

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΟΛΟΓΙΑ

“ Επίπεδα βιολογικών παραγόντων ενδεικτικών της μεταβολικής δραστηριότητας του οστού μετά από εφαρμογή πορωδών κόκκων τιτανίου σε πειραματόζωα ”

ΜΑΡΑΓΚΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής
Διπλωματικής Εργασίας:**

Πεπελάση Ευδοξία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Περιοδοντολογίας

**Τριμελής Επιτροπή για την αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής
Διπλωματικής Εργασίας:**

1. Πεπελάση Ευδοξία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Περιοδοντολογίας
2. Καρούσης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιοδοντολογίας
3. Μπομπέτσης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Περιοδοντολογίας

Αντί Προλόγου

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με τη συμμετοχή τους βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και σε όσους συνέβαλαν στην επιτυχή διεκπεραίωση του κύκλου των σπουδών μου.

Στην επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Ευδοξία Πεπλάση για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και την ένθερμη υποστήριξή της σε όλα τα στάδια της μελέτης, χωρίς τα οποία η εκπόνησή της θα ήταν αδύνατη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω επίσης θερμά για τη συνολική της παρουσία δίπλα μου σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, από την διαδικασία της επιλογής μου για τη συμμετοχή στο πρόγραμμα έως την αποφοίτησή μου.

Στον Διευθυντή του Εργαστηρίου της Περιοδοντολογίας Καθηγητή κύριο Ιωάννη Βρότσο για την υποστηρικτική του και την κρίσιμη συμβολή του στο να επιδιώξω και να επιτύχω τους στόχους και τα όνειρά μου.

Στον Υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Περιοδοντολογίας Καθηγητή κύριο Φοίβο Μαδιανό και στον Υπεύθυνο της Μεταπτυχιακής Κλινικής Περιοδοντολογίας Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Ιωάννη Καρούση για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετάσχω στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, την απλόχερη προσφορά γνώσης, τη συνεχή καθοδήγηση, την ενθάρρυνση και τη διαρκή προσπάθειά τους για βελτίωση και αναβάθμιση του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή Περιοδοντολογίας Κύριο Βασίλιο Πανή και στον Επίκουρο Καθηγητή Περιοδοντολογίας κύριο Ιωάννη Φουρμούζη για την

συμβολή τους στη διαδικασία της επιλογής μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών αλλά και τη συνεχή υποστήριξη και συμπαράστασή τους στη διάρκεια του συνόλου των σπουδών μου.

Σε όλο το επιστημονικό και ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου Περιοδοντολογίας και στους επιστημονικούς συνεργάτες της Μεταπτυχιακής Κλινικής Περιοδοντολογίας και της Κλινικής των Εμφυτευμάτων για τη συμβολή τους στην κλινική και επιστημονική μου κατάρτιση.

Στην διευθύντρια του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής & Χειρουργικής Έρευνας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών κυρία Δέσποινα Περρέα για την άψογη συνεργασία της και την συνεχή εποπτεία του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Στον κύριο Παναγιώτη Κωνσταντόπουλο για την πολύτιμη συμβολή του στην διεξαγωγή των εργαστηριακών αναλύσεων, την προσφορά του χρόνου του, την καθοδήγηση και την γνώση που μου προσέφερε.

Στο υπόλοιπο προσωπικό του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής & Χειρουργικής Έρευνας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και ιδιαίτερα στους κυρίους Νικόλαο και Παναγιώτη Τσακινόπουλο για την άψογη συνεργασία τους.

Στον κύριο Νικόλαο Πανταζή για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, στους συμφοιτητές μου Γιώτα, Μάρα και Τάσο για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε τα τελευταία τρία χρόνια. Αναμφίβολα, η παρουσία τους έκανε το ταξίδι αυτό καλύτερο και πιο δημιουργικό.

Πίνακας περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
Πορώδεις κόκκοι τιτανίου	24
Τιτάνιο	24
Χαρακτηριστικά των πορωδών κόκκων τιτανίου	27
Εφαρμογή στην Ορθοπαιδική.....	28
Εφαρμογή στην Οδοντιατρική	32
Το οστόν κατά τη διάπλαση και την ανάπτυξη	56
Επούλωση οστικών καταγμάτων	63
Δείκτες οστικού μεταβολισμού	67
Δείκτες οστικής εναπόθεσης.....	68
Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase – ALP)	68
Οστεοκαλσίνη (Osteocalcin – OSC/OS/OC)	70
Προπεπτίδιο Αμινοτελικού/Καρβοξυτελικού Άκρου Προκολλαγόνου Τύπου I (Procollagen Type I N/C Terminal Propeptide – PINP/PICP) ...	72
Δείκτες οστικής απορρόφησης	73
Υδροξυπρολίνη (Hydroxyproline – HYP).....	73
Υδροξυλυσίνη (Hydroxylysine – Hyl)	74
Διασταυρούμενες Διασυνδέσεις Πυριδινίου: Πυριδινολίνη & Δεοξυπυριδινολίνη (3-Hydroxy Pyridinium Crosslinks of Collagen: Pyridinoline & Deoxypyridinoline – PYD & DPD)	75

Αμινοτελικά/Καρβοξυτελικά Διασταυρούμενα Τελοπεπτιδία Κολλαγόνου Τύπου I (Aminoterminal/Carboxyterminal Cross-linked Telopeptides of Collagen Type I - NTX-I & CTX-I)	76
Οστική Σιαλοπρωτεΐνη & Οστεοποντίνη (Bone Sialoprotein & Osteopontin - BSP & OPN)	77
Ανθεκτική στο Άλας του Τρυγικού Οξέος Όξινη Φωσφατάση (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase -TRAP)	79
Καθεψίνη K (Kathepsin K).....	80
Μεταβολή δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων.....	82
Δείκτες οστικού μεταβολισμού ως ένδειξη της έκβασης της επούλωσης οστικών καταγμάτων.....	100
Διακύμανση των δεικτών οστικού μεταβολισμού.....	112
Σκοπός της μελέτης	114
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	117
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	118
Υλικό της μελέτης	118
Μέθοδοι προσδιορισμού δεικτών οστικού μεταβολισμού	122
Μέθοδος προσδιορισμού ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP).....	122
A) Αρχή της μεθόδου.....	122
B) Αντιδραστήρια	123
Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	124

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία	124
Ε) Πειραματική διαδικασία.....	125
ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου	126
Μέθοδος προσδιορισμού του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC).....	126
Α) Αρχή της μεθόδου.....	126
Β) Αντιδραστήρια	127
Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	128
Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία	129
Ε) Πειραματική διαδικασία.....	129
ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου	130
Μέθοδος προσδιορισμού προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP).....	130
Α) Αρχή της μεθόδου.....	131
Β) Αντιδραστήρια	132
Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	132
Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία	133
Ε) Πειραματική διαδικασία.....	133
ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου	134
Μέθοδος προσδιορισμού ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b)	135
Α) Αρχή της μεθόδου.....	135
Β) Αντιδραστήρια	136
Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	137
Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία	137

Ε) Πειραματική διαδικασία.....	137
ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου	138
Μέθοδος προσδιορισμού καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (CTX-I).....	139
A) Αρχή της μεθόδου.....	139
B) Αντιδραστήρια	140
Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	141
Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία	141
Ε) Πειραματική διαδικασία.....	141
ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου	142
Στατιστική ανάλυση.....	143
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	162
Περιγραφή των δεδομένων	163
Αποτελέσματα ανάλυσης με μοντέλα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.....	164
BALP.....	164
CTX-I	166
N-MID-OC.....	169
PINP	172
TRAP5b	176
Συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών.....	180
Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων	182
Σύγκριση προεγχειρητικά μεταξύ των τριών ομάδων.....	182
Σύγκριση των διαχρονικών μεταβολών μεταξύ των τριών ομάδων	182

Διαχρονικές μεταβολές ανά δείκτη	183
BALP.....	183
CTX-I	183
N-MID-OC.....	184
PINP	184
TRAP5b	185
Για την ομάδα CM.....	186
Σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων	186
Σύγκριση μεταξύ PTGM και CM.....	187
Σύγκριση μεταξύ AGM και CM	188
Διαχρονική πορεία ανά δείκτη ανά ομάδα.....	188
BALP.....	189
CTX-I	189
N-MID-OC.....	190
PINP	191
TRAP5b	191
Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών.....	192
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	228
Διαχρονική εξέλιξη επιπέδων δεικτών οστικού μεταβολισμού ...	228
BALP.....	228
CTX-I	232
N-MID-OC.....	234
PINP	237
TRAP5b	239
Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών.....	240

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων των δεικτών ανά ομάδα.....	241
Ομάδα CM.....	241
Ομάδα AGM	243
Ομάδα PTGM.....	244
Ιδιαίτερα στοιχεία των πειραματικών ομάδων	244
Ομάδα PTGM.....	244
Ομάδα AGM	245
Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων	246
Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων PTGM, CM και AGM.....	246
Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων PTGM και CM	246
Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων AGM και CM	247
Διαφορές μεταξύ των ομάδων PTGM, CM, AGM	247
Σύγκριση με προγενέστερες μελέτες	248
Περιορισμοί της μελέτης.....	253
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	255
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	257
ABSTRACT	262
BIBLIOΓΡΑΦΙΑ.....	266

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1.1 Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην ορθοπεδική.....	31
Πίνακας 1.2. Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική	51
Πίνακας 1.3. Μελέτες μεταβολών στα επίπεδα δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων	96
Πίνακας 1.4. Μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων	98
Πίνακας 1.5. Μελέτες σχετικές με τη διακύμανση δεικτών οστικού μεταβολισμού ως ένδειξη της έκβασης της επούλωσης.....	110
Πίνακας 2.1. Κατανομή BALP ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	193
Πίνακας 2.2. Κατανομή CTX-I ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	193
Πίνακας 2.3. Κατανομή N-MID-OC ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	193
Πίνακας 2.4. Κατανομή PINP ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	193

Πίνακας 2.5. Κατανομή TRAP5b ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	193
Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του BALP ανά ομάδα	199
Πίνακας 3.2. Εκτιμώμενες μεταβολές του BALP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	200
Πίνακας 3.3. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του BALP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	200
Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του CTX-I ανά ομάδα	201
Πίνακας 3.5. Εκτιμώμενες μεταβολές του CTX-I μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	202
Πίνακας 3.6. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του CTX-I μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	202
Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του N-MID-OC ανά ομάδα	203
Πίνακας 3.8. Εκτιμώμενες μεταβολές του N-MID-OC μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	204

Πίνακας 3.9. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του N-MID-OC μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	204
Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του PINP ανά ομάδα	205
Πίνακας 3.11. Εκτιμώμενες μεταβολές του PINP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	206
Πίνακας 3.12. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του PINP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	206
Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του TRAP5b ανά ομάδα	207
Πίνακας 3.14. Εκτιμώμενες μεταβολές του TRAP5b μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	208
Πίνακας 3.15. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του TRAP5b μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα.....	208
Πίνακας 4.1. Στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).....	226
Πίνακας 4.2. Στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών στην κάθε ομάδα ανά χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα) ..	227

Πίνακας γραφημάτων

Γράφημα 2.1. Θηκογράμματα για την κατανομή του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	194
Γράφημα 2.2. Μέση τιμή (\pm SD) του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	194
Γράφημα 2.3. Θηκογράμματα για την κατανομή του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	195
Γράφημα 2.4. Μέση τιμή (\pm SD) του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	195
Γράφημα 2.5. Θηκογράμματα για την κατανομή του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης.....	196
Γράφημα 2.6. Μέση τιμή (\pm SD) του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	196
Γράφημα 2.7. Θηκογράμματα για την κατανομή του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	197
Γράφημα 2.8. Μέση τιμή (\pm SD) του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	197
Γράφημα 2.9. Θηκογράμματα για την κατανομή του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	198

Γράφημα 2.10. Μέση τιμή (\pm SD) του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	198
Γράφημα 3.1. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	199
Γράφημα 3.2. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του BALP ανά ομάδα	200
Γράφημα 3.3. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	201
Γράφημα 3.4. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του CTX-I ανά ομάδα.....	202
Γράφημα 3.5. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης.....	203
Γράφημα 3.6. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του N-MID-OC ανά ομάδα	204
Γράφημα 3.7. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	205
Γράφημα 3.8. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του PINP ανά ομάδα.....	206
Γράφημα 3.9. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης	207
Γράφημα 3.10. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του TRAP5b ανά ομάδα	208

Γράφημα 3.11. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα PTGM	209
Γράφημα 3.12. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα AGM	209
Γράφημα 3.13. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα CM	210
Γράφημα 4.1. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 0	211
Γράφημα 4.2. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 1η	212
Γράφημα 4.3. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 2η	213
Γράφημα 4.4. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 4η	214
Γράφημα 4.5. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 6η	215
Γράφημα 4.6. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 0	216
Γράφημα 4.7. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 1η	217
Γράφημα 4.8. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 2η	218

Γράφημα 4.9. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 4η	219
Γράφημα 4.10. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 6η	220
Γράφημα 4.11. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 0	221
Γράφημα 4.12. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 1η	222
Γράφημα 4.13. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 2η	223
Γράφημα 4.14. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 4η	224
Γράφημα 4.15. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 6η	225

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1. Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b)	148
Εικόνα 2. Διάλυμα αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση (enzyme conjugate).....	148
Εικόνα 3. Πρότυπα διαλύματα του αντιγόνου γνωστών συγκεντρώσεων (0ng/mL, 2.5ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 25ng/mL, 50ng/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς	149
Εικόνα 4. Διαλύματα χρωμογόνου (substrates).....	149
Εικόνα 5. Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας	150
Εικόνα 6. Διάλυμα έκπλυσης (wash solution).....	150
Εικόνα 7. Διάλυμα PBS	151
Εικόνα 8. Μικροπιπέτες ακριβείας	151
Εικόνα 9. Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450nm	152
Εικόνα 10. Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100mL	152
Εικόνα 11. Υδατόλουτρο (37° C)	153
Εικόνα 12. Απόψυξη δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου	153

Εικόνα 13. Προσθήκη 100 μL PBS στα δύο πρώτα φρεάτια (φρεάτια ελέγχου)	154
Εικόνα 14. Προσθήκη 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης ανά ζεύγος επόμενων φρεατίων και τοποθέτηση 100 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν.	154
Εικόνα 15. Προσθήκη 50 μL ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου	155
Εικόνα 16. Οι πλάκες σκεπασμένες και τοποθετημένες στο υδατόλουτρο στους 37° C.	156
Εικόνα 17. Έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης και στέγνωμα	157
Εικόνα 18. Προθήκη 50 μL από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα	158
Εικόνα 19. Η πλάκα μετά τη δεύτερη επώαση για 15 λεπτά	159
Εικόνα 20. Προσθήκη 50 μL διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας.....	160
Εικόνα 21. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450nm	161

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταβολές των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας πιθανόν να είναι μεγάλες μετά από εξαγωγές δοντιών (Schropp et al.). Η σημαντικά ελαττωμένη φατνιακή ακρολοφία πιθανόν να περιορίζει την δυνατότητα τοποθέτησης εμφυτευμάτων στις επιθυμητές θέσεις και διαστάσεις (Βλαχοδημήτρη & Πεπελάση 2009). Η διατήρηση της φατνιακής ακρολοφίας αποτρέπει τις μεγάλες μεταβολές των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγή δοντιού (Araújo & Lindhe 2009). Η αύξηση της φατνιακής ακρολοφίας αποσκοπεί στην αύξηση των διαστάσεων της ελαττωμένης νωδής φατνιακής ακρολοφίας στα πλαίσια προετοιμασίας της περιοχής πριν την τοποθέτηση εμφυτευμάτων (Caldwell et al. 2015). Μία από τις τεχνικές που εφαρμόζονται για αυτό το σκοπό είναι η καθοδηγούμενη οστική ανάπλαση με συνδυασμό μεμβράνης και οστικού μοσχεύματος (Buser et al. 1996, Iasella et al. 2003).

Η πλέον συνήθης ταξινόμηση των οστικών μοσχευμάτων στηρίζεται στην προέλευσής τους. Σύμφωνα με αυτό το κριτήριο, τα οστικά μοσχεύματα διακρίνονται σε αυτογενή μοσχεύματα ή αυτομοσχεύματα, αλλογενή μοσχεύματα ή αλλομοσχεύματα, ομοιομοσχεύματα, ετερογενή μοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα και αλλοπλαστικά μοσχεύματα (Πεπελάση & Βρότσος 1991, Πεπελάση 2002, 2016). Με βάση την οστεογενετική δυνατότητα τους τα οστικά μοσχεύματα ταξινομούνται σε οστεογενετικά (ή οστεογενή), οστεοεπαγωγικά, οστεοσυνεργετικά (ή οστεοσυνεργή) και οστεοαδρανή (Πεπελάση 2002, 2016).

Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά χρήσης οστικού μοσχεύματος στην οδοντιατρική χρονολογείται στο 1923 και αφορά σε χρήση αυτογενούς μοσχεύματος (Hegdeus 1923). Μεταξύ όλων των τύπων οστικών μοσχευμάτων υπερέχουν τα

αυτογενή οστικά μοσχεύματα γιατί είναι τα μόνα που διαθέτουν σε κάποιο βαθμό οστεογενετικές και υψηλές οστεοεπαγωγικές δυνατότητες (Nasz et al. 1999). Επί δεκαετίες λοιπόν τα αυτογενή οστικά μοσχεύματα αποτελούσαν την ιδανική επιλογή μεταξύ όλων των τύπων οστικών μοσχευμάτων, λόγω των υψηλότερων δυνατοτήτων τους (Πεπελάση & Ξυνογαλά 2009). Επιπρόσθετα, με τη χρήση των αυτογενών μοσχευμάτων αποφεύγεται πλήρως ο κίνδυνος πρόκλησης αντιγονικής απάντησης και μετάδοσης νόσων.

Τα αυτογενή οστικά μοσχεύματα προέρχονται είτε από εξωστοματικές περιοχές, όπως η λαγώνια ακρολοφία και τα οστά του κρανίου (Chiapasco et al. 2007), ή από ενδοστοματικές περιοχές, όπως το γένειο, το γναθιαίο κύρτωμα, ο κλάδος της κάτω γνάθου και οι παρακείμενες νωδές περιοχές (Cordaro et al. 2002). Οι εξωστοματικές δότες περιοχές για λήψη αυτογενούς μοσχεύματος εξασφαλίζουν ποσότητα μοσχεύματος ικανή για την πλήρωση εκτεταμένων οστικών βλαβών. Η ανάγκη για χειρουργική παρέμβαση στη δότες περιοχή για τη λήψη του αυτογενούς μοσχεύματος εξωστοματικής προέλευσης, με συνεπακόλουθη μεγαλύτερη μετεγχειρητική ταλαιπωρία του ασθενούς και πιθανότητα επιπλοκών στη δότες περιοχή (Almaiman et al. 2013), οδήγησε σταδιακά στην εξαιρετικά περιορισμένη χρήση αυτής της τεχνικής.

Η λήψη αυτομοσχεύματος από ενδοστοματικές περιοχές συνδέεται σε χαμηλά ποσοστά με εμφάνιση επιπλοκών (Cordaro et al. 2011). Εφόσον απαιτείται χειρουργική παρέμβαση σε δεύτερη ενδοστοματική περιοχή για τη λήψη του μοσχεύματος ο διεγχειρητικός χρόνος και η μετεγχειρητική ταλαιπωρία του ασθενούς αυξάνονται, στοιχεία που θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη. Επίσης, η περιορισμένη ποσότητα διαθέσιμου αυτομοσχεύματος (Yates et al. 2012) σε συνδυασμό με την ταχεία απορρόφηση αυτού, που οδηγεί συχνά σε σημαντική μείωση της έκτασης της

αναπλασθείσας περιοχής (Nkenke et al. 2002, Araujo et al. 2002), έχουν στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον προς την εύρεση εναλλακτικών μοσχευματικών υλικών.

Αποτέλεσμα των περιορισμών των αυτογενών μοσχευμάτων είναι τελευταία να χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη μοσχεύματα αλλογενούς και ετερογενούς προέλευσης. Η επεξεργασία που υφίστανται τα μοσχευματικά αυτά υλικά με σκοπό τον περιορισμό του κινδύνου μετάδοσης νόσων (Mellonig et al. 1992) ή πρόκλησης ανοσολογικής απάντησης (Quattlebaum et al. 1988) οδηγούν σε σημαντικό βαθμό απώλεια των βιολογικών ιδιοτήτων τους. Ως εκ τούτου αυτά τα οστικά μοσχεύματα χαρακτηρίζονται ως επί το πλείστον ως οστεοσυνεργή. Η καλή κλινική τους συμπεριφορά στηρίζεται στη σταθεροποίηση του θρόμβου και στη δημιουργία σταθερού ικρίωματος κατά τη διάρκεια της επούλωσης, ενώ ο ρυθμός απορρόφησης τους καθώς και ο ρυθμός και βαθμός αντικατάστασής τους από οστίτη ιστό φαίνεται να ποικίλει (Kline & Rimer 1983, Yang et al. 2014). Η άντληση αποθεμάτων από τράπεζες ιστών για την παρασκευή τους καθώς και η δυσκολία αποδοχής της χρήσης τους από ορισμένες ομάδες ασθενών λόγω θρησκευτικών ή άλλων πεποιθήσεων αποτελούν περιορισμούς που σχετίζονται με την κλινική εφαρμογή των αλλογενών και ετερογενών οστικών μοσχευμάτων.

Οι παραπάνω προβληματισμοί έστρεψαν το ενδιαφέρον προς τη χρήση αλλοπλαστικών μοσχευματικών υλικών. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται πληθώρα μοσχευματικών υλικών, τα οποία είτε παρασκευάζονται από φυσικά συστατικά, από συστατικά του οστού, υποκατάστατα του οστού ή είναι συνθετικά υλικά (Πεπελάση & Βρότσος 1993). Τα αλλοπλαστικά μοσχεύματα είναι είτε οστεοαδρανή ή οστεοσυνεργή (Πεπελάση & Βρότσος 1993). Τα υλικά αυτά όσον αφορά στο χρόνο απορρόφησης τους κυμαίνονται από απορροφήσιμα έως εξαιρετικά βραδέως ή και μη απορροφήσιμα (Πεπελάση & Βρότσος 1993, Artzi et al. 2004). Στην τελευταία αυτή

κατηγορία των μη απορροφήσιμων αλλοπλαστικών μοσχευματικών υλικών εντάσσονται και οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου (Vandeweghe et al. 2013), οι οποίοι μελετώνται σε διάφορες εφαρμογές της ορθοπεδικής και της οδοντιατρικής τελευταία (Alffram et al. 2007, Thomas et al. 2007, Holmberg et al. 2008, Bystedt & Rasmusson 2009, Wohlfahrt et al. 2010, Wohlfahrt et al. 2011, Bashara et al. 2012, Tavakoli et al. 2012, Wohlfahrt et al. 2012A, Wohlfahrt et al. 2012B, Wohlfahrt et al. 2012C, Lambert et al. 2013, Mijiritsky et al. 2013, Thor 2013, Vandeweghe et al. 2013, Verket et al. 2013, Delgado-Ruiz et al. 2014, Dursun et al. 2015, Jónsson & Mjöberg 2015, Lee et al. 2015, Lyngstadaas et al. 2015, Jepsen et al. 2016).

Πορώδεις κόκκοι τιτανίου

Τιτάνιο

Το τιτάνιο συνιστά υλικό με ποικίλες εφαρμογές στις βιοϊατρικές επιστήμες λόγω των πολύ καλών μηχανικών, βιολογικών και χημικών ιδιοτήτων του. Παρ' ότι αποτελεί ένα από τα πλέον διαβρώσιμα υλικά, μόλις έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα δημιουργείται στην επιφάνειά του μία στρώση οξειδίων, το πάχος της οποίας ποικίλει ανάλογα με την επεξεργασία της επιφάνειάς του (Olefjord & Hansson 1993). Η ζώνη αυτή είναι συμπαγής και προσφύεται στέρεα στην υποκείμενη επιφάνεια του μετάλλου. Η παθητικοποίηση αυτή της επιφάνειας καθιστά το τιτάνιο ένα από τα πλέον βιοσυμβατά υλικά, λόγω της μεγάλης αντοχής στη διάβρωση που προσφέρει (Ducheyne et al. 1984).

Το τιτάνιο διαθέτει υψηλό θρομβογενετικό δυναμικό. Πιο συγκεκριμένα, αμέσως μετά την επαφή του με το αίμα και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος απορροφώνται στην επιφάνειά του κυκλοφορούσες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα. Παράλληλα, τα κυκλοφορούντα αιμοσφαίρια ενεργοποιούν τον παράγοντα πήξης XII, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μία μέτριας έντασης ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού πήξης και σε παραγωγή θρομβίνης. Η κυκλοφορούσα αυτή θρομβίνη ενεργοποιεί με τη σειρά της τα αιμοπετάλια, τα οποία ενισχύουν τον καταρράκτη και οδηγούν σε απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων θρομβίνης στην περιοχή. Η θρομβίνη διαμεσολαβεί στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες με τελική κατάληξη τη σταθεροποίηση του θρόμβου σε στενή σχέση με την επιφάνεια του τιτανίου. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια οδηγούν στην απελευθέρωση υψηλών συγκεντρώσεων χημειοτακτικών και αυξητικών παραγόντων στην περιοχή, οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται μεταξύ άλλων και με την αγγειογένεση και την οστεογένεση. Επισημαίνεται επίσης ότι το θρομβογενετικό δυναμικό του τιτανίου φαίνεται πως αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της αδρότητας της επιφάνειάς του (Hong et al. 1999, Thor et al. 2007).

Το θρομβογενετικό αυτό δυναμικό του τιτανίου προάγει τις διεργασίες της επούλωσης, άμεσα με την δημιουργία αιματικού θρόμβου στην περιοχή, καθώς και έμμεσα οδηγώντας στην απελευθέρωση υψηλών συγκεντρώσεων αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Ο αρχικός αιματικός θρόμβος που σχηματίζεται μετατρέπεται σύντομα σε πήγμα ινικής και στη συνέχεια σε προσωρινή μήτρα συνδετικού ιστού. Είναι υψίστης σημασίας ο συνδετικός ιστός να διατηρήσει τη στενή του σχέση με την επιφάνεια του τιτανίου, όταν ο τελικός στόχος είναι η εναπόθεση νέου οστού σε άμεση επαφή με το τιτάνιο. Ωστόσο, ήδη από την 5^η περίπου ημέρα της επούλωσης έχει δειχθεί ότι ξεκινά η ρίκνωση των

νεοδημιουργηθέντων ιστών. Η ρίκνωση αυτή διαμεσολαβείται από τη συστολή των ινοβλαστών που αποικίζουν την περιοχή, παράγοντας δυνάμεις μεγέθους περίπου 3 nN (Galbraith & Sheetz 1997). Ως εκ τούτου, η δυνατότητα του τιτανίου να διατηρήσει την επαφή με την προσωρινή μήτρα συνδετικού ιστού κατά την αρχική φάση της επούλωσης καθορίζει και το αν οι οστεοβλάστες που θα μεταναστεύσουν στην περιοχή θα φτάσουν στην επιφάνεια του τιτανίου, εναποθέτοντας νέο οστόν σε άμεση επαφή με αυτό (Galbraith & Sheetz 1997). Η δυνατότητα αυτή, η οποία αντικατοπτρίζει και την οστεοσυνέργεια του τιτανίου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την μορφολογία της επιφάνειας του υλικού. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η επιφανειακή αδρότητα της κλίμακας μικρόμετρων αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση οστεοβλαστών στην επιφάνεια του τιτανίου, οδηγώντας σε μεγαλύτερη επαφή οστού-τιτανίου και σε μεγαλύτερη αντοχή της σύνδεσης σε δυνάμεις απόσπασης (Buser et al. 1991). Παράλληλα, η επιφανειακή επεξεργασία του τιτανίου φαίνεται να μειώνει την ελαστικότητα του μετάλλου σε επίπεδα που προσομοιάζουν περισσότερο την ελαστικότητα του οστίτη οστού. Αυτή η μεταβολή οδηγεί σε καλύτερη κατανομή των δυνάμεων στη διεπιφάνεια οστού-τιτανίου κατά τη λειτουργική φόρτιση (Bahrami et al. 2014), καθιστώντας την οστεοενσωμάτωση πιο ανθεκτική σε δυνάμεις απόσπασης (Spoerke et al. 2005). Λαμβάνοντας, ωστόσο, υπ' όψιν ότι τα συστατικά τόσο της ανόργανης όσο και της οργανικής φάσης του οστίτη ιστού κυμαίνονται στην κλίμακα των νανομικρών, αποτελέσματα από *in vivo* μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε νανοτεχνολογία για την επεξεργασία της επιφάνειας του τιτανίου έδειξαν σαφή υπεροχή της επιτευχθείσας οστεοενσωμάτωσης σε σύγκριση με επιφάνειες τιτανίου επεξεργασμένες σε μεγαλύτερες κλίμακες (Bjursten et al. 2010).

Χαρακτηριστικά των πορωδών κόκκων τιτανίου

Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου (porous titanium granules-PTG) αποτελούν μοσχευματικό υλικό που ανήκει στα αλλοπλαστικά μοσχεύματα. Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου διατίθενται με την εμπορική ονομασία TigranTM-PTG. Οι κόκκοι αυτοί τιτανίου διατίθενται στο εμπόριο σε γκρι χρώμα για εφαρμογή σε οπίσθιες περιοχές (TigranTM-PTG) και σε λευκό χρώμα (TigranTM-PTG White) για εφαρμογή σε περιοχές υψηλών αισθητικών απαιτήσεων, όπως στις πρόσθιες περιοχές. Οι δύο τύποι κόκκων διαθέτουν ίδια χαρακτηριστικά (<http://www.tigran.se/produkter/ptg/tigran-ptg-ptg-white/>).

Το υλικό αυτό κατασκευάζεται από εμπορικά διαθέσιμο καθαρό τιτάνιο (cpTi) και αποτελείται από κόκκους τιτανίου διαμέτρου 0,7-1 mm. Διαθέτει ακανόνιστο σχήμα κόκκων καθώς και μεγάλο ποσοστό πόρων στη μάζα του που φτάνει το 80%. Οι πόροι επικοινωνούν μεταξύ τους. Η διαπερατότητα των πόρων του για μόρια μικρότερα των 75 μm έχει δειχθεί ότι ξεπερνά το 90%, ενώ για μόρια μεγέθους μεγαλύτερα των 200 μm υπολογίζεται στο 50%. Είναι μη απορροφήσιμο υλικό με δυνατότητα ελαστικής παραμόρφωσης και καλή διατήρηση των διαστάσεών του κάτω από την επίδραση συμπιεστικών δυνάμεων (Sabetrasekh et al. 2011, <http://www.tigran.se/wp-content/uploads/2013/02/Tigran%E2%84%A2-PTGPTG-White.pdf>). Η ιδιότητα της καλής διατήρησης των διαστάσεών του θα μπορούσε να θεωρηθεί πλεονέκτημα για τη διατήρηση των διαστάσεων της περιοχής όπου επιδιώκεται ανάπλαση, καθώς ο οστικός ανασχηματισμός είναι διεργασία που διαρκεί για ιδιαίτερα μεγάλους χρόνους (Schmitt et al. 2014). Υποστηρίζεται ότι η δομή των πορωδών κόκκων τιτανίου επιτρέπει την εναπόθεση νέου οστού γύρω, ανάμεσα και

δια μέσου των κόκκων (Sabetrsekh et al. 2011, Bashara et al. 2012, Vandeweghe et al. 2013, Verket et al. 2013).

Παρ' ό,τι έχει δειχθεί η δυνατότητα εναπόθεσης νέου οστού ακόμα και μέσα σε πόρους της τάξης των νανόμετρων, οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου φαίνεται να συμβάλλουν καλύτερα στην οστική ανάπλαση όταν πραγματοποιείται χαλαρή συμπύκνωση των κόκκων τους. Αντίθετα, η έντονη συμπύκνωση του υλικού μειώνει αισθητά το μέγεθος των πόρων τόσο μεταξύ διαφορετικών κόκκων όσο και στο εσωτερικό του κάθε κόκκου, περιορίζοντας έτσι το διαθέσιμο χώρο για εναπόθεση νέου οστού (Walschot et al. 2011).

Οι κόκκοι τιτανίου φαίνεται πως διαθέτουν πολύ καλή βιοσυμβατότητα, όπως αυτό καταδεικνύεται από *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Wohlfahrt et al. 2010, Sabetrsekh et al. 2011, Wohlfahrt et al. 2012A, Wohlfahrt et al. 2012B).

Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία για εφαρμογή σε περιπτώσεις περιεμφυτευματικών βλαβών, διατήρησης ή/και αύξησης φατνιακής ακρολοφίας και ανύψωσης ιγμορείου

(<http://www.tigran.se/wp-content/uploads/2013/02/Tigran%E2%84%A2PTGPTG-White.pdf>).

Εφαρμογή στην Ορθοπεδική

Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου βρήκαν για πρώτη φορά εφαρμογή στον τομέα της ορθοπεδικής, αρχικά σε περιπτώσεις ολικής αντικατάστασης αρθρώσεων με τεχνητές προθέσεις (Alffram et al. 2007) και αργότερα σε περιπτώσεις συμπιεστικών καταγμάτων της κνήμης (Jónsson & Mjöberg 2015). Η πρώτη κλινική τους εφαρμογή στον τομέα της ορθοπεδικής αφορά στην παρουσίαση πέντε περιστατικών όπου πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση της άρθρωσης του ισχίου με τεχνητή πρόθεση.

Όλες οι επεμβάσεις κρίθηκαν επιτυχείς με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια για διάστημα παρακολούθησης 9 έως 14 ετών. Στα 14 έτη παρατηρήθηκε άσηπτη χαλάρωση της τεχνητής πρόθεσης σε μία περίπτωση και η επέμβαση επαναλήφθηκε. Κατά την επανάληψη πραγματοποιήθηκε ιστολογική εξέταση η οποία έδειξε απουσία φλεγμονώδους διήθησης στην περιοχή. Η επαφή οστού-τεχνητής πρόθεσης κυμαινόταν μεταξύ 27 και 68% ανάλογα με την υπό εξέταση επιφάνεια, ενώ η περιοχή μεταξύ των κόκκων του μοσχεύματος είχε καταληφθεί από οστούν σε ποσοστό 97% (Allfram et al. 2007).

Ελλείπει επαρκούς ιστολογικής τεκμηρίωσης σχετικά με τη χρήση των κόκκων τιτανίου σε επεμβάσεις ολικής αντικατάστασης της άρθρωσης του ισχίου, οι Thomas και συν. προχώρησαν για αυτό το σκοπό σε πειραματική μελέτη σε 10 σκυλιά. Όλες οι επεμβάσεις κρίθηκαν επιτυχείς με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια, ενώ οι βιοψίες που λήφθηκαν 6 μήνες μετά ανέδειξαν απουσία αντίδρασης ξένου σώματος στους περιβάλλοντες ιστούς. Η περιοχή μεταξύ των κόκκων τιτανίου περιείχε κατά 62% οστούν και κατά 37% συνδετικό ιστό κατά μέσο όρο, ενώ το υπόλοιπο 1% καταλάμβανε ο μυελός των οστών (Thomas et al. 2007).

Οι Jónsson και Mjöberg παρουσίασαν 4 περιστατικά αντιμετώπισης συμπιεστικών καταγμάτων της κνήμης με τη χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου αντί αυτομοσχεύματος. Όλες οι επεμβάσεις κρίθηκαν επιτυχείς με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια στους 6 μήνες (Johnsson & Mjöberg 2009). Η καλή συμπεριφορά των κόκκων τιτανίου και η αποφυγή λήψης αυτομοσχεύματος από την λαγώνια ακρολοφία, που αποτελεί μία ευρέως αποδεκτή τεχνική αντιμετώπισης αυτών των περιστατικών, οδήγησαν τους ερευνητές να διεξάγουν ακολούθως μία τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, τα αποτελέσματα της οποίας ανακοινώθηκαν πρόσφατα. Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σύγκριση της εφαρμογής των

πορωδών κόκκων τιτανίου έναντι του αυτομοσχεύματος που είχε ληφθεί από την λαγώνια ακρολοφία για την αποκατάσταση συμπιεστικών καταγμάτων της κνήμης. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η χρήση του οστικού υποκατάστατου είχε εμφανή πλεονεκτήματα έναντι του αυτομοσχεύματος καθώς περιόρισε σημαντικά τον διεγχειρητικό χρόνο, τη μετεγχειρητική ταλαιπωρία του ασθενούς και τη μετεγχειρητική παρεκτόπιση των κατεαγόντων τμημάτων του οστού σε συμπιεστικά κατάγματα της κνήμης. Η μελέτη αυτή διακόπηκε πρόωρα καθώς στην επανεξέταση του ενός έτους 50% των ασθενών που είχαν δεχτεί αυτογενές μόσχευμα εμφάνισαν παρεκτόπιση των κατεαγόντων τμημάτων κατά 2-5 mm. Αντίθετα, κανείς από τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με κόκκους τιτανίου δεν εμφάνισε αυτή την επιπλοκή (Jónsson & Mjöberg 2015).

Τα στοιχεία των μελετών που αφορούν στην εφαρμογή των πορωδών κόκκων τιτανίου στην ορθοπεδική εμφανίζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.1**.

Πίνακας 1.1 Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην ορθοπεδική

Συγγραφείς & έτος	Είδος μελέτης	Είδος παρέμβασης	Ομάδες	Χρόνος αξιολόγησης	Τρόπος αξιολόγησης	Αποτελέσματα	Συμπεράσματα
Alffram et al. 2007	Παρουσίαση κλινικών περιστατικών (n=5 ασθενείς)	Ολική αντικατάσταση άρθρωσης ισχίου (n=5)	1. Πορώδεις κόκκοι τιτανίου	9-14 έτη	Κλινική & ακτινογραφική (n=5) Αξονική τομογραφία (n=3) Ιστολογική (n=1)	Όλες οι επεμβάσεις επιτυχείς κλινικά & ακτινογραφικά. Σε μία περίπτωση άσηπτης χαλάρωσης (14 έτη): απουσία ιστολογικά φλεγμονώδους διήθησης, επαφή οστού-τεχνητής πρόθεσης 27-68% & 97% εναπόθεση οστού μεταξύ των κόκκων.	Οι κόκκοι τιτανίου προσδίδουν καλή αρχική & μακροχρόνια μηχανική σταθερότητα & αποτελούν στέρεο ικρίωμα για τη δημιουργία νέου οστού σε επεμβάσεις αντικατάστασης άρθρωσης ισχίου με τεχνητή πρόθεση.
Thomas et al. 2007	Πειραματική σε σκυλιά (n=10 σκυλιά)	Ολική αντικατάσταση άρθρωσης ισχίου (n=10)	1. Πορώδεις κόκκοι τιτανίου	6 μήνες	Κλινική (n=10) Ακτινογραφική (n=10) Ιστολογική (n=10)	Όλες οι επεμβάσεις επιτυχείς κλινικά & ακτινογραφικά. Η ιστολογική εξέταση έδειξε ότι η περιοχή περιλάμβανε κατά 62% οστόν, 37% συνδετικό ιστό και 1% μυελό των οστών.	Οι κόκκοι τιτανίου απέδωσαν καλή αρχική σταθερότητα για τη δημιουργία νέου οστού & την εξασφάλιση της οστεοενσωμάτωσης των τεχνητών προθέσεων σε επεμβάσεις αντικατάστασης άρθρωσης ισχίου.
Johnsson & Mjöberg 2009	Παρουσίαση κλινικών περιστατικών (n=4 ασθενείς)	Αντιμετώπιση συμπιεστικών καταγμάτων κνήμης (n=4)	1. Πορώδεις κόκκοι τιτανίου	6 εβδομάδες 6 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (n=4)	Όλες οι επεμβάσεις επιτυχείς κλινικά & ακτινογραφικά.	Οι κόκκοι τιτανίου απέδωσαν ικανοποιητική αρχική σταθερότητα & καλή συμπεριφορά σε επεμβάσεις αποκατάστασης συμπιεστικών καταγμάτων κνήμης.
Jónsson & Mjöberg 2015	Προοπτική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη (n=20 ασθενείς)	Αντιμετώπιση συμπιεστικών καταγμάτων κνήμης (n=20)	1. Πορώδεις κόκκοι τιτανίου 2. Αυτομόσχευμα από λαγόνια ακρολοφία	1 & 6 εβδομάδες, 3, 6 & 12 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (n=20)	Κόκκοι τιτανίου: Στατιστικά σημαντικά μικρότερα ποσοστά παρεκτόπισης κατεαγόντων τμημάτων μετεγχειρητικά & μικρότερος διεγχειρητικός χρόνος.	Οι κόκκοι τιτανίου υπερέχουν σημαντικά έναντι του αυτομοσχεύματος από τη λαγόνια ακρολοφία για την αντιμετώπιση συμπιεστικών καταγμάτων κνήμης.

Εφαρμογή στην Οδοντιατρική

Η πρώτη εφαρμογή των κόκκων τιτανίου στον τομέα της οδοντιατρικής αποδίδεται στους Holmberg και συν. το 2008. Πρόκειται για αναφορά ενός περιστατικού όπου πραγματοποιήθηκε διάσχιση με σκοπό την καθ' εύρος αύξηση της ελαττωμένης νωδής φατνιακής ακρολοφίας της άνω γνάθου με άμεση τοποθέτηση εμφυτευμάτων. Τα εμφυτεύματα φορτίστηκαν λειτουργικά 9 μήνες μετά την τοποθέτηση, ενώ 15 έτη μετά η μέση οριζόντια οστική απώλεια γύρω από τα εμφυτεύματα υπολογίστηκε σε λιγότερο από 2 mm (Holmberg et al. 2008).

Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου έχουν μελετηθεί σε ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου (Bystedt et al. 2009, Lambert et al. 2013, Vandeweghe et al. 2013, Verket et al. 2013, Dursun et al. 2015, Lyngstadaas et al. 2015), σε διατήρηση ή/και αύξηση φατνιακής ακρολοφίας (Bashara et al. 2012, Tavakoli et al. 2012, Delgado-Ruiz et al. 2014) και σε περιεμφυτευματικές βλάβες (Wohlfahrt et al. 2010, Wohlfahrt et al. 2011, Wohlfahrt et al. 2012A, Mijiritsky et al. 2013, Thor 2013, Lee et al. 2015, Jepsen et al. 2016) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, έχουν μελετηθεί σε περιοδοντικές ενδοοστικές βλάβες, συγκεκριμένα σε βλάβες της περιοχής συμβολής των ριζών (μεσορριζικές βλάβες) (Wohlfahrt et al. 2012 B, Wohlfahrt et al. 2012 C). Τα στοιχεία των μελετών που αφορούν στη χρήση των πορωδών κόκκων τιτανίου στον τομέα της οδοντιατρικής παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.2**.

Προκειμένου για επεμβάσεις ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου, η σταθερότητα των διαστάσεων του μοσχευματικού υλικού πιθανώς να αποτελεί πλεονέκτημα για την διατήρηση του χώρου που διατίθεται για ανάπλαση του οστού. Η ανύψωση ιγμορείου και η ταυτόχρονη τοποθέτηση εμφυτευμάτων χωρίς την εφαρμογή μοσχευματικού υλικού είναι εφικτή καθ' ότι ο θρόμβος που σχηματίζεται

στην περιοχή διαθέτει το δυναμικό να προάγει την οστική ανάπλαση (Lambert et al. 2011). Εν τούτοις, η υδροστατική πίεση που ασκείται από τη μεμβράνη του ιγμορείου κατά την αναπνοή οδηγεί στη μείωση των διαστάσεων του αρχικά σχηματισμένου θρόμβου, και ως εκ τούτου περιορίζει σημαντικά τις διαστάσεις της περιοχής που διατίθεται για ανάπλαση και στη συνέχεια την έκταση της οστικής ανάπλασης που επιτυγχάνεται (Lambert et al. 2011). Οι Lambert και συν. συνέκριναν τη σταθερότητα του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής μετά από ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου σε πέντε κουνέλια. Για τη διατήρηση του χώρου που διατίθεται για ανάπλαση χρησιμοποιήθηκαν αιματικός θρόμβος, αυτομόσχευμα ή ξενομόσχευμα. Πραγματοποιήθηκε ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση καθώς και ακτινογραφική αξιολόγηση με μικροτομογραφία την πρώτη και την πέμπτη εβδομάδα καθώς και έξι μήνες μετά την ανοικτή ανύψωση. Οι περιοχές όπου είχε χρησιμοποιηθεί αιματικός θρόμβος ή αυτομόσχευμα έδειξαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νέο οστόν σε σύγκριση με τις περιοχές όπου είχε χρησιμοποιηθεί ξενομόσχευμα την πέμπτη εβδομάδα. Ωστόσο, στους 6 μήνες η διαφορά αυτή έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική. Επιπροσθέτως, στις πέντε εβδομάδες οι ομάδες του αιματικού θρόμβου και του αυτομοσχεύματος εμφάνισαν ρίκνωση του αναπλασθέντος όγκου κατά 83% και 42% αντίστοιχα. Το ξενομόσχευμα, αντιθέτως, που απορροφάται βραδέως εμφάνισε σταθερότητα του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής κατά 90% (Lambert et al. 2011).

Διαφορετικά ποσοστά ρίκνωσης της αναπλασθείσας περιοχής έχουν περιγραφεί στις διάφορες μελέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση διαφόρων ειδών οστικών μοσχευμάτων. Οι Hatano και συν. μελέτησαν τη μεταβολή των διαστάσεων της αναπλασθείσας περιοχής μετά από ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με χρήση αναμειγμένου αυτομοσχεύματος και ξενομοσχεύματος σε

αναλογία 2:1. Το αυτομόσχευμα λήφθηκε από την περιοχή του γενείου ή του κλάδου της κάτω γνάθου. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη λήψη πανοραμικών ακτινογραφιών ανά έτος έως και 9 έτη μετά την επέμβαση. Βρέθηκε ότι η αναπλασθείσα περιοχή παρουσίασε σταδιακή μείωση του όγκου της, φτάνοντας στα χαμηλότερα επίπεδα τρία χρόνια μετά την ανύψωση, οπότε και οι διαστάσεις της σταθεροποιήθηκαν. Ήδη μεταξύ δεύτερου και τρίτου έτους ωστόσο, στο 73% των ασθενών τα εμφυτεύματα ακτινογραφικά απεικονίζονταν να προεξέχουν εντός του ιγμορείου (Hatano et al. 2004). Οι Sbordone και συν. συνέκριναν τη σταθερότητα των διαστάσεων της αναπλασθείσας περιοχής μετά από ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με τη χρήση αυτογενούς μοσχεύματος σε μορφή μεγάλου τεμαχίου ή κόκκων. Το αυτομόσχευμα είχε ληφθεί είτε από το γένειο είτε από τη λαγώνια ακρολοφία. Στην ανάλυση εντάχθηκαν 17 επεμβάσεις ανύψωσης ιγμορείου σε ίσο αριθμό ασθενών και η τελική αξιολόγηση έγινε με υπολογιστική τομογραφία έξι έτη μετά από την επέμβαση. Οι περιοχές στις οποίες είχε χρησιμοποιηθεί αυτομόσχευμα σε μορφή μεγάλου τεμαχίου εμφάνισαν μικρότερη μείωση του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής σε σύγκριση με τις περιοχές όπου είχε χρησιμοποιηθεί αυτομόσχευμα σε μορφή κόκκων (21,5% έναντι 39,2%), αν και η διαφορά δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των δύο ομάδων (Sbordone et al. 2013). Οι Berberi και συν. σε μία μελέτη παρόμοιου σχεδιασμού μελέτησαν τη σταθερότητα του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής μετά από ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με τη χρήση φλοιώδους αλλομοσχεύματος. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν 11 ασθενείς και ο χρόνος παρακολούθησης ήταν περιορισμένος καθώς έφτασε μόνο το ένα έτος μετά από τη λειτουργική φόρτιση των εμφυτευμάτων. Στο ένα έτος παρατηρήθηκε μείωση του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής κατά 20% (Berberi et al. 2015). Οι Lutz και συν. συνέκριναν την ογκομετρική σταθερότητα

της αναπλασθείσας περιοχής μετά από ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με χρήση αυτομοσχεύματος από το γένειο ή ξενομοσχεύματος. Στη μελέτη εντάχθηκαν 47 ασθενείς με χρόνο παρακολούθησης 5 έτη και η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με πανοραμικές ακτινογραφίες. Στο 50% των περιπτώσεων στην ομάδα του ξενομοσχεύματος και στο 43,5% στην ομάδα του αυτομοσχεύματος παρατηρήθηκε σταθερότητα των διαστάσεων της αναπλασθείσας περιοχής. Παρόμοια ήταν επίσης τα ποσοστά των περιπτώσεων των δύο ομάδων που εμφάνισαν ρίκνωση η οποία δεν ξεπερνούσε το 25%. Σε ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων (8,7% στην ομάδα του αυτομοσχεύματος και 4,2% στην ομάδα του ξενομοσχεύματος) η μεταβολή του όγκου έφτασε το 50%. Σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την πενταετή ογκομετρική σταθερότητα της αναπλασθείσας περιοχής ανάμεσα στις δύο ομάδες, όπως αυτή αξιολογήθηκε με πανοραμική ακτινογραφία (Lutz et al. 2015).

Η απορρόφηση του οστικού μοσχεύματος και η σταδιακή αντικατάστασή του από οστίτη ιστό αποτελεί βασικό σημείο για τη σταδιακή μείωση του όγκου της αναπλασθείσας περιοχής σε βάθος χρόνου. Ο χρόνος απορρόφησης των οστικών μοσχευμάτων φαίνεται να ποικίλλει ευρέως (Artzi et al. 2004). Οι κόκκοι τιτανίου διαθέτουν άριστη σταθερότητα των διαστάσεών τους και πιθανώς αυτό αποτελεί πλεονέκτημα για χρήση σε επεμβάσεις ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου (Lambert et al. 2011).

Οι Lambert και συν. συνέκριναν τη συμπεριφορά ξενομοσχεύματος με αυτή των κόκκων τιτανίου κατά την ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου σε πειραματόζωα. Δεκαέξι κουνέλια υποβλήθηκαν σε αμφοτερόπλευρη ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 τύποι μοσχευμάτων : βόειο ξενομόσχευμα, βόειο ξενομόσχευμα εμποτισμένο με

δοξυκυκλίνη (0,1 mg/ml) και πορώδεις κόκκοι τιτανίου. Πραγματοποιήθηκε ακτινογραφικός έλεγχος με μικροτομογραφία, ιστολογική μελέτη και ιστομορφομετρική ανάλυση την πρώτη και την πέμπτη εβδομάδα καθώς και έξι μήνες μετά. Ο ακτινογραφικός έλεγχος στους 6 μήνες έδειξε ότι οι κόκκοι τιτανίου είχαν καλύτερη σταθερότητα διαστάσεων σε σύγκριση με το ξενομόσχευμα, το οποίο υπέστη ρίκνωση της τάξης του 15% κατά το διάστημα αυτό. Η ιστολογική εξέταση σε όλες τις χρονικές στιγμές έδειξε ότι στις περιοχές όπου είχαν τοποθετηθεί πορώδεις κόκκοι τιτανίου η επούλωση εμφάνισε χρονική καθυστέρηση σε σύγκριση με τις περιοχές όπου είχε τοποθετηθεί ξενομόσχευμα. Στην ιστομορφομετρική ανάλυση το ποσοστό ενασβεστίωσης της αναπλασθείσας περιοχές αυξανόταν με το χρόνο χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η επαφή νέου οστού και μοσχεύματος όμως ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στις περιοχές όπου χρησιμοποιήθηκαν πορώδεις κόκκοι τιτανίου. Συνολικά, η συμπεριφορά και των δύο υλικών κρίθηκε παρόμοια σε επεμβάσεις ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου (Lambert et al. 2013).

Ακολούθως, οι Vandeweghe και συν. πραγματοποίησαν πιλοτική κλινική μελέτη με split-mouth σχεδιασμό σε δύο ασθενείς που έχρηζαν αμφοτερόπλευρης ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου. Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σύγκριση του ξενομοσχεύματος έναντι των κόκκων τιτανίου. Τα εμφυτεύματα τοποθετήθηκαν 9 μήνες μετά την ανύψωση και κατά την τοποθέτηση συλλέχθηκαν δείγματα ιστού για ιστολογική εξέταση. Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με το ξενομόσχευμα καθώς σε μεγαλύτερες μεγεθύνσεις το οστόν εξακολουθούσε να φαίνεται σε άμεση επαφή με το μοσχευματικό υλικό, ενώ νέο οστόν παρατηρήθηκε και μέσα στους πόρους του τιτανίου. Γύρω από τους κόκκους τιτανίου δεν παρατηρήθηκε οστεοκλαστική δραστηριότητα, σε αντίθεση με το ξενομόσχευμα,

στην επιφάνεια του οποίου υπήρχαν διάσπαρτοι οστεοκλάστες. Συνολικά, και τα δύο μοσχευματικά φάνηκαν να έχουν παρόμοια συμπεριφορά (Vandeweghe et al. 2013).

Οι Bystedt και Rasmusson διεξήγαγαν πιλοτική μελέτη σε 16 ασθενείς με ωδότητα σε οπίσθιες περιοχές της άνω γνάθου οι οποίοι έχριζαν ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου ώστε να καταστεί δυνατή η τοποθέτηση εμφυτευμάτων στην περιοχή. Η ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου έγινε με την εφαρμογή κόκκων τιτανίου. Σε 4 ασθενείς η τοποθέτηση εμφυτευμάτων έγινε σε δεύτερο χρόνο λόγω ελλιπούς αρχικής σταθερότητας κατά την ανύψωση. Το ποσοστό πρώιμης απώλειας των εμφυτευμάτων ανήλθε σε 13% και αν και ήταν υψηλό, θεωρήθηκε αποδεκτό από τους ερευνητές για τη συγκεκριμένη περιοχή των γνάθων (Bystedt & Rasmusson 2009).

Σε ανάλογη κλινική μελέτη των Verket και συν. συμπεριλήφθηκαν 17 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με τη χρήση κόκκων τιτανίου. Τα εμφυτεύματα τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα με την ανύψωση και κατά την αποκάλυψή τους 6 μήνες μετά λήφθηκαν δείγματα ιστού για ιστολογική και ιστομορφομετρική εξέταση. Τα αποτελέσματα έδειξαν εναπόθεση νέου οστού σε άμεση επαφή με του κόκκους τιτανίου, στοιχείο ενδεικτικό της οστεοσυνέργειας του οστικού υποκατάστατου. Το 25% της περιοχής περιείχε κόκκους τιτανίου, το 16% είχε καταληφθεί από νεόπλαστο οστού, ενώ το υπόλοιπο 59% της περιοχής των υπό εξέταση δειγμάτων περιείχε μη ενασβεστωμένο συνδετικό ιστό (Verket et al. 2013).

Οι ασθενείς της προηγούμενης μελέτης αποτέλεσαν μέρος του δείγματος μιας προοπτικής πολυκεντρικής μελέτης που πραγματοποίησε η ίδια ερευνητική ομάδα (Lyngstadaas et al. 2015) και η οποία είχε σκοπό να μελετήσει τα ποσοστά επιβίωσης των εμφυτευμάτων μετά από ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου με την χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου. Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 40

ασθενείς με ένδειξη ετερόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου. Εβδομήντα εμφυτεύματα τοποθετήθηκαν συνολικά ταυτόχρονα με την ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου. Το ποσοστό επιβίωσης των εμφυτευμάτων ανήλθε σε 98,6% με χρόνο παρακολούθησης 12 έως 42 μήνες. Τα εμφυτεύματα εμφάνισαν μέση οστική απώλεια 0,5 mm και 0,8 mm στην εγγύς και άπω επιφάνεια αντίστοιχα με χρόνο παρακολούθησης τουλάχιστον ένα έτος μετά τη λειτουργική φόρτιση. Η μέση αύξηση του ύψους της φατνιακής ακρολοφίας τουλάχιστον ένα έτος μετά τη λειτουργική φόρτιση των εμφυτευμάτων ήταν 6,5 mm. Σε 21 ασθενείς πραγματοποιήθηκε επίσης ιστολογική εξέταση έξι μήνες μετά την ανοικτή ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου κατά την αποκάλυψη των εμφυτευμάτων. Η ιστολογική εξέταση έδειξε ότι τα ιστοτεμάχια αποτελούνταν κατά 16,6% από νέο οστόν και κατά 26,8% από κόκκους τιτανίου, ενώ την υπόλοιπη περιοχή καταλάμβανε συνδετικός ιστός. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου είναι αποτελεσματικοί σε επεμβάσεις ανοικτής ανύψωσης του εδάφους ιγμορείου με ταυτόχρονη τοποθέτηση εμφυτευμάτων (Lyngstadaas et al. 2015).

Οι Dursun και συν. πραγματοποίησαν προοπτική κλινική μελέτη στην οποία συμπεριλήφθηκαν 8 ασθενείς που έχριζαν ανοικτής ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου αμφοτερόπλευρα. Στη μία πλευρά τοποθετήθηκε ξενομόσχευμα ίππειας προέλευσης και στην αντιδιαμετρική πλευρά τοποθετήθηκε συνδυασμός (σε ανάμειξη) ξενομοσχεύματος και πορωδών κόκκων τιτανίου. Έξι μήνες μετά, κατά την τοποθέτηση των εμφυτευμάτων στην περιοχή, λήφθηκαν δείγματα ιστού τα οποία εξετάστηκαν με μικροτομογραφία. Η μελέτη αυτή δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δομή του αναπλασθέντος οστού μεταξύ των δύο ομάδων (Dursun et al. 2015).

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή χρήση των κόκκων τιτανίου ως αναπλαστικό υλικό γύρω από εμφυτεύματα. Σε μελέτη σε κουνέλια, οι Wohlfahrt και συν. παρασκεύασαν αβαθή φρεάτια στις κνήμες των ζώων, διαμέτρου 6,25 mm για την υποδοχή τροχίσκων τιτανίου. Στη συνέχεια δημιούργησαν οστικά ελλείμματα διαστάσεων 3x5 mm σε γειτνίαση με τα εμφυτεύματα, που εκτείνονταν μέσα στο χώρο του μυελού των οστών. Τα κουνέλια ταξινομήθηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες. Οι δύο πειραματικές ομάδες έλαβαν πορώδεις κόκκους τιτανίου οξειδωμένους ή μη με σκοπό την ανάπλαση των οστικών ελλειμμάτων, ενώ στην ομάδα ελέγχου οι οστικές κοιλότητες αφέθηκαν κενές. Τέσσερις εβδομάδες μετά πραγματοποιήθηκε ιστολογική εξέταση η οποία έδειξε σαφή υπεροχή των κόκκων τιτανίου ως προς την προαγωγή της εναπόθεσης νέου οστού έναντι της ομάδας ελέγχου. Ο ακτινογραφικός έλεγχος έδειξε την παρουσία ενασβεστωμένου ιστού σε ποσοστό 27% στις πειραματικές ομάδες έναντι 2% στην ομάδα ελέγχου. Επιπροσθέτως, η ανάλυση ιστικών υγρών από την περιοχή του τραύματος μετά την αφαίρεση των εμφυτευμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην τιμή της γαλακτικής αφυδρογονάσης ως δείκτη ιστικής νέκρωσης, στοιχείο ενδεικτικό της βιοσυμβατότητας του οστικού υποκατάστατου. Επίσης, ο έλεγχος γονιδιακής έκφρασης με την εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) στο περιβάλλον των ιστών δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων ή παραγόντων ενδεικτικών οστεοκλαστικής και οστεοβλαστικής δραστηριότητας μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδας ελέγχου. Η εύρεση νεοδημιουργηθέντος οστού μέσα στο χώρο του μυελού, όπου φυσιολογικά δεν ανευρίσκονται οστικές δοκίδες, και πάντα σε σχέση με την επιφάνεια των κόκκων τιτανίου αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη για οστεοσυνεργική δράση του υλικού (Wohlfahrt et al. 2010).

Ακολούθως, σε πειραματική μελέτη οι Lee και συν. συνέκριναν τη χρήση ξενομοσχεύματος σε συνδυασμό με μεμβράνη κολλαγόνου και πορωδών κόκκων τιτανίου σε συνδυασμό με μεμβράνη κολλαγόνου έναντι ομάδας ελέγχου στην οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο μεμβράνη κολλαγόνου για την αντιμετώπιση χειρουργικά προκληθεισών κυκλοτερών οστικών βλαβών μετά από τοποθέτηση εμφυτευμάτων. Οι κυκλοτερείς βλάβες είχαν διάμετρο 2 mm μεγαλύτερη από τη διάμετρο των εμφυτευμάτων και βάθος 5 mm. Στα εμφυτεύματα τοποθετήθηκαν βίδες κάλυψης και πραγματοποιήθηκε σύγκλιση των κρημνών. Στις 4 και 8 εβδομάδες μετεγχειρητικά πραγματοποιήθηκε ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο πειραματικές ομάδες είχαν σημαντικά μεγαλύτερη οστική πλήρωση των οστικών βλαβών έναντι της ομάδας ελέγχου τόσο στις 4 όσο και στις 8 εβδομάδες. Η ομάδα του ξενομοσχεύματος δε διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό έναντι της ομάδας των κόκκων τιτανίου ως προς το ποσοστό οστικής πλήρωσης. Εν τούτοις, το ποσοστό οστεοενσωμάτωσης ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στην ομάδα του ξενομοσχεύματος (49%) έναντι της ομάδας των κόκκων τιτανίου (33%). Οι κόκκοι τιτανίου δεν προήγαγαν τη δημιουργία νέου οστού σε επαφή με τους κόκκους του υλικού. Αντιθέτως, τόσο στην ομάδα του συνδυασμού κόκκων τιτανίου και μεμβράνης όσο και στην ομάδα ελέγχου η δημιουργία νέου οστού άρχισε και επεκτάθηκε κατά μήκος των οστικών τοιχωμάτων της βλάβης με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη οστική πλήρωση και τη μειωμένη επαφή οστού-εμφυτεύματος αντίστοιχα με το πλέον μυλικό τμήμα της βλάβης. Η διάρκεια αυτής της μελέτης ήταν αρκετά μικρή (8 εβδομάδες) και είναι πιθανό η διαδικασία της επούλωσης των οστικών βλαβών να μην είχε ολοκληρωθεί στο διάστημα αυτό. Σε κάθε περίπτωση, η τοποθέτηση οστικού μοσχεύματος φάνηκε να επιταχύνει τις διαδικασίες της οστικής πλήρωσης. Επιπλέον, το ξενομόσχευμα έδειξε καλύτερη

οστεοσυνεργή δράση έναντι των κόκκων τιτανίου καθώς δημιουργήθηκε νέο οστόν σε άμεση επαφή με του κόκκους του υλικού και οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά επαφής οστού-εμφυτεύματος (Lee et al. 2015).

Οι Wohlfahrt και συν. πραγματοποίησαν τυχαιοποιημένη προοπτική κλινική μελέτη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των πορωδών κόκκων τιτανίου στην αντιμετώπιση περιεμφυτευματικών βλαβών. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν συνολικά 32 περιεμφυτευματικές ενδοοστικές βλάβες ενός, δύο και τριών τοιχωμάτων βάθους τουλάχιστον 4 mm, οι οποίες ταξινομήθηκαν τυχαία σε πειραματική ομάδα και ομάδα ελέγχου. Στις επιφάνειες όλων των προσβεβλημένων από περιεμφυτευματίτιδα εμφυτευμάτων (πειραματική ομάδα και ομάδα ελέγχου) έγινε λεπτομερής μηχανική απομάκρυνση των τοπικών εναποθέσεων με εργαλεία τιτανίου και στη συνέχεια χημική επεξεργασία της επιφάνειας με γέλη αιθυλενδιαμινοτετραοξικού οξέος (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 24%. Στην πειραματική ομάδα οι ενδοοστικές βλάβες πληρώθηκαν με κόκκους τιτανίου, ενώ στην ομάδα ελέγχου οι ενδοοστικές βλάβες δεν έλαβαν μοσχευματικό υλικό. Στη συνέχεια όλα τα εμφυτεύματα καλύφθηκαν με κρημνό και οι περιοχές αφέθηκαν να επουλωθούν για 6 μήνες. Στους 6 μήνες πραγματοποιήθηκε η αποκάλυψη των εμφυτευμάτων και ακολούθησε επανατοποθέτηση των προσθετικών εργασιών. Στους 12 μήνες πραγματοποιήθηκε κλινικός και ακτινογραφικός επανέλεγχος με λήψη οπισθοφατνιακών ακτινογραφιών καθώς και έλεγχος της σταθερότητας των εμφυτευμάτων με ανάλυση συχνότητας συντονισμού (resonance frequency analysis). Και οι δύο ομάδες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο βάθος της περιεμφυτευματικής σχισμής και στην αιμορραγία στην αντίχνευση με μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης η σταθερότητα των εμφυτευμάτων στην πειραματική ομάδα αυξήθηκε κατά 1.6 μονάδες στην κλίμακα σταθερότητας (implant

stability quotient ISQ), ενώ στην ομάδα ελέγχου διαπιστώθηκε πτώση κατά 0.7 ISQ, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Η πειραματική ομάδα παρουσίασε στατιστικά σημαντική πλήρωση των ενδοοστικών βλαβών με ακτινογραφικά κριτήρια (μέση πλήρωση της ενδοοστικής βλάβης κατά 57%) σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου στην οποία παρατηρήθηκε μέση αύξηση του μεγέθους της ενδοοστικής βλάβης κατά 14%. Επίσης, το βάθος των ενδοοστικών βλαβών στην πειραματική ομάδα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά με ακτινογραφικά κριτήρια (μείωση κατά 2 mm) ενώ το βάθος στην ομάδα ελέγχου παρέμεινε πρακτικά σταθερό (μείωση κατά 0.1 mm) (Wohlfart et al. 2012A). Σε έναν από τους ασθενείς της πειραματικής ομάδας πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα ιστολογική εξέταση κατά την αφαίρεση ενός εμφυτεύματος ένα έτος μετά τη θεραπεία. Το εμφύτευμα αυτό ήταν αδύνατον να αποκατασταθεί με νέα επιεμφυτευματική στεφάνη καθώς έφερε αποσπαστική βλάβη στον αυχένα του η οποία είχε προκληθεί πιθανώς από την παλαιότερη επιεμφυτευματική προσθετική εργασία. Η ιστολογική εξέταση που πραγματοποιήθηκε μετά την αφαίρεση του εμφυτεύματος έδειξε δημιουργία νέου οστού σε επαφή τόσο με τους κόκκους του υλικού όσο και με την επιφάνεια του εμφυτεύματος. Σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα των Wohlfart και συνεργατών, η αναφορά αυτού του περιστατικού παρέχει μία μικρή ένδειξη ότι οι κόκκοι τιτανίου πιθανώς να ευνοούν την επαναοστεοενσωμάτωση σε εμφυτεύματα που έχουν προσβληθεί από περιεμφυτευματίτιδα (Wohlfart et al. 2011).

