτεται σε τουλάχιστον σε επεμβάσεις χαμηλού αιμορραγικού κινδύνου¹⁷⁵⁻¹⁷⁹. Επιπλέον, οι κατευθυντήριες οδηγίες της American Association of Orthopedic Surgeons όσον αφορά στην αντιμετώπιση των καταγμάτων ισχίου σε ηλικιωμένους ασθενείς, προτείνουν την άμεση επέμβαση χωρίς καθυστέρηση και για τις περιπτώσεις που οι ασθενείς λαμβάνουν ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη¹⁸⁰.

Οι ανωτέρω παρατηρήσεις δημιούργησαν εύλογα τον προβληματισμό σχετικά με την ποιότητα της οστικής επούλωσης και της οστεονεσωμάτωσης σε περιπτώσεις καρδιολογικών ασθενών που είτε συνεχίζουν να λαμβάνουν το φάρμακο διεγχειρητικά και μετεγχειρητικά είτε διακόπτουν προσωρινά για λίγες ημέρες και ξαναρχίζουν την αγωγή αμέσως μετά την χειρουργική επέμβαση συνεχίζοντάς την καθόλη τη μετεγχειρητική περίοδο.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η πρόοδος της Ιατρικής και η αύξηση του προσδόκιμου ζωής έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση των ασθενών που βρίσκονται υπό χρόνια φαρμακευτική αγωγή. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί αρκετή ερευνητική βαρύτητα στη μελέτη των φαρμάκων που μπορεί να επιδρούν άλλοτε αρνητικά και άλλοτε θετικά στις διαδικασίες της οστικής επούλωσης. Η μελέτη του ανωτέρω ζητήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική για επιστημονικούς κλάδους όπως η ορθοπαιδική ή η χειρουργική του στόματος και των γνάθων, που ασχολούνται με την αποκατάσταση του οστίτη ιστού και την ενδοοστική τοποθέτηση μεταλλικών εμφυτευμάτων. Τα αποτελέσματα τέτοιων ερευνών δεν αποδίδουν μόνο σημαντικές πληροφορίες για τον βέλτιστο τρόπο αντιμετώπισης των τραυματικών κακώσεων των οστών στους ασθενείς υπό χρόνια φαρμακευτική αγωγή, αλλά σε πολλές περιπτώσεις προσθέτουν σημαντική γνώση στην κατανόηση βασικών βιολογικών διεργασιών της οστικής επούλωσης που οδηγούν σε καινοτόμες εφαρμογές για την επιτάχυνση αυτής.

Μια σημαντική κατηγορία ασθενών υπό χρόνια φαρμακευτική αγωγή αποτελούν οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, ο αριθμός των οποίων αυξάνει συνεχώς λόγω της αυξανόμενης επίπτωσης των καρδιαγγειακών νοσημάτων στα αναπτυγμένα κράτη. Η κλοπιδογρέλη αποτελεί ένα από τα συχνότερα συνταγογραφούμενα φάρμακα της κατηγορίας αυτής. Τα παλαιότερα έτη η περιεγχειρητική αντιμετώπιση των ασθενών υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή βασιζόταν στην προσωρινή διακοπή της λήψης των φαρμάκων αυτών με σκοπό την αποφυγή της δι- και μετεγχειρητικής αιμορραγίας. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι ακόμη και η ολιγοήμερη προσωρινή διακοπή της αγωγής αυξάνει την πιθανότητα θρομβοεμβολικών επιπλοκών. Η ανωτέρω πρακτική άρχισε να αναθεωρείται σε αρκετές χειρουργικές ειδικότητες, καθώς διάφορες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι περισσότερες χειρουργικές επεμβάσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν υπό συνεχιζόμενη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, με σκοπό την αποφυγή των θρομβοεμβολικών επιπλοκών. Ωστόσο, όπως αναλύθηκε και στο γενικό μέρος

η παρουσία περιεγχειρητικά ενός φαρμάκου για το οποίο υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό και την επούλωση, δημιουργεί προβληματισμούς. Ακόμα όμως και στην περίπτωση της περιεγχειρητικής διακοπής της αγωγής με κλοπιδογρέλη, αυτή είναι προσωρινή για λίγες ημέρες και η επίδρασή της ενδέχεται επίσης να επηρεάζει τις επουλωτικές διαδικασίες του οστού που διαρκούν για αρκετό χρονικό διάστημα μετεγχειρητικά. Οι ανωτέρω διαπιστώσεις αποτέλεσαν το έναυσμα για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής.

Στα πλαίσια, λοιπόν, της ερευνητικής προσπάθειας για διερεύνηση των φαρμάκων που μπορεί να επηρεάζουν την οστική επούλωση, ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη σε πειραματικό ζωικό πρότυπο της επίδρασης της συστηματικής χορήγησης κλοπιδογρέλης: α) στην επούλωση οστικών ελλειμμάτων κρανίου και β) στην οστεοενσωμάτωση εμφυτευμάτων τιτανίου στον έσω μηριαίο κόνδυλο.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Τα χειρουργεία για τις ανάγκες της μελέτης διεξήχθησαν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Αδειοδότησης Πρωτοκόλλων της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Κεντρικής Μακεδονίας για την τήρηση των κανόνων ηθικής και δεοντολογίας για πειραματισμούς σε ζώα εργαστηρίου συμφώνως με το ΠΔ 56/2013 (ΦΕΚ Α' 106/10-5-2013) «*Προσαρμογή της ελληνικής νομοθεσίας στην Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 "σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς"*». Οι ακτινολογικές και ιστολογικές διαδικασίες της μελέτης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο ιστολογίας οστού του Εργαστηρίου Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής, Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας και Ακτινολογίας του Τμήματος Οδοντιατρικής Α.Π.Θ. σε συνεργασία με την Πανεπιστημιακή Ορθοπαιδική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

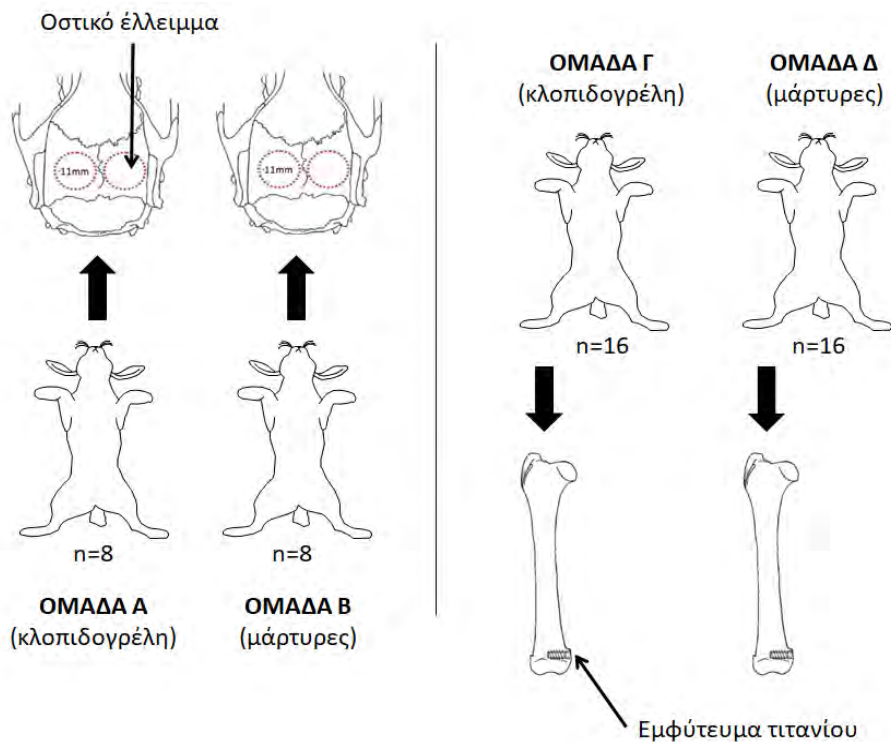
2.1 Ζωικό πρότυπο και σχεδιασμός της μελέτης

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 48 αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας με μέσο όρο βάρους 4,8 kg και ηλικίας 28 εβδομάδων σε πλήρη σκελετική ανάπτυξη. Τα κουνέλια παρέμεναν σε ατομικούς κλωβούς, τρεφόταν *ad libitum* και είχαν εγκλιματιστεί για τουλάχιστον μια εβδομάδα πριν την έναρξη του πειραματισμού.

Ο σχεδιασμός και η εκπόνηση της μελέτης περιλάμβανε δύο σκέλη (Εικ.19). Στην πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε πειραματική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στο μοντέλο του κρίσιμου μεγέθους κρανιακού οστικού ελλείμματος. Για τις ανάγκες της πρώτης φάσης χρησιμοποιήθηκαν 16 κουνέλια τα οποία χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες Α και Β. Η δεύτερη φάση περιλάμβανε πειραματική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην ενσωμάτωση κοχλιωτών εμφυτευμάτων

τιτανίου στον έσω μηριαίο κόνδυλο, για τις ανάγκες τις οποίας χρησιμοποιήθηκαν 32 κουνέλια τα οποία επίσης χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες Γ και Δ.

Οι ομάδες Α και Γ αποτέλεσαν τις ομάδες ελέγχου όπου τα κουνέλια ελάμβαναν δόση κλοπιδογρέλης 3 mg/kg ημερησίως, η οποία έχει φανεί από προηγούμενη μελέτη ότι προκαλεί αντίστοιχη αντισταμοπεταλιακή δράση με αυτή των 75 mg ημερησίως στον άνθρωπο¹⁸¹. Η κλοπιδογρέλη χορηγούνταν per os αναμεμιγμένη με πολτό φρούτων μέσω ειδικής σύριγγας στο στόμα του κουνελιού. Η έναρξη της αγωγής σε κάθε κουνέλι γινόταν μια εβδομάδα πριν την πραγματοποίηση των χειρουργικών επεμβάσεων και διαρκούσε για έξι εβδομάδες μετεγχειρητικά, οπότε και πραγματοποιούνταν η ευθανασία του ζώου. Οι ομάδες Β και Δ αποτέλεσαν τις ομάδες μαρτύρων όπου τα κουνέλια ελάμβαναν ημερησίως μόνο τον πολτό φρούτων, με την ανωτέρω αναφερόμενη διαδικασία.



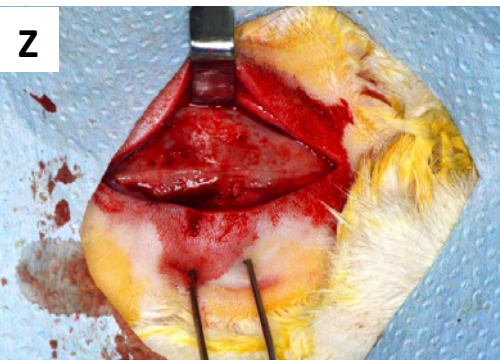
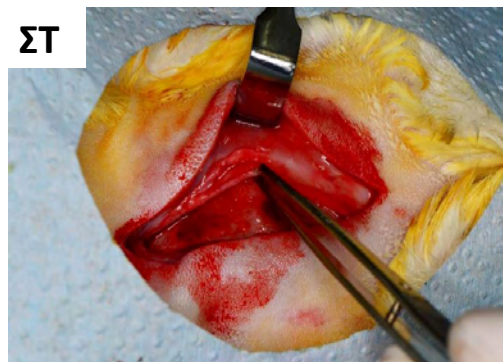
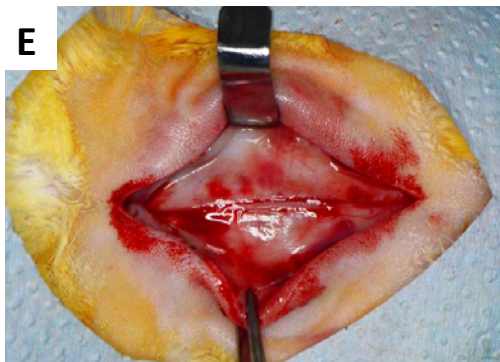
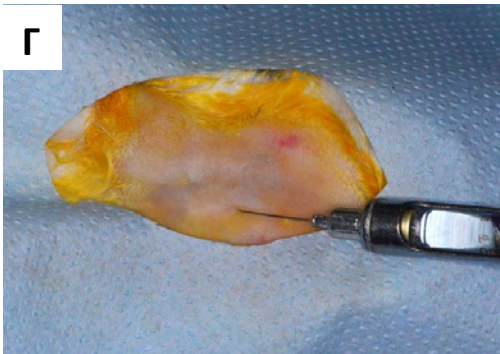
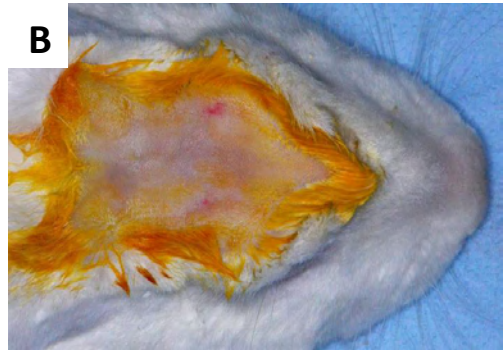
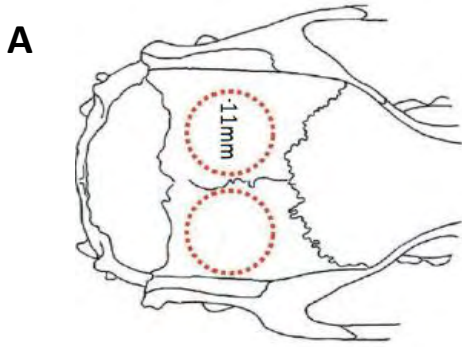
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του σχεδιασμού και των ομάδων της μελέτης.

2.2. Χειρουργικές επεμβάσεις

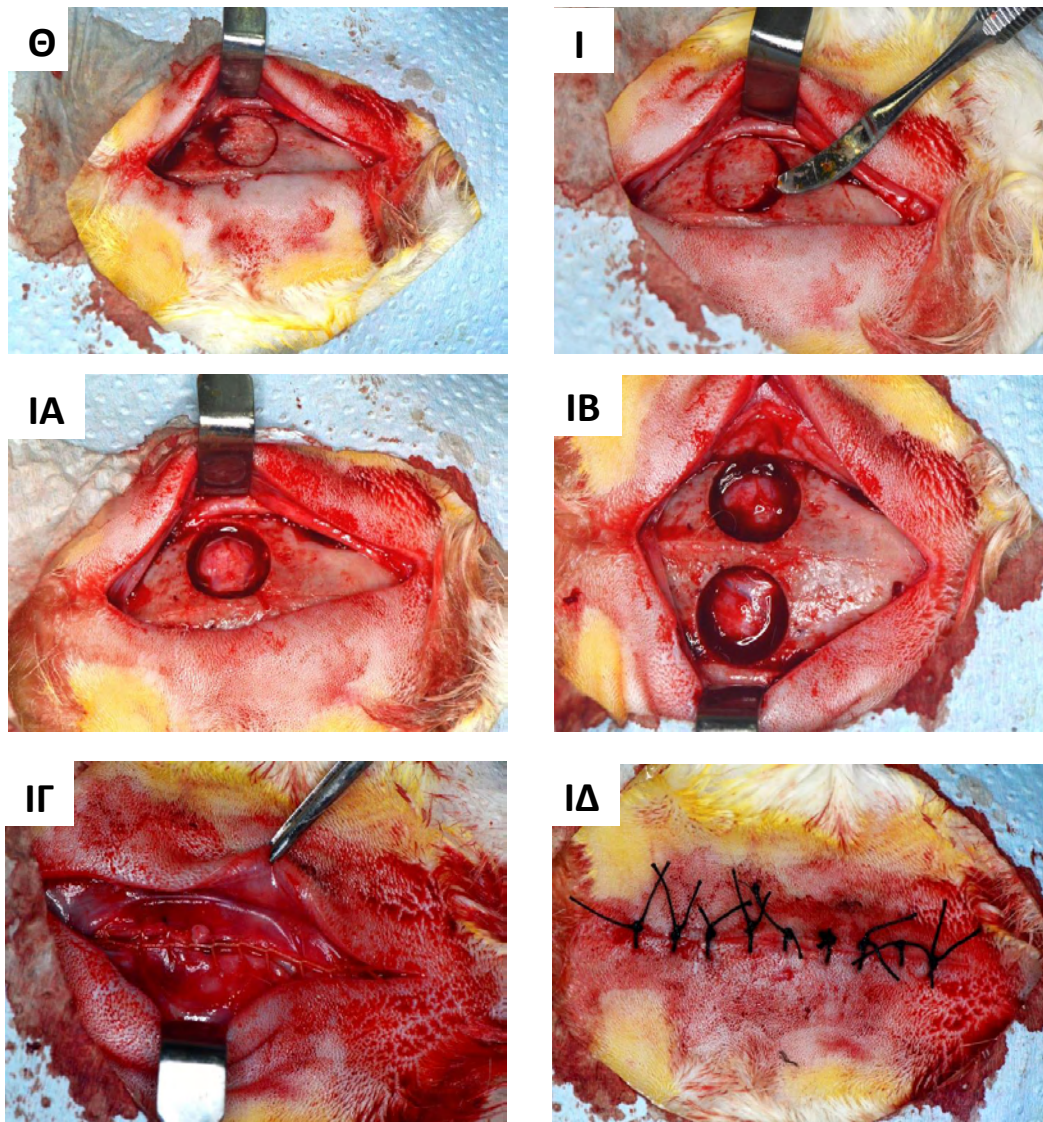
Σε όλες τις ομάδες οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν μια εβδομάδα μετά την έναρξη της αγωγής. Κάθε κουνέλι μια ώρα πριν την εισαγωγή στην αναισθησία ελάμβανε περιεγχειρητική χημειοπροφύλαξη με ενροφλοξασίνη 10 mg/kg υποδορίως (BAYTRIL, Bayer, Germany). Η γενική αναισθησία πραγματοποιούνταν με χορήγηση ενδομυϊκώς ξυλαζίνης 2-5 mg/kg (ROMPUN 20, Bayer, Germany) και κεταμίνης 20-30 mg/kg (IMALGENE 1000, Merial SA, France). Ο έλεγχος επίτευξης γενικής αναισθησίας γινόταν με το αντανακλαστικό του κερατοειδούς.

2.2.1 Δημιουργία οστικών ελλειμμάτων κρανίου (Ομάδες Α και Β)

Σε κάθε κουνέλι των ομάδων Α και Β πραγματοποιήθηκε προετοιμασία του χειρουργικού πεδίου με επιμελές ξύρισμα της βρεγματικής και μετωπιαίας χώρας και αντισηψία με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης 10% (BETADINE, Mundipharma Pte Ltd, Singapore). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τοπική αναισθησία με διάλυμα λιδοκαΐνης 2% με επινεφρίνη 1:80.000 (LIGNOSPAN, Septodont Ltd, France) στην περιοχή της επέμβασης. Στο κρανίο κάθε κουνελιού πραγματοποιήθηκε μέση οβελιαία τομή και ακολούθησε παρασκευή δερμο-περιοστικού κρημνού για την αποκάλυψη των υποκείμενων βρεγματικών οστών. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν δύο κυκλικά οστικά ελλείμματα ολικού πάχους και διαμέτρου 11 mm εκατέρωθεν της οβελιαίας ραφής, με περιστροφικό κοπτικό εργαλείο οστικής βιοψίας τύπου trephine υπό συνεχή καταιονισμό φυσιολογικού ορού. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες το έλλειμμα των ανωτέρω διαστάσεων θεωρείται κρίσιμου μεγέθους^{182, 183}. Ακολούθησε τέλος συρραφή του περισστού και των υπερκείμενων ιστών (κατά στρώματα) με απορροφήσιμα ράμματα πολυγλακτίνης 4/0 και ράμματα μετάξης 3/0 (NEOSORB, Medipac SA, Greece), ώστε τα ελλείμματα να αφεθούν προς αυθόρμητη επούλωση, χωρίς την τοποθέτηση μοσχευματικού υλικού ή μεμβράνης (Εικ. 20).



Εικόνα 20 (συνεχίζεται). Χειρουργική επέμβαση δημιουργίας οστικών ελλειμμάτων.



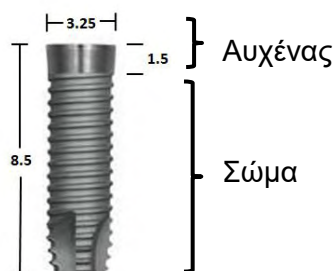
Εικόνα 20 (συνεχίζεται). Χειρουργική επέμβαση δημιουργίας οστικών ελλειμμάτων.

2.2.2. Τοποθέτηση εμφυτευμάτων τιτανίου (Ομάδες Γ και Δ)

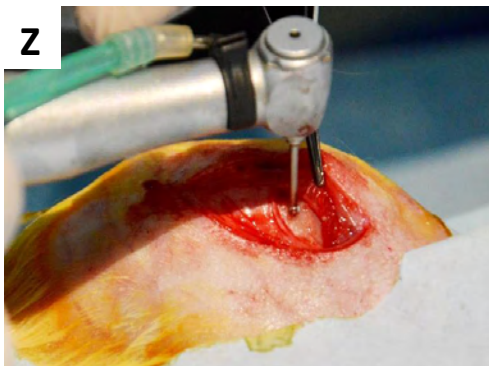
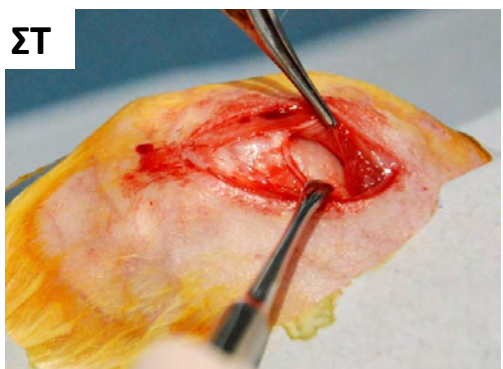
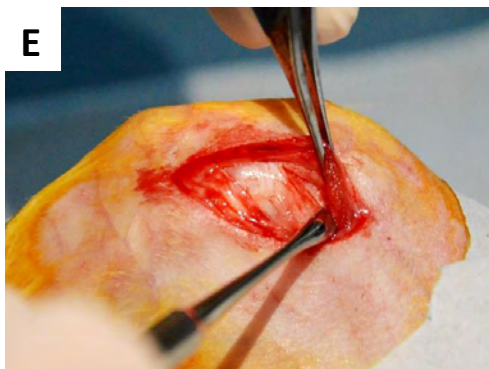
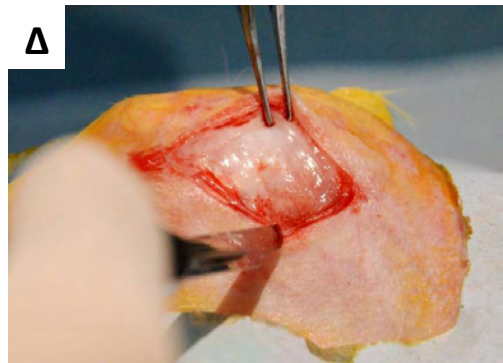
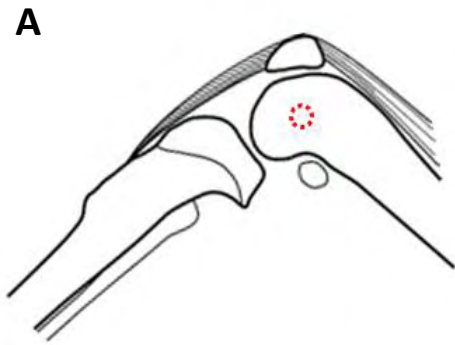
Στα κουνέλια των ομάδων Γ και Δ, όπως ήδη αναφέρθηκε, έγινε τοποθέτηση εμφυτεύματος τιτανίου στον έσω μηριαίο κόνδυλο του αριστερού οπισθίου σκέλους. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκε κοχλιωτό οδοντικό εμφύτευμα, παράλληλων τοιχωμάτων διαμέτρου 3,25 mm και μήκους 8,5 mm

(NANOTITE™ PARALLEL WALLED CERTAIN, Biomet 3i, USA). Το συγκεκριμένο εμφύτευμα παρουσιάζει μια ζώνη 1,5 mm αυχενικά η οποία είναι λεία, ενώ το υπόλοιπο σώμα του εμφυτεύματος μέχρι το κοπτικό του άκρο είναι αδροποιημένο με αμμοβόληση και οξική κατεργασία (**Εικ. 21**).

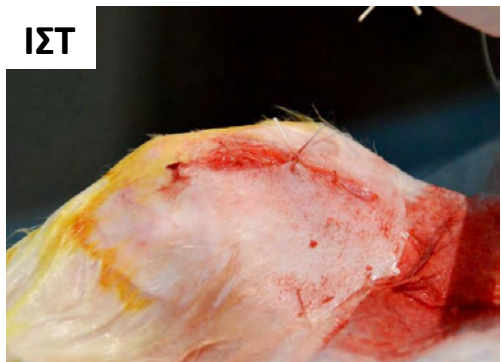
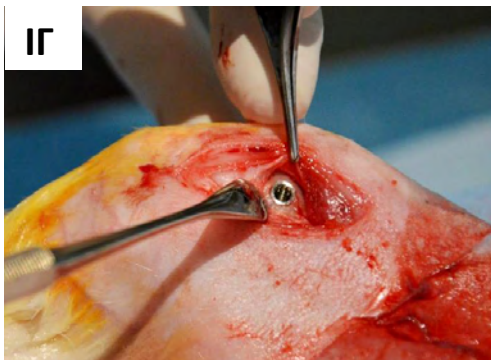
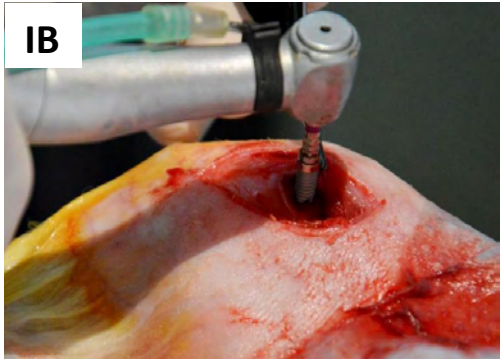
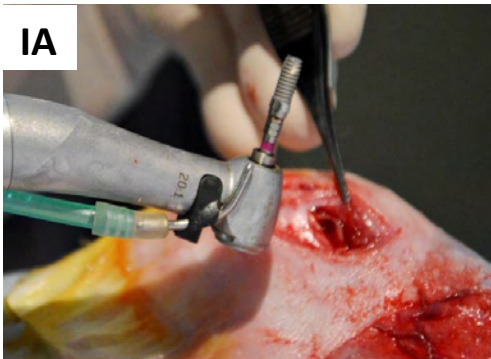
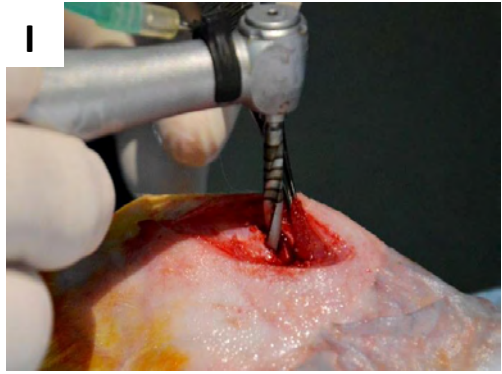
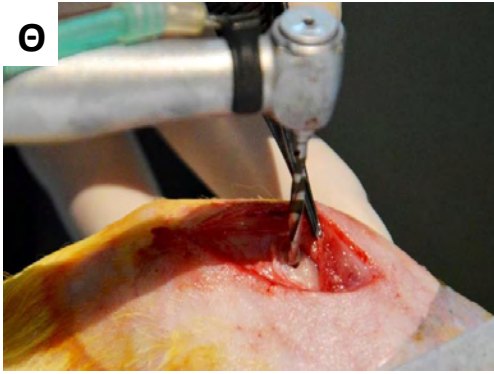
Σε κάθε κουνέλι των ομάδων Γ και Δ πραγματοποιήθηκε προετοιμασία του χειρουργικού πεδίου με επιμελές ξύρισμα της έσω επιφάνειας του δεξιού κάτω άκρου αντίστοιχα προς την κατά γόνυ άρθρωση και αντισηψία με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης 10% (BETADINE, Mundipharma Pte Ltd, Singapore). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της επέμβασης τοπική αναισθησία με διάλυμα λιδοκαΐνης 2% με επινεφρίνη 1:80.000 (LIGNOSPAN, Septodont Ltd, France). Ακολούθως, πραγματοποιούνταν τομή στην εσωτερική επιφάνεια του γόνατος, παρασκευή των μυϊκών ομάδων και αποκάλυψη του έσω μηριαίου κονδύλου (προσπέλαση κατά Henderson). Η προετοιμασία του οστού για την τοποθέτηση του εμφυτεύματος περιλάμβανε τη δημιουργία εντυπώματος με στρογγύλη εγγλυφίδα, αρχικό τρυπανισμό με φρέζα (τρύπανο για την οδοντιατρική) διαμέτρου 2 mm και διεύρυνση της αρχικής οπής (οστικό φρεάτιο) με φρέζα διαμέτρου 3 mm, υπό συνεχή καταιονισμό φυσιολογικού ορού με περιστροφική ταχύτητα 1200 στροφών/λεπτό. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν η κοχλίωση του εμφυτεύματος χωρίς καταιονισμό φυσιολογικού ορού με ταχύτητα 15 στροφών/λεπτό. Τέλος, γινόταν συρραφή του περιοστέου επάνω από το εμφύτευμα και των υπερκείμενων ιστών (κατά στρώματα) με απορροφήσιμα ράμματα πολυγλακτίνης 4/0 (NEOSORB, Medipac SA, Greece) (**Εικ. 22**).



Εικόνα 21. Μορφολογία και μετρικά στοιχεία του εμφυτεύματος τιτανίου.



Εικόνα 22 (συνεχίζεται). Χειρουργική επέμβαση τοποθέτησης του εμφυτεύματος τιτανίου.



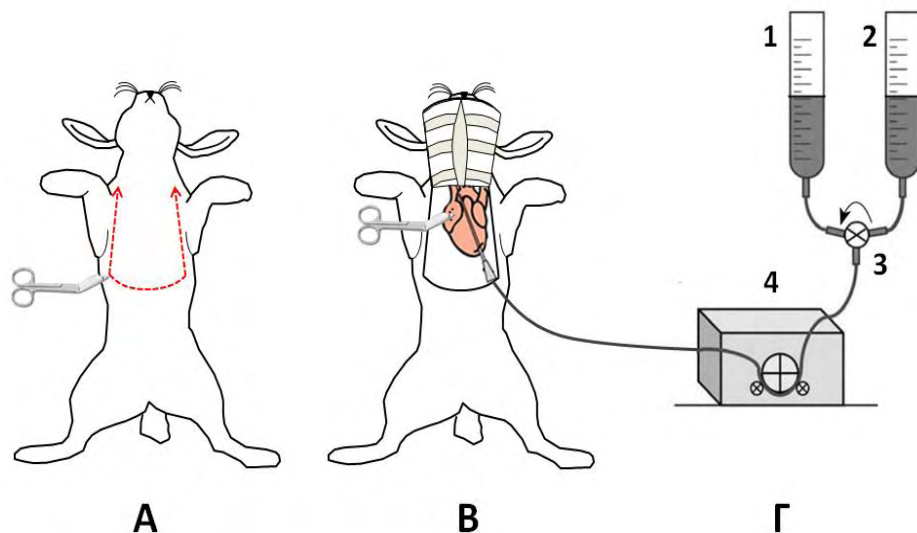
Εικόνα 22 (συνέχεια). Χειρουργική επέμβαση τοποθέτησης του εμφυτεύματος τιτανίου.

2.3 Ευθανασία και μονιμοποίηση ιστών

Έξι εβδομάδες μετεγχειρητικά πραγματοποιήθηκε η ευθανασία των κουνελιών με υψηλή δόση αναισθητικού. Ευθύς αμέσως ξεκινούσε η διαδικασία μονιμοποίησης των ιστών ολοκλήρου του σώματος του ζώου. Η διαδικασία περιλάμβανε αρχικά τη διενέργεια πρόσθιας εγκάρσιας θωρακοτομής στο ύψος της ξιφοειδούς αποφύσεως με αποκοπή των κατώτερων πλευρών. Στη συνέχεια γινόταν ανάσπαση του προσθίου θωρακικού τοιχώματος, προσπέλαση μέσω του μεσοθωρακίου στην καρδιά και αποκοπή του περικαρδίου. Ακολούθως πραγματοποιούνταν καθετηριασμός της αριστερής κοιλίας μέσω της κορυφής της καρδιάς με βελόνη διαμέτρου 1,2 mm και ταυτόχρονα πραγματοποιούνταν διάσχιση του δεξιού ωπίου. Η βελόνη καθετηριασμού ήταν συνδεδεμένη με σύστημα ορού το οποίο με τη σειρά του ήταν συνδεδεμένο με ειδική προωθητική αντλία υγρών. Μέσω της προωθητικής αντλίας χορηγούνταν αρχικά φυσιολογικός ορός, η διέλευση του οποίου μέσω της αριστερής κοιλίας, της συστηματικής κυκλοφορίας και τελικά εξόδου του από το δεξιό ωτίο προκαλούσε αφαίμαξη του ζώου και έκπλυση των αιμοφόρων αγγείων. Στη συνέχεια και πάλι με τη βοήθεια της αντλίας μέσω της ίδιας οδού προωθούνταν στην κυκλοφορία ουδέτερο διάλυμα φορμόλης 10% το οποίο προκαλούσε την ολική μονιμοποίηση του σώματος του ζώου (**Εικ. 23**).

Η ανωτέρω διαδικασία μονιμοποίησης θεωρείται διαδικασία εκλογής όταν πρόκειται να ακολουθήσουν ιστολογικές διαδικασίες στο σκελετό, καθώς το διάλυμα φορμόλης εμποτίζει και μονιμοποιεί τον οστίτη ιστό μέσω της τριχοειδικής κυκλοφορίας. Αντίθετα, η διαδικασία λήψης των οστικών τεμαχίων ενδιαφέροντος αμέσως μετά την ευθανασία και η μονιμοποίησή τους με εμβάπτιση σε διάλυμα φορμόλης οδηγεί συχνά σε ατελή μονιμοποίηση του ιστοτεμαχίου, λόγω της δυσκολίας διήθησης της φορμόλης στον πυκνό οστίτη ιστό.

Με το πέρας της διαδικασίας μονιμοποίησης πραγματοποιήθηκε η λήψη των οστικών τεμαχίων ενδιαφέροντος, δηλαδή της βρεγματικής-μετωπιαίας επιφάνειας του κρανίου ή του περιφερικού τμήματος του μηριαίου, αναλόγως της ομάδας στην οποία ανήκε το κουνέλι.



Εικόνα 23. Διαδικασία και διάταξη για τη μονιμοποίηση ολοκλήρου του σώματος του κουνελιού. (1) φυσιολογικός ορός, (2) διάλυμα φορμόλης 10%, (3) διακόπτης τύπου three-way και (4) προωθητική αντλία.

2.4 Ακτινολογική μελέτη ελλειμμάτων κρανίου

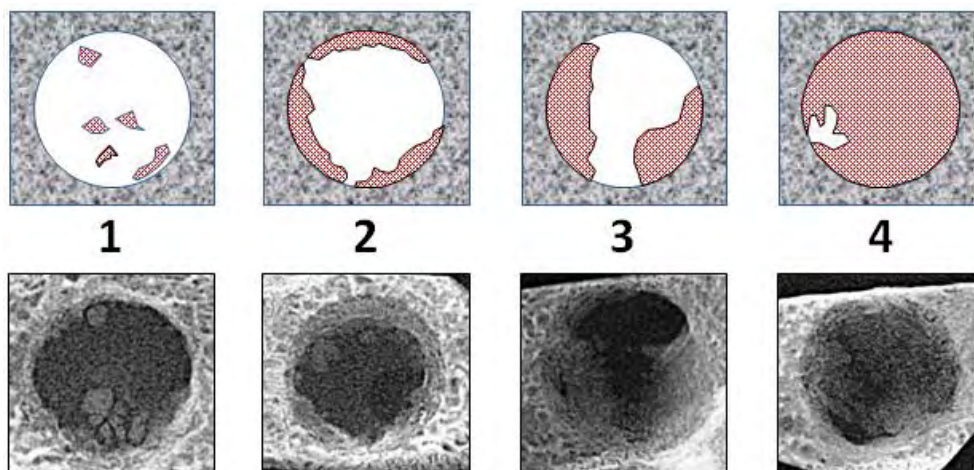
Στα ιστοτεμάχια που ελήφθησαν από τα κρανία των κουνελιών των ομάδων Α και Β, διενεργήθηκε ακτινολογική μελέτη πριν την περαιτέρω επεξεργασία τους για τη δημιουργία ιστολογικών παρασκευασμάτων. Από κάθε ιστοτεμάχιο έγινε λήψη ψηφιακής ακτινογραφίας με τη χρήση οδοντιατρικού ακτινολογικού μηχανήματος (X-Mind AC, Satelec Acteon Group, Merignac, France) και ανιχνευτή συζευγμένου φορτίου (charge-coupled device/ CCD sensor) (Sopix2, Sopro Acteon Imaging, La Ciota, France). Όλες οι ακτινογραφίες ελήφθησαν από την ίδια απόσταση και υπό τις ίδιες παραμέτρους ακτινοβολήσης (70kV, 8mA, 0.125 sec χρόνος έκθεσης). Οι ψηφιακές ακτινογραφίες μεταφέρθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και πραγματοποιήθηκε η αξιολόγησή τους.

Η αξιολόγηση της γεφύρωσης και πλήρωσης των οστικών ελλειμμάτων με νέο οστό έγινε με τη χρήση της βαθμονομημένης ποιοτικής κλίμακας που

περιγράφεται από τους Patel και συν.¹⁸⁴. Η κλίμακα περιλαμβάνει πέντε βαθμίδες:

- (0) καθόλου νέο οστό εντός του ελλείμματος
- (1) λίγες νησίδες νέου οστού, διάσπαρτες εντός του ελλείμματος
- (2) παρουσία νέου οστού μόνο στα χείλη του ελλείμματος
- (3) μερική γεφύρωση του ελλείμματος, αλλά όχι στη μέγιστη διάσταση (διάμετρο) αυτού
- (4) γεφύρωση του ελλείμματος στη μέγιστη διάσταση (διάμετρο) αυτού
(Εικ. 24).

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τυφλά από δύο ανεξάρτητους εξεταστές.



Εικόνα 24. Σχηματική παράσταση της ακτινολογικής κλίμακας (επάνω) και αντίστοιχα ενδεικτικές ακτινογραφίες (κάτω).

2.5 Ιστολογική μελέτη

Στα μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια οστού έγινε αρχικά έκπλυση με απεσταγμένο νερό και ακολούθησε η διαδικασία παρασκευής μη απασβεστωμένων ιστολογικών παρασκευασμάτων εγκιβωτισμένων σε ρητίνη, με τη χρήση των συσκευών του συστήματος EXAKT (EXAKT Advanced

Technologies GmbH, Germany), όπως αυτή περιγράφεται από τους Donath και συν.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αφυδάτωσή τους με εμβάπτιση σε υδατικά διαλύματα αλκοόλης προοδευτικά αυξανόμενης συγκέντρωσης ανά δύο ημέρες (50%, 70%, 90%, 100%, 100%, 100%). Στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε αλκοολικά διαλύματα μεθακρυλικής ρητίνης (Techonit 7200, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) ανά δύο ημέρες (50%, 70%, 90%). Τέλος, τα ιστοτεμάχια παρέμειναν για δέκα ημέρες εμβάπτισμένα σε 100% υγρή μεθακρυλική ρητίνη, προκειμένου να επιτευχθεί βέλτιστη διήθηση. Όλες οι διαδικασίες εμβάπτισης πραγματοποιήθηκαν όλες υπό συνεχή ανάδευση, με τη βοήθεια ειδικής συσκευής του συστήματος EXAKT (**Εικ. 25**). Στη συνέχεια τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε ειδικά καλούπια με υγρή ρητίνη, όπου πραγματοποιήθηκε ο φωτοπολυμερισμός της για 16 ώρες με ειδική συσκευή (**Εικ. 26**).

Οι κύβοι της πολυμερισμένης ρητίνης που περιείχαν τα ιστοτεμάχια (**Εικ. 27 και 28**) στη συνέχεια κόπηκαν με πριονοκορδέλα διαμαντιού σε ειδικό μικροτόμο στο σημείο οριοθέτησης της ιστολογικής τομής ενδιαφέροντος (**Εικ 29 και 30**). Οι πλευρές των κύβων ρητίνης που περιείχαν την τομή ενδιαφέροντος κολλήθηκαν σε γυάλινα ιστολογικά πλακίδια με τη χρήση σιλανίου (SILANO, Angelus SA, Brazil) και παχύρρευστης φωτοπολυμεριζόμενης ρητίνης (Techonit 7210, Heraeus Kulzer GmbH, Germany) (**Εικ. 31 και 32**). Οι κολλημένοι στα πλακίδια κύβοι κόπηκαν και πάλι στον μικροτόμο και η επιφάνειά τους γυαλίστηκε με τη βοήθεια δίσκων υαλοχάρτου προοδευτικά μειούμενης αδρότητας (P500, P800, P1000, P1200, P2500 και P4000) σε ειδικό τριβείο (**Εικ. 33**), ώστε να παραμείνει κολλημένη στο πλακίδιο ιστολογική τομή πάχους περίπου 100μm (**Εικ. 34**). Οι ιστολογικές τομές βάφτηκαν με κυανό της τολουϊδίνης / βασική φουξίνη (Merck Co, Darmstadt, Germany) ή με την τρίχρωμη βαφή Gomori (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA).