Σε ανάλογη αναδρομική κλινική μελέτη οι Mijiritsky και συν. προχώρησαν σε χειρουργική θεραπεία περιεμφυτευματίτιδας με τη χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου για την πλήρωση ενδοοστικών βλαβών σε 18 εμφυτεύματα. Η αξιολόγηση έγινε με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια. Η θεραπεία κρίθηκε επιτυχής με βάση την απουσία αιμορραγίας στην αντίχενυση και πυόρροιας καθώς και την ύπαρξη αβαθούς

περιεμφυτευματικής σχισμής στο 88% των περιπτώσεων με μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 7 μήνες (Mijiritsky et al. 2013). Επιπλέον η χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου οδήγησε σε μέση μείωση του βάθους των ενδοοστικών βλαβών από 4,4 mm σε 2,2 mm.

Παρομοίως, ο Thor έχει αναφέρει τέσσερα κλινικά περιστατικά χειρουργικής αντιμετώπισης περιεμφυτευματίτιδας με τη χρήση κόκκων τιτανίου. Τα εμφυτεύματα αυτά παρουσίαζαν εκτεταμένη οστική απώλεια που έφτανε ως το «ακρορριζικό» τμήμα τους. Μετεγχειρητικά, δύο από τα τέσσερα εμφυτεύματα παρουσίασαν «ακρορριζική» μετατόπιση της παρυφής των μαλακών περιεμφυτευματικών ιστών και συνεπακόλουθη απώλεια κόκκων μοσχεύματος κατά τον πρώτο μήνα της επούλωσης. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις, οι ιστοί παρέμειναν ελεύθεροι φλεγμονής κατά το διάστημα παρακολούθησης που κυμάνθηκε από 9 έως 26 μήνες (Thor 2013).

Πρόσφατα οι Jepsen και συν. πραγματοποίησαν τυχαιοποιημένη πολυκεντρική κλινική μελέτη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης πορωδών κόκκων τιτανίου για την αντιμετώπιση περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών έναντι της απόξεσης με χειρουργικό κρημό. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν 66 ασθενείς με περιεμφυτευματικές βλάβες τριών ή τεσσάρων τοιχωμάτων βάθους τουλάχιστον 3 mm και ακτινογραφικής γωνίας όχι μεγαλύτερης από 35°. Στην ομάδα ελέγχου πραγματοποιήθηκε μόνο απόξεση των βλαβών με κρημό, ενώ στην πειραματική ομάδα τοποθετήθηκαν στις βλάβες και πορώδεις κόκκοι τιτανίου. Και στις δύο ομάδες ακολούθησε διαβλεννογόνια επούλωση. Η τελική κλινική και ακτινογραφική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε στους 12 μήνες. Η πειραματική ομάδα εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ελάττωση των διαστάσεων και πλήρωση των βλαβών με ακτινογραφικά κριτήρια. Οι κλινικές

παράμετροι βελτιώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις 2 ομάδες σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, χωρίς να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Επιπρόσθετα, οι συγγραφείς αυτής της μελέτης υποστήριξαν ότι εξάλειψη των περιεμφυτευματικών βλαβών, όπως αυτό εκτιμήθηκε από την απουσία αιμορραγίας στη ανίχνευση, την ύπαρξη βάθους περιεμφυτευματικής σχισμής μικρότερου από 5 mm και τη μη περαιτέρω οστική απώλεια, παρατηρήθηκε στο 30% και το 23% των βλαβών για την πειραματική και την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Συμπερασματικά, η σύγκριση των πορωδών κόκκων τιτανίου έναντι μόνης της απόξεσης με κρημνό σε περιεμφυτευματικές βλάβες έδειξε ότι οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ελάττωση των διαστάσεων και πλήρωση των βλαβών με ακτινογραφικά κριτήρια, χωρίς όμως αυτό το εύρημα να συνοδεύεται από στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τις κλινικές παραμέτρους μεταξύ των δύο ομάδων. Ως εκ τούτου οι συγγραφείς της μελέτης κατέληξαν ότι απαιτούνται νέες μελέτες με ιστολογικά δεδομένα για να διερευνηθεί περαιτέρω η ύπαρξη ή μη επιπρόσθετου οφέλους από την αντιμετώπιση των περιεμφυτευματικών βλαβών με πορώδεις κόκκους τιτανίου έναντι μόνης της απόξεσης με κρημνό (Jepsen et al. 2016).

Σε περίπτωση εφαρμογής μοσχευματικών υλικών σε μετεξακτικά φατνία με σκοπό τη διατήρηση των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας, ο χρόνος απορρόφησης του υλικού φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Σε πειραματική μελέτη σε σκύλους οι Araújo και Lindhe συνέκριναν τη χρήση αυτομοσχεύματος και ξενομοσχεύματος ως προς την αποτελεσματικότητά τους στη διατήρηση των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας. Η ιστολογική αξιολόγηση στους τρεις μήνες έδειξε ότι το αυτομόσχευμα στο διάστημα αυτό είχε πλήρως απορροφηθεί και

απέτυχε να διατηρήσει το “περίγραμμα” της φατνιακής ακρολοφίας. Αντιθέτως, τα φατνία στα οποία είχε τοποθετηθεί ξενομόσχευμα, το οποίο απορροφάται βραδέως, εμφάνισαν μικρότερη απορρόφηση κατά 35% έναντι των φατνίων που είχαν δεχθεί αυτομόσχευμα (Araújo & Lindhe 2011). Παρομοίως οι Jung και συν. σε κλινική μελέτη συνέκριναν τη χρήση ξενομοσχεύματος με το αλλοπλαστικό μόσχευμα β-τριφωσφορικό ασβέστιο (β-TCP) στη διατήρηση των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας. Στην υπολογιστική τομογραφία 6 μήνες μετά φάνηκε ότι η ομάδα στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί το β-TCP εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη απορρόφηση της φατνιακής ακρολοφίας έναντι της ομάδας όπου είχε χρησιμοποιηθεί το βραδέως απορροφήσιμο ξενομόσχευμα (Jung et al. 2013).

Η σταθερότητα των διαστάσεων της αναπλασθείσας περιοχής σε βάθος χρόνου αποτελεί επίσης κρίσιμο παράγοντα, ιδιαίτερα σε περιοχές αισθητικού ενδιαφέροντος. Οι Jensen και συν. πραγματοποίησαν ιστολογική μελέτη σε 10 ασθενείς στους οποίους είχαν τοποθετηθεί 12 εμφυτεύματα στην αισθητική ζώνη 4 με 8 εβδομάδες μετά από την εξαγωγή των δοντιών. Κατά την τοποθέτηση των εμφυτευμάτων διαπιστώθηκε η παρουσία ελλείμματος του παρειακού πετάλου και πραγματοποιήθηκε εφαρμογή κατευθοδηγούμενης οστικής ανάπλασης με τη χρήση αυτομοσχεύματος σε επαφή με τις αποκαλυμμένες σπείρες των εμφυτευμάτων παρειακά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στρώση ξενομοσχεύματος και η περιοχή καλύφθηκε με διπλή στρώση απορροφήσιμης μεμβράνης κολλαγόνου. Η ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε 14 έως 80 μήνες αργότερα ανέδειξε την παρουσία υπολειμματικών κόκκων ξενομοσχεύματος σε ποσοστό 32%. Το ποσοστό αυτό δεν επέδειξε τάση προς μείωση με την πάροδο του χρόνου. Το 40% της περιοχής καταλάμβανε ώριμο οστόν. Επίσης, το 70% της επιφάνειας των κόκκων του ξενομοσχεύματος βρισκόταν σε άμεση επαφή με ώριμο οστόν. Τα

αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν την παραμονή υπολειμματικών κόκκων ξενομοσχεύματος για ιδιαίτερα μεγάλους χρόνους σε αναπλασθείσες περιοχές, στοιχείο που συνηγορεί υπέρ του ιδιαίτερα μεγάλου χρόνου απορρόφησης του ξενομοσχεύματος (Jensen et al 2014).

Οι κόκκοι τιτανίου αποτελούν μη απορροφήσιμο μοσχευματικό υλικό και αυτή τους η ιδιότητα είναι πιθανώς σημαντική για τη διατήρηση των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγές δοντιών. Σε πειραματική μελέτη σε σκύλους, οι Bashara και συν. συνέκριναν σε μετεξακτικά φατνία τη χρήση βόειου ξενομοσχεύματος με ή χωρίς το συνδυασμό απορροφήσιμης μεμβράνης κολλαγόνου και τη χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου με ή χωρίς το συνδυασμό μεμβράνης έναντι της επούλωσης των φατνίων χωρίς την εφαρμογή μοσχευματικού υλικού με ή χωρίς μεμβράνη. Η ακτινογραφική και ιστολογική αξιολόγηση 6 μήνες μετά απέτυχε να δείξει την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ομάδων. Η ιστολογική εξέταση ωστόσο στις ομάδες όπου χρησιμοποιήθηκαν κόκκοι τιτανίου έδειξε εναπόθεση νέου οστού τόσο μεταξύ των κόκκων όσο και εντός των πόρων τους. Αντιθέτως, στην περίπτωση του βόειου ξενομοσχεύματος διαπιστώθηκε η εναπόθεση νέου οστού μόνο στην περιφέρεια των κόκκων του μοσχεύματος. Επίσης, το ξενομόσχευμα βρέθηκε να είναι ενσωματωμένο με το περιβάλλον οστού μόνο στην περιφέρεια του φατνίου. Στο κέντρο, αντιθέτως, παρατηρήθηκε διείσδυση συνδετικού ιστού (Bashara et al. 2012).

Οι Tavakoli και συν. συνέκριναν την επίδραση της συνδυασμένης εφαρμογής κόκκων τιτανίου και απορροφήσιμης μεμβράνης κολλαγόνου με την εφαρμογή μόνο μεμβράνης σε μετεξακτικά φατνία τεσσάρων σκύλων. Σε κάθε πειραματόζωο πραγματοποιήθηκαν συνολικά έξι εξαγωγές στην κάτω γνάθο. Στη συνέχεια, τα φατνία ταξινομήθηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα τοποθετήθηκε στα

φατνία συνδυασμός κόκκων τιτανίου και μεμβράνης, στη δεύτερη ομάδα τοποθετήθηκε μόνο μεμβράνη και στην τρίτη ομάδα τα φατνία αφέθηκαν να επουλωθούν χωρίς τη χρήση μοσχεύματος ή/και μεμβράνης (ομάδα ελέγχου). Η ιστολογική εξέταση στις 2 και στις 6 εβδομάδες αποκάλυψε ότι το ποσοστό νεοδημιουργηθέντος οστού διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ της ομάδας όπου είχε χρησιμοποιηθεί συνδυασμός κόκκων τιτανίου και μεμβράνης κολλαγόνου έναντι της ομάδας ελέγχου. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η αποτυχία να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το ποσοστό του νεοδημιουργηθέντος οστού μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων θα μπορούσε πιθανόν να αποδοθεί στο μικρό μέγεθος του δείγματος. Τόνισαν ωστόσο τη σημασία της χρήσης μεμβράνης σε συνδυασμό με τους πορώδεις κόκκους τιτανίου με σκοπό τον αποκλεισμό των επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων συνδετικού ιστού από την περιοχή όπου επιδιώκεται οστική ανάπλαση (Tavakoli et al. 2012).

Σε πειραματική μελέτη οι Delgado-Ruiz και συν. μελέτησαν την επίδραση της επιπρόσθετης χρήσης απορροφήσιμης μεμβράνης κολλαγόνου σε συνδυασμό με πορώδεις κόκκους τιτανίου κατά την αντιμετώπιση οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους στις κνήμες κουνελιών. Ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν βλάβες οι οποίες αφέθηκαν να επουλωθούν χωρίς τη χρήση μοσχευματικού υλικού ή/και μεμβράνης. Η ιστολογική και ιστομορφομετρική εξέταση 6 εβδομάδες μετά έδειξε δημιουργία στατιστικά σημαντικά περισσότερου νέου οστού μετά από συνδυασμένη χρήση μοσχεύματος και μεμβράνης έναντι της χρήσης μόνο μοσχεύματος. Η ποσότητα νέου οστού σε αυτή την ομάδα ήταν υπερδιπλάσια (57% της βλάβης) σε σύγκριση με την ομάδα που χρησιμοποιήθηκε μόνο μόσχευμα (26% της βλάβης). Η ομάδα ελέγχου εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μικρότερα ποσοστά νέου οστού σε σύγκριση με τις δύο πειραματικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό του νεοδημιουργηθέντος

οστού στην ομάδα ελέγχου ανήλθε μόλις στο 6% της βλάβης. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την οστεοσυνεργική δράση των κόκκων τιτανίου. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι στις δύο πειραματικές ομάδες παρατηρήθηκε εναπόθεση νέου οστού και αντίστοιχα με το τμήμα της βλάβης που επεκτεινόταν μέσα στο χώρο του μυελού των οστών. Αντιθέτως, στην ομάδα ελέγχου η περιοχή αυτή καταλήφθηκε κατά 98% από συνδετικό ιστό. Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η χρήση μεμβράνης σε συνδυασμό με πορώδεις κόκκους τιτανίου αποφέρει πολλά οφέλη καθώς αποτρέπει την κατάδυση του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού μέσα στην οστική βλάβη και ευνοεί την εναπόθεση νέου οστού. Επιπροσθέτως, η μεμβράνη κολλαγόνου την αρχική μετεγχειρητική περίοδο συγκρατεί το μοσχευματικό υλικό στη θέση που τοποθετήθηκε αρχικά και αποτρέπει την μετατόπιση του από την περιοχή, βοηθά στη σταθεροποίηση του θρόμβου αίματος ενώ παράλληλα πιθανόν να αποτελέσει προστατευτικό φραγμό έναντι στη λοίμωξη σε περίπτωση που αποκαλυφθεί η αναπλασθείσα περιοχή στο στοματικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της επούλωσης (Delgado-Ruiz et al. 2014).

Οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου έχουν μελετηθεί και σε περιοδοντικές βλάβες (Wohlfart et al. 2012B,C). Σε πειραματική μελέτη οι Wohlfart και συν. συνέκριναν τη χρήση ξενομοσχεύματος και κόκκων τιτανίου έναντι ομάδας ελέγχου, η οποία δεν έλαβε μόσχευμα, στη θεραπευτική αντιμετώπιση χειρουργικά προκληθεισών βλαβών της περιοχής συμβολής των ριζών (μεσορριζικών βλαβών) κατηγορίας II σε χοιρίδια. Η ιστολογική μελέτη στις 6 εβδομάδες έδειξε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη οστική ανάπλαση κατά το κατακόρυφο επίπεδο στην περιοχή συμβολής των ριζών στην ομάδα όπου είχαν χρησιμοποιηθεί οι κόκκοι τιτανίου σε σύγκριση με την ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε ξενομόσχευμα. Οι διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των πορωδών κόκκων τιτανίου δεν ήταν ωστόσο στατιστικά σημαντικές.

Οι δύο πειραματικές ομάδες εμφάνισαν επίσης μικρότερης έκτασης ανάπλαση του περιρριζίου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς και πάλι οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Επιπλέον και στις τρεις ομάδες εμφανίστηκαν λίγες περιπτώσεις επιφανειακής απορρόφησης στις ριζικές επιφάνειες και πάλι χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η μικροτομογραφική ανάλυση έδειξε ότι η μέση πλήρωση των βλαβών στην ομάδα των κόκκων τιτανίου ανήλθε στο 96%, και ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα ποσοστά για την ομάδα του ξενομοσχεύματος και την ομάδα ελέγχου, τα οποία ήταν 62% και 72,2% αντίστοιχα και δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ τους (Wohlfart et al. 2012B). Επιπρόσθετα, τα ιστολογικά ευρήματα έδειξαν ότι οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου ήταν ασφαλείς για χρήση σε επαφή με τις ριζικές επιφάνειες δοντιών. Συμπερασματικά, οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου σε αυτή τη μελέτη θεωρήθηκαν κατάλληλοι και ασφαλείς για χρήση σε μεσορριζικές βλάβες (Wohlfart et al. 2012A).

Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση της χρήσης πορωδών κόκκων τιτανίου σε 10 ασθενείς με περιοδοντικές βλάβες της περιοχής συμβολής των ριζών κατηγορίας II παρειακά σε γομφίους της κάτω γνάθου. Η χρήση των πορωδών κόκκων τιτανίου οδήγησε 6 και 12 μήνες μετά σε στατιστικά σημαντική μείωση του βάθους των θυλάκων και του ουλικού δείκτη. Ακτινογραφικά διαπιστώθηκε σημαντικό βαθμό ελάττωση των μεσορριζικών βλαβών, η οποία δε συνοδευόταν όμως από στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αιμορραγία στην αντίχνευση, στην κλινική απώλεια πρόσφυσης και στην ακρορριζική μετατόπιση της παρυφής των ούλων. Το οστικό αυτό υποκατάστατο θεωρήθηκε ασφαλές για χρήση σε επαφή με ριζικές επιφάνειες. Ωστόσο, η μελέτη αυτή δεν συμπεριέλαβε ομάδα ελέγχου και επομένως δε μπορεί να τεκμηριώσει κάποιο επιπρόσθετο όφελος από τη χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου σε βλάβες της περιοχής συμβολής των ριζών κατηγορίας

Η παρειακά σε γομφίους της κάτω γνάθου έναντι μόνης της ριζικής απόξεσης με κρημνό (Wohlfart et al. 2012C).

Πίνακας 1.2. Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική

Συγγραφείς & έτος	Είδος μελέτης	Είδος παρέμβασης	Ομάδες	Χρόνος αξιολόγησης	Τρόπος αξιολόγησης	Αποτελέσματα	Συμπεράσματα
Holmberg et al. 2008	Αναφορά κλινικού περιστατικού	Καθ' εύρος αύξηση φατνιακής ακρολοφίας με διάσχιση και ταυτόχρονη τοποθέτηση 9 εμφυτευμάτων	PTG	6 μήνες, 1, 2, 3, 5, 7 & 12 έτη μετά τη φόρτιση	Κλινική & ακτινογραφική (πανοραμική)	Καλή λειτουργικότητα της αποκατάστασης. Μέση οστική απώλεια < 2 mm.	PTG: κατάλληλοι για χρήση σε καθ' εύρος αύξηση φατνιακής ακρολοφίας.
Bystedt & Rasmusson 2009	Πιλοτική κλινική (n=16 ασθενείς)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου (n=16)	PTG & τοποθέτηση 23 εμφυτευμάτων άμεση (12 άτομα) μεθύστερη (4 άτομα)	12-36 μήνες μετά τη φόρτιση	Κλινική	Επιβίωση εμφυτευμάτων: 87%	PTG: καλή συμπεριφορά στην ανύψωση εδάφους ιγμορείου.
Wohlfahrt et al. 2010	Πειραματική (n=24 κουνέλια)	Ανάπλαση χειρουργικά προκληθέντων οστικών ελλειμμάτων στην κνήμη σε γεινίαση με τροχίσκους τιτανίου με χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου (n=60 οστικά ελλείμματα)	Τυχαιοποίηση σε τρεις ομάδες: 1.PTG 2.WPTG 3.Χωρίς μοσχευματικό υλικό (ομάδα ελέγχου)	4 εβδομάδες	Ιστολογική, μικροτομογραφία, ELISA (ιστικά υγρά), rt-PCR (ιστοί)	ΣΣ μεγαλύτερη δημιουργία νέου οστού γύρω από τους κόκκους, ενδιάμεσα στους πόρους & στις δύο πειραματικές ομάδες έναντι της ομάδας ελέγχου. ΜΣΣ διαφορά στη συγκέντρωση δεικτών ιστικής βλάβης & στη γονιδιακή έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων & δεικτών οστικού μεταβολισμού μεταξύ των ομάδων.	PTG, WPTG: οστεοσυnergική δράση & μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπλαση οστικών ελλειμμάτων γύρω από εμφυτεύματα.
Wohlfahrt et al. 2011	Αναφορά κλινικού περιστατικού	Αφαίρεση ενός εμφυτεύματος μετά από ανάπλαση περιεμφυτευματικής ενδοοστικής βλάβης	EDTA + PTG	12 μήνες	Ιστολογική	Δημιουργία νέου οστού σε επαφή με τους κόκκους PTG καθώς και με το εμφύτευμα.	Υπάρχει δυνατότητα επαναστεοενσωμάτωσης μετά από ανάπλαση περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών με PTG

Πίνακας 1.2 (συνέχεια α) Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική

Bashara et al. 2012	Πειραματική (n=6 σκυλιά)	Διατήρηση διαστάσεων φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγές 36 δοντιών	Τυχοποίηση: 1.XG 2.XG + CM 3.PTG 4.PTG + CM 5.CM 6.χωρίς υλικό (ομάδα ελέγχου)	6 μήνες	Μικροτομαγραφία, ιστολογική	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ των ομάδων. PTG: νέο οστόν γύρω από τους κόκκους & μέσα σε πόρους. XG: νέο οστόν μόνο γύρω από τους κόκκους (όχι μέσα σε πόρους).	PTG: φαίνεται να έχει καλύτερη οστεοσυνεργική δράση συγκριτικά με XG και είναι κατάλληλο για χρήση σε διατήρηση των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας.
Tavakoli et al. 2012	Πειραματική (n=4 σκυλιά)	Διατήρηση διαστάσεων φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγές 24 δοντιών	Τυχοποίηση των φατνίων σε 3 ομάδες: 1.PTG + CM 2.CM 3. χωρίς μοσχευματικό υλικό (ομάδα ελέγχου)	2 & 6 εβδομάδες	Ιστολογική	ΣΣ περισσότερο νέο οστόν με χρήση PTG + CM έναντι ομάδας ελέγχου.	Ο συνδυασμός PTG+CM φαίνεται να προάγει τη δημιουργία νέου οστού σε οστικά ελλείμματα.
Wohlfart et al. 2012 A	Προοπτική τυχοποιημένη κλινική (n=32 ασθενείς)	Ανάπλαση περιεμφτευματικών ενδοοστικών βλαβών (n=32)	Τυχοποίηση σε 2 ομάδες: 1.EDTA + PTG 2.EDTA (ομάδα ελέγχου)	12 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (οπισθοφατνιακές), resonance frequency analysis	ΣΣ μείωση στο βάθος θυλάκων και στην αιμορραγία στην ανίχνευση χωρίς ΣΣΔ μεταξύ των ομάδων. ΜΣΣ διαφορά στη μεταβολή σταθερότητας εμφυτευμάτων μεταξύ των ομάδων. ΣΣ ελάττωση των διαστάσεων των οστικών βλαβών στην πειραματική ομάδα με ακτινογραφικά κριτήρια.	Η χρήση PTG σε περιεμφτευματικές ενδοοστικές βλάβες οδηγεί σε ΣΣ ελάττωση των διαστάσεων των βλαβών με ακτινογραφικά κριτήρια.

Πίνακας 1.2 (συνέχεια β) Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική

Wohlfart et al. 2012B	Πειραματική (n=11 χοιρίδια)	Ανάπλαση χειρουργικά προκλειθεισών μεσορριζικών βλαβών 2 ^{ου} βαθμού (n=66 βλάβες)	Τυχαιοποίηση βλαβών σε 3 ομάδες: 1. XG 2. PTG 3. Χωρίς μοσχευματικό υλικό (ομάδα ελέγχου)	6 εβδομάδες	Μικροτομογραφία, ιστομορφομετρική	ΣΣ μεγαλύτερη δημιουργία νέου οστού στην ομάδα PTG έναντι XG. ΣΣ μεγαλύτερη πλήρωση βλαβών στην ομάδα PTG έναντι άλλων 2 ομάδων.	PTG: φαίνονται κατάλληλοι και ασφαλείς για χρήση σε μεσορριζικές βλάβες.
Wohlfart et al. 2012C	Παρουσίαση σειράς κλινικών περιστατικών (n=10 ασθενείς)	Ανάπλαση 2 ^{ου} βαθμού μεσορριζικών βλαβών παρειικά σε γομφίους κάτω γνάθου (n=10)	PTG	6 & 12 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (οπισθοφατνιακές)	ΣΣ μείωση βάθους θυλάκων και ουλικού δείκτη. ΣΣ ελάττωση των διαστάσεων των οστικών βλαβών ακτινογραφικά.	PTG: φάνηκαν ασφαλείς για χρήση σε μεσορριζικές βλάβες. Η αποτελεσματικότητα τους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.
Lambert et al. 2013	Πειραματική σε κουνέλια (n=16 κουνέλια)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους γιμορείου (n=32)	Τυχαιοποίηση 1. XG 2. XG+δοξυκυκλίνη (0.1 mg/ml) 3. PTG	1 & 5 εβδομάδες, 6 μήνες	Ακτινογραφική (μικροτομογραφία), ιστολογική & ιστομορφομετρική	PTG: Σταθερότητα διαστάσεων της αναπλασθείσας περιοχής, επιβράδυνση επούλωσης & ΣΣ χαμηλότερο ποσοστό επαφής οστού-εμφυτεύματος.	PTG & XG: παρόμοια συμπεριφορά στην ανύψωση εδάφους γιμορείου.
Mijiritsky et al. 2013	Αναδρομική κλινική (n=18 ασθενείς)	Ανάπλαση ενδοοστικών βλαβών (n=18 εμφυτεύματα)	PTG	6-15 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (οπισθοφατνιακές Δεν το αποσαφηνίζει)	Απουσία αιμορραγίας ή/και πυόρροιας στην αντίχνευση και απουσία βαθέων θυλάκων στο 88% των περιπτώσεων. Μέση ακτινογραφική ελάττωση των διαστάσεων των βλαβών κατά 2,2 mm.	PTG: πιθανή καλή συμπεριφορά στην αντιμετώπιση περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών.

Πίνακας 1.2 (συνέχεια γ) Μελέτες εφαρμογής των πορωδών κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική

Thor 2013	Αναφορά κλινικών περιστατικών (n=4 ασθενείς)	Ανάπλαση περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών (n=4)	PTG	9-26 μήνες	Κλινική	Σε δύο περιπτώσεις: ακρορριζική μετατόπιση της παρυφής των ιστών & απώλεια PTG κόκκων κατά τον 1 ^ο μήνα. Απουσία φλεγμονής για το διάστημα παρακολούθησης.	Η εφαρμογή PTG ως αναπλαστικό υλικό χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.
Vandeweghe et al. 2013	Πιλοτική κλινική split-mouth (n=2 ασθενείς)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου (n=4)	1.PTG 2.XG	9 μήνες	Ιστολογική	Εναπόθεση νέου οστού σε άμεση επαφή με PTG & μέσα στους πόρους του.	PTG & XG: παρόμοια συμπεριφορά στην ανύψωση εδάφους ιγμορείου.
Verket et al. 2013	Πιλοτική κλινική (n=17 ασθενείς)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου (n=18)	PTG	6 μήνες	Μικροτομογραφία, Ιστολογική & ιστομορφομετρική	Εναπόθεση νέου οστού σε άμεση επαφή με PTG. 16,1% νέο οστού, 25,9% PTG κόκκοι, 59% συνδετικός ιστός.	PTG: καλή οστεοσυνέργεια & συμπεριφορά στην ανύψωση εδάφους ιγμορείου.
Delgado-Ruiz et al. 2014	Πειραματική (n=21 κουνέλια)	Ανάπλαση οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους στην κνήμη (n=63 οστικά ελλείμματα)	Τυχαιοποίηση βλαβών σε 3 ομάδες: 1.PTG + CM 2.PTG 3.Χωρίς μοσχευματικό υλικό (ομάδα ελέγχου)	6 εβδομάδες	Ιστολογική & ιστομορφομετρική	ΣΣ περισσότερο νέο οστού στην ομάδα συνδυασμένης χρήσης PTG+CM σε σύγκριση με τις άλλες 2 ομάδες. ΣΣ περισσότερο νέο οστού στην ομάδα PTG έναντι ομάδας ελέγχου.	PTG: φαίνεται να αποτελούν κατάλληλο υλικό για χρήση σε ανάπλαση οστικών ελλειμμάτων. Ο συνδυασμός PTG+CM έχει καλύτερα αποτελέσματα.
Dursun et al. 2015	Προοπτική κλινική split-mouth (n=18 ασθενείς)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου (n=36 άτομα)	1.PTG 2. XG	6 μήνες	Μικροτομογραφία	ΜΣΣ διαφορά στη δομή του αναπλασθέντος οστού μεταξύ των 2 ομάδων.	PTG & XG: παρόμοια συμπεριφορά στην ανύψωση εδάφους ιγμορείου.

Πίνακας 1.2 (συνέχεια δ) Μελέτες εφαρμογής των πορώδων κόκκων τιτανίου στην οδοντιατρική

Lee et al. 2015	Πειραματική (n=5 σκυλιά)	Ανάπλαση χειρουργικά προκληθέντων οστικών ελλειμμάτων γύρω από εμφυτεύματα (n=30 οστικά ελλείμματα)	Τυχαιοποίηση βλαβών σε 3 ομάδες: 1.PTG + CM 2.XG + CM 3.CM (ομάδα ελέγχου)	4 & 8 εβδομάδες	Ιστολογική & ιστομορφομετρική	ΣΣ μεγαλύτερο % οστικής πλήρωσης στις πειραματικές ομάδες έναντι ομάδας ελέγχου. ΣΣ μεγαλύτερη επαφή οστού-μοσχεύματος στην ομάδα XG έναντι ομάδας PTG.	Η τοποθέτηση οστικού μοσχεύματος επιτάχυνε την επούλωση των οστικών ελλειμμάτων. Το XG υπερέχει έναντι των PTG ως προς το ποσοστό επαφής οστού-κόκκων μοσχεύματος.
Lyngstadaas et al. 2015	Προοπτική πολυκεντρική κλινική (n=17 ασθενείς)	Ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου & τοποθέτηση εμφυτευμάτων (n=70 εμφυτεύματα)	PTG & ταυτόχρονη τοποθέτηση εμφυτευμάτων	12-42 μήνες	Ιστολογική & ιστομορφομετρική 6 μήνες μετά την ανύψωση (n=21), ακτινογραφική (πανοραμική και οπισθοφατνικές) τουλάχιστον 12 μήνες μετά τη φόρτιση (n=37)	Επιβίωση εμφυτευμάτων 98,6%. Μέση οστική απώλεια 0,5 mm και 0,8 mm εγγύς & άπω αντίστοιχα. Μέση αύξηση ύψους φατνιακής ακρολοφίας 6,5 mm. 16,6% νέο οστόν, 26,8% PTG.	PTG: αποτελεσματικοί σε ανοικτή ανύψωση εδάφους ιγμορείου με ταυτόχρονη τοποθέτηση εμφυτευμάτων.
Jepsen et al. 2016	Προοπτική τυχαιοποιημένη πολυκεντρική (n=66 ασθενείς)	Αντιμετώπιση περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών (n=66)	Τυχαιοποίηση σε 2 ομάδες: 1.PTG 2.Χωρίς μοσχευματικό υλικό (ομάδα ελέγχου)	12 μήνες	Κλινική & ακτινογραφική (οπισθοφατνιακές)	PTG: ΣΣ μεγαλύτερη ακτινογραφική ελάττωση διαστάσεων βλαβών. ΜΣΣ διαφορά σε βελτίωση κλινικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων.	Το όφελος από τη χρήση PTG για την ελάττωση των διαστάσεων των περιεμφυτευματικών ενδοοστικών βλαβών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

PTG: Πορώδεις κόκκοι τιτανίου (porous titanium granules), **WPTG:** Λευκοί πορώδεις κόκκοι τιτανίου (white porous titanium granules), **ELISA:** ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (enzyme-linked immunosorbent assay), **rt-PCR:** αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time polymerase chain reaction), **EDTA:** εθυλενδιαμινοτετραοξικό οξύ, **XG:** ξενομόσχευμα (xenograft), **CM:** μεμβράνη κολλαγόνου (collagen membrane), **ΣΣ:** στατιστικά σημαντικό/ά, **ΜΣΣ:** μη στατιστικά σημαντικό/ά

Το οστόν κατά τη διάπλαση και την ανάπτυξη

Κατά την εμβρυική καταβολή και τη διάπλαση του σκελετικού συστήματος λαμβάνουν χώρα δυο διακριτοί τύποι οστεογένεσης: η ενδοχόνδρια και η ενδομεμβρανώδης (Karaplis 2008).

Τα περισσότερα οστά του σκελετικού μας συστήματος αναπτύσσονται με τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεογένεσης. Σε αυτήν παρατηρείται αρχικά άθροιση αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων γύρω από ανάγγειες ζώνες κάτω από την επίδραση άγνωστων μέχρι σήμερα σημάτων. Τα κύτταρα στην κεντρική μοίρα των αθροίσεων σταδιακά διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα και εναποθέτουν θεμέλια ουσία που αποτελεί το πρόπλασμα του μελλοντικού οστού. Σημαντικό ρόλο για την αρχική αυτή συνάθροιση των κυττάρων φαίνεται να διαδραματίζει η αναστολή της αγγειογένεσης στην περιοχή (Feinberg et al. 1986). Στην περιφέρεια της θεμέλιας ουσίας διατηρείται η φυσιολογική αγγειοβρίθεια των ιστών και τα μεσεγχυματικά κύτταρα που βρίσκονται στη ζώνη αυτή υφίστανται αποπλάτυνση και βράχυνση και συνθέτουν το περίοστεο. Τα κύτταρα του περιοστέου επάγουν τη διαφοροποίηση των παρακείμενων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, οι οποίες συνθέτουν ένα αρχικό κέλυφος οστίτη ιστού το οποίο αργότερα θα αποτελέσει τη φλοιώδη μοίρα του. Παράλληλα τα χονδροκύτταρα που βρίσκονται στα πλέον κεντρικά τμήματα του προπλάσματος καθίστανται σταδιακά υπερτροφικά και μετάγουν σήματα που οδηγούν στην ενασβεστίωση της περιβάλλουσας θεμέλιας ουσίας, μετατρέποντάς τη σε χόνδρο. Βασικά γονίδια που εκφράζονται σε αυτό το στάδιο είναι το γονίδιο Col2a1 που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου II και το γονίδιο SOX9 που κωδικοποιεί διάφορες μορφές κολλαγόνου όπως οι τύποι II, IX και XI (Mori-Akiyama et al. 2003, Shibata et al. 2006). Καθώς η ενασβεστίωση εξελίσσεται,

τα χονδροκύτταρα παγιδεύονται στο εσωτερικό του χόνδρου και αποκομμένα πλέον από την αιματική κυκλοφορία υφίστανται απόπτωση. Παράλληλα, η έκφραση του γονιδίου SOX9 μειώνεται και την περίοδο αυτή στη θεμέλια ουσία επικρατούν άτυπες μορφές κολλαγόνου όπως το κολλαγόνο τύπου X (Iyama και συν. 1991). Την περιοχή αυτή εν συνεχεία καταλαμβάνουν εκβλαστήσεις του περιostίου οι οποίες περιέχουν αγγεία, λεμφαγγεία, νευρικά στοιχεία, μυελό των οστών, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες (Colnot et al. 2004). Οι οστεοκλάστες αποδομούν σταδιακά το χόνδρο και ακολουθεί εναπόθεση σπογγώδους οστίτη ιστού από τις οστεοβλάστες. Στο στάδιο αυτό το γονίδιο που εκφράζεται κατά κύριο λόγο είναι το RUNX2, το οποίο ενορχηστρώνει την έκφραση απαραίτητων γονιδίων για την ενασβεστίωση όπως είναι αυτό του κολλαγόνου τύπου I, της οστεοκαλσίνης και της οστεοποντίνης, γνωστή και ως σιαλοπρωτεΐνη του οστού (Ducy et al. 1997). Οι διαδικασίες αυτές του πολλαπλασιασμού, της υπερτροφίας, της απόπτωσης των χονδροκυττάρων και της αντικατάστασης του χόνδρου από οστίτη ιστό ελέγχονται από πληθώρα σηματοδοτικών μορίων, με τις μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού ((Bone morphogenetic proteins, BMPs), την πρωτεΐνη Indian Hedgehog (IHH) και την πρωτεΐνη που σχετίζεται με την παραθορμόνη (Parathyroid hormone related protein, PTHrP και PTHLH) να είναι κάποια από τα βασικότερα (Capdevila & Johnson 1998, Bitgood & McMahon 1995, Lanske et al. 1999).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης οι χονδροβλάστες που εντοπίζονται στα άκρα του χόνδρινου προπλάσματος συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ταχέως, απομακρύνοντας έτσι την επίφυση από τη διάφυση και οδηγώντας στην κατά μήκος αύξηση του οστού. Ταυτόχρονα παρατηρείται και αύξηση της διαμέτρου με εναπόθεση νέου συμπαγούς οστίτη ιστού με τη διαδικασία της ενδομεμβρανώδους οστεογένεσης. Με το πέρας της ανάπτυξης πραγματοποιείται η συνένωση της

επίφυσης με τη διάφυση. Στη συνέχεια το σκελετικό σύστημα συνεχίζει να υπόκειται δια βίου στη διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής.

Το μετωπιαίο, το βρεγματικό, το κροταφικό, το ινιακό οστόν, η κάτω γνάθος και η κλείδα αναπτύσσονται με το μηχανισμό της ενδομεμβρανώδους οστεογένεσης (Karaplis 2008). Ο μηχανισμός της ενδομεμβρανώδους οστεογένεσης έχει πολύ λιγότερο μελετηθεί σε σύγκριση με αυτόν της ενδοχόνδριας οστεογένεσης. Οι δύο τύποι οστεογένεσης ωστόσο φαίνεται να έχουν αρκετά κοινά στοιχεία, χωρίς βέβαια να απουσιάζουν και σημαντικές διαφορές (Eams & Helms 2004, Abzhanov et al. 2004).

Στην ενδομεμβρανώδη οστεογένεση παρατηρείται αρχικά συνάθροιση και πολλαπλασιασμός μεσεγχυματικών κυττάρων σε ανάγγειες περιοχές συνδετικού ιστού (Zernik et al. 1990). Τα μεσεγχυματικά αυτά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και εναποθέτουν οστεοειδές (Ting et al. 2009). Ακολουθεί η διείδυση αγγειακών στοιχείων στην περιοχή καθώς αρχίζει η ενασβεστίωση του οστεοειδούς και η εναπόθεση άωρου οστού. Ο αγγειοβριθής συνδετικός ιστός στην εξωτερική επιφάνεια του οστεοειδούς μετατρέπεται σε περίοστεο. Οι οστεοβλάστες που παγιδεύονται μέσα στην ενασβεστιωμένη πλέον θεμέλια ουσία μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Σταδιακά παρατηρείται πάχυνση των οστικών δοκίδων που βρίσκονται προς το περίοστεο και σχηματίζεται έτσι ένα οστέινο κέλυφος από συμπαγές οστόν. Το οστεοειδές σε πιο κεντρικά σημεία ενασβεστιώνεται και μετατρέπεται σε σπογγώδες οστόν. Το άωρο οστόν εν συνεχεία υπόκειται στη διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής, η οποία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης συμβάλλει σημαντικά στην ομαλή διαμόρφωση του σχήματος των οστών (Erben 1996).

Στην ενδομεμβρανώδη οστεογένεση κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η έκφραση του γονιδίου RUNX2. Σημαντικό ρόλο κατά τα στάδια της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων φαίνεται να παίζουν και τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σιαλοπρωτεΐνη του οστού 2 (Bone sialoprotein II, BSP II) και το κολλαγόνο τύπου II και τύπου IX. Επίσης, οι BMPs φαίνονται αναγκαίες για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς την κατεύθυνση των οστεοβλαστών, ενώ η πρωτεΐνη Indian Hedgehog (IHH) και αυτές που σχετίζονται με την παραθορμόνη (PTHrP, PTHLH) έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν αρνητικά τη διαφοροποίηση των προοστεοβλαστών σε οστεοβλάστες, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη της οστεοποίησης (Abzhanov et al. 2007).

Η διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής

Η οστική επαναπροσαρμογή είναι μία κυκλική διαδικασία ανανέωσης του σκελετικού συστήματος. Σε αυτή, ένα μέρος του οστού αρχικά απορροφάται και στη συνέχεια ακολουθεί η πλήρωση της κοιλότητας που προκύπτει από νεόπλαστο οστόν. Σε αντίθεση με αυτή τη διαδικασία, στην οποία υπάρχει σύζευξη μεταξύ της οστικής απορρόφησης και της οστικής εναπόθεσης, οι διαδικασίες αυτές δρουν ανεξάρτητα κατά τη φάση της διάπλασης του σκελετικού συστήματος. Ως εκ τούτου, η απορρόφηση και εναπόθεση οστού κατά την ανάπτυξη οδηγεί σε διαφοροποιήσεις ως προς το σχήμα και το μέγεθος των οστών, κάτι που φυσιολογικά δεν παρατηρείται μετά την ενηλικίωση (Erben 1996).

Οι διαδικασίες οστικής επαναπροσαρμογής λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα σε διαφορετικά σημεία του σκελετικού συστήματος. Βασικό στοιχείο της διαδικασίας αποτελούν οι αυτόνομες και προσωρινές δομές που απαντώνται στα σημεία

ανακατασκευής και ονομάζονται βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (Basic Multicellular Units, BMUs). Κάθε μονάδα περιλαμβάνει οστεοκλάστες, οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα, κύτταρα που διατάσσονται κατά μήκος της οστικής παρυφής και αγγεία.

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από μακροφάγα/μονοκύτταρα και φθάνουν στην περιοχή μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Για την ενεργοποίησή τους, διαδικασία γνωστή ως οστεοκλαστογένεση, απαραίτητη είναι η δράση του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων (M-CSF), ο οποίος προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους (Felix et al. 1994), καθώς και του προσδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα kappa B (RANKL) (Lacey et al. 2000). Ο τελευταίος εκφράζεται από τις οστεοβλάστες, τα T λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνδέεται με τον υποδοχέα RANK που εκφράζεται στους οστεοκλάστες. Σε κατάσταση ηρεμίας η σύνδεση RANK/RANKL αποτρέπει από την οστεοπροτεγερίνη, έναν διαλυτό ανταγωνιστικό αναστολέα του υποδοχέα RANK που παράγεται από τις οστεοβλάστες. Όταν διαταράσσεται ο λόγος RANKL/OPG εις βάρος της OPG ακολουθεί η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και η έναρξη της απορροφητικής διεργασίας (Mizuno et al. 1998).

Μετά το πέρας της οστικής απορρόφησης ακολουθεί η αναστροφή της διαδικασίας με την εναπόθεση νέου οστού. Η διαδικασία αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα σε σύγκριση με την οστική απορρόφηση (Eriksen et al. 1984). Κυρίαρχο ρόλο στη φάση αυτή διαδραματίζουν οι οστεοβλάστες, οι οποίες προέρχονται από πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης προς αυτή την κατεύθυνση (Dennis et al. 1999). Το σημαντικότερο σηματοδοτικό μονοπάτι για την ενεργοποίηση των οστεοβλαστών φαίνεται πως είναι το μονοπάτι Wnt- β κατενίνη, ενώ ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας- β (Transforming growth factor- β , TGF-

β) και οι BMPs φαίνεται να συμμετέχουν επίσης ενεργά στη διαδικασία (Behrens et al. 1996, Tachi et al. 2011). Ο ακριβής μηχανισμός της ενασβεστίωσης δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η αλκαλική φωσφατάση κατέχει κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία (Wennberg et al. 2000).

Τα οστεοκύτταρα έχουν επίσης ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής, δρώντας τόσο στους οστεοκλάστες όσο και στις οστεοβλάστες. Παρ' ότι βρίσκονται εγκλωβισμένα μέσα στα οστικά βοθρία επικοινωνούν με τις οστεοβλάστες στην επιφάνεια του οστού αλλά και μεταξύ τους με τη βοήθεια των κυτταροπλασματικών προσεκβολών τους που είναι πλούσιες σε κυτταροσκελετό ακτίνης (Tanaka-Kamioka et al. 1998). Τα οστεοκύτταρα φαίνεται πως λειτουργούν ως μηχανοποδοχείς των τάσεων που ασκούνται στο σκελετικό σύστημα. Τα οστεοκύτταρα που βρίσκονται κοντά σε περιοχές που έχουν υποστεί βλάβες λόγω μηχανικής φόρτισης ή κάποιας άλλης παθολογικής αιτίας υφίστανται απόπτωση. Στη συνέχεια ακολουθεί αυξημένη παραγωγή RANKL που οδηγεί σε οστεοκλαστογένεση και έναρξη της απορροφητικής διεργασίας (Tatsumi et al. 2007). Τα οστεοκύτταρα εκκρίνουν επίσης τη σκληροστίνη, αναστολέα της οστικής εναπόθεσης που δρα ανάλογα με τις εκάστοτε λειτουργικές απαιτήσεις. Η σκληροστίνη φαίνεται πως επιδρά τόσο στις οστεοβλάστες όσο και στους οστεοκλάστες (Li et al. 2005, Wijenayaka et al. 2011) και έχει ενοχοποιηθεί για την ατροφία που παρατηρείται στο σκελετικό σύστημα σε περιπτώσεις έλλειψης μηχανικής φόρτισης (Gaudio et al. 2010).

Η διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση από σειρά ενδοκρινικών και τοπικώς δρώντων παραγόντων. Μεταξύ αυτών έχει περιγραφεί η δράση της παραθορμόνης (Neer et al. 2001), των θυρεοειδικών ορμονών (Mundy et al. 1976), της βιταμίνης D (Gurlek & Kumar 2001), της

αυξητικής ορμόνης (Lim et al. 2015), της καλσιτονίνης (Kauther et al. 2011), των γλυκοκορτικοειδών (Bouvard et al. 2013), των ορμονών του φύλου (Riggs et al. 1998), των υποδοχέων ανίχνευσης ιόντων ασβεστίου που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης της παραθορμόνης και της βιταμίνης D (Kanatani et al. 1999), καθώς και πληθώρας άλλων τοπικά δρώντων παραγόντων.

Η σύζευξη της οστικής απορρόφησης με την εναπόθεση νέου οστού αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του σκελετικού συστήματος. Η πρώτη θεωρία που διατυπώθηκε σχετικά με το μηχανισμό αναστροφής από την οστική απορρόφηση στην εναπόθεση νέου οστού αφορούσε στη δράση παραγόντων που απελευθερώνονται από τη θεμέλια ουσία του οστού καθώς αυτή αποδομείται από τους οστεοκλάστες, όπως ο TGF- β και ο προσομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (insulin-like growth factor, IGF) (Howard et al. 1991). Άλλοι διαλυτοί παράγοντες που έχουν περιγραφεί αφορούν σε παράγοντες που εκκρίνονται από τους οστεοκλάστες, όπως ο S1P (Lotinun et al. 2013), παράγοντες που προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος ή παράγοντες που δρουν σε αυτά, όπως η ογκοστατίνη M (Walker et al. 2010), καθώς και μεμβρανικοί παράγοντες που δρουν εξ' επαφής όπως η εφρίνη B2 (Allan et al. 2008). Οι θεωρίες αυτές δεν μπορούν να εξηγήσουν επαρκώς τον τρόπο με τον οποίο κατά τη φάση της επαναπροσαρμογής εναποτίθεται ακριβώς ίση ποσότητα οστού με αυτή που αποδομήθηκε. Ένα άλλο πρόβλημα αφορά στο χρόνο ζωής των μορίων που εκκρίνονται, ο οποίος είναι κατά πολύ μικρότερος από το διάστημα που μεσολαβεί μέχρι να γίνει η αναστροφή από την απορρόφηση στην εναπόθεση. Ως αποτέλεσμα αυτού, έχει προταθεί επίσης μία «μηχανιστική» προσέγγιση για την εξήγηση του μηχανισμού σύζευξης. Σύμφωνα με αυτή, η οστική απορρόφηση προκαλεί μεταβολές στις τάσεις που ασκούνται από τις λειτουργικές δυνάμεις στο παρακείμενο οστόν και η φάση της επαναπροσαρμογής

ξεκινά και διαρκεί ώσπου οι τάσεις να εξομαλυνθούν (Smit & Burger 2000, Erben 2015).

Όπως έγινε αντιληπτό, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο διαμεσολαβείται η σύζευξη μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικής εναπόθεσης παραμένει αδιευκρίνιστος. Σε κάθε περίπτωση, η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οστικής απορρόφησης και εναπόθεσης οδηγεί στην εκδήλωση νόσων, όπως οι διάφορες μορφές οστεοπόρωσης, η νεφρική οστεοδυστροφία, η νόσος του Paget, η οστεοπέτρωση και η ραχίτιδα.

Επούλωση οστικών καταγμάτων

Το οστόν δύναται να επιδιορθώσει τυχόν βλάβες που υφίσταται με ανάπλαση. Την ιδιότητά του αυτή την οφείλει στο μηχανισμό οστικής επαναπροσαρμογής που λαμβάνει χώρα δια βίου μετά το πέρας της ανάπτυξης. Τα στάδια μέσω των οποίων πραγματοποιείται η ανάπλαση προσομοιάζουν πολύ με τα στάδια που περιγράψαμε κατά τη διάπλαση του σκελετικού συστήματος. Η εσωτερική επιφάνεια του περιόστεου (Muraio et al. 2013), τα αγγεία των αβέρσειων συστημάτων της φλοιώδους μοίρας του οστού (Matsumoto et al. 2006), τα κύτταρα του ενδόστεου (Colnot 2009) και αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα των περιβαλλόντων μαλακών ιστών (Lee et al. 2000) και του μυελού των οστών (Tavassoli & Crosby 1968) αποτελούν τις δυνητικές πηγές που τροφοδοτούν την περιοχή της βλάβης με κύτταρα που δύνανται να προάγουν την ανάπλαση. Ο μηχανισμός με τον οποίο θα επιτευχθεί εν τέλει η ανάπλαση εξαρτάται από τις μηχανικές συνθήκες κάτω από τις οποίες εξελίσσεται η επούλωση. Έτσι, το μέγεθος του κενού που καταλείπεται μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων και το μέγεθος των

δυνάμεων που ασκούνται σε συνδυασμό με τις μικροκινήσεις που καταγράφονται διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο (Goodship & Kenwright 1985, Epari et al. 2006, Claes et al. 1997).

Σε περιοχές που παρατηρείται κίνηση μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων η επούλωση εξελίσσεται με έναν συνδυασμό ενδοχόνδριας και ενδομεμβρανώδους οστεογένεσης (Epari et al. 2006). Το πρώτο στάδιο της επούλωσης περιλαμβάνει την ανάπτυξη φλεγμονής στην περιοχή της βλάβης. Σύντομα μετά το τραύμα η περιοχή καταλαμβάνεται από αίμα που προέρχεται από περιφερικά αγγεία και από τα αγγεία του μυελικού σωλήνα. Ακολουθεί η δημιουργία αιματικού θρόμβου και η απελευθέρωση από τα αιμοπετάλια TGFβ και αυξητικού παράγοντα προερχόμενου από τα αιμοπετάλια (PDGF) (Cho και συν. 2002, Andrew et al. 1995). Ο παράγοντας TGFβ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων και ο PDGF με τη σειρά του διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τόσο των μεσεγχυματικών κυττάρων όσο και των οστεοβλαστών και παράλληλα προάγει τη χημειοταξία των μακροφάγων. Σκοπός της αρχικής φλεγμονώδους απάντησης είναι η καταπολέμηση της λοίμωξης και η απομάκρυνση των νεκρωτικών ιστών από την περιοχή. Στο αιμάτωμα που δημιουργείται επικρατεί ισχαιμία, υποξία, χαμηλό Ph και υψηλές συγκεντρώσεις καλίου και γαλακτικού οξέος. Αυτές οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές για την επιβίωση των κυττάρων στην περιοχή. Οι συνθήκες υποξίας οδηγούν στη αύξηση τοπικά παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση και την οστεογένεση, συγκεκριμένα αυξάνεται ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1-α (HIF1-α), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και οι BMPs (Street et al. 2000, Valdimarsdottir et al. 2002, Groothuis et al. 2010, Raheja et al. 2011). Σταδιακά αυξάνονται οι συγκεντρώσεις και άλλων αυξητικών παραγόντων, όπως του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) και του IGF-1 οι οποίοι

ευνοούν επίσης τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση οστεοπρογονικών κυττάρων (Taniguchi et al. 2003, Schmid et al. 2010).

Η έντονη παρουσία αγγειακών στοιχείων, φλεγμονωδών κυττάρων και οστεοβλαστών στην περιοχή σηματοδοτούν τη μετατροπή του αρχικού αιματικού θρόμβου σε κοκκιώδη ιστό. Μονοπύρηνια φαγοκύτταρα, μακροφάγα και πολυμορφοπύρηνια γιγαντοκύτταρα φθάνουν μέσω της αιματικής κυκλοφορίας και αποδομούν το νεκρωτικό οστόν συνθέτοντας παράλληλα τον ινοχόδρινο μαλακό πόρο. Η παρουσία της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), των BMPs και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) επιτείνει τη φλεγμονώδη διήθηση στην περιοχή ενώ επιπρόσθετα οι παράγοντες αυτοί προσελκύουν αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από το περίοστεο, το μυελό των οστών, την περιφερική κυκλοφορία και τους περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς (Einhorn et al. 1995, Gerstenfeld et al. 2003, Cho et al. 2002). Ο κοκκιώδης ιστός στη συνέχεια μετατρέπεται σε συνδετικό ιστό, στον οποίο επικρατεί το κολλαγόνο τύπου III σε πιο προχωρημένα στάδια ωρίμανσης (Lane et al. 1986).

Το περίοστεο απαντά στο τραύμα με έντονο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της εσωτερικής στιβάδας του και τοπική πάχυνση. Κάτω από την επίδραση των αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που ήδη περιγράφηκαν, δημιουργείται σταδιακά ο εξωτερικός σκληρός πόρος. Πρόκειται για εναπόθεση χόνδρου στην περιφέρεια του οποίου εναποτίθεται ένα οστέινο κέλυφος άωρου οστού που βοηθά στη σταθεροποίηση της περιοχής κατά την επούλωση του κατάγματος. Παράλληλα, το περίοστεο αποτελεί τη βασική πηγή κυττάρων για τη δημιουργία του μαλακού πόρου στα κεντρικά σημεία του κατάγματος (Muraio et al. 2013). Στην περιοχή αυτή μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων ο συνδετικός ιστός μετατρέπεται σταδιακά σε μαλακό πόρο, ο οποίος στη συνέχεια ενασβεστιώνεται και ακολουθεί η

αντικατάστασή του από άωρο οστόν. Η βασική λειτουργία του πόρου συνίσταται στην ακινητοποίηση των κατεαγόντων τμημάτων ώστε να εξασφαλιστούν οι απαραίτητες συνθήκες για οστική ανάπλαση. Τα στάδια και οι διαδικασίες που μεσολαβούν στην περιοχή μέχρι την πλήρη ανάπλαση του οστού προσομοιάζουν με αυτά που ήδη περιγράφηκαν κατά τη διάπλαση του σκελετικού συστήματος (Ferguson et al. 1999).

Σε περιπτώσεις που εξασφαλίζεται ένα σταθερό περιβάλλον επούλωσης μέσω χειρουργικής σταθεροποίησης των κατεαγόντων τμημάτων η επούλωση του κατάγματος ακολουθεί το μηχανισμό της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης. Σε περιπτώσεις μάλιστα που τα κατεαγόντα τμήματα έχουν συμπλησιάσει πλήρως, παρατηρείται επούλωση εξ' επαφής. Σε αυτή την περίπτωση, οι οστεοκλάστες δημιουργούν μία πολύ στενή δίοδο κατά μήκος της γραμμής του κατάγματος μέσω της οποίας διεισδύουν στην περιοχή αγγειακά στοιχεία και οστεοβλάστες. Μία ακόμη πηγή οστεοπρογονικών κυττάρων σε αυτή την περίπτωση αποτελούν τα αβέρσεια συστήματα της συμπαγούς μοίρας. Ξεκινά έτσι αμέσως η διαδικασία της εναπόθεσης νέου οστού με οστικές δοκίδες παράλληλα διατεταγμένες με τον επιμήκη άξονα του οστού (Perren et al. 1969). Σε περιπτώσεις που μετά τη σταθεροποίηση παραμένει μικροκενό μεταξύ των κατεαγόντων τμημάτων που δεν ξεπερνά τα 0.2χιλ σε μέγεθος, τότε παρατηρείται ο μηχανισμός της άμεσης αποκατάστασης του οστού (direct bone repair). Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα οστεοπρογονικά κύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών, διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και εναποθέτουν πεταλιώδες οστόν του οποίου οι οστικές δοκίδες αρχικά διατάσσονται κάθετα στον επιμήκη άξονα του οστού. Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας της οστικής επαναπροσαρμογής, οι οστικές δοκίδες εναρμονίζονται με τον προσανατολισμό του επιμήκους άξονα (Olerud et al. 1968). Τέλος, σε περιπτώσεις όπου το κενό μεταξύ

των καλά σταθεροποιημένων κατεαγόντων τμημάτων ξεπερνά τα 0.2 χιλ παρατηρείται επούλωση με το μηχανισμό της εξ' αποστάσεως επούλωσης. Σε αυτή αρχικά εναποτίθεται άωρο οστόν, το οποίο στη συνέχεια ωριμάζει σε πεταλιώδες με δοκίδες κάθετες προς τον επιμήκη άξονα του οστού και στη συνέχεια οι οστικές δοκίδες παραλληλίζονται με αυτόν μέσω της διαδικασίας της οστικής επαναπροσαρμογής (Glimcher et al. 1980).

Δείκτες οστικού μεταβολισμού

Το οστόν είναι μεταβολικά ενεργός ιστός ο οποίος υπόκειται διαρκώς στη διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής. Όπως προαναφέρθηκε, η οστική απορρόφηση είναι αυστηρά συζευγμένη με την οστική εναπόθεση σε συνθήκες υγείας, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της ακεραιότητας του σκελετικού συστήματος. Σε ειδικές όμως καταστάσεις, που περιλαμβάνουν τη διαδικασία της ανάπτυξης, της γήρανσης, διάφορες μεταβολικές νόσους του οστού, ελλιπή ή υπερβολική κινητοποίηση και διάφορες κακοήθεις εξεργασίες των οστών παρατηρείται μεταβολή της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της εναπόθεσης ή της απορρόφησης οστού. Τόσο κατά τη φυσιολογική διαδικασία της οστικής επαναπροσαρμογής όσο και σε παθολογικές καταστάσεις ανιχνεύονται στο αίμα βιολογικοί παράγοντες που αντικατοπτρίζουν τη δυναμική του οστικού μεταβολισμού και αναφέρονται ως δείκτες οστικού μεταβολισμού. Οι δείκτες αυτοί διακρίνονται σε δείκτες οστικής απορρόφησης και δείκτες οστικής εναπόθεσης (Seibel 2005).

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο σήμερα για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της πορείας πληθώρας νόσων. Αυτές περιλαμβάνουν διάφορες παθήσεις των οστών, όπως τα οστεοσαρκώματα

(Shimose et al. 2014) και οι οστικές μεταστάσεις (Du et al. 2014), η ραχίτιδα (Taylor et al. 2010), η οστεομαλάκυνση (Chinoy et al. 2011), η σπονδυλοαρθρίτιδα (Kang et al. 2015), η νόσος Paget (Al Nofal et al. 2015), το πολλαπλούν μυέλωμα (Pecoraro et al. 2015) και η ατελής οστεογένεση (Cabral et al. 2007). Άλλες καταστάσεις που μπορεί να οδηγήσουν δευτεροπαθώς σε βλάβες του σκελετικού συστήματος και σε μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού αφορούν σε ενδοκρινικές διαταραχές όπως ο υπερθυρεοειδισμός (El Hadidy et al. 2011), ο υπερπεραθυρεοειδισμός (Guo et al. 1996), το σύνδρομο Cushing (Godang et al. 1999), οι διαδικασίες της φυσιολογικής γήρανσης (Funck-Brentano et al. 2011) και οι βλάβες των νεφρών (Lin et al. 1994). Διακυμάνσεις των δεικτών οστικού μεταβολισμού διαπιστώνονται επίσης και κατά τη διάρκεια της επούλωσης των οστικών καταγμάτων.

Δείκτες οστικής εναπόθεσης

Οι δείκτες οστικής εναπόθεσης είναι παράγωγα των οστεοβλαστών που εκφράζονται σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου της οστεοβλαστικής λειτουργίας και αντικατοπτρίζουν τα διάφορα στάδια της εναπόθεσης νέου οστού. Στους δείκτες οστικής εναπόθεσης ανήκουν η αλκαλική φωσφατάση, η οστεοκαλσίνη και το προπεπτίδιο αμινοτελικού/καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I.

Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase – ALP)

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μια υδροξυλάση του ορθοφωσφορικού εστέρος με δράση σε αλκαλικό pH. Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες σε διάφορους

ιστούς καταλύοντας την υδρόλυση των μονοφωσφορικών εστερικών ομάδων. Με την ηλεκτροφόρηση της αλκαλικής φωσφατάσης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός των ισοενζύμων της και είναι δυνατή η επιβεβαίωση της πηγής προέλευσής της. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 4 διαφορετικά γενετικά καθορισμένα ισοένζυμα. Τα τρία από αυτά εκφράζονται οργανοειδικά στο έντερο, τον πλακούντα και τους γαμέτες. Η τέταρτη μορφή είναι μη οργανοειδική και βρίσκεται σε αφθονία στα κύτταρα όλου του σώματος. Εκφράζεται όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, τους νεφρούς και το οστόν. Το τέταρτο αυτό ισοένζυμο προέρχεται από την έκφραση του ίδιου γονιδίου στο χρωμόσωμα 1 και οι διαφορετικές μορφές του διαφέρουν μόνο ως προς το επίπεδο μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (Langlois et al. 1994).

Στους ενήλικες με φυσιολογική ηπατική λειτουργία το 50% της ολικής αλκαλικής φωσφατάσης ορού προέρχεται από το ήπαρ και το υπόλοιπο 50% από το οστόν (Green et al. 1971). Στα παιδιά και τους εφήβους που βρίσκονται στην περίοδο της ανάπτυξης υπάρχει μία επιπρόσθετη συμβολή από τα οστά που φτάνει ως και το 90% της συνολικής αλκαλικής φωσφατάσης του ορού, γεγονός που αποτελεί την αιτία για τις μεγαλύτερες τιμές αναφοράς για τις ομάδες αυτές (Van Hoof et al. 1990). Ελάχιστες ποσότητες της συνολικής αλκαλικής φωσφατάσης ορού προέρχονται από το έντερο και σε περιόδους κυοφορίας και γαλουχίας ένα μέρος προέρχεται από τον πλακούντα και το μαστό.

Στα οστά, η αλκαλική φωσφατάση βρίσκεται στις οστεοβλάστες και συμβάλλει στην ομαλή οστεοποίηση και εναπόθεση του ασβεστίου. Η αύξηση του οστικού κλάσματος της αλκαλικής φωσφατάσης (Bone Specific Alkaline Phosphatase BALP) συσχετίζεται ευθέως με την οστεοβλαστική δραστηριότητα (van Straalen et al. 1991).