Η παρατήρηση των ιστολογικών τομών έγινε με οπτικό μικροσκόπιο (AXIOSTAR Plus, Carl Zeiss, Germany) και ελήφθησαν ψηφιακές φωτογραφίες με ειδική κάμερα (AxioCam ICc3, Carl Zeiss, Germany). Οι μετρήσεις στις

ψηφιακές φωτογραφίες για τις ανάγκες της ιστομορφομετρίας πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Image Pro Plus, Media Cybernetics Inc., USA).



Εικόνα 25. Συσκευή ανάδευσης.



Εικόνα 26. Συσκευή φωτοπολυμερισμού.



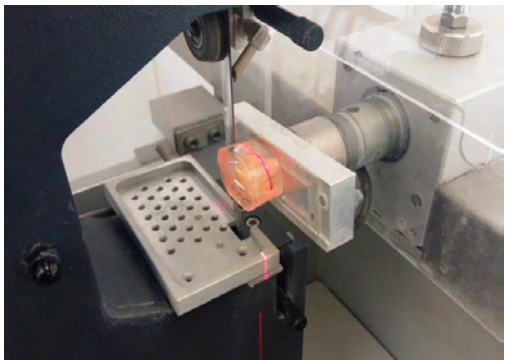
Εικόνα 27. Καλούπια με υγρή ρητίνη προς πολυμερισμό.



Εικόνα 28. Κύβος πολυμερισμένης ρητίνης που περιέχει το ιστοτεμάχιο οστού



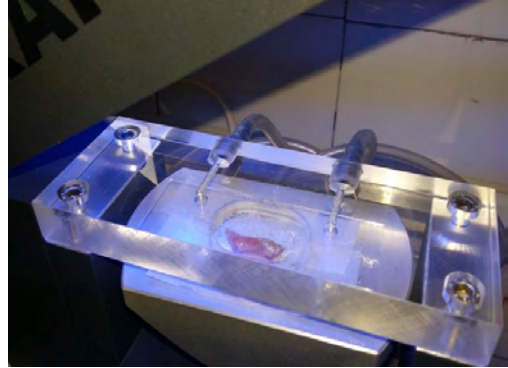
Εικόνα 29. Μικροτόμος του συστήματος EXAKT.



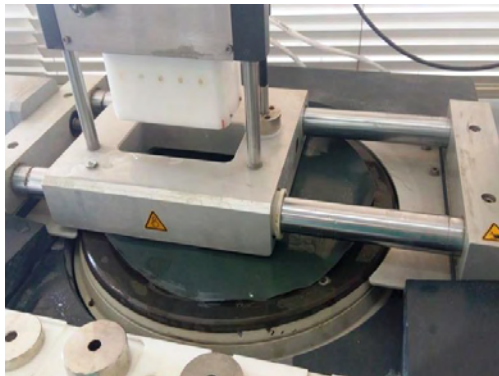
Εικόνα 30. Τομή του κύβου ρητίνης στο μικροτόμο.



Εικόνα 31. Απαραίτητα υλικά για τη συγκόλληση στο πλακίδιο ιστολογίας (σιλάνιο και ημίρρευστη ρητίνη)



Εικόνα 32. Συσκευή φωτοπολυμερισμού πλακιδίων για τη συγκόλληση του κύβου ρητίνης στο γυάλινο πλακίδιο υπό πλήρη παραλληλότητα



Εικόνα 33. Ειδικό τριβείο του συστήματος EXAKT.

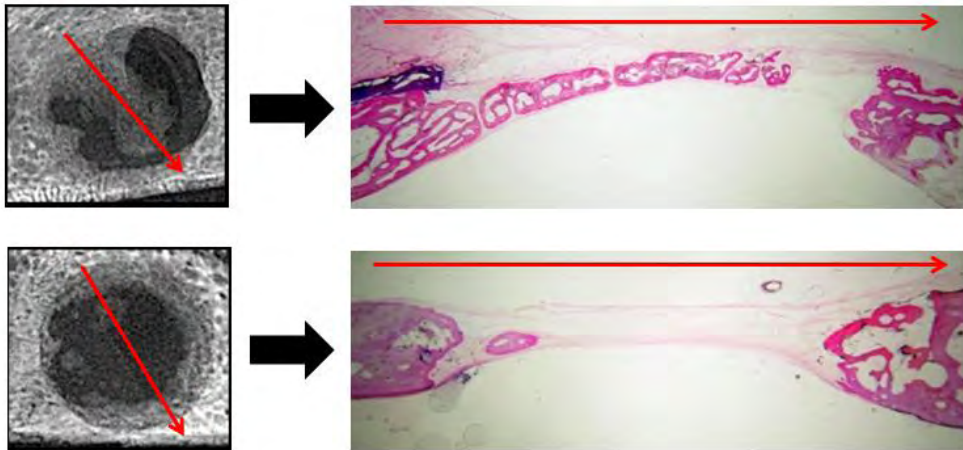


Εικόνα 34. Έλεγχος του τελικού πάχους της ιστολογικής τομής με ηλεκτρονικό παχύμετρο.

2.6. Ιστομορφομετρία

2.6.1 Ιστομορφομετρία επούλωσης ελλειμμάτων κρανίου

Στα παρασκευάσματα των ελλειμμάτων κρανίου των ομάδων Α και Β η ιστολογική τομή πραγματοποιήθηκε κάθετα στο έλλειμμα. Η τομή οριοθετήθηκε στη διάμετρο που συνέπιπτε με την κατεύθυνση της μέγιστης γεφύρωσης όπως αυτή παρατηρήθηκε προηγουμένως ακτινολογικά (**Εικ. 35**).



Εικόνα 35. Παραδείγματα οριοθέτησης της ιστολογικής τομής στη διάμετρο της μέγιστης γεφύρωσης που παρατηρήθηκε ακτινολογικά.

Στα ιστολογικά παρασκευάσματα των οστικών ελλειμμάτων μετρήθηκαν οι παρακάτω πρωτογενείς ιστομορφομετρικές παράμετροι (**Εικ. 36 και 37**):

α) **Επιφάνεια ελλείμματος**: οριοθετήθηκε κυκλώνοντας χειροκίνητα την νοητή περιοχή που κατείχε το οστό πριν τη δημιουργία του οστικού ελλείμματος.

β) **Επιφάνεια νέου οστίτη ιστού**: οριοθετήθηκε κυκλώνοντας το νέο οστίτη ιστό που δημιουργήθηκε μέσα στην επιφάνεια του ελλείμματος και περιλαμβάνοντας τόσο τα ενασβετισμένα μέρη όσο και τον μυελό.

γ) **Επιφάνεια νέου οστού**: οριοθετήθηκε κυκλώνοντας μόνο τα ενασβετισμένα μέρη του νέου οστίτη ιστού.

δ) **Μήκος ελλείμματος**: μετρήθηκε ενώνοντας γραμμικά τα δύο όρια του ελλείμματος εκατέρωθεν.

ε) **Συνολικό μήκος γεφύρωσης με νέο οστίτη ιστό**: μετρήθηκε προσθέτοντας τις επιμέρους επιμήκεις διαστάσεις των νησίδων και προεκτάσεων του νέου οστίτη ιστού κατά μήκος του ελλείμματος.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι παρακάτω δευτερογενείς ιστομορφομετρικές παράμετροι:

α) Ποσοστό (%) οστικής αναγέννησης του ελλείμματος:

$$\frac{\text{Συνολική επιφάνεια νέου οστίτη ιστού}}{\text{Επιφάνεια ελλείμματος}} \times 100$$

β) Ποσοστό (%) νέου οστού στο έλλειμμα:

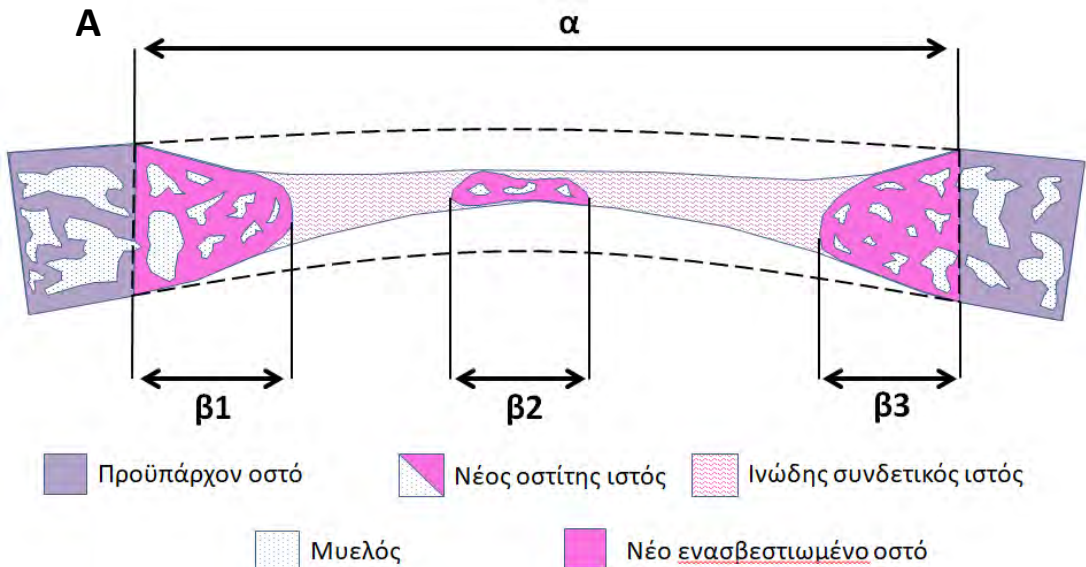
$$\frac{\text{Συνολική επιφάνεια νέου οστού}}{\text{Επιφάνεια ελλείμματος}} \times 100$$

γ) Ποσοστιαία (%) πυκνότητα του νέου οστίτη ιστού (BV/TV):

$$\frac{\text{Συνολική επιφάνεια νέου οστού}}{\text{Συνολική επιφάνεια νέου οστίτη ιστού}} \times 100$$

δ) Ποσοστό (%) γεφύρωσης του ελλείμματος:

$$\frac{\text{Συνολικό μήκος γεφύρωσης με νέο οστίτη ιστό}}{\text{Μήκος ελλείμματος}} \times 100$$



Εικόνα 36. Σχηματική παράσταση της ιστολογικής τομής του ελλείμματος και των ιστομορφομετρικών παραμέτρων που αξιολογήθηκαν. Διακρίνεται η συνολική επιφάνεια του ελλείμματος (διακεκομμένη γραμμή), το συνολικό μήκος του ελλείμματος (α) και το μήκος γεφύρωσης με νέο οστίτη ιστό (β1+β2+β3).



Εικόνα 37. Ιστολογικό παρασκεύασμα κατά την επεξεργασία με το ειδικό λογισμικό.

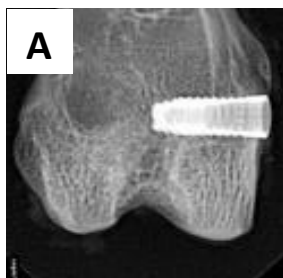
2.6.2 Ιστομορφομετρία ενσωμάτωσης εμφυτευμάτων τιτανίου

Στα παρασκευάσματα των μηριαίων των ομάδων Γ και Δ η ιστολογική τομή πραγματοποιήθηκε στεφανιαίως με τρόπο που το εμφύτευμα τιτανίου να τέμνεται επιμήκως στη διάμετρό του (**Εικ. 38**).

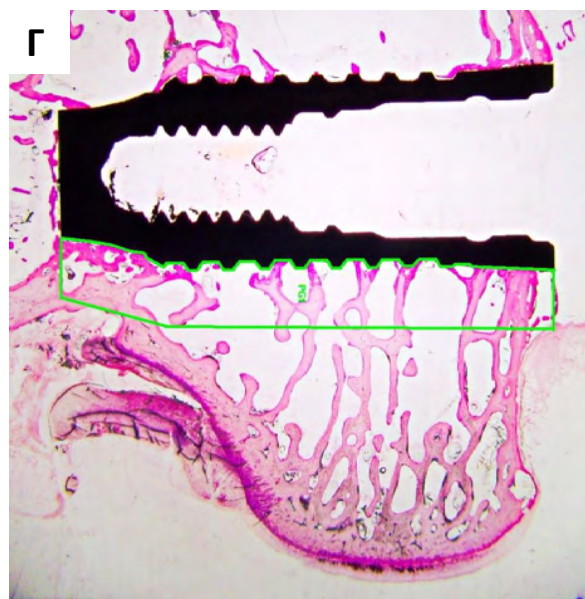
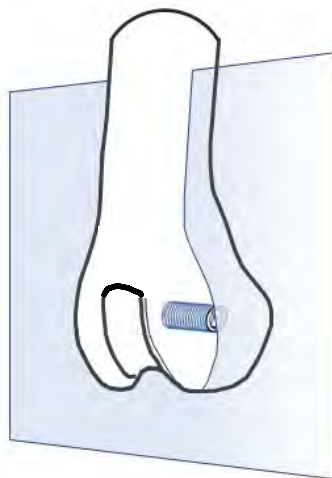
Στα ιστολογικά παρασκευάσματα των μηριαίων που περιείχαν τα εμφυτεύματα τιτανίου καθορίστηκε μια περιοχή ενδιαφέροντος (region of interest – ROI), όπου πραγματοποιήθηκαν οι ιστομορφομετρικές μετρήσεις. Η περιοχή περιλάμβανε την περιφερική διεπιφάνεια οστού-εμφυτεύματος, που βρισκόταν προς την πλευρά του αρθρικού χόνδρου καθώς και το τμήμα του οστού που βρισκόταν σε απόσταση 1 mm από τη διεπιφάνεια προς την ίδια κατεύθυνση (**Εικ. 38. Γ**). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο σε αυτή την περιοχή, διότι η κεντρική πλευρά που βρισκόταν προς την μυελική κοιλότητα παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των δειγμάτων, όσον αφορά το μήκος της επιφάνειας του εμφυτεύματος που βρισκόταν σε επαφή με τον μυελό.

Στην περιοχή ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω πρωτογενείς ιστομορφομετρικές παράμετροι (**Εικ. 39**):

- α) **Μήκος επιφάνειας εμφυτεύματος:** οριοθετήθηκε κυκλώνοντας χειροκίνητα το περίγραμμα της επιφάνειας του εμφυτεύματος.
- β) **Συνολική επιφάνεια εμφυτεύματος σε άμεση επαφή με οστό:** οριοθετήθηκε σημειώνοντας χειροκίνητα τα μήκη των επιφανειών του εμφυτεύματος που βρισκόταν σε άμεση επαφή με οστό.



B

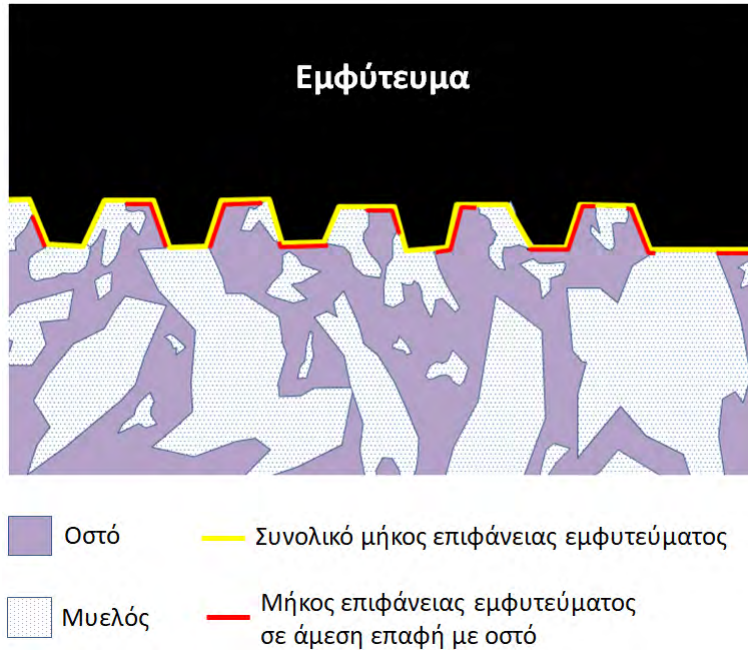


Εικόνα 38. A: Ακτινογραφία που δείχνει τη θέση του εμφυτεύματος, **B:** σχηματική παράσταση του επιπέδου ιστολογικής τομής, **Γ:** ιστολογική εικόνα όπου φαίνεται η περιοχή ενδιαφέροντος (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x2,5).

γ) **Επιφάνεια οστίτη ιστού:** η επιφάνεια αυτή συμπίπτει με την περιοχή ενδιαφέροντος (ROI).

δ) **Επιφάνεια οστού:** οριοθετήθηκε κυκλώνοντας χειροκίνητα το οστό που υπήρχε εντός της περιοχής ενδιαφέροντος.

ε) **Συνολικό μήκος επιφάνειας οστού:** αποτελεί το συνολικό μήκος της γραμμής που απαιτήθηκε για να κυκλωθεί το οστό που υπήρχε στην περιοχή ενδιαφέροντος.



Εικόνα 39. Σχηματική παράσταση των ιστομορφομετρικών μετρήσεων.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι παρακάτω δευτερογενείς ιστομορφομετρικές παράμετροι:

α) Ποσοστό (%) επαφής διεπιφάνειας οστού-εμφυτεύματος (BIC):

$$\frac{\text{Συνολική επιφάνεια εμφυτεύματος σε άμεση επαφή με οστό}}{\text{Μήκος επιφάνειας εμφυτεύματος}} \times 100$$

β) Ποσοστιαία (%) πυκνότητα του οστίτη ιστού (BV/TV):

$$\frac{\text{Επιφάνεια οστού}}{\text{Επιφάνεια οστίτη ιστού}} \times 100$$

γ) Μέση διάμετρος των δοκίδων του σπογγώδους οστού (Tb.Th):

$$2 \times \frac{\text{Επιφάνεια οστού}}{\text{Συνολικό μήκος επιφάνειας οστού}}$$

δ) Αριθμός δοκίδων του σπογγώδους οστού (Tb.N):

$$\frac{\text{Συνολικό μήκος επιφάνειας οστού}}{2 \times \text{Επιφάνεια οστίτη ιστού}}$$

Για τον υπολογισμό των παραμέτρων γ) και δ) χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένοι τύποι όπως αυτοί περιγράφηκαν από τους Parfitt και συν.¹⁸⁸ κάνοντας την παραδοχή ότι οι οστικές δοκίδες στη συγκεκριμένη περιοχή του μηριαίου είναι παράλληλα διατεταγμένες πλάκες (parallel-plate model assumption).

2.7 Μέγεθος δείγματος

Για τη μελέτη της επούλωσης των οστικών ελλειμμάτων, με βάση προηγούμενες μελέτες^{189, 190}, εκτιμήθηκε ότι η κύρια μεταβλητή (ποσοστιαία οστική αναγέννηση του ελλείμματος) στην ομάδα των μαρτύρων θα κυμαινόταν περίπου στο $20 \pm 5\%$. Έτσι, έχοντας ως στόχο το πείραμά μας να μπορέσει να ανιχνεύσει μια διαφορά της τάξης του $\pm 10\%$ μεταξύ των δύο ομάδων, υπολογίστηκε ότι θα απαιτούνταν οκτώ κουνέλια ανά ομάδα, εφόσον ορίσουμε το $\alpha=0,05$ και $(1-\beta)=0,95$. Για τη μελέτη της οστεοενσωμάτωσης των εμφυτευμάτων τιτανίου, με βάση προηγούμενες μελέτες^{191, 192}, εκτιμήθηκε ότι η κύρια μεταβλητή (ποσοστό επαφής διεπιφάνειας οστού-εμφυτεύματος) στην ομάδα των μαρτύρων θα κυμαινόταν περίπου στο $35 \pm 8\%$. Θέτωντας ως στόχο το πείραμά μας να μπορέσει να ανιχνεύσει μια διαφορά της τάξης του $\pm 10\%$ μεταξύ των δύο ομάδων, υπολογίστηκε ότι θα απαιτούνταν δεκαέξι κουνέλια ανά ομάδα, εφόσον ορίσουμε το $\alpha=0,05$ και $(1-\beta)=0,95$. Οι υπολογισμοί των μεγεθών δείγματος ανά ομάδα πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό G*Power v.3.1.9.2 (Franz Faul, Universität Kiel, Germany).