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των δύο κυριότερων ισομορφών της αλκαλικής φωσφατάσης ορού. Αυτές περιλαμβάνουν τη θερμική αδρανοποίηση, την ηλεκτροφόρηση, την καθίζηση και πιο πρόσφατα τις ανοσοενζυμικές μεθόδους (Farley et al. 1981, Rosalki & Foo 1984, Gomez et al. 1995). Οι τελευταίες παρέχουν τη δυνατότητα απλής και γρήγορης ποσοτικής μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας του κάθε ενζύμου, αν και υπάρχει διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ της ηπατικής και οστικής αλκαλικής φωσφατάσης σε ένα ποσοστό που φτάνει μέχρι 15-20% (Martin et al. 1997). Σε κάθε περίπτωση η μέτρηση του οστικού κλάσματος θεωρείται προτιμότερη λόγω της μεγαλύτερης ειδικότητας της δοκιμασίας (Farley et al. 1981).

Οστεοκαλσίνη (Osteocalcin – OSC/OS/OC)

Η οστεοκαλσίνη είναι μία μικρή μη κολλαγονική πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας των οστών που συντίθεται αποκλειστικά από τις οστεοβλάστες, τις οδοντοβλάστες και τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα (Ulrich et al. 1987). Η βιταμίνη Κ είναι απαραίτητη για την προσθήκη μιας δεύτερης γ- καρβοξυλικής ομάδας στην πλευρική αλυσίδα των γλουταμινικών υπολειμμάτων του μορίου της πρωτεΐνης. Η καρβοξυλιωμένη αυτή μορφή είναι και η ενεργός μορφή της οστεοκαλσίνης (Poser & Price 1979). Τα επίπεδα της ενεργού οστεοκαλσίνης συνεπώς επηρεάζονται από την επάρκεια της βιταμίνης Κ (Iwamoto et al. 2014). Το κύριο δομικό της χαρακτηριστικό είναι τα τρία κατάλοιπα καρβοξυγλουταμινικού οξέος που φέρει στο άκρο της τα οποία της προσδίδουν τη δυνατότητα να προσδένει ιόντα ασβεστίου. Η οστεοκαλσίνη μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά και με άλλα μόρια μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της, συμπεριλαμβανομένων επιφανειακών υποδοχέων. Αυτές

οι ιδιότητές της την καθιστούν ικανή να συμμετέχει στην οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Gundberg & Clough 1992).

Η ακριβής δράση της οστεοκαλσίνης παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη. Υποστηρίζεται ότι συμμετέχει στην ενασβεστίωση των οστών, στην ομοιοστασία του Ca, καθώς και στη χημειοταξία και τη στρατολόγηση των μακροφάγων που είναι υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση (Glowacki & Lian 1987, Heersche et al. 1992, Brown et al. 1984). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα με πειραματικά προκληθέντα γονιδιακό αποκλεισμό (knock-out experimental animals) ανέδειξαν φυσιολογική ή μάλιστα αυξημένη οστική εναπόθεση απουσία της δράσης της οστεοκαλσίνης (Ducy et al. 1984). Επομένως φαίνεται πως η οστεοκαλσίνη συμμετέχει στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού ως αρνητικός ρυθμιστικός παράγοντας.

Η οστεοκαλσίνη θεωρείται ειδικός δείκτης της οστεοβλαστικής λειτουργίας. Αμέσως μετά τη σύνθεσή της από τις οστεοβλάστες το μεγαλύτερό της μέρος ενσωματώνεται στο οστόν. Ένα μικρότερο μέρος απελευθερώνεται στην κυκλοφορία και ανιχνεύεται με τη χρήση ανοσοενζυμικών μεθόδων. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα οστεοκαλσίνης φαίνεται να έχουν καλή συσχέτιση με την οστική εναπόθεση, όπως αυτό επιβεβαιώνεται μέσα από μελέτες που περιλαμβάνουν και ιστομορφομετρική ανάλυση, καθώς και με τα επίπεδα άλλων δεικτών ενδεικτικών οστικών εναπόθεσης (Delmas et al. 1985, Eastell et al. 1988). Ωστόσο, η οστεοκαλσίνη στον ορό υφίσταται ταχεία αποδόμηση, με αποτέλεσμα στην κυκλοφορία να συνυπάρχουν τόσο το ακέραιο μόριο της οστεοκαλσίνης όσο και κλάσματα αυτής. Είναι επίσης πιθανό κάποια τμήματα του μορίου να ελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης. Η ετερογένεια στα κυκλοφορούντα μόρια οστεοκαλσίνης οδηγεί σε μειωμένη χρήση της πρωτεΐνης

αυτής ως δείκτη οστικού μεταβολισμού και διαφορετικές ανοσοενζυμικές διαδικασίες παράγουν αποτελέσματα με μεγάλες αποκλίσεις που συχνά δεν είναι συγκρίσιμα (Page et al. 1983, Fournier et al. 1989, Masters et al. 1994).

Για την ανίχνευση της οστεοκαλσίνης υπάρχουν διαθέσιμα ανοσοενζυμικά αντιδραστήρια τα οποία ανιχνεύουν το άθικτο μόριο. Εναλλακτικά, διατίθενται αντιδραστήρια που ανιχνεύουν τα προϊόντα αποδόμησης της οστεοκαλσίνης, που προκύπτουν από πρωτεολυτική διάσπαση του αρχικού μορίου. Με τον τρόπο αυτό αντιμετωπίζεται σε μεγάλο βαθμό η μικρή σταθερότητα του δείγματος μέχρι την ανάλυση. Και πάλι ωστόσο δεν ανιχνεύεται το σύνολο της κυκλοφορούσας οστεοκαλσίνης (Hellman et al. 1996).

Προπεπτίδιο Αμινοτελικού/Καρβοξυτελικού Άκρου Προκολλαγόνου Τύπου I (Procollagen Type I N/C Terminal Propeptide – PINP/PICP)

Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί την κυριότερη μορφή κολλαγόνου του οστού και συντίθεται από τις οστεοβλάστες σε μία πρόδρομη μορφή (Merry et al. 1976). Αμέσως μετά την έκκρισή του στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία το προκολλαγόνο υφίσταται ενζυματική αποκοπή του αμινοτελικού (PINP) και του καρβοξυτελικού άκρου του (PICP) (Fessler et al. 1975). Το μόριο του PICP σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς και απομακρύνεται από την κυκλοφορία κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος μέσω των υποδοχέων μαννόζης με χρόνο ημίσειας ζωής 6 έως 8 λεπτά (Smedsrød et al. 1990). Το μόριο του PINP είναι πλούσιο σε προλίνη και υδροξυπρολίνη και απομακρύνεται από την κυκλοφορία κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος μέσω των εκκαθαριστικών υποδοχέων (scavenger receptors) μόλις σε 3 λεπτά (Melkko et al. 1994). Και τα δύο άκρα του μορίου του

προκολλαγόνου απελευθερώνονται στην κυκλοφορία σε αναλογία 1:1 με το νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο. Ως εκ τούτου αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια την ποσότητα του κολλαγόνου τύπου I που παράγεται. Αν και το κολλαγόνο τύπου I συντίθεται και σε άλλους εξωσκελετικούς ιστούς, η συμβολή των υπόλοιπων ιστών στη συγκέντρωση του προκολλαγόνου τύπου I στον ορό είναι ελάχιστη.

Υπάρχουν διαθέσιμα αντιδραστήρια για την ανίχνευση και των δύο τύπων προκολλαγόνου με ανοσοενζυμικές μεθόδους (Tähtelä et al. 1997). Μεταξύ των δύο, το PINP θεωρείται μεγαλύτερης διαγνωστικής αξίας (Ebert & συν. 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ένας αυτοσωμικός επικρατών τύπος κληρονομικότητας που σχετίζεται με ιδιαίτερα αυξημένες τιμές PICP. Στην κατάσταση αυτή οι τιμές των υπολοίπων δεικτών οστικού μετασχηματισμού δε φαίνεται να επηρεάζονται (Sorva et al. 1994).

Δείκτες οστικής απορρόφησης

Στους δείκτες οστικής απορρόφησης ανήκουν η υδροξυπρολίνη, η υδροξυλυσίνη, οι διασταυρούμενες διασυνδέσεις πυριδινίου, συγκεκριμένα η πυριδινολίνη και η δεοξυπυριδινολίνη, τα αμινοτελικά/καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I, η οστική σιαλοπρωτεΐνη, η οστεοποντίνη, η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση και η καθεψίνη K.

Υδροξυπρολίνη (Hydroxyproline - HYP)

Η υδροξυπρολίνη συντίθεται ενδοκυττάρια κατά την μετα-μεταφραστική υδροξυλίωση της προλίνης και αποτελεί το 12-14% της αλληλουχίας του ώριμου

μορίου του κολλαγόνου. Το 90% της υδροξυπρολίνης που απελευθερώνεται κατά την οστική απορρόφηση μεταβολίζεται στο ήπαρ. Ακολούθως απεκκρίνεται στα ούρα, όπου μπορεί να ανιχνευθεί ως ελεύθερη ή συνδεδεμένη με πεπτίδια υδροξυπρολίνη με χρωματομετρικές και ραδιοανοσομετρικές μεθόδους (Lowry et al. 1985). Κατά τη μέτρηση πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι τα επίπεδά της επηρεάζονται από τη λήψη πλούσιας σε κολλαγόνο τροφής (Bettica et al. 1992). Η υδροξυπρολίνη αποτελεί μη ειδικό δείκτη οστικής απορρόφησης καθώς μέρος της προέρχεται από τον καταβολισμό κολλαγόνου δερματικής ή άλλης προέλευσης ή από την αποδόμηση νεοσυντιθέντος κολλαγόνου (Nusgens & Lapiere 1973).

Υδροξυλυσίνη (Hydroxylysine - Hyl)

Η υδροξυλυσίνη παράγεται κατά τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του κολλαγόνου και απαντάται σε δύο μορφές: γλυκόσυλ-γαλακτόσυλ-υδροξυλυσίνη (GGHL) και γαλακτόσυλ-υδροξυλυσίνη (GHL) (Cunningham et al. 1967). Και οι δύο μορφές απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μετά την αποδόμηση του κολλαγόνου και μπορούν να μετρηθούν στα ούρα με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, ενώ υπάρχουν διαθέσιμες και ανοσοενζυμικές μέθοδοι (Bettica et al. 1992). Η GGHL συναντάται και στο κολλαγόνο δερματικής προέλευσης, σε αντίθεση με την GHL που είναι πιο ειδική για το οστόν.

Διασταυρούμενες Διασυνδέσεις Πυριδινίου: Πυριδινολίνη & Δεοξυπυριδινολίνη (3-Hydroxy Pyridinium Crosslinks of Collagen: Pyridinoline & Deoxypyridinoline - PYD & DPD)

Οι διασταυρούμενες διασυνδέσεις πυριδινίου περιλαμβάνουν την πυριδινολίνη (PYD) και την δεοξυπυριδινολίνη (DPD). Τα μόρια PYD και DPD δημιουργούνται κατά την εξωκυττάρια ωρίμανση των ινιδίων κολλαγόνου. Πιο συγκεκριμένα οι αλυσίδες τριών μορίων τροποκολλαγόνου συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν δαχτύλιο πυριδίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία δεσμών πυριδινόλης. Πρόκειται για διασταυρούμενες διασυνδέσεις μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου που σταθεροποιούν το μόριο κολλαγόνου. Οι δεσμοί αυτοί εμφανίζονται με δύο χημικές μορφές: της PYD για το σχηματισμό της οποίας συμμετέχουν τρία μόρια υδροξυλυσίνης, και της DPD για το σχηματισμό της οποίας συμμετέχουν δύο μόρια υδροξυλυσίνης και ένα μόριο λυσίνης (Fujimoto et al. 1978). Οι μορφές αυτές αντανακλούν πιθανώς τη μετα-μεταφραστική ετερογένεια αναφορικά με το βαθμό υδροξυλίωσης των υπολειμμάτων λυσίνης στα σημεία που δημιουργούνται σταθεροποιητικοί δεσμοί.

Η αναλογία PYD/DPD στη θεμέλια ουσία του οστού είναι 2:3. Κατά την οστική απορρόφηση οι διασυνδέσεις διασπώνται πρωτεολυτικά και τα τμήματά τους απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και απεκκρίνονται αναλλοίωτα στα ούρα. Τα επίπεδά τους στο αίμα και στα ούρα δεν επηρεάζονται από την αποδόμηση νεοδημιουργηθέντος κολλαγόνου αλλά αντικατοπτρίζουν μόνο την αποδόμηση ώριμου κολλαγόνου. Το PYD ανευρίσκεται στο χόνδρο, στα οστά, στους συνδέσμους και τα αγγεία. Το DPD απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στο οστούν και στα δόντια. Το οστούν έχει πολύ υψηλότερο ρυθμό ανακατασκευής από τους υπόλοιπους ιστούς.

Ως εκ τούτου, τα επίπεδα και των δύο μορίων στο αίμα και στα ούρα θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν με καλή ακρίβεια τον ρυθμό οστικής απορρόφησης, χωρίς να επηρεάζονται από εξωγενείς παράγοντες, όπως η λήψη τροφής (Colwell et al. 1993). Για τον προσδιορισμό των επιπέδων τους χρησιμοποιείται η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία καθώς και ανοσοενζυμικές μέθοδοι με καλά αποτελέσματα (Pratt et al. 1992, Krabben et al. 2013).

Αμινοτελικά/Καρβοξυτελικά Διασταυρούμενα Τελοπεπτίδια Κολλαγόνου Τύπου I (Aminoterminal/Carboxyterminal Cross-linked Telopeptides of Collagen Type I - NTX-I & CTX-I)

Τα διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I αποτελούν τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα του μορίου του κολλαγόνου, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία μετά την αποδόμησή του. Πρόκειται για μια αλληλουχία οχτώ αμινοξέων που βρίσκονται στα άκρα της αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου I κοντά στο σημείο σύνδεσης με τις πυριδινόλες αλλά είναι ανεξάρτητα από αυτές (Hanson et al. 1992, Bonde et al. 1994).

Τα διαθέσιμα αντιδραστήρια για την ανίχνευση των διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων με ανοσοενζυμική μέθοδο αναγνωρίζουν το καρβοξυτελικό άκρο της αλυσίδας α1 που περιέχει έναν ισοασπαρτυλικό πεπτιδικό δεσμό (βCTX) (Bonde et al. 1994). Ο δεσμός αυτός θεωρείται ότι δημιουργείται με την ωρίμανση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Fledelius et al. 1997). Παράλληλα, υπάρχει διαθέσιμο αντιδραστήριο για την εντόπιση του μη ισομερισμένου οκταπεπτιδίου στα ούρα (αCTX) (Bonde et al. 1996). Η ταυτόχρονη μέτρηση και των δύο επιτρέπει τον υπολογισμό του λόγου αCTX:βCTX ο οποίος αποτελεί δείκτη του

ρυθμού οστικού μεταβολισμού (Garnero et al. 1997). Εκτός από τον ισομερισμό, κάποιες πρωτεΐνες υπόκεινται επίσης σε αδρανοποίηση ορισμένων καταλοίπων τους. Και οι δύο διαδικασίες θεωρούνται προϊόν της γήρανσης καθώς τόσο ο ισομερισμός όσο και η αδρανοποίηση αυξάνονται με το χρόνο που μεσολαβεί από τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης. Υπάρχουν διαθέσιμα και αντιδραστήρια για την ανίχνευση των αντίστοιχων αδρανοποιημένων μορφών με αμφίβολη όμως κλινική χρησιμότητα (Cloos & Fledelius 2000).

Παραλλαγή της CTX αποτελεί η ανίχνευση του καρβοξυτελικού πεπτιδίου ICTP. Ο αντιγονικός καθοριστής για τα διαθέσιμα αντισώματα περιλαμβάνει μια τρισθενή διασταυρούμενη διασύνδεση και δύο περιοχές πλούσιες σε φαινυλαλανίνη στην τελική περιοχή της αλυσίδας α1 (Risteli et al.1991). Τα αντισώματα για το πεπτίδιο ICTP φαίνεται να αντιδρούν με προϊόντα αποδόμησης κολλαγόνου τύπου I που προέρχονται και από εξωσκελετικούς ιστούς, όχι όμως δερματικής προέλευσης.

Παρομοίως διατίθεται αντιδραστήριο για την ανίχνευση του αμινοτελικού οκταπεπτιδίου της α2 αλυσίδας κολλαγόνου τύπου I (Hanson et al. 1992). Τα αντισώματα αυτά ωστόσο φαίνεται να αντιδρούν με πληθώρα διασταυρούμενων διασυνδέσεων που εντοπίζονται και σε προϊόντα αποδόμησης κολλαγόνου τύπου I δερματικής προέλευσης.

Οστική Σιαλοπρωτεΐνη & Οστεοποντίνη (Bone Sialoprotein & Osteopontin – BSP & OPN)

Η οστική σιαλοπρωτεΐνη (BSP) και η οστεοποντίνη (OPN) ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών SIBLING (Small Integrin Binding N-Linked Glycoproteins). Πρόκειται για μια ομάδα μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών της

εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, τα γονίδια των οποίων εδράζονται στο χρωμόσωμα 4 (Young et al. 1990, Kerr et al. 1993). Και οι δύο πρωτεΐνες διαθέτουν μια μακρά αλληλουχία όξινων αμινοξέων που τους επιτρέπει την πρόσδεση στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Διαθέτουν επίσης την ικανότητα να προσδένονται σε επιφανειακούς υποδοχείς διαφόρων κυττάρων, όπως ο υποδοχέας Η του συμπληρώματος (Fedarko et al. 2000) και ο υποδοχέας CD44 (Weber et al. 1996). Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και των περιβαλλόντων κυττάρων. Τέλος κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αργινίνης – γλυκίνης – ασπαραγινικού (RGD) η οποία αναγνωρίζεται από της ιντεγκρίνες και κυρίως από την ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ (Ross et al. 1993). Και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται από τις οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα αν και ο ακριβής τους ρόλος στη διαδικασία της οστικής διάπλασης και ανάπλασης παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος (Sodek et al. 1995, Zohar et al. 1997, Landis et al. 2003).

Η οστική σιαλοπρωτεΐνη είναι πλούσια σε γλουταμικό οξύ και είναι αρκετά ειδική για το οστόν (Fisher et al. 1990, Bianco et al. 1991). Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν αναδείξει τη σημασία της για την οστική εναπόθεση κατά τη διάρκεια της διάπλασης του σκελετικού συστήματος (Chen et al. 1992). Σημαντικό ρόλο επίσης φαίνεται να διαδραματίζει στη διαδικασία της οστικής απορρόφησης κατά τη διάρκεια της οστικής επαναπροσαρμογής (Ross et al. 1993). Η οστική σιαλοπρωτεΐνη ανιχνεύεται στον ορό με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών και ραδιοενζυμικών μεθόδων και τα επίπεδά της έχει βρεθεί ότι αντανakλούν το ρυθμό οστικής απορρόφησης (Seibel et al. 1996).

Η οστεοποντίνη είναι πλούσια σε ασπαρτικό οξύ και εκτός από το οστόν εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα

(Young et al. 1990). Η κύρια δράση της φαίνεται να συνίσταται σε αναστολή της ενασβεστίωσης (Boskey et al. 2002). Τα επίπεδά της στον ορό προσδιορίζονται με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων και έχει βρεθεί ότι αντανακλούν το ρυθμό οστικής απορρόφησης (Iwadata et al. 2013).

Παρά το γεγονός ότι και οι δύο παράγοντες φαίνεται να αποτελούν δείκτες οστικής απορρόφησης, τόσο η οστεοποντίνη όσο και η σιαλοπρωτεΐνη του οστού έχουν μελετηθεί κυρίως ως καρκινικοί δείκτες. Ως εκ τούτου, τα δεδομένα που αφορούν στη συγκέντρωσή τους ως δείκτες οστικής επαναπροσαρμογής είναι ελλιπή.

Ανθεκτική στο Άλας του Τρυγικού Οξέος Όξινη Φωσφατάση (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase –TRAP)

Η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP) είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των όξινων φωσφατασών και περιλαμβάνει τουλάχιστον 5 διαφορετικές ισομορφές (TRAP1-5). Οι ισομορφές αυτές εκφράζονται από ποικίλα κύτταρα και ιστούς, όπως ο σπλήνας, το οστόν, τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα. Όλες οι ισομορφές, εκτός από την TRAP5 εξουδετερώνονται από το άλας του τρυγικού οξέος. Η TRAP5 διακρίνεται επίσης σε δύο διαφορετικούς υπότυπους (TRAP5a, TRAP5b), οι οποίοι έχουν διαχωριστεί μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση (Lam et al. 1981). Οι δύο αυτοί υπότυποι είναι αντιγονικά και δομικά πανομοιότυποι. Ωστόσο, η TRAP5b είναι πλούσια σε σιαλικό οξύ και εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα σε pH 5.5-6.0 (Lam et al. 1978). Ο υπότυπος 5b φαίνεται πως είναι ειδικός για τους οστεοκλάστες. Αντίθετα η προέλευση της TRAP5a δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, αν και πιθανή πηγή θεωρούνται τα κυψελιδικά μακροφάγα των πνευμόνων (Lam & Desnick 1982).

Κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης οι οστεοκλάστες ενδοκυτταρώνουν τα προϊόντα αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας του οστού τα οποία απελευθερώνονται ακολούθως από την ειδική εκκριτική περιοχή στη βασική μεμβράνη (Salo et al. 1997). Κατά την πορεία τους εντός των οστεοκλαστών τα κυστίδια ενδοκυττάρωσης συντήκονται με κυστίδια που περιέχουν TRAP5b. Ο ρόλος του ενζύμου πιθανώς έγκειται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες αποδομούν περαιτέρω τα προϊόντα αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας του οστού (Halleen et al. 1999). Η έκκριση του ενζύμου μαζί με τα προϊόντα αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας συνεπάγεται ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα του ενζύμου πρέπει να συσχετίζονται με τα κυκλοφορούντα επίπεδα αποδόμησης του κολλαγόνου. Πράγματι, η συσχέτιση αυτή έχει επαληθευτεί, καθιστώντας την TRAP5b έναν δυναμικό δείκτη οστικής απορρόφησης (Scheven et al. 1997).

Η TRAP απελευθερώνεται ως ενεργό ένζυμο στον ορό. Στη συνέχεια απενεργοποιείται και χάνει την περιεκτικότητά της σε σίδηρο. Ακολούθως, υδρολύεται από πρωτεάσες και διασπάται σε μικρότερα τμήματα τα οποία μεταβολίζονται στον ορό και απεκκρίνονται στα ούρα. Έχει δειχτεί ότι το 90% της κυκλοφορούσας TRAP5b περιλαμβάνει ανενεργά τμήματα. Ως εκ τούτου, η μέτρηση μόνο του ακέραιου ενεργού μορίου αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της πλέον πρόσφατης οστεοκλαστικής δραστηριότητας τη στιγμή της αιμοληψίας (Halleen et al. 2000).

Καθεψίνη K (Kathepsin K)

Η Καθεψίνη K είναι πρωτεολυτικό ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των κυστεϊνικών πρωτεασών. Ανευρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις κατά μήκος των βοθρίων απορρόφησης καθώς και σε ενδοπλασματικά έγκλειστα ώριμων ενεργών

οστεοκλαστών. Στα λυσοσώματα το ένζυμο ανευρίσκεται σε μία πρόδρομη μορφή και ενεργοποιείται μέσω μιας διαδικασίας αυτοκατάλυσης (Dodds et al. 2001). Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών μελετών αναδεικνύουν το ρόλο της στην εξωκυττάρια αποδόμηση του κολλαγόνου κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης (Goto et al. 2003). Είναι επίσης πιθανό να συμμετέχει στην περαιτέρω αποδόμηση των διασπασμένων οργανικών καταλοίπων που ακολουθεί την ενδοκυττάρωσή τους με έναν μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε για την TRAP5b (Yamaza et al. 1998). Η ενεργός μορφή του ενζύμου στην κυκλοφορία βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό συνδεδεμένη με τον ενδογενή αναστολέα της, την κυστατίνη C (Lecaille et al. 2007). Επίσης, μέρος του κυκλοφορούντος ενζύμου στον ορό διασπάται από άλλες πρωτεάσες, όπως η καθεψίνη S (Barry & Platt 2012).

Ο ρόλος της καθεψίνης K αναδείχθηκε μέσα από μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα. Σε αυτές η έλλειψη της έκφρασης του γονιδίου οδήγησε σε φαινότυπο συμβατό με πυκνοδυσόστωση (Saftig et al. 1998). Στοιχεία από κλινικές μελέτες επίσης δείχνουν μεταβολές των επιπέδων της καθεψίνης K στον ορό σε έδαφος μεταβολικών νόσων του οστού, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία της ως δείκτη οστικής απορρόφησης, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα ομόφωνα (Meier et al. 2006). Αντίστοιχα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η χορήγηση αναστολέων του ενζύμου μειώνει το ρυθμό οστικής απορρόφησης (Kumar et al. 2007). Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη ωστόσο στην οποία ανιχνεύτηκε με ανοσοενζυμικές μεθόδους μόνο το ενεργό κλάσμα της καθεψίνης K στον ορό, η συγκέντρωσή της δε βρέθηκε να αντανakλά το ρυθμό της οστικής απορρόφησης (Sun et al. 2013).

Μεταβολή δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων

Πληθώρα μελετητών έχουν διερευνήσει τη μεταβολή των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό και στα ούρα ασθενών κατά τη διάρκεια επούλωσης οστικών καταγμάτων. Τα στοιχεία των μελετών που θα συζητηθούν στην πορεία αναγράφονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.3**. Οι τιμές στους περισσότερους από τους δείκτες οστικού μεταβολισμού έχουν βρεθεί να μεταβάλλονται κατά το διάστημα αυτό, πιθανώς αντανakλώντας τις υποκείμενες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε ιστολογικό επίπεδο στην περιοχή του τραυματισμού. Πρώτοι σε σειρά φαίνεται να αυξάνονται οι δείκτες οστικής απορρόφησης σύντομα μετά την οστική βλάβη, αύξηση που πιθανώς αντανakλά την απορρόφηση του νεκρωτικού ιστού στα όρια της βλάβης. Στη συνέχεια ακολουθεί η αύξηση των δεικτών οστικής εναπόθεσης, καθώς σε ιστολογικό επίπεδο ξεκινά και η διεργασία της αποκατάστασης της βλάβης (Ohishi κα συν. 1993, Emami et al. 1999). Οι τιμές των δεικτών οστικού μεταβολισμού συχνά παραμένουν τροποποιημένες για μακρά διαστήματα, πέραν της αποκατάστασης του οστικού κατάγματος με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια (Obrant αι συν. 2005). Το φαινόμενο αυτό πιθανώς αντανakλά τη μακρά διεργασία της οστικής επαναπροσαρμογής κατά την οποία το άωρο οστόν ωριμάζει και καθίσταται ικανό να ανταπεξέλθει στις λειτουργικές απαιτήσεις φόρτισης. Οι ασθενείς με οστεοπόρωση φαίνεται να εμφανίζουν διαφορετική απάντηση στο τραύμα, γεγονός που πιθανώς καθιστά τα αποτελέσματα μελετών που αφορούν σε οστεοπορωτικά κατάγματα μη συγκρίσιμα με αυτά άλλων μελετών (Yu-Yahiro et al. 2001, Wöfl et al. 2014). Διαφορετική απάντηση επίσης φαίνεται να εγείρεται και μετά από κατάγματα διαφορετικής εντόπισης (Nakagawa et al. 2006, Stoffel et al. 2007) καθώς

και ανάλογα με τον τρόπο αντιμετώπισής τους (Lotz et al. 1999), στοιχείο που δυσχεραίνει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών μελετών.

Η αλκαλική φωσφατάση, τόσο η ολική όσο και η ειδική για το οστόν (ALP και BALP, αντίστοιχα) αποτελεί έναν από τους πλέον μελετημένους δείκτες οστικού μεταβολισμού κατά τη διάρκεια επούλωσης οστικών καταγμάτων. Οι Southwood και συν. παρακολούθησαν την επούλωση κατά τη διάρκεια των πρώτων 4 μηνών σε πειραματικά προκληθέντα κατάγματα ισχίων σε 32 κουνέλια. Τα κουνέλια ταξινομήθηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες: στην πρώτη ομάδα εξασφαλίστηκε η παρεμπόδιση της ομαλής επούλωσης με αποκλεισμό της γονιδιακής έκφρασης των μορφογενετικών πρωτεϊνών του οστού, στη δεύτερη ομάδα προκλήθηκε επιπρόσθετα λοίμωξη του τραύματος με σταφυλόκοκκο, στην τρίτη ομάδα προκλήθηκε μόνο λοίμωξη με σταφυλόκοκκο και τέλος, στην ομάδα ελέγχου το κάταγμα αφέθηκε να επουλωθεί χωρίς παρέμβαση. Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC) και της πυριδινολίνης (PYD) στον ορό πριν από την πρόκληση των καταγμάτων καθώς και στις 4, 8, 12, και 16 εβδομάδες μετά το κάταγμα. Στην ομάδα ελέγχου η BALP παρουσίασε πτώση των επιπέδων της κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες της επούλωσης και στη συνέχεια αυξήθηκε μέχρι τις 8 εβδομάδες. Στο διάστημα που ακολούθησε παρατηρήθηκε εκ νέου πτώση των επιπέδων της στον ορό (Southwood et al. 2003).

Οι Komnenou και συν. πραγματοποίησαν πειραματική μελέτη σε 83 σκυλιά τα οποία προσκομίστηκαν σε πανεπιστημιακή κτηνιατρική κλινική με κατάγματα στη διάφυση μακρών οστών. Τα κατάγματα αντιμετωπίστηκαν με χειρουργική ανάταξη. Η διακύμανση της συγκέντρωσης της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό του αίματος εκτιμήθηκε πριν από την επέμβαση καθώς και στις 10, 20 και 30 ημέρες μετά και ακολούθως ανά μήνα μέχρι να επιτευχθεί πλήρης επούλωση ή να τεκμηριωθεί η

απουσία πόρωσης των καταγμάτων με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια. Ανάλογα με την έκβαση της επούλωσης των καταγμάτων τα σκυλιά ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα παρατηρήθηκε πλήρης επούλωση εντός δύο μηνών (n=35), στη δεύτερη ομάδα παρατηρήθηκε δημιουργία υπερτροφικού πόρου και πλήρης επούλωση μεταξύ τριών και πέντε μηνών (n=36) και στην τρίτη ομάδα η επούλωση εξελίχθηκε ιδιαίτερα αργά και συνοδευόταν από αποτυχία πόρωσης του κατάγματος στους δύο μήνες (n=12). Σε αυτή τη μελέτη στην ομάδα όπου η επούλωση εξελίχθηκε φυσιολογικά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ALP στον ορό τη 10^η ημέρα. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων της σε κάθε χρονική στιγμή αξιολόγησης μέχρι τους δύο μήνες (Komnenou et al. 2005).

Η διακύμανση των επιπέδων της ALP στον ορό έχει περιγραφεί και μέσα από μία σειρά κλινικών μελετών. Οι Wölfel και συν. σε μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων παρακολούθησαν την επούλωση καταγμάτων στη μετάφυση βραχιόνιου, μηριαίου και κερκιδικού οστού σε 30 ασθενείς. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την οστική πυκνότητα και οι δύο ομάδες εμφάνιζαν μεταξύ τους ατομική κατά ζεύγη αντιστοιχία με εξομοίωση ως προς την ηλικία, το φύλο, την εντόπιση και το είδος του κατάγματος καθώς και τη μέθοδο χειρουργικής ανάταξης που επιλέχθηκε. Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (CTX) και της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP) στον ορό το επόμενο πρωί μετά το κάταγμα καθώς και την 1^η, 4^η, και 8^η εβδομάδα μετά. Στην ομάδα με φυσιολογική οστική πυκνότητα η BALP παρουσίασε πτώση την 1^η εβδομάδα, στη συνέχεια άνοδο την 4^η εβδομάδα και μικρή πτώση την 8^η εβδομάδα (Wölfel et al. 2014).

Ο Kurdy παρακολούθησε την πορεία επούλωσης κατά τη διάρκεια 20 εβδομάδων σε 20 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), των προπεπτιδίων καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PICP) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (ICTP) στον ορό την 1^η, 4^η και 8^η ημέρα καθώς και 5, 10, 14 και 20 εβδομάδες μετά το κάταγμα. Η BALP παρουσίασε πτώση την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια τα επίπεδά της έβαιναν αυξανόμενα τις επόμενες εβδομάδες για όλο το διάστημα παρακολούθησης (Kurdy 2000).

Οι Herrmann και συν. παρακολούθησαν την πορεία επούλωσης καταγμάτων του μηριαίου οστού σε 14 ασθενείς με διάρκεια παρακολούθησης ένα έτος. Οι ερευνητές προσδιόρισαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (β -CTX) στον ορό των ασθενών την 1^η ημέρα μετά το κάταγμα και ακολούθως στις 1, 2, 4, 6, 8, 12, 25 και 52 εβδομάδες. Οι δέκα ασθενείς παρουσίασαν ομαλή επούλωση του κατάγματος, ενώ στους υπόλοιπους τέσσερις η επούλωση κρίθηκε καθυστερημένη με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια. Η BALP στους ασθενείς με φυσιολογική επούλωση παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας, έφτασε σε μέγιστα επίπεδα στις 6 με 12 εβδομάδες και μετά ακολούθησε σταδιακή πτώση μέχρι τα αρχικά επίπεδα (Herrmann et al. 2002).

Οι Emami και συν. πραγματοποίησαν τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη για την αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής υπερήχων κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων. Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 30 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Τρεις ημέρες μετά από τη χειρουργική ανάταξη στην πειραματική ομάδα

εφαρμόστηκε θεραπεία με υπερήχους διάρκειας 75 ημερών. Οι ερευνητές αξιολόγησαν τα επίπεδα της οστεοκαλσίνης (OC), της αλκαλικής φωσφατάσης ειδικής για το οστόν (BALP) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (CTX-I) την ημέρα του κατάγματος, την 1^η μετεγχειρητική ημέρα καθώς και στις 1, 4, 7, 10, 13, 16, 26, 52 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκαν 7 περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια. Η εφαρμογή υπερήχων δε φάνηκε να έχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκβαση της επούλωσης. Τα επίπεδα της BALP εμφάνισαν στατιστικά σημαντική άνοδο μέχρι την 13^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή πτώση. Ωστόσο η συγκέντρωση του δείκτη παρέμεινε στατιστικά σημαντικά αυξημένη μέχρι το ένα έτος σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά του δείκτη μεταξύ πειραματικής ομάδας και ομάδας ελέγχου δεν καταγράφηκαν (Emami et al. 1999).

Οι Singh και συν. παρακολούθησαν την επούλωση καταγμάτων κνήμης και μηριαίου οστού σε 95 ασθενείς ηλικίας 18-45 ετών. Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης ορού (ALP) στις 1, 7, 14, 28, 42, 60 και 90 ημέρες, ενώ η τελική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε κατά τη διαπίστωση ολοκλήρωσης της επούλωσης με κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια ή εναλλακτικά στους 6 μήνες. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την έκβαση της επούλωσης. Στην ομάδα της φυσιολογικής επούλωσης (n=69) παρατηρήθηκε πλήρης αποκατάσταση εντός έξι μηνών, στην ομάδα της καθυστερημένης επούλωσης (n=18) παρατηρήθηκε αποκατάσταση της περιοχής μεταξύ 6 και 9 μηνών, ενώ στην ομάδα της αποτυχίας επούλωσης (n=8) η αποκατάσταση δεν επιτεύχθηκε μέχρι τους 9 μήνες. Στην ομάδα της φυσιολογικής επούλωσης παρατηρήθηκε αύξηση της ALP από τη 2^η εβδομάδα, η οποία έφτασε σε μέγιστα επίπεδα την 3^η εβδομάδα μετά τον

τραυματισμό και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή επαναφορά στα αρχικά επίπεδα μέχρι τη χρονική στιγμή της πλήρους επούλωσης εντός 6 μηνών (Singh et al. 2013).

Οι Moghaddam και συν. πραγματοποίησαν μελέτη ασθενών – μαρτύρων με 30 ασθενείς οι οποίοι επιλέχθηκαν από ένα δείγμα 248 ασθενών με κατάγματα μακρών οστών. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την έκβαση της επούλωσης και εμφάνιζαν ατομική κατά ζεύγη αντιστοιχία με εξομοίωση ως προς το φύλο, την ηλικία, τον τύπο, την εντόπιση και τον τρόπο αντιμετώπισης του κατάγματος, το δείκτη μάζας σώματος και τις καπνιστικές συνήθειες. Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b), των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (βCTX), των προπεπτιδίων αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP) και της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP) στον ορό την 3^η ημέρα του κατάγματος και ακολούθως την 1^η, 2^η, 4^η, 8^η, 12^η και 52^η εβδομάδα. Ως φυσιολογικές τιμές των δεικτών θεωρήθηκαν οι τιμές των 12 μηνών. Η BALP εμφάνισε πτώση την 1^η εβδομάδα και σταδιακή αύξηση από τη 2^η εβδομάδα ως το ένα έτος (Moghaddam et al. 2011).

Οι Veitch και συν. πραγματοποίησαν κλινική μελέτη με 18 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκαν οι μεταβολές των επιπέδων της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC), των προπεπτιδίων αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (βCTX) στον ορό. Η αρχική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε εντός 2 ημερών από το κάταγμα και ακολούθως στις 3 και 7 ημέρες και στις 2, 4, 8, 12, 16 και 24 εβδομάδες. Η BALP παρουσίασε απότομη αύξηση τις πρώτες 4 εβδομάδες και ακολούθησε μικρότερη αλλά συνεχής αύξηση μέχρι τις 24 εβδομάδες (Veitch et al. 2006).

Οι Yu-Yahiro και συν. πραγματοποίησαν κλινική μελέτη με 205 γυναίκες ηλικίας άνω των 65 ετών με κατάγματα στο μηριαίο οστόν. Ανάλογα με την οστική πυκνότητα οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε ομάδα υψηλής, μέτριας και χαμηλής οστικής πυκνότητας. Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC) και των προπεπτιδίων καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PICP) ορού, καθώς και της δεοξυπυριδινολίνης (DPD) ούρων στις 3, 10, 60, 180 και 365 ημέρες μετά το κάταγμα. Η BALP παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στις 10 και στις 60 ημέρες και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική πτώση ως το ένα έτος. Η ομάδα με τη χαμηλή οστική πυκνότητα εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές BALP σε όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την 3^η και 180^η ημέρα (Yu-Yahiro et al. 2001).

Οι Habermann και συν. παρακολούθησαν τα επίπεδα της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC), της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (βCTX) στον ορό σε 17 ασθενείς μετά από επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής ισχίου. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε προεγχειρητικά και στις 2, 3, 6, 8, 12, 16 και 26 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Η BALP παρουσίασε στατιστικά σημαντική πτώση την 1^η εβδομάδα και ακολούθησε συνεχής αύξηση μέχρι τις 26 εβδομάδες (Habermann et al. 2007).

Οι Stoffel και συν. πραγματοποίησαν κλινική μελέτη με 20 ασθενείς με κατάγματα κνήμης και αστραγάλου. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η συγκέντρωση της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b), των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (ICTP), της

ειδικής για το οστούν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP), της οστεοκαλσίνης (OC) και των προπεπτιδίων καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PICP) στον ορό την 1^η, 3^η και 7^η ημέρα και ακολούθως στις 2, 6, 12 και 24 εβδομάδες μετά το κάταγμα. Η συγκέντρωση της BALP παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση την 3^η ημέρα και στη συνέχεια ακολούθησε συνεχής αύξηση και στους δύο τύπους καταγμάτων (Stoffel et al. 2007).

Η οστεοκαλσίνη (OC) αποτελεί επίσης έναν ευρέως μελετημένο δείκτη οστικής εναπόθεσης κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων. Οι Southwood και συν. στην πειραματική τους μελέτη σε κουνέλια βρήκαν διακύμανση των επιπέδων της OC ανάλογη με αυτή που περιέγραψαν για την ALP. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων της κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες και στη συνέχεια η συγκέντρωσή της αυξήθηκε μέχρι τις 8 εβδομάδες. Στο διάστημα που ακολούθησε παρατηρήθηκε εκ νέου πτώση των επιπέδων της στον ορό (Southwood et al. 2003). Παρομοίως, οι Herrmann και συν. σε κλινική μελέτη με 14 ασθενείς με κατάγματα μηριαίου διαπίστωσαν ότι η OC στην ομάδα των ασθενών με φυσιολογική επούλωση παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της από την 4^η εβδομάδα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στους 2 μήνες και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή πτώση μέχρι τα αρχικά επίπεδα (Herrmann et al. 2002). Αντίθετα, οι Emami και συν. σε τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη με 30 ασθενείς διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση της OC εμφάνισε στατιστικά σημαντική πτώση την 3^η ημέρα και ακολούθως στατιστικά σημαντική άνοδο από την 1^η εβδομάδα, με μέγιστα επίπεδα τον 4^ο μήνα. Τα επίπεδά της παρέμειναν στατιστικά σημαντικά αυξημένα μέχρι και ένα έτος μετά σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές. Σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ της πειραματικής ομάδας στην οποία εφαρμόστηκε θεραπεία με υπερήχους

κατά τη διάρκεια της επούλωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Emami et al. 1999). Οι Veitch και συν. σε κλινική μελέτη με 18 ασθενείς με κατάγματα κνήμης διαπίστωσαν μικρή σταδιακή αύξηση της OC μέχρι τις 24 εβδομάδες, χωρίς τα επίπεδά της να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τις αρχικές τιμές του δείκτη που καταγράφηκαν την 1^η ημέρα του κατάγματος (Veitch et al. 2006). Οι Yu-Yahiro και συν. σε κλινική μελέτη με 205 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη στις 60 ημέρες και παραμονή σε υψηλά επίπεδα για όλο το διάστημα παρακολούθησης που έφτασε ως το ένα έτος. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της OC ανάμεσα στις ομάδες διαφορετικής οστικής πυκνότητας (Yu-Yahiro et al. 2001). Οι Habermann και συν. σε κλινική μελέτη με 17 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική ισχίου παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση της OC στις 16 εβδομάδες και στη συνέχεια σταδιακή πτώση της έως τα αρχικά επίπεδα (Habermann et al. 2007). Τέλος οι Stoffel και συν. σε κλινική μελέτη με 10 ασθενείς με κατάγματα αστραγάλου παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση της OC την 3^η ημέρα και στη συνέχεια ακολούθησε μικρή περαιτέρω αύξηση. Τη 14^η ημέρα η τιμή του δείκτη είχε επιστρέψει σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντιθέτως, σε 8 ασθενείς με κατάγματα κνήμης που συμπεριλήφθηκαν επίσης σε αυτή τη μελέτη και εμφάνισαν φυσιολογική επούλωση η τιμή της OC έβαινε διαρκώς αυξανόμενη ως το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης (Stoffel et al. 2007).

Οι μεταβολές της συγκέντρωσης των προπεπτιδίων αμινοτελικού/καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP και PICP αντίστοιχα) έχουν επίσης μελετηθεί ως δείκτες οστικής εναπόθεσης κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων. Οι Moghaddam και συν. σε κλινική μελέτη ασθενών-μαρτύρων με 30 ασθενείς παρατήρησαν απότομη μείωση στη συγκέντρωση

των PINP την 1^η εβδομάδα και σταδιακή αύξηση από τη 2^η, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή την 4^η εβδομάδα. Στη συνέχεια ο δείκτης παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια των τεσσάρων πρώτων μηνών (Moghaddam et al. 2011). Οι Veitch και συν. σε 18 ασθενείς με κατάγματα κνήμης παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση των PINP έφτασε σε μέγιστη τιμή στις 12 εβδομάδες και παρέμεινε σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές μέχρι τις 24 εβδομάδες (Veitch et al. 2006). Οι Yu-Yahiro και συν. σε κλινική μελέτη με 205 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των PICP στις 10 ημέρες και μετά σταδιακή πτώση ως τα αρχικά επίπεδα στις 180 ημέρες. Σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του δείκτη μεταξύ των ομάδων διαφορετικής οστικής πυκνότητας (Yu-Yahiro et al. 2001). Οι Stoffel και συν. σε 20 ασθενείς με κατάγματα κνήμης και αστραγάλου παρατήρησαν στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των PICP την 3^η ημέρα μετά το κάταγμα και στη συνέχεια ακολούθησε συνεχής αύξηση των επιπέδων του δείκτη και στους δύο τύπους καταγμάτων (Stoffel et al. 2007). Οι Joerring και συν. πραγματοποίησαν κλινική μελέτη με 24 ασθενείς οι οποίοι έφεραν κατάγματα στη διάφυση ή στον κόνδυλο της κνήμης. Αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των προπεπτιδίων καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PICP) και των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (ICTP) στον ορό στις 2 και 4 ημέρες μετά το κάταγμα καθώς και στις 1, 2, 6, 12, 18 και 26 εβδομάδες. Στα κατάγματα στη διάφυση της κνήμης η συγκέντρωση των PICP παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση από την 1^η εβδομάδα, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στις 2 εβδομάδες. Σε κατάγματα στον κόνδυλο της κνήμης οι τιμές των PICP ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στις 2 και 6 εβδομάδες. Οι Lotz και συν. παρακολούθησαν τις μεταβολές των επιπέδων των καρβοξυτελικών

διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (ICTP) και των προπεπτιδίων καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PICP) στον ορό κατά τις 3 πρώτες εβδομάδες μετά από αποκατάσταση καταγμάτων αστραγάλου και μηριαίου καθώς και από επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής. Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 54 ασθενείς, εκ των οποίων οι 12 έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα και υπεβλήθησαν σε επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου, οι 13 έπασχαν από κάταγμα μηριαίου το οποίο αποκαταστάθηκε με μερική αρθροπλαστική ισχίου, οι 12 έπασχαν από κάταγμα μηριαίου το οποίο αντιμετωπίστηκε με ήλωση και οι 17 έπασχαν από κάταγμα αστραγάλου το οποίο αντιμετωπίστηκε με οστεοσύνθεση. Η συγκέντρωση των PICP παρουσίασε αύξηση κατά τις πρώτες εβδομάδες μετεγχειρητικά σε όλες τις ομάδες. Στην ομάδα της οστεοσύνθεσης σε κατάγματα αστραγάλου οι διαφορές δεν έφτασαν όμως σε επίπεδα στατιστικά σημαντικά (Lotz et al. 1999).

Σε μελέτες επούλωσης οστικών καταγμάτων έχει διερευνηθεί και η πιθανή διακύμανση της συγκέντρωσης των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (CTX-I και ICTP). Οι Wöflf και συν. σε κλινική μελέτη ασθενών-μαρτύρων με 30 ασθενείς και διάρκεια παρακολούθησης 8 εβδομάδων παρατήρησαν σταδιακή αύξηση των επιπέδων των βCTX κατά το διάστημα αυτό (Wöflf et al. 2014). Οι Emami και συν. σε τυχαίοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη με 30 ασθενείς με κατάγματα κνήμης παρατήρησαν ότι τα επίπεδα των βCTX στον ορό αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μέχρι την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια εμφάνισαν πτώση έως τα αρχικά επίπεδα τη 16^η εβδομάδα. Την 1^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα στην πειραματική ομάδα στην οποία εφαρμόστηκε θεραπεία με υπερήχους κατά τη διάρκεια της επούλωσης (Emami συν. 2009). Οι Moghaddam και συν. σε μελέτη

ασθενών-μαρτύρων με 30 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών παρατήρησαν ότι στην ομάδα της φυσιολογική επούλωσης (n=15) η συγκέντρωση των βCTX αυξήθηκε μέχρι την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια παρουσίασε σταδιακή πτώση μέχρι τα φυσιολογικά επίπεδα στους 6 μήνες (Moghaddam et al. 2011). Οι Veitch και συν. σε κλινική μελέτη με 18 ασθενείς με κατάγματα κνήμης περιέγραψαν πτώση στην τιμή των επιπέδων των βCTX τις πρώτες τρεις μέρες μετά το κάταγμα και στη συνέχεια έντονη αύξηση μέχρι τις 2 πρώτες εβδομάδες. Τα επίπεδα παρέμειναν σταθερά αυξημένα σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές για το διάστημα παρακολούθησης των έξι μηνών, αν και παρουσίασαν μικρή σταδιακή πτωτική τάση μετά τις 8 εβδομάδες (Veitch et al. 2006). Οι Habermann και συν. σε κλινική μελέτη με 17 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου παρατήρησαν ότι τα επίπεδα των βCTX εμφάνισαν μικρές μόνο διακυμάνσεις κατά το διάστημα παρακολούθησης των έξι μηνών. Η μέγιστη συγκέντρωση του δείκτη καταγράφηκε στις τρεις εβδομάδες μετά την επέμβαση (Habermann et al. 2007). Οι Joerring και συν. σε κλινική μελέτη με 24 ασθενείς με κατάγματα κνήμης διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ICTP στις 4 ημέρες, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στις 2 εβδομάδες όταν το κάταγμα εντοπιζόταν στη διάφυση της κνήμης. Παρομοίως, σε περιπτώσεις καταγμάτων στον κόνδυλο της κνήμης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη στις 4 μέρες και στη 1 εβδομάδα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στις 2 εβδομάδες. Οι μεταβολές των επιπέδων των ICTP ήταν παράλληλες και στους δύο τύπους καταγμάτων και οι τιμές επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τις 6 εβδομάδες (Joerring et al. 1994). Οι Lotz και συν. σε κλινική μελέτη με 54 ασθενείς διαπίστωσαν αύξηση των επιπέδων των ICTP στον ορό κατά το διάστημα παρακολούθησης των τριών πρώτων εβδομάδων σε όλες τις ομάδες των ασθενών εκτός από τους ασθενείς

με κατάγματα αστραγάλου που αντιμετωπίστηκαν με οστεοσύνθεση. Σε αυτή την ομάδα η συγκέντρωση των ICTP δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές κατά το διάστημα παρακολούθησης (Lotz et al. 1999). Οι Stoffel και συν. σε κλινική μελέτη με 10 ασθενείς με κατάγματα αστραγάλου περιέγραψαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των ICTP από την 3^η ημέρα φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στις 6 εβδομάδες. Σε 10 ακόμη ασθενείς με κατάγματα κνήμης παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 3^η και την 7^η ημέρα με μέγιστα επίπεδα και πάλι στις 6 εβδομάδες (Stoffel et al. 2007).

Ένας ακόμα δείκτης οστικής απορρόφησης που έχει μελετηθεί κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων είναι η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP5b). Οι Wölfel και συν. σε κλινική μελέτη με 30 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων της TRAP5b την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν σε σταθερά αυξημένα επίπεδα για το διάστημα παρακολούθησης των 8 πρώτων εβδομάδων (Wölfel et al. 2014). Οι Moghaddam και συν. σε μελέτη με 15 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών που εμφάνισαν φυσιολογική επούλωση περιέγραψαν μικρή πτώση των επιπέδων της TRAP5b την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση με μέγιστα επίπεδα στις 4 εβδομάδες. Ακολούθησε εκ νέου σταδιακή πτώση των επιπέδων του δείκτη έως τα φυσιολογικά επίπεδα στους 4 μήνες (Moghaddam et al. 2011). Οι Habermann και συν. σε κλινική μελέτη με 17 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου παρατήρησαν ότι τα επίπεδα της TRAP5b αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στις 2 εβδομάδες, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στις 6 εβδομάδες και στη συνέχεια σημειώθηκε σταδιακή πτώση σε επίπεδα μικρότερα από τα αρχικά έως τους 6 μήνες (Habermann et al. 2007). Οι Stoffel και συν. σε κλινική μελέτη με 10 ασθενείς με κατάγματα αστραγάλου περιέγραψαν

στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της TRAP5b από την 3^η ημέρα φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα σε 7 ημέρες. Σε 10 ακόμη ασθενείς με κατάγματα κνήμης παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων της TRAP5b από την 3^η ημέρα με μέγιστα επίπεδα στις 2 εβδομάδες (Stoffel et al. 2007).

Τέλος, δύο ακόμα δείκτες οστικής απορρόφησης που έχουν μελετηθεί κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων είναι η δεοξυπυριδινολίνη (DPD) και η πυριδινολίνη (PYR). Οι Southwood και συν. σε πειραματική μελέτη σε κουνέλια διαπίστωσαν αύξηση της συγκέντρωσης της PYR κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες στην ομάδα ελέγχου, στην οποία η επούλωση των καταγμάτων κνήμης αφέθηκε να εξελιχθεί ομαλά. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων του δείκτη κατά το υπόλοιπο διάστημα παρακολούθησης που έφτασε τους 4 μήνες (Southwood et al. 2003). Οι Yu-Yahiro και συν. σε κλινική μελέτη με 205 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με κατάγματα μηριαίου οστού διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της DPD στα ούρα σε ασθενείς με μέτρια ή υψηλή οστική πυκνότητα παρουσίασαν μικρές μόνο μεταβολές κατά το πρώτο έτος μετά το κάταγμα και ήπια μη στατιστικά σημαντική αύξηση σημειώθηκε στις 10 και 60 ημέρες. Στην ομάδα χαμηλής οστικής πυκνότητας παρατηρήθηκε όμως απότομη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη στους 6 μήνες (Yu-Yahiro et al. 2001).

Τα αποτελέσματα των μελετών που περιγράφηκαν αναγράφονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.4**.

Πίνακας 1.3. Μελέτες μεταβολών στα επίπεδα δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων

Μελέτη	Είδος μελέτης	Κάταγμα	Ομάδες	Χρονικές στιγμές αξιολόγησης	Δείκτες
Oni et al. 1989	Κλινική (n=50 ασθενείς)	Κνήμη	Παρακολούθηση επιπέδων ALP: 1.Φυσιολογική επούλωση (n=41) 2. Καθυστερημένη επούλωση (n=9) Παρακολούθηση επιπέδων OC: 1. Φυσιολογική επούλωση (n=7) 2.Καθυστερημένη επούλωση (n=7)	1 ^η ημέρα, ανά εβδομάδα μέχρι τις 20 εβδομάδες για BALP (n=50) 1 ^η ημέρα, 4, 8, 12 & 16 εβδομάδες για OC (n=14)	ALP OC
Joerring et al. 1994	Κλινική (n=24 ασθενείς)	Κνήμη	I.Διάφυση κνήμης (n=16) I ₁ .Αντιμετώπιση με γύψο (n=12) I _{1a} .Φυσιολογική επούλωση (n=6) I _{1b} .Καθυστερημένη επούλωση (n=6) I ₂ .Αντιμετώπιση με ενδομυελική ήλωση (n=4) II.Κόνδυλος κνήμης (n=8)	2 & 4 ημέρες, 1, 2, 6, 12, 18 & 26 εβδομάδες	PICP ICTP
Lotz et al. 1998	Κλινική (n=54 ασθενείς)	Κεφαλή μηριαίου (n=25), αστράγαλος (n=17), ισχίο (n=12)	1.Ολική αρθροπλαστική ισχίου (n=12) 2. Μερική αρθροπλαστική ισχίου (n=13) 3. Ήλωση ισχίου (n=12) 4. Οστεοσύνθεση αστραγάλου (n=17)	Προεγχειρητικά, 1,2 & 3 εβδομάδες	PICP ICTP
Emami et al. 1999	Τυχοιοποιημένη διπλή τυφλή Κλινική (n=30 ασθενείς)	Κνήμη	I.Πειραματική ομάδα: εφαρμογή υπερήχων (n=15) I ₁ .Φυσιολογική επούλωση (n=10) I ₂ .Καθυστερημένη επούλωση (n=5) II.Ομάδα ελέγχου: εφαρμογή εικονικής θεραπείας (n=15) II ₁ .Φυσιολογική επούλωση (n=13) II ₂ .Καθυστερημένη επούλωση (n=2)	1 & 3 ημέρες, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 26 & 52 εβδομάδες	OC BALP βCTX
Kurdy 2000	Κλινική (n=20 ασθενείς)	Κνήμη	1.Φυσιολογική επούλωση (n=17) 2.Αποτυχία πόρωσης (n=3)	1, 4 & 8 ημέρες, 5, 10, 14 & 20 εβδομάδες	BALP, PICP ICTP
Yu-Yahiro et al. 2001	Κλινική (n=205 ασθενείς)	Μηριαίο	1.Υψηλή οστική πυκνότητα (n=24) 2.Μέτρια οστική πυκνότητα (n=35) 3.Χαμηλή οστική πυκνότητα (n=13)	3, 10, 60, 180, 365 ημέρες. Ένα μικρό μέρος των ασθενών είχε εξεταστεί κάθε χρονική στιγμή και όχι οι ίδιοι κάθε φορά	BALP OC PICP DPD

Πίνακας 1.3 (συνέχεια) Μελέτες μεταβολών στα επίπεδα δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων

Herrmann et al. 2002	14 ασθενείς	Μηριαίο	1.Φυσιολογική επούλωση (n=10) 2.Καθυστερημένη επούλωση (n=4)	1 ημέρα, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 25 & 52 εβδομάδες	OC BALP βCTX
Southwood et al. 2003	Πειραματική (32=κουνέλια)	Μηριαίο	1.Αποκλεισμός γονιδιακής έκφρασης BMP (n=8) 2.Αποκλεισμός γονιδιακής έκφρασης BMP&λοίμωξη με σταφυλόκοκκο (n=8) 3.Λοίμωξη με σταφυλόκοκκο (n=8) 4.Ομάδα ελέγχου (n=8)	Αρχικά, 4,8,12,&16 εβδομάδες	OC BALP PYR
Komnenou et al. 2005	Πειραματική (83=σκυλιά)	Διάφυση μακρών οστών	1.Πλήρης επούλωση εντός 2 μηνών (n=35) 2.Υπερτροφικός πόρος και πλήρης επούλωση στους 3-5μήνες (n=36) 3.Απουσία πόρωσης στους 2 μήνες (n=12)	10, 20 & 30 μέρες & μετά ανά μήνα στην ομάδα 2	ALP
Veitch et al. 2006	Κλινική (n=18 ασθενείς)	Κνήμη	1.Αντιμετώπιση με γύψο (n=10) 2.Αντιμετώπιση με ενδομυελική ήλωση (n=8)	Εντός 2 ημερών, 3 και 7 ημέρες, 2, 4, 8, 12, 16 και 24 εβδομάδες.	BALP OC PINP βCTX
Habermann et al. 2007	Κλινική (n=17 ασθενείς)	Ισχίο	Ολική αθροπλαστική ισχίου (n=17)	Προεγχειρητικά, 2, 3, 6, 8, 12, 16 & 26 εβδομάδες μετεγχειρητικά	BALP OC TRAP5b, βCTX
Stoffel et al. 2007	Κλινική (n=20 ασθενείς)	Κνήμη, αστραγάλος	I.κατάγματα κνήμης (n=10) I ₁ .Επούλωση στις 12 εβδομάδες (n=5) I ₂ .Επούλωση στις 24 εβδομάδες (n=3) I ₃ . Αποτυχία επούλωσης (n=2) II.Κατάγματα αστράγαλου (n=10) Επούλωση εντός 6 εβδομάδων (n=10)	1, 3 & 7 ημέρες, 2, 6, 12 & 24 εβδομάδες.	TRAP5b ICTP BALP OC PICP
Moghaddam et al. 2011	Κλινική ασθενών-μαρτύρων (n=30 ασθενείς)	Κνήμη, βραχιόνιο, αντιβράχιο, μηριαίο	1.Φυσιολογική επούλωση (n=15) 2.Αποτυχία επούλωσης (n=15) Εξομοίωση ως προς φύλο, ηλικία, τύπο, εντόπιση & τρόπο αντιμετώπισης του κατάγματος, δείκτη μάζας σώματος & κάπνισμα	3 ημέρες, 1, 2, 4, 8, 12 & 52 εβδομάδες. Ως φυσιολογικές θεωρήθηκαν οι τιμές των 12 μηνών.	TRAP5b βCTX PINP BALP
Singh et al. 2013	Κλινική (n=95 ασθενείς)	Κνήμη, μηριαίο	1.Επιτυχής επούλωση μέχρι τους 6 μήνες (n=69) 2.Επούλωση μεταξύ 6 και 9 μηνών (n=18) 3.Αποτυχία επούλωσης μέχρι τους 9 μήνες (n=8).	1,7,14,28,42,60 & 90 ημέρες, στην ολοκλήρωση επούλωσης (κλινικά & ακτινογραφικά) ή σε 6μήνες	ALP
Wölfl et al. 2014	Κλινική ασθενών-μαρτύρων (n=30)	Βραχιόνιο, μηριαίο, κερκίδα	1.Υψηλή οστική πυκνότητα (n=15) 2.Χαμηλή οστική πυκνότητα (n=15) Εξομοίωση 1:1 για ηλικία, φύλο, είδος κατάγματος, μέθοδο ανάταξης	1 ημέρα, 1, 4 & 8 εβδομάδες	BALP βCTX TRAP5b

Πίνακας 1.4. Μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων

Δείκτης	Συγγραφείς, έτος	Μεταβολές δείκτη
BALP	Emami et al. 1999	Μέγιστη συγκέντρωση στις 10-16 εβδομάδες σε κατάγματα κνήμης
	Kurdy 2000	Πτώση την 1 ^η εβδομάδα και σταδιακή αύξηση μέχρι τις 20 εβδομάδες
	Yu-Yahiro et al. 2001	ΣΣ αύξηση στις 10 και στις 60 ημέρες και στη συνέχεια ΜΣΣ πτώση. ΣΣ μεγαλύτερες τιμές σε χαμηλή οστική πυκνότητα εκτός από την 3 ^η και 180 ^η ημέρα
	Herrmann et al. 2002	Σε φυσιολογική επούλωση ΣΣ αύξηση μεταξύ 4 ^{ης} και 6 ^{ης} εβδομάδας, μέγιστα επίπεδα στις 6 με 12 εβδομάδες και μετά σταδιακή πτώση
	Southwood et al. 2003	Σε φυσιολογική επούλωση πτώση μέχρι την 4 ^η εβδομάδα, άνοδο μέχρι την 8 ^η και εκ νέου πτώση από τη 12 ^η εβδομάδα
	Komnenou et al. 2005	Σε φυσιολογική επούλωση ΣΣ αύξηση στις 10 ημέρες και ΣΣ πτώση ανά χρονική στιγμή μέχρι τους 2 μήνες
	Veitch et al. 2006	Απότομη αύξηση τις πρώτες 4 εβδομάδες και συνεχής αύξηση μέχρι τις 24 εβδομάδες
	Habermann et al. 2007	ΣΣ πτώση την 1 ^η εβδομάδα και συνεχής αύξηση μέχρι τις 26 εβδομάδες
	Stoffel et al. 2007	ΣΣ μείωση την 3 ^η ημέρα και μετά συνεχής αύξηση. ΣΣ μεγαλύτερη σε κατάγματα κνήμης σε σύγκριση με κατάγματα αστραγάλου
	Moghaddam et al. 2011	Πτώση την 1 ^η εβδομάδα και σταδιακή αύξηση από τη 2 ^η εβδομάδα έως το 1 έτος
	Singh et al. 2013	Σε φυσιολογική επούλωση αύξηση από τη 2 ^η εβδομάδα, μέγιστα επίπεδα μέχρι την 3 ^η και επαναφορά στις αρχικές τιμές μέσα στο 6μηνο, παράλληλα με την επίτευξη πλήρους επούλωσης
Wöfl et al. 2014	Σε φυσιολογική οστική πυκνότητα πτώση την 1 ^η εβδομάδα, άνοδος στις 4 εβδομάδες και μικρή πτώση στις 8 εβδομάδες	
OC	Emami et al. 1999	ΣΣ πτώση την 3 ^η ημέρα, ΣΣ άνοδο από την 1 ^η εβδομάδα. Μέγιστη συγκέντρωση στις 10-16 εβδομάδες. ΣΣ μεγαλύτερη από αρχικές τιμές στο ένα έτος.
	Yu-Yahiro et al. 2001	ΣΣ αύξηση στις 60 ημέρες και παραμονή σε υψηλά επίπεδα. ΜΣΣ μεγαλύτερες τιμές σε χαμηλή οστική πυκνότητα
	Herrmann et al. 2002	Σε φυσιολογική επούλωση αύξηση από την 4 ^η εβδομάδα, μέγιστα επίπεδα στους 2 μήνες και μετά πτώση σταδιακά
	Southwood et al. 2003	Πτώση μέχρι την 4 ^η εβδομάδα, άνοδο μέχρι την 8 ^η και εκ νέου πτώση από τη 12 ^η εβδομάδα
	Habermann et al. 2006	ΣΣ αύξηση στις 16 εβδομάδες και μετά σταδιακή πτώση στα αρχικά επίπεδα
	Veitch et al. 2006	Μικρή σταδιακή ΜΣΣ αύξηση μέχρι τις 24 εβδομάδες
	Stoffel et al. 2007	ΣΣ αύξηση την 3 ^η ημέρα. Επιστροφή σε κανονικά επίπεδα στις 14 ημέρες σε κατάγματα αστραγάλου Συνεχής αύξηση σε κατάγματα κνήμης.
PINP	Veitch et al. 2006	Μέγιστη τιμή στις 12 εβδομάδες και παραμονή σε ΣΣ υψηλότερα επίπεδα μέχρι τις 24 εβδομάδες
	Moghaddam et al. 2011	Απότομη πτώση την 1 ^η εβδομάδα, αύξηση από τη 2 ^η με μέγιστη τιμή την 4 ^η εβδομάδα, και παραμονή σε υψηλά επίπεδα έως τους 4 μήνες

Πίνακας 1.4 (συνέχεια) Μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων

PICP	Joerring et al. 1994	Κατάγματα διάφυσης κνήμης: ΣΣ αύξηση από την 1 ^η εβδομάδα, μέγιστη τιμή στις 2 εβδομάδες Κατάγματα κονδύλου κνήμης: ΣΣ αύξηση στις 2 και 6 εβδομάδες
	Lotz et al. 1999	ΣΣ αύξηση με μέγιστα επίπεδα την 2 ^η ή 3 ^η εβδομάδα. Στην ομάδα της οστεοσύνθεσης σε κατάγματα αστραγάλου η αύξηση ήταν ΜΣΣ.
	Yu-Yahiro et al. 2001	ΣΣ αύξηση στις 10 ημέρες και μετά σταδιακή πτώση ως τα αρχικά επίπεδα στις 180 ημέρες. ΜΣΣΔ μεταξύ των ομάδων διαφορετικής οστικής πυκνότητας
	Stoffel et al. 2007	ΣΣ μείωση την 3 ^η ημέρα και μετά συνεχής αύξηση. ΣΣ μεγαλύτερη αύξηση σε κατάγματα κνήμης σε σύγκριση με κατάγματα αστραγάλου
CTX-I	Emami et al. 1999	ΣΣ αύξηση μέχρι την 4 ^η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση ως τα αρχικά επίπεδα τη 16 ^η εβδομάδα
	Veitch et al. 2006	Αύξηση από την 3 ^η ημέρα με απότομη αύξηση στις 2 εβδομάδες και παραμονή σε ΣΣ αυξημένα επίπεδα στις 24 εβδομάδες
	Habermann et al. 2007	ΣΣ αύξηση στις 3 εβδομάδες και στη συνέχεια σταδιακή πτώση στα αρχικά επίπεδα
	Moghaddam et al. 2011	Αύξηση μέχρι την 4 ^η εβδομάδα και μετά σταδιακή πτώση μέχρι τα αρχικά επίπεδα στους 6 μήνες
	Wöfl et al. 2014	Σταδιακή αύξηση κατά τη διάρκεια των 8 εβδομάδων σε φυσιολογική οστική πυκνότητα
ICTP	Joerring et al. 1994	Κατάγματα διάφυσης κνήμης: ΣΣ αύξηση στις 4 ημέρες, μέγιστη τιμή στις 2 εβδ. Κατάγματα κονδύλου κνήμης: ΣΣ αύξηση στις 4 μέρες και στη 1 εβδομάδα, μέγιστα επίπεδα στις 2 εβδομάδες. ΣΣ αυξημένα επίπεδα στις 6 εβδομάδες
	Lotz et al. 1999	ΣΣ αύξηση με μέγιστα επίπεδα την 2 ^η ή 3 ^η εβδ.. ΜΣΣ αύξηση στην ομάδα της οστεοσύνθεσης σε κατάγματα αστραγάλου.
	Stoffel et al. 2007	Κατάγματα κνήμης: ΣΣ αύξηση την 3 ^η και 7 ^η ημέρα και στις 6 εβδομάδες Κατάγματα αστραγάλου: ΣΣ αύξηση την 3 ^η ημέρα και στις 6 εβδομάδες ΣΣ μεγαλύτερη αύξηση σε κατάγματα κνήμης
TRAP5b	Habermann et al. 2007	ΣΣ αύξηση στις 2 εβδομάδες, μέγιστα επίπεδα στις 6 εβδομάδες και μετά σταδιακή πτώση ως τα αρχικά επίπεδα
	Stoffel et al. 2007	Κατάγματα κνήμης: ΣΣ αύξηση την 3 ^η ημέρα, μέγιστα επίπεδα στις 2 εβδομάδες Κατάγματα αστραγάλου: ΣΣ αύξηση την 3 ^η ημέρα, μέγιστα επίπεδα την 7 ^η ημέρα ΣΣ μεγαλύτερη αύξηση σε κατάγματα κνήμης
	Moghaddam et al. 2011	Μικρή πτώση την 1 ^η εβδομάδα, σταδιακή αύξηση με μέγιστα επίπεδα στις 4 εβδομάδες και μετά σταδιακή πτώση ως τα φυσιολογικά επίπεδα στους 4 μήνες
	Wöfl et al. 2014	Αύξηση την 1 ^η εβδομάδα και παραμονή σε αυξημένα επίπεδα μέχρι τις 8 εβδομάδες σε φυσιολογική οστική πυκνότητα
PYR	Southwood et al. 2003	ΣΣ αύξηση μέχρι την 4 ^η εβδομάδα και μετά ΣΣ σταδιακή πτώση
DPD(ούρα)	Yu-Yahiro et al. 2001	ΜΣΣ αύξηση στις 10 και 60 ημέρες. ΣΣ μεγαλύτερες τιμές σε χαμηλή οστική πυκνότητα.

ΣΣ: στατιστικά σημαντική ή στατιστικά σημαντικά, ΜΣΣ: μη στατιστικά σημαντική ή μη στατιστικά σημαντικά

Δείκτες οστικού μεταβολισμού ως ένδειξη της έκβασης της επούλωσης οστικών καταγμάτων

Η επιτυχής έκβαση των διεργασιών της επούλωσης ενός κατάγματος οστού είναι η ανάπλαση της περιοχής που έχει υποστεί βλάβη, με αποτέλεσμα την ανάκτηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής δομής και λειτουργικότητας του οστού. Τα κριτήρια αξιολόγησης των διαταραχών της επούλωσης καταγμάτων δεν είναι σαφή ούτε τυγχάνουν ευρείας αποδοχής και εφαρμογής μεταξύ των διαφόρων μελετητών (Bhandari et al. 2002). Σε γενικές γραμμές στον άνθρωπο ως καθυστέρηση στην επούλωση κατάγματος οστού ορίζεται η μη πλήρης επούλωση για διάστημα που εκτείνεται πέραν των έξι μηνών, ενώ ως αποτυχία στην επούλωση κατάγματος ορίζεται η αποτυχία αποκατάστασης της περιοχής για διάστημα πέραν των εννέα μηνών, όπως αυτό εκτιμάται με ακτινογραφικά κριτήρια.

Η καθυστέρηση στην επούλωση ή/και η αποτυχία επούλωσης καταγμάτων μακρών οστών είναι μία αρκετά συχνή επιπλοκή και τα αναφερόμενα ποσοστά εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις. Οι Parker και συν. σε προοπτική μελέτη με 1133 ασθενείς με κάταγμα της κεφαλής του μηριαίου διαπίστωσαν αποτυχία της επούλωσης στο 19,3% των περιπτώσεων. Τα κατάγματα με παρεκτόπιση, το γυναικείο φύλο και η αυξημένη ηλικία αναδείχθηκαν ως παράγοντες κινδύνου για αποτυχία της επούλωσης σε αυτή τη μελέτη (Parker et al. 2007). Η επιτυχής επούλωση κατάγματος οστού, ο ρυθμός επούλωσης αυτού και η εμφάνιση επιπλοκών επηρεάζονται από παράγοντες που αφορούν στην εντόπιση του κατάγματος, τη συνυπάρχουσα απώλεια τμήματος οστού, τον τραυματισμό των υπερκείμενων μαλακών μορίων και τις συνεπακόλουθες διαταραχές στην αιμάτωση της περιοχής (Olesen et al. 2015), τον τύπο του κατάγματος (Taitzman et al. 2009), την εμφάνιση

λοιμώξης στην περιοχή (Yokoyama et al. 2008), τη θεραπευτική μέθοδο που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση του κατάγματος (Ly & Swiontkowski 2008), το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς (Loder 1988) και το κάπνισμα (Kyro et al. 1993).

Η βασική μέθοδος εκτίμησης της πορείας επούλωσης ενός κατάγματος οστού στηρίζεται σε κλινικά και ακτινογραφικά κριτήρια και η έγκαιρη ανίχνευση των μη ομαλών διεργασιών της επούλωσης είναι επί του παρόντος πολύ δύσκολη (Parker et al. 2007, Zimmermann et al. 2007). Οι μεταβολές των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού στο αίμα κατά τη διάρκεια της επούλωσης κατάγματος οστού έχουν από παλαιότερα παρουσιάσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον (Joerring et al. 1994, Emami et al. 1999) και συνεχίζουν να μελετώνται έντονα (Moghaddam et al. 2011, Singh et al. 2013). Οι μεταβολές αυτές πιθανόν να μπορούσαν να αποτελέσουν πρώιμο δείκτη της ομαλής ή μη έκβασης της επούλωσης κατάγματος οστού (Hermann et al. 2002, Moghaddam et al. 2011, Singh et al. 2013). Επιπρόσθετα, η ευρεία εφαρμογή της χρήσης των δεικτών πιθανόν να μπορούσε να μειώσει την μετεχειρητική ταλαιπωρία του ασθενούς σε περίπτωση πρόληψης ή πρώιμης ανίχνευσης επιπλοκών της επούλωσης, να ελαττώσει την παρατεταμένη απώλεια λειτουργικότητας, την πιθανότητα αναπηρίας καθώς και το κόστος νοσηλείας που σχετίζονται με την καθυστερημένη ανίχνευση επιπλοκών επούλωσης (Beaver et al. 1997, Zimmermann et al. 2007).

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την αξία της παρακολούθησης των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης, ολικής ή ειδικής για το οστόν (ALP και BALP αντίστοιχα) ως μέσο αξιολόγησης της πορείας της επούλωσης των οστικών καταγμάτων (Oni et al. 1989, Emami et al. 1999, Kurdy 2000, Herrmann et al. 2002, Southwood et al. 2003, Komnenou et al. 2005, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011, Singh et al. 2013).

Οι Southwood και συν. σε πειραματική μελέτη σε κουνέλια διαπίστωσαν ότι στις ομάδες όπου είχε προκληθεί πειραματικά οστεομυελίτιδα η BALP είχε στατιστικά σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση στις 4 εβδομάδες. Σε αυτή τη μελέτη μάλιστα η ταυτόχρονη συνεκτίμηση και των τριών δεικτών που μελετήθηκαν (BALP, OC και PYR) μπορούσαν να ανιχνεύσουν την επιπλεγμένη επούλωση λόγω λοίμωξης του τραύματος με ακρίβεια 96% (Southwood et al. 2003). Οι Komnenou και συν. παρακολούθησαν τις μεταβολές των επιπέδων της ALP κατά την επούλωση καταγμάτων μακρών οστών σε σκυλιά. Στην ομάδα όπου η επούλωση εξελίχθηκε φυσιολογικά (n=35) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ALP στον ορό τη 10^η ημέρα, η τιμή της οποίας τη χρονική αυτή στιγμή ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από τις δύο άλλες ομάδες. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων της σε κάθε χρονική στιγμή αξιολόγησης μέχρι τους δύο μήνες. Στην ομάδα όπου παρατηρήθηκε καθυστερημένη επούλωση (n=36) η ALP παρουσίασε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση την 10^η ημέρα, ωστόσο από το σημείο αυτό και έπειτα η πτώση της τιμής της ήταν πιο αργή συγκριτικά με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης και έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας το δεύτερο και τον τρίτο μήνα. Τον δεύτερο μήνα η συγκέντρωσή ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από τις άλλες δύο ομάδες. Τέλος, στην ομάδα στην οποία παρατηρήθηκε αποτυχία πόρωσης (n=12) οι τιμές της ALP δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο μηνών και ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερες από τις άλλες δύο ομάδες σε όλη του διάρκεια του 1^{ου} μήνα και στατιστικά σημαντικά μικρότερες από την ομάδα καθυστερημένης επούλωσης τον 2^ο μήνα (Komnenou et al. 2005). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Singh και συν. οι οποίοι παρακολούθησαν 95 ασθενείς με κατάγματα κνήμης και μηριαίου. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι σε περιπτώσεις φυσιολογικής επούλωσης (n=69) η

ALP παρουσίασε αύξηση από τη 2^η εβδομάδα φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα την 3^η εβδομάδα. Παρέμεινε σε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα μέχρι την 6^η εβδομάδα μετά το κάταγμα και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή επαναφορά στα αρχικά επίπεδα μέχρι τη χρονική στιγμή της ολοκλήρωσης της επούλωσης εντός 6 μηνών. Στις περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης (n=18) παρουσιάστηκε αύξηση των επιπέδων της ALP από τη 2^η εβδομάδα φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα την 3^η εβδομάδα, αλλά οι τιμές ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερες σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης σε αυτές τις χρονικές στιγμές. Η συγκέντρωση του δείκτη στη συνέχεια παρέμεινε σταθερά στατιστικά σημαντικά αυξημένη μέχρι το πέρας της μελέτης στους 6 μήνες. Τέλος, στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε αποτυχία επούλωσης (n=8) δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της ALP κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης (Singh et al. 2013). Οι Herrmann και συν. παρακολούθησαν την επούλωση καταγμάτων του μηριαίου σε 14 ασθενείς. Η BALP στους ασθενείς με φυσιολογική επούλωση (n=10) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας, έφτασε σε μέγιστα επίπεδα στις 6 με 12 εβδομάδες και μετά ακολούθησε σταδιακή πτώση μέχρι τα αρχικά επίπεδα. Οι ασθενείς με καθυστερημένη επούλωση (n=4) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση της BALP την 1^η ημέρα και την 1^η εβδομάδα της επούλωσης. Ο ρυθμός της αύξησης της συγκέντρωσης της BALP στον ορό ήταν μη στατιστικά σημαντικά μικρότερος μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Τα επίπεδα του δείκτη σε αυτή την ομάδα ασθενών συνέχισαν να αυξάνονται κα' όλη τη διάρκεια της μελέτης και ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης την 25^η και 52^η εβδομάδα (Herrmann et al. 2002). Παρομοίως, οι Emami και συν. σε 23 ασθενείς με φυσιολογική επούλωση σε κατάγματα κνήμης κατέγραψαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της

BALP μέχρι την 13^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή πτώση. Στις περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης (n=7) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση του δείκτη την 4^η εβδομάδα, συνέχιση της αύξησης μέχρι την 16^η εβδομάδα και στη συνέχεια παραμονή σε σταθερά υψηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της μελέτης στους 12 μήνες (Emami et al. 1999). Ο Kurdy παρακολούθησε την πορεία της επούλωσης κατά τη διάρκεια 20 εβδομάδων σε 20 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Σε τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αποτυχία πόρωσης των καταγμάτων. Οι ασθενείς αυτοί παρουσίασαν πτώση των επιπέδων της BALP στον ορό από τη 10^η εβδομάδα, αν και η διαφορά δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας, μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης στις 20 εβδομάδες (Kurdy 2000). Οι Stoffel και συν. παρακολούθησαν την επούλωση 20 ασθενών με κατάγματα κνήμης και αστραγάλου. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε φυσιολογική επούλωση (n=18) η συγκέντρωση της BALP παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση την 3^η ημέρα και στη συνέχεια ακολούθησε συνεχής αύξηση και στους δύο τύπους καταγμάτων. Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκαν δύο περιπτώσεις αποτυχίας της επούλωσης σε κατάγματα κνήμης. Στη μία περίπτωση η συγκέντρωση της BALP εμφάνισε μεγαλύτερη συγκέντρωση τον 4^ο μήνα και στη δεύτερη περίπτωση έμεινε σχεδόν αμετάβλητη για όλο το διάστημα παρακολούθησης των 6 μηνών. Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, οι Moghaddam και συν. σε μελέτη ασθενών - μαρτύρων με 30 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών απέτυχαν να διακρίνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μεταβολές των επιπέδων της BALP μεταξύ περιπτώσεων φυσιολογικής (15 ασθενείς) και καθυστερημένης επούλωσης (15 ασθενείς) (Moghaddam et al. 2011). Παρομοίως οι Oni και συν. σε κλινική μελέτη με 50 ασθενείς με κατάγματα κνήμης δεν διαπίστωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα

επίπεδα του δείκτη μεταξύ περιπτώσεων φυσιολογικής (41 ασθενείς) και καθυστερημένης επούλωσης (9 ασθενείς) (Oni et al. 1989).

Αναφορικά με τις μεταβολές των επιπέδων της οστεοκαλσίνης (OC), οι Southwood και συν. σε πειραματική μελέτη σε κουνέλια παρατήρησαν ότι η OC είχε στατιστικά σημαντικά αυξημένες τιμές τη 16^η εβδομάδα στις ομάδες όπου είχε προκληθεί πειραματικά οστεομυελίτιδα (Southwood et al.2003). Οι Hermann και συν. σε κλινική μελέτη με 14 ασθενείς με κατάγματα μηριαίου παρατήρησαν ότι η OC στην ομάδα των ασθενών με φυσιολογική επούλωση (10 ασθενείς) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της από την 4^η εβδομάδα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στους 2 μήνες και στη συνέχεια ακολούθησε σταδιακή πτώση μέχρι τα αρχικά επίπεδα. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης (4 ασθενείς) διαπιστώθηκε-καθυστέρηση στην αύξηση των επιπέδων της OC στον ορό κατά έναν περίπου μήνα. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του δείκτη σε αυτούς τους ασθενείς ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στις 6 εβδομάδες, άρχισε να αυξάνεται από την 8^η εβδομάδα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στους 3 μήνες και μετά ακολούθησε και πάλι σταδιακή πτώση (Herrmann et al. 2002). Οι Oni και συν. παρακολούθησαν τη μεταβολή των επιπέδων της OC κατά την επούλωση σε 14 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι σε περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης (7 ασθενείς) η OC είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές την 8^η και 16^η εβδομάδα της επούλωσης σε σύγκριση με τις περιπτώσεις ομαλής επούλωσης (7 ασθενείς) (Oni et al. 1989). Οι Stoffel και συν. σε 8 ασθενείς με κατάγματα κνήμης που εμφάνισαν φυσιολογική επούλωση περιέγραψαν συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης της OC κατά το διάστημα παρακολούθησης των 6 μηνών. Σε μία περίπτωση αποτυχίας της επούλωσης τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν αμετάβλητα για το διάστημα παρακολούθησης, ενώ σε μία ακόμη περίπτωση τα

επίπεδα του δείκτη ήταν αυξημένα κατά την αρχική εξέταση, εμφάνισαν μικρή μόνο περαιτέρω αύξηση μετεγχειρητικά και στη συνέχεια παρέμειναν αμετάβλητα (Stoffel et al. 2007). Αντίθετα, οι Emami και συν. δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε περιπτώσεις με φυσιολογική (n=23) και καθυστερημένη επούλωση (n=7) σε ασθενείς με κατάγματα κνήμης (Emami et al. 1999).

Αναφορικά με τη συγκέντρωση των προπεπτιδίων αμινοτελικού/καρβοξυτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP και PICP αντίστοιχα) οι υπάρχουσες μελέτες δε φαίνεται να οδηγούν σε κάποιο σαφές συμπέρασμα για την πιθανή αξία τους ως δείκτες της πορείας της οστικής επούλωσης. Οι Joerring και συν. παρακολούθησαν την επούλωση 24 ασθενών με κατάγματα στον κόνδυλο ή στη διάφυση της κνήμης. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε φυσιολογική επούλωση σε κατάγματα διάφυσης της κνήμης (10 ασθενείς) η συγκέντρωση των PICP παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση την 1^η εβδομάδα και έφτασε σε μέγιστο επίπεδο στις 2 εβδομάδες μετά το κάταγμα. Στις περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης (6 ασθενείς) παρατηρήθηκε μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των επιπέδων των PICP στις 2 εβδομάδες και μεγαλύτερη μέγιστη συγκέντρωση στο διάστημα αυτό, αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Joerring et al. 1994). Οι Stoffel και συν. σε 18 ασθενείς με κατάγματα κνήμης και αστραγάλου με φυσιολογική επούλωση παρατήρησαν στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των PICP την 3^η ημέρα μετά το κάταγμα και στη συνέχεια ακολούθησε συνεχής αύξηση των επιπέδων του δείκτη και στους δύο τύπους καταγμάτων. Σε μία περίπτωση αποτυχίας της επούλωσης σε κάταγμα κνήμης η συγκέντρωση των PICP ήταν αυξημένη κατά τον 4^ο μήνα επούλωσης, ενώ σε μία ακόμα περίπτωση τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητα για όλο το διάστημα παρακολούθησης των 6 μηνών. Ο Kurdy παρακολούθησε για 20 εβδομάδες

την πορεία της επούλωσης σε 20 ασθενείς με κατάγματα κνήμης. Σε τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αποτυχία πόρωσης των καταγμάτων. Οι ασθενείς αυτοί παρουσίασαν πτώση των επιπέδων των PIRP στον ορό από τη 10^η εβδομάδα και η διαφορά συγκριτικά με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας στις 20 εβδομάδες (Kurdy 2000). Αντιθέτως, οι Moghaddam και συν. δεν διέκριναν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των PINP στον ορό μεταξύ περιπτώσεων με φυσιολογική και διαταραγμένη επούλωση (Moghaddam et al. 2011).

Στα πλαίσια της προσπάθειας πρόβλεψης της έκβασης της επούλωσης οστικών καταγμάτων, έχουν μελετηθεί ορισμένοι δείκτες οστικής απορρόφησης για την πιθανή εμπλοκή τους στην ομαλή ή μη επούλωση καταγμάτων. Τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I (CTX-I και ICTP) είναι οι δείκτες οστικής απορρόφησης που έχουν μελετηθεί περισσότερο για αυτό το σκοπό. Οι Moghaddam και συν. σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων με 30 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών παρατήρησαν ότι στην ομάδα της φυσιολογικής επούλωσης (15 ασθενείς) η συγκέντρωση των βCTX αυξήθηκε μέχρι την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια παρουσίασε σταδιακή πτώση μέχρι τα φυσιολογικά επίπεδα στους 6 μήνες. Η ομάδα των ασθενών που εμφάνισαν αποτυχία επούλωσης (15 ασθενείς) παρουσίασε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση του δείκτη την 1^η εβδομάδα επούλωσης (Moghaddam et al. 2011). Οι Joerring και συν. σε ασθενείς με φυσιολογική επούλωση καταγμάτων διάφυσης της κνήμης (n=10) διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ICTP στις 4 ημέρες, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στις 2 εβδομάδες και η συγκέντρωση του δείκτη επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τις 6 εβδομάδες. Σε 6 περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης διαπιστώθηκε μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των

επιπέδων των ICTP στις 2 εβδομάδες, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Joerring et al. 1994). Οι Stoffel και συν. σε 10 ασθενείς με κατάγματα κνήμης παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 3^η και την 7^η ημέρα με μέγιστα επίπεδα στις 6 εβδομάδες. Αντιθέτως, σε μία περίπτωση αποτυχίας της επούλωσης διαπίστωσαν περιορισμένη μόνο αύξηση της συγκέντρωσης των ICTP μετεγχειρητικά και καμία μεταβολή των επιπέδων τους σε μεταγενέστερα στάδια της επούλωσης. Ωστόσο, οι Emami και συν. και οι Hermann και συν. απέτυχαν να εντοπίσουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μεταβολές των επιπέδων των βCTX ανάμεσα σε περιπτώσεις με φυσιολογική και καθυστερημένη επούλωση (Emami et al. 1999, Herrmann et al. 2002). Παρομοίως, ο Kurdy σε τρεις περιπτώσεις αποτυχίας πόρωσης καταγμάτων κνήμης δεν διέκρινε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των ICTP σε σύγκριση με τις περιπτώσεις φυσιολογικής επούλωσης (17 ασθενείς).

Περιορισμένα είναι τα δεδομένα που αφορούν στην αξία της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b) ως δείκτης της πορείας της επούλωσης. Οι Moghaddam και συν. σε μελέτη με 15 ασθενείς με κατάγματα μακρών οστών που εμφάνισαν φυσιολογική επούλωση περιέγραψαν μικρή πτώση των επιπέδων της TRAP5b την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση με μέγιστα επίπεδα στις 4 εβδομάδες. Ακολούθησε εκ νέου σταδιακή πτώση των επιπέδων του δείκτη ως τα φυσιολογικά επίπεδα στους 4 μήνες. Στην ομάδα των ασθενών με αποτυχία επούλωσης (15 ασθενείς) διαπίστωσαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση του δείκτη στον ορό την 4^η και 8^η εβδομάδα (Moghaddam et al. 2011). Οι Stoffel και συν. σε 8 περιπτώσεις φυσιολογικής επούλωσης καταγμάτων κνήμης περιέγραψαν αύξηση των επιπέδων της TRAP5b από την 3^η ημέρα με μέγιστα επίπεδα στις 2 εβδομάδες (Stoffel et al. 2007). Αντιθέτως, σε μία

περίπτωση αποτυχίας της επούλωσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του δείκτη κατά το διάστημα παρακολούθησης (Stoffel et al. 2007).

Τέλος, η πυριδινολίνη (PYR) ως δείκτης έκβασης της επούλωσης οστικών βλαβών έχει μελετηθεί μόνο από τους Southwood και συν. σε πειραματική μελέτη σε κουνέλια. Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι στις ομάδες όπου είχε προκληθεί πειραματικά οστεομυελίτιδα η PYR είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση την 4^η, 8^η και 16^η εβδομάδα συγκριτικά με τις ομάδες στις οποίες δεν προκλήθηκε λοίμωξη του τραύματος (Southwood et al. 2003).

Τα αποτελέσματα των μελετών που περιγράφηκαν αναγράφονται συνοπτικά στον **Πίνακα 1.5**.

Πίνακας 1.5. Μελέτες σχετικές με τη διακύμανση δεικτών οστικού μεταβολισμού ως ένδειξη της έκβασης της επούλωσης

BALP/ALP	Oni et al. 1989	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής και καθυστερημένης επούλωσης (n=9)
	Emami et al. 1999	Καθυστερημένη επούλωση (n=7): ΣΣ μικρότερη την 4 ^η εβδομάδα, μέγιστη στις 16 εβδομάδες, παραμονή σε ΣΣ αυξημένα επίπεδα μέχρι τους 12 μήνες
	Kurdy et al. 2000	Αποτυχία επούλωσης (n=3): πτώση από τη 10 ^η εβδομάδα, ΜΣΣ χαμηλότερη συγκέντρωση στις 20 εβδομάδες
	Herrmann et al. 2002	Καθυστερημένη επούλωση (n=4): ΣΣ υψηλότερη την 1 ^η ημέρα και 1 ^η εβδομάδα, ΜΣΣ μικρότερος ρυθμός αύξησης μεταξύ 4 ^{ης} και 6 ^{ης} εβδομάδας, διαρκής αύξηση μέχρι το 1 έτος, ΣΣ μεγαλύτερη συγκέντρωση την 25 ^η και 52 ^η εβδομάδα σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης
	Southwood et al. 2003	ΣΣ μικρότερη στις ομάδες με λοίμωξη του τραύματος (ομάδες 2 & 3) την 4 ^η εβδομάδα
	Komnenou et al. 2005	Καθυστερημένη επούλωση (n=36): ΣΣ μικρότερη αύξηση τη 10 ^η ημέρα και ΣΣ βραδύτερη μείωση μετά τις 10 ημέρες σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικής επούλωσης Αποτυχία επούλωσης (n=12): ΜΣΣ διαφορά τους 2 μήνες παρακολούθησης. ΣΣ μικρότερη σε σύγκριση με όλες τις ομάδες μέχρι τον 1 ^ο μήνα. ΣΣ μικρότερη σε σύγκριση με την ομάδα καθυστερημένης επούλωσης το 2 ^ο μήνα
	Stoffel et al. 2007	Αποτυχία επούλωσης: μεγαλύτερη συγκέντρωση τον 4 ^ο μήνα (n=1), αμετάβλητα επίπεδα για τους 6 μήνες παρακολούθησης (n=1)
	Moghaddam et al. 2011	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής επούλωσης και αποτυχίας επούλωσης (n=15)
	Singh et al. 2013	Καθυστερημένη επούλωση (n=18): ΣΣ μικρότερη αύξηση τη 2 ^η εβδομάδα, ΣΣ μικρότερα μέγιστα επίπεδα την 3 ^η εβδομάδα Φυσιολογική επούλωση (n=69): ΣΣ μικρότερα επίπεδα μέχρι την επίτευξη πλήρους επούλωσης, παραμονή σε ΣΣ αυξημένα επίπεδα μέχρι τους 6 μήνες. Αποτυχία επούλωσης (n=8): ΜΣΣ διαφορά των επιπέδων κατά τη διάρκεια παρακολούθησης
OC	Oni et al. 1989	Καθυστερημένη επούλωση (n=7): ΣΣ χαμηλότερη συγκέντρωση την 8 ^η και 16 ^η εβδομάδα
	Emami et al. 1999	ΜΣΣΔ μεταξύ φυσιολογικής και καθυστερημένης επούλωσης (n=7)
	Herrmann et al. 2002	Καθυστερημένη επούλωση (n=4): καθυστέρηση σε αύξηση των επιπέδων στον ορό κατά 1 μήνα, ΣΣ χαμηλότερη τιμή στις 6 εβδομάδες, αύξηση από την 8 ^η εβδομάδα, μέγιστα επίπεδα στους 3 μήνες και μετά σταδιακή πτώση
	Southwood et al. 2003	ΣΣ μεγαλύτερη στις ομάδες με λοίμωξη του τραύματος (ομάδες 2 & 3) την 16 ^η εβδομάδα
PINP	Stoffel et al. 2007	Αποτυχία επούλωσης: μεγαλύτερη συγκέντρωση τον 4 ^ο μήνα (n=1), αμετάβλητα επίπεδα για τους 6 μήνες παρακολούθησης (n=1)
	Moghaddam et al. 2011	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής επούλωσης και αποτυχίας επούλωσης (n=15)
PICP	Joerring et al. 1994	Καθυστερημένη επούλωση (n=6): μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης στις 2 εβδομάδες, μεγαλύτερη μέγιστη συγκέντρωση (ΜΣΣ διαφορά)
	Kurdy 2000	Αποτυχία επούλωσης (n=3): πτώση από τη 10 ^η εβδομάδα, ΣΣ μικρότερη συγκέντρωση στις 20 εβδομάδες
CTX-I	Emami et al. 1999	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής και καθυστερημένης επούλωσης (n=7)
	Herrmann et al. 2002	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής και καθυστερημένης επούλωσης (n=4)

Πίνακας 1.5 (συνέχεια) Μελέτες σχετικές με τη διακύμανση δεικτών οστικού μεταβολισμού ως ένδειξη της έκβασης της επούλωσης

	Moghaddam et al. 2011	Αποτυχία επούλωσης (n=15): ΣΣ χαμηλότερη συγκέντρωση την 1 ^η εβδομάδα
ICTP	Joerring et al. 1994	Καθυστερημένη επούλωση (n=6): ΜΣΣ μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης στις 2 εβδομάδες
	Kurdy 2000	ΜΣΣ διαφορά μεταξύ φυσιολογικής επούλωσης και αποτυχίας επούλωσης (n=3)
	Stoffel et al. 2007	Αποτυχία επούλωσης (n=1): περιορισμένη αύξηση μετεγχειρητικά και καμία μεταβολή σε μεταγενέστερα στάδια της επούλωσης
TRAP5b	Stoffel et al. 2007	Αποτυχία επούλωσης (n=1): καμία μεταβολή τους 6 μήνες παρακολούθησης
	Moghaddam et al. 2011	Αποτυχία επούλωσης (n=15): ΣΣ χαμηλότερη συγκέντρωση την 4 ^η και 8 ^η εβδομάδα
PYD	Southwood et al. 2003	ΣΣ μεγαλύτερη στις ομάδες με λοίμωξη του τραύματος (ομάδες 2 & 3) την 4 ^η , 8 ^η και 16 ^η εβδομάδα

ΣΣ: στατιστικά σημαντική ή στατιστικά σημαντικά, ΜΣΣ: μη στατιστικά σημαντική ή μη στατιστικά σημαντικά

Διακύμανση των δεικτών οστικού μεταβολισμού

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού φαίνεται πως παρουσιάζουν μεγάλη φυσιολογική διακύμανση. Ως εκ τούτου, για την κατά το δυνατόν ελαχιστοποίηση της υπάρχουσας διακύμανσης θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να ελέγχονται στο βαθμό του εφικτού οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτήν. Βιολογικοί παράγοντες και παράγοντες που αφορούν στη διαδικασία συλλογής και ανάλυσης των δειγμάτων αίματος, ούρων ή ιστών (τεχνικοί παράγοντες) επηρεάζουν τη διακύμανση των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού.

Η μέθοδος συλλογής του δείγματος και οι μέθοδοι που ακολουθούνται για την επεξεργασία και ανάλυση του δείγματος μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι τεχνικοί παράγοντες αποτελούν μία ελεγχόμενη ως επί το πλείστον πηγή διακύμανσης των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων η ευαισθησία των δεικτών μεταβολισμού στη θερμική αποδόμηση, τη φωτόλυση και τη αιμόλυση. Το ακέραιο μόριο της οστεοκαλσίνης μεταβολίζεται ταχέως σε θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική εξασθένηση του σήματός της μετά από 1 έως 2 ώρες παραμονής σε συνθήκες απόψυξης (Lang et al. 1996). Παρατηρείται επίσης κατά 12% περίπου εξασθένηση του σήματος του ICTP μετά από παραμονή του δείγματος για 5 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (Blumsohn et al. 1995), ενώ και η TRAP5b αποδομείται ταχέως και το μόριό της διατηρείται σταθερό στους -70° ή σε ακόμα χαμηλότερη θερμοκρασία (Bais & Edwards 1976). Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία επηρεάζει τη σταθερότητα των διασταυρούμενων διασυνδέσεων πυριδινίου (Blumsohn et al. 1995). Επίσης τα μόρια της οστεοκαλσίνης, της σιαλικής

πρωτεΐνης του οστού και πιθανώς και της TRAP5b είναι ευαίσθητα στην αιμόλυση (Seibel 2005).

Κατά την ανάλυση δείγματος ούρων πραγματοποιείται διόρθωση για την κάθαρση της κρεατινίνης, γεγονός που λειτουργεί ως επιπρόσθετη πηγή διακύμανσης (Heymssfield et al. 1983). Επιπρόσθετα, θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπ' όψιν ο κιρκάδιος ρυθμός στην έκκριση των περισσότερων δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι μεταβολές λόγω του κιρκάδιου ρυθμού είναι εντονότερες κατά τις πρωινές ώρες. Ως εκ τούτου, η τυποποίηση της ώρας λήψης του δείγματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να είναι συγκρίσιμα δείγματα διαφορετικών χρονικών στιγμών (Greenspan et al. 1997). Δεδομένου ότι ορισμένοι δείκτες επηρεάζονται και από τη λήψη τροφής, οι πλέον ενδεδειγμένες συνθήκες δειγματοληψίας θεωρούνται νωρίς το πρωί κατόπιν νυχτερινής νηστείας (Clowes et al. 2002). Μεγάλη φαίνεται να είναι και η διακύμανση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από ανάλυση των ίδιων δειγμάτων με διαφορετικά αντιδραστήρια ή και με τη χρήση ίδιων αντιδραστηρίων αλλά από διαφορετικά εργαστήρια (Seibel et al. 2001).

Οι βιολογικοί παράγοντες διακύμανσης των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού είναι δυσκολότερο να ελεγχθούν σε σύγκριση με τους τεχνικούς. Η ηλικία και το φύλο αποτελούν τους δύο κυριότερους ίσως από αυτούς (Szulc et al. 2001, Seifert-Klauss et al. 2002). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες αφορούν στην ύπαρξη νεφρικής ή ηπατικής νόσου (Alvarez et al. 2004, Lai et al. 2015). Τέλος, η διακύμανση των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού φαίνεται πως επηρεάζεται επίσης από τον έμμηνο κύκλο και τις εποχές του χρόνου (Nielsen et al. 1990, Woitge et al. 1998).

Η σημαντικότητα στη μεταβολή των επιπέδων ενός δείκτη στην κλινική πράξη αναδεικνύεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη σύγκριση της

μεταβολής με μία προαποφασισμένη οριακή τιμή μεταβολής (ελάχιστη σημαντική μεταβολή). Ο δεύτερος και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος περιλαμβάνει τη σύγκριση της τιμής του δείκτη με το φυσιολογικό εύρος τιμών, όπως αυτό έχει προσδιοριστεί μέσα από μελέτες σε ευρείες βάσεις πληθυσμών. Για τους περισσότερους δείκτες οστικού μεταβολισμού δεν έχει ακόμα οριστεί το φυσιολογικό εύρος τιμών για όλες τις πληθυσμιακές ομάδες (Bayer 2014, Hannemann & Wallaschofski et al. 2015). Σημαντικά προβλήματα επιπρόσθετα απορρέουν τόσο από τις φυσιολογικές διακυμάνσεις στα επίπεδα των δεικτών, όπως περιγράφηκαν, καθώς και από την έλλειψη τυποποίησης και εναρμόνισης των μεθόδων μέτρησής τους, ώστε να είναι τα αποτελέσματα διαφορετικών μεθόδων και διαφορετικών εργαστηρίων συγκρίσιμα. Πλέον υπάρχει έντονη ερευνητική προσπάθεια για να ξεπεραστούν τα υπάρχοντα εμπόδια και να εισαχθεί η χρήση των δεικτών οστικού μεταβολισμού στην κλινική πράξη για την πρόληψη, τη διάγνωση και την παρακολούθηση της πορείας διαφόρων καταστάσεων και νόσων του μεταβολισμού του οστίτη ιστού (Bauer et al. 2012).

Σκοπός της μελέτης

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που προηγήθηκε φαίνεται πως τα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό πιθανόν να μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της επούλωσης οστικών βλαβών. Παράγοντες που περιλαμβάνουν το είδος της βλάβης, τον τρόπο αντιμετώπισης και την πορεία της επούλωσης πιθανόν να μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος και τη χρονική διάρκεια αυτών των μεταβολών. Η χρήση οστικών μοσχευμάτων τόσο στον τομέα της ορθοπεδικής όσο και στον τομέα της οδοντιατρικής αποτελεί μία συνήθη πρακτική για την αντιμετώπιση οστικών βλαβών. Κατά την αναζήτηση ανάλογων μελετών στη

βιβλιογραφία, δε βρέθηκε καμία μελέτη που να έχει διερευνήσει έως τώρα την επίδραση της χρήσης οστικού μοσχεύματος για την αντιμετώπιση οστικών βλαβών στις μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό του αίματος κατά τη διάρκεια της επούλωσης. Είναι προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σε αυτό τον τομέα.

Το πρώτο τμήμα της υπόθεσης εργασίας της παρούσας μελέτης ήταν ότι η πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν σε κουνέλια επηρεάζει τα επίπεδα στον ορό του αίματος βιολογικών παραγόντων ενδεικτικών της μεταβολικής δραστηριότητας του οστού. Το δεύτερο τμήμα της υπόθεσης εργασίας της παρούσας μελέτης ήταν ότι σε κουνέλια στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά οστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και οι οποίες αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με πορώδεις κόκκους τιτανίου ή με αυτογενές οστικό μόσχευμα ή αφέθηκαν να επούλωθούν χωρίς μοσχευματικό υλικό τα επίπεδα στον ορό του αίματος βιολογικών παραγόντων ενδεικτικών της μεταβολικής δραστηριότητας του οστού διέφεραν ως προς τις διαχρονικές μεταβολές τους ανάλογα με τον τρόπο αντιμετώπισης.

Ως παράγοντες ενδεικτικοί της εναπόθεσης νέου οστού σε αυτή τη μελέτη επιλέχθηκαν η ειδική για το οστόν αλκαλική φωσφατάση (BALP), το ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC) και το προπεπτιδίο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP). Η επιλογή της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης έναντι της ολικής αλκαλικής φωσφατάσης στηρίχθηκε στον αποκλεισμό προσμέτρησης των διαφόρων ισοενζύμων μη σκελετικής προέλευσης στον ορό (Green et al. 1971, Farley et al. 1981). Η επιλογή του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης έναντι του ακέραιου μορίου της οστεοκαλσίνης βασίστηκε στην ταχεία αποδόμηση που εμφανίζει το ακέραιο κλάσμα στον ορό (Hellman et al. 1996). Η επιλογή του αμινοτελικού έναντι του καρβοξυτελικού προπεπτιδίου

προκολλαγόνου τύπου I βασίστηκε στη συχνότερη χρήση του πρώτου μορίου ως δείκτη εναπόθεσης νέου οστού στη βιβλιογραφία (Veitch et al. 2006, Moghaddam et al. 2011).

Ως παράγοντες ενδεικτικοί της απορρόφησης οστού σε αυτή τη μελέτη επιλέχθηκαν τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I (CTX-I) και η ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP5b). Οι δύο αυτοί δείκτες επιλέχθηκαν έναντι των υπολοίπων διαθέσιμων δεικτών ενδεικτικών της απορρόφησης οστού με βάση τη μεγαλύτερη συχνότητα χρήσης τους από αντίστοιχες μελέτες στη βιβλιογραφία, ώστε τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης να μπορούν κατά το δυνατόν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Habermann et al. 2007 Moghaddam et al. 2011 Wöfl et al. 2014).

Ο πρώτος σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας παρέμβασης σε κουνέλια που υποβλήθηκαν σε πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστού ήταν η μελέτη στον ορό του αίματος των πιθανών διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων των παραγόντων ειδική για το οστού αλκαλική φωσφατάση (BALP), ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC), προπεπτίδιο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP), καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I (CTX-I) και ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP5b) κατά την επούλωση. Ο δεύτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση στον ορό του αίματος των πιθανών διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων των παραγόντων BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I και TRAP5b σε κουνέλια στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά οστικές βλάβες στο μηριαίο οστού και οι οποίες αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με πορώδεις κόκκους τιτανίου ή με αυτογενές οστικό μόσχευμα ή αφέθηκαν να επουλωθούν χωρίς μοσχευματικό υλικό.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικό της μελέτης

Η παρούσα μελέτη αποτελεί το δεύτερο τμήμα ευρύτερης μελέτης, η οποία είχε τίτλο: “Συγκριτική αξιολόγηση της εφαρμογής πορωδών κόκκων τιτανίου έναντι αυτογενούς οστικού μόσχευματος σε οστικές βλάβες σε πειραματόζωα” και η οποία έχει λάβει έγκριση από την Επιτροπή Έρευνας και Δεοντολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (#167/12.5.2011, ημερομηνία Συνεδρίας 26.5.2011). Η ευρύτερη μελέτη αφορούσε 45 κουνέλια τύπου New Zealand, γένους αρσενικού και βάρους 3,5-4 kg, στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και αντιμετωπίστηκαν με τις εξής τρεις θεραπευτικές επιλογές:

1. Κουνέλια (15) στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και έγινε αντιμετώπιση αυτών με πορώδεις κόκκους τιτανίου (TIGRANTM-PGT) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) – Ομάδα PTGM
2. Κουνέλια (15) στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και έγινε αντιμετώπιση αυτών με αυτογενές οστικό μόσχευμα (AG) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα AGM
3. Κουνέλια (15) στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και έγινε αντιμετώπιση αυτών με απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα CM

Οι δύο σκοποί της ευρύτερης αυτής μελέτης ήταν:

1. Ιστολογική και ιστομορφομετρική αξιολόγηση της οστικής πλήρωσης σε πειραματικά προκληθείσες οστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν κουνελιών μετά από

θεραπευτική αντιμετώπιση με πορώδεις κόκκους τιτανίου έναντι αντιμετώπισης με αυτογενές οστικό μόσχευμα (σκοπός του πρώτου τμήματος της μελέτης).

2. Εκτίμηση των επιπέδων στο αίμα συγκεκριμένων βιολογικών παραγόντων, ενδεικτικών της μεταβολικής δραστηριότητας του οστού και σύγκριση των επιπέδων αυτών μεταξύ των τριών ομάδων πειραματοζώων (σκοπός του δεύτερου τμήματος της μελέτης).

Το πειραματικό στάδιο του πρώτου τμήματος της μελέτης εκπονήθηκε και ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής & Χειρουργικής Έρευνας της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Διευθύντρια Καθηγήτρια Κα Δέσποινα Περρέα) καθώς και οι ιστολογικές/ιστομορφομετρικές αναλύσεις του πρώτου τμήματος της μελέτης που αφορούσαν στον πρώτο σκοπό αυτής εκπονήθηκαν και ολοκληρώθηκαν στο Department of Oral Surgery, Bernhard Gottlieb Dental School, Medical University of Vienna/Austrian Cluster for Tissue Regeneration, Vienna, Austria (Διευθυντής Καθηγητής Κος Georg Watzek). Πλέον, το πρώτο τμήμα της μελέτης βρίσκεται στη φάση της συγγραφής των ευρημάτων.

Συνοπτικά, σε κάθε πειραματόζωο, αφού είχε αυτό ταξινομηθεί τυχαία σε μία από τις 3 ομάδες (PTGM, AGM, CM) με βάση τυχαίοποιημένο πρωτόκολλο με τη χρήση ειδικού λογισμικού, προκλήθηκε υπό γενική αναισθησία στο δεξί μηριαίο οστόν οστική βλάβη βάθους 5 mm και διαμέτρου 6 mm με τη χρήση εγγλυφίδων συγκεκριμένης διαμέτρου και έγινε πλήρωση της οστικής βλάβης με κόκκους τιτανίου (TIGRANTM-PGT) (για την ομάδα PGTM) ή με αυτογενές οστικό μόσχευμα (για την ομάδα AGM). Οι οστικές βλάβες στο δεξί μηριαίο οστόν των πειραματοζώων της ομάδας CM δεν δέχθηκαν μοσχευματικό υλικό αλλά παρέμειναν κενές. Ακολούθησε κάλυψη της οστικής βλάβης στο δεξί μηριαίο οστόν και στις

τρεις ομάδες πειραματοζώων (PTGM, AGM, CM) με απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (Biogide) και σταθεροποίηση της μεμβράνης με μη απορροφήσιμες καρφίδες τιτανίου. Για κάθε πειραματόζωο της ομάδας AGM, το αυτογενές οστικό μόσχευμα ελήφθη από το αριστερό μηριαίο οστόν του πειραματοζώου. Για τις άλλες δύο ομάδες (PTGM, CM) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία στο αριστερό μηριαίο οστόν χωρίς όμως να χρησιμοποιηθεί το ληφθέν μόσχευμα, προκειμένου να ισχύουν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες για όλες τις ομάδες πειραματοζώων. Στις έξι εβδομάδες έγινε ευθανασία κάθε πειραματοζώου (ομάδες PTGM, AGM, CM) και στη συνέχεια ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση του μηριαίου οστού. Οι προεγχειρητικές, διεγχειρητικές και μετεγχειρητικές πειραματικές συνθήκες ήταν σταθερές για όλα τα πειραματόζωα. Σε 9 πειραματόζωα (3 από κάθε ομάδα) το πειραματικό τμήμα της μελέτης δεν ολοκληρώθηκε, οπότε αυτά τα πειραματόζωα εξαιρέθηκαν από την μελέτη και αντικαταστάθηκαν από 9 νέα πειραματόζωα. Η αιτία θανάτου αφορούσε σε ασφυξία λόγω βλάβης στο σύστημα εξαερισμού του εργαστηρίου κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επομένως, ο συνολικός αριθμός των πειραματοζώων που ολοκλήρωσαν όλο το πειραματικό τμήμα της μελέτης και αξιολογήθηκαν ήταν 45 πειραματόζωα.

Το υλικό του δευτέρου τμήματος της μελέτης είναι δείγματα φλεβικού αίματος που προήλθαν από τα ανωτέρω 45 κουνέλια τύπου New Zealand, γένους αρσενικού και βάρους 3,5-4 kg, στα οποία είχαν προκληθεί πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και είχαν αντιμετωπισθεί με τις τρεις ανωτέρω θεραπευτικές επιλογές. Οι ομάδες που εξετάστηκαν είναι τρεις, οι εξής:

1. Δείγματα ορού αίματος από 15 κουνέλια στα οποία είχε γίνει πειραματική πρόκληση ενδοοστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν και αντιμετώπιση αυτών με

πορώδεις κόκκους τιτανίου (TIGRANTM-PGT) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα PTGM

2. Δείγματα ορού αίματος από 15 κουνέλια στα οποία είχε γίνει πειραματική πρόκληση ενδοοστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν και αντιμετώπιση αυτών με αυτογενές οστικό μόσχευμα (AG) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα AGM

3. Δείγματα ορού αίματος από 15 κουνέλια στα οποία είχε γίνει πειραματική πρόκληση ενδοοστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν και αντιμετώπιση αυτών με απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα CM

Σε κάθε πειραματόζωο, πριν από την έναρξη της χειρουργικής επέμβασης πειραματικής πρόκλησης της ενδοοστικής βλάβης είχε γίνει αιμοληψία φλεβικού αίματος (3,5 ml) για να προσδιοριστούν οι αρχικές (προεγχειρητικές) τιμές των βιολογικών παραγόντων που θα εξετάζονταν. Στη συνέχεια, σε κάθε πειραματόζωο έγινε αιμοληψία φλεβικού αίματος (3,5 ml) την 1η, 2η, 4η και 6η μετεγχειρητική εβδομάδα για να προσδιοριστούν οι μετεγχειρητικές τιμές των βιολογικών παραγόντων που θα εξετάζονταν. Συνολικά σε κάθε κουνέλι έγιναν πέντε αιμοληψίες φλεβικού αίματος (3,5 ml εκάστη) και αυτά τα δείγματα ορού αίματος (225 δείγματα) αποτέλεσαν το υλικό του δευτέρου τμήματος της μελέτης.

Η αιμοληψία γινόταν τις πρωινές ώρες, πριν από τη λήψη τροφής και με τα πειραματόζωα να βρίσκονται σε καλή γενική κατάσταση. Για τη μέτρηση των δεικτών οστικού μεταβολισμού χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος. Για τη λήψη του ορού το αίμα των πειραματόζωων τοποθετήθηκε σε ξηρά σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό. Μετά την πήξη έγινε φυγοκέντρηση στις 3.500 στροφές ανά λεπτό για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια ο ορός διαχωρίστηκε και φυλάχθηκε σε ψύξη (-80° C) έως τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού.

Μέθοδοι προσδιορισμού δεικτών οστικού μεταβολισμού

Μέθοδος προσδιορισμού ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης (BALP)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ανταγωνιστικής ELISA (ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός, enzyme-linked immunosorbent assay) με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Bluegene και την συσκευή Luminex 100 device (Multiplexed Biomarker Immunoassays for Luminex® Instrumentation/xMAP® Technology).

A) Αρχή της μεθόδου

Για την ανίχνευση της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιήθηκαν ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης και ένα μόριο ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση. Τα δείγματα τοποθετούνται στα μικροφρέατια και επώάζονται για μία ώρα στους 37° C. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και ακολουθεί εκ νέου επώαση στους 37° C για δεκαπέντε λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος δημιουργεί ένα σύμπλεγμα μπλε χρώματος. Στη συνέχεια τοποθετείται στα μικροφρέατια το διάλυμα πάυσης της αντίδρασης το οποίο μετατρέπει το χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο. Η ένταση του χρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης στα δείγματα, εφόσον το αντιγόνο του δείγματος και το αντιγόνο το

συζευγμένο με υπεροξειδάση ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ειδικής για το οστούν αλκαλικής φωσφατάσης. Εφόσον οι θέσεις πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος είναι περιορισμένες, όσες περισσότερες καταληφθούν από την ειδική για το οστούν αλκαλική φωσφατάση του δείγματος τόσο λιγότερες θα παραμείνουν διαθέσιμες για την πρόσδεση του πρόσθετου αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μία καμπύλη αναφοράς η οποία συσχετίζει την ένταση του χρώματος με τη συγκέντρωση των δειγμάτων. Η συγκέντρωση της ειδικής για το οστούν αλκαλικής φωσφατάσης στα δείγματα υπολογίζεται με βάση αυτή την καμπύλη.

B) Αντιδραστήρια

Κάθε αντιδραστήριο απαρτιζόταν από τα εξής μέρη:

- 1) Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ειδικής για το οστούν αλκαλικής φωσφατάσης (**Εικόνα 1**)
- 2) Διάλυμα ειδικής για το οστούν αλκαλικής φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση (enzyme conjugate) (**Εικόνα 2**)
- 3) Πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (0 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL) αλκαλικής φωσφατάσης ειδικής για το οστούν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (**Εικόνα 3**)
- 4) Δύο διαλύματα χρωμογόνου (substrates) (**Εικόνα 4**)
- 5) Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (stop solution) (**Εικόνα 5**)
- 6) Διάλυμα πλύσεως (wash solution) (**Εικόνα 6**)

Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος για τη δοκιμασία εξοπλισμός που δεν περιλαμβάνονταν στα αντιδραστήρια αποτελούνταν από:

- 1) Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (**Εικόνα 7**)
- 2) Μικροπιπέτες ακριβείας (**Εικόνα 8**)
- 3) Απορροφητικό χαρτί
- 4) Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm (**Εικόνα 9**)
- 5) Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL (**Εικόνα 10**)
- 6) Υδατόλουτρο (37° C) (**Εικόνα 11**)
- 7) Λογισμικό ανάλυσης των αποτελεσμάτων και κατασκευής γραφικών

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία

- 1) Τα περιεχόμενα των αντιδραστηρίων και τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (**Εικόνα 12**)
- 2) Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραίωση
- 3) Παρασκευάστηκε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας τα 10 ml συμπυκνωμένου διαλύματος με 990 ml απιονισμένου νερού

E) Πειραματική διαδικασία

- 1) Προστέθηκαν 100 μL phosphate-buffered saline PBS στα δύο πρώτα φρεάτια, τα οποία αποτέλεσαν τα φρεάτια ελέγχου (**Εικόνα 13**). Στη συνέχεια, σε κάθε ζεύγος επόμενων φρεατίων προστέθηκαν 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν (**Εικόνα 14**). Στα τελευταία 20 φρεάτια κάθε πλάκας τοποθετήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα που δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη και εξαιρέθηκαν από αυτήν εις διπλούν (duplicates).
- 2) Προστέθηκαν 50 μL ειδικής για το οστών αλκαλικής φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου (**Εικόνα 15**). Η πλάκα σκεπάστηκε και ακολούθησε καλή ανάμιξη και επώαση για μία ώρα στους 37° C (**Εικόνα 16**).
- 3) Ακολούθησε έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης πέντε φορές. Στο τέλος κάθε έκπλυσης δινόταν ιδιαίτερη έμφαση ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα υγρασίας στα φρεάτια (**Εικόνα 17**).
- 4) Προστέθηκαν 50 μL από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα (**Εικόνα 18**). Η πλάκα καλύφτηκε και επώαστηκε εκ νέου για 15 λεπτά (**Εικόνα 19**).
- 5) Προστέθηκαν 50 μL διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα φρεάτια και ακολούθησε καλή ανάμιξη (**Εικόνα 20**).
- 6) Μετρήθηκε αμέσως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm (**Εικόνα 21**).

ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου

- 1) Συντελεστής μεταβλητότητας % < 10
- 2) Spike recovery: 92%- 101%
- 3) Γραμμικότητα

	Διακύμανση %
1:2	94-102
1:4	92-104
1:8	98-105
1:16	94-109

- 4) Ευαισθησία 0,1 ng/mL
- 5) Ειδικότητα: Μη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ ειδικής για το οστόν αλκαλικής φωσφατάσης και άλλων ανάλογων

Μέθοδος προσδιορισμού του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ανταγωνιστικής ELISA με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Bluegene και την συσκευή Luminex 100 device.

A) Αρχή της μεθόδου

Για την ανίχνευση του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης χρησιμοποιήθηκαν ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης και ένα ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης συζευγμένο με υπεροξειδάση. Τα δείγματα τοποθετούνται στα μικροφρεάτια και

επωάζονται για μία ώρα στους 37° C. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και ακολουθεί εκ νέου επώαση στους 37° C για δεκαπέντε λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος δημιουργεί ένα σύμπλεγμα μπλε χρώματος. Στη συνέχεια τοποθετείται στα μικροφρεάτια το διάλυμα παύσης της αντίδρασης το οποίο μετατρέπει το χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο. Η ένταση του χρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης στα δείγματα, εφόσον το αντιγόνο του δείγματος και το πρόσθετο αντιγόνο το συζευγμένο με υπεροξειδάση ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στο μονοκλωνικό αντισώμα έναντι του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης. Εφόσον οι θέσεις πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος είναι περιορισμένες, όσες περισσότερες καταληφθούν από το ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης του δείγματος τόσο λιγότερες θα παραμείνουν διαθέσιμες για την πρόσδεση του αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μία καμπύλη αναφοράς η οποία συσχετίζει την ένταση του χρώματος με τη συγκέντρωση των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης στα δείγματα υπολογίζεται με βάση αυτή την καμπύλη.

B) Αντιδραστήρια

Κάθε αντιδραστήριο απαρτιζόταν από τα εξής μέρη:

- 1) Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης

- 2) Διάλυμα του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης συζευγμένο με υπεροξειδάση (enzyme conjugate)
- 3) Πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης (0 pg/mL, 100 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2500 pg/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς
- 4) Δύο διαλύματα χρωμογόνου (substrates)
- 5) Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (stop solution)
- 6) Διάλυμα πλύσεως (wash solution)

Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος για τη δοκιμασία εξοπλισμός που δεν περιλαμβάνόταν στα αντιδραστήρια αποτελούταν από:

- 1) Μικροπιπέτες ακριβείας
- 2) Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- 3) Απορροφητικό χαρτί
- 4) Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm
- 5) Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL
- 6) Υδατόλουτρο (37° C)
- 7) Λογισμικό ανάλυσης των αποτελεσμάτων και κατασκευής γραφικών

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία

- 1) Τα περιεχόμενα των αντιδραστηρίων και τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραιώση
- 3) Παρασκευάστηκε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας τα 10 ml συμπυκνωμένου διαλύματος με 990 ml απιονισμένου νερού

Ε) Πειραματική διαδικασία

- 1) Προστέθηκαν 100 μL PBS στα δύο πρώτα φρεάτια, τα οποία αποτέλεσαν τα φρεάτια ελέγχου. Στη συνέχεια, σε κάθε ζεύγος επόμενων φρεατίων προστέθηκαν 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν. Στα τελευταία 20 φρεάτια κάθε πλάκας τοποθετήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα που δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη και εξαιρέθηκαν από αυτήν εις διπλούν (duplicates).
- 2) Προστέθηκαν 50 μL ενδιάμεσου τμήματος της οστεοκαλσίνης συζευγμένου με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου. Η πλάκα σκεπάστηκε και ακολούθησε καλή ανάμιξη και επώαση για μία ώρα στους 37° C.
- 3) Ακολούθησε έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης πέντε φορές. Στο τέλος κάθε έκπλυσης δινόταν ιδιαίτερη έμφαση ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα υγρασίας στα φρεάτια.

- 4) Προστέθηκαν 50 μL από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα. Η πλάκα καλύφτηκε και επώαστηκε εκ νέου για 15 λεπτά.
- 5) Προστέθηκαν 50 μL διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα φρεάτια και ακολούθησε καλή ανάμιξη.
- 6) Μετρήθηκε αμέσως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου

- 1) Συντελεστής μεταβλητότητας %: 4.4, 5.6
- 2) Spike recovery: 94%- 103%
- 3) Γραμμικότητα

	Διακύμανση %
1:2	96-101
1:4	93-107
1:8	92-100
1:16	96-108

- 4) Ευαισθησία 1 pg/mL
- 5) Ειδικότητα: Μη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του ενδιάμεσου κλάσματος της οστεοκαλσίνης και άλλων ανάλογων

Μέθοδος προσδιορισμού προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ανταγωνιστικής ELISA με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Bluegene.

A) Αρχή της μεθόδου

Για την ανίχνευση του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I χρησιμοποιήθηκαν ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I και ένα προπεπτίδιο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I συζευγμένο με υπεροξειδάση. Τα δείγματα τοποθετούνται στα μικροφρεάτια και επωάζονται για μία ώρα στους 37° C. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και ακολουθεί εκ νέου επώαση στους 37° C για δεκαπέντε λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος δημιουργεί ένα σύμπλεγμα μπλε χρώματος. Στη συνέχεια προστίθεται στα μικροφρεάτια το διάλυμα πάυσης της αντίδρασης το οποίο μετατρέπει το χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο. Η ένταση του χρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I στα δείγματα, εφόσον το αντιγόνο του δείγματος και το πρόσθετο αντιγόνο το συζευγμένο με υπεροξειδάση ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I. Εφόσον οι θέσεις πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος είναι περιορισμένες, όσες περισσότερες καταληφθούν από το προπεπτίδιο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I του δείγματος τόσο λιγότερες θα παραμείνουν διαθέσιμες για την πρόσδεση του πρόσθετου αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μία καμπύλη αναφοράς η οποία συσχετίζει την ένταση του χρώματος με τη συγκέντρωση των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I στα δείγματα υπολογίζεται με βάση την καμπύλη.

B) Αντιδραστήρια

Κάθε αντιδραστήριο απαρτιζόταν από τα εξής μέρη:

- 1) Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I
- 2) Διάλυμα προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I συζευγμένο με υπεροξειδάση (enzyme conjugate)
- 3) Πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (0 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2500 pg/mL, 5000 pg/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς
- 4) Δύο διαλύματα χρωμογόνου (substrates)
- 5) Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (stop solution)
- 6) Διάλυμα πλύσεως (wash solution)

Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος για τη δοκιμασία εξοπλισμός που δεν περιλαμβανόταν στα αντιδραστήρια αποτελούταν από:

- 1) Μικροπιπέτες ακριβείας
- 2) Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- 3) Απορροφητικό χαρτί
- 4) Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm

- 5) Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL
- 6) Υδατόλουτρο (37° C)
- 7) Λογισμικό ανάλυσης των αποτελεσμάτων και κατασκευής γραφικών

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία

- 1) Τα περιεχόμενα των αντιδραστηρίων και τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραιώση
- 3) Παρασκευάστηκε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας τα 10 ml συμπυκνωμένου διαλύματος με 990 ml απιονισμένου νερού

Ε) Πειραματική διαδικασία

- 1) Προστέθηκαν 100 μL PBS στα δύο πρώτα φρεάτια, τα οποία αποτέλεσαν τα φρεάτια ελέγχου. Στη συνέχεια, σε κάθε ζεύγος επόμενων φρεατίων προστέθηκαν 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν. Στα τελευταία 20 φρεάτια κάθε πλάκας τοποθετήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα που δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη και εξαιρέθηκαν από αυτήν εις διπλούν (duplicates).
- 2) Προστέθηκαν 50 μL προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I συζευγμένου με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων

ελέγχου. Η πλάκα σκεπάστηκε και ακολούθησε καλή ανάμιξη και επώαση για μία ώρα στους 37° C.

- 3) Ακολούθησε έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης πέντε φορές. Στο τέλος κάθε έκπλυσης δινόταν ιδιαίτερη έμφαση ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα υγρασίας στα φρεάτια.
- 4) Προστέθηκαν 50 μ L από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα. Η πλάκα καλύφτηκε και επώαστηκε εκ νέου για 15 λεπτά.
- 5) Προστέθηκαν 50 μ L διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα φρεάτια και ακολούθησε καλή ανάμιξη.
- 6) Μετρήθηκε αμέσως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου

- 1) Συντελεστής μεταβλητότητας %: 4,4, 5,6
- 2) Spike recovery: 94%- 103%
- 3) Γραμμικότητα

	Διακύμανση %
1:2	96-101
1:4	93-107
1:8	92-100
1:16	96-108

- 4) Ευαισθησία 1 pg/mL
- 5) Ειδικότητα: Μη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του προπεπτιδίου αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I και άλλων ανάλογων

Μέθοδος προσδιορισμού ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ανταγωνιστικής ELISA με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Bluegene και την συσκευή Luminex 100 device.

A) Αρχή της μεθόδου

Για την ανίχνευση της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης χρησιμοποιήθηκαν ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης και ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση συζευγμένη με υπεροξειδάση. Τα δείγματα τοποθετούνται στα μικροφρεάτια και επωάζονται για μία ώρα στους 37° C. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και ακολουθεί εκ νέου επώαση στους 37° C για δεκαπέντε λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος δημιουργεί ένα σύμπλεγμα μπλε χρώματος. Στη συνέχεια προστίθεται στα μικροφρεάτια το διάλυμα πάυσης της αντίδρασης το οποίο μετατρέπει το χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο. Η ένταση του χρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm. Η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης στα δείγματα, εφόσον το αντιγόνο του δείγματος και το πρόσθετο αντιγόνο το συζευγμένο με υπεροξειδάση ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης. Εφόσον οι θέσεις

πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος είναι περιορισμένες, όσες περισσότερες καταληφθούν από την ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση του δείγματος τόσο λιγότερες θα παραμείνουν διαθέσιμες για την πρόσδεση του πρόσθετου αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μία καμπύλη αναφοράς η οποία συσχετίζει την ένταση του χρώματος με τη συγκέντρωση των δειγμάτων. Η συγκέντρωση της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης στα δείγματα υπολογίζεται με βάση την καμπύλη.