2.8 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS v.18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Τα ακτινολογικά σκορ καθώς και οι ιστομορφομετρικές παράμετροι των ομάδων παρουσιάζονται ως μέσοι όροι με

τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Για τις ομάδες A και B προηγήθηκε υπολογισμός του μέσου όρου μεταξύ των δύο ελλειμμάτων του κάθε κουνελιού και στη συνέχεια ο υπολογισμός του μέσου όρου της κάθε ομάδας. Η συμφωνία μεταξύ των εξεταστών της ακτινολογικής μελέτης ελέγχθηκε με τον υπολογισμό του συντελεστή συμφωνίας Kappa. Η σύγκριση των μέσων όρων του ακτινογραφικού σκορ μεταξύ των ομάδων A και B πραγματοποιήθηκε με το Mann-Whiney U test, καθώς τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή όπως υποδείχθηκε από το Sapiro-Wilk test. Η σύγκριση των μέσων όρων των ιστομορφομετρικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων A και B πραγματοποιήθηκε με το t-test, καθώς τα δεδομένα πληρούσαν τα κριτήρια της κανονικής κατανομής όπως υποδείχθηκε από το Sapiro-Wilk test. Η σύγκριση των μέσων όρων των ιστομορφομετρικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων Γ και Δ πραγματοποιήθηκε με το t-test, καθώς τα δεδομένα πληρούσαν τα κριτήρια της κανονικής κατανομής όπως υποδείχθηκε από το Sapiro-Wilk test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε όλους τους ελέγχους τέθηκε στο $p=0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

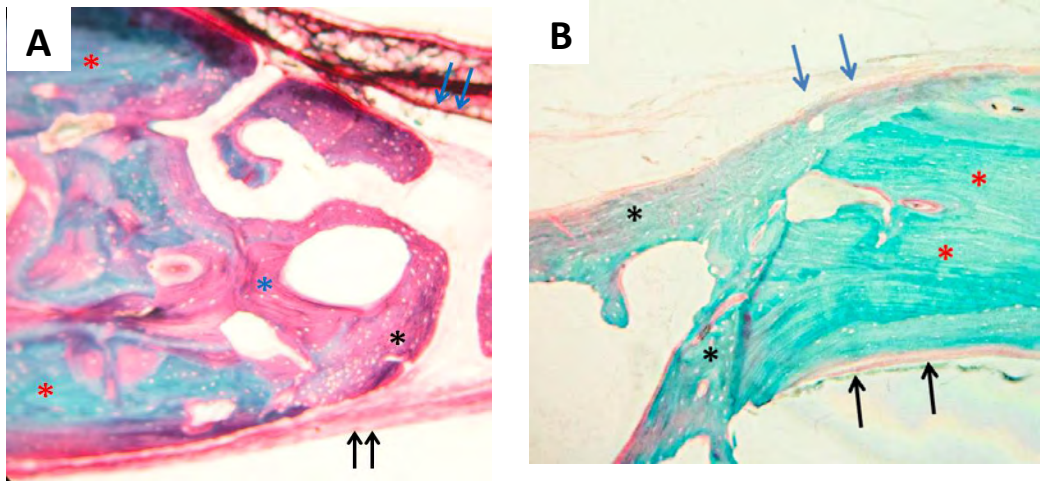
Κανένα ζώο δεν παρουσίασε επιπλοκές όπως αιμορραγία, αιμάτωμα, διάσπαση του τραύματος, λοίμωξη ή άλλα σημεία νοσηρότητας στη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης ή στην μετεγχειρητική περίοδο.

3.1 Αποτελέσματα επούλωσης οστικών ελλειμμάτων κρανίου

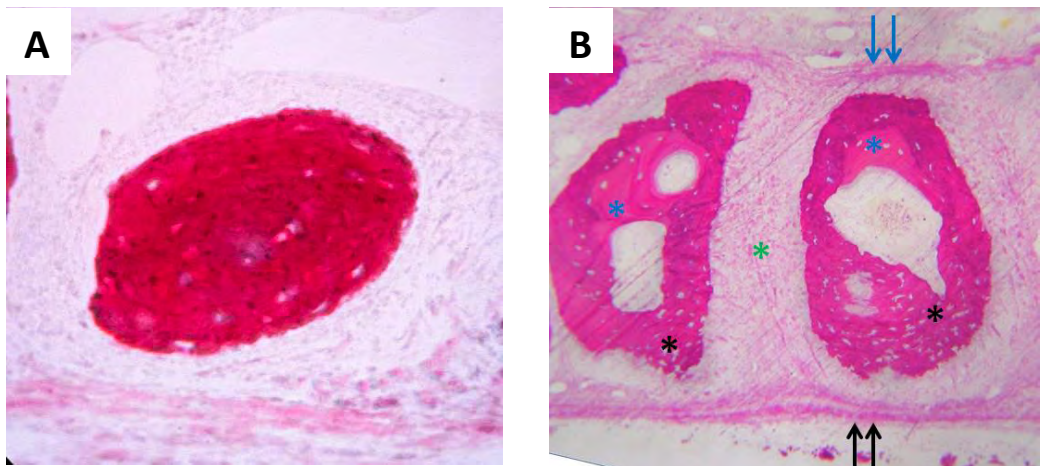
Τόσο από την ακτινολογική όσο και από την ιστολογική μελέτη διαπιστώθηκε μερική πλήρωση των οστικών ελλειμμάτων με νέο οστίτη ιστό. Ο νέος οστίτης ιστός δημιουργήθηκε είτε ως προέκταση του προϋπάρχοντος οστού στην περιφέρεια του ελλείμματος είτε ως μεμονωμένες νησίδες νέου οστού στο κέντρο του ελλείμματος (**Εικ. 40 και 41**). Η *de novo* αναγέννηση νησίδων οστού στο κέντρο προήλθε προφανώς από τη οστεογενετική δράση του περιοστέου και της σκληράς μήνιγγας. Από την ιστολογική μελέτη διαπιστώθηκε παρουσία τόσο άωρου δικτυωτού οστού όσο και ώριμου πεταλιώδους οστού (**Εικ. 40 και 41**). Τα οστικά ελλείματα της ομάδας A (κλοπιδογρέλη) περιείχαν γενικά περισσότερο πεταλιώδες οστό, υποδεικνύοντας εντονότερη οστική αναγέννηση σε σχέση με την ομάδα B (μάρτυρες). Σε τέσσερα δε παρασκευάσματα της ομάδας A παρατηρήθηκε πλήρης οστική γεφύρωση κατά μήκος όλου του ελλείμματος, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε κανένα έλλειμμα της ομάδας B.

Ο μέσος όρος ακτινολογικού σκορ των ομάδων A και B ήταν αντίστοιχα 3.31 ± 0.2 και 1.43 ± 0.2 για των πρώτο εξεταστή (**Εικ. 42 και 43**), και 3.12 ± 0.3 και 1.88 ± 0.2 για τον δεύτερο εξεταστή (**Εικ. 42 και 43**). Και οι δύο εξεταστές βρήκαν ότι τα ελλείματα της ομάδας A είχαν σημαντικά μεγαλύτερο ακτινολογικό σκορ οστικής αναγέννησης από αυτά της ομάδα B ($p < 0.001$ και $p = 0.007 < 0.05$) αντίστοιχα, με συντελεστή συμφωνίας $k = 0.441$, $p < 0.001$). Η ιστομορφομετρική μελέτη επιβεβαίωσε επίσης τα ανωτέρω ακτινολογικά ευρήματα (**Πίνακας 3**). Το ποσοστό νέου ενασβεστωμένου οστού στον νέο οστίτη ιστό δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων, γεγονός που

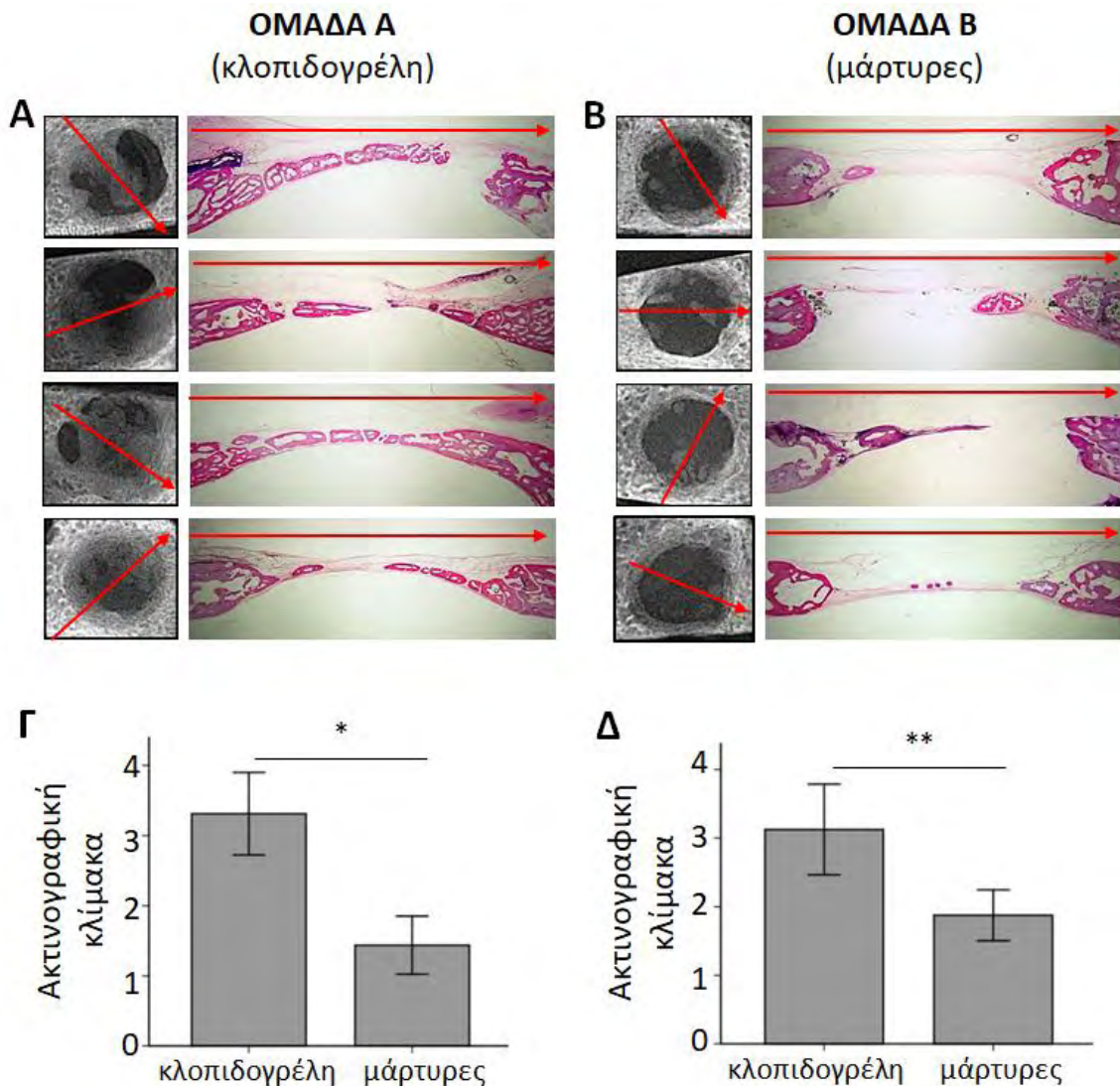
υποδεικνύει ότι η κλοπιδογρέλη προήγαγε την οστική αναγέννηση χωρίς να επιφέρει όμως αλλαγές στην πυκνότητα του νέου οστού.



Εικόνα 40. Ενδεικτικές ιστολογικές εικόνες από την περιφέρεια των ελλειμμάτων. Νεοσχηματισθέν οστό ως προέκταση του προϋπάρχοντος οστού. Μπλε βέλη: περίοστεο, μαύρα βέλη: σκληρά μήνιγγα, μαύροι αστερίσκοι: νέο άωρο δικτυωτό οστό, μπλε αστερίσκοι: νέο ώριμο πεταλιώδες οστό, κόκκινοι αστερίσκοι: παλαιό προϋπάρχον πεταλιώδες οστό και πράσινος αστερίσκος: ινώδης συνδετικός ιστός. (Gomori's trichrome, x10)



Εικόνα 41. Ενδεικτικές ιστολογικές εικόνες από την κεντρική περιοχή των ελλειμμάτων **A:** Πυρήνας οστέωσης νέου άωρου δικτυωτού οστού (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x40), **B:** De novo οστική αναγέννηση ως νησίδα νέου οστού στο κέντρο του ελλείμματος όπου διακρίνεται η παρουσία και άωρου και πεταλιώδους οστού (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x20) . Μπλε βέλη: περίοστεο, μαύρα βέλη: σκληρά μήνιγγα, μαύροι αστερίσκοι: νέο άωρο δικτυωτό οστό, μπλε αστερίσκοι: νέο ώριμο πεταλιώδες οστό, κόκκινοι αστερίσκοι: παλαιό προϋπάρχον πεταλιώδες οστό και πράσινος αστερίσκος: ινώδης συνδετικός ιστός



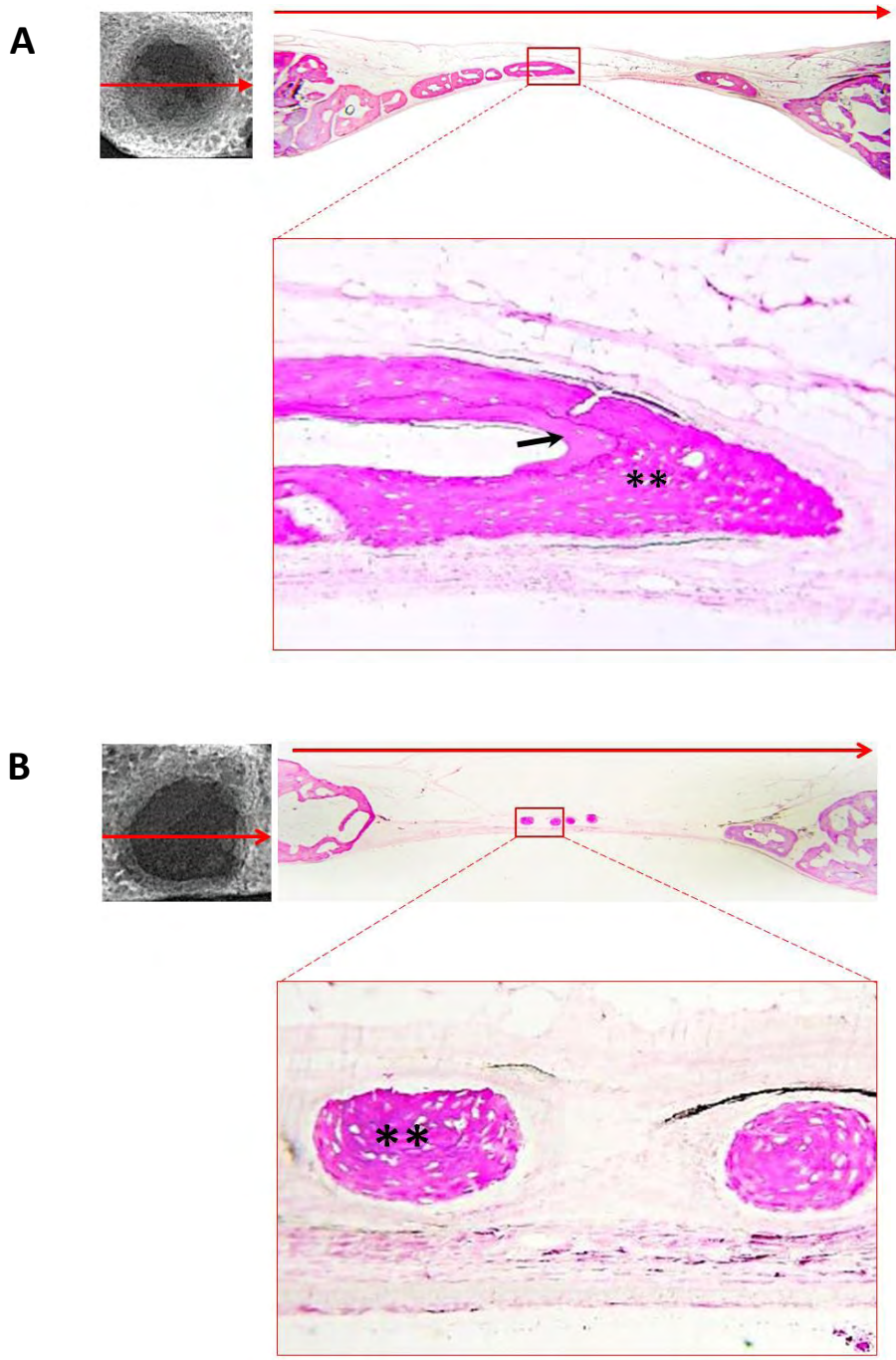
Εικόνα 42. Α: Ενδεικτικά δείγματα της ομάδας Α όπου φαίνεται η γεφύρωση του ελλείμματος σε μεγάλο βαθμό. Β: Ενδεικτικά δείγματα της ομάδας Β όπου φαίνεται η επίτευξη γεφύρωσης σε πολύ μικρότερη έκταση. Γ: Ιστόγραμμα με τα αποτελέσματα της ακτινολογικής αξιολόγησης από τον Α εξεταστή., Δ: Ιστόγραμμα με τα αποτελέσματα της ακτινογραφικής αξιολόγησης από τον Β εξεταστή (* $p < 0,001$ και ** $p < 0,05$).

Ομάδα Α (κλοπιδογρέλη)		Εξεταστής Α		Εξεταστής Β		Ομάδα Β (μάρτυρες)		Εξεταστής Α		Εξεταστής Β	
		3	3	3	3			2	2	2	2
		4	4	4	4			2	1	2	2
		4	4	3	4			1	3	2	3
		3	3	3	3			1	1	2	2
		4	3	4	3			1	1	1	2
		3	3	2	2			1	3	1	3
		4	4	4	4			0	2	0	2
		2	2	2	2			1	1	2	2

Εικόνα 43. Πίνακες ακτινολογικής αξιολόγησης της επούλωσης των ελλειμμάτων από τους δύο εξεταστές

Πίνακας 3. Σύγκριση ιστομορφομετρικών παραμέτρων επούλωσης οστικών ελλειμμάτων.