B) Αντιδραστήρια

Κάθε αντιδραστήριο απαρτιζόταν από τα εξής μέρη:

- 1) Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης
- 2) Διάλυμα ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση (enzyme conjugate)
- 3) Πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (0 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς
- 4) Δύο διαλύματα χρωμογόνου (substrates)
- 5) Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (stop solution)
- 6) Διάλυμα πλύσεως (wash solution)

Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος για τη δοκιμασία εξοπλισμός που δεν περιλαμβάνονταν στα αντιδραστήρια αποτελούταν από:

- 1) Μικροπιπέτες ακριβείας
- 2) Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- 3) Απορροφητικό χαρτί
- 4) Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm
- 5) Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL
- 6) Υδατόλουτρο (37° C)
- 7) Λογισμικό ανάλυσης των αποτελεσμάτων και κατασκευής γραφικών

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία

- 1) Τα περιεχόμενα των αντιδραστηρίων και τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραίωση
- 3) Παρασκευάστηκε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας τα 10 ml συμπυκνωμένου διαλύματος με 990 ml απιονισμένου νερού

Ε) Πειραματική διαδικασία

- 1) Προστέθηκαν 100 μ L PBS στα δύο πρώτα φρεάτια, τα οποία αποτέλεσαν τα φρεάτια ελέγχου. Στη συνέχεια, σε κάθε ζεύγος επόμενων φρεατίων

προστέθηκαν 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν. Στα τελευταία 20 φρεάτια κάθε πλάκας τοποθετήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα που δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη και εξαιρέθηκαν από αυτήν εις διπλούν (duplicates).

- 2) Προστέθηκαν 50 μL ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου. Η πλάκα σκεπάστηκε και ακολούθησε καλή ανάμιξη και επώαση για μία ώρα στους 37° C.
- 3) Ακολούθησε έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης πέντε φορές. Στο τέλος κάθε έκπλυσης δινόταν ιδιαίτερη έμφαση ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα υγρασίας στα φρεάτια.
- 4) Προστέθηκαν 50 μL από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα. Η πλάκα καλύφτηκε και επώαστηκε εκ νέου για 15 λεπτά.
- 5) Προστέθηκαν 50 μL διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα φρεάτια και ακολούθησε καλή ανάμιξη.
- 6) Μετρήθηκε αμέσως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου

- 1) Συντελεστής μεταβλητότητας % < 10
- 2) Spike recovery: 92%- 101%
- 3) Γραμμικότητα

	Διακύμανση %
1:2	94-102
1:4	92-104
1:8	98-105

- 4) Ευαισθησία 0,1 ng/mL
- 5) Ειδικότητα: Μη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης και άλλων ανάλογων

Μέθοδος προσδιορισμού καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (CTX-I)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA τύπου sandwich με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Novateinbio και την συσκευή Luminex 100 device.

A) Αρχή της μεθόδου

Για την ανίχνευση καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I διατίθεται ειδική πλάκα προεπικαλυμμένη με μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια της πλάκας και τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I συνδέονται, εφόσον είναι παρόντα, με τα αντισώματα που βρίσκονται στα φρεάτια. Για την ποσοτική εκτίμηση των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I ένα δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση προστίθεται στα φρεάτια. Με αυτό τον τρόπο, τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια

κολλαγόνου τύπου I ακινητοποιούνται και εγκλωβίζονται σαν sandwich από τα δύο αντισώματα. Το ένζυμο αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά του για σύντομο χρονικό διάστημα. Σε αυτό, τα φρεάτια που περιέχουν καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτιδία κολλαγόνου τύπου I και το αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο παρουσιάζουν αλλαγή στο χρώμα. Η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος σουλφουρικού οξέος και η υπάρχουσα χρωματική αλλαγή μετράται φασματοφωτομετρικά στα 450 nm.

B) Αντιδραστήρια

Κάθε αντιδραστήριο απαρτιζόταν από τα εξής μέρη:

- 1) Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I
- 2) Διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος έναντι των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I συζευγμένο με υπεροξειδάση (enzyme conjugate)
- 3) Πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I (0 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς
- 4) Διαλυτικό διάλυμα (sample diluent)
- 5) Δύο διαλύματα χρωμογόνου (substrates)
- 6) Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας (stop solution)
- 7) Διάλυμα πλύσεως (wash solution)

Γ) Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο απαραίτητος για τη δοκιμασία εξοπλισμός που δεν περιλαμβάνονταν στα αντιδραστήρια αποτελούνταν από:

- 1) Μικροπιπέτες ακριβείας
- 2) Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- 3) Απορροφητικό χαρτί
- 4) Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm
- 5) Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL
- 6) Υδατόλουτρο (37° C)
- 7) Λογισμικό ανάλυσης των αποτελεσμάτων και κατασκευής γραφικών

Δ) Προετοιμασία για την πειραματική διαδικασία

- 1) Τα περιεχόμενα των αντιδραστηρίων και τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραίωση
- 3) Παρασκευάστηκε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας τα 25 mL συμπυκνωμένου διαλύματος με 475 mL απιονισμένου νερού

Ε) Πειραματική διαδικασία

- 1) Προστέθηκαν 50 μL διαλυτικού στα δύο πρώτα φρεάτια, τα οποία αποτέλεσαν τα φρεάτια ελέγχου. Στη συνέχεια, σε κάθε ζεύγος επόμενων φρεατίων

προστέθηκαν 50 μL από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, τοποθετήθηκαν 50 μL δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν. Στα τελευταία 20 φρεάτια κάθε πλάκας τοποθετήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα που δεν ολοκλήρωσαν τη μελέτη και εξαιρέθηκαν από αυτήν εις διπλούν (duplicates).

- 2) Προστέθηκαν 100 μL πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού για τα καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I συζευγμένου με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου. Η πλάκα σκεπάστηκε και ακολούθησε καλή ανάμιξη και επώαση για μία ώρα στους 37° C.
- 3) Ακολούθησε έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης πέντε φορές. Στο τέλος κάθε έκπλυσης δινόταν ιδιαίτερη έμφαση ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα υγρασίας στα φρεάτια.
- 4) Προστέθηκαν 50 μL από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα. Η πλάκα καλύφτηκε και επώαστηκε εκ νέου για 15 λεπτά.
- 5) Προστέθηκαν 50 μL διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλα τα φρεάτια και ακολούθησε καλή ανάμιξη.
- 6) Μετρήθηκε αμέσως η οπτική πυκνότητα στα 450 nm.

ΣΤ) Χαρακτηριστικά μεθόδου

- 1) Ευαισθησία 0,1 ng/mL
- 2) Ειδικότητα: Μη σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των καρβοξυτελικών διασταυρούμενων τελοπεπτιδίων κολλαγόνου τύπου I και άλλων ανάλογων.

Στατιστική ανάλυση

Η περιγραφή των δεδομένων γίνεται αρχικά μέσω πινάκων όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (SD) για τα επίπεδα των εξεταζομένων δεικτών ανά χρονική στιγμή (προεγχειρητικά: εβδομάδα 0 και μετεγχειρητικά: εβδομάδες 1, 2, 4 και 6) και ομάδα (PTGM, AGM, CM). Τα p-values σε αυτούς τους πίνακες προέρχονται από one-way ANOVA για διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων σε κάθε χρονική στιγμή αλλά θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη καθώς αποτελούν μέρος της διερευνητικής ανάλυσης ενώ η κατάλληλη ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στη συνέχεια.

Τα δεδομένα για κάθε δείκτη παρουσιάζονται και γραφικά: αρχικά μέσω θηκογραμμάτων (box-plots) και στη συνέχεια μέσω profile-plots στα οποία απεικονίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ανά χρονική στιγμή και ομάδα.

Στη συνέχεια τα δεδομένα για κάθε δείκτη (όλες οι μετρήσεις σε όλες τις χρονικές στιγμές και όλες τις ομάδες) αναλύονται μέσω μοντέλων παλινδρόμησης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα τα μοντέλα αυτά επιτρέπουν συσχέτιση στις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου πειραματόζωου. Για τη μοντελοποίηση του μέσου εισήχθησαν επιδράσεις της ομάδας, του χρόνου καθώς και της αλληλεπίδρασής τους. Έτσι επιτρέπονται διαφορές στα επίπεδα των μελετούμενων δεικτών μεταξύ ομάδων και χρονικών στιγμών καθώς και διαφορές μεταξύ των ομάδων όσον αφορά στη συνολική χρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη. Η δομή του πίνακα διασποράς-συνδιασποράς των υπολοίπων επιλέχθηκε χωριστά για κάθε δείκτη με βάση το κριτήριο του ελέγχου πιθανοφάνειας (likelihood ratio test). Από τους αντίστοιχους ελέγχους φάνηκε ότι για το δείκτη BALP η

καταλληλότερη δομή ήταν η exchangeable με διαφορετικές παραμέτρους ανά ομάδα ενώ για όλες τους υπόλοιπους δείκτες η επικρατέστερη δομή που ήταν η unstructured.

Οι συντελεστές του μοντέλου για κάθε δείκτη παρουσιάζονται συνολικά σε πίνακα (μαζί με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης – 95%CI) και τα αντίστοιχα p-values από Wald tests. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνολικοί έλεγχοι (global tests – Wald type) για διαφορές μεταξύ των ομάδων προεγχειρητικά, μεταβολές στο χρόνο μέσα σε κάθε ομάδα και διαφορά στη χρονική εξέλιξη του δείκτη μεταξύ των ομάδων. Με βάση τις εκτιμήσεις του κάθε μοντέλου υπολογίζονται και παρουσιάζονται γραφικά οι μέσες τιμές ανά χρονική στιγμή και ομάδα συνοδευόμενες από τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης. Τέλος εκτιμώνται όλες οι απόλυτες και σχετικές % μεταβολές του εκάστοτε δείκτη μεταξύ όλων των χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακα και περιλαμβάνουν 95% διαστήματα εμπιστοσύνης για τις μεταβολές και p-value από έλεγχο Wald για διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων.

Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των διαφόρων δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης παρουσιάζονται μέσω στικρογραμμάτων στα οποία αναγράφεται και η τιμή του Pearson correlation coefficient (r) μαζί με το αντίστοιχο p-value.

Σημειώνεται ότι υπήρχαν 4/225 (1,78%) μετρήσεις του δείκτη CTX-I που ήταν μικρότερες από το κατώτατο όριο ανίχνευσης, 3/225 (1,33%) μετρήσεις του δείκτη PINP με το ίδιο πρόβλημα και 2/225 (0,89%) μετρήσεις του δείκτη PINP που ήταν μεγαλύτερες από το ανώτατο όριο ανίχνευσης. Για τις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι περικομμένης παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθούν οι υπό συνθήκη αναμενόμενες τιμές οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν για να αντικαταστήσουν τις περικομμένες αυτές παρατηρήσεις πριν από οποιαδήποτε ανάλυση.

Το μέγεθος του δείγματος (3 ομάδες των 15 πειραματόζωων) κρίθηκε επαρκές καθώς με ισχύ 80% ($\alpha=0.05$) μπόρεσαν να ανιχνευτούν διαφορές μέτριας κλίμακας ($d=0.478$) στα αποτελέσματα της δεύτερης εβδομάδας με one-way ANOVA. Στην πραγματικότητα η ισχύς της μελέτης αναμένεται ακόμα μεγαλύτερη (ή αντίστοιχα υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης διαφορών μικρότερης κλίμακας) καθώς για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων συνυπολογίζοντας τις συσχετίσεις μεταξύ των πειραματόζωων.

Η ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο Stata 13.1 (Stata Corp., Texas USA).

Υπόμνημα 1: Δομή και ερμηνεία των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Η μέση τιμή του εκάστοτε δείκτη Y (πχ BALP, CTX-I κλπ) κατά τη χρονική στιγμή t (week 0, 1, 2, 4, 6) συμβολίζεται με $E[Y_t]$ και σύμφωνα με τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν δίνεται από την πιο κάτω σχέση:

$$\begin{aligned}
 E[Y_t] = & \beta_0 + \\
 & + \beta_1 * I(\text{Group}=\text{PTGM}) + \beta_2 * I(\text{Group}=\text{AGM}) + \\
 & + \beta_3 * I(\text{Week}=1) + \beta_4 * I(\text{Week}=2) + \beta_5 * I(\text{Week}=4) + \beta_6 * I(\text{Week}=6) + \\
 & + \beta_7 * I(\text{Week}=1 \ \& \ \text{Group}=\text{PTGM}) + \beta_8 * I(\text{Week}=2 \ \& \ \text{Group}=\text{PTGM}) + \beta_9 * I(\text{Week}=4 \\
 & \ \& \ \text{Group}=\text{PTGM}) + \beta_{10} * I(\text{Week}=6 \ \& \ \text{Group}=\text{PTGM}) + \\
 & + \beta_{11} * I(\text{Week}=1 \ \& \ \text{Group}=\text{AGM}) + \beta_{12} * I(\text{Week}=2 \ \& \ \text{Group}=\text{AGM}) \\
 & + \beta_{13} * I(\text{Week}=4 \ \& \ \text{Group}=\text{AGM}) + \beta_{14} * I(\text{Week}=6 \ \& \ \text{Group}=\text{AGM})
 \end{aligned}$$

Η συνάρτηση I (Συνθήκη) παίρνει την τιμή 1 όταν η συνθήκη αληθεύει και 0 όταν δεν αληθεύει

Ερμηνεία συντελεστών

β_0 : Σταθερά (Επίπεδα Y την εβδομάδα 0 για την ομάδα CM)

β_1, β_2 : Επιδράσεις Ομάδας (διαφορές στα επίπεδα της Y μεταξύ των ομάδων κατά την εβδομάδα 0)

β_1 διαφορά PTGM-CM την εβδομάδα 0

β_2 διαφορά AGM-CM την εβδομάδα 0

$\beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$: Επιδράσεις χρόνου (μεταβολές στα επίπεδα της Y μεταξύ χρονικών στιγμών για την ομάδα CM)

β_3 μεταβολή Εβδομάδα1-Εβδομάδα0 για την ομάδα CM

β_4 μεταβολή Εβδομάδα1-Εβδομάδα0 για την ομάδα CM

β_5 μεταβολή Εβδομάδα1-Εβδομάδα0 για την ομάδα CM

β_6 μεταβολή Εβδομάδα1-Εβδομάδα0 για την ομάδα CM

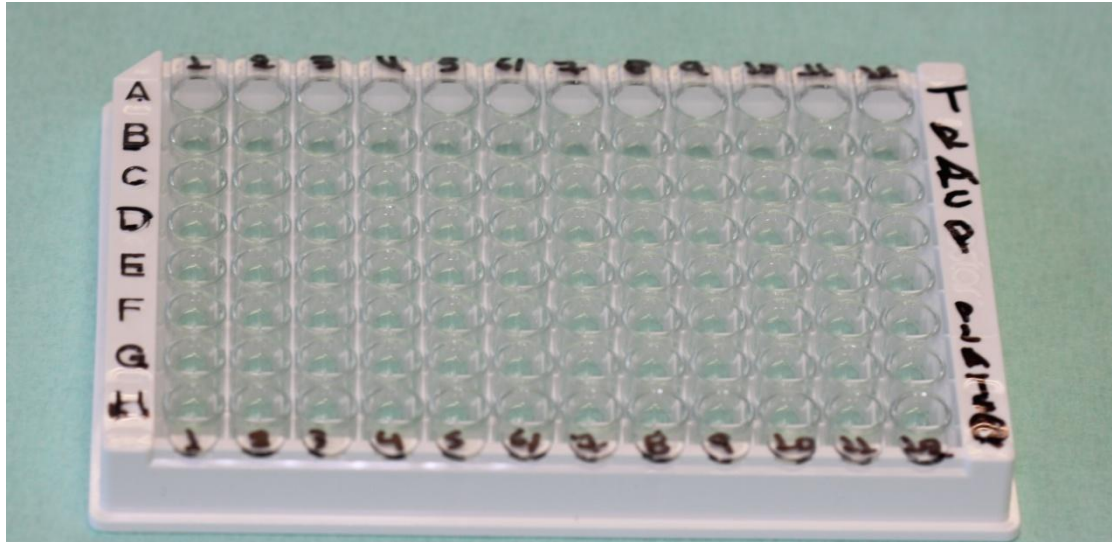
$\beta_7 \dots \beta_{14}$: Αλληλεπιδράσεις Ομάδας-Χρόνου (διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς τις χρονικές μεταβολές)

π.χ. η χρονική μεταβολή Εβδομάδα1-Εβδομάδα0 για την ομάδα CM είναι β_3 αλλά για την ομάδα PTGM είναι $\beta_3+\beta_7$ ενώ για την ομάδα AGM η αντίστοιχη μεταβολή είναι $\beta_3+\beta_{11}$

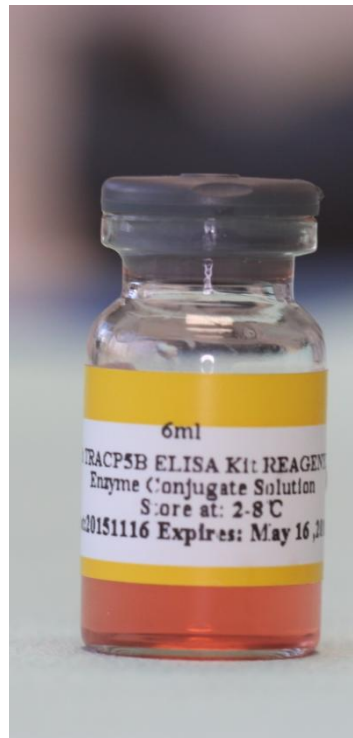
Οι εκτιμώμενες μέσες τιμές της Y ανά ομάδα και χρονική στιγμή δίνονται στον πιο κάτω πίνακα (μπλε=επιδράσεις ομάδας, κόκκινο=επιδράσεις χρόνου, πορτοκαλί=αλληλεπιδράσεις Ομάδας-Χρόνου):

	PTGM	AGM	CM
Εβδομάδα 0	$\beta_0 + \beta_1$	$\beta_0 + \beta_2$	β_0
Εβδομάδα 1	$\beta_0 + \beta_1 + \beta_3 + \beta_7$	$\beta_0 + \beta_2 + \beta_3 + \beta_{11}$	$\beta_0 + \beta_3$
Εβδομάδα 2	$\beta_0 + \beta_1 + \beta_4 + \beta_8$	$\beta_0 + \beta_2 + \beta_4 + \beta_{12}$	$\beta_0 + \beta_4$
Εβδομάδα 4	$\beta_0 + \beta_1 + \beta_5 + \beta_9$	$\beta_0 + \beta_2 + \beta_5 + \beta_{13}$	$\beta_0 + \beta_5$
Εβδομάδα 6	$\beta_0 + \beta_1 + \beta_6 + \beta_{10}$	$\beta_0 + \beta_2 + \beta_6 + \beta_{14}$	$\beta_0 + \beta_6$

Σε όλα τα μοντέλα ισχύει ότι η τιμή του δείκτη Y κατά τη στιγμή t για το πειραματόζωο i (Y_{it}) δίνεται από τη σχέση $Y_{it} = E[Y_t] + e_{it}$ όπου τα e_{it} είναι τα υπόλοιπα (residuals) του μοντέλου. Τα υπόλοιπα σύμφωνα με το μοντέλο κατανέμονται κανονικά και είναι ανεξάρτητα μεταξύ των πειραματόζωων. Αντιθέτως, κατάλοιπα διαφορετικών χρονικών στιγμών αλλά του ίδιου πειραματόζωου επιτρέπεται να έχουν συσχέτιση (η οποία και εκτιμάται όπως και η διασπορά των υπολοίπων). Η δομή που καθορίζει τις επιτρεπτές συσχετίσεις καθώς και τη διασπορά των υπολοίπων επιλέχθηκε ξεχωριστά για κάθε δείκτη (βλέπε Στατιστική ανάλυση) με γνώμονα την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.



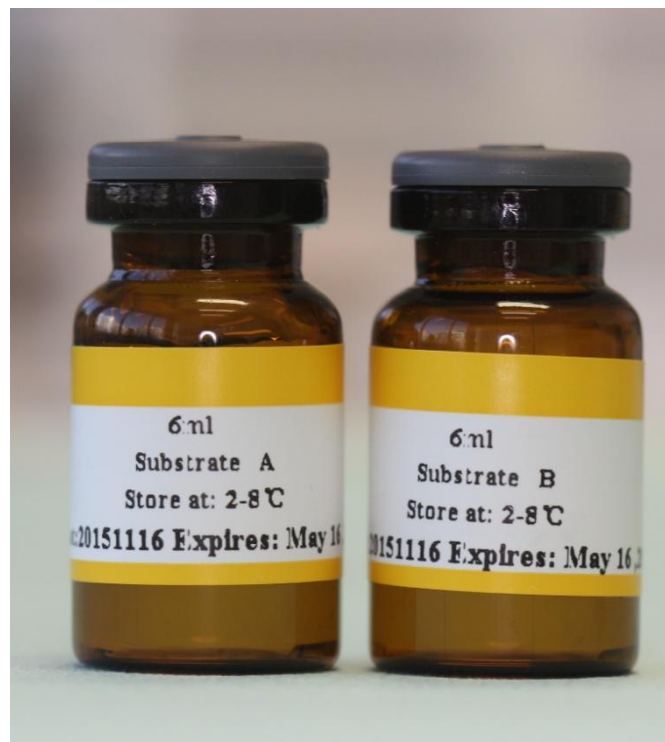
Εικόνα 1. Ειδική πλάκα (microtiter plate) με προεπικαλυμμένα φρεάτια (precoated wells) με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης (TRAP5b)



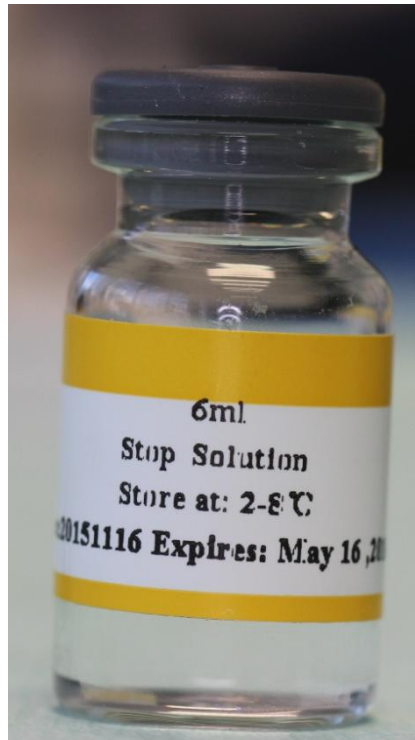
Εικόνα 2. Διάλυμα αντιγόνου συζευγμένου με υπεροξειδάση (enzyme conjugate)



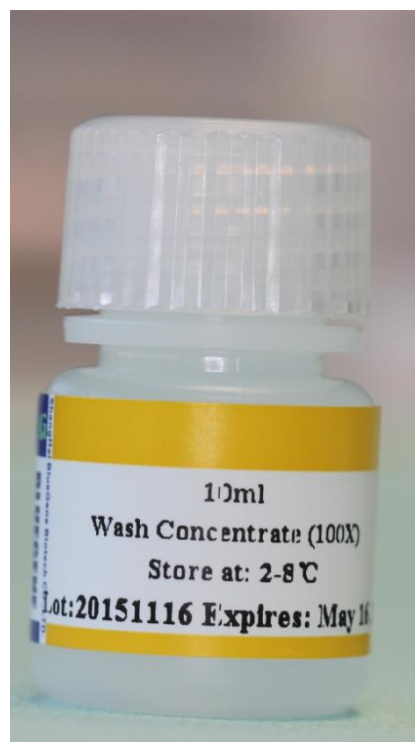
Εικόνα 3. Πρότυπα διαλύματα του αντιγόνου γνωστών συγκεντρώσεων (0 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς



Εικόνα 4. Διαλύματα χρωμογόνου (substrates)



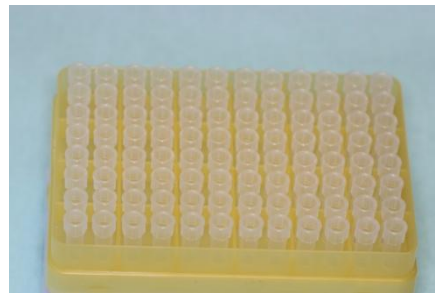
Εικόνα 5. Διάλυμα αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας



Εικόνα 6. Διάλυμα έκπλυσης (wash solution)



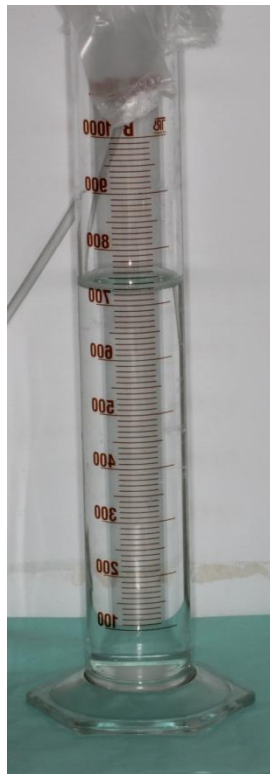
Εικόνα 7. Διάλυμα PBS



Εικόνα 8. Μικροπιπέτες ακριβείας



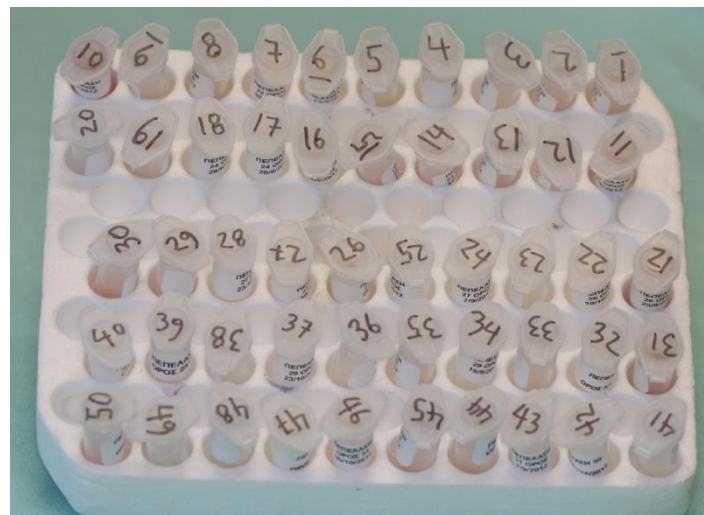
Εικόνα 9. Φωτόμετρο ικανό να μετρά την απορρόφηση στα 450 nm



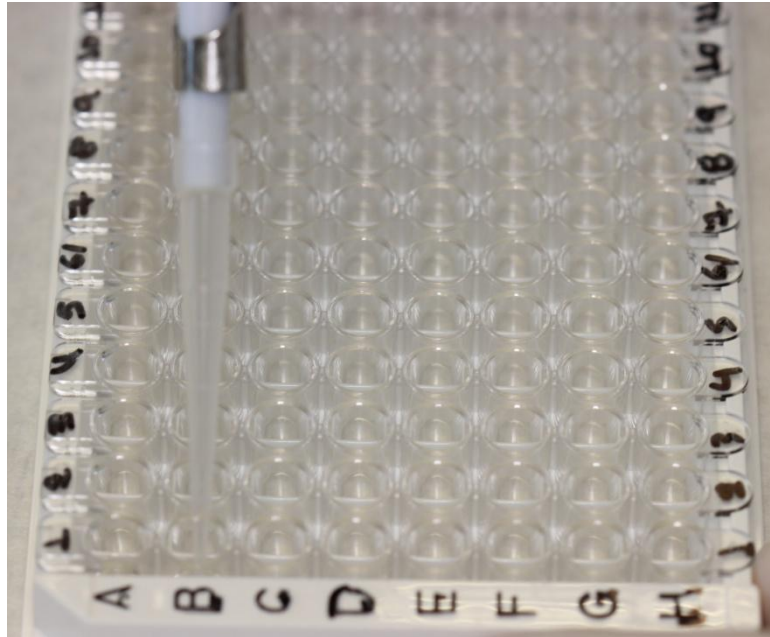
Εικόνα 10. Δοχείο για την παρασκευή διαλύματος έκπλυσης ενός λίτρου με διαβάθμιση ανά 100 mL



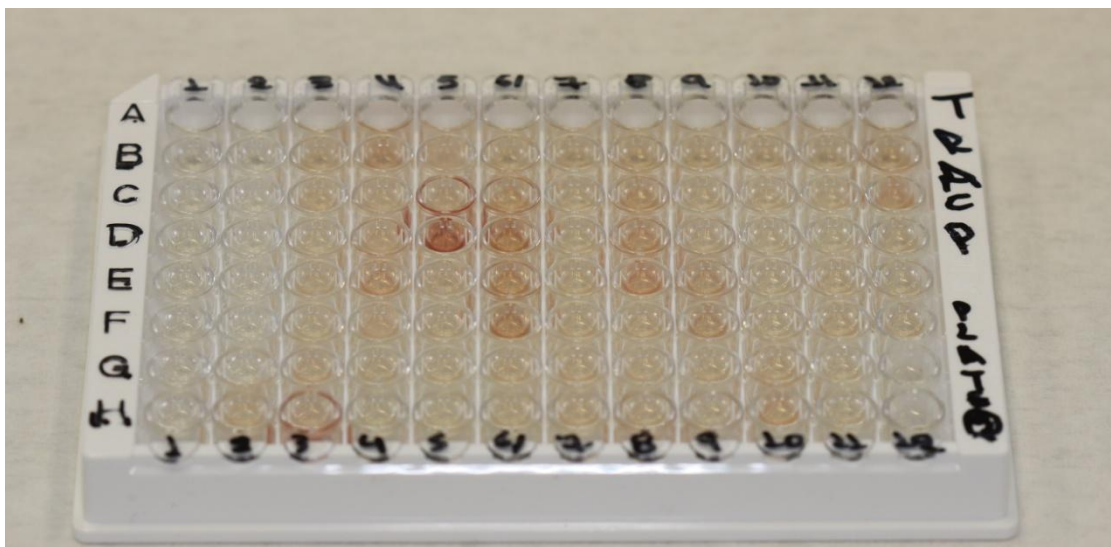
Εικόνα 11. Υδατόλουτρο (37° C)



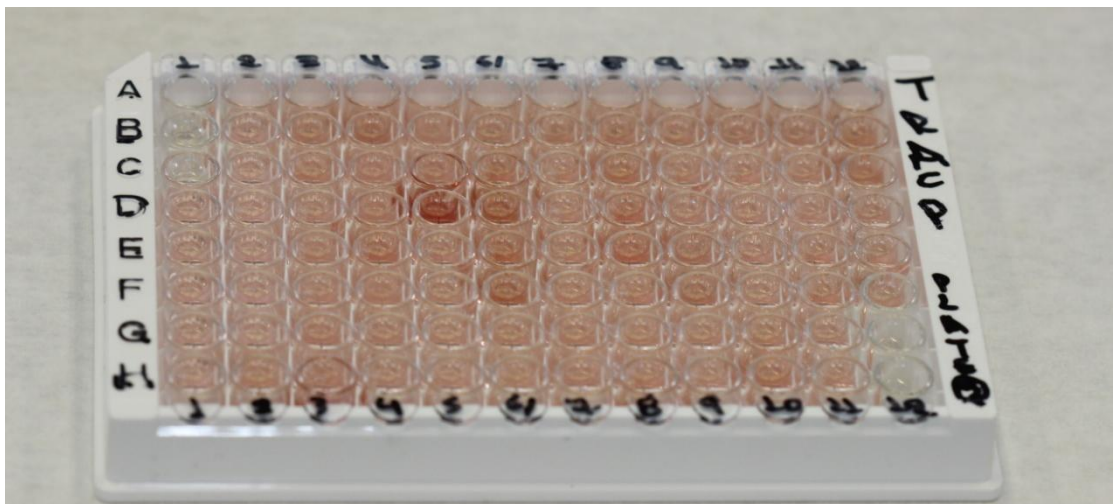
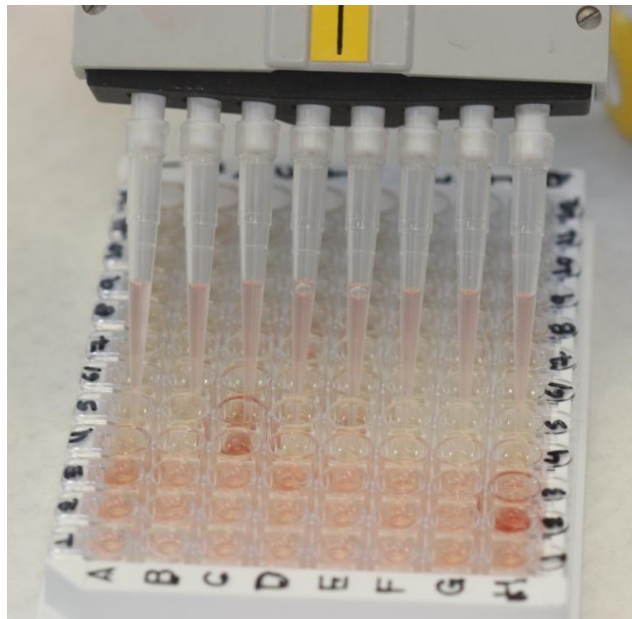
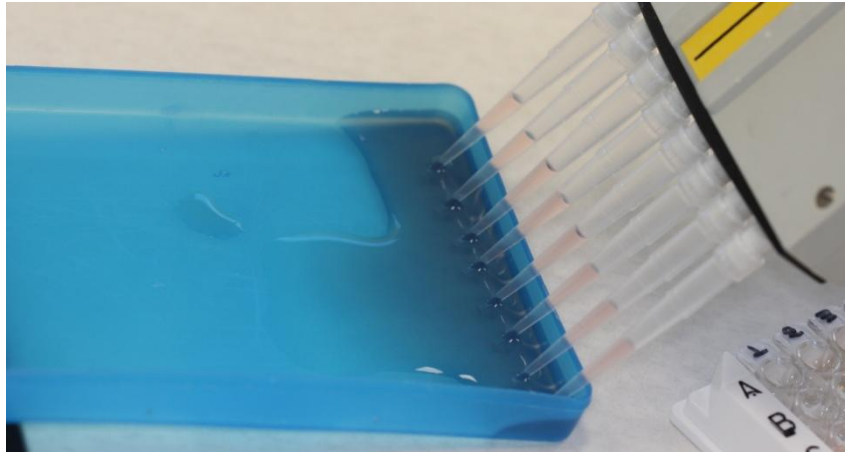
Εικόνα 12. Απόψυξη δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου



Εικόνα 13. Προσθήκη 100 μ L PBS στα δύο πρώτα φρεάτια (φρεάτια ελέγχου)



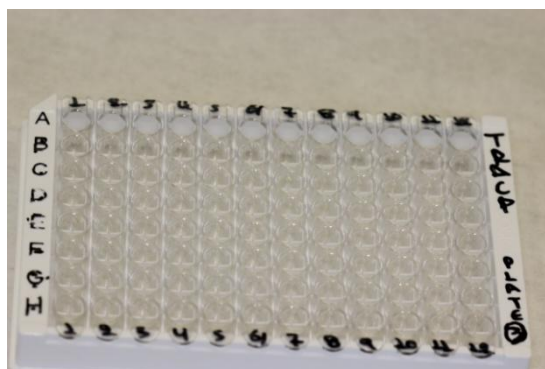
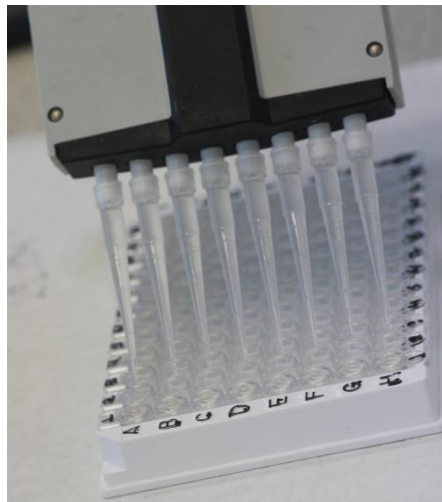
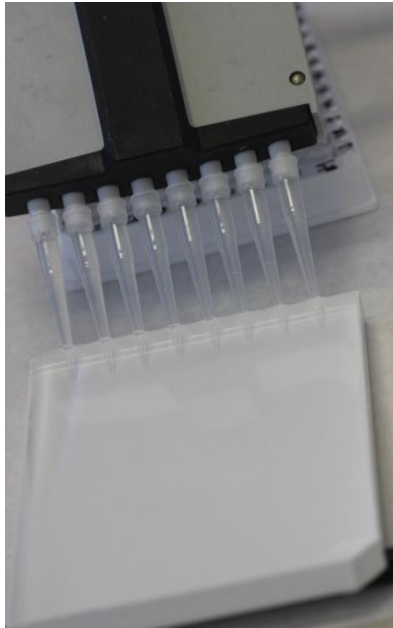
Εικόνα 14. Προσθήκη 100 μ L από τα πρότυπα διαλύματα με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης ανά ζεύγος επόμενων φρεατίων και τοποθέτηση 100 μ L δείγματος ορού στο καθένα από τα φρεάτια που ακολούθησαν.



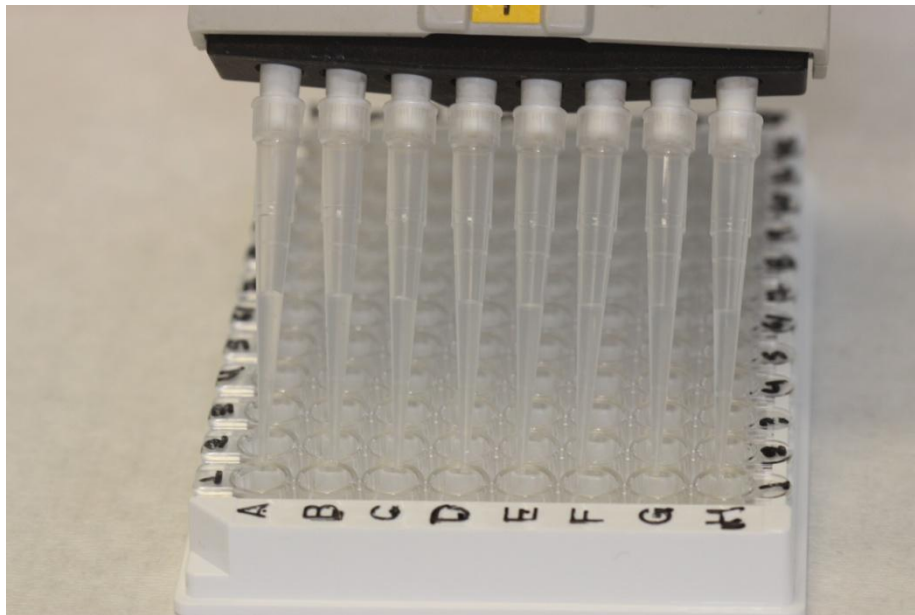
Εικόνα 15. Προσθήκη 50 μL ανθεκτικής στο άλας του τρυγικού οξέος όξινης φωσφατάσης συζευγμένης με υπεροξειδάση σε όλα τα φρεάτια εκτός των φρεατίων ελέγχου



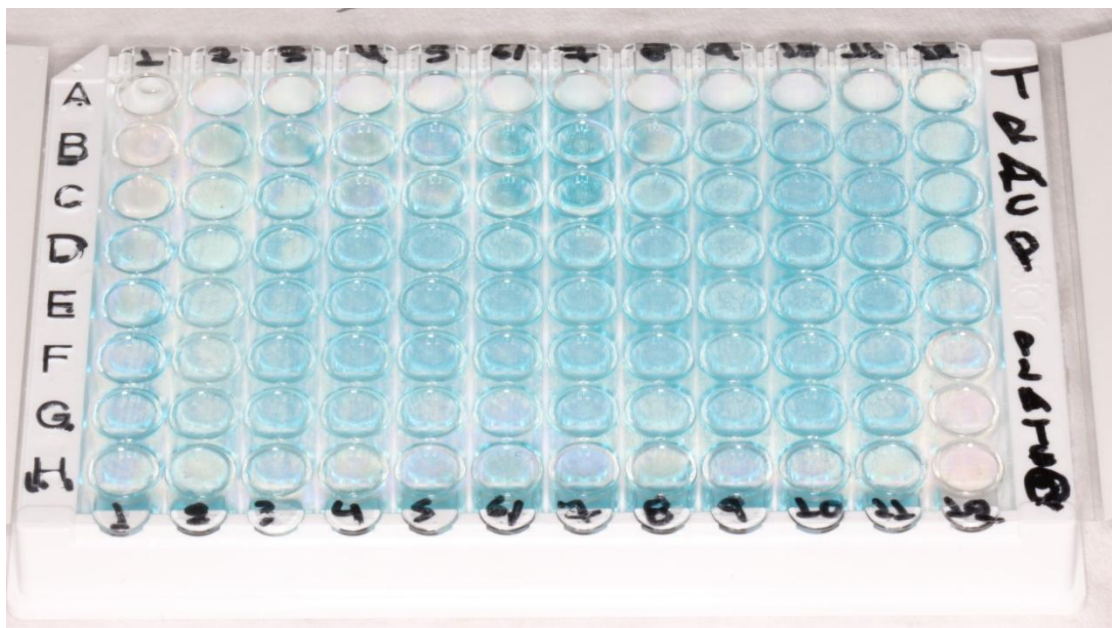
Εικόνα 16. Οι πλάκες σκεπασμένες και τοποθετημένες στο υδατόλουτρο στους 37° C.



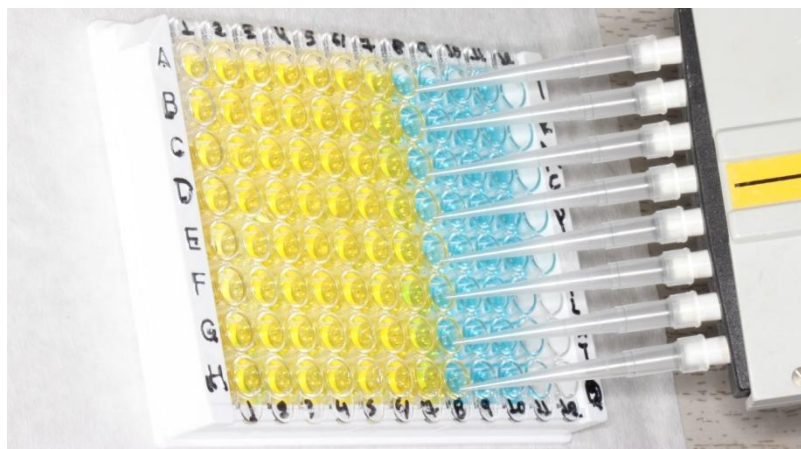
Εικόνα 17. Έκπλυση της πλάκας με το διάλυμα έκπλυσης και στέγνωμα



Εικόνα 18. Προθήκη 50 μ L από το κάθε χρωμογόνο διάλυμα



Εικόνα 19. Η πλάκα μετά τη δεύτερη επώαση για 15 λεπτά



Εικόνα 20. Προσθήκη 50 μ L διαλύματος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας



Εικόνα 21. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450 nm

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το υλικό της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι δείγματα φλεβικού αίματος που προήλθαν από 45 κουνέλια τύπου New Zealand, στα οποία είχαν προκληθεί πειραματικά ενδοοστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και είχαν αντιμετωπισθεί με πορώδεις κόκκους τιτανίου και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (Ομάδα PTGM), με αυτογενές οστικό μόσχευμα και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (Ομάδα AGM) ή με απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (Ομάδα CM). Σε 9 πειραματόζωα (3 από κάθε ομάδα) το πειραματικό τμήμα της μελέτης δεν ολοκληρώθηκε, οπότε αυτά τα πειραματόζωα εξαιρέθηκαν από την μελέτη και αντικαταστάθηκαν από 9 νέα πειραματόζωα. Συνεπώς, ο συνολικός αριθμός των πειραματοζώων που ολοκλήρωσαν όλο το πειραματικό τμήμα της μελέτης, συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν και αξιολογήθηκαν ήταν 45 πειραματόζωα (15 σε κάθε ομάδα). Το ποσοστό επιβίωσης ήταν 83,33 % για κάθε ομάδα πειραματοζώων. Η αιτία θανάτου αφορούσε σε ασφυξία λόγω βλάβης στο σύστημα εξαερισμού του εργαστηρίου κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Σε κάθε πειραματόζωο, πριν από την έναρξη της πειραματικής πρόκλησης της ενδοοστικής βλάβης είχε γίνει αιμοληψία φλεβικού αίματος για να προσδιοριστούν οι αρχικές (προεγχειρητικές) τιμές των βιολογικών παραγόντων που θα εξετάζονταν. Ακολούθως, σε κάθε πειραματόζωο έγινε αιμοληψία φλεβικού αίματος την 1η, 2η, 4η και 6η (τελικές) μετεγχειρητική εβδομάδα για να προσδιοριστούν οι μετεγχειρητικές τιμές των υπό εξέταση βιολογικών παραγόντων. Συνολικά σε κάθε κουνέλι έγιναν πέντε αιμοληψίες φλεβικού αίματος και αυτά τα δείγματα ορού αίματος από τα 45 κουνέλια (225 δείγματα) αποτέλεσαν το υλικό της παρούσας πειραματικής μελέτης. Από τα 225 δείγματα ορού αίματος 75 ανήκαν στην ομάδα CM, 75 ανήκαν στην

ομάδα PTGM και 75 στην ομάδα AGM. Για κάθε χρονική στιγμή υπήρχαν 45 δείγματα. Στα δείγματα ορού προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των βιολογικών παραγόντων BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I και TRAP5b με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Για κάθε δείκτη οστικού μεταβολισμού που μελετήθηκε υπήρχαν 45 δείγματα.

Περιγραφή των δεδομένων

Η περιγραφή των δεδομένων γίνεται αρχικά μέσω πινάκων (**πίνακας 2.1-2.5**) όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (\pm SD) για τα επίπεδα των εξεταζόμενων δεικτών (BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I, TRAP5b) ανά ομάδα πειραματοζώων (PTGM, AGM, CM) και χρονική στιγμή μέτρησης (προεγχειρητικά-0, 1^η, 2^η, 4^η, 6^η εβδομάδα). Τα p-values σε αυτούς τους πίνακες προέρχονται από ανάλυση one-way ANOVA για διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων σε κάθε χρονική στιγμή αλλά θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιφύλαξη καθώς αποτελούν μέρος της διερευνητικής ανάλυσης ενώ η κατάλληλη ανάλυση πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια.

Τα δεδομένα για κάθε δείκτη παρουσιάζονται και γραφικά, μέσω θηκογραμμάτων (box-plots) (**γραφήματα 2.1, 2.3, 2.5, 2.7, 2.9**) στα οποία απεικονίζεται η διάμεση τιμή και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95%CI) και στη συνέχεια μέσω profile-plots (**γραφήματα 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 2.10**) στα οποία απεικονίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ανά ομάδα πειραματοζώων και χρονική στιγμή μέτρησης.

Στους **πίνακες 3.1, 3.3, 3.5, 3.7, 3.9** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοντέλων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων των δεικτών BALP, N-MID-OC,

PINP, CTX-I, TRAP5b ανά ομάδα πειραματοζώων. Οι πίνακες περιλαμβάνουν τους συντελεστές του μοντέλου για κάθε δείκτη μαζί με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95%CI) και τα αντίστοιχα p-values από Wald tests. Στη συνέχεια παρουσιάζονται συνολικοί έλεγχοι (global tests-Wald type) για διαφορές μεταξύ των ομάδων προεγχειρητικά, διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μέσα στην κάθε ομάδα και διαφορά στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων.

Αποτελέσματα ανάλυσης με μοντέλα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων

BALP

Στον **πίνακα 3.1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων της BALP ανά ομάδα. Οι συνολικοί έλεγχοι έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά ($p < 0.001$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη σε καμία ομάδα (PTGM: $p = 0.466$, ομάδα AGM: $p = 0.242$, ομάδα CM: $p = 0.067$). Ομοίως, η διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ήταν μη στατιστικά σημαντική ($p = 0.541$).

Στο **γράφημα 3.1** απεικονίζεται διαγραμματικά η πορεία των εκτιμώμενων μέσων τιμών των επιπέδων του δείκτη BALP στις τρεις ομάδες (95% CI). Στον **πίνακα 3.2** αναγράφονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη BALP μεταξύ των διαφόρων

χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι απόλυτες τιμές των εκτιμώμενων μέσων τιμών των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη BALP μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών δεν διέφεραν μεταξύ των τριών ομάδων. Αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη ανά ομάδα, στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων του δείκτη BALP έως τη 2^η εβδομάδα, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε αύξηση έως την 6^η εβδομάδα. Τα επίπεδα την 6^η εβδομάδα παρέμειναν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά. Στην ομάδα AGM παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων του δείκτη έως την 4^η εβδομάδα και ελάχιστη πτώση την 6^η εβδομάδα. Τέλος, στην ομάδα CM παρατηρήθηκε μικρή πτώση των επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα στη συνέχεια μικρή αύξηση την 2^η εβδομάδα, εκ νέου μικρή πτώση την 4^η εβδομάδα και τέλος μη στατιστικά σημαντική αύξηση την 6^η εβδομάδα. Καμία από τις παρατηρούμενες διαχρονικές μεταβολές στις τρεις ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην ομάδα CM ωστόσο η μεταβολή μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας καθώς και η μεταβολή μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας προσέγγισε τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

Στον **πίνακα 3.3** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών (%Δ) των επιπέδων του δείκτη BALP μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε % πτώση των επιπέδων του δείκτη έως τη 2^η εβδομάδα, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε % αύξηση έως την 6^η εβδομάδα. Για την ομάδα PTGM καμία από τις εκτιμώμενες μέσες τιμές των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη BALP δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην ομάδα AGM παρατηρήθηκε σταδιακή % αύξηση των επιπέδων του δείκτη σε όλο το διάστημα παρακολούθησης, με εξαίρεση πολύ μικρή % πτώση (0,87%) από την 4^η έως την 6^η

εβδομάδα. Για την ομάδα AGM καμία από τις εκτιμώμενες μέσες τιμές των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη BALP δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, στην ομάδα CM παρατηρήθηκε μικρή % πτώση των επιπέδων του δείκτη έως την 1^η εβδομάδα, στη συνέχεια % αύξηση έως την 2^η εβδομάδα, εκ νέου μικρή πτώση έως την 4^η εβδομάδα και τέλος % αύξηση έως την 6^η εβδομάδα. Για την ομάδα CM καμία από τις εκτιμώμενες μέσες τιμές των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη BALP δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ωστόσο, οι % Δ του δείκτη BALP μεταξύ 2^{ης} και 1^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 6^{ης} και 1^{ης} εβδομάδας προσέγγισαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

CTX-I

Στον **πίνακα 3.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη CTX-I ανά ομάδα. Οι συνολικοί έλεγχοι έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά ($p=0.001$). Οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη ήταν στατιστικά σημαντικές στις ομάδες PTGM ($p<0.001$) και CM ($p=0.02$), ενώ στην ομάδα AGM ήταν μη στατιστικά σημαντικές ($p=0.615$). Αναδείχθηκε επίσης ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ($p=0.017$).

Στο **γράφημα 3.2** απεικονίζεται διαγραμματικά η πορεία των εκτιμώμενων μέσων τιμών των επιπέδων του δείκτη CTX-I στις τρεις ομάδες (95% CI), όπου είναι εμφανής η εντονότερη αύξηση του δείκτη την 2η εβδομάδα. Οι απόλυτες τιμές των

εκτιμώμενων μέσων τιμών των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη CTX-I διέφεραν μεταξύ των τριών ομάδων μεταξύ των χρονικών στιγμών: 2ης εβδομάδας και προεγχειρητικά (με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση στην ομάδα PTGM έναντι των άλλων δύο ομάδων και παρόμοια αύξηση μεταξύ των άλλων δύο ομάδων), 2ης και 1ης εβδομάδας (με μεγαλύτερη αύξηση στην ομάδα PTGM και παρόμοια αύξηση μεταξύ των άλλων δύο ομάδων) καθώς και μεταξύ 4ης και 2ης εβδομάδας (με μεγαλύτερη ελάττωση στην ομάδα PTGM και παρόμοια ελάττωση μεταξύ των άλλων δύο ομάδων) (ενώ πλησίαζαν το όριο της στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των χρονικών στιγμών 6ης εβδομάδας και 2ης εβδομάδας). Επίσης, στον **πίνακα 3.5** αναγράφονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη CTX-I μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη ανά ομάδα, στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε αύξηση έως και την 2^η εβδομάδα. Στην ομάδα PTGM, σε σύγκριση με τις προεγχειρητικές τιμές, η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική την 2^η εβδομάδα ενώ δεν ήταν στατιστικά σημαντική την 1^η εβδομάδα. Στη συνέχεια ακολούθησε πτώση για το υπόλοιπο διάστημα παρακολούθησης, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 6^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, ενώ μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας ήταν πολύ μικρή και δεν ήταν στατιστικά. Τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από τα προεγχειρητικά επίπεδα κατά την 2^η και 4^η εβδομάδα, ενώ την 6^η εβδομάδα ήταν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα. Στην ομάδα AGM οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη μέχρι τη 2^η εβδομάδα και στη συνέχεια μη

στατιστικά σημαντική πτώση για όλο το διάστημα παρακολούθησης. Τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα έως τις 6 εβδομάδες σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα. Ενδιάμεσα όμως παρουσίασαν μικρή μη στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Στην ομάδα CM, σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα, υπήρχε στατιστικά σημαντική αύξηση την 4^η εβδομάδα καθώς και μη στατιστικά σημαντική αύξηση την 1^η, 2^η και 6^η εβδομάδα. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση έως τη 2^η εβδομάδα, στη συνέχεια μικρή μη στατιστικά σημαντική πτώση έως την 4^η εβδομάδα και εκ νέου μη στατιστικά σημαντική αύξηση έως την 6^η εβδομάδα.

Στον **πίνακα 3.6** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών (%Δ) των επιπέδων του δείκτη CTX-I μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι μόνες % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των τριών ομάδων ήταν οι % μεταβολές μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας, όπου η % μείωση ήταν μέγιστη για την PTGM ομάδα και παρόμοια για τις ομάδες AGM και CM. Στην ομάδα PTGM, σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I παρουσίασαν ανοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα (για όλο το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης) με στατιστικά σημαντικές % μεταβολές την 2^η και την 4^η εβδομάδα. Στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική % αύξηση την 1^η εβδομάδα, ακολουθούμενη από στατιστικά σημαντική % αύξηση από την 1^η έως και την 2^η εβδομάδα. Στη συνέχεια, ακολούθησε %πτώση για το υπόλοιπο διάστημα παρακολούθησης, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από τα επίπεδα

προεγχειρητικά κατά την 2^η και 4^η εβδομάδα, ενώ την 6^η εβδομάδα ήταν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Στην ομάδα AGM, σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I παρουσίασαν ανοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα χωρίς όμως αυτές οι % μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές. Επομένως, τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα έως και την 6^η εβδομάδα σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική % αύξηση των επιπέδων του δείκτη έως την 2^η εβδομάδα και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική % πτώση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Στην ομάδα CM, σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I παρουσίασαν ανοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα χωρίς όμως αυτές οι % μεταβολές να είναι στατιστικά σημαντικές. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική % αύξηση των επιπέδων του δείκτη έως την 2^η εβδομάδα και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική % πτώση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και τέλος μη στατιστικά σημαντική % αύξηση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Στις ομάδες AGM και CM καμία από τις % διαχρονικές μεταβολές των τιμών του δείκτη CTX-I δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

N-MID-OC

Στον **πίνακα 3.7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC ανά ομάδα. Οι συνολικοί έλεγχοι δεν έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων

προεγχειρητικά ($p=0.099$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα AGM ($p=0.034$), ενώ στις ομάδες PTGM ($p=0.157$) και CM ($p=0.641$) οι διαχρονικές μεταβολές ήταν μη στατιστικά σημαντικές. Η διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ήταν μη στατιστικά σημαντική ($p=0.113$).

Στο **γράφημα 3.3** απεικονίζεται διαγραμματικά η πορεία των εκτιμώμενων μέσων τιμών των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC στις τρεις ομάδες (95% CI). Στον **πίνακα 3.8** αναγράφονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι διαφορές στις απόλυτες τιμές των εκτιμώμενων μέσων τιμών των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών προσέγγισαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των τριών ομάδων μόνο για το χρονικό διάστημα μεταξύ 4^{ης} εβδομάδας και προεγχειρητικής αξιολόγησης, όπου την μεγαλύτερη μεταβολή παρουσίασε η ομάδα PTGM και την μικρότερη η ομάδα AGM. Στην ομάδα PTGM, αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδά του παρατηρήθηκε αύξηση σε όλες τις χρονικές στιγμές (1^η, 2^η, 4^η και 6^η εβδομάδα). Μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας ακολούθησε μη στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του δείκτη, αλλά αυτά παρέμειναν υψηλότερα των προεγχειρητικών την 6^η εβδομάδα. Στην ομάδα AGM, σε σύγκριση με προεγχειρητικά, παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων του δείκτη την 1^η, 2^η, 4^η και 6^η εβδομάδα, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μόνο την 1^η εβδομάδα. Στις 6 εβδομάδες τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 1^{ης} και

6^{ης} υπήρχε στατιστικά σημαντική ανοδική πορεία στα επίπεδα του δείκτη, ενώ μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας υπήρχε πολύ μικρή μη στατιστικά σημαντική μείωση. Στην ομάδα CM, σε σύγκριση με προεγχειρητικά, παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων του δείκτη την 1^η, 2^η, 4^η και 6^η εβδομάδα, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, στην ομάδα CM παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων του δείκτη έως και την 1^η εβδομάδα, ακολούθησε μη στατιστικά σημαντική αύξηση έως και την 2^η εβδομάδα, εκ νέου μη στατιστικά σημαντική πτώση έως και την 4^η εβδομάδα ακολουθούμενη από ελάχιστη αύξηση έως και την 6^η εβδομάδα. Η τιμή των επιπέδων του δείκτη στις 6 εβδομάδες παρακολούθησης ήταν μη στατιστικά σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με την τιμή προεγχειρητικά.

Στον **πίνακα 3.9** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών (%Δ) των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι μόνες διαφορές στις % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC που προσέγγισαν τα όρια στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των τριών ομάδων ήταν οι % μεταβολές μεταξύ 4^{ης} εβδομάδας και προεγχειρητικής αξιολόγησης, όπου η % μεταβολή ήταν μέγιστη για την ομάδα PTGM και ελάχιστη για την ομάδα AGM. Στην ομάδα PTGM, οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα παρουσίασαν ανοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα (για όλο το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης) με % αύξηση που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας την 4^η εβδομάδα. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά. Στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική % αύξηση ανά εβδομάδα έως και την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική πτώση έως την 6^η εβδομάδα. Στην ομάδα AGM, οι %

διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα παρουσίασαν καθοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα με στατιστικά σημαντική % μείωση την 1^η εβδομάδα. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά. Στην ομάδα AGM παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική αύξηση έως και την 4^η εβδομάδα. Τόσο στις 4 όσο και στις 6 εβδομάδες τα επίπεδα του δείκτη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την 1^η εβδομάδα. Στην ομάδα CM, οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα παρουσίασαν καθοδική πορεία έως και την 6^η εβδομάδα με μη στατιστικά σημαντικές % μεταβολές. Τα επίπεδα του δείκτη στις 6 εβδομάδες ήταν κατά 10% μειωμένα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Στην ομάδα CM παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τη 2^η εβδομάδα, εκ νέου μη στατιστικά σημαντική πτώση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας ακολουθούμενη από ελάχιστη αύξηση έως και την 6^η εβδομάδα.

PINP

Στον **πίνακα 3.10** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη PINP ανά ομάδα. Οι συνολικοί έλεγχοι δεν έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά ($p=0.750$). Στις ομάδες AGM ($p=0.02$) και CM ($p=0.005$) διαπιστώθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στις διαχρονικές

μεταβολές των επιπέδων του δείκτη. Αντιθέτως, στην ομάδα PTGM οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0.409$). Η διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ήταν μη στατιστικά σημαντική ($p=0.602$).

Στο **γράφημα 3.4** απεικονίζεται διαγραμματικά η πορεία των εκτιμώμενων μέσων τιμών (95% CI) των επιπέδων του δείκτη PINP στις τρεις ομάδες. Στον **πίνακα 3.11** αναγράφονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Η διαφορά στις απόλυτες τιμές των εκτιμώμενων μέσων τιμών των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών προσέγγισαν τα όρια στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των τριών ομάδων μόνο για το χρονικό διάστημα μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας, όπου την μεγαλύτερη μεταβολή παρουσίασε η ομάδα CM και την μικρότερη η ομάδα PTGM. Για το χρονικό διάστημα μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας οι ομάδες PTGM και CM παρουσίασαν μείωση ενώ η AGM παρουσίασε αύξηση. Στην ομάδα PTGM αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα του όλες οι μεταβολές ήταν μη στατιστικά σημαντικές με μέγιστη μεταβολή την 1^η εβδομάδα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα, η διαφορά όμως ήταν πολύ μικρή. Αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική πτώση την 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και εκ νέου πτώση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Στην ομάδα AGM αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα

στατιστικά σημαντικές μεταβολές υπήρχαν την 2^η και 4^η εβδομάδα, όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα, η διαφορά όμως ήταν πολύ μικρή. Τα επίπεδα του δείκτη παρουσίασαν σταθερά ανοδική πορεία έως και την 4^η εβδομάδα χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Στη συνέχεια υπήρχε καθοδική πορεία μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας με στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων. Επιπρόσθετα, μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας υπήρχε στατιστικά σημαντική ελάττωση. Επομένως, οι τιμές των επιπέδων του δείκτη την 2^η και 4^η εβδομάδα ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά, ενώ την 6^η εβδομάδα ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές της 2^{ης} και της 4^{ης} εβδομάδας. Στην ομάδα CM σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα στατιστικά σημαντικές μεταβολές υπήρχαν μόνο την 1^η εβδομάδα με στατιστικά σημαντική αύξηση. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με προεγχειρητικά, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 1^η και 2^η εβδομάδα, ενώ παρατηρήθηκε μείωση την 4^η και 6^η εβδομάδα. Όσον αφορά στις συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών, στατιστικά σημαντικές μεταβολές υπήρχαν μεταξύ 1^{ης} εβδομάδας και προεγχειρητικής αξιολόγησης, 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας, 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας, 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Μετά την στατιστικά σημαντική αύξηση την 1^η εβδομάδα ακολούθησε στατιστικά σημαντική μείωση την 2^η, 4^η και 6^η εβδομάδα σε σύγκριση με την 1^η εβδομάδα. Παρατηρήθηκε λοιπόν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα, στατιστικά σημαντική πτώση την 2^η εβδομάδα και η καθοδική πορεία συνεχίστηκε σε επίπεδα μη στατιστικά σημαντικά μέχρι την 6^η εβδομάδα.

Στον **πίνακα 3.12** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών (%Δ) των επιπέδων του δείκτη PINP μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη PINP δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά καμία % μεταβολή των επιπέδων του δείκτη δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, την 1^η, 2^η και 4^η εβδομάδα υπήρχε % αύξηση ενώ την 6^η εβδομάδα υπήρχε % μείωση των επιπέδων του δείκτη. Τα επίπεδα του δείκτη στις 6 εβδομάδες ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών αξιολόγησης. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική % αύξηση την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική % πτώση την 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και εκ νέου μικρή % πτώση έως και την 6^η εβδομάδα. Στην ομάδα AGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά στατιστικά σημαντική % μεταβολή παρατηρήθηκε μόνο την 4^η εβδομάδα, όπου υπήρχε % αύξηση των επιπέδων του δείκτη. Σε σύγκριση με προεγχειρητικά παρατηρήθηκε σταθερά % ανοδική πορεία έως και την 4^η εβδομάδα, όπου παρουσιάστηκε στατιστική σημαντικότητα στην % αύξηση. Στις 6 εβδομάδες τα επίπεδα του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Όσον αφορά στις % διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών, στατιστική σημαντικότητα υπήρχε στην % μείωση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Επομένως, οι % διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών έδειξαν ότι παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική % αύξηση έως και την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια στατιστικά σημαντική % μείωση

έως και την 6^η εβδομάδα. Στην ομάδα CM σε σύγκριση με προεγχειρητικά μόνο την 1^η εβδομάδα υπήρχε στατιστικά σημαντική % μεταβολή, συγκεκριμένα % αύξηση των επιπέδων του δείκτη. Στις 6 εβδομάδες οι τιμές του δείκτη ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά. Οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ προεγχειρητικής αξιολόγησης και 1^{ης} εβδομάδας, μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας, μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική % αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα, στατιστικά σημαντική % πτώση την 2^η εβδομάδα και η καθοδική πορεία συνεχίστηκε σε επίπεδα μη στατιστικά σημαντικά μέχρι την 6^η εβδομάδα.

TRAP5b

Στον **πίνακα 3.13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη TRAP5b ανά ομάδα. Οι συνολικοί έλεγχοι δεν έδειξαν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά ($p=0.956$). Στις ομάδες AGM ($p=0.326$) και CM ($p=0.059$) διαπιστώθηκε απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη. Αντιθέτως, στην ομάδα PTGM οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη ήταν στατιστικά σημαντικές ($p=0.026$). Η διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των τριών ομάδων ήταν μη στατιστικά σημαντική ($p=0.721$).

Στο **γράφημα 3.5** απεικονίζεται διαγραμματικά η πορεία των εκτιμώμενων μέσων τιμών (95% CI) των επιπέδων του δείκτη στις τρεις ομάδες. Στον **πίνακα 3.14** αναγράφονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι εκτιμώμενες μέσες τιμές των διαχρονικών μεταβολών των επιπέδων του δείκτη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά, στατιστικά σημαντικές μεταβολές υπήρχαν μόνο την 1^η εβδομάδα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση. Σε σύγκριση με προεγχειρητικά παρουσιάστηκε ανοδική πορεία έως και την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε μικρή μείωση έως και την 6^η εβδομάδα. Αναφορικά με τη διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη, στην ομάδα PTGM παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική πτώση την 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση την 4^η εβδομάδα και εκ νέου στατιστικά σημαντική πτώση την 6^η εβδομάδα. Τα επίπεδα του δείκτη στις 6 εβδομάδες ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα από τα επίπεδα την 1^η εβδομάδα και μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Στην ομάδα AGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά, οι διαφορές στα επίπεδα του δείκτη προσέγγισαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μόνο την 2^η εβδομάδα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση. Σε σύγκριση με προεγχειρητικά παρουσιάστηκε ανοδική πορεία έως και την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε μικρή μείωση έως και την 6^η εβδομάδα. Διαχρονικά παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 1^η και την 2^η εβδομάδα καθώς και μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και στη συνέχεια μη στατιστικά σημαντική πτώση έως την 6^η εβδομάδα. Στην ομάδα CM οι διαφορές στα επίπεδα του δείκτη σε σύγκριση με προεγχειρητικά προσέγγισαν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας την 1^η και 2^η εβδομάδα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση.

Σε σύγκριση με προεγχειρητικά, βρέθηκε ανοδική πορεία έως την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια καθοδική. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του δείκτη που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική πτώση τη 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και πτώση που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα την 1^η και την 2^η εβδομάδα, ενώ ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά.

Στον **πίνακα 3.12** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι εκτιμώμενες εκτιμώμενες μέσες τιμές (95% CI) των ποσοστιαίων διαχρονικών μεταβολών (%Δ) των επιπέδων του δείκτη TRAP5b μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ανά ομάδα. Οι % διαχρονικές μεταβολές δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά στατιστικά σημαντική % μεταβολή παρουσιάστηκε την 1^η εβδομάδα, όπου υπήρχε % αύξηση. Σε σύγκριση με προεγχειρητικά η πορεία των % μεταβολών των επιπέδων του δείκτη ήταν ανοδική έως και την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια ελαφρώς καθοδική. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική % αύξηση την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική πτώση την 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και εκ νέου στατιστικά σημαντική πτώση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Τα επίπεδα του δείκτη στις 6 εβδομάδες ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα από τα επίπεδα την 1^η εβδομάδα και μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά. Στην ομάδα AGM σε σύγκριση με προεγχειρητικά παρατηρήθηκε % μεταβολή που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας την 2^η εβδομάδα, όπου υπήρχε % αύξηση. Σε σύγκριση με

προεγχειρητικά η πορεία των % μεταβολών των επιπέδων του δείκτη ήταν ανοδική έως και την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια ελαφρώς καθοδική. Παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 1^η και την 2^η εβδομάδα καθώς και μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και στη συνέχεια % πτώση που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας-έως και την 6^η εβδομάδα. Οι τιμές του δείκτη την 2^η εβδομάδα ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά, και στις 6 εβδομάδες οι τιμές ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Στην ομάδα CM σε σύγκριση με προεγχειρητικά παρουσιάστηκε % μεταβολή που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας την 1^η εβδομάδα, όπου υπήρχε % αύξηση. Σε σύγκριση με προεγχειρητικά η πορεία των % μεταβολών των επιπέδων του δείκτη ήταν ανοδική έως και την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια καθοδική. Παρατηρήθηκε % αύξηση των επιπέδων του δείκτη που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας την 1^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική πτώση την 2^η εβδομάδα, μη στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και πτώση που προσέγγισε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα την 1^η και την 2^η εβδομάδα, ενώ ήταν μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις τιμές προεγχειρητικά.

Στα **γραφήματα 3.6-3.8** παρουσιάζονται διαγραμματικά οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, CTX-I, N-MID-OC, PINP και TRAP5b για την κάθε ομάδα χωριστά.

Συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών

Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των διαφόρων δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης παρουσιάζονται μέσω στικτογραμμμάτων στα οποία αναγράφεται και η τιμή του Pearson correlation coefficient (συντελεστής συσχέτισης Pearson) μαζί με το αντίστοιχο p-value. Στο **γράφημα 4.1** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών στην ομάδα PTGM προεγχειρητικά. Παρατηρούμε στατιστικά σημαντικά θετική συσχέτιση μεταξύ των ζευγών δεικτών BALP και N-MID-OC ($r=0.67$, $p=0.006$), BALP και PINP ($r=0.62$, $p=0.014$), N-MID-OC και PINP ($r=0.57$, $p=0.025$) BALP και TRAP5b ($r=0.72$, $p=0.002$), N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.88$, $p<0.001$), PINP και TRAP5b ($r=0.8$, $p<0.001$). Την 1^η εβδομάδα (**γράφημα 4.2**) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των N-MID-OC και PINP ($r=0.54$, $p=0.037$), N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.61$, $p=0.016$), PINP και TRAP5b ($r=0.95$, $p<0.001$). Την 2^η εβδομάδα (**γράφημα 4.3**) διατηρήθηκαν οι στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και PINP ($r=0.88$, $p<0.001$), N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.77$, $p=0.001$), PINP και TRAP5b ($r=0.86$, $p<0.001$). Παρατηρήθηκε επίσης εκ νέου στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών BALP και N-MID-OC ($r=0.64$, $p=0.010$). Την 4^η εβδομάδα (**γράφημα 4.4**) παρέμειναν οι στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και PINP ($r=0.56$, $p=0.031$), N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.68$, $p=0.006$), PINP και TRAP5b ($r=0.86$, $p<0.001$), BALP και N-MID-OC ($r=0.55$, $p=0.033$). Τέλος την 6^η εβδομάδα (**γράφημα 4.5**) παρέμειναν οι στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και PINP ($r=0.53$, $p=0.043$), N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.76$, $p=0.001$), PINP και TRAP5b ($r=0.82$, $p<0.001$), CTX-I και TRAP5b ($r=0.52$, $p=0.045$).

Στην ομάδα AGM παρατηρούμε προεγχειρητικά την ύπαρξη στατιστικά σημαντικά θετικών συσχετίσεων μεταξύ των ζευγών δεικτών N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.65$ $p=0.009$), καθώς και PINP και TRAP5b ($r=0.73$, $p=0.002$) (**γράφημα 4.6**). Την 1^η εβδομάδα διατηρήθηκαν οι δύο προηγούμενες συσχετίσεις μεταξύ N-MID-OC - TRAP5b ($r=0.52$ $p=0.046$) και PINP - TRAP5b ($r=0.67$, $p=0.006$) ενώ εμφανίστηκε και μία νέα θετική συσχέτιση μεταξύ N-MID-OC και PINP ($r=0.66$, $p=0.008$) (**γράφημα 4.7**). Την 2^η εβδομάδα διατηρήθηκαν οι δύο συσχετίσεις μεταξύ N-MID-OC - TRAP5b ($r=0.56$ $p=0.034$) και PINP - TRAP5b ($r=0.59$, $p=0.021$), ενώ παρουσιάστηκαν και δύο νέες μεταξύ CTX-I - N-MID-OC ($r=0.62$, $p=0.013$) και CTX-I - TRAP5b ($r=0.56$, $p=0.034$) (**γράφημα 4.8**). Την 4^η εβδομάδα παρατηρήθηκαν μόνο δύο νέες θετικές συσχετίσεις μεταξύ BALP - N-MID-OC ($r=0.58$, $p=0.022$) και CTX-I - N-MID-OC ($r=0.56$, $p=0.029$) (**γράφημα 4.9**). Τέλος, την 6^η εβδομάδα σε αυτή την ομάδα επανήλθαν οι στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ N-MID-OC - TRAP5b ($r=0.73$ $p=0.002$) και PINP - TRAP5b ($r=0.73$, $p=0.002$), ενώ εμφανίστηκε και μία νέα μεταξύ BALP - TRAP5b ($r=0.54$, $p=0.036$) (**γράφημα 4.10**).

Στην ομάδα CM προεγχειρητικά παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των ζευγών δεικτών BALP - N-MID-OC ($r=0.61$, $p=0.016$), N-MID-OC - TRAP5b ($r=0.59$, $p=0.02$), N-MID-OC - PINP ($r=0.6$, $p=0.018$) (**γράφημα 4.11**). Την 1^η εβδομάδα η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ήταν αυτή μεταξύ BALP και N-MID-OC ($r=0.56$, $p=0.032$) (**γράφημα 4.12**). Την 2^η εβδομάδα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και TRAP5b ($r=0.78$, $p=0.001$) (**γράφημα 4.13**). Την 4^η εβδομάδα εμφανίστηκαν δύο νέες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ PINP - TRAP5b ($r=0.63$, $p=0.013$) και CTX-I - PINP ($r=0.53$, $p=0.042$)

(**γράφημα 4.14**). Τέλος, την 6^η εβδομάδα διατηρήθηκε η στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ PINP - TRAP5b ($r=0.51$, $p=0.05$) και εμφανίστηκε και νέα στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ BALP – CTX-I ($r=0.57$, $p=0.027$) (**γράφημα 4.15**).

Στους **πίνακες 4.1** και **4.2** απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων δεικτών ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα).

Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Σύγκριση προεγχειρητικά μεταξύ των τριών ομάδων

Τα επίπεδα των δεικτών CTX-I και BALP διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά, ενώ τα επίπεδα των δεικτών N-MID-OC, PINP και TRAP5b δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων προεγχειρητικά.

Σύγκριση των διαχρονικών μεταβολών μεταξύ των τριών ομάδων

Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων, ενώ οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις

χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων για την χρονική περίοδο μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP μεταξύ των τριών ομάδων για την χρονική περίοδο μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Διαχρονικές μεταβολές ανά δείκτη

BALP

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν μη στατιστικά σημαντικές για όλες τις ομάδες. Στην ομάδα CM όμως οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

CTX-I

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν στατιστικά σημαντικές για τις ομάδες PTGM και CM. Για την ομάδα PTGM οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν

στατιστικά σημαντικές την 2^η εβδομάδα και την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Για την ομάδα CM οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν στατιστικά σημαντικές την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά, ενώ οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($p= 0.057$).

N-MID-OC

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για την ομάδα AGM. Για την ομάδα AGM οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC ήταν στατιστικά σημαντικές την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και την 4^η και 6^η εβδομάδα σε σύγκριση με την 1^η εβδομάδα. Επιπρόσθετα, για την ομάδα AGM στατιστικά σημαντικές ήταν και οι % διαχρονικές μεταβολές την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Παρά την απουσία σημαντικότητας, για την ομάδα PTGM οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά.

PINP

Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP ήταν στατιστικά σημαντικές για τις ομάδες AGM και CM. Για την

ομάδα AGM οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP ήταν στατιστικά σημαντικές την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Επιπρόσθετα, για την ομάδα AGM στατιστικά σημαντικές ήταν και οι % διαχρονικές μεταβολές την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Για την ομάδα CM οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP ήταν στατιστικά σημαντικές την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας, 1^{ης} και 2^{ης}, 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Επιπρόσθετα, για την ομάδα CM στατιστικά σημαντικές ήταν και οι διαχρονικές μεταβολές μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Παρά την απουσία σημαντικότητας για την ομάδα PTGM, οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP σε αυτήν προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την χρονική περίοδο μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας.

TRAP5b

Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για την ομάδα PTGM. Συγκεκριμένα, στην ομάδα PTGM αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Παρά την απουσία σημαντικότητας για την ομάδα AGM, οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b σε αυτήν προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Επιπρόσθετα, για

την ομάδα AGM οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Όσον αφορά στην ομάδα CM, παρά την απουσία σημαντικότητας οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης}, 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας.

Για την ομάδα CM

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών CTX-I (4^η εβδομάδα VS προεγχειρητικά) και PINP (1^η εβδομάδα VS προεγχειρητικά, μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης}, 1^{ης} και 4^{ης}, 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας) ήταν στατιστικά σημαντικές.

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, N-MID-OC και TRAP5b δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Ορισμένες όμως μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP (μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας) και TRAP5b (1^η εβδομάδα VS προεγχειρητικά καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης}, 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας) προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Υπήρχε μετρίως ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των δεικτών N-MID-OC και TRAP5b κατά την 2η εβδομάδα.

Σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων

Τα τελικά επίπεδα όλων των δεικτών ήταν παρόμοια με τα προεγχειρητικά σε όλες τις ομάδες και δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων.

Και οι τρεις ομάδες παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντικά διαφορετικές διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b. Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαχρονικές μεταβολές αυτών των δεικτών κατά την επούλωση των έξι εβδομάδων δεν επηρεάστηκε σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό για την αντιμετώπιση των οστικών βλαβών.

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων, συγκεκριμένα στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. (Στην PTGM σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, ο δείκτης παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας και στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ελάττωση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας.) Στις περιόδους στις οποίες διέφεραν στατιστικά σημαντικά οι μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I μεταξύ PTGM και των άλλων δύο ομάδων και οι τρεις ομάδες αντέδρασαν με ανάλογο τρόπο, δηλαδή όλες με αύξηση ή όλες με μείωση των επιπέδων.

Ορισμένες διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών N-MID-OC (4^η εβδομάδα VS προεγχειρητικά) και PINP (μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας) μεταξύ των τριών ομάδων προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Σύγκριση μεταξύ PTGM και CM

Για τις ομάδες PTGM και CM, οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν στατιστικά σημαντικές (σημαντικά αυξημένες την 4^η εβδομάδα VS προεγχειρητικά), ενώ οι μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν μη στατιστικά σημαντικές.

Στατιστική σημαντικότητα στις διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη TRAP5b υπήρχε μόνο για την ομάδα PTGM. Παρ' όλα αυτά, για τις περιόδους στις οποίες στην PTGM βρέθηκε σημαντικότητα στις διαχρονικές μεταβολές (1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά, μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας) για τις ίδιες περιόδους στην CM βρέθηκε ότι οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Για αυτές τις χρονικές περιόδους ο δείκτης TRAP5b μεταβλήθηκε με ανάλογο τρόπο και στις δύο ομάδες (PTGM και CM), δηλαδή είτε με αύξηση είτε με μείωση.

Σύγκριση μεταξύ AGM και CM

Για τις ομάδες AGM και CM, οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν μη στατιστικά σημαντικές, ενώ τα επίπεδα του δείκτη PINP μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά.

Διαχρονική πορεία ανά δείκτη ανά ομάδα

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων των δεικτών CTX-I, PINP, TRAP5b στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε όλες τις ομάδες, ενώ το πρότυπο διέφερε για τις μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP και N-MID-OC. Η πορεία όμως των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC ήταν παρόμοια για τις ομάδες PTGM και AGM από την 2^η εβδομάδα και μετά.

BALP

Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα CM περιελάμβανε αρχικά μικρή πτώση την 1η εβδομάδα, ακολουθούμενη από μικρή αύξηση την 2η εβδομάδα, εκ νέου ελάχιστη πτώση και τέλος ελάχιστη περαιτέρω αύξηση. Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα AGM περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση. Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα PTGM περιελάμβανε σταδιακή πτώση μέχρι την 2η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης. Η διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη στο διάστημα παρακολούθησης των έξι εβδομάδων φαίνεται να ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στις τρεις ομάδες, υπήρχαν όμως και κοινά στοιχεία. Στην ομάδα CM η πτώση στα αρχικά στάδια της επούλωσης έγινε την 1^η εβδομάδα ενώ στην ομάδα PTGM έγινε τις δύο πρώτες εβδομάδες. Στις ομάδες PTGM και AGM οι μεταβολές μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ήταν πολύ μικρές. Ο δείκτης BALP έφθασε στα μέγιστα επίπεδα την 4^η εβδομάδα στις ομάδες PTGM και AGM ενώ στην ομάδα CM την 2^η εβδομάδα. Από την 2^η εβδομάδα επούλωσης και μετά οι ομάδες PTGM και AGM είχαν παρόμοια πορεία.

CTX-I

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ήταν παρόμοια και στις τρεις ομάδες, συγκεκριμένα περιελάμβανε αύξηση των επιπέδων την αρχική περίοδο της επούλωσης και στη συνέχεια ελάττωση σε μεταγενέστερα στάδια επούλωσης. Στην ομάδα CM η

σημαντική αύξηση των επιπέδων CTX-I έγινε στις 4 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Στην ομάδα PTGM σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων CTX-I έγιναν στις 2 και στις 4 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά, η μεγαλύτερη όμως αύξηση έγινε στις 2 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Ο δείκτης CTX-I έφθασε στα μέγιστα επίπεδα στην ομάδα PTGM την 2^η εβδομάδα ενώ στην ομάδα CM την 4^η εβδομάδα, δηλαδή στην ομάδα PTGM νωρίτερα χρονικά σε σύγκριση με την ομάδα CM. Η αύξηση των επιπέδων CTX-I ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα PTGM έναντι της ομάδας CM (και φυσικά έναντι και της ομάδας AGM). Η διαχρονική πορεία των επιπέδων CTX-I στην ομάδα AGM ήταν μεν παρόμοια με αυτή στις άλλες δύο ομάδες αλλά χωρίς σημαντικές διαχρονικές μεταβολές. Μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας τα επίπεδα CTX-I ελαττώθηκαν σε όλες τις ομάδες αλλά η ελάττωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για την ομάδα PTGM έναντι των άλλων δύο ομάδων.

N-MID-OC

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC στο διάστημα των έξι εβδομάδων epούλωσης φαίνεται να ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στις τρεις ομάδες, υπήρχαν όμως και κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων. Την αρχική περίοδο της epούλωσης, συγκεκριμένα τις δύο πρώτες εβδομάδες, η πορεία ήταν παρόμοια για τις ομάδες CM και AGM και περιελάμβανε αρχικά ελάττωση, σημαντική μόνο για την AGM, και στη συνέχεια μικρή αύξηση. Από την 2^η εβδομάδα όμως και μετά η πορεία διαφοροποιήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων έτσι ώστε στην ομάδα CM υπήρχε μικρή ελάττωση και στη συνέχεια σταθεροποίηση των επιπέδων ενώ στην ομάδα AGM συνεχίστηκε η σταδιακή μικρή αύξηση έως την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε

σταθεροποίηση των επιπέδων. Η ομάδα PTGM ήταν η μόνη που παρουσίασε μικρή αύξηση (και όχι ελάττωση) την 1^η εβδομάδα. Από την 2^η εβδομάδα όμως και μετά η πορεία των επιπέδων ήταν παρόμοια για τις ομάδες PTGM και AGM, συγκεκριμένα μικρή αύξηση και στη συνέχεια σχετική σταθεροποίηση των επιπέδων.

PINP

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων PINP στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ήταν παρόμοια και στις τρεις ομάδες, συγκεκριμένα περιελάμβανε αρχικά αύξηση των επιπέδων και στη συνέχεια ελάττωση σε μεταγενέστερα στάδια επούλωσης. Στην ομάδα AGM υπήρχε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έως την 4^η εβδομάδα, οπότε τα επίπεδα έφθασαν στο μέγιστο και ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα προεγχειρητικά, και ακολούθησε ελάττωση έως το τέλος της παρακολούθησης. Στις ομάδες PTGM και CM η αύξηση έγινε την 1^η εβδομάδα και ήταν σημαντική μόνο για την CM.

TRAP5b

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων TRAP5b στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε όλες τις ομάδες αλλά με περισσότερα κοινά στοιχεία στις ομάδες PTGM και CM. Περιελάμβανε αύξηση των επιπέδων στα αρχικά στάδια της επούλωσης και ελάττωση αυτών σε προχωρημένα στάδια επούλωσης. Στις ομάδες PTGM και CM η αύξηση έγινε την 1^η εβδομάδα και η ελάττωση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Οι μεταβολές αυτές ήταν σημαντικές για την ομάδα PTGM ενώ προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας στην ομάδα CM. Ενδιάμεσα υπήρχε και στις δύο ομάδες μικρή ελάττωση και στη συνέχεια

μικρή αύξηση. Στην ομάδα AGM υπήρχε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έως την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε ελάττωση έως το τέλος της παρακολούθησης. Η μέγιστη αύξηση στην ομάδα AGM ήταν στις δύο εβδομάδες, δηλαδή λίγο αργότερα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, και προσέγγισε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών

Στην PTGM υπήρχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των ζευγών N-MID OC και PINP, N-MID-OC και TRAP5b καθώς και PINP και TRAP5b, που διατηρήθηκαν σε όλες τις χρονικές στιγμές και εμφάνιζαν κατά διαστήματα υψηλούς συντελεστές συσχέτισης. Παρόμοιο πρότυπο συσχετίσεων υπήρχε και στην ομάδα AGM, με τα τρία αυτά ζεύγη δεικτών να αποτελούν τις βασικές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν σε αυτή την ομάδα (σε όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την 4η εβδομάδα).

Οι συσχετίσεις ανά χρονική στιγμή ήταν ισχυρότερες στην PTGM έναντι της AGM.

Πίνακας 2.1. Κατανομή BALP ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

	PTGM	AGM	CM	Overall	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p-value
0	2.49 (0.93)	2.48 (0.80)	1.47 (0.70)	2.15 (0.93)	0.001
1η	2.38 (0.75)	2.51 (0.63)	1.40 (0.59)	2.09 (0.82)	<0.001
2η	2.32 (0.71)	2.55 (0.89)	1.62 (0.71)	2.16 (0.85)	0.006
4η	2.41 (0.63)	2.77 (0.71)	1.53 (0.65)	2.24 (0.84)	<0.001
6η	2.64 (0.79)	2.75 (0.88)	1.66 (0.79)	2.35 (0.95)	0.001

Πίνακας 2.2. Κατανομή CTX-I ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

	PTGM	AGM	CM	Overall	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p-value
0	3.00 (1.74)	2.57 (1.16)	1.41 (0.54)	2.33 (1.39)	0.003
1η	3.48 (3.26)	2.83 (1.15)	2.06 (1.43)	2.79 (2.19)	0.209
2η	7.39 (6.12)	3.67 (2.05)	2.82 (1.50)	4.63 (4.24)	0.005
4η	4.18 (3.19)	3.18 (1.32)	2.44 (1.32)	3.27 (2.21)	0.093
6η	3.51 (2.26)	2.92 (1.19)	3.51 (7.38)	3.31 (4.41)	0.920

Πίνακας 2.3. Κατανομή N-MID-OC ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

	PTGM	AGM	CM	Overall	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p-value
0	676.2 (246.2)	861.5 (281.7)	677.9 (310.4)	738.5 (288.0)	0.128
1η	711.8 (246.1)	726.4 (197.0)	611.2 (208.7)	683.1 (219.5)	0.300
2η	713.2 (274.5)	762.6 (184.5)	649.4 (247.0)	708.4 (237.5)	0.435
4η	807.6 (351.7)	833.2 (255.2)	603.2 (144.9)	748.0 (278.5)	0.043
6η	763.0 (328.3)	832.0 (243.8)	605.5 (123.3)	733.5 (259.3)	0.046

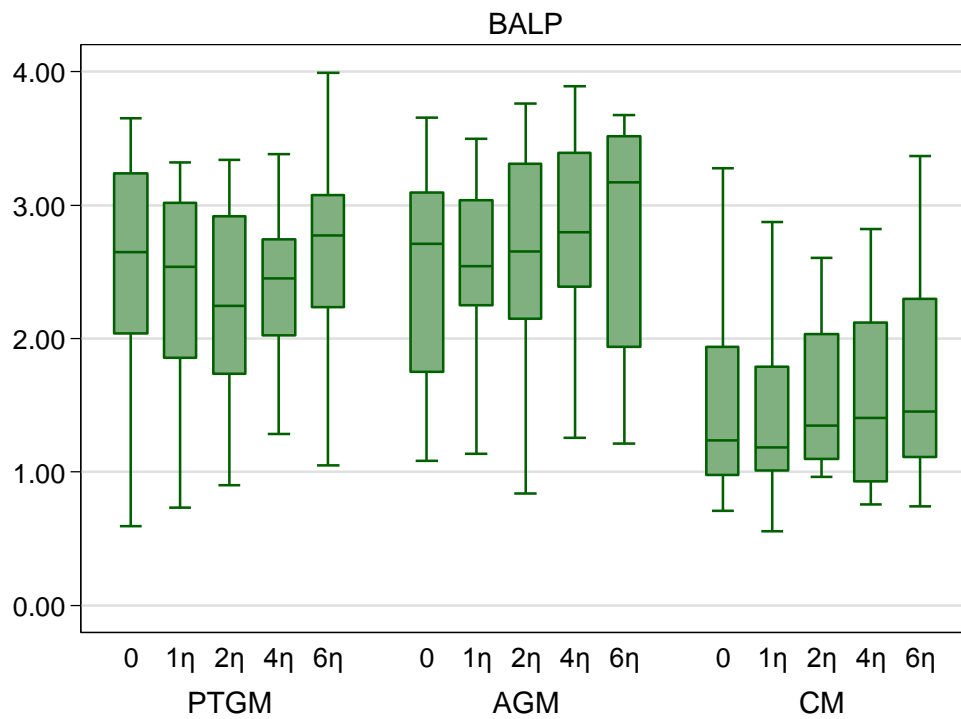
Πίνακας 2.4. Κατανομή PINP ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

	PTGM	AGM	CM	Overall	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p-value
0	796.2 (364.0)	889.3 (431.8)	797.5 (400.6)	827.7 (393.0)	0.766
1η	1124.2 (520.0)	1033.4 (331.7)	1457.6 (1438.4)	1205.1 (901.9)	0.408
2η	883.9 (370.5)	1100.7 (292.0)	932.0 (457.5)	972.2 (382.4)	0.270
4η	1011.1 (514.7)	1395.4 (1178.6)	794.9 (429.6)	1067.2 (805.0)	0.116
6η	777.2 (331.2)	850.0 (317.1)	670.7 (301.4)	766.0 (318.4)	0.307

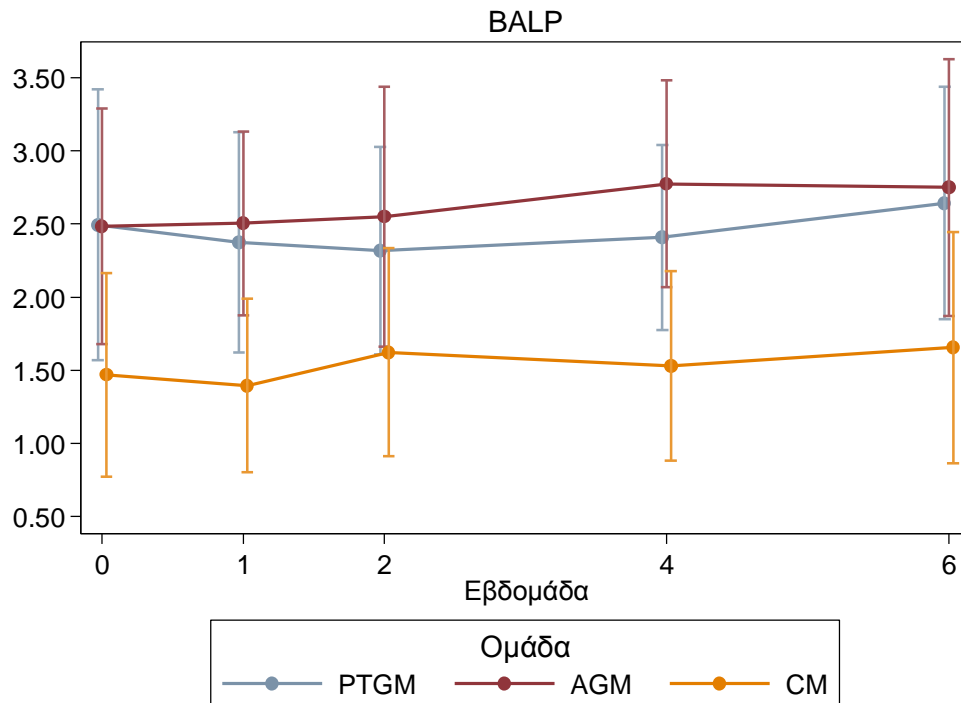
Πίνακας 2.5. Κατανομή TRAP5b ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

	PTGM	AGM	CM	Overall	
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p-value
0	10.67 (3.40)	10.69 (2.96)	11.05 (5.29)	10.80 (3.92)	0.959
1η	12.64 (5.15)	11.76 (2.13)	13.67 (8.73)	12.69 (5.89)	0.683
2η	11.35 (3.86)	12.57 (2.92)	12.75 (8.17)	12.22 (5.40)	0.749
4η	13.07 (5.20)	12.60 (4.09)	12.96 (8.28)	12.88 (5.98)	0.976
6η	9.73 (3.54)	10.33 (3.97)	10.01 (3.33)	10.03 (3.55)	0.903

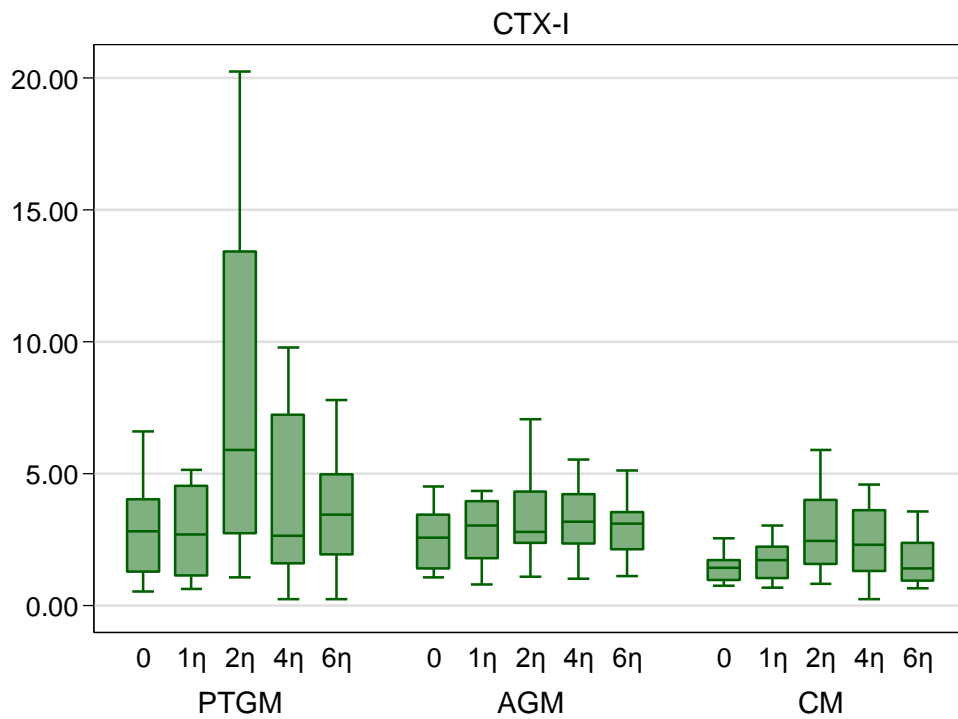
Γράφημα 2.1. Θηκογράμματα για την κατανομή του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



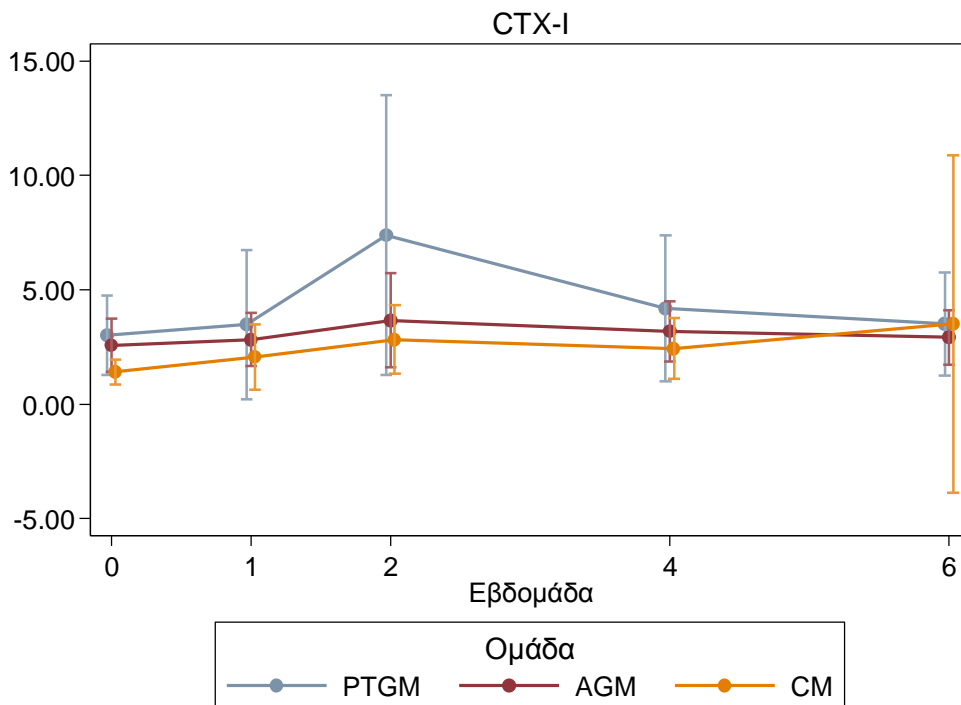
Γράφημα 2.2. Μέση τιμή (\pm SD) του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



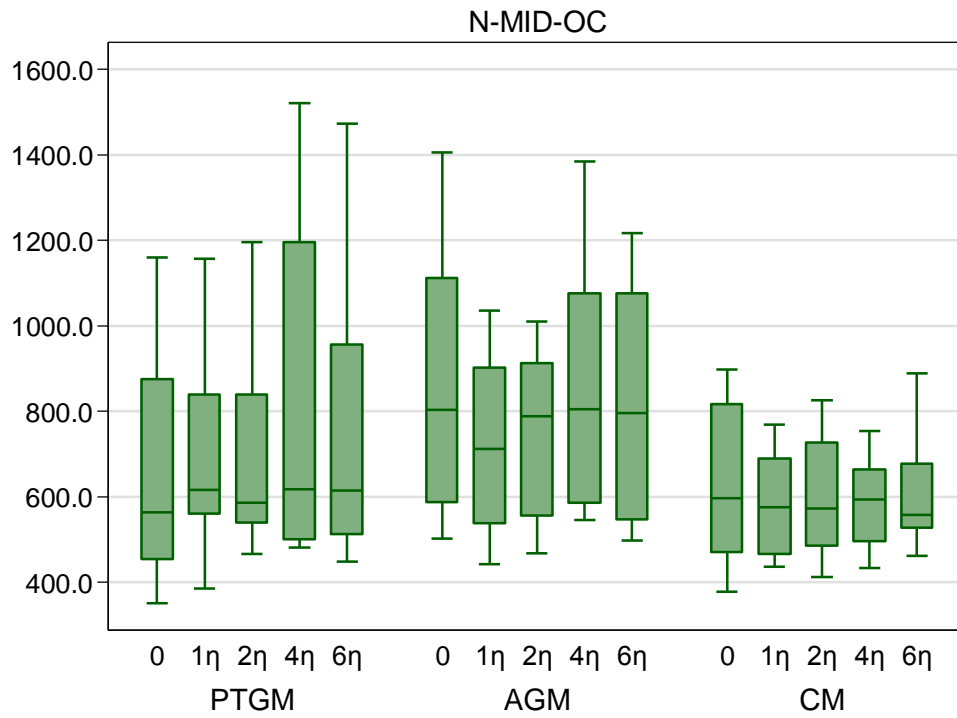
Γράφημα 2.3. Θηκογράμματα για την κατανομή του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



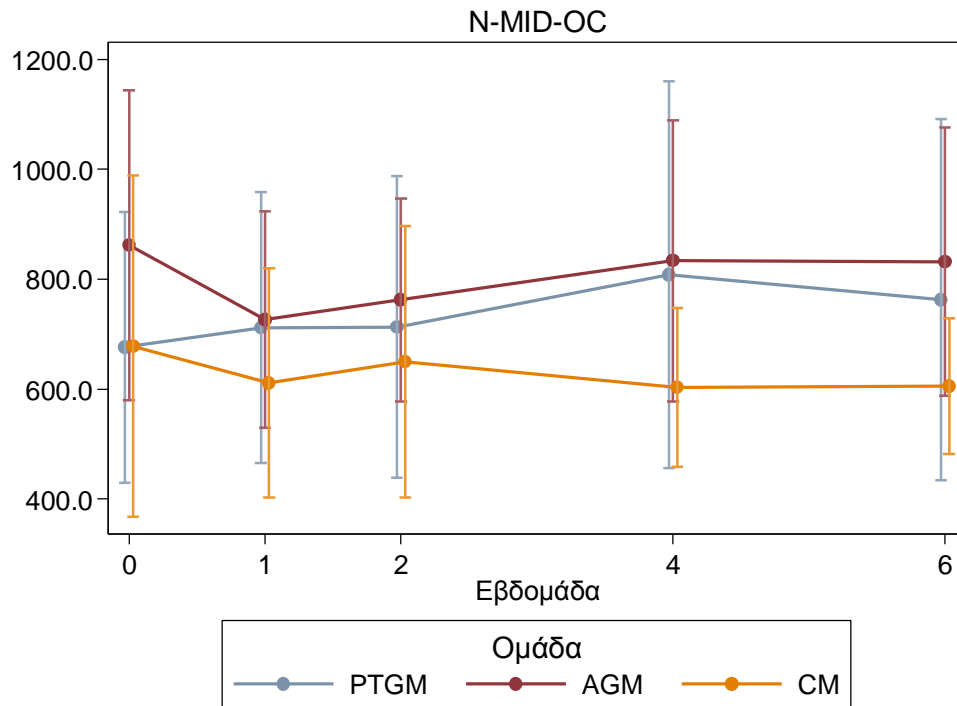
Γράφημα 2.4. Μέση τιμή (\pm SD) του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



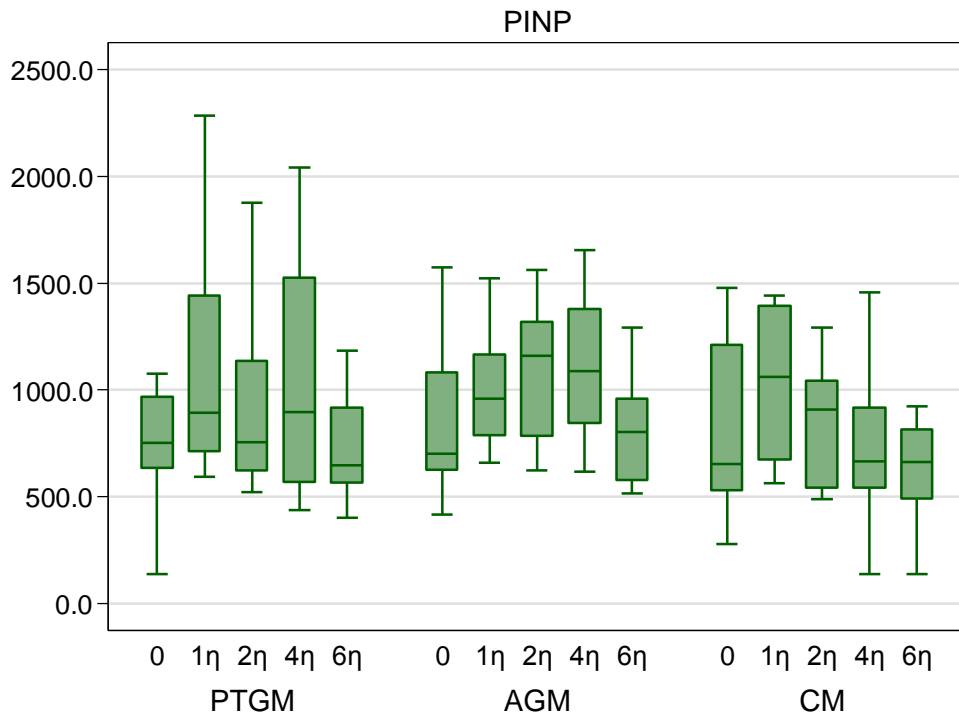
Γράφημα 2.5. Θηκογράμματα για την κατανομή του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



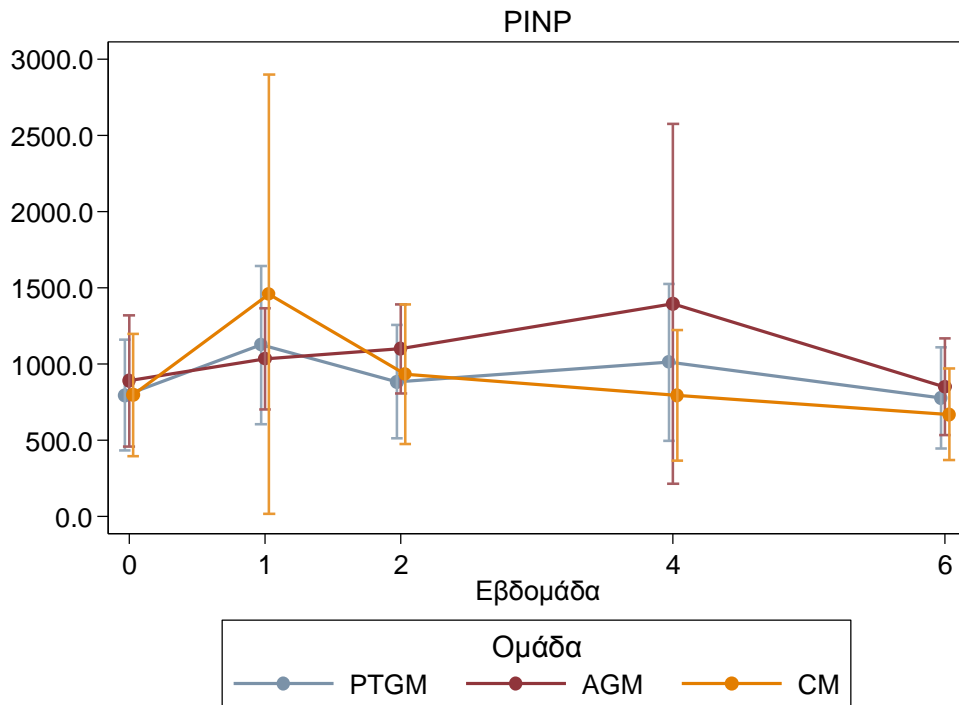
Γράφημα 2.6. Μέση τιμή (\pm SD) του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



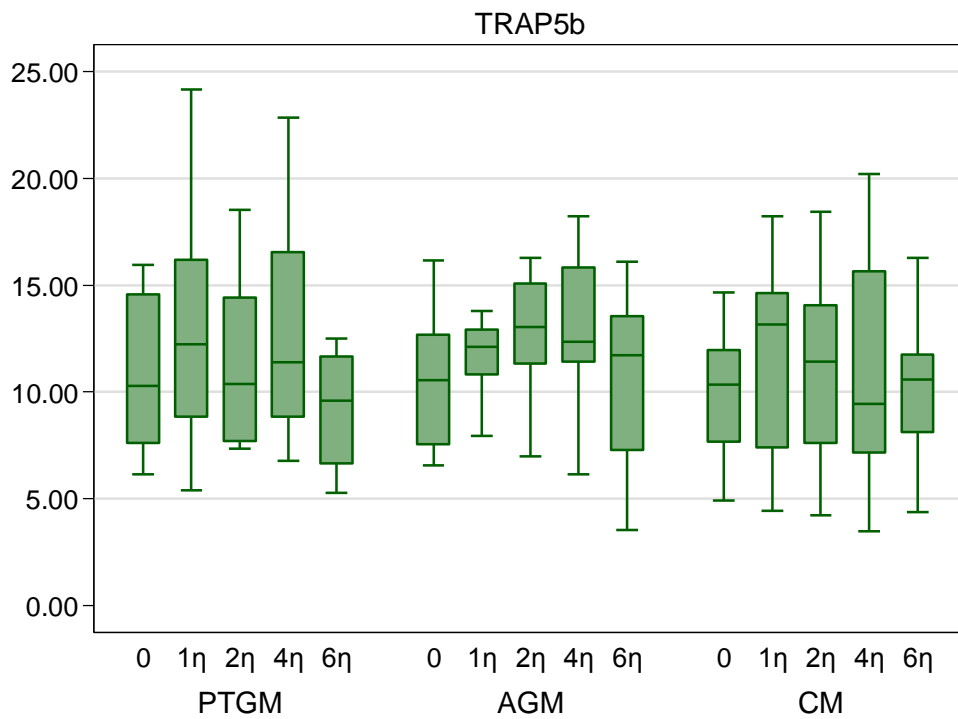
Γράφημα 2.7. Θηκογράμματα για την κατανομή του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



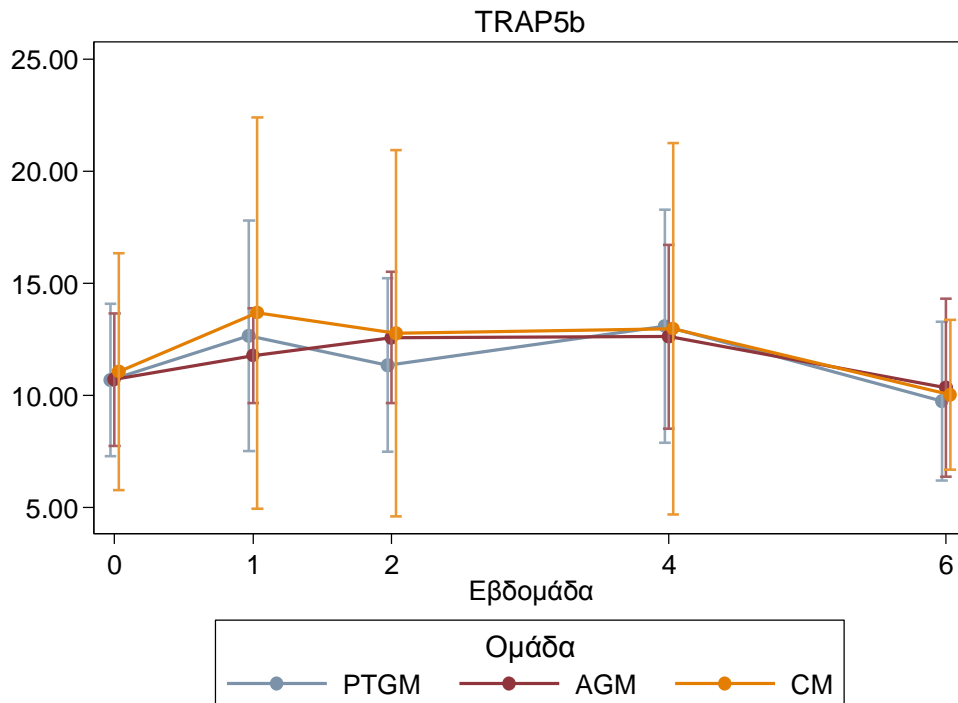
Γράφημα 2.8. Μέση τιμή (\pm SD) του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



Γράφημα 2.9. Θηκογράμματα για την κατανομή του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



Γράφημα 2.10. Μέση τιμή (\pm SD) του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του BALP ανά ομάδα

Παράγοντας	Συντελεστής	95% C.I.	p-value
Σταθερά			
per unit	1.47	(1.13, 1.81)	<0.001
Ομάδα			
PTGM	1.03	(0.52, 1.53)	<0.001
AGM	1.02	(0.50, 1.53)	<0.001
CM*	0		
Εβδομάδα			
0*	0		
1 ^η	-0.07	(-0.27, 0.13)	0.483
2 ^η	0.15	(-0.05, 0.36)	0.130
4 ^η	0.06	(-0.14, 0.26)	0.544
6 ^η	0.19	(-0.01, 0.39)	0.067
Ομάδα & Εβδομάδα interaction			
PTGM & 1η	-0.05	(-0.47, 0.37)	0.825
PTGM & 2η	-0.33	(-0.75, 0.09)	0.123
PTGM & 4η	-0.15	(-0.57, 0.27)	0.486
PTGM & 6η	-0.04	(-0.46, 0.38)	0.854
AGM & 1 ^η	0.09	(-0.29, 0.48)	0.636
AGM & 2 ^η	-0.09	(-0.48, 0.30)	0.646
AGM & 4 ^η	0.23	(-0.16, 0.61)	0.245
AGM & 6 ^η	0.08	(-0.31, 0.46)	0.688

* Ομάδα αναφοράς

Συνολικοί έλεγχοι (global tests)

Διαφορές μεταξύ ομάδων προεγχειρητικά: p-value<0.001

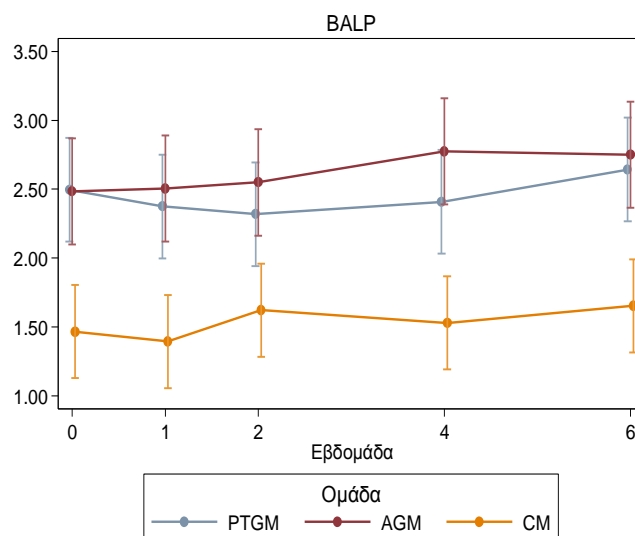
Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα PTGM: p-value=0.466

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα AGM: p-value=0.242

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα CM: p-value=0.067

Διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων: p-value=0.541

Γράφημα 3.1. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του BALP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



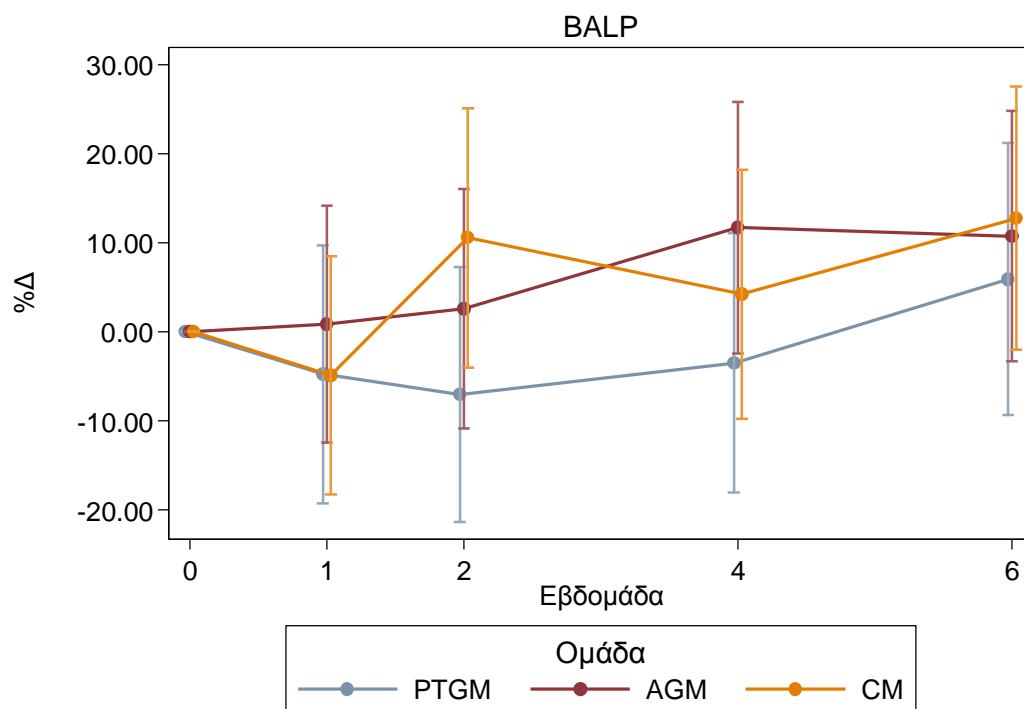
Πίνακας 3.2. Εκτιμώμενες μεταβολές του BALP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	-0.12 (-0.49, 0.25); 0.527	0.02 (-0.31, 0.35); 0.899	-0.07 (-0.27, 0.13); 0.483	0.841
2 vs. 0	-0.18 (-0.55, 0.19); 0.351	0.06 (-0.26, 0.39); 0.700	0.15 (-0.05, 0.36); 0.130	0.303
4 vs. 0	-0.09 (-0.46, 0.28); 0.644	0.29 (-0.04, 0.62); 0.084	0.06 (-0.14, 0.26); 0.544	0.304
6 vs. 0	0.15 (-0.22, 0.52); 0.433	0.27 (-0.06, 0.60); 0.113	0.19 (-0.01, 0.39); 0.067	0.884
2 vs. 1	-0.06 (-0.43, 0.31); 0.763	0.04 (-0.29, 0.37); 0.796	0.23 (0.03, 0.43); 0.027*	0.344
4 vs. 1	0.03 (-0.34, 0.40); 0.866	0.27 (-0.06, 0.60); 0.109	0.13 (-0.07, 0.33); 0.191	0.632
6 vs. 1	0.27 (-0.10, 0.64); 0.157	0.24 (-0.08, 0.57); 0.145	0.26 (0.06, 0.46); 0.011*	0.996
4 vs. 2	0.09 (-0.28, 0.46); 0.638	0.23 (-0.10, 0.56); 0.179	-0.09 (-0.29, 0.11); 0.364	0.242
6 vs. 2	0.32 (-0.05, 0.69); 0.086	0.20 (-0.13, 0.53); 0.230	0.03 (-0.17, 0.23); 0.752	0.343
6 vs. 4	0.24 (-0.13, 0.60); 0.213	-0.02 (-0.35, 0.31); 0.885	0.13 (-0.08, 0.33); 0.221	0.577

Πίνακας 3.3. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του BALP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

% Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	-4.78 (-19.25, 9.70); 0.518	0.86 (-12.46, 14.17); 0.899	-4.89 (-18.25, 8.48); 0.474	0.796
2 vs. 0	-7.05 (-21.38, 7.27); 0.334	2.60 (-10.83, 16.04); 0.704	10.56 (-4.01, 25.12); 0.155	0.238
4 vs. 0	-3.50 (-18.06, 11.06); 0.638	11.69 (-2.43, 25.82); 0.105	4.23 (-9.75, 18.20); 0.553	0.341
6 vs. 0	5.92 (-9.35, 21.20); 0.447	10.72 (-3.33, 24.77); 0.135	12.75 (-2.04, 27.55); 0.091	0.812
2 vs. 1	-2.39 (-17.77, 12.98); 0.761	1.73 (-11.53, 14.99); 0.798	16.24 (0.27, 32.20); 0.046*	0.222
4 vs. 1	1.34 (-14.32, 17.01); 0.866	10.74 (-3.19, 24.67); 0.131	9.58 (-5.62, 24.79); 0.217	0.646
6 vs. 1	11.24 (-5.27, 27.74); 0.182	9.78 (-4.08, 23.63); 0.167	18.55 (2.28, 34.81); 0.025*	0.706
4 vs. 2	3.83 (-12.43, 20.08); 0.644	8.86 (-4.69, 22.41); 0.200	-5.72 (-17.77, 6.33); 0.352	0.274
6 vs. 2	13.96 (-3.20, 31.13); 0.111	7.91 (-5.57, 21.38); 0.250	1.99 (-10.49, 14.47); 0.755	0.531
6 vs. 4	9.76 (-6.39, 25.92); 0.236	-0.87 (-12.69, 10.94); 0.885	8.18 (-5.57, 21.92); 0.244	0.478

Γράφημα 3.2. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του BALP ανά ομάδα



Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του CTX-I ανά ομάδα

Παράγοντας	Συντελεστής	95% C.I.	p-value
Σταθερά			
per unit	1.41	(0.80, 2.02)	<0.001
Ομάδα			
PTGM	1.60	(0.74, 2.46)	<0.001
AGM	1.16	(0.30, 2.02)	0.008
CM*	0		
Εβδομάδα			
0*	0		
1 ^η	0.65	(-0.07, 1.38)	0.079
2 ^η	1.41	(-0.33, 3.16)	0.113
4 ^η	1.03	(0.11, 1.95)	0.027
6 ^η	2.10	(-0.10, 4.30)	0.062
Ομάδα & Εβδομάδα interaction			
PTGM & 1η	-0.18	(-1.21, 0.86)	0.739
PTGM & 2η	2.97	(0.50, 5.44)	0.018
PTGM & 4η	0.14	(-1.15, 1.44)	0.829
PTGM & 6η	-1.60	(-4.71, 1.51)	0.315
AGM & 1 ^η	-0.40	(-1.43, 0.63)	0.451
AGM & 2 ^η	-0.32	(-2.79, 2.15)	0.800
AGM & 4 ^η	-0.43	(-1.72, 0.87)	0.520
AGM & 6 ^η	-1.75	(-4.86, 1.36)	0.271

* Ομάδα αναφοράς

Συνολικοί έλεγχοι (global tests)

Διαφορές μεταξύ ομάδων προεγχειρητικά: p-value=0.001

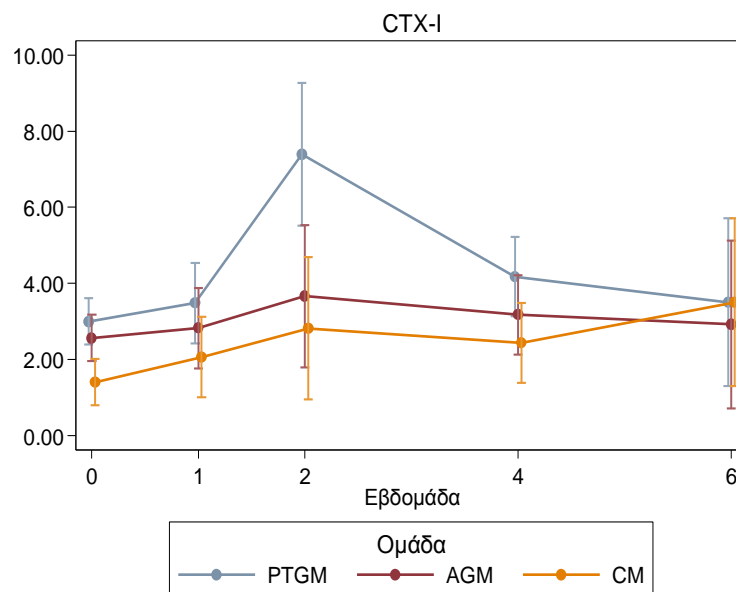
Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα PTGM: p-value<0.001

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα AGM: p-value=0.615

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα CM: p-value=0.020

Διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων: p-value=0.017

Γράφημα 3.3. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του CTX-I ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



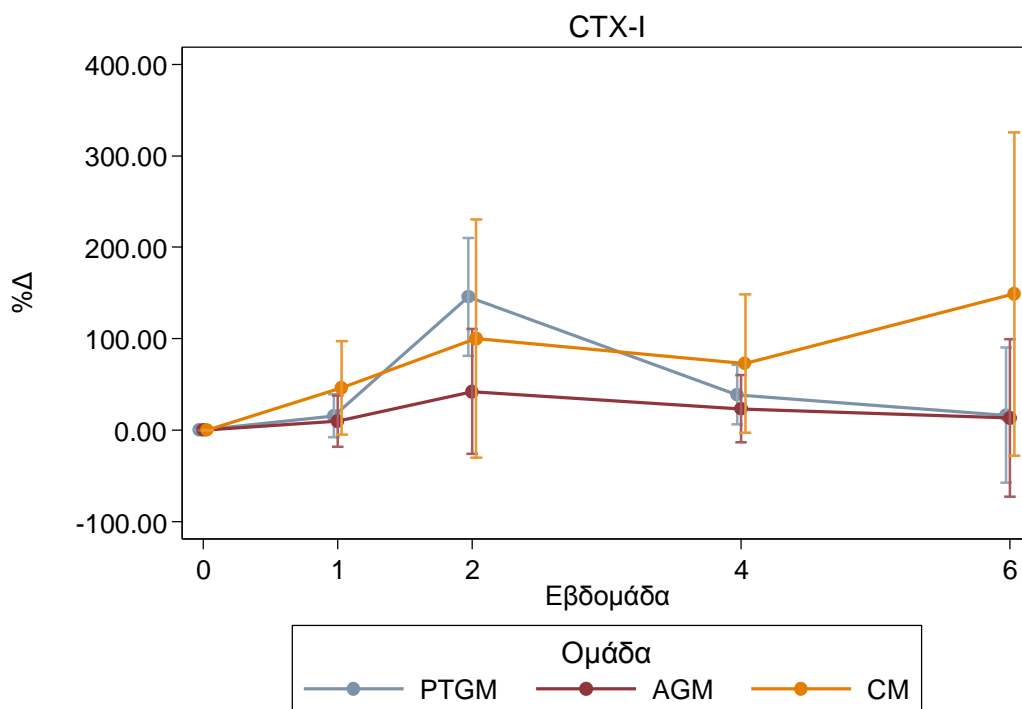
Πίνακας 3.5. Εκτιμώμενες μεταβολές του CTX-I μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	0.48 (-0.25, 1.21); 0.198	0.26 (-0.47, 0.99); 0.488	0.65 (-0.07, 1.38); 0.079	0.752
2 vs. 0	4.39 (2.64, 6.13); <0.001*	1.09 (-0.65, 2.84); 0.219	1.41 (-0.33, 3.16); 0.113	0.016*
4 vs. 0	1.17 (0.26, 2.09); 0.012*	0.61 (-0.31, 1.52); 0.195	1.03 (0.11, 1.95); 0.027*	0.671
6 vs. 0	0.50 (-1.70, 2.70); 0.655	0.35 (-1.85, 2.55); 0.754	2.10 (-0.10, 4.30); 0.062	0.475
2 vs. 1	3.91 (1.97, 5.84); <0.001*	0.84 (-1.10, 2.77); 0.397	0.76 (-1.18, 2.69); 0.442	0.037*
4 vs. 1	0.69 (-0.58, 1.97); 0.286	0.35 (-0.93, 1.62); 0.593	0.38 (-0.90, 1.65); 0.563	0.916
6 vs. 1	0.02 (-2.30, 2.35); 0.985	0.09 (-2.23, 2.42); 0.937	1.44 (-0.88, 3.77); 0.224	0.634
4 vs. 2	-3.21 (-4.43, -2.00); <0.001*	-0.49 (-1.70, 0.73); 0.431	-0.38 (-1.60, 0.83); 0.539	0.001*
6 vs. 2	-3.88 (-6.58, -1.18); 0.005*	-0.74 (-3.44, 1.96); 0.590	0.68 (-2.02, 3.38); 0.619	0.056
6 vs. 4	-0.67 (-2.86, 1.51); 0.547	-0.25 (-2.44, 1.93); 0.819	1.07 (-1.12, 3.25); 0.339	0.516

Πίνακας 3.6. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του CTX-I μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

% Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	15.95 (-7.75, 39.66); 0.187	10.03 (-17.85, 37.92); 0.481	46.50 (-4.36, 97.36); 0.073	0.463
2 vs. 0	145.95 (81.73, 210.18); <0.001*	42.55 (-25.73, 110.82); 0.222	100.33 (-29.52, 230.19); 0.130	0.096
4 vs. 0	39.07 (6.74, 71.41); 0.018*	23.57 (-13.10, 60.24); 0.208	73.25 (-2.18, 148.67); 0.057	0.493
6 vs. 0	16.71 (-57.01, 90.43); 0.657	13.66 (-72.36, 99.68); 0.756	148.96 (-27.70, 325.62); 0.098	0.368
2 vs. 1	112.11 (37.98, 186.25); 0.003*	29.55 (-43.25, 102.34); 0.426	36.75 (-64.87, 138.36); 0.478	0.252
4 vs. 1	19.94 (-20.65, 60.52); 0.336	12.30 (-35.72, 60.32); 0.616	18.26 (-49.69, 86.21); 0.598	0.971
6 vs. 1	0.65 (-66.14, 67.44); 0.985	3.30 (-79.29, 85.89); 0.938	69.94 (-59.38, 199.27); 0.289	0.630
4 vs. 2	-43.46 (-52.53, -34.38); <0.001*	-13.31 (-40.90, 14.27); 0.344	-13.52 (-49.26, 22.22); 0.458	0.045*
6 vs. 2	-52.55 (-83.22, -21.88); 0.001*	-20.26 (-88.37, 47.84); 0.560	24.27 (-81.71, 130.25); 0.654	0.309
6 vs. 4	-16.08 (-67.66, 35.49); 0.541	-8.02 (-76.28, 60.25); 0.818	43.70 (-51.84, 139.24); 0.370	0.554