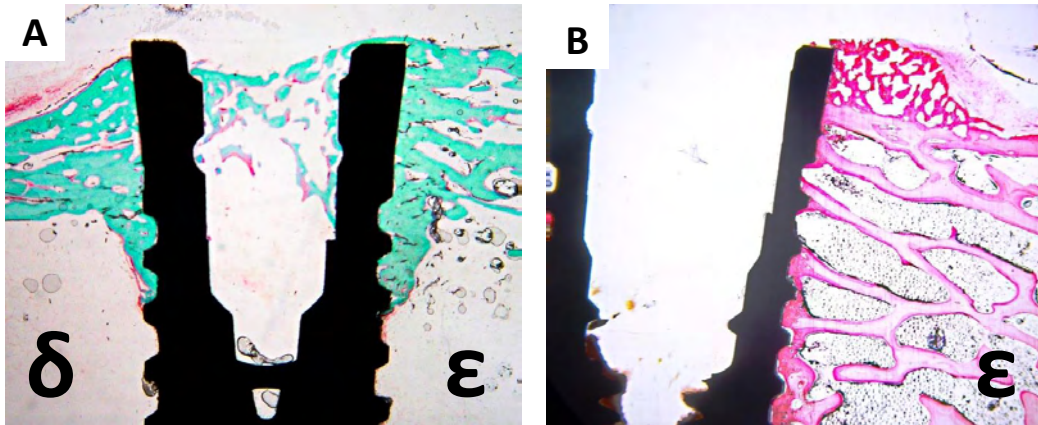
	Ομάδα Α (κλοπιδογρέλη) n=8	Ομάδα Β (μάρτυρες) n=8	<i>P value</i>
Οστική αναγέννηση του ελλείμματος (%)	28.07 ± 7.7	19.47 ± 4.9	0.018
Γεφύρωση του ελλείμματος (%)	72.17 ± 21.2	41.17 ± 8.5	0.004
Πυκνότητα του νέου οστίτη ιστού (%)	72.13 ± 8.5	64.82 ± 11.9	0.179



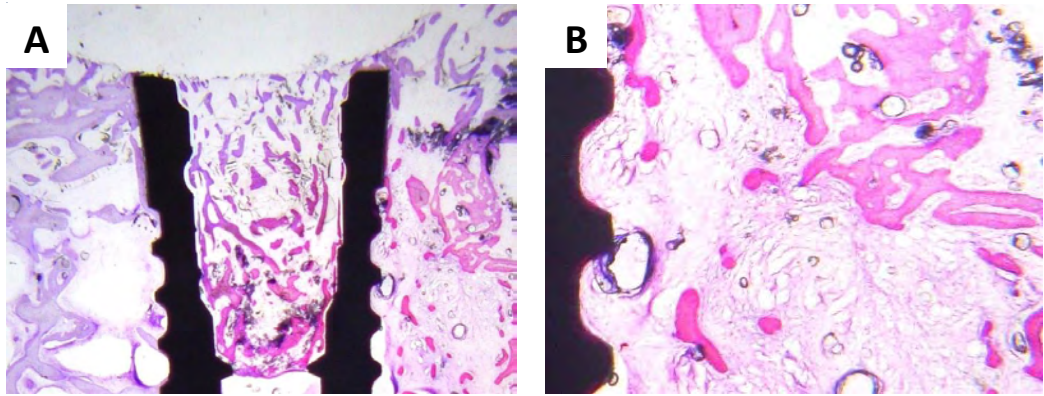
Εικόνα 44. Ενδεικτικά δείγματα οστικών ελλειμμάτων των ομάδων A (κλοπιδογρέλη) και B (μάρτυρες). **A:** Δείγμα της ομάδας A όπου φαίνεται η παρουσία τόσο ανώριμου δικτυωτού οστού (αστερίσκοι) όσο και ώριμου πεταλιώδους οστού (μαύρο βέλος), **B:** Δείγμα της ομάδας B όπου φαίνονται νησίδες ανώριμου δικτυωτού οστού. (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x2,5 και x20)

3.2 Αποτελέσματα ενσωμάτωσης εμφυτευμάτων τιτανίου

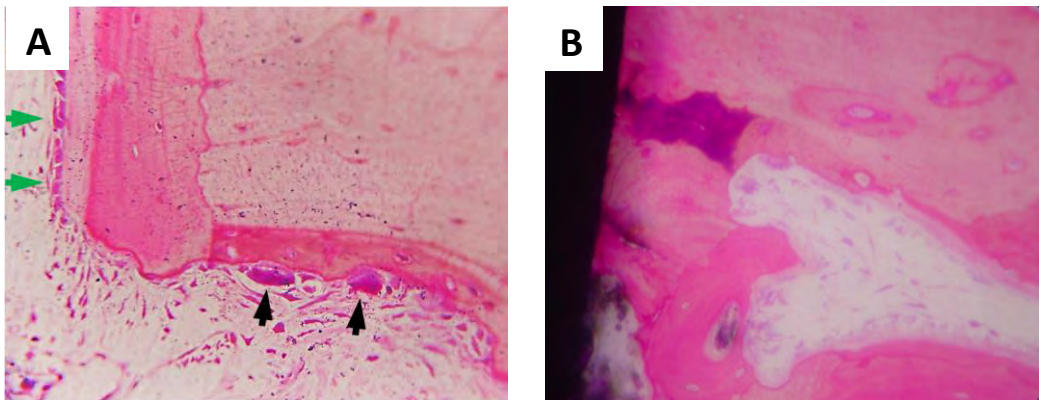
Όλα τα εμφυτεύματα και των δύο ομάδων Γ (κλοπιδογρέλη) και Δ (μάρτυρες) είχαν οστεονεσωματωθεί επιτυχώς χωρίς να παρουσιάζουν κινητικότητα. Σε αρκετές περιπτώσεις, κατά τη συλλογή των δειγμάτων οστού, διαπιστώθηκε μακροσκοπικά η πλήρης κάλυψη του αυχένα του εμφυτεύματος με νεόπλαστο οστό. Το αυτό διαπιστώθηκε και ιστολογικά, καθώς αρκετά εμφυτεύματα εμφάνιζαν νεόπλαστο ανώριμο δικτυωτό οστό στο εξωτερικό τμήμα του αυχένα, προερχόμενο προφανώς από το περίοστεο (**Εικ. 45. Α**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι, καθώς δεν είχε τοποθετηθεί βίδα κάλυψης στα εμφυτεύματα, αρκετά από αυτά εμφάνιζαν νεόπλαστο άωρο δικτυωτό οστό εντός του σώματός τους (**Εικ. 45. Β**). Το νέο οστό δημιουργήθηκε πιθανότατα στο σημείο αυτό υπό την οστεογενετική επίδραση του περισσέου επί του αιμοπήγματος που πλήρωσε τον κενό εσωτερικό χώρο του εμφυτεύματος. Σε ένα από τα δείγματα της ομάδας Δ (μάρτυρες) παρατηρήθηκαν σημεία ίνωσης του μυελού γύρω από το εμφύτευμα, πιθανότατα οφειλόμενη σε υπέρμετρη φλεγμονώδη αντίδραση ξένου σώματος ενάντια στην τοποθέτηση του εμφυτεύματος (**Εικ. 46**). Σε όλα τα δείγματα και των δύο ομάδων Γ και Δ, ήταν εμφανής η έντονη εναπόθεση νέου οστού σε εγγύτητα με το εμφύτευμα και πάνω στην επιφάνειά του, ενώ στις περιοχές μακράν του εμφυτεύματος η εναπόθεση νέου οστού ήταν αμελητέα. Παρατηρήθηκαν σημεία οστικής αναδιαμόρφωσης και στις δύο ομάδες (**Εικ. 47**). Παρατηρήθηκαν τόσο περιοχές οστεογένεσης εξ' επαφής όσο και οστεογένεσης εξ' αποστάσεως και στις δύο ομάδες (**Εικ. 48**). Η εναπόθεση νέου οστού γύρω οστικές δοκίδες που βρισκόταν σε εγγύτητα με την οπή/φρεάτιο τοποθέτησης του εμφυτεύματος, ήταν εντονότερη στην ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα Δ (**Εικ. 49**). Τα εμφυτεύματα της ομάδας Γ εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό επαφής διεπιφάνειας οστού-εμφυτεύματος, σε σχέση με αυτά της Ομάδας Δ. Οι υπόλοιπες ιστομορφομετρικές παράμετροι φαίνονται στον **Πίνακα 4**.



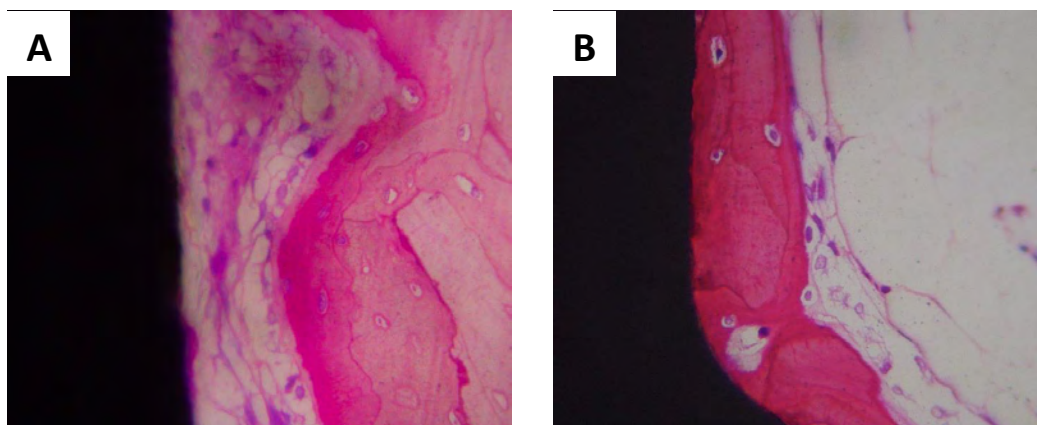
Εικόνα 45. **A:** Δημιουργία νέου οστού εντός της κοιλότητας του εμφυτεύματος (Gomori's trichrome, x2,5), **B:** δη-μιουργία νέου οστού εξωτερικά του αυχένα (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x2,5). (ε: επίφυση, δ: διάφυση)



Εικόνα 46. Περίπτωση ίνωσης του μυελού από υπέρμετρη φλεγμονώδη αντίδραση ξένου σώματος. (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, A: x2,5 και B: x10)



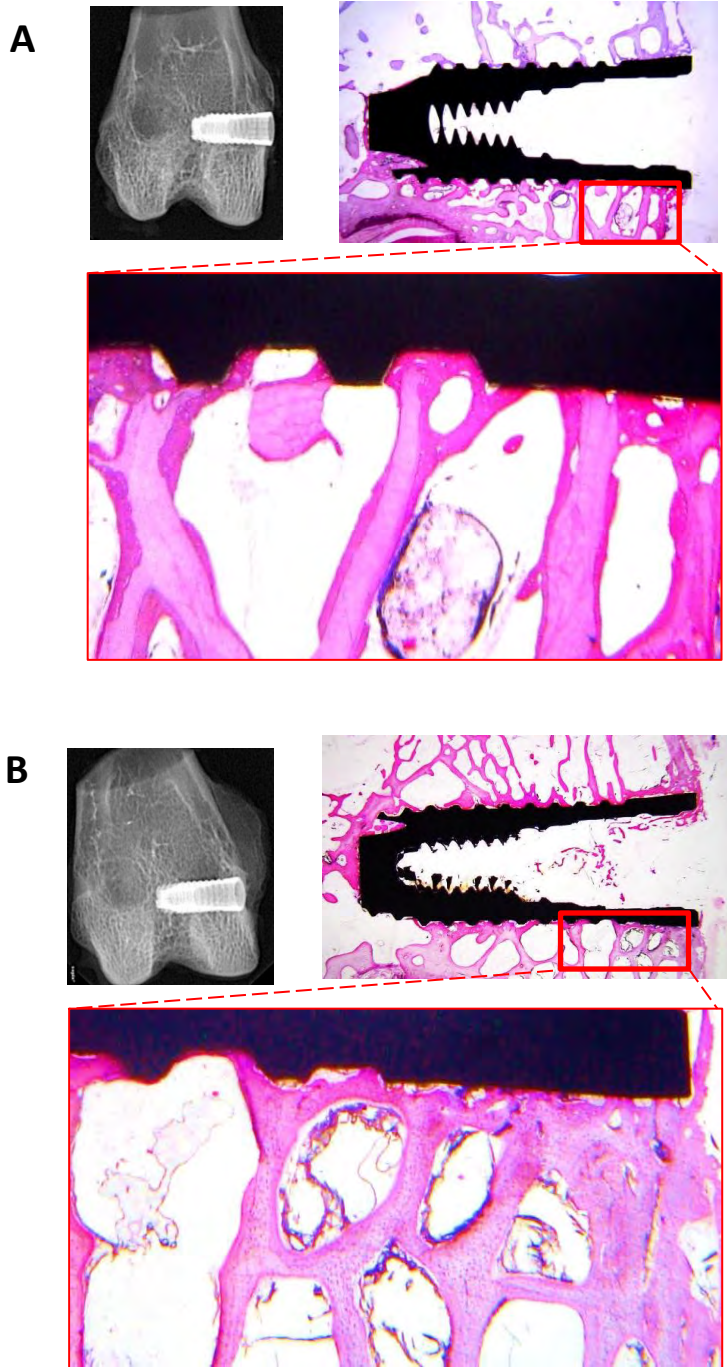
Εικόνα 47. Οστική αναδιαμόρφωση με παρουσία οστεοβλαστών (πράσινα βέλη) και οστεοκλαστών (μαύρα βέλη) τόσο στη σπογγώδη μοίρα (**A**) όσο και στη φλοιώδη με παρουσία τέμνοντος κώνου σε μεγάλη εγγύτητα με την επιφάνεια του εμφυτεύματος (**B**). (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x40)



Εικόνα 48. Χαρακτηριστικές ιστολογικές εικόνες οστεογένεσης αποστάσεως (**A**) και οστεογένεσης επαφής (**B**) σε ιστολογικά δείγματα των ομάδων Γ και Δ. (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x40).

Πίνακας 4. Σύγκριση ιστομορφομετρικών παραμέτρων οστεοενσωμάτωσης.

	Ομάδα Γ (κλοπιδογρέλη) n=16	Ομάδα Δ (μάρτυρες) n=16	<i>P value</i>
Ποσοστό επαφής οστού-εμφυτεύματος BIC (%)	48,77 ± 11,2	34,65 ± 9,1	0,001
Πυκνότητα του οστίτη ιστού (BV/TV) (%)	40,52 ± 7,6	28,74 ± 8,8	0,001
Μέση διάμετρος οστικών δοκίδων (Tb.Th) (μm)	284,7 ± 122,9	180,7 ± 44,3	0,001
Αριθμός οστικών δοκίδων/mm² (Tb.N)	1,56 ± 0,4	1,60 ± 0,3	0,961



Εικόνα 49. Ενδεικτικά δείγματα των ομάδων Γ (κλοπιδογρέλη) και Δ (μάρτυρες). Είναι εμφανής η εντονότερη αναπόθεση νέου οστού και η πάχυνση των οστικών δοκίδων που βρίσκονται σε εγγύτητα με το εμφύτευμα στην ομάδα Γ (Α) σε σχέση με την ομάδα Δ (Β). (Τολουϊδίνη-Βασική φουξίνη, x2,5 και x10)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αξιολόγηση της επίδρασης των φαρμακολογικών παραγόντων στην οστική επούλωση και στην οστεοενσωμάτωση αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τη βελτίωση των θεραπειών του σκελετικού συστήματος. Η κλοπιδογρέλη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο παγκοσμίως για την πρόληψη των επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης. Η παρούσα διατριβή είναι η πρώτη, από όσο γνωρίζουμε, που μελετά την επίδραση της συστηματικής χορήγησης της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση και στην οστεοενσωμάτωση. Η μελέτη αρχικά σχεδιάστηκε ώστε να διερευνηθούν πιθανές αρνητικές επιδράσεις της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση που βασιζόταν σε έμμεσες ενδείξεις προηγούμενων μελετών. Διάφορες ενδείξεις, όπως ότι η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων ή ότι ο υποδοχέας P2Y₁₂ όπου αυτή συνδέεται υπάρχει τόσο στις οστεοβλάστες όσο και στις οστεοκλάστες, οδήγησαν στην υπόθεση ότι η κλοπιδογρέλη ενδέχεται να επηρεάζει τις φυσιολογικές διαδικασίες της οστικής επούλωσης αλλά και της οστεοενσωμάτωσης των εμφυτευμάτων τιτανίου. Η παρουσία ενός φαρμάκου κατά την μετεγχειρητική περίοδο που ενδεχομένως να επηρεάζει την επούλωση του οστίτη ιστού, έχει ιδιαίτερη κλινικό ενδιαφέρον για ειδικότητες όπως η ορθοπαιδική, η νευροχειρουργική, η γναθοπροσωπική χειρουργική και η χειρουργική του στόματος. Η παρούσα διατριβή έδειξε ότι η αγωγή με κλοπιδογρέλη, όχι μόνο δεν επηρεάζει αρνητικά την οστική επούλωση και την οστεοενσωμάτωση, αλλά αντίθετα φαίνεται να προάγει τις διαδικασίες αυτές.

Στην παρούσα μελέτη η ημερήσια δοσολογία της κλοπιδογρέλης που χορηγήθηκε στα κουνέλια ήταν 3 mg/kg ανά ημέρα. Η δόση αυτή επιλέχθηκε με βάση τη μελέτη των Wong και συν.¹⁸¹, σύμφωνα με την οποία η συγκεκριμένη δόση προκαλεί αναστολή του 30-40% περίπου των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων στο κουνέλι, όπως αντίστοιχα προκαλεί η δόση των 75 mg ημερησίως στον άνθρωπο. Η επιλογή της δόσης έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς είναι αυτή που αντιπροσωπεύει καλύτερα το κλινικό σενάριο της λήψης κλοπιδογρέλης για πρόληψη της στεφανιαίας νόσου. Αντίστοιχα, άλλες μελέτες

έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές, είτε μικρότερες είτε μεγαλύτερες δόσεις, γεγονός που δεν επιτρέπει την ασφαλή αναγωγή των αποτελεσμάτων τους στον άνθρωπο. Σε προηγούμενη μελέτη του υποψηφίου διδάκτορα σχετικά με την επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστικής επούλωση ελλειμμάτων κρανίου σε επίμυες, βρέθηκε ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων κλοπιδογρέλης 75 mg/kg ημερησίως περιεγχειρητικά προκαλεί καταστολή της οστικής επούλωσης¹⁹³. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω φαίνεται ότι η ημερήσια δοσολογία της κλοπιδογρέλης φαίνεται να επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμά στον μεταβολισμό των οστών.

Η επιλογή του μοντέλου του κρίσιμου μεγέθους κρανιακού ελλείμματος στην παρούσα διατριβή βασίστηκε στο γεγονός ότι αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα αλλά και αξιόπιστα πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της οστικής επούλωσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν ότι το κυκλικό οστικό έλλειμμα διαμέτρου 11 mm στο βρεγματικό οστό του κουνελιού είναι κρίσιμου μεγέθους στο χρόνο ελέγχου των 6 εβδομάδων. Ωστόσο, το συγκεκριμένο μοντέλο αντιπροσωπεύει τις περιπτώσεις επούλωσης οστών υμενογενούς προελεύσεως. Για το λόγο αυτό το εύρημα της προαγωγής της οστικής επούλωσης ενδεχομένως να μην μπορεί να αναχθεί με ασφάλεια και στις περιπτώσεις επούλωσης καταγμάτων των μακρών οστών που είναι χονδρογενή.

Όσον αφορά στο μοντέλο της οστεοενσωμάτωσης, επιλέχθηκε η τοποθέτηση ενός εμφυτεύματος τιτανίου στον έσω μηριαίο κόνδυλο. Η θέση αυτή αποτελεί μια ανατομική περιοχή όπου συχνά τοποθετούνται ορθοπαιδικά εμφυτεύματα (πχ. αρθροπλαστική γόνατος), ενώ ταυτόχρονα είναι εύκολα προσβάσιμη στο κουνέλι για τη διεξαγωγή ανάλογων μελετών. Είναι απαραίτητο ωστόσο, ο πειραματισμός να γίνεται σε περίοδο που έχει ολοκληρωθεί η σκελετική ανάπτυξη του κουνελιού. Η πλήρης οστεοποίηση του συζευκτικού χόνδρου στην αναπτυξιακή πλάκα της περιφερικής επίφυσης του μηριαίου ολοκληρώνεται κατά την 20^η – 24^η εβδομάδα ζωής του κουνελιού¹⁹⁴. Για το λόγω αυτό τα κουνέλια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν ηλικίας άνω των 24 εβδομάδων. Ταυτόχρονα, αναφέρεται ότι η περιοχή

αυτή, καθώς αποτελείται από σπογγώδες οστό που περιβάλλεται από φλοιώδες, αποτελεί περιοχή που, μακροσκοπικά τουλάχιστον, προσομοιάζει στη δομή των γνάθων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντίστοιχη έρευνα¹⁹⁵. Ωστόσο, η άποψη αυτή δε μπορεί να γίνει πλήρως αποδεκτή καθώς οι φορτίσεις που δέχεται η κάτω επίφυση του μηριαίου κατά τη στάση και βάρδια είναι αρκετά διαφορετικές από αυτές που δέχεται το σώμα της κάτω γνάθου κατά τη μασητική λειτουργία. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι διαφορετικές περιοχές στην επίφυση του μηριαίου εμφανίζουν διαφορετικούς ρυθμούς ενασβεστίωσης (mineral apposition rate). Για παράδειγμα, οι Cacchioli και συν.¹⁹⁶ έδειξαν ότι το οστό του έσω μηριαίου κονδύλου εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς ενασβεστίωσης από το οστό του έξω. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη το μήκος των εμφυτευμάτων που τοποθετήθηκαν ήταν ανάλογοι μήκους ώστε να επεκτείνονται - παράλληλα προς την αρθρική επιφάνεια - μόνο εντός του έσω μηριαίου κονδύλου, από την έσω επιφάνεια του μηριαίου έως το επίπεδο της μεσοκονδυλίου εντομής. Ταυτόχρονα, για τον ίδιο λόγο οι ιστομορφομετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοχή ενδιαφέροντος μόνο περιφερικά (προς την επίφυση και αρθρική επιφάνεια) όπου υπάρχει άφθονο σπογγώδες οστό και όχι προς το κεντρικό τμήμα-διάφυση όπου υπάρχουν και μυελικά στοιχεία, εξασφαλίζοντας τη μεγαλύτερη δυνατή ομοιογένεια στα δείγματα.