Γράφημα 3.4. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του CTX-I ανά ομάδα



Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του N-MID-OC ανά ομάδα

Παράγοντας	Συντελεστής	95% C.I.	p-value
Σταθερά			
per unit	677.9	(540.7, 815.2)	<0.001
Ομάδα			
PTGM	-1.7	(-195.8, 192.3)	0.986
AGM	183.5	(-10.5, 377.6)	0.064
CM*	0		
Εβδομάδα			
0*	0		
1 ^η	-66.8	(-164.5, 30.9)	0.180
2 ^η	-28.5	(-131.6, 74.5)	0.587
4 ^η	-74.7	(-180.8, 31.4)	0.168
6 ^η	-72.4	(-190.6, 45.7)	0.230
Ομάδα & Εβδομάδα interaction			
PTGM & 1 ^η	102.4	(-35.8, 240.6)	0.147
PTGM & 2 ^η	65.5	(-80.2, 211.3)	0.378
PTGM & 4 ^η	206.1	(56.1, 356.2)	0.007
PTGM & 6 ^η	159.2	(-7.9, 326.3)	0.062
AGM & 1 ^η	-68.3	(-206.5, 69.9)	0.333
AGM & 2 ^η	-70.4	(-216.1, 75.4)	0.344
AGM & 4 ^η	46.4	(-103.6, 196.5)	0.544
AGM & 6 ^η	42.9	(-124.1, 210.0)	0.615

* Ομάδα αναφοράς

Συνολικοί έλεγχοι (global tests)

Διαφορές μεταξύ ομάδων προεγχειρητικά: p-value=0.099

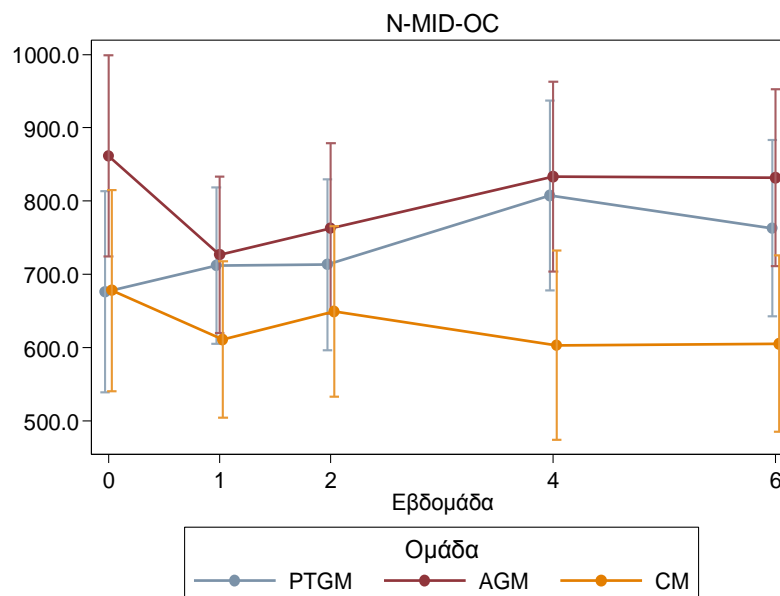
Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα PTGM: p-value=0.157

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα AGM: p-value=0.034

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα CM: p-value=0.641

Διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων: p-value=0.113

Γράφημα 3.5. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του N-MID-OC ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



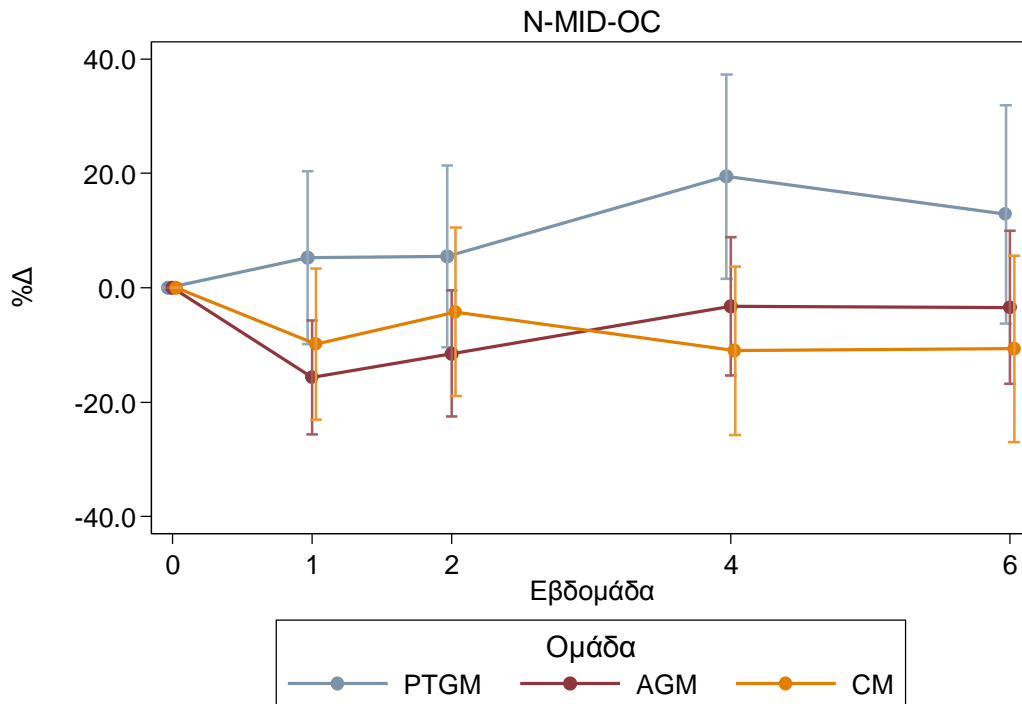
Πίνακας 3.8. Εκτιμώμενες μεταβολές του N-MID-OC μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	35.6 (-62.1, 133.3); 0.475	-135.1 (-232.8, -37.3); 0.007*	-66.8 (-164.5, 30.9); 0.180	0.051
2 vs. 0	37.0 (-66.1, 140.0); 0.482	-98.9 (-202.0, 4.1); 0.060	-28.5 (-131.6, 74.5); 0.587	0.188
4 vs. 0	131.4 (25.3, 237.5); 0.015*	-28.3 (-134.4, 77.9); 0.602	-74.7 (-180.8, 31.4); 0.168	0.019*
6 vs. 0	86.8 (-31.3, 204.9); 0.150	-29.5 (-147.6, 88.6); 0.624	-72.4 (-190.6, 45.7); 0.230	0.154
2 vs. 1	1.4 (-96.7, 99.5); 0.978	36.1 (-61.9, 134.2); 0.470	38.2 (-59.8, 136.3); 0.445	0.843
4 vs. 1	95.8 (-2.0, 193.6); 0.055	106.8 (9.0, 204.6); 0.032*	-7.9 (-105.7, 89.9); 0.874	0.200
6 vs. 1	51.2 (-43.9, 146.3); 0.291	105.5 (10.4, 200.6); 0.030*	-5.6 (-100.7, 89.5); 0.907	0.269
4 vs. 2	94.5 (-17.8, 206.7); 0.099	70.7 (-41.6, 182.9); 0.217	-46.2 (-158.4, 66.1); 0.420	0.178
6 vs. 2	49.8 (-69.1, 168.7); 0.412	69.4 (-49.5, 188.3); 0.253	-43.9 (-162.8, 75.0); 0.470	0.369
6 vs. 4	-44.6 (-120.6, 31.3); 0.250	-1.3 (-77.2, 74.7); 0.974	2.3 (-73.7, 78.3); 0.953	0.635

Πίνακας 3.9. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του N-MID-OC μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

% Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	5.3 (-9.9, 20.4); 0.496	-15.7 (-25.6, -5.7); 0.002*	-9.9 (-23.1, 3.4); 0.145	0.077
2 vs. 0	5.5 (-10.4, 21.4); 0.500	-11.5 (-22.5, -0.4); 0.042*	-4.2 (-19.0, 10.5); 0.576	0.225
4 vs. 0	19.4 (1.6, 37.3); 0.033*	-3.3 (-15.4, 8.8); 0.595	-11.0 (-25.8, 3.7); 0.143	0.031*
6 vs. 0	12.8 (-6.2, 31.9); 0.187	-3.4 (-16.8, 10.0); 0.617	-10.7 (-27.0, 5.6); 0.199	0.177
2 vs. 1	0.2 (-13.6, 14.0); 0.978	5.0 (-8.8, 18.8); 0.479	6.3 (-10.2, 22.7); 0.457	0.830
4 vs. 1	13.5 (-0.8, 27.7); 0.065	14.7 (0.6, 28.8); 0.040*	-1.3 (-17.3, 14.7); 0.873	0.276
6 vs. 1	7.2 (-6.5, 20.9); 0.304	14.5 (0.7, 28.4); 0.040*	-0.9 (-16.4, 14.6); 0.907	0.346
4 vs. 2	13.2 (-3.4, 29.9); 0.119	9.3 (-6.0, 24.6); 0.235	-7.1 (-24.0, 9.8); 0.409	0.201
6 vs. 2	7.0 (-10.3, 24.2); 0.427	9.1 (-7.2, 25.4); 0.274	-6.8 (-24.5, 11.0); 0.456	0.389
6 vs. 4	-5.5 (-14.6, 3.6); 0.233	-0.2 (-9.3, 9.0); 0.974	0.4 (-12.3, 13.0); 0.953	0.647

Γράφημα 3.6. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του N-MID-OC ανά ομάδα



Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του PINP ανά ομάδα

Παράγοντας	Συντελεστής	95% C.I.	p-value
Σταθερά			
per unit	797.5	(602.0, 992.9)	<0.001
Ομάδα			
PTGM	-1.3	(-277.6, 275.1)	0.993
AGM	91.9	(-184.5, 368.3)	0.515
CM*	0		
Εβδομάδα			
0*	0		
1 ^η	660.2	(236.6, 1083.7)	0.002
2 ^η	134.5	(-69.9, 339.0)	0.197
4 ^η	-2.5	(-426.9, 421.8)	0.991
6 ^η	-126.8	(-295.1, 41.5)	0.140
Ομάδα & Εβδομάδα interaction			
PTGM & 1 ^η	-332.2	(-931.2, 266.8)	0.277
PTGM & 2 ^η	-46.8	(-336.0, 242.3)	0.751
PTGM & 4 ^η	217.5	(-382.6, 817.5)	0.478
PTGM & 6 ^η	107.8	(-130.2, 345.8)	0.375
AGM & 1 ^η	-516.2	(-1115.2, 82.8)	0.091
AGM & 2 ^η	76.8	(-212.3, 366.0)	0.602
AGM & 4 ^η	508.6	(-91.4, 1108.7)	0.097
AGM & 6 ^η	87.5	(-150.5, 325.5)	0.471

* Ομάδα αναφοράς

Συνολικοί έλεγχοι (global tests)

Διαφορές μεταξύ ομάδων προεγχειρητικά: p-value=0.750

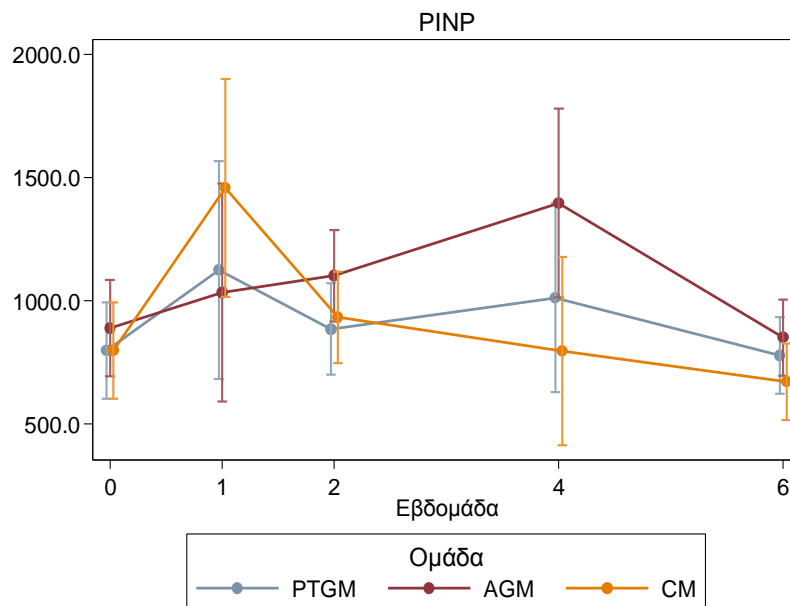
Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα PTGM: p-value=0.409

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα AGM: p-value=0.020

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα CM: p-value=0.005

Διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων: p-value=0.602

Γράφημα 3.7. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του PINP ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



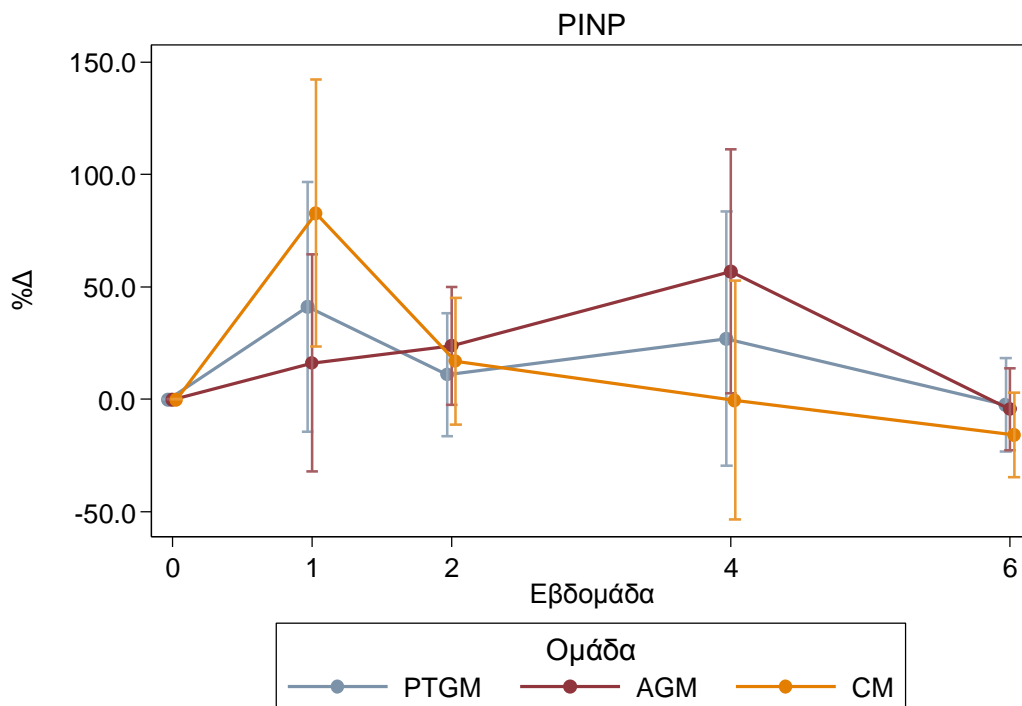
Πίνακας 3.11. Εκτιμώμενες μεταβολές του PINP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	328.0 (-95.5, 751.6); 0.129	144.0 (-279.5, 567.6); 0.505	660.2 (236.6, 1083.7); 0.002*	0.231
2 vs. 0	87.7 (-116.7, 292.2); 0.400	211.4 (6.9, 415.8); 0.043*	134.5 (-69.9, 339.0); 0.197	0.699
4 vs. 0	214.9 (-209.4, 639.2); 0.321	506.1 (81.8, 930.4); 0.019*	-2.5 (-426.9, 421.8); 0.991	0.249
6 vs. 0	-19.0 (-187.3, 149.3); 0.825	-39.3 (-207.6, 129.0); 0.647	-126.8 (-295.1, 41.5); 0.140	0.641
2 vs. 1	-240.3 (-684.7, 204.1); 0.289	67.4 (-377.0, 511.7); 0.766	-525.7 (-970.0, -81.3); 0.020*	0.181
4 vs. 1	-113.1 (-684.3, 458.1); 0.698	362.1 (-209.2, 933.3); 0.214	-662.7 (-1234.0, -91.5); 0.023*	0.045*
6 vs. 1	-347.0 (-792.8, 98.7); 0.127	-183.3 (-629.1, 262.4); 0.420	-787.0 (-1232.8, -341.2); 0.001*	0.152
4 vs. 2	127.2 (-293.3, 547.7); 0.553	294.7 (-125.8, 715.2); 0.170	-137.1 (-557.6, 283.4); 0.523	0.357
6 vs. 2	-106.7 (-317.4, 103.9); 0.321	-250.7 (-461.3, -40.1); 0.020*	-261.3 (-472.0, -50.7); 0.015*	0.524
6 vs. 4	-233.9 (-627.1, 159.3); 0.244	-545.4 (-938.6, -152.2); 0.007*	-124.3 (-517.4, 268.9); 0.536	0.305

Πίνακας 3.12. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του PINP μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

% Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	41.2 (-14.3, 96.7); 0.146	16.2 (-32.0, 64.4); 0.511	82.8 (23.4, 142.2); 0.006*	0.233
2 vs. 0	11.0 (-16.3, 38.3); 0.429	23.8 (-2.6, 50.1); 0.077	16.9 (-11.3, 45.1); 0.241	0.804
4 vs. 0	27.0 (-29.5, 83.5); 0.349	56.9 (2.6, 111.2); 0.040*	-0.3 (-53.5, 52.9); 0.991	0.336
6 vs. 0	-2.4 (-23.1, 18.4); 0.822	-4.4 (-22.7, 13.9); 0.636	-15.9 (-34.7, 2.9); 0.098	0.576
2 vs. 1	-21.4 (-53.4, 10.7); 0.191	6.5 (-39.0, 52.1); 0.779	-36.1 (-57.1, -15.1); 0.001*	0.233
4 vs. 1	-10.1 (-58.0, 37.9); 0.681	35.0 (-32.1, 102.2); 0.307	-45.5 (-75.9, -15.1); 0.003*	0.075
6 vs. 1	-30.9 (-59.4, -2.3); 0.034*	-17.7 (-53.8, 18.4); 0.336	-54.0 (-70.2, -37.8); <0.001*	0.117
4 vs. 2	14.4 (-34.5, 63.3); 0.564	26.8 (-13.5, 67.1); 0.193	-14.7 (-58.7, 29.3); 0.512	0.385
6 vs. 2	-12.1 (-34.2, 10.1); 0.285	-22.8 (-39.4, -6.1); 0.007*	-28.0 (-47.1, -8.9); 0.004*	0.559
6 vs. 4	-23.1 (-54.1, 7.9); 0.144	-39.1 (-57.9, -20.3); <0.001*	-15.6 (-58.3, 27.0); 0.472	0.491

Γράφημα 3.8. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του PINP ανά ομάδα



Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα από μοντέλο επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για την διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του TRAP5b ανά ομάδα

Παράγοντας	Συντελεστής	95% C.I.	p-value
Σταθερά			
per unit	11.05	(9.09, 13.01)	<0.001
Ομάδα			
PTGM	-0.38	(-3.15, 2.39)	0.788
AGM	-0.36	(-3.13, 2.42)	0.802
CM*	0		
Εβδομάδα			
0*	0		
1 ^η	2.62	(0.77, 4.48)	0.006
2 ^η	1.70	(-0.13, 3.53)	0.069
4 ^η	1.91	(-0.74, 4.57)	0.158
6 ^η	-1.04	(-2.49, 0.42)	0.163
Ομάδα & Εβδομάδα interaction			
PTGM & 1η	-0.65	(-3.28, 1.97)	0.626
PTGM & 2η	-1.02	(-3.62, 1.57)	0.438
PTGM & 4η	0.49	(-3.26, 4.25)	0.797
PTGM & 6η	0.10	(-1.95, 2.16)	0.922
AGM & 1 ^η	-1.56	(-4.18, 1.07)	0.245
AGM & 2 ^η	0.18	(-2.41, 2.77)	0.894
AGM & 4 ^η	-0.00	(-3.76, 3.75)	0.999
AGM & 6 ^η	0.68	(-1.38, 2.73)	0.519

* Ομάδα αναφοράς

Συνολικοί έλεγχοι (global tests)

Διαφορές μεταξύ ομάδων προεγχειρητικά: p-value=0.956

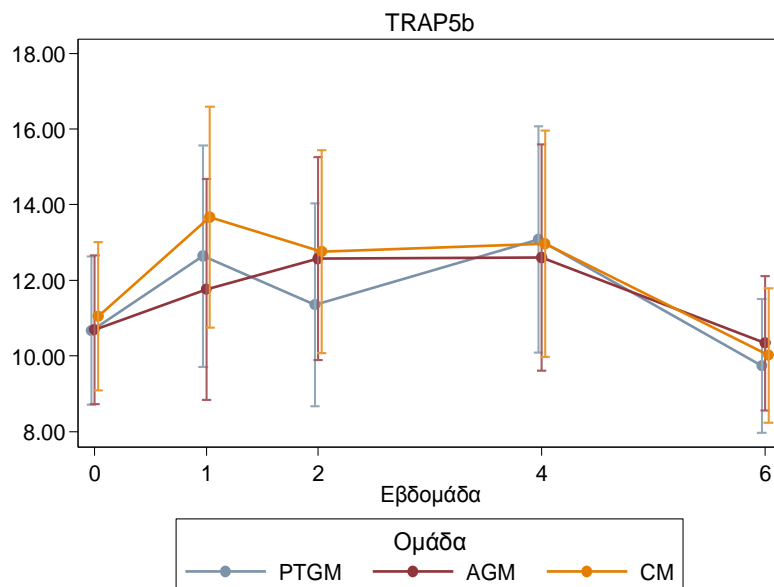
Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα PTGM: p-value=0.026

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα AGM: p-value=0.326

Διαχρονικές μεταβολές στην ομάδα CM: p-value=0.059

Διαφορά στις διαχρονικές μεταβολές μεταξύ των τριών ομάδων: p-value=0.721

Γράφημα 3.9. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) του TRAP5b ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης



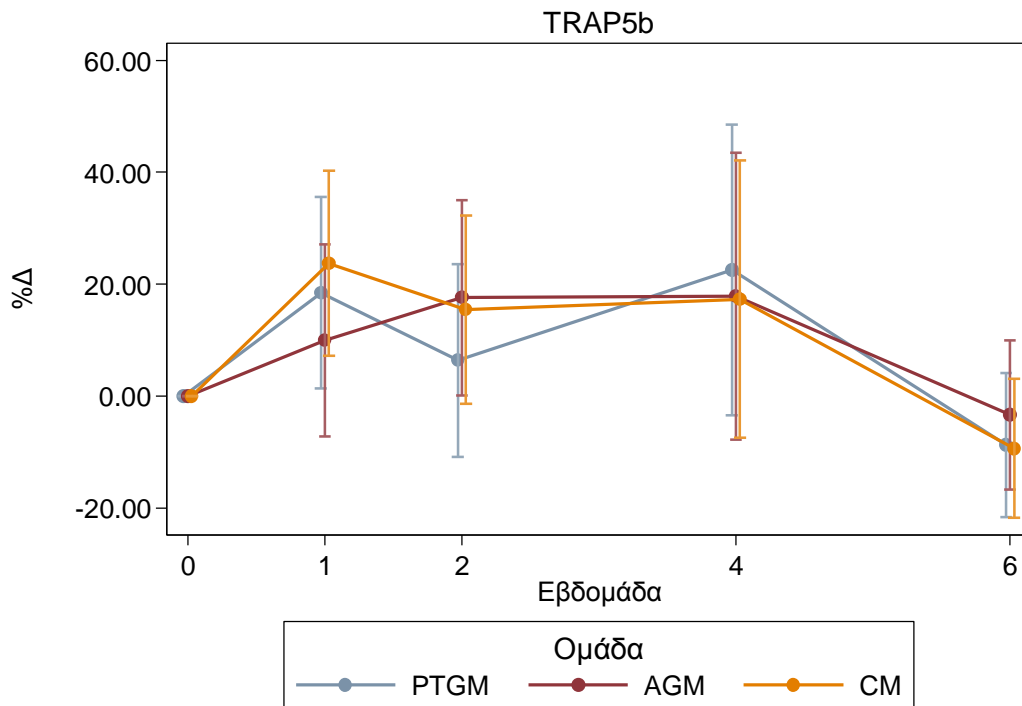
Πίνακας 3.14. Εκτιμώμενες μεταβολές του TRAP5b μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	1.97 (0.11, 3.82); 0.037*	1.07 (-0.79, 2.92); 0.260	2.62 (0.77, 4.48); 0.006*	0.505
2 vs. 0	0.68 (-1.15, 2.51); 0.469	1.88 (0.05, 3.71); 0.044*	1.70 (-0.13, 3.53); 0.069	0.618
4 vs. 0	2.41 (-0.25, 5.06); 0.076	1.91 (-0.74, 4.57); 0.158	1.91 (-0.74, 4.57); 0.158	0.957
6 vs. 0	-0.93 (-2.39, 0.52); 0.208	-0.36 (-1.81, 1.09); 0.628	-1.04 (-2.49, 0.42); 0.163	0.785
2 vs. 1	-1.29 (-2.79, 0.21); 0.091	0.81 (-0.68, 2.31); 0.287	-0.92 (-2.42, 0.58); 0.228	0.115
4 vs. 1	0.44 (-1.95, 2.82); 0.720	0.85 (-1.54, 3.23); 0.487	-0.71 (-3.09, 1.68); 0.560	0.645
6 vs. 1	-2.90 (-5.41, -0.39); 0.023*	-1.42 (-3.94, 1.09); 0.266	-3.66 (-6.17, -1.15); 0.004*	0.456
4 vs. 2	1.73 (-0.12, 3.58); 0.067	0.03 (-1.82, 1.88); 0.973	0.21 (-1.64, 2.06); 0.823	0.378
6 vs. 2	-1.61 (-3.89, 0.67); 0.167	-2.24 (-4.52, 0.04); 0.055	-2.74 (-5.02, -0.46); 0.019*	0.791
6 vs. 4	-3.34 (-5.95, -0.72); 0.012*	-2.27 (-4.88, 0.34); 0.089	-2.95 (-5.56, -0.33); 0.027*	0.849

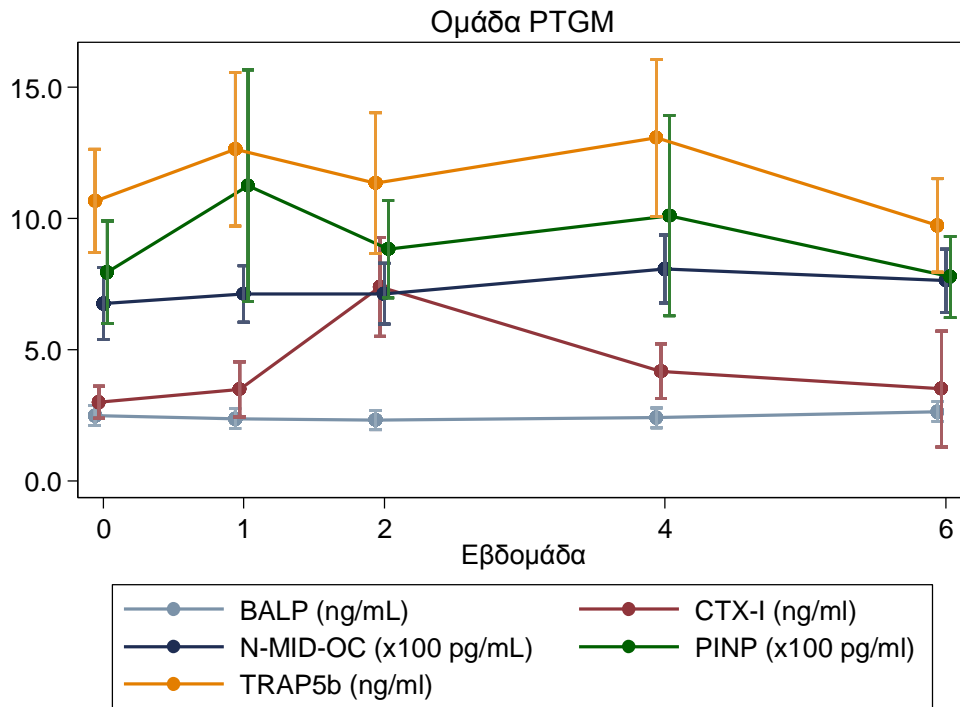
Πίνακας 3.15. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές του TRAP5b μεταξύ χρονικών στιγμών ανά ομάδα

% Δ	PTGM	AGM	CM	p-value
1 vs. 0	18.46 (1.33, 35.59); 0.035*	9.96 (-7.16, 27.08); 0.254	23.73 (7.15, 40.32); 0.005*	0.522
2 vs. 0	6.35 (-10.87, 23.57); 0.470	17.57 (0.13, 35.02); 0.048*	15.41 (-1.41, 32.22); 0.073	0.633
4 vs. 0	22.55 (-3.43, 48.53); 0.089	17.88 (-7.77, 43.52); 0.172	17.32 (-7.47, 42.11); 0.171	0.953
6 vs. 0	-8.75 (-21.65, 4.16); 0.184	-3.36 (-16.65, 9.94); 0.621	-9.37 (-21.78, 3.05); 0.139	0.782
2 vs. 1	-10.22 (-21.31, 0.87); 0.071	6.92 (-6.61, 20.45); 0.316	-6.73 (-17.17, 3.71); 0.207	0.140
4 vs. 1	3.45 (-15.74, 22.64); 0.724	7.20 (-13.83, 28.22); 0.502	-5.19 (-22.24, 11.87); 0.551	0.637
6 vs. 1	-22.97 (-38.93, -7.01); 0.005*	-12.11 (-31.15, 6.93); 0.212	-26.75 (-40.99, -12.52); <0.001*	0.477
4 vs. 2	15.23 (-2.06, 32.52); 0.084	0.26 (-14.48, 14.99); 0.973	1.65 (-12.93, 16.24); 0.824	0.379
6 vs. 2	-14.20 (-31.91, 3.52); 0.116	-17.80 (-33.28, -2.32); 0.024*	-21.47 (-36.25, -6.69); 0.004*	0.824
6 vs. 4	-25.54 (-41.19, -9.88); 0.001*	-18.01 (-35.48, -0.55); 0.043*	-22.75 (-38.97, -6.53); 0.006*	0.819

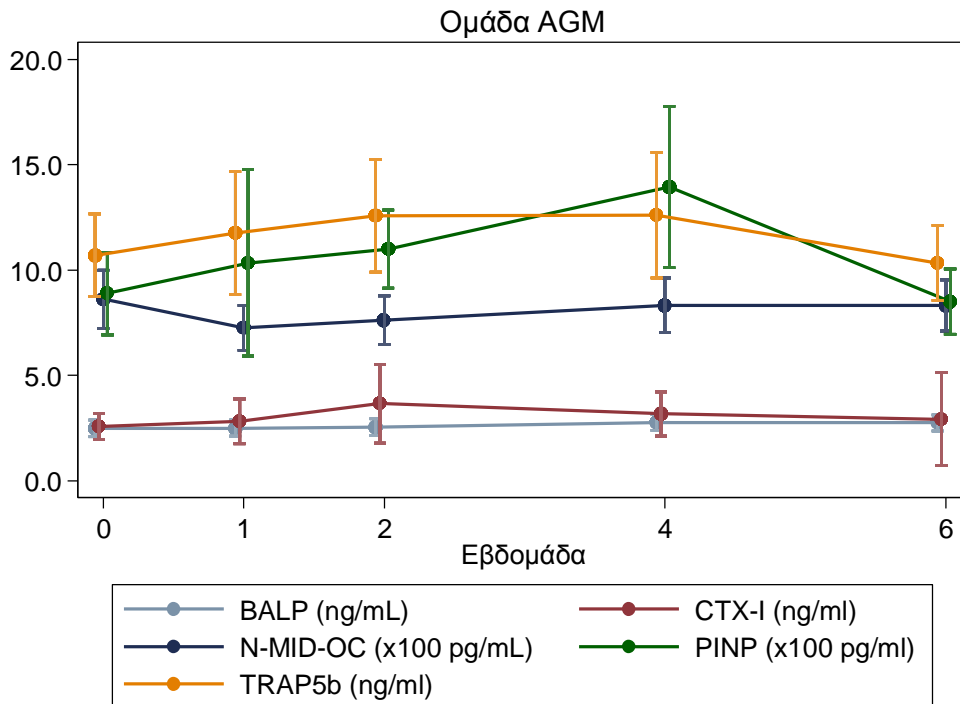
Γράφημα 3.10. Εκτιμώμενες σχετικές % μεταβολές (ως προς αρχική) του TRAP5b ανά ομάδα



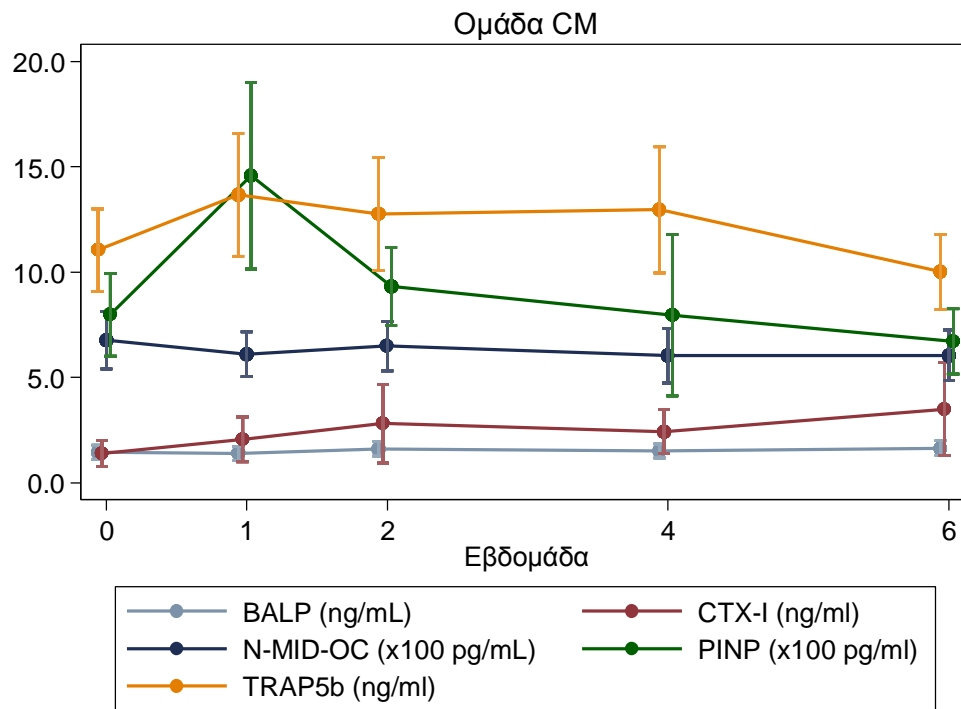
Γράφημα 3.11. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα PTGM



Γράφημα 3.12. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα AGM

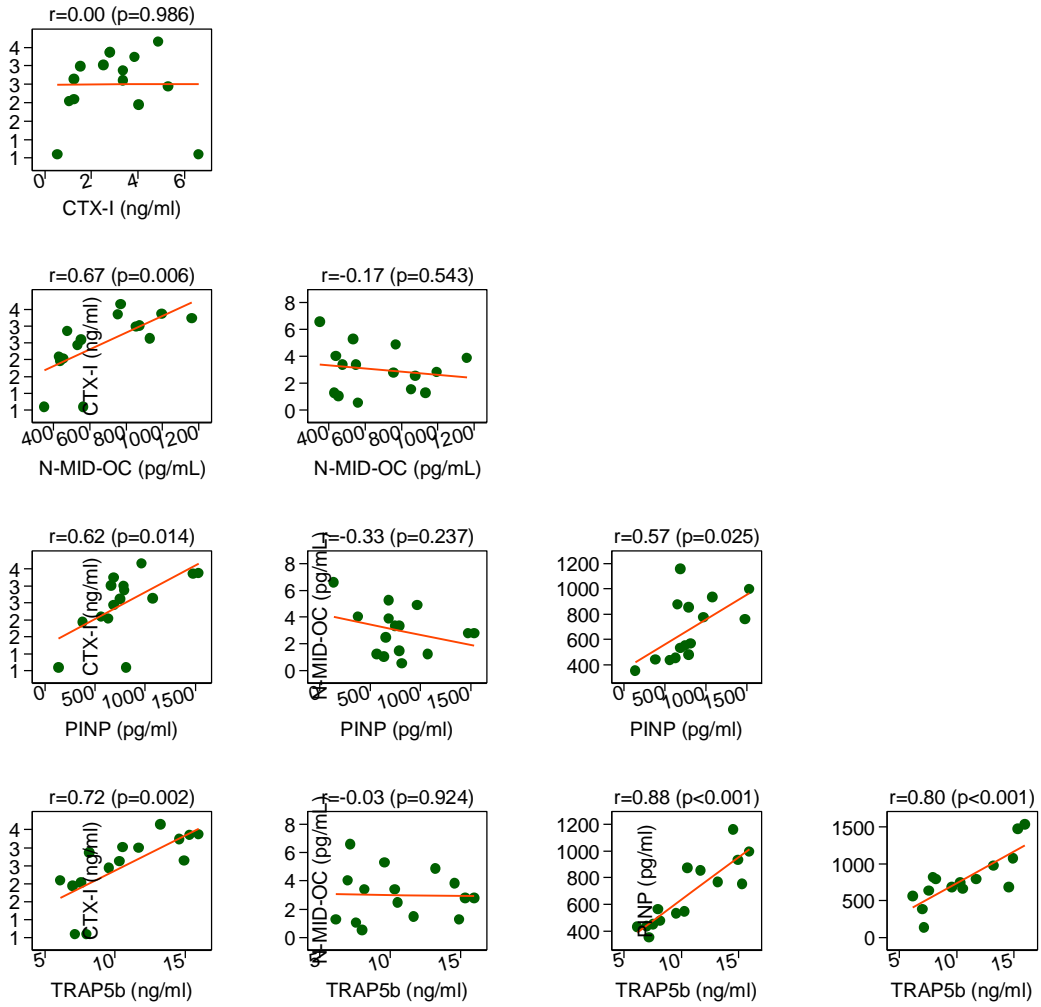


Γράφημα 3.13. Εκτιμώμενη μέση τιμή (95% CI) όλων των δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης. Ομάδα CM



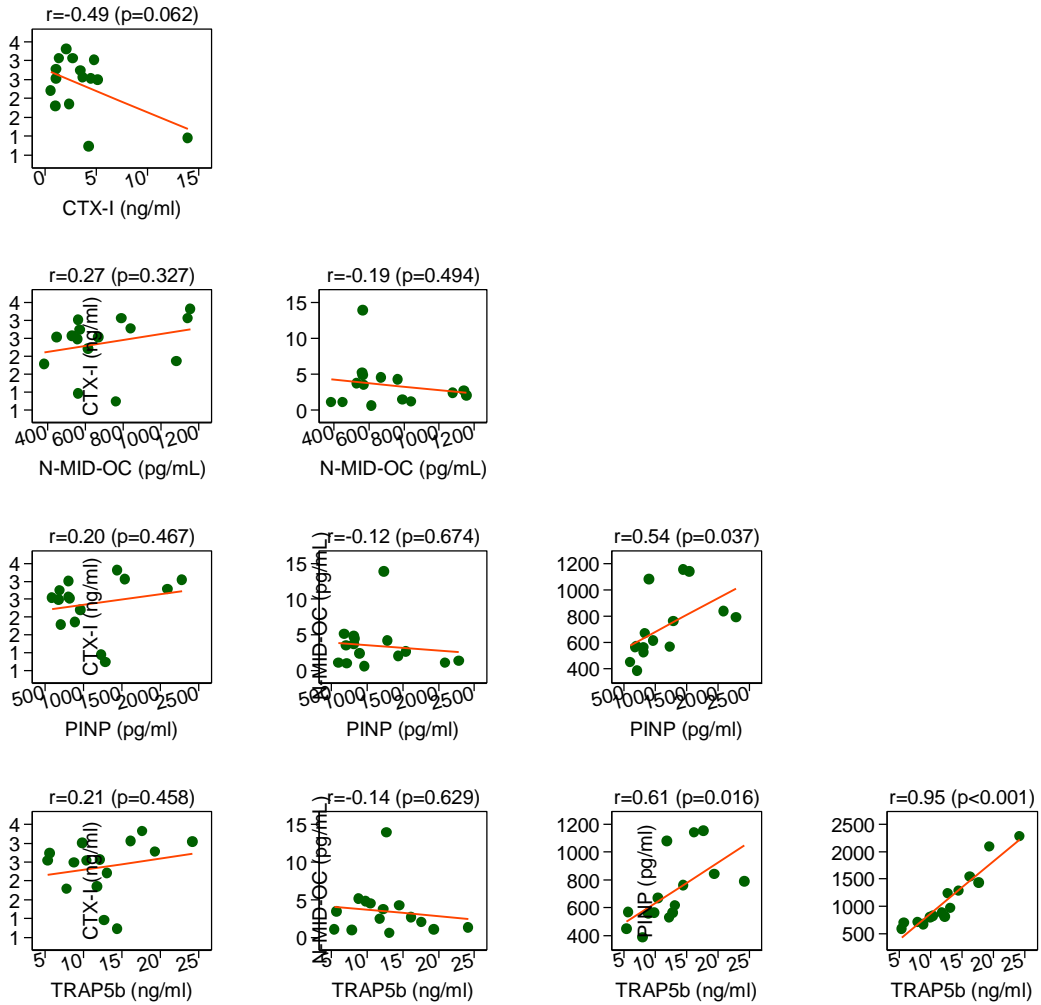
Γράφημα 4.1. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 0

Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 0



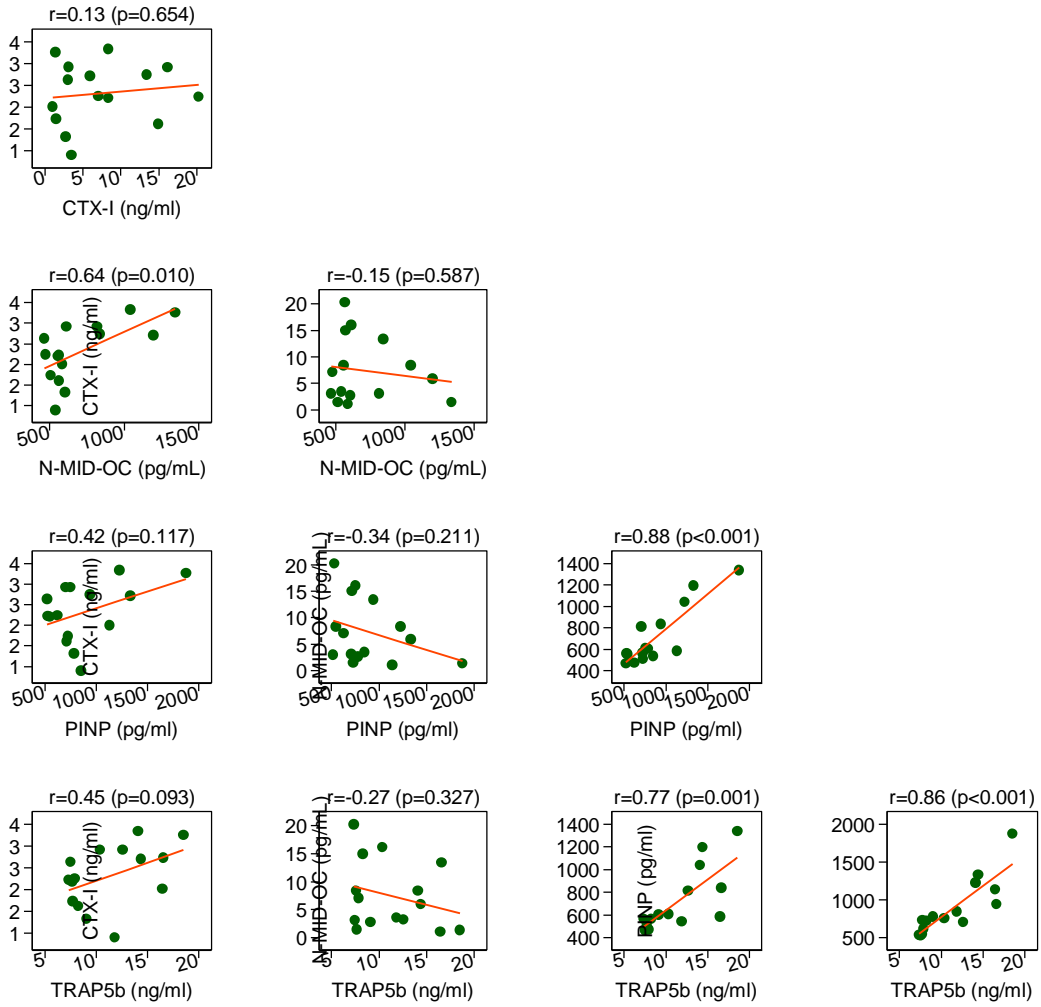
Γράφημα 4.2. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 1η

Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 1η



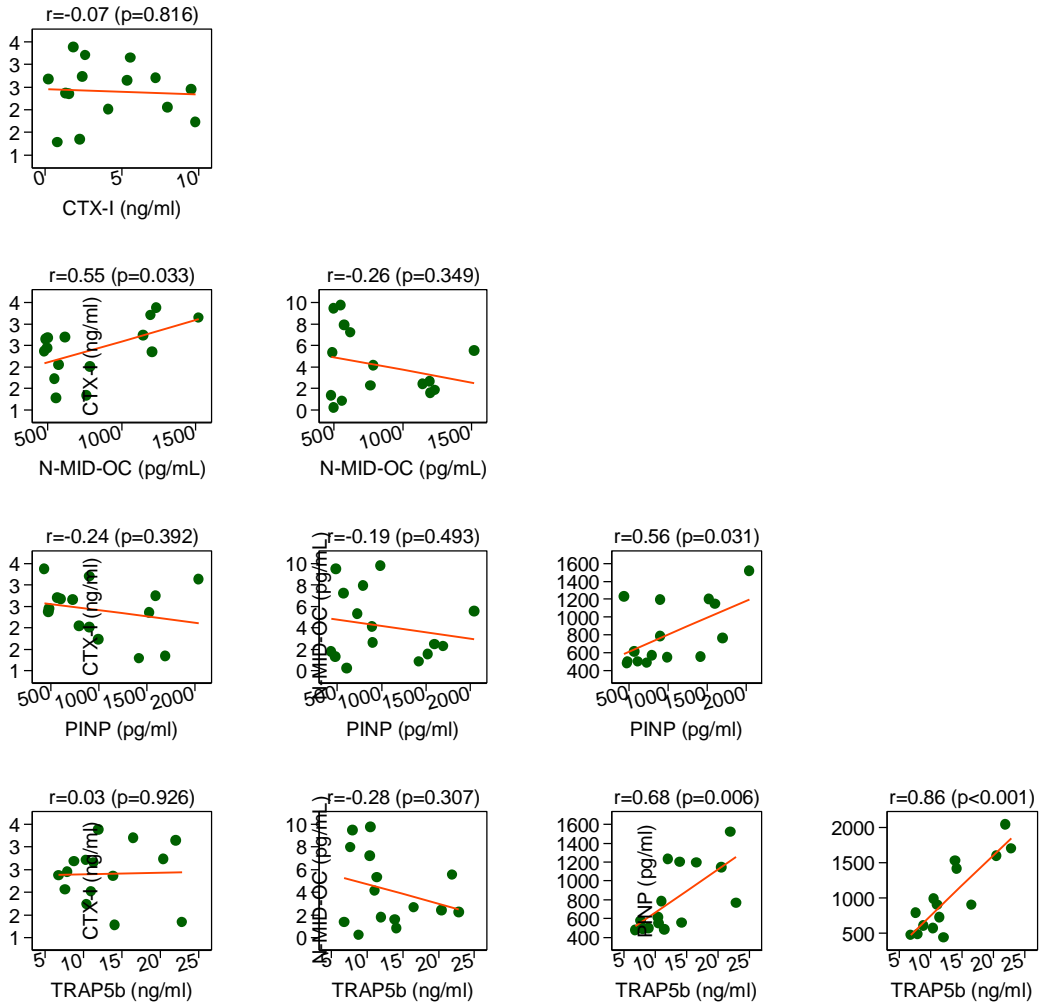
Γράφημα 4.3. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 2η

Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 2η



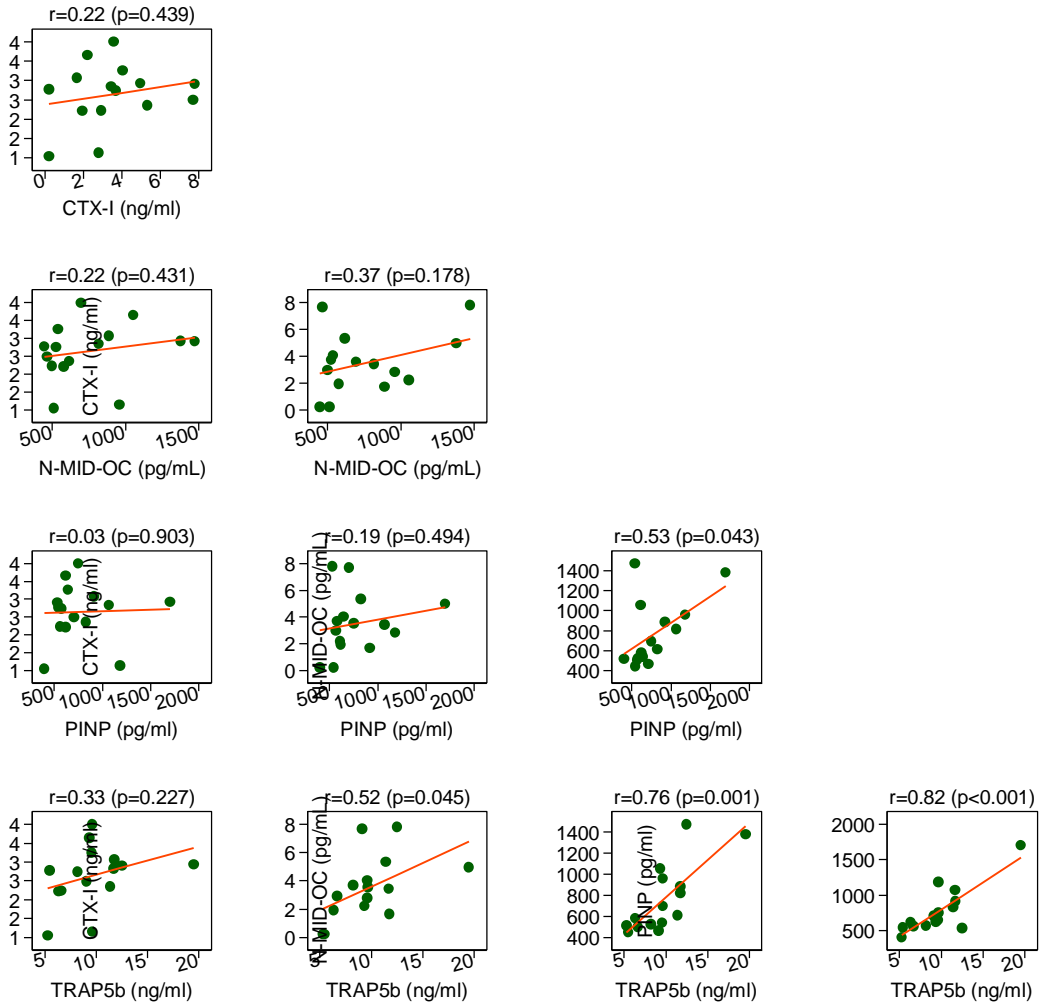
Γράφημα 4.4. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 4η

Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 4η



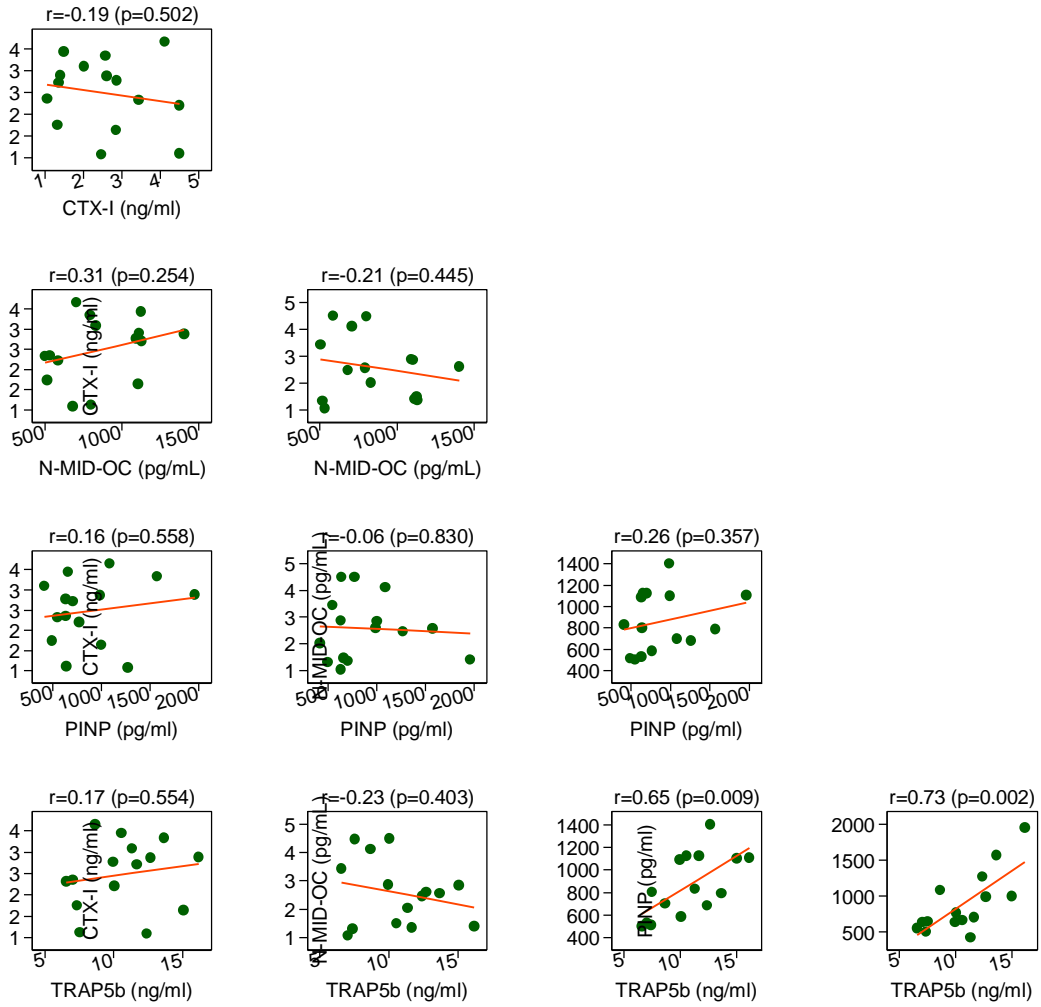
Γράφημα 4.5. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 6η

Ομάδα PTGM, Εβδομάδα 6η



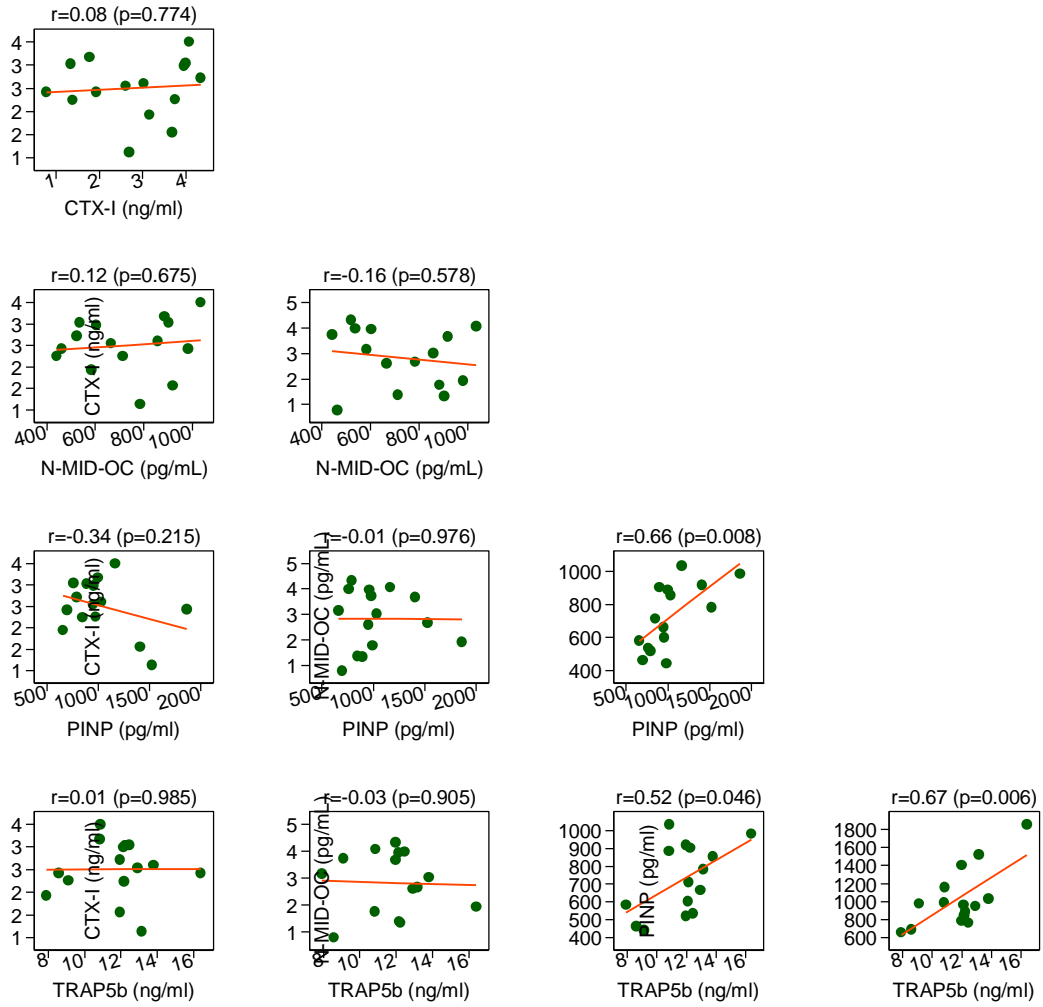
Γράφημα 4.6. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 0

Ομάδα AGM, Εβδομάδα 0



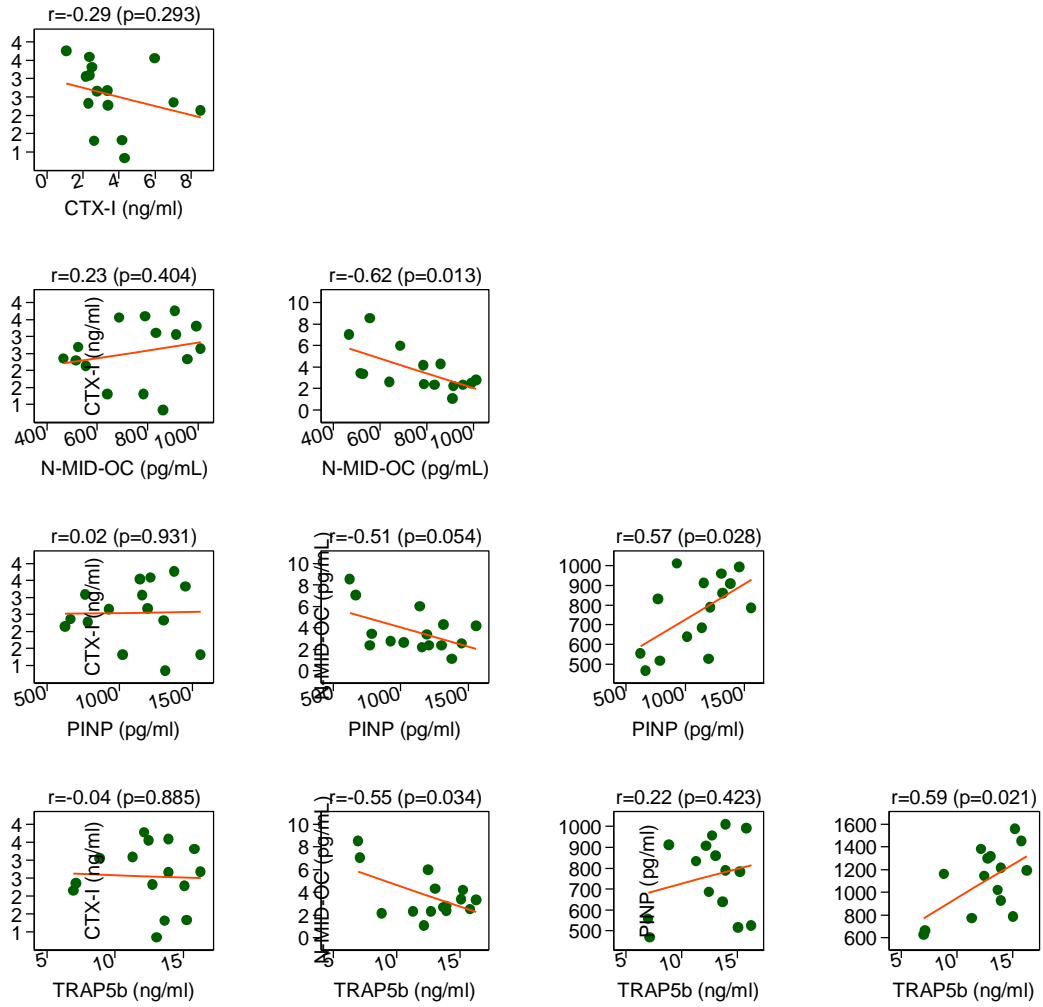
Γράφημα 4.7. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 1η

Ομάδα AGM, Εβδομάδα 1η



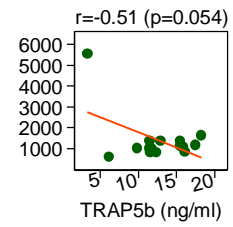
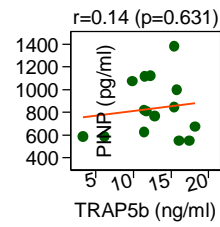
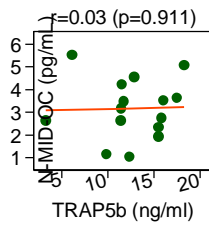
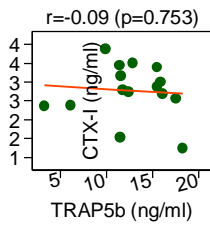
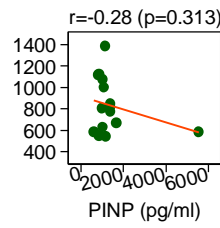
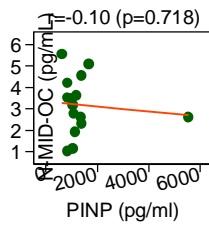
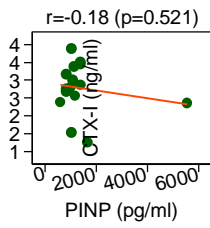
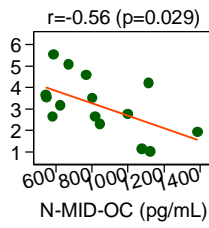
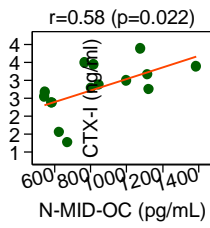
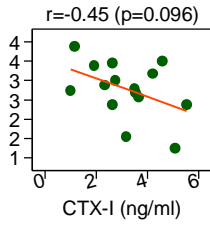
Γράφημα 4.8. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 2η

Ομάδα AGM, Εβδομάδα 2η



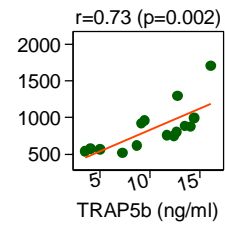
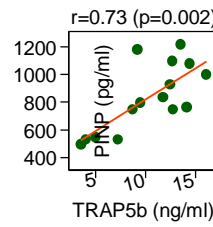
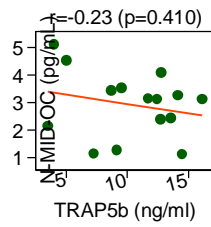
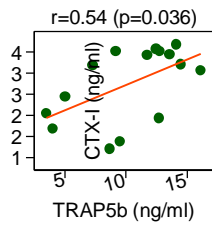
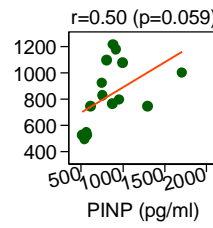
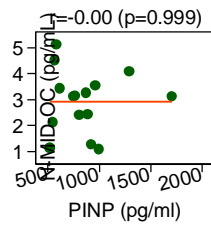
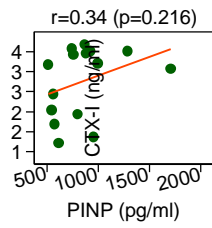
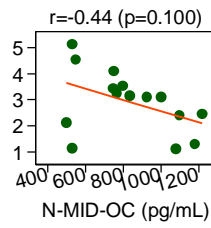
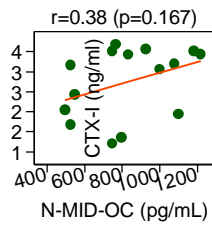
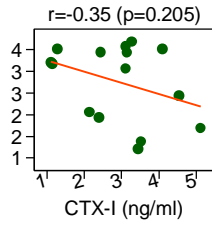
Γράφημα 4.9. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 4η