Η ιστολογική μελέτη στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε σε μη απασβεστωμένα παρασκευάσματα εγκιβωτισμένα σε ακρυλική ρητίνη. Οι κλασσικές ιστολογικές τεχνικές εγκιβωτισμού του ιστικού τεμαχίου σε παραφίνη, απαιτούν προηγούμενη αφαλάτωση των δοκιμίων όταν πρόκειται για ενασβεστωμένους ιστούς όπως οστό, οδοντίνη ή αδαμαντίνη. Αρκετές φορές όμως στην ορθοπαιδική, στη γναθοπροσωπική χειρουργική και τη χειρουργική του στόματος απαιτείται η παρατήρηση και η μελέτη της περιοχής σύνδεσης μεταξύ οστού και ενός μεταλλικού εμφυτεύματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις η κλασσική τεχνική εγκιβωτισμού με παραφίνη δεν μπορεί να εφαρμοστεί, παρά μόνο εάν προηγουμένως το εμφύτευμα αφαιρεθεί από το τεμάχιο του οστού που πρόκειται να μελετηθεί, καταστρέφοντας όμως τη διεπιφάνεια μεταξύ τους.

Για την αποφυγή του ανωτέρω, ο Καθηγητής Στοματολογίας του Πανεπιστημίου του Αμβούργου Donath K. πρότεινε μια τεχνική παρασκευής μη απασβεστωμένων τομών, με δικής του επινόησης εξοπλισμό (σύστημα EXAKT), η οποία εφαρμόστηκε και στην παρούσα διατριβή.

Κατά τη διάρκεια διενέργειας της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκε μια ακόμα μελέτη από τους Medeiro και συν.¹⁹⁷ στην οποία αξιολογήθηκε η τοπική επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση. Οι ερευνητές πρόσθεσαν τον ενεργό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (CAM) σε σπόγγο κολλαγόνου και σε τρισδιάστατο πλέγμα από υδροξιαπατίτη/φωσφορικό τριασβέστιο (HP/TCP 3D scaffold) τα οποία εμφύτευσαν εντός κυκλικών οστικών ελλειμμάτων σε κρανία επίμυων. Η μελέτη τους έδειξε ότι η προσθήκη του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης οδήγησε σε σημαντική αύξηση της οστικής αναγέννησης τόσο στις ομάδες των σπόγγων κολλαγόνου όσο και στις ομάδες με το πλέγμα. Τα ίδια αποτελέσματα παρατήρησαν επίσης και με την προσθήκη τικαγκρελόρης, που αποτελεί νεώτερο αντιαίμοπεταλιακό φάρμακο επίσης αναστολέα του πουρινεργικού υποδοχέα P2Y₁₂. Μάλιστα η αύξηση της οστικής αναγέννησης ήταν σε παρόμοια επίπεδα με αυτά που προκαλεί η προσθήκη της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης-2 (BMP-2), όπως αυτό ελέγχθηκε σε σύγκριση με άλλη ομάδα της μελέτης τους.

Ελλείπει άλλων ερευνών που να μελετούν την επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθούμε σε έρευνες οι οποίες μελέτησαν την επίδραση της κλοπιδογρέλης στον οστικό μεταβολισμό, οι οποίες ωστόσο παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα. Από τις μελέτες αυτές συνάγεται το συμπέρασμα ότι η δοσολογία και η διάρκεια χορήγησης της κλοπιδογρέλης παίζουν σημαντικό ρόλο στο τελική επίδρασή της στον οστικό μεταβολισμό.

Οι Syberg και συν.¹³⁰ βρήκαν *in vitro* ότι η προσθήκη κλοπιδογρέλης σε καλλιέργειες οστεοβλαστών οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, μείωση της ζωτικότητάς τους και αναστολή της δημιουργίας πυρήνων ενασβεστίωσης εντός της καλλιέργειας. Οι ίδιοι βρήκαν επίσης με τη βοήθεια μικρο-αξονικής τομογραφίας (MicroCT) ότι η χορήγηση 1 mg/kg κλοπιδογρέλης

ημερησίως για τέσσερις εβδομάδες σε ωθηκεκτομημένους μύες οδήγησε σε μείωση του όγκου του σπογγώδους οστού κατά 24% στην κνήμη και κατά 18% στο μηριαίο, καθώς και αραίωση των δοκίδων του σπογγώδους οστού κατά 20%. Αντίθετα, το πάχος των δοκίδων του σπογγώδους οστού και οι παράμετροι του φλοιώδους οστού παρέμειναν ανεπηρέαστα. Οι ερευνητές βρήκαν τέλος μικρή μείωση (μη σημαντική) του παράγοντα οστεοκλαστικής δραστηριότητας cross-linked C-telopeptide - I (CTX-I) κατά 9%. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους οι ανωτέρω συμπεράναν ότι η συστηματική χορήγηση κλοπιδογρέλης είναι δυνατό να προκαλεί οστεοπόρωση.

Οι Su και συν.¹²⁹ μελέτησαν το ρόλο του υποδοχέα P2Y₁₂ στην λειτουργία των οστεοκλαστών και της οστικής απορρόφησης. Οι ερευνητές έδειξαν ότι ο υποδοχέας P2Y₁₂ εκφράζεται στις αναπτυσσόμενες οστεοκλάστες και ότι ποντίκια με γενετική έλλειψή του εμφανίζουν αυξημένη οστική μάζα και μειωμένα επίπεδα του δείκτη οστεοκλαστικής δραστηριότητας (CTX). Βρήκαν επίσης ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης 30 mg/kg την ημέρα για 2 ή 5 εβδομάδες σε ενήλικες ωθηκεκτομημένους μύες οδήγησε σε σημαντική αύξηση του όγκου του σπογγώδους οστού στην κνήμη και σε σημαντική μείωση του CTX σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον παρατήρησαν ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης με την ανωτέρω δοσολογία για 9 ημέρες σε νεαρούς υγιείς μύες, που βρισκόταν ακόμα υπό σκελετική ανάπτυξη, οδήγησε σε σημαντική αύξηση του όγκου του σπογγώδους οστού και της πυκνότητάς του στην κνήμη, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα με την ίδια αγωγή στους υγιείς ενήλικες μύες. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι πιθανό η κλοπιδογρέλη να εμφανίζει διαφορετική δράση στον οστίτη ιστό στη φάση που αυτός βρίσκεται υπό έντονη αναβολική δραστηριότητα όπως δηλαδή συμβαίνει κατά την σκελετική ανάπτυξη ή την επούλωση των καταγμάτων και των οστικών ελλειμμάτων. Στην ίδια τέλος έρευνα μελετήθηκε την επίδραση της κλοπιδογρέλης σε πειραματικό μοντέλο οστικής μετάστασης σε μύες. Οι ερευνητές βρήκαν ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης 30 mg/kg την ημέρα για 9 ημέρες δρούσε προστατευτικά στην οστική απορρόφηση που προκαλούνταν από τον μεταστατικό όγκο. Οι ανωτέρω παρατηρήσεις οδήγησαν του Su και

συν.¹²⁹ να υποστηρίξουν ότι η κλοπιδογρέλη ενδεχομένως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά στην αντιμετώπιση της οστεόλυσης που προκαλείται από μεταστατικούς όγκους και στη θεραπεία κατά της οστεοπόρωσης.

Σε ενίσχυση των ανωτέρω συμβάλει η μελέτη των Yamaguchi και συν.¹²⁸ που μελέτησαν την επίδραση της κλοπιδογρέλης σε πειραματικό μοντέλο οστεονέκρωσης από κορτικοστεροειδή. Χορήγησαν σε κουνέλια κλοπιδογρέλη 5 mg/kg ανά ημέρα για τρεις εβδομάδες και κατά τη δεύτερη εβδομάδα χορήγησαν μεθυλπρεδνιζολόνη 20 mg/kg προκειμένου να προκαλέσουν οστεονέκρωση. Παρατήρησαν ότι το ποσοστό των κουνελιών που ελάμβανε κλοπιδογρέλη και εμφάνισε ιστολογικές αλλοιώσεις οστεονέκρωσης (48,5%) ήταν σημαντικά μικρότερο από αυτό των μαρτύρων (73,3%). Επίσης, βρήκαν ότι η αναλογία οστεονεκρωτικών βλαβών στο εγγύς μηριαίο ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα που ελάμβανε κλοπιδογρέλη (42,2%) σε σχέση με τους μάρτυρες (70%). Αντίθετα σε άλλες περιοχές δεν υπήρχε σημαντική διαφορά.

Σε μιας μεγάλης έκτασης αναδρομική κλινική μελέτη παρατήρησης (cohort study) οι Jørgensen και συν.¹³¹ παρατήρησαν ότι η θεραπεία με κλοπιδογρέλη αυξάνει την πιθανότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων. Η μελέτη περιελάμβανε 77.503 ασθενείς που ελάμβαναν κλοπιδογρέλη το διάστημα 1996-2008 στη Δανία και 232.510 μάρτυρες (matched). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή η πιθανότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων (του ισχίου, του αντιβραχίου και της σπονδυλικής στήλης) είναι κατά 50% αυξημένη σε όσους ελάμβαναν κλοπιδογρέλη και ιδιαίτερα σε αυτούς που την ελάμβαναν για περισσότερο από ένα έτος. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει το εύρημα ότι οι ασθενείς με μικρή έκθεση στην κλοπιδογρέλη (<0.01 defined daily dose) εμφάνιζαν μικρότερη πιθανότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι αυτή η δοσοεξαρτώμενη δράση διπλή δράση της κλοπιδογρέλης πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι επηρεάζει τόσο την εναπόθεση όσο και την απορρόφηση του οστού μέσω της δράσης της τόσο στις οστεοβλάστες όσο και στις οστεοκλάστες. Ωστόσο, η ίδια ερευνητική ομάδα

σε νεότερη δημοσίευσή της το 2017 μελέτησε από την ανωτέρω ομάδα (cohort) ξεχωριστά μόνο την υπο-ομάδα των ασθενών που λάμβαναν κλοπιδογρέλη λόγω αγγειακού εγκεφαλικού, και βρήκε ότι ενώ υπήρχε αυξημένη πιθανότητα καταγμάτων στην υπο-ομάδα αυτή, αυτό δεν οφειλόταν στην κλοπιδογρέλη¹⁹⁸. Βέβαια, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε και πάλι ότι οι ασθενείς που δεν ήταν συνεπείς με την αγωγή τους (και άρα ελάμβαναν μικρότερες δόσεις αθροιστικά) εμφάνιζαν μικρότερη πιθανότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων από τους μη χρήστες της κλοπιδογρέλης.

Σημαντικό επίσης να αναφερθούν τα ευρήματα της ομάδας των Coibra και συν.¹⁹⁹⁻²⁰² που αφορούν άμεσα την Οδοντιατρική, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της κλοπιδογρέλης σε μοντέλο πειραματικής περιοδοντίτιδας σε επίμυες (με προσθήκη νημάτων στις ουλοδοντικές σχισμές των δοντιών). Η περιοδοντίτιδα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που οφείλεται στα μικρόβια της στοματικής κοιλότητας και οδηγεί σταδιακά σε απορρόφηση του φατνιακού οστού που στηρίζει τα δόντια. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές βρήκαν ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης 75 mg/kg για 3 ημέρες σε επίμυες με πειραματική περιοδοντίτιδα οδήγησε σε σημαντική μείωση της φλεγμονώδους διήθησης των περιοδοντικών ιστών, σημαντική αυτόματη αναγέννησή του οστού τους μετά την απομάκρυνση των νημάτων και σημαντική αύξηση του ρυθμού διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων μετά την αποδρομή της περιοδοντικής φλεγμονής.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των ανωτέρω *in vitro* μελετών φαίνεται ότι η αναστολή του υποδοχέα P2Y₁₂ των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών από την κλοπιδογρέλη θα έπρεπε *in vivo* να οδηγεί σε καταστολή τόσο της παραγωγής νέου οστού, όσο και της οστικής απορρόφησης. Για παράδειγμα, ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης (CAM) φαίνεται να αναστέλλει *in vitro* τη διαφοροποίηση τόσο των οστεοβλαστών όσο και των οστεοκλαστών από κύτταρα του μυελού των οστών^{129, 130}. Οι Su και συν.¹²⁹ έδειξαν επίσης η κλοπιδογρέλη μειώνει την ικανότητα προσκόλλησης των οστεοκλαστών στις περιοχές οστικής απορρόφησης. Επιπλέον, η προσθήκη κλοπιδογρέλης σε κυτταροκαλλιέργειες

οστεοβλαστών δείχνει να μειώνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, να μειώνει την ζωτικότητα τους και να αναστέλλει την εναπόθεση νησίδων νέου οστού¹³⁰. Συνεπώς, φαίνεται ότι η αναστολή του υποδοχέα P2Y₁₂ στις οστεοβλάστες και στις οστεοκλάστες, δεν αποτελεί τον μοναδικό παράγοντα που οδήγησε τελικά σε προαγωγή της οστικής επούλωσης και της οστεοενσωμάτωσης στην παρούσα μελέτη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η κλοπιδογρέλη εμφανίζει πλειοτροπικές δράσεις καθώς ο υποδοχέας P2Y₁₂ είναι παρόν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των διαφόρων ιστών. Συνεπώς, είναι εύλογο να υποτεθεί ότι η προαγωγή της οστικής επούλωσης και της οστεοενσωμάτωσης στην παρούσα μελέτη είναι αποτέλεσμα πλειοτροπικής δράσης της κλοπιδογρέλης, όχι μόνο στα οστικά κύτταρα, αλλά και σε άλλες κυτταρικές σειρές που συμμετέχουν στις επουλωτικές διεργασίες. Είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας P2Y₁₂ εκφράζεται εκτός από τα αιμοπετάλια, στα λευκά αιμοσφαίρια, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις επουλωτικές διαδικασίες²⁰³. Έχει επίσης φανεί ότι η κλοπιδογρέλη είναι δυνατό να επηρεάσει διάφορες βιολογικές διεργασίες που συμμετέχουν στην επούλωση όπως η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας του πρωτοξειδίου του αζώτου, η μείωση της συγκόλλησης μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων, η μείωση της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών και της C αντιδρώσας πρωτεΐνης²⁰⁴. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το πουρινεργικό σύστημα σηματοδότησης ελέγχει γενικότερα μακροπρόσθεσμες τροφικές διεργασίες στην ιστική αναγέννηση στο σύνολό του^{205, 206}. Τα διάφορα μέρη που απαρτίζουν το σύστημα (πολλαπλά υπο-είδη υποδοχέων και πολλαπλά σηματοδοτικά μόρια που μπορούν να επιδρούν στους ίδιους υποδοχείς) είναι ιδιαίτερα αλληλοεξαρτώμενα^{207, 208}. Δεν θα ήταν παράλογο να υποτεθεί ότι η αναστολή του υποδοχέα P2Y₁₂ πιθανότατα επηρεάζει και άλλα μέρη που απαρτίζουν το σύστημα και άρα τη συνολική του δράση, οδηγώντας τελικά σε μια αλληλουχία διεργασιών αλλά και ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την οστική επούλωση.

Όσον αφορά στο σκέλος της οστεοενσωμάτωσης, η κλοπιδογρέλη ενδέχεται επίσης να επηρέασε ευνοϊκά τις εστιακές συνδέσεις (focal adhesion) των οστεοβλαστών και πιθανώς τη μετανάστευσή τους προς την επιφάνεια του τιτανίου. Οι εστιακές συνδέσεις αποτελούν σημαντική διαδικασία για την κίνηση και μετανάστευση των κυττάρων μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, η οποία συντελείται με τη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση μακρομοριακών συμπλεγμάτων. Ιδιαίτερο ρόλο στην ανωτέρω διαδικασία παίζουν οι συνδέσεις που περιέχουν παξιλλίνη (paxillin) στο προέχων ψευδοπόδιο (leading edge) κατά τις αμοιβαδοειδείς κυτταρικές κινήσεις. Η σηματοδότηση μέσω του ADP και του πουρινεργικού υποδοχέα P2Y₁₂ έχει φανεί ότι εμπλέκεται στην κυτταρική εστιακή προσκόλληση και κινητικότητα διαφόρων κυτταρικών σειρών όπως τα αιμοπετάλια και τα μικρογλοιακά κύτταρα^{209, 210}. Οι Lee και συν.²¹¹ έδειξαν στα μικρογλοιακά κύτταρα ότι η σηματοδοτική αλληλουχία ADP – P2Y₁₂ – ERK – β-arrestin 2 – paxillin Ser⁸³ προάγει την αποσυναρμολόγηση των εστιακών συνδέσεων. Ταυτόχρονα όμως φαίνεται ότι η σηματοδοτική αλληλουχία ADP – P2Y₁₂ προάγει και την συναρμολόγηση των εστιακών συνδέσεων μέσω σηματοδοτικής αλληλουχίας που ελέγχεται από την Src-κινάση. Ωστόσο, ο τρόπος διασύνδεσης και αλληλεπίδρασης των δύο σηματοδοτικών αλληλουχιών δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί²¹². Επιπλέον οι Su και συν.¹²⁹ έδειξαν ότι ο υποδοχέας P2Y₁₂ προάγει τη συγκόλληση των οστεοκλαστών στις περιοχές οστικής απορρόφησης, όπως αντίστοιχα προάγει τη συγκόλληση μεταξύ των αιμοπεταλίων.

Αδιαμφισβήτητα, η παρούσα μελέτη έχει και κάποιους περιορισμούς. Για παράδειγμα, λόγω περιορισμών στον αριθμό των εργαστηριακών ζώων από την επιτροπή αδειοδότησης πρωτοκόλλου δεν κατέστη δυνατή η αξιολόγηση και άλλων δοσολογιών της κλοπιδογρέλης ή και άλλων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, όπως είχε αρχικά σχεδιαστεί. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη θα είχε ωφεληθεί από τη χρήση μικρο-αξονικής τομογραφίας (MicroCT) για την απόδοση ακριβέστερων ποσοτικών αποτελεσμάτων στην αξιολόγηση της οστικής επούλωσης και της οστεοενσωμάτωσης. Επιπλέον, δεν ήταν εφικτή η ακτινολογική αξιολόγηση της οστεοενσωμάτωσης καθώς οι διαστάσεις του

εμφυτεύματος και του μηριαίου του κουνελιού ήταν ιδιαίτερα μικρές, αλλά και ο χρόνος ελέγχου βραχύς, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση οστεολυσίας γύρω από τα εμφυτεύματα. Ωστόσο, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (συνδυασμός ιστολογικής και ακτινολογικής αξιολόγησης) θεωρούνται επίσης αξιόπιστες από τη βιβλιογραφία²¹³. Τέλος, η παρούσα διατριβή, αν και προσπαθεί να προσομοιάσει ένα κλινικό σενάριο, δεν παύει να αποτελεί μια πειραματική μελέτη σε εργαστηριακά ζώα, και η μεταφορά των αποτελεσμάτων της στην κλινική πράξη οφείλει να γίνεται με επιφύλαξη.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή έδειξε ότι:

- η περιεγχειρητική χορήγηση της κλοπιδογρέλης δεν οδηγεί σε καταστολή της οστικής επούλωσης, και άρα είναι δυνατή η συνέχιση της αγωγής διεγχειρητικά εφόσον δεν υπάρχει κίνδυνος σοβαρής αιμορραγίας ή άλλως η επανέναρξη της αγωγής σύντομα μετεγχειρητικά.
- η παρουσία της κλοπιδογρέλης προάγει την οστική επούλωση και την ενσωμάτωση των εμφυτευμάτων τιτανίου. Το εύρημα αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση ώστε:
 - να αξιολογηθεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει
 - να εξακριβωθεί η πιθανή συνεργική δράση της κλοπιδογρέλης με άλλα φάρμακα που συχνά συγχορηγούνται σε καρδιαγγειακούς ασθενείς όπως στατίνες, αντιπηκτικά, β-αδρενεργικοί αναστολείς, κ.α., τα οποία είναι γνωστό ότι επίσης επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό²¹⁴
 - να βρεθούν πιθανές κλινικές εφαρμογές των συγκεκριμένων φαρμακολογικών παραγόντων σε σχέση με την οστική επούλωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σάββας Α. Ανατομική του ανθρώπου. Τόμος Α'. Εκδοτικός Οίκος ΑΦΩΝ Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη. 1957: 219
2. Fawcett, DW. A textbook of histology. II. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986
3. Dorland's illustrated medical dictionary. 26. Philadelphia: W.B. Saunders; 1981
4. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 2-17
5. Del Fattore A, Capannolo M, Rucci N. Bone and bone marrow: the same organ. *Arch Biochem Biophys* 2010; 503 :28-34
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 421746
7. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 81-94
8. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 229-38

9. Luxenburg C, Addadi L, Geiger B. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 203-11
10. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 195-202
11. Δοντά Ι. Ανατομική και βιολογία των οστικών κυττάρων και της θεμέλιας ουσίας, Στο: Λυρίτης Γ. Μεταβολικά νοσήματα των οστών. HYLONOME EDITIONS. 4η Έκδοση. Αθήνα. 2007: 13-21
12. Παρίσης Ν, Τσίρλης Α, Βέης Α. Οστό και οστική αναγέννηση (κεφάλαιο14), Στο: Παρίσης Ν, Τσίρλης Α. Σημειώσεις Χειρουργικής Στόματος. Θεσσαλονίκη 2008: 289-295
13. Nobakhti S, Limbert G, Turner PJ. Cement lines and interlamellar areas in compact bone as strain amplifiers - contributors to elasticity, fracture toughness and mechanotransduction. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014; 29: 235-51
14. Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas*. 6th Ed. Churchill Livingstone. 2014: 189-190
15. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem* 2018; 55: 308-327
16. Hadjidakis DJ, Androulakis I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092: 385-96
17. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124: 991-8

18. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31: 233-45
19. Zhou H, Chernenky R and Davies JE. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 367–374
20. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42: 551-5
21. Einhorn T, Gerstenfeld L. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 45–54
22. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 459-66
23. Alberius P, Johnell O. Repair of intra-membranous bone fractures and defects in rats. Immunolocalization of bone and cartilage proteins and proteoglycans. *J Craniomaxillofac Surg* 1991; 19: 15-20
24. Thaller SR, Kawamoto HK. A histologic evaluation of fracture repair in the midface. *Plast Reconstr Surg* 1990; 85: 196-201
25. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AA, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004; 42: 315-22
26. Quarto N, Wan DC, Kwan MD, Panetta NJ, Li S, Longaker MT. Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling

- determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 1680-94
27. Aghaloo TL, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry SM, Atti E, Tetradis S. Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J Dent Res* 2010; 89: 1293-8
 28. Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VM, Hutmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene* 2013; 525: 99-106
 29. Veis A, Kougias K, Tsirlis A, Parisis N, Papadopoulou C, Romanos GE. Evaluation of the osteogenic potential in experimental defects, with and without bone marrow, in the rabbit tibia: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24: 1054-60
 30. Fujii T, Ueno T, Kagawa T, Sakata Y, Sugahara T. Comparison of bone formation ingrafted periosteum harvested from tibia and calvaria. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 580-4
 31. Olate S, Vásquez B, Sandoval C, Vasconcellos A, Alister JP, Sol M. Histological Analysis of Bone Mandibular Body Repair in Osteotomy Using Internal Fixation System in Three Different Gaps without Bone Graft in an Animal Model. *BioMed Research International* 2019; 2: 1-8
 32. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 205: 299-308

33. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, Sasano Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Diseases* 2008; 14: 457-64
34. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 2008; 5: 1137-58
35. Markatos K, Tsoucalas G, Sgantzos M. Hallmarks in the history of orthopaedic implants for trauma and joint replacement. *Acta Med Hist Adriat* 2016; 14: 161-76
36. Bothe RT, Beaton LE, Davenport HA. Reaction of Bone to Multiple Metallic Implants. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 1940; 71: 598-602
37. Leventhal G.S. Titanium, a Metal for Surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1951; 33A: 473-474
38. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchor of dental prosthesis. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3: 81-100
39. Brånemark P-I, Hansson BU, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallen O, Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1977; 2(suppl. 16): 1-132

40. Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration — a requiem for the periodontal ligament? *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; 11: 88–91
41. The Academy of Prosthodontics. The Glossary of Prosthodontic Terms: Ninth Edition. *J Prosthet Dent*. 2017; 117(5S): e1-e105
42. McClarence E. *Close To The Edge: Branemark And The Development Of Osseointegration*. Quintessence Pub Co. 2003
43. Albrektsson T, Albrektsson B. Osseointegration of bone implants: A review of an alternative mode of fixation, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1987; 58: 567-577
44. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 1127-35
45. Taipale J, Keski-Oja, J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB Journal* 1997; 11: 51– 59
46. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22: 349–356
47. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American Journal of Surgery* 1998; 176: 26S–38S.
48. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224–2234

49. Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE2 biosynthesis in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 65: 792–799
50. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867–869
51. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering* 2005; 11: 1–18
52. Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; 57: 41–64
53. Lansdown ABG, Sampson B, Rowe A. Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *International Journal Experimental Pathology* 2001; 82: 35–41
54. Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Pe´ault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2010; 30: 1104–1109
55. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233–241
56. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998; 11: 391-401
57. Βέης Α. Συγκριτική μελέτη της σύνδεσης αυτογενούς οστικού μοσχεύματος με διαφορετικής επεξεργασίας εμφυτεύματα. *Ιστολογική*

- μελέτη. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. 2002
58. Boyce BF, Xing L. Osteoclasts, no longer osteoblast slaves. *Nature Medicine* 2006; 12: 1356–1358
 59. Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi, Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Frontiers in Bioscience* 2011; 16: 21–30.
 60. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Lowik CW, van Bezooijen RL. Osteocytederived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2008; American Volume 90(Suppl. 1): 31–35.
 61. Τσίρλης Α, Παρίσης Ν. Χειρουργική Οδοντικών Εμφυτευμάτων. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Θεσσαλονίκη, 2001:17
 62. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res* 2014 ; 16: 155–165
 63. Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Bone Immune Response to Materials, Part I: Titanium, PEEK and Copper in Comparison to Sham at 10 Days in Rabbit Tibia. *J Clin Med* 2018; 7: E526
 64. Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the

first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018; 20: 82–91

65. Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Bone Immune Response to Materials, Part II: Copper and Polyetheretherketone (PEEK) Compared to Titanium at 10 and 28 Days in Rabbit Tibia. *J Clin Med* 2019; 8: E814
66. Shayan M, Padmanabhan J, Morris AH, Cheung B, Smith R, Schroers J, Kyriakides TR. Nanopatterned bulk metallic glass-based biomaterials modulate macrophage polarization. *Acta Biomater* 2018; 75: 427–438
67. Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 1996; 18: 451-457
68. Gilles JA, Carnes DL, Windeler AS. Development of an in vitro culture system for the study of osteoclast activity and function. *J Endod* 1994; 20: 327-331
69. Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE. Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 1993; 14: 91-96.
70. de Bruijn JD, Bovell YP, Davies JE, van Blitterswijk CA. Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 105-112
71. Lohmann K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 1929; 17: 624–625

72. Fiske CH, SubbaRow Y. Phosphorous compounds of muscle and liver. *Science* 1929; 70: 381–382
73. Lippman F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Enzymology* 1941; 1: 99
74. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 1970; 40: 668–688
75. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509–581
76. Wikipedia contributors, " Geoffrey Burnstock ", Wikipedia, The Free Encyclopedia, last modified Sept 19, 2018, https://en.wikipedia.org/wiki/Geoffrey_Burnstock
77. Geoffrey Burnstock, "Purinergic System", in Stefan Offermanns and Walter Rosenthal "Encyclopedia of Molecular Pharmacology", 2nd Edition, Springer, Berlin Heidelberg. 2008: 1047-1053
78. Ryan LM, Rachow JW, McCarty BA, McCarty DJ. Adenosine triphosphate levels in human plasma. *J Rheumatol* 1996; 23: 214–219
79. Novak. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus, *News Physiol Sci* 2003; 18: 12-7
80. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Yreceptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 785–795

81. Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res* 1996; 39: 337–352
82. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 358-404
83. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *Journal of Physiology* 1929; 68: 213–237
84. Burnstock G. Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology* 1976; 62: 491–503
85. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW and Bolis L (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press, 1978: 107–118
86. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International union of pharmacology. XXV: Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 2001; 53: 527–552
87. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5113–5117

88. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Letters* 1993; 324: 219–225
89. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extra-cellular ATP. *Nature* 1994; 371: 516–519
90. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994; 371: 519–523
91. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 281–341
92. Kumral A, Tuzun F, Yesilirmak DC, Duman N, Ozkan H. Genetic basis of apnoea of prematurity and caffeine treatment response: Role of adenosine receptor polymorphisms: Genetic basis of apnoea of prematurity. *Acta Paediatrica* 2012; 101: e299–e303
93. Reshkin SJ, Guerra L, Bagorda A, Debellis L, Cardone R, Li AH, Jacobson KA, Casavola V. Activation of A3 adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A6 cells. *Journal of Membrane Biology* 2000; 178: 103–113

94. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances* 2018; 2: 1– 10
95. Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry* 2008; 105: 1067–79
96. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews* 2002; 82: 1013–1067
97. Evans RJ. Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. *Eur Biophys J* 2008; 38: 319–27
98. Boué-Grabot E, Archambault V, Séguéla P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 10190–10195
99. Dubyak, George R. P2Y Receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2nd. ed.). Cleveland, OH: Elsevier Inc. 2013: 375–378
100. Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y, Nakata H. Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Letters* 2002; 531: 299–303
101. Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: A P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiological Reviews* 2001; 81: 767–806
102. Van Kolen K, Slegers H. Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. *Purinergic Signaling* 2006; 2: 451–69

103. Kumagai H, Sacktor B, Filburn CR. Purinergic regulation of cytosolic calcium and phosphoinositide metabolism in rat osteoblast-like osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 697–708
104. Schofl C, Cuthbertson KS, Walsh CA, Mayne C, Cobbold P, von zur Muhlen A, Hesch RD, Gallagher JA. Evidence for P2-purinoceptors on human osteoblastlike cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 485–91
105. Rumney RM, Wang N, Agrawal A, Gartland A. Purinergic signalling in bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 116
106. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 2000; 275: 31061-8
107. Thompson WR, Majid AS, Czymmek KJ, Ruff AL, García J, Duncan RL, Farach-Carson MC. Association of the $\alpha(2)\delta(1)$ subunit with $Ca(v)3.2$ enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 2125-39
108. Rumney RM, Sunters A, Reilly GC, Gartland A. Application of multiple forms of mechanical loading to human osteoblasts reveals increased ATP release in response to fluid flow in 3D cultures and differential regulation of immediate early genes. *J Biomech* 2012; 45: 549-54

109. Brandao-Burch A1, Key ML, Patel JJ, Arnett TR, Orriss IR. The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 41
110. Hoebertz A1, Townsend-Nicholson A, Glass R, Burnstock G, Arnett TR. Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells. *Bone*. 2000; 27: 503-10
111. Orriss IR1, Utting JC, Brandao-Burch A, Colston K, Grubb BR, Burnstock G, Arnett TR. Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology*. 2007; 148: 4208-16
112. Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1356-67
113. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol* 2008; 181: 859–871.
114. Li J, Liu D, Ke HZ, Duncan RL, Turner CH. The P2X7 nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem* 2005; 280: 42952-9

115. World Health Organization, 20th WHO Model List of Essential Medicines. March 2017. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML_2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1
116. Fischer, Janos; Ganellin, C. Robin. Analogue-based Drug Discovery. John Wiley & Sons. 2006: 453
117. Smock KJ, Saunders PJ, Rodgers GM, et al. Laboratory evaluation of clopidogrel responsiveness by platelet function and genetic methods. *Am J Hematol* 2011;86(12):1032- 4
118. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-13
119. Mirabbasi SA, Khalighi K, Wu Y, Walker S, Khalighi B, Fan W, Kodali A, Cheng G. CYP2C19 genetic variation and individualized clopidogrel prescription in a cardiology clinic. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2017; 7: 151–156
120. Smock KJ, Saunders PJ, Rodgers GM, Johari V. Laboratory evaluation of clopidogrel responsiveness by platelet function and genetic methods. *Am J Hematol* 2011; 86: 1032-4
121. Warnholtz A, Ostad MA, Velich N, Trautmann C, Schinzel R, Walter U, Munzel T. A single loading dose of clopidogrel causes dose-dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary

- artery disease: results of a double-blind, randomised study. *Atherosclerosis* 2008; 196: 689-695
122. West LE, Steiner T, Judge HM, Francis SE, Storey RF. Vessel wall, not platelet, P2Y₁₂ potentiates early atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 429-35
123. Ostad MA, Nick E, Paixao-Gatinho V, Schnorbus B, Schiewe R, Tschentscher P, Munzel T, Warnholtz A. Lack of evidence for pleiotropic effects of clopidogrel on endothelial function and inflammation in patients with stable coronary artery disease: results of the double-blind, randomised CASSANDRA study. *Clin Res Cardiol* 2011; 100: 29-36
124. André P, DeGuzman F, Haberstock-Debic H, Mills S, Pak Y, Inagaki M, Pandey A, Hollenbach S, Phillips DR, Conley PB. Thienopyridines, but not elinogrel, result in off-target effects at the vessel wall that contribute to bleeding. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338: 22-30
125. Frolidi G, Bertin R, Dorigo P, Montopoli M, Caparrotta L. Endothelium-independent vasorelaxation by ticlopidine and clopidogrel in rat caudal artery. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63: 1056-1062
126. Xiao Z, Thérroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1982-1988
127. Antonino MJ, Mahla E, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Effect of long-term clopidogrel treatment on platelet function and inflammation in

- patients undergoing coronary arterial stenting. *Am J Cardiol* 2009; 103: 1546-1550
128. Yamaguchi R, Yamamoto T, Motomura G, Ikemura S, Iwasaki K, Zhao G, Iwamoto Y. Effects of an anti-platelet drug on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 789-793
129. Su X, Floyd DH, Hughes A, Xiang J, Schneider JG, Uluckan O, Heller E, Deng H, Zou W, Craft CS, Wu K, Hirbe AC, Grabowska D, Eagleton MC, Townsley S, Collins L, Piwnica-Worms D, Steinberg TH, Novack DV, Conley PB, Hurchla MA, Rogers M, Weilbaecher KN. The ADP receptor P2RY12 regulates osteoclast function and pathologic bone remodeling. *J Clin Invest* 2012; 122: 3579-3592
130. Syberg S, Brandao-Burc A, Patel JJ, Hajjawi M, Arnett TR, Schwarz P, Jorgensen NR, Orriss IR. Clopidogrel (Plavix), a P2Y12 receptor antagonist, inhibits bone cell function in vitro and decreases trabecular bone in vivo. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2373-2386
131. Jørgensen NR, Grove EL, Schwarz P, Vestergaard P. Clopidogrel and the risk of osteoporotic fractures: a nationwide cohort study. *J Intern Med* 2012; 272: 385-393
132. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Koyano K. The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-

like cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: 724-9

133. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355 (Suppl): S116-23
134. Claesson-Welsh L, Heldin CH. Platelet-derived growth factor. Three isoforms that bind to two distinct cell surface receptors. *Acta Oncol* 1989; 28: 331-4
135. Tanaka H, Liang CT. Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *J Cell Physiol* 1995; 164: 367-75
136. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, et al. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 1995; 16: 455–460
137. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004; 13: 301–309
138. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 Suppl 1: S13-33
139. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* 2004; 104: 3198-204

140. Scull CM, Hays WD, Fischer TH. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J Inflamm (Lond)* 2010; 7: 53
141. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008; 29: 403-40
142. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 1585-90
143. Kanagaraja S, Lundström I, Nygren H, Tengvall P. Platelet binding and protein adsorption to titanium and gold after short time exposure to heparinized plasma and whole blood. *Biomaterials* 1996; 17: 2225-32
144. Nygren H, Tengvall P, Lundström I. The initial reactions of TiO₂ with blood. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 487- 92
145. Nygren H, Eriksson C, Lausmaa J. Adhesion and activation of platelets and polymorphonuclear granulocyte cells at TiO₂ surfaces. *J Lab Clin Med* 1997; 129: 35-46
146. Hong J, Andersson J, Nilsson Ekdahl K, Elgue G, Axén N, Larsson R, Nilsson B. Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 58-64
147. Broberg M, Eriksson C, Nygren H. GpIIb/IIIa is the main receptor for initial platelet adhesion to glass and titanium surfaces in contact with whole blood. *J Lab Clin Med* 2002; 139: 163-72

148. Davies JE, Park JY. Critical issues in endosseous periimplant wound healing. In: Ellingsen J, ed. Bio-implant interface: improving biomaterials and tissue reactions. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003
149. Mitchell S M, Sethia KK. Hazards of aspirin withdrawal before transurethral prostatectomy. *BJU Int* 1999; 84: 530
150. Collet JP, Montalescot G, Blanchet B, Tanguy ML, Golmard JL, Choussat R, Beygui F, Payot L, Vignolles N, Metzger JP, Thomas D. Impact of prior use or recent withdrawal of oral antiplatelet agents on acute coronary syndromes. *Circulation* 2004; 110: 2361-7
151. Ferrari E, Benhamou M, Cerboni P, Marcel B. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 456-9
152. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Fusaro M, Burzotta F, Testa L, Sheiban I, Sangiorgi G. A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50,279 patients at risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006; 27: 2667-74
153. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: A look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol Ther* 2009; 123: 178-86
154. Grines CL, Bonow RO, Casey DE Jr, Gardner TJ, Lockhart PB, Moliterno DJ, O'Gara P, Whitlow P; American Heart Association;

American College of Cardiology; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; American College of Surgeons; American Dental Association; American College of Physicians. Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians. *Circulation* 2007; 115: 813-8

155. Burger W, Chemnitz JM, Kneissl GD, Rücker G. Low-dose aspirin for secondary cardiovascular prevention - cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation - review and meta-analysis. *J Intern Med.* 2005;257(5):399-414
156. Palmer JD, Sparrow OC, Iannotti F. Postoperative hematoma: a 5-year survey and identification of avoidable risk factors. *Neurosurgery* 1994; 35: 1061-4
157. Thurston AV, Briant SL. Aspirin and post-prostatectomy haemorrhage. *Br J Urol* 1993; 71: 574-6
158. Lawrence C, Sakuntabhai A, Tiling-Grosse S. Effect of aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drug therapy on bleeding complications in dermatologic surgical patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 988-92
159. Kapetanakis EI, Medlam DA, Petro KR, Haile E, Hill PC, Dillum MK, Bafi AS, Boyce SW, Corso PJ. Effect of clopidogrel premedication in

- off-pump cardiac surgery: are we forfeiting the benefits of reduced hemorrhagic sequelae? *Circulation*. 2006; 113: 1667-74
160. Kang W, Theman TE, Reed JF III, Stoltzfus J, Weger N. The effect of preoperative clopidogrel on bleeding after coronary artery bypass surgery. *J Surg Educ* 2007; 64: 88-92
161. Sharma AK, Ajani AE, Hamwi SM, Maniar P, Lakhani SV, Waksman R, Lindsay J. Major noncardiac surgery following coronary stenting: when is it safe to operate? *Catheter Cardiovasc Interv* 2004; 63: 141-5
162. Song SW, Youn YN, Yi G, Lee S, Yoo KJ. Effects of continuous administration of clopidogrel before off-pump coronary artery bypass grafting in patients with acute coronary syndrome. *Circ J* 2008; 72: 626-32
163. Chassot PG, Delabays A, Spahn DR. Perioperative antiplatelet therapy: the case for continuing therapy in patients at risk of myocardial infarction. *Br J Anaesth* 2007; 99: 316-28
164. Pickard AS, Becker RC, Schumock GT, Frye CB. Clopidogrel-associated bleeding and related complications in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 376-92
165. Lillis T, Ziakas A, Koskinas K, Tsirlis A, Giannoglou G. Safety of dental extractions during uninterrupted single or dual antiplatelet treatment. *Am J Cardiol* 2011; 108: 964-7

166. Lu SY, Tsai CY, Lin LH, Lu SN. Dental extraction without stopping single or dual antiplatelet therapy: results of a retrospective cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016; 45: 1293-8
167. Gupta R, Dugal A, Sane VD, Hiwarkar S, Khandelwal S, Iyengar A. Effect of Low-Dose Aspirin on Bleeding Following Exodontia: A Prospective Clinical Study. *J Maxillofac Oral Surg* 2018; 17: 350-355
168. Tabrizi R, Khareshi I, Hoseinzadeh A, Rezvanpour B, Shafie S. Do Antiplatelet Drugs Increase the Risk of Bleeding After Dental Implant Surgery? A Case-and-Crossover Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2018; 76: 2092-2096
169. Doganay O, Atalay B, Karadag E, Aga U, Tugrul M. Bleeding frequency of patients taking ticagrelor, aspirin, clopidogrel, and dual antiplatelet therapy after tooth extraction and minor oral surgery. *J Am Dent Assoc* 2018; 149: 132-138
170. Napeñas JJ1, Oost FC, DeGroot A, Loven B, Hong CH, Brennan MT, Lockhart PB, van Diermen DE. Review of postoperative bleeding risk in dental patients on antiplatelet therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: 491-9
171. Zabojszcz M, Malinowski KP, Janion-Sadowska A, Lillis T, Ziakas A, Sławska A, Janion M, Siudak Z. Safety of dental extractions in patients on dual antiplatelet therapy - a meta-analysis. *Postepy Kardiologii Interwencyjnej* 2019; 15: 68-73

172. Li L, Zhang W, Yang Y, Zhao L, Zhou X, Zhang J. Dental management of patient with dual antiplatelet therapy: a meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2019; 23: 1615-1623
173. Ockerman A, Bornstein MM, Leung YY, Li SKY, Politis C, Jacobs R. Incidence of bleeding after minor oral surgery in patients on dual antiplatelet therapy: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2019; S0901-5027: 31171-3
174. Pean CA, Goch A, Christiano A, Konda S, Egol K. Current Practices Regarding Perioperative Management of Patients With Fracture on Antiplatelet Therapy: A Survey of Orthopedic Surgeons. *Geriatr Orthop Surg Rehabil* 2015; 6: 289-94
175. Lin SY, Huang HT, Chou SH, Ho CJ, Liu ZM, Chen CH, Lu CC. The Safety of Continuing Antiplatelet Medication Among Elderly Patients Undergoing Urgent Hip Fracture Surgery. *Orthopedics*. 2019; 42: 268-274
176. Hu SB, Hai Y, Tang JF, Liu T, Liang BX, Xue BQ. Risk of bleeding in patients with continued dual antiplatelet therapy during orthopedic surgery. *Chin Med J (Engl)* 2019; 132: 943-947
177. Shin WS, Ahn DK, Lee JS, Yoo IS, Lee HY. The Influence of Antiplatelet Drug Medication on Spine Surgery. *Clin Orthop Surg* 2018; 10: 380-384
178. Ghanem ES, Richard RD, Wingert NCH, Gotoff JR, Graham JH, Bowen TR. Preoperative Use of Clopidogrel Does Not Affect Outcomes for

Femoral Neck Fractures Treated With Hemiarthroplasty. *J Arthroplasty* 2017; 32: 2171-2175

179. Sa-Ngasoongsong P, Kulachote N, Sirisreetreerux N, Chanplakorn P, Laohajaroensombat S, Pinsiranon N, Woratanarat P, Kawinwonggowit V, Suphachatwong C, Wajanavisit W. Effect of early surgery in high surgical risk geriatric patients with femoral neck fracture and taking antiplatelet agents. 2015; 6: 970–976
180. American Association of Orthopedic Surgeons. Management of hip fractures in the elderly. Evidence- based clinical practice guideline. Board of Directors, September 5, 2014 6300 North River Road Rosemont, IL 60018 First Edition. Retrieved in 2/9/2019 https://www.aaos.org/uploadedFiles/PreProduction/Quality/Guidelines_and_Reviews/guidelines/hip-fractures-elderly-clinical-practice-guideline-4-24-19%20-2.pdf
181. Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Jiang X, Hua J, Bostwick JS, Ogletree ML, Schumacher WA, Rehfuss R. Platelet aggregometry and receptor binding to predict the magnitude of antithrombotic and bleeding time effects of clopidogrel in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 49: 316-324
182. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res* 2015; 26: 915-930

183. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010; 40: 180-187
184. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008; 43: 931-940
185. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *J Oral Pathol* 1982; 11: 318–326
186. Donath K. The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. *Pathol Res Pract* 1985; 179: 631–633
187. Donath K., Rohrer M. Bone Sectioning Using the Exakt System. In: An Y.H., Martin K.L. (eds) *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Humana Press, Totowa, NJ. 2003: 243-252
188. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 1983; 72: 1396–1409
189. Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, Oliveira RD, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone

marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clinical Oral Implants Research* 2014; 25: 567-72

190. Calvo-Guirado JL, Garces M, Delgado-Ruiz RA, Ramirez-Fernandez MP, Ferres-Amat E, Romanos GE. Biphasic β -TCP mixed with silicon increases bone formation in critical site defects in rabbit calvaria. *Clinical Oral Implants Research* 2015; 26: 891-897
191. Fontana F, Rocchietta I, Addis A, Schupbach P, Zanotti G, Simion M. Effects of a calcium phosphate coating on the osseointegration of endosseous implants in a rabbit model. *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22: 760–766
192. Johansson CB, Gretzer C, Jimbo R, Mattisson I, Ahlberg E. Enhanced implant integration with hierarchically structured implants: a pilot study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 2012; 23: 943-53
193. Λιλλής Θ. Η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση. Πειραματική μελέτη σε επίμυες. Διπλωματική διατριβή. Τμήμα Οδοντιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. 2012
194. Kaweblum M, Aguilar MC, Blancas E, Kaweblum J, Lehman WB, Grant AD, Strongwater AM. Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fib fibula of the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res* 1994; 12: 747–749

195. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 62-71
196. Cacchioli A, Ravanetti F, Soliani L, Borghetti P. Preliminary study on the mineral apposition rate in distal femoral epiphysis of New Zealand white rabbit at skeletal maturity. *Anat Histol Embryol* 2012; 41: 163-9.
197. Mediero A, Wilder T, Reddy VS, Cheng Q, Tovar N, Coelho PG, Witek L, Whatling C, Cronstein BN. Ticagrelor regulates osteoblast and osteoclast function and promotes bone formation in vivo via an adenosine-dependent mechanism. *FASEB J* 2016; 30: 3887-3900
198. Jørgensen NR, Schwarz P, Iversen HK, Vestergaard P. P2Y12 Receptor Antagonist, Clopidogrel, Does Not Contribute to Risk of Osteoporotic Fractures in Stroke Patients. *Front Pharmacol* 2017; 8: 821
199. Coimbra LS, Rossa C Jr, Guimarães MR, Gerlach RF, Muscará MN, Spolidorio DM, Herrera BS, Spolidorio LC. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *J Periodontol* 2011; 82: 767-77
200. Coimbra LS, Steffens JP, Muscará MN, Rossa C Jr, Spolidorio LC. Antiplatelet drugs reduce the immunoinflammatory response in a rat model of periodontal disease. *J Periodontal Res* 2014; 49: 729-35
201. Coimbra LS, Steffens JP, Rossa C Jr, Graves DT, Spolidorio LC. Clopidogrel enhances periodontal repair in rats through decreased inflammation. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 295-302.

202. Coimbra LS, Steffens JP, Alsadun S, Albiero ML, Rossa C Jr, Pignolo RJ, Spolidorio LC, Graves DT. Clopidogrel Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation Following Periodontitis. *J Dent Res* 2015; 94: 1691-7
203. Gachet C. P2Y₁₂ receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal* 2012; 8: 609–619
204. Schrottmaier WC, Kral JB, Badrnya S, Assinger A. Aspirin and P2Y₁₂ Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb Haemost* 2015; 114: 478-489
205. Burnstock G, Verkhatsky A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 2010; 1: e9
206. Noronha-Matos JB, Correia-de-Sá P. Mesenchymal Stem Cells Ageing: Targeting the "Purinome" to Promote Osteogenic Differentiation and Bone Repair. *J Cell Physiol* 2016; 231: 1852-1861
207. Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal* 2013; 9: 541-572
208. Novak I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 2003; 18: 12-17
209. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1975–1982

210. Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B, Gachet C. The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the α (IIb) β (3) integrin–a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Letters* 2001; 505: 281–290
211. Lee SH¹, Hollingsworth R, Kwon HY, Lee N, Chung CY. β -arrestin 2-dependent activation of ERK1/2 is required for ADP-induced paxillin phosphorylation at Ser(83) and microglia chemotaxis. *Glia*. 2012 Sep;60(9):1366-77
212. Fuss B. Signaling pathways mediating adhesion and spreading through extracellular ADP and the P2Y₁₂ receptor: presented by Maria P. Abbracchio. *Purinergic Signal*. 2013; 9:131-3
213. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc* 2012; 7: 1918-29
214. Walsh JS, Newman C, Eastell R. Heart drugs that affect bone. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 163-8

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΑΦΕ

Θεσ/νίκη: 22 Δεκεμβρίου 2015
Αριθ. Πρωτ.: 527888/4090

Ταχ. Δ/ση: Αιγαίου 15 & Σολωμού 1
Τ. Κ.: 551 34, Καλαμαριά
Ταχ. Γραφείο: 16, Τ.Κ. : 54008, Θεσσαλονίκη
Τηλέφωνο: 478.618
Φαξ: 478.333
Πληροφορίες: Ε. Παπαγιάννη
Email: Ef.Papagianni@pkm.gov.gr

ΘΕΜΑ: Χορήγηση άδειας πρωτοκόλλου

Α Π Ο Φ Α Σ Η

Έχοντας υπόψη:

1. Το Ν. 3852/2010 «Νέα Αρχιτεκτονική της Αυτοδιοίκησης και της Αποκεντρωμένης Διοίκησης- Πρόγραμμα Καλλικράτης» (ΦΕΚ 87/τ. Α' /07.06.2010).
2. Τις διατάξεις του Π.Δ. 133/10 «Οργανισμός Περιφέρειας Κεντρικής Μακεδονίας», που δημοσιεύθηκε στο ΦΕΚ 226/τ. Α' /27-12-2010.
3. Τις διατάξεις του Ν. 1197/81 «περί προστασίας των ζώων» & συγκεκριμένα το αρθ.4.
4. Τις διατάξεις του Ν. 2015/92 «περί κυρώσεως της Ευρωπαϊκής Σύμβασης για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς».
5. Τις διατάξεις του Π.Δ. 56/13 «Προσαρμογή της ελληνικής νομοθεσίας στην Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 (L 276/33/20.10.2010) "σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς" (ΦΕΚ 106/τ. Α' /30.04.2013)
6. Την υπ' αριθμ. Πρωτ. 2215/117550/01.10./2013 ερμηνευτική εγκύκλιο του ΥΠΑΑΤ
7. Την υπ' αριθμ. Πρωτ. 262514/2177/07.07.2014 Απόφαση Έγκρισης Επιτροπής Αξιολόγησης πρωτοκόλλων πειραματισμού για την εγκατάσταση *χρήσης* πειραματοζώων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Φαρμακολογίας, Βιοχημείας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ. με αριθμό καταχώρησης EL 54BIO10
8. Την από 03/12/2015 αίτηση του ενδιαφερόμενου για την αδειοδότηση πρωτοκόλλου σε κόνικλους με τον τίτλο «Μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην οστική επούλωση και στην ενσωμάτωση εμφυτευμάτων τιτανίου» στην εγκατάσταση χρήσης με κωδικό αριθμό **EL54BIO10**
9. Το Πρακτικό της ΕΑΠ της εγκατάστασης χρήσης πειραματοζώων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Φαρμακολογίας, Βιοχημείας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ. με κωδικό EL54BIO10, που συνιστά τη θετική αξιολόγηση του πρωτοκόλλου.
10. Την με αριθμ. πρωτ. 20/11.12.2015 Γνωμάτευση της ΕΑΠ της εγκατάστασης χρήσης πειραματοζώων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Φαρμακολογίας, Βιοχημείας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ. με κωδικό EL54BIO10, που συνιστά τη θετική αξιολόγηση του πρωτοκόλλου.

ΑΠΟΦΑΣΙΖΟΥΜΕ

Χορηγούμε άδεια πρωτοκόλλου για την πραγματοποίηση του προαναφερόμενου πειράματος σε σαράντα οκτώ (48) κόνικλους της φυλής Νέας Ζηλανδίας από τον κ. Θεόδωρο Λιλλή- Χειρουργό Οδοντίατρο, Msc (med), Msc (dent), Υπ. Διδάκτωρ του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος ορίζεται και ως υπεύθυνος πρωτοκόλλου, καθόσον πληρούνται οι προϋποθέσεις της σχετικής για την προστασία των ζώων νομοθεσίας.

Υπεύθυνος χρήσης πρωτοκόλλου : κ. ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΙΛΛΗΣ

Υπεύθυνος εκτέλεσης/ υλοποίησης του πρωτοκόλλου: κ. ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΛΙΛΛΗΣ

Υπεύθυνος για τη συμμόρφωση προς την αδειοδότησή του: κ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΑΪΤΖΟΓΛΟΥ

Εγκεκριμένη εγκατάσταση χρήσης: Εργαστήριο Φυσιολογίας, Φαρμακολογίας, Βιοχημείας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ. με κωδικό **EL54BIO10** και υπεύθυνη κτηνίατρο την κ. ΜΑΡΙΑ ΤΣΑΝΤΑΡΛΙΩΤΟΥ

Η παρούσα άδεια χορηγείται για χρονικό διάστημα τριών (3) ετών.

Σημειώσεις

- Τροποποίηση ή ανανέωση της άδειας πρωτοκόλλου απαιτείται για τις αλλαγές του πρωτοκόλλου που δύνανται να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ευζωία των ζώων.
- Οποιαδήποτε τροποποίηση ή ανανέωση άδειας πρωτοκόλλου προϋποθέτει περαιτέρω θετική έκβαση της αξιολόγησης του πρωτοκόλλου.
- Σε περίπτωση που το πρωτόκολλο δεν εκτελείται σύμφωνα με τους όρους αδειοδότησής του, η αρμόδια περιφερειακή αρχή, σε συνεργασία με την Επιτροπή Αξιολόγησης των πρωτοκόλλων μπορεί να ανακαλέσει τη σχετική άδεια.
- Η ανάκληση της άδειας του πρωτοκόλλου δεν πρέπει να επηρεάζει αρνητικά την ευζωία των ζώων που χρησιμοποιούνται ή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν στο πρωτόκολλο.
- Οι χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ή και λοιπές ουσίες για τη διεξαγωγή του πειράματος υπόκεινται, όσον αφορά την εισαγωγή και εν γένει κυκλοφορία τους, στις σχετικές κείμενες διατάξεις.



Ο

Προϊστάμενος Διεύθυνσης Κτηνιατρικής

Γεώργιος Βαφειάδης
Κτηνίατρος

Πίνακας Διανομής:

1. Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων
Γενική Δ/ση Κτηνιατρικής
Δ/ση Κ.Α.Φ.Ε.
Αχαρνών 2, 101 76 ΑΘΗΝΑ
2. Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής
Μητροπολιτικής Ενότητας Θεσσαλονίκης, Τμήμα Κτηνιατρικής
3. Επιτροπή αξιολόγησης πρωτοκόλλων πειραματισμού για την εγκατάσταση *χρήσης* πειραματοζώων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Φαρμακολογίας, Βιοχημείας και Τοξικολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ. με αριθμό καταχώρησης EL54BIO10 Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ., Τ.Κ. 54124, Πανεπιστημιούπολη Θεσσαλονίκη
- ✓ 4. Θεόδωρος Λιλλής
Ικαρίας 2, Θεσσαλονίκη



**Baishideng
Publishing
Group**

7041 Koll Center Parkway, Suite
160, Pleasanton, CA 94566, USA

Telephone: +1-925-223-8242

Fax: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

https://www.wjgnet.com

Name of Journal: World Journal of Orthopedics

Manuscript NO: 49724

Manuscript Type: BASIC STUDY

Title: Effect of clopidogrel in bone healing. Experimental study in rabbits.

Authors: Theodoros Lillis, Alexander Veis, Nikolaos Sakellaris, Anastasios Tsirlis, Zoe

Dailiana

ABSTRACT

BACKGROUND

Clopidogrel is a widely prescribed drug for prevention of myocardial infarction and stroke in patients at risk. It inhibits thrombus formation via inhibition of the P2Y₁₂ purinergic receptor on platelets, which is important in their activation by ADP. However, the P2Y₁₂ receptor has also been found to be expressed in both osteoblasts and osteoclasts. Accumulated evidence suggests that purinergic receptors regulate important functions of bone turnover. Previous studies on the effect of clopidogrel on bone metabolism indicated potential harmful effects, but their results remain contrasting. Thus, clopidogrel treatment may also affect bone healing, but it has not been studied yet.

AIMS

To evaluate if continuous perioperative clopidogrel treatment has any negative effect on bone healing in the rabbit calvarial defect model.

METHODS

Sixteen male white New Zealand rabbits were randomly assigned in two groups: one group received daily 3 mg/kg of clopidogrel per os and the other group received the vehicle alone for a week prior to the surgical procedures; the treatments were continued for another six weeks postoperatively. The surgical procedures included generation of two circular calvarial defects 11 mm in diameter in every animal. After the six-week period of healing, postmortem radiographic and histomorphometric evaluation of the defects was performed.

RESULTS

Both the surgical procedures and the postoperative period were uneventful and well tolerated by all the animals, without any surgical wound dehiscence, signs of infection or other complication. New bone was formed either inwards from the defect margins or in the central portion of the defect as separated bony islets. While defect healing was still incomplete in both groups, the clopidogrel group had significantly improved radiographic healing scores. Moreover, the histomorphometric analysis showed that bone regeneration (%) was 28.07 ± 7.7 for the clopidogrel group and 19.47 ± 4.9 for the control group, showing statistically significant difference between them ($p=0.018$). Statistically significant difference was also found in the defect bridging (%), i.e. 72.17 ± 21.2 for the clopidogrel group and 41.17 ± 8.5 for the control group, respectively ($p=0.004$), whereas bone tissue density had no statistical difference between the groups.

CONCLUSION

Our results indicate that maintenance of perioperative clopidogrel treatment does not negatively affect bone healing, but rather promotes it. Further research is needed in order to find useful applications of this finding.

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Official Publication of the European Association for Osseointegration



28th Annual Scientific Meeting of the European
Association for Osseointegration
26–28 September 2019

EDITOR-IN-CHIEF

Lisa J. A. Heitz-Mayfield, Australia

ASSOCIATE EDITORS

T. Berglundh, Sweden

G. E. Salvi, Switzerland

R. Gruber, Austria

S. S. Jensen, Denmark

N. Zitzmann, Switzerland

WILEY

**15989 ORAL COMMUNICATION
BASIC RESEARCH****The antiplatelet drug clopidogrel promotes osseointegration. Histomorphometric study in rabbits**Theodoros Lillis¹; Nikolaos Dabarakis¹; Nikolaos Sakellariadis²; Zoe Dailiana³

¹Department of Dentoalveolar Surgery, Implantology & Radiology, Faculty of Dentistry, Aristotle University of Thessaloniki, Greece; ²Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larisa, Greece; ³Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larisa, Greece

Background: Clopidogrel is a widely prescribed antithrombotic drug which inhibits platelets aggregation through blocking of P2Y₁₂ purinergic receptor. Purinergic receptors, including P2Y₁₂, are also expressed in bone cells and accumulated evidence suggests that they regulate important functions in bone. Several studies have demonstrated that clopidogrel treatment may negatively affect bone metabolism, but their results are controversial, while its effect in osseointegration has not been studied yet.

Aim/Hypothesis: The present study conducted in order to investigate if systemic clopidogrel treatment has any negative effect on osseointegration of titanium implants, representing the clinical scenario of osseointegration of dental implants in patients in chronic use of this drug for cardiovascular indications.

Material and Methods: Thirty-two white New Zealand rabbits were randomly assigned in two groups- a clopidogrel group and a control group. Rabbits of the clopidogrel group received 3 mg/kg day of clopidogrel orally, which has been previously demonstrated to cause similar level of platelet aggregation inhibition with that of usual daily dose in human; and rabbits of the control group received only vehicle. The administration of clopidogrel or vehicle respectively, started one week prior to the surgical procedures of implant placement and continued for six weeks postoperatively. A cylindrical crew titanium dental implant was placed into the left medial femur condyle of every rabbit. After the six weeks of healing, postmortem histomorphometric evaluation of the titanium implants was performed. Bone-implant contact ratios (BIC) were calculated and means between groups were compared by t-test, since data were distributed normally as indicated by Sapiro-Wilk test.

Results: Surgical procedures and postoperative period were uneventful and well tolerated by all animals without any surgical wound dehiscence, signs of infection or other complication. No implant failure was observed in any of the groups. Histomorphometric analysis showed that BIC (%) was 52.8% for the clopidogrel group and 34.6% for the control group with statistically significant difference between them ($P < 0.001$). Interestingly, in clopidogrel group new bone formation was also found to be more extensive around the trabeculae proximal to the surface of the titanium implant, compared to control group.

Conclusion and clinical implications: Our present results indicate that clopidogrel treatment does not impair osseointegration of titanium implants. On the contrary, it seems that systemic clopidogrel administration promoted peri-implant contact osteogenesis. Further research is needed, in order to find useful applications, such as topical delivery systems of clopidogrel or other P2Y₁₂ inhibitors, in order to improve osseointegration outcomes.