Ομάδα AGM, Εβδομάδα 4η



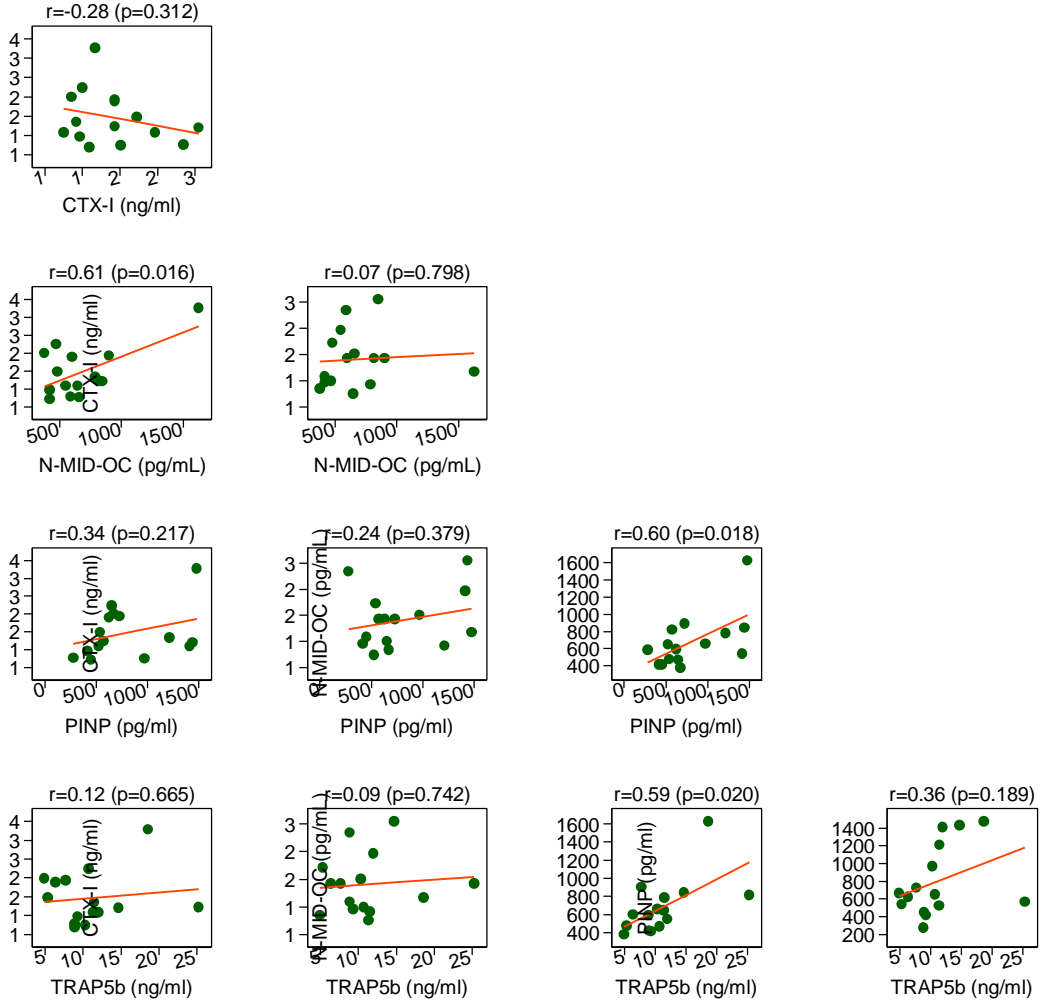
Γράφημα 4.10. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα AGM, Εβδομάδα 6η

Ομάδα AGM, Εβδομάδα 6η



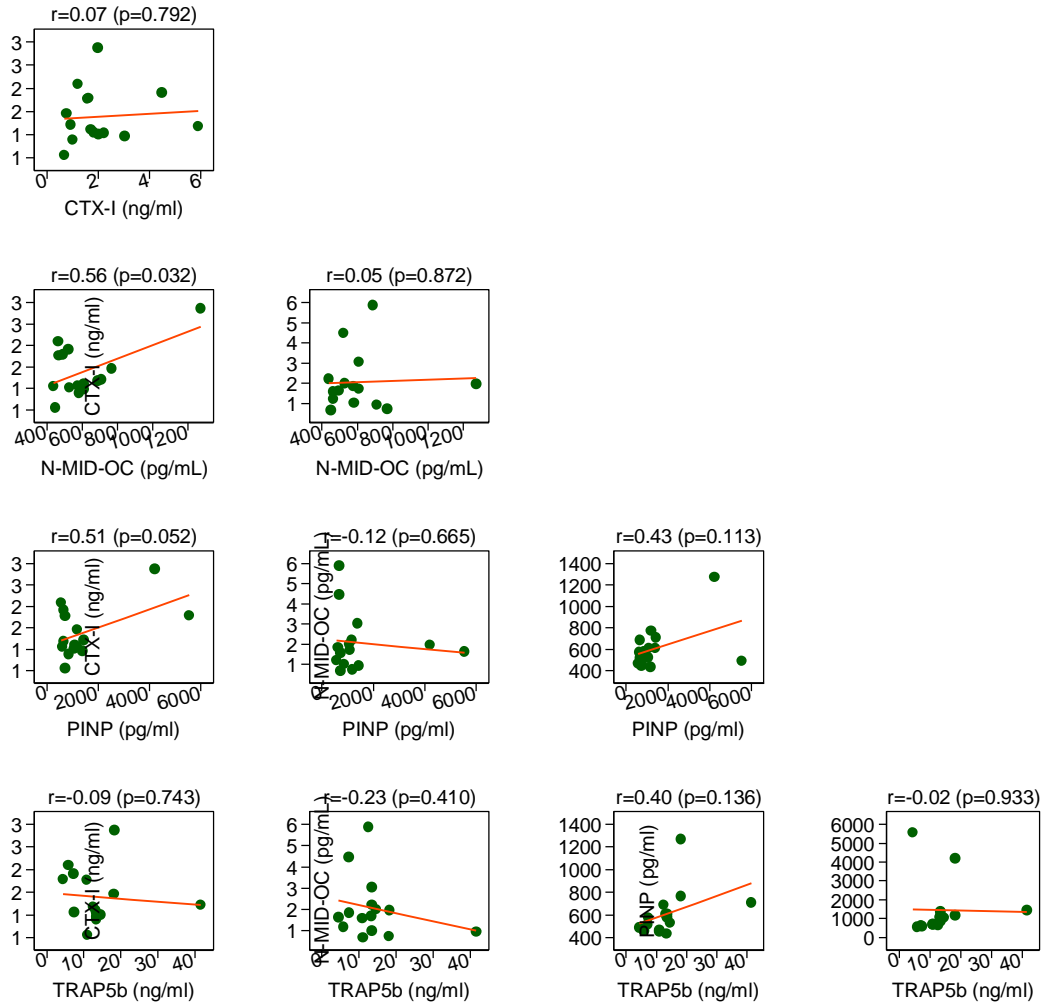
Γράφημα 4.11. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 0

Ομάδα CM, Εβδομάδα 0



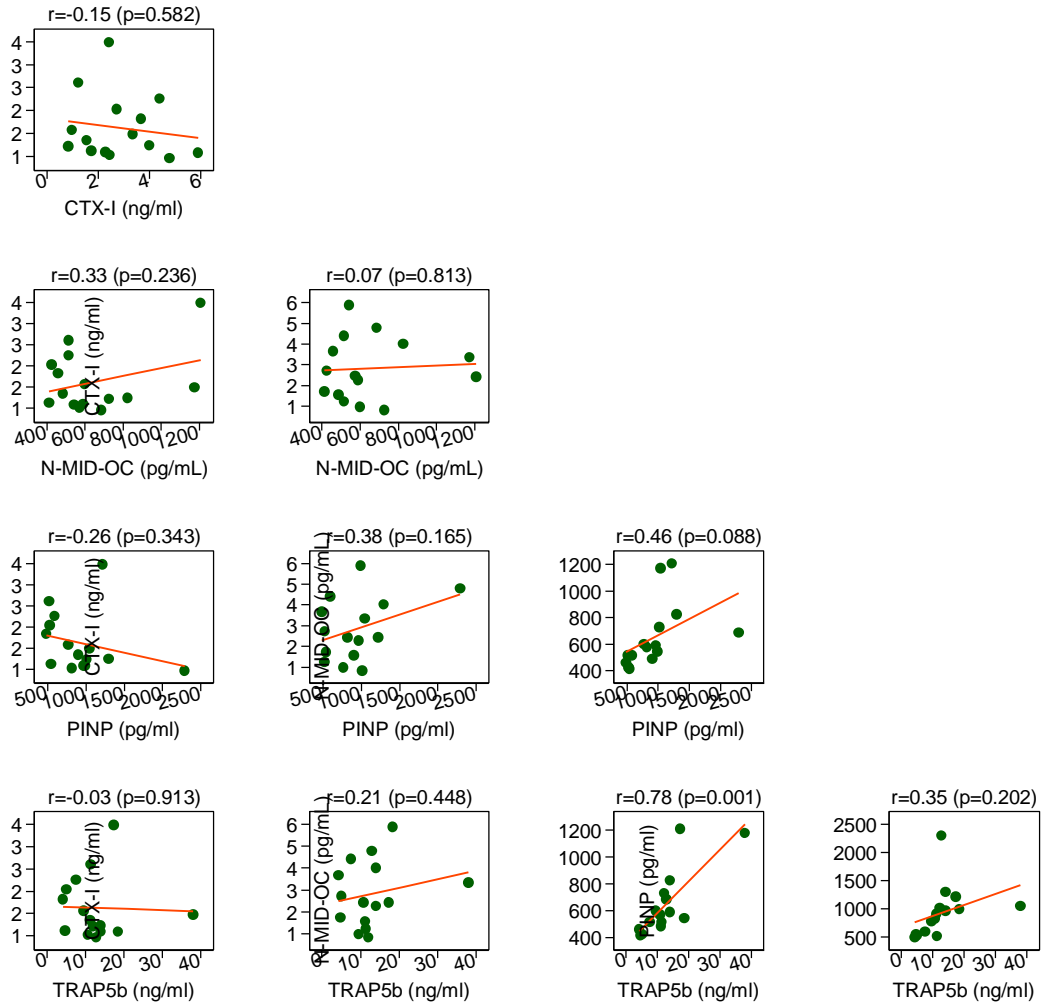
Γράφημα 4.12. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 1η

Ομάδα CM, Εβδομάδα 1η



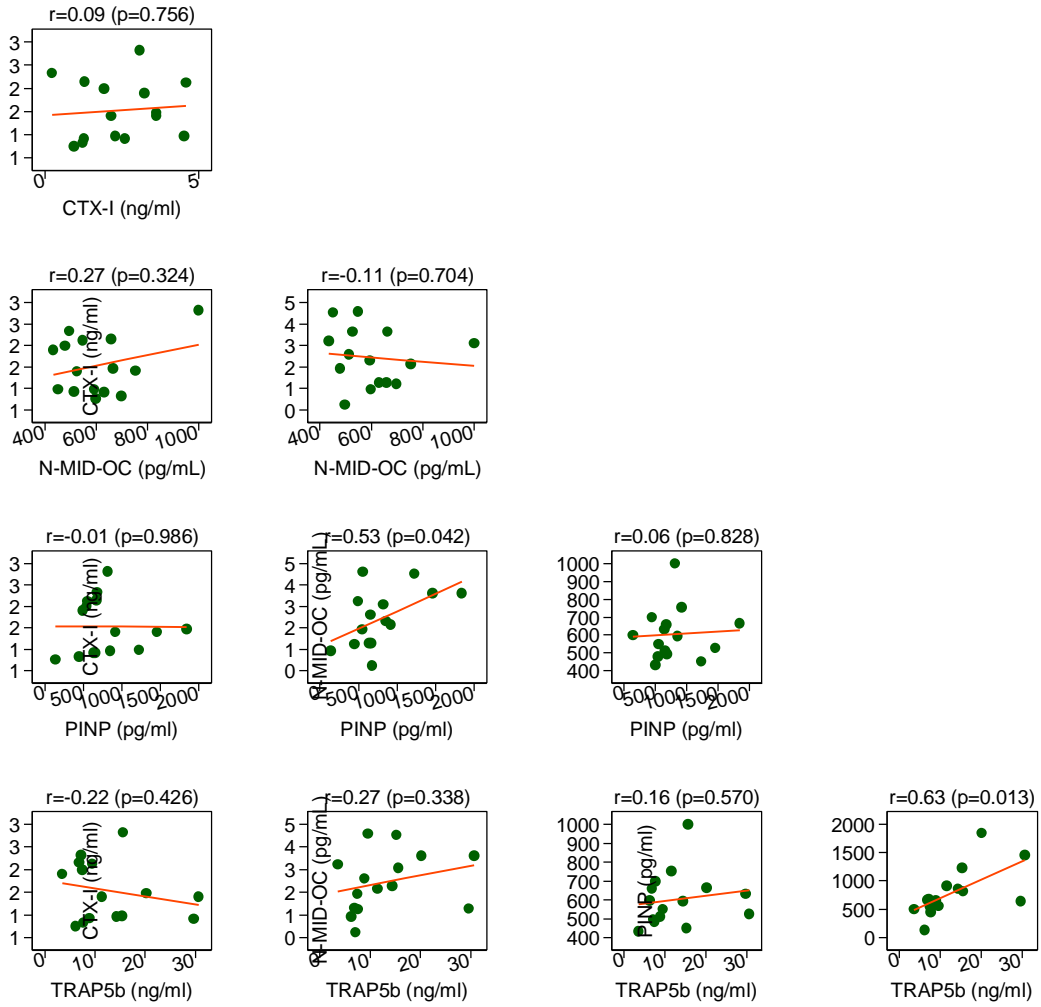
Γράφημα 4.13. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 2η

Ομάδα CM, Εβδομάδα 2η



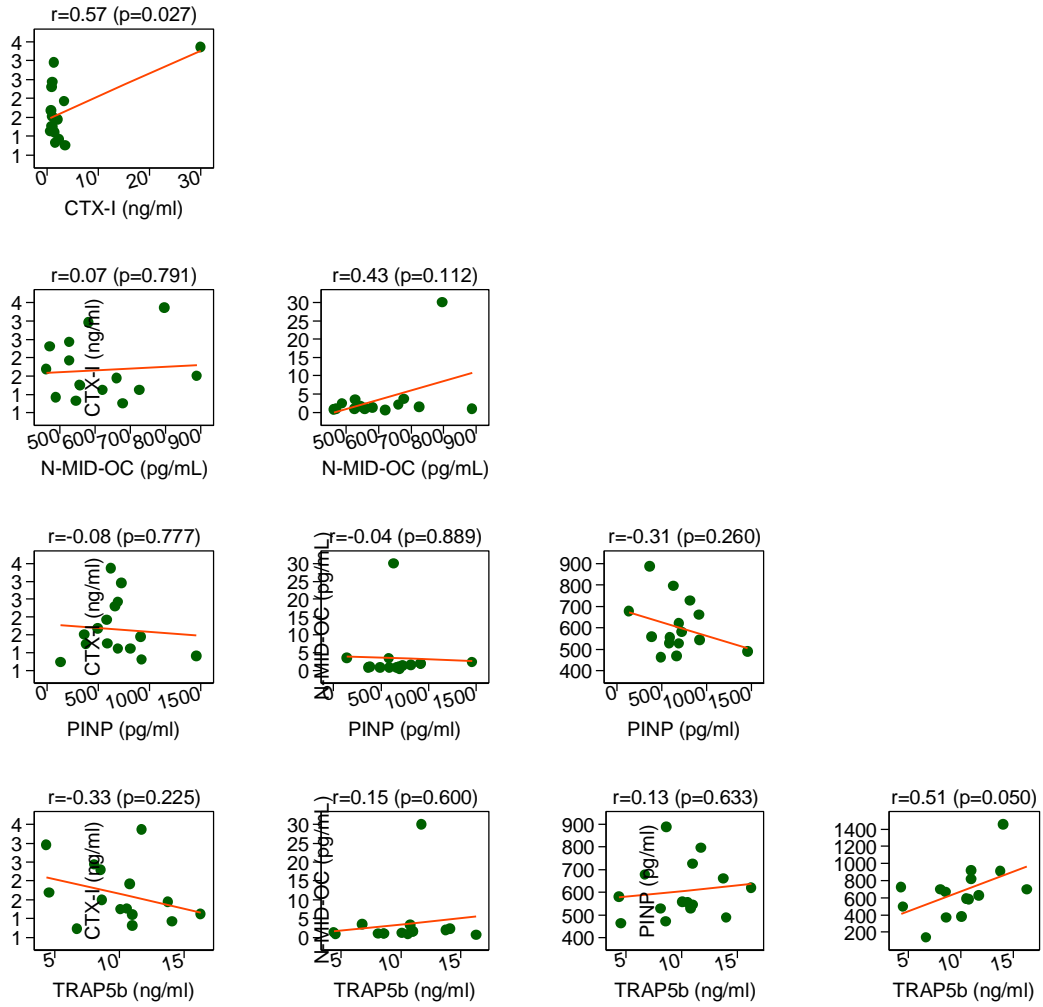
Γράφημα 4.14. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 4η

Ομάδα CM, Εβδομάδα 4η



Γράφημα 4.15. Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών: Ομάδα CM, Εβδομάδα 6η

Ομάδα CM, Εβδομάδα 6η



Πίνακας 4.1. Στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών ανά ομάδα και χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

Ομάδα	Εβδομάδα	Δείκτες	r, p
PTGM	0	BALP και N-MID-OC BALP και PINP N-MID-OC και PINP BALP και TRAP5b N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b	r=0.67, p=0.006 r=0.62, p=0.014 r=0.57, p=0.025 r=0.72, p=0.002 r=0.88, p<0.001 r=0.8, p<0.001
	1 ⁿ	N-MID OC και PINP N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b	r=0.54, p=0.037 r=0.61, p=0.016 r=0.95, p<0.001
	2 ⁿ	N-MID-OC και PINP N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b BALP και N-MID-OC	r=0.88, p<0.001 r=0.77, p=0.001 r=0.86, p<0.001 r=0.64, p=0.01
	4 ⁿ	N-MID-OC και PINP N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b	r=0.56, p=0.031 r=0.68, p=0.006 r=0.86, p<0.001
	6 ⁿ	N-MID-OC και PINP N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b CTX-I και TRAP5b	r=0.53, p=0.043 r=0.76, p=0.001 r=0.82, p<0.001 r=0.52, p=0.045
AGM	0	N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b	r=0.65 p=0.009 r=0.73, p=0.002
	1 ⁿ	N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b N-MID-OC και PINP	r=0.52 p=0.046 r=0.67, p=0.006 r=0.66, p=0.008
	2 ⁿ	N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b CTX-I και N-MID-OC CTX-I και TRAP5b	r=0.56 p=0.034 r=0.59, p=0.021 r=0.62, p=0.013 r=0.56, p=0.034
	4 ⁿ	BALP και N-MID-OC CTX-I και N-MID-OC	r=0.58, p=0.022 r=0.56, p=0.029
	6 ⁿ	N-MID-OC και TRAP5b PINP και TRAP5b BALP και TRAP5b	r=0.73 p=0.002 r=0.73, p=0.002 r=0.54, p=0.036
CM	0	BALP και N-MID-OC N-MID-OC και TRAP5b N-MID-OC και PINP	r=0.61, p=0.016 r=0.59, p=0.02 r=0.6, p=0.018
	1 ⁿ	BALP και N-MID-OC	r=0.56, p=0.032
	2 ⁿ	N-MID-OC και TRAP5b	r=0.78, p=0.001
	4 ⁿ	PINP και TRAP5b CTX-I και PINP	r=0.63, p=0.013 r=0.53, p=0.042
	6 ⁿ	PINP και TRAP5b BALP και CTX-I	r=0.51, p=0.005 r=0.57, p=0.027

Πίνακας 4.2. Στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών στην κάθε ομάδα ανά χρονική στιγμή μέτρησης (εβδομάδα)

Εβδομάδα	Ομάδα	Δείκτες	r, p
0	PTGM	BALP και N-MID-OC	r=0.67, p=0.006
		BALP και PINP	r=0.62, p=0.014
		N-MID-OC και PINP	r=0.57, p=0.025
	AGM	BALP και TRAP5b	r=0.72, p=0.002
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.88, p<0.001
		PINP και TRAP5b	r=0.8, p<0.001
	CM	N-MID-OC και TRAP5b	r=0.65 p=0.009
		PINP και TRAP5b	r=0.73, p=0.002
		BALP και N-MID-OC	r=0.61, p=0.016
1^η	PTGM	N-MID-OC και TRAP5b	r=0.59, p=0.02
		N-MID-OC και PINP	r=0.6, p=0.018
		N-MID OC και PINP	r=0.54, p=0.037
	AGM	N-MID-OC και TRAP5b	r=0.61, p=0.016
		PINP και TRAP5b	r=0.95, p<0.001
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.52 p=0.046
	CM	PINP και TRAP5b	r=0.67, p=0.006
		N-MID-OC και PINP	r=0.66, p=0.008
		BALP και N-MID-OC	r=0.56, p=0.032
2^η	PTGM	N-MID-OC και PINP	r=0.88, p<0.001
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.77, p=0.001
		PINP και TRAP5b	r=0.86, p<0.001
	AGM	BALP και N-MID-OC	r=0.64, p=0.01
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.56 p=0.034
		PINP και TRAP5b	r=0.59, p=0.021
	CM	CTX-I και N-MID-OC	r=0.62, p=0.013
		CTX-I και TRAP5b	r=0.56, p=0.034
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.78, p=0.001
4^η	PTGM	N-MID-OC και PINP	r=0.56, p=0.031
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.68, p=0.006
		PINP και TRAP5b	r=0.86, p<0.001
	AGM	BALP και N-MID-OC	r=0.58, p=0.022
		CTX-I και N-MID-OC	r=0.56, p=0.029
		PINP και TRAP5b	r=0.63, p=0.013
	CM	CTX-I και PINP	r=0.53, p=0.042
		N-MID-OC και PINP	r=0.53, p=0.043
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.76, p=0.001
6^η	PTGM	PINP και TRAP5b	r=0.82, p<0.001
		CTX-I και TRAP5b	r=0.52, p=0.045
		N-MID-OC και TRAP5b	r=0.73 p=0.002
	AGM	PINP και TRAP5b	r=0.73, p=0.002
		BALP και TRAP5b	r=0.54, p=0.036
		PINP και TRAP5b	r=0.51, p=0.05
	CM	BALP και CTX-I	r=0.57, p=0.027

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία παρέμβασης σε κουνέλια που υποβλήθηκαν σε πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν μελέτησε στον ορό του αίματος τα επίπεδα των παραγόντων ειδική για το οστόν αλκαλική φωσφατάση (BALP), ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC), προπεπτίδιο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP), καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I (CTX-I) και ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP5b) κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες της επούλωσης. Επιπλέον, συνέκρινε τη διαχρονική εξέλιξη στα επίπεδα των παραγόντων BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I και TRAP5b στον ορό σε κουνέλια στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά οστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και οι οποίες αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με πορώδεις κόκκους τιτανίου ή με αυτογενές οστικό μόσχευμα ή αφέθηκαν να επουλωθούν χωρίς μοσχευματικό υλικό.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 45 κουνέλια τύπου New Zealand, γένους αρσενικού και βάρους 3,5-4 kg. Η ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA.

Διαχρονική εξέλιξη επιπέδων δεικτών οστικού μεταβολισμού

BALP

Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα CM περιελάμβανε αρχικά μικρή πτώση την 1^η εβδομάδα, ακολουθούμενη από μικρή αύξηση την 2^η εβδομάδα, εκ νέου ελάχιστη πτώση και τέλος ελάχιστη

περαιτέρω αύξηση. Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα AGM περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση. Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα PTGM περιελάμβανε σταδιακή πτώση μέχρι την 2^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης. Η διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη στο διάστημα παρακολούθησης των έξι εβδομάδων φαίνεται να ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στις τρεις ομάδες, υπήρχαν όμως και κοινά στοιχεία. Στην ομάδα CM η πτώση στα αρχικά στάδια της επούλωσης έγινε την 1^η εβδομάδα ενώ στην ομάδα PTGM έγινε τις δύο πρώτες εβδομάδες. Στις ομάδες PTGM και AGM οι μεταβολές μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών ήταν πολύ μικρές. Ο δείκτης BALP έφθασε στα μέγιστα επίπεδα την 4^η εβδομάδα στις ομάδες PTGM και AGM ενώ στην ομάδα CM την 2^η εβδομάδα. Από την 2^η εβδομάδα επούλωσης και μετά οι ομάδες PTGM και AGM είχαν παρόμοια πορεία.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη BALP στην κάθε ομάδα ξεχωριστά ούτε μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, τα επίπεδα του δείκτη στην ομάδα CM ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες τόσο προεγχειρητικά όσο και σε κάθε χρονική στιγμή της μελέτης. Η ύπαρξη αυτής της διαφοράς δεν μπόρεσε να αποδοθεί σε κάποια εμφανή αιτία και η επίδραση αυτής της διαφοράς εξαλήφθηκε κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω της χρήσης μοντέλων παλινδρόμησης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Παρ' ό,τι οι τιμές των επιπέδων του δείκτη είναι σημαντικά χαμηλότερες σε αυτή την ομάδα, η διαχρονική εξέλιξη των μεταβολών επιπέδων του δείκτη ακολουθεί ανάλογη πορεία με τις άλλες δύο ομάδες, χωρίς να ανιχνεύονται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η παρόμοια

διαχρονική εξέλιξη και πορεία του δείκτη BALP μεταξύ των τριών ομάδων υποδηλώνει ότι ούτε οι κόκκοι τιτανίου ούτε το αυτογενές οστικό μόσχευμα δεν τροποποιούν σημαντικά την πορεία της επούλωσης οστικών βλαβών όσον αφορά τον δείκτη BALP.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα υπάρχουσών μελετών, οι οποίες ανευρίσκουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του δείκτη BALP κατά την πορεία επούλωσης οστικών καταγμάτων (Yu-Yahiro et al. 2001, Herrmann et al. 2002, Komnenou et al. 2005, Habermann et al. 2007, Stoffel et al. 2007). Αν και δεν υπάρχει πλήρης ομοφωνία στα αποτελέσματα ανάλογων μελετών, φαίνεται να υπερισχύει η τάση για πτώση των επιπέδων του δείκτη το πρώτο διάστημα μετά την πρόκληση του κατάγματος (Kurdy 2000, Habermann et al. 2007, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011, Wöfl et al. 2014), ακολουθούμενη από σταδιακή αύξηση στη συνέχεια της επούλωσης, ενώ συνηθέστερα ακολουθεί εκ νέου πτώση μέχρι την επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα σε προχωρημένα στάδια επούλωσης (Emami et al. 1999, Herrmann et al. 2002, Singh et al. 2013, Wöfl et al. 2014). Σε ορισμένες μελέτες ωστόσο, τα επίπεδα του δείκτη παραμένουν αυξημένα για μεγάλους χρόνους παρακολούθησης (Veitch et al. 2006, Habermann et al. 2007, Moghaddam et al. 2011). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά στην διαχρονική πορεία του δείκτη BALP μετά την χειρουργική πρόκληση της οστικής βλάβης στη ομάδα CM, όπου δεν χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό για την πλήρωση της βλάβης, είναι παρόμοια με αυτά μελετών της πορείας της επούλωσης καταγμάτων (Kurdy 2000, Habermann et al. 2007, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011, Wöfl et al. 2014, Emami et al. 1999, Herrmann et al. 2002, Singh et al. 2013, Wöfl et al. 2014). Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη μετά την πρόκληση της οστικής βλάβης παρατηρήθηκε στα

επίπεδα του δείκτη BALP στην ομάδα CM αρχικά πτώση, ακολουθούμενη από αύξηση, εκ νέου πτώση μέχρις ότου επανήλθαν τα επίπεδα στα αρχικά προεγχειρητικά και τέλος ελάχιστη περαιτέρω αύξηση. Επιπρόσθετα, τα παρόντα ευρήματα ότι σε πλέον προχωρημένα στάδια της επούλωσης χειρουργικά προκληθεισών οστικών βλαβών τα επίπεδα του δείκτη BALP είναι παρόμοια με τα προεγχειρητικά συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών επούλωσης οστικών καταγμάτων (Emami et al. 1999, Herrmann et al. 2002, Singh et al. 2013, Wöflfl et al. 2014).

Αναφορικά με την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη BALP και την έκβαση της επούλωσης οστικών καταγμάτων, τα αποτελέσματα των υπαρχουσών μελετών είναι αντικρουόμενα. Σειρά μελετών έχουν διαπιστώσει την ύπαρξη σημαντικά χαμηλότερων επιπέδων του δείκτη BALP στον ορό σε άλλοτε άλλα διαστήματα κατά την επούλωση σε περιπτώσεις διαταραγμένης επούλωσης σε σύγκριση με τις περιπτώσεις φυσιολογικής επούλωσης (Emami et al. 1999, Komnenou et al. 2005, Stoffel et al. 2007, Singh et al. 2013). Στην παρούσα μελέτη, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των ομάδων. Αυτό πιθανώς να συνηγορεί υπέρ της απουσίας ύπαρξης διαφορών αναφορικά με την πορεία της επούλωσης μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, οι Oni και συν. και Moghaddam και συν. δεν ανίχνευσαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με φυσιολογική επούλωση ή αποτυχία επούλωσης (Oni et al. 1989, Moghaddam et al. 2011). Ως εκ τούτου, το σύνολο των διαθέσιμων στοιχείων δεν επαρκεί για τη διεξαγωγή κάποιου συμπεράσματος αναφορικά με την ύπαρξη ή μη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη BALP και την έκβαση της επούλωσης οστικών βλαβών.

CTX-I

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ήταν παρόμοια και στις τρεις ομάδες και συγκεκριμένα περιελάμβανε αύξηση των επιπέδων την αρχική περίοδο της επούλωσης και στη συνέχεια ελάττωση σε μεταγενέστερα στάδια επούλωσης. Ωστόσο, τα επίπεδα του δείκτη στην ομάδα CM ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες προεγχειρητικά. Η ύπαρξη αυτής της διαφοράς δεν μπόρεσε να αποδοθεί σε κάποια εμφανή αιτία και η επίδραση αυτής της διαφοράς εξαλήφθηκε κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω της χρήσης μοντέλων παλινδρόμησης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Παρ' ό,τι οι τιμές των επιπέδων του δείκτη είναι σημαντικά χαμηλότερες σε αυτή την ομάδα προεγχειρητικά, η διαχρονική εξέλιξη των μεταβολών επιπέδων του δείκτη ακολουθεί ανάλογη πορεία με τις άλλες δύο ομάδες.

Στην ομάδα CM η σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη CTX-I έγινε στις 4 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Στην ομάδα PTGM σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων του δείκτη CTX-I έγιναν στις 2 και στις 4 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά, η μεγαλύτερη όμως αύξηση έγινε στις 2 εβδομάδες σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Ο δείκτης CTX-I έφθασε στα μέγιστα επίπεδα στην ομάδα PTGM την 2^η εβδομάδα ενώ στην ομάδα CM την 4^η εβδομάδα, δηλαδή στην ομάδα PTGM νωρίτερα χρονικά σε σύγκριση με την ομάδα CM. Η αύξηση των επιπέδων του δείκτη CTX-I ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα PTGM έναντι της ομάδας CM (και φυσικά έναντι και της ομάδας AGM). Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I στην ομάδα AGM ήταν μεν παρόμοια με αυτή στις άλλες δύο ομάδες αλλά χωρίς σημαντικές διαχρονικές μεταβολές. Μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας

τα επίπεδα του δείκτη CTX-I ελαττώθηκαν σε όλες τις ομάδες αλλά η ελάττωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για την ομάδα PTGM έναντι των άλλων δύο ομάδων.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη CTX-I κατά την επούλωση οστικών βλαβών συμφωνούν με τα αποτελέσματα από ορισμένες προγενέστερες μελέτες (Emami et al. 1999, Habermann et al. 2006, Veitch et al. 2006, Moghaddam et al. 2011, Wöflfl et al. 2014). Οι Emami και συν. διαπίστωσαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη την 4^η εβδομάδα επούλωσης και επαναφορά σε φυσιολογικά επίπεδα τη 16^η εβδομάδα (Emami et al. 1999). Παρομοίως, οι Moghaddam και συν. διαπίστωσαν αύξηση των επιπέδων του δείκτη μέχρι την 4^η εβδομάδα και επαναφορά σε φυσιολογικά επίπεδα στους 6 μήνες (Moghaddam et al. 2011). Οι Habermann και συν. παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων του δείκτη μέχρι την 3^η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή πτώση (Habermann et al. 2006). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, στη μελέτη των Veitch και συν. τα επίπεδα του δείκτη παρέμειναν αυξημένα σε όλο το διάστημα των έξι μηνών παρακολούθησης (Veitch et al. 2006). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης των Wöflfl και συν. Η διάρκεια αυτής της μελέτης όμως ήταν μόνο 8 εβδομάδες (Wöflfl et al. 2014).

Αναφορικά με τη συσχέτιση της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη CTX-I με την έκβαση της επούλωσης, οι Emami και συν και οι Herrmann και συν. δεν διαπίστωσαν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ περιπτώσεων φυσιολογικής ή καθυστερημένης επούλωσης. Αντιθέτως, οι Moghaddam και συν. διαπίστωσαν την παρουσία σημαντικά χαμηλότερων επιπέδων του δείκτη την 1^η εβδομάδα σε περιπτώσεις αποτυχίας της επούλωσης. Στην παρούσα μελέτη η ομάδα PTGM παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του δείκτη κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων της επούλωσης σε σύγκριση με τις άλλες δύο

ομάδες. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε πιθανόν να αποτελέσει ένδειξη βελτιωμένης επούλωσης στην ομάδα PTGM με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης των Moghaddam και συν. (Moghaddam et al. 2011). Σε καμία περίπτωση όμως τα υπάρχοντα στοιχεία δεν επαρκούν για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη CTX-I και της έκβασης της επούλωσης οστικών βλαβών.

N-MID-OC

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης φαίνεται να ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στις τρεις ομάδες, υπήρχαν όμως και κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων. Την αρχική περίοδο της επούλωσης, συγκεκριμένα τις δύο πρώτες εβδομάδες, η πορεία ήταν παρόμοια για τις ομάδες CM και AGM και περιελάμβανε αρχικά ελάττωση, σημαντική μόνο για την AGM, και στη συνέχεια μικρή αύξηση. Από την 2^η εβδομάδα όμως και μετά η πορεία διαφοροποιήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων έτσι ώστε στην ομάδα CM υπήρχε μικρή ελάττωση και στη συνέχεια σταθεροποίηση των επιπέδων ενώ στην ομάδα AGM συνεχίστηκε η σταδιακή μικρή αύξηση έως την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε σταθεροποίηση των επιπέδων. Η ομάδα PTGM ήταν η μόνη που παρουσίασε μικρή αύξηση (και όχι ελάττωση) την 1^η εβδομάδα. Από την 2^η εβδομάδα όμως και μετά η πορεία των επιπέδων ήταν παρόμοια για τις ομάδες PTGM και AGM, συγκεκριμένα μικρή αύξηση και στη συνέχεια σχετική σταθεροποίηση των επιπέδων.

Στην παρούσα μελέτη στις ομάδες PTGM και CM δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη. Αντιθέτως, στην ομάδα AGM παρατηρήθηκε σημαντική πτώση την 1^η εβδομάδα. Επιπλέον, την

4^η και 6^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τις τιμές της 1^{ης} εβδομάδας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα ευρήματα προγενέστερων μελετών αναφορικά με τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη OC κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων (Emami et al. 1999, Yu-Yahiro et al. 2001, Herrmann et al. 2002, Southwood et al. 2003, Veitch et al. 2006, Habermann et al. 2006, Stoffel et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότερες μελέτες τείνουν να περιγράφουν μία αρχική πτώση των επιπέδων του δείκτη στα πρώτα στάδια της επούλωσης (Emami et al. 1999, Southwood et al. 2003) ακολουθούμενη από σταδιακή αύξηση του δείκτη (Emami et al. 1999, Yu-Yahiro et al. 2001, Herrmann et al. 2002, Southwood et al. 2003, Veitch et al. 2006, Habermann et al. 2006, Stoffel et al. 2007). Σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται εκ νέου πτώση και σταδιακή επαναφορά στα αρχικά επίπεδα σε προχωρημένα στάδια της επούλωσης (Herrmann et al. 2002, Southwood et al. 2003, Habermann et al. 2006), αν και σε άλλες μελέτες τα επίπεδα του δείκτη παραμένουν υψηλά για μεγάλους χρόνους παρακολούθησης (Emami et al. 1999, Yu-Yahiro et al. 2001, Veitch et al. 2006).

Στην παρούσα μελέτη οι τρεις ομάδες δεν διαφέρουν σημαντικά στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη. Ωστόσο, οι δύο ομάδες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων της OC σε προχωρημένα στάδια της επούλωσης, η οποία φτάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας στην ομάδα AGM, σε αντίθεση με την ομάδα CM στην οποία δεν χρησιμοποιήθηκε οστικό μόσχευμα. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα της OC την 4η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων, με χαμηλότερη τιμή στην ομάδα CM ενώ οι τιμές στις δύο ομάδες που χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό ήταν

παρόμοιες. Για την ομάδα PTGM τα επίπεδα της OC αυξήθηκαν τόσο στις 4 εβδομάδες, ώστε οι διαχρονικές μεταβολές τους προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την 4η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Μετά από την χειρουργική πρόκληση οστικής βλάβης (που δε αντιμετωπίστηκε με μοσχευματικό υλικό), η διαχρονική πορεία της OC κατά την επούλωση παρουσίασε αρχικά μικρή πτώση, στη συνέχεια μικρή αύξηση και εκ νέου πτώση και τέλος σταθεροποίηση των επιπέδων της.

Αναφορικά με την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων της OC στον ορό και την έκβαση της επούλωσης, τα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών εμφανίζονται αντικρουόμενα. Οι Herrmann και συν. συσχέτισαν την καθυστερημένη επούλωση οστικών καταγμάτων με καθυστέρηση στην αύξηση των επιπέδων του δείκτη κατά ένα μήνα σε σύγκριση με τις περιπτώσεις ομαλής επούλωσης. Πιο συγκεκριμένα, στις 6 εβδομάδες στις περιπτώσεις καθυστερημένης επούλωσης τα επίπεδα του δείκτη βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα, και η άνοδος των επιπέδων του δείκτη ξεκίνησε μετά τον 2^ο μήνα, φτάνοντας σε μέγιστα επίπεδα στους 3 μήνες (Herrmann et al. 2002). Οι Oni και συν. διαπίστωσαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα του δείκτη στις 2 και στους 4 μήνες τις επούλωσης σε σύγκριση με τις περιπτώσεις ομαλής επούλωσης. Αντιθέτως, οι Emami και συν. δε διαπίστωσαν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στα επίπεδα του δείκτη μεταξύ περιπτώσεων ομαλής και καθυστερημένης επούλωσης (Emami et al. 1999). Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα του δείκτη στην ομάδα CM δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές διαχρονικά. Αντίθετα, στις ομάδες όπου χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό παρατηρούμε μία ανάλογη πορεία με σημαντική αύξηση των επιπέδων του δείκτη με την πάροδο του χρόνου στην ομάδα AGM. Με βάση τα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών, αυτό θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη για

καθυστέρηση της επούλωσης στην ομάδα όπου δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα οστικό μόσχευμα για την πλήρωση των οστικών βλαβών. Σε καμία περίπτωση όμως τα υπάρχοντα δεδομένα δεν επαρκούν για τη διεξαγωγή κάποιου ασφαλούς συμπεράσματος και η πιθανή συσχέτιση της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων της OC με την έκβαση της επούλωσης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

PINP

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη PINP στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ήταν παρόμοια και στις τρεις ομάδες και συγκεκριμένα περιελάμβανε αρχικά αύξηση των επιπέδων και στη συνέχεια ελάττωση σε μεταγενέστερα στάδια επούλωσης. Στην ομάδα AGM υπήρχε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έως την 4^η εβδομάδα, οπότε τα επίπεδα έφθασαν στο μέγιστο και ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα προεγχειρητικά, και ακολούθησε ελάττωση έως το τέλος της παρακολούθησης. Στις ομάδες PTGM και CM η αύξηση έγινε την 1^η εβδομάδα και ήταν σημαντική μόνο για την ομάδα CM.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία τα επίπεδα του δείκτη PINP στην ομάδα PTGM δεν παρουσίασαν καμία σημαντική διαφορά στη διαχρονική τους εξέλιξη. Στην ομάδα AGM παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές την 2^η και 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με τα επίπεδα προεγχειρητικά. Στη συνέχεια ακολούθησε πτώση των επιπέδων του δείκτη και την 6^η εβδομάδα τα επίπεδα ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά της 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Στην ομάδα CM οι μεταβολές ήταν αντίστοιχες με αυτές τις ομάδες AGM, με τη διαφορά ότι έλαβαν χώρα σε προγενέστερα στάδια της επούλωσης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση την 1^η εβδομάδα, ακολουθούμενη από σημαντική πτώση την 2^η

εβδομάδα. Σε πλέον προχωρημένα στάδια επούλωσης (4^η και 6^η εβδομάδα) τα επίπεδα του δείκτη ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα αρχικά στάδια επούλωσης (1^η εβδομάδα).

Στη μελέτη των Veitch και συν. περιγράφεται σταδιακή αύξηση των επιπέδων του δείκτη κατά τα αρχικά στάδια της επούλωσης με μέγιστα επίπεδα στους 3 μήνες και παραμονή σε υψηλά επίπεδα μέχρι τους 6 μήνες παρακολούθησης (Veitch et al. 2006). Παρομοίως, στη μελέτη των Moghaddam και συν., μετά από μία αρχική πτώση την 1^η εβδομάδα της επούλωσης περιγράφεται σταδιακή αύξηση των επιπέδων του δείκτη, με μέγιστα επίπεδα τον 2^ο μήνα και παραμονή σε υψηλά επίπεδα έως τους 4 μήνες (Moghaddam et al. 2011). Η παραμονή αυτή των επιπέδων του δείκτη PINP σε υψηλά επίπεδα για μεγάλα διαστήματα παρακολούθησης έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ταχύτερη επούλωση που παρατηρείται στα ζωικά μοντέλα σε σύγκριση με τον άνθρωπο. Έτσι, είναι πιθανό να υπήρχε σταδιακή επαναφορά των επιπέδων του δείκτη στις φυσιολογικές τιμές αν οι προαναφερθείσες κλινικές μελέτες είχαν μεγαλύτερους χρόνους παρακολούθησης.

Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των ομάδων. Αναφορικά με την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη PINP και της έκβασης της επούλωσης, οι Moghaddam και συν. δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιπτώσεων με φυσιολογική ή καθυστερημένη επούλωση (Moghaddam et al. 2011). Σε κάθε περίπτωση, τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την παρουσία ή μη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη PINP κατά τη διάρκεια επούλωσης οστικών καταγμάτων και της έκβασης της επούλωσης είναι ελλιπή και χρήζουν περεταίρω διερεύνησης.

TRAP5b

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη TRAP5b στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε όλες τις ομάδες αλλά με περισσότερα κοινά στοιχεία στις ομάδες PTGM και CM. Περιελάμβανε αύξηση των επιπέδων στα αρχικά στάδια της επούλωσης και ελάττωση αυτών σε προχωρημένα στάδια επούλωσης. Στις ομάδες PTGM και CM η αύξηση έγινε την 1^η εβδομάδα και η ελάττωση μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Οι μεταβολές αυτές ήταν σημαντικές για την ομάδα PTGM ενώ προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας στην ομάδα CM. Ενδιάμεσα υπήρχε και στις δύο ομάδες μικρή ελάττωση και στη συνέχεια μικρή αύξηση. Στην ομάδα AGM υπήρχε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έως την 4^η εβδομάδα και ακολούθησε ελάττωση έως το τέλος της παρακολούθησης. Η μέγιστη αύξηση στην ομάδα AGM ήταν στις δύο εβδομάδες, δηλαδή λίγο αργότερα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, και προσέγγισε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας αναφορικά με τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη TRAP5b κατά την επούλωση οστικών βλαβών συμφωνούν με τα ευρήματα προγενέστερων μελετών (Habermann et al. 2006, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011). Έτσι, κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων έχει περιγραφεί αύξηση των επιπέδων του δείκτη κατά τις πρώτες εβδομάδες της επούλωσης και επαναφορά σε φυσιολογικά επίπεδα σε προχωρημένα στάδια της επούλωσης (Habermann et al. 2006, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011). Στη μελέτη των Wöfll και συν. τα επίπεδα του δείκτη έμειναν αυξημένα για όλο το διάστημα παρακολούθησης. Η διάρκεια αυτής της μελέτης όμως ήταν μόλις 8 εβδομάδες (Wöfll et al. 2014).

Αναφορικά με τη συσχέτιση μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη TRAP5b και την έκβαση της επούλωσης οι Moghaddam και συν. διαπίστωσαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα του δείκτη την 4^η και 8^η εβδομάδα σε περιπτώσεις αποτυχίας της επούλωσης. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων του δείκτη μεταξύ των ομάδων. Σε κάθε περίπτωση, τα υπάρχοντα δεδομένα αναφορικά με την ύπαρξη ή μη συσχέτισης μεταξύ της διαχρονικής εξέλιξης των επιπέδων του δείκτη TRAP5b και της έκβασης της επούλωσης οστικών βλαβών είναι ανεπαρκή για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Συσχετίσεις μεταξύ δεικτών

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διαπιστώθηκε η ύπαρξη σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων ορισμένων δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι περισσότερες συσχετίσεις ήταν ασθενείς και δεν διατηρούνταν επί σειρά επανεξετάσεων. Στην ομάδα PTGM διαπιστώθηκε ωστόσο η ύπαρξη σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των ζευγών των δεικτών N-MID-OC και PINP, N-MID-OC και TRAP5b καθώς και PINP και TRAP5b οι οποίες διατηρήθηκαν σε όλες τις χρονικές στιγμές και εμφάνιζαν κατά διαστήματα υψηλούς συντελεστές συσχέτισης. Παρόμοιο πρότυπο συσχετίσεων παρατηρήθηκε και στην ομάδα AGM, με τα τρία αυτά ζεύγη δεικτών να αποτελούν τις βασικές σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν σε αυτή την ομάδα σε όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την 4^η εβδομάδα. Ωστόσο, οι συσχετίσεις ανά χρονική στιγμή ήταν ασθενέστερες συγκριτικά με αυτές της ομάδας PTGM. Αντιθέτως, στην ομάδα CM οι υπάρχουσες συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών ήταν ασθενείς και ποίκιλαν ανά χρονική στιγμή. Η μόνη μετρίως ισχυρή συσχέτιση

εμφανίστηκε σε αυτή την ομάδα κατά την 2^η εβδομάδα μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και TRAP5b.

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων των δεικτών ανά ομάδα

Ομάδα CM

Για την ομάδα CM, οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών CTX-I και PINP ήταν σημαντικές, ενώ οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, N-MID-OC και TRAP5b δεν ήταν σημαντικές. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν σημαντικές την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά, όπου υπήρχε σημαντική αύξηση. Επομένως η μεγάλη αύξηση στα επίπεδα του δείκτη CTX-I σε σύγκριση με προεγχειρητικά βρέθηκε στις 4 εβδομάδες. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP ήταν σημαντικές την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης}, 1^{ης} και 4^{ης}, 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Παρά την απουσία σημαντικότητας, οι μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Οι μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας την 1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης}, 2^{ης} και 6^{ης}, 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας. Επομένως, η πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών CTX-I και PINP στον ορό του αίματος κατά την διάρκεια των έξι εβδομάδων παρακολούθησης της επούλωσης, ενώ δεν οδήγησε σε σημαντικές

μεταβολές των επιπέδων των δεικτών BALP, N-MID-OC και TRAP5b στον ορό του αίματος για αυτό το χρονικό διάστημα. Παρά την απουσία σημαντικής επίδρασης της πειραματικής πρόκλησης οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών στα επίπεδα των δεικτών BALP και TRAP5b στον ορό του αίματος για το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης, ορισμένες από τις διαχρονικές μεταβολές αυτών των δύο δεικτών προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι εβδομάδων παρακολούθησης μετά την πρόκληση των οστικών βλαβών περιελάμβανε αρχικά πτώση την 1η εβδομάδα, ακολουθούμενη από αύξηση την 2η εβδομάδα μέχρις ότου επανήλθαν τα επίπεδα στα αρχικά προεγχειρητικά, εκ νέου ελάχιστη πτώση και τέλος ελάχιστη περαιτέρω αύξηση. Στα πλέον προχωρημένα στάδια της επούλωσης των χειρουργικά προκληθεισών οστικών βλαβών τα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν παρόμοια με τα προεγχειρητικά. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I κατά την επούλωση περιελάμβανε αρχικά αύξηση μέχρι την 2η εβδομάδα, στη συνέχεια μικρή πτώση ακολουθούμενη από αύξηση. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη OC κατά την επούλωση παρουσίασε αρχικά μικρή πτώση, στη συνέχεια μικρή αύξηση και εκ νέου πτώση και τέλος σταθεροποίηση των επιπέδων της. Σε όλο το διάστημα της επούλωσης τα επίπεδα κυμάνθηκαν σε τιμές χαμηλότερες από τις προεγχειρητικές. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη PINP περιελάμβανε αρχικά αύξηση την 1^η εβδομάδα και στη συνέχεια ακολούθησε πτωτική πορεία. Την 4^η εβδομάδα τα επίπεδα του δείκτη προσέγγισαν τις τιμές προεγχειρητικά, και την 6^η εβδομάδα ακολούθησε περαιτέρω πτώση. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη TRAP5b περιλάμβανε αύξηση κατά την 1^η εβδομάδα, ακολουθούμενη από πτώση την 2^η

εβδομάδα, μικρή εκ νέου αύξηση την 4^η εβδομάδα και στη συνέχεια εκ νέου πτώση την 6^η εβδομάδα.

Στην ομάδα CM οι υπάρχουσες συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών ήταν ασθενείς και ποίκιλαν ανά χρονική στιγμή. Η μόνη μετρίως ισχυρή συσχέτιση εμφανίστηκε σε αυτή την ομάδα κατά την 2η εβδομάδα μεταξύ των δεικτών N-MID-OC και TRAP5b.

Ομάδα AGM

Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι εβδομάδων παρακολούθησης μετά την πρόκληση των οστικών βλαβών περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I κατά την επούλωση περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή πτώση. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη OC κατά την επούλωση παρουσίασε αρχικά πτώση κατά την 1η εβδομάδα, σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και ελάχιστη πτώση την 6η εβδομάδα. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη PINP περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση έως την 6η εβδομάδα. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη TRAP5b περιελάμβανε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση μέχρι την 6η εβδομάδα.

Ομάδα PTGM

Η διαχρονική πορεία στα επίπεδα του δείκτη BALP μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι εβδομάδων παρακολούθησης μετά την πρόκληση των οστικών βλαβών περιελάμβανε σταδιακή πτώση μέχρι την 2η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη CTX-I κατά την επούλωση περιελάμβανε αύξηση μέχρι την 2η εβδομάδα και στη συνέχεια σταδιακή πτώση για το υπόλοιπο διάστημα παρακολούθησης. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη OC κατά την επούλωση παρουσίασε σταδιακή αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και στη συνέχεια πτώση. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη PINP περιλάμβανε αρχικά αύξηση κατά την 1η εβδομάδα, στη συνέχεια μείωση μέχρι την 2η εβδομάδα, εκ νέου αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και τέλος μείωση μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης. Η διαχρονική πορεία των επιπέδων του δείκτη TRAP5b περιλάμβανε αρχικά αύξηση κατά την 1η εβδομάδα, στη συνέχεια μείωση μέχρι την 2η εβδομάδα, εκ νέου αύξηση μέχρι την 4η εβδομάδα και τέλος μείωση μέχρι το τέλος του διαστήματος παρακολούθησης.

Ιδιαίτερα στοιχεία των πειραματικών ομάδων

Ομάδα PTGM

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b ήταν σημαντικές μόνο για την ομάδα PTGM. Οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I στην ομάδα PTGM διέφεραν αριθμητικά σημαντικά έναντι αυτών στις ομάδες

AGM και CM για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 2ης εβδομάδας και προεγχειρητικά, 1ης και 2ης εβδομάδας καθώς και μεταξύ 2ης και 4ης εβδομάδας. Θα πρέπει να τονισθεί ότι στις 3 αυτές χρονικές περιόδους στις οποίες διέφεραν σημαντικά αριθμητικά οι μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I μεταξύ της ομάδας PTGM και των άλλων δύο ομάδων και οι τρεις ομάδες αντέδρασαν με ανάλογο τρόπο, δηλαδή όλες με αύξηση ή όλες με μείωση των επιπέδων. Τις δύο πρώτες εβδομάδες της επούλωσης (σε σύγκριση με προεγχειρητικά) και για την 2^η εβδομάδα της επούλωσης (σε σύγκριση με την 1^η) η αύξηση των επιπέδων του δείκτη ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα PTGM έναντι της αύξησης των άλλων δύο ομάδων. Για την χρονική περίοδο μεταξύ 2ης και 4ης εβδομάδας της επούλωσης η ελάττωση των επιπέδων του δείκτη ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα PTGM έναντι της ελάττωσης των άλλων δύο ομάδων. Οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I για την χρονική περίοδο μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας έφθασαν κοντά στο όριο της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.057$) μεταξύ των τριών ομάδων με υψηλότερα επίπεδα για την ομάδα PTGM και παρόμοια για τις άλλες δύο ομάδες.

Ομάδα AGM

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC ήταν σημαντικές μόνο για την ομάδα AGM.

Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων PTGM, CM και AGM

Και οι τρεις ομάδες παρουσίασαν παρόμοιες (δηλ. μη σημαντικά διαφορετικές) διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b. Θα μπορούσε λοιπόν να ειπωθεί ότι οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα αυτών των δεικτών κατά την επούλωση των έξι εβδομάδων δεν επηρεάστηκε σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό για την αντιμετώπιση των οστικών βλαβών.

Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων PTGM και CM

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν μη σημαντικές για τις ομάδες PTGM και CM. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν σημαντικές για τις ομάδες PTGM και CM. Και στις δύο ομάδες τα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν σημαντικά αυξημένα την 4^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Στατιστική σημαντικότητα στις διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη TRAP5b υπήρχε μόνο για την ομάδα PTGM. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι για τις χρονικές περιόδους στις οποίες στην ομάδα PTGM βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα στις διαχρονικές μεταβολές του δείκτη TRAP5b (1^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά, μεταξύ 1^{ης} και 6^{ης} και μεταξύ 4^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας) για τις ίδιες χρονικές περιόδους στην ομάδα CM βρέθηκε ότι οι διαχρονικές μεταβολές του δείκτη προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Για αυτές τις χρονικές περιόδους ο δείκτης TRAP5b μεταβλήθηκε

με ανάλογο τρόπο και στις δύο ομάδες (PTGM και CM), δηλαδή είτε με αύξηση είτε με μείωση.

Κοινά στοιχεία μεταξύ των ομάδων AGM και CM

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη BALP ήταν μη σημαντικές για τις ομάδες AGM και CM. Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP ήταν σημαντικές για τις ομάδες AGM και CM.

Διαφορές μεταξύ των ομάδων PTGM, CM, AGM

Οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων, ενώ οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων του δείκτη CTX-I διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και για τις χρονικές περιόδους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας και μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. (Οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I ήταν σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων για την χρονική περίοδο μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας.) Τα επίπεδα του δείκτη CTX-I στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες, παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση την 2^η εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά καθώς και μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας και σημαντικά μεγαλύτερη ελάττωση μεταξύ 2^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας. Οι διαχρονικές μεταβολές και οι % διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη N-MID-OC την 4^η

εβδομάδα σε σύγκριση με προεγχειρητικά προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων. Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη PINP μεταξύ των τριών ομάδων για την χρονική περίοδο μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Σύγκριση με προγενέστερες μελέτες

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού φαίνεται πως παρουσιάζουν μεγάλη φυσιολογική διακύμανση. Βιολογικοί παράγοντες και παράγοντες που αφορούν στη διαδικασία συλλογής και ανάλυσης των δειγμάτων αίματος, επηρεάζουν τη διακύμανση των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Ως εκ τούτου, για την κατά το δυνατόν ελαχιστοποίηση της υπάρχουσας διακύμανσης σε αυτή τη μελέτη λήφθηκε πρόνοια ώστε να ελεγχθούν στο βαθμό του εφικτού οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτήν.

Οι βιολογικοί παράγοντες διακύμανσης των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού είναι δυσκολότερο να ελεγχθούν σε σύγκριση με τους τεχνικούς. Η ηλικία και το φύλο αποτελούν τους δύο κυριότερους ίσως από αυτούς (Szulc et al. 2001, Seifert-Klauss et al. 2002). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες αφορούν στην ύπαρξη νεφρικής ή ηπατικής νόσου (Alvarez et al. 2004, Lai et al. 2015). Τέλος, η διακύμανση των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού φαίνεται πως επηρεάζεται επίσης από τον έμμηνο κύκλο και τις εποχές του χρόνου (Nielsen et al. 1990, Woitge et al. 1998). Στην παρούσα μελέτη παρέμβασης όλα τα πειραματοζώα είχαν παρόμοια ηλικία και βάρος, ήταν γένους αρσενικού και συστηματικά υγιή.

Η μέθοδος συλλογής του δείγματος και οι μέθοδοι που ακολουθούνται για την επεξεργασία και ανάλυση του δείγματος μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές των

επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι τεχνικοί παράγοντες αποτελούν μία ελεγχόμενη ως επί το πλείστον πηγή διακύμανσης των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων η ευαισθησία των δεικτών μεταβολισμού στη θερμική αποδόμηση, τη φωτόλυση και τη αιμόλυση. Το ακέραιο μόριο της οστεοκαλσίνης μεταβολίζεται ταχέως σε θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική εξασθένηση του σήματός της μετά από 1 έως 2 ώρες παραμονής σε συνθήκες απόψυξης (Lang et al. 1996). Η TRAP5b αποδομείται επίσης ταχέως και το μόριό της διατηρείται σταθερό στους -70° ή σε ακόμα χαμηλότερη θερμοκρασία (Bais & Edwards 1976). Επιπλέον, τα μόρια της οστεοκαλσίνης και πιθανώς και της TRAP5b είναι ευαίσθητα στην αιμόλυση (Seibel 2005).

Επιπρόσθετα, θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπ' όψιν ο κιρκάδιος ρυθμός στην έκκριση των περισσότερων δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι μεταβολές λόγω του κιρκάδιου ρυθμού είναι εντονότερες κατά τις πρωινές ώρες. Ως εκ τούτου, η τυποποίηση της ώρας λήψης του δείγματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να είναι συγκρίσιμα δείγματα διαφορετικών χρονικών στιγμών (Greenspan et al. 1997). Δεδομένου ότι ορισμένοι δείκτες επηρεάζονται και από τη λήψη τροφής, οι πλέον ενδεδειγμένες συνθήκες δειγματοληψίας θεωρούνται νωρίς το πρωί κατόπιν νυχτερινής νηστείας (Clowes et al. 2002). Μεγάλη φαίνεται να είναι και η διακύμανση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από ανάλυση ίδιων δειγμάτων με διαφορετικά αντιδραστήρια ή και με τη χρήση ίδιων αντιδραστηρίων αλλά από διαφορετικά εργαστήρια (Seibel et al. 2001).

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη λήφθηκε πρόνοια ώστε να ελεγχθούν στο βαθμό του εφικτού οι τεχνικοί παράγοντες που συμβάλλουν στη διακύμανση των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν

κατά τις πρωινές ώρες κατόπιν νυχτερινής νηστείας. Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή επιμερίστηκαν σε ικανοποιητικό αριθμό φιαλιδίων ώστε να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η επαναλαμβανόμενη απόψυξη των δειγμάτων κατά την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης. Στη συνέχεια φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C , κατάλληλη για τη μακροχρόνια διατήρηση του σήματος για την ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Η ανίχνευση των δεικτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων και έλαβε χώρα στο ίδιο εργαστήριο. Εν τούτοις, ένας μικρός αριθμός των δειγμάτων ορού εμφάνισε αιμόλυση ή πήγματα ινικής. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επηρέασε το σήμα κατά την ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού σε αυτά τα δείγματα. Επίσης, δεδομένου του μεγάλου αριθμού παραγόντων που εξετάστηκαν δεν μπόρεσε να αποφευχθεί πλήρως ο κύκλος επανειλημμένων αποψύξεων στα δείγματα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επηρέασε και πάλι το σήμα κατά την ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προς το τέλος των αναλύσεων.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των προγενέστερων μελετών αναφορικά με τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού τόσο μεταξύ τους όσο και με την παρούσα μελέτη είναι ωστόσο αρκετά δύσκολη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι διαφέρουν μεταξύ τους αισθητά ποικίλοι παράγοντες που αφορούν στο είδος και την εντόπιση του κατάγματος καθώς και στον τρόπο αντιμετώπισής του. Οι παράγοντες αυτοί έχουν δειχθεί ότι μπορεί να επηρεάσουν τη διαχρονική εξέλιξη των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού. Επίσης διαφέρουν αισθητά τα διαστήματα των επανεξετάσεων καθώς και ο συνολικός χρόνος παρακολούθησης μεταξύ των μελετών.

Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες είναι κλινικές (Emami et al. 1999, Kurdy 2000, Yu-Yahiro et al. 2001, Herrmann et al. 2002, Veitch et al. 2006, Habermann et

al. 2007, Stoffel et al. 2007, Moghaddam et al. 2011, Singh et al. 2013), ενώ η παρούσα μελέτη είναι πειραματική. Η πειραματική μελέτη των Komnenou και συν. έχει χρησιμοποιήσει διαφορετικό ζωικό μοντέλο (Komnenou et al. 2005), ενώ η μελέτη των Southwood και συν., αν και πρόκειται επίσης για πειραματική μελέτη σε κουνέλια, διαφέρει αισθητά ως προς τον σχεδιασμό, καθώς περιλαμβάνει την πρόκληση αποτυχίας της πόρωσης των καταγμάτων μέσω άσκησης δυνάμεων ή/και πρόκλησης λοίμωξης του τραύματος (Southwood et al. 2003).

Η σημαντικότητα στη μεταβολή των επιπέδων ενός δείκτη στην κλινική πράξη αναδεικνύεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη σύγκριση της μεταβολής με μία προαποφασισμένη οριακή τιμή μεταβολής (ελάχιστη σημαντική μεταβολή). Ο δεύτερος και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος περιλαμβάνει τη σύγκριση της τιμής του δείκτη με το φυσιολογικό εύρος τιμών, όπως αυτό έχει προσδιοριστεί μέσα από μελέτες σε ευρείες βάσεις πληθυσμών. Για τους περισσότερους δείκτες οστικού μεταβολισμού δεν έχει ακόμα οριστεί το φυσιολογικό εύρος τιμών για όλες τις πληθυσμιακές ομάδες (Bayer 2014, Hannemann & Wallaschofski et al. 2015). Το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με την απουσία δειγμάτων πριν την πρόκληση του κατάγματος στο σύνολο των κλινικών μελετών καθιστά δύσκολη την ερμηνεία και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των προγενέστερων μελετών. Στην παρούσα ερευνητική εργασία έχουν ληφθεί δείγματα αίματος προεγχειρητικά τα οποία αποτελούν και τα επίπεδα αναφοράς για τη σύγκριση των επιπέδων των δεικτών κατά την επούλωση.

Τα τελικά επίπεδα όλων των δεικτών οστικού μεταβολισμού στο αίμα ήταν παρόμοια με τα προεγχειρητικά σε όλες τις ομάδες και δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι το διάστημα παρακολούθησης των έξι εβδομάδων ήταν επαρκές για την επαναφορά των επιπέδων

των δεικτών οστικού μεταβολισμού στο αίμα στα προεγχειρητικά επίπεδα, γεγονός που σηματοδοτεί πιθανώς και την ολοκλήρωση των επουλωτικών διεργασιών σε αυτό το διάστημα παρακολούθησης.

Περιορισμοί της μελέτης

Η παρούσα πειραματική μελέτη συνοπτικά παρουσίαζε τους εξής περιορισμούς:

- Ένας μικρός αριθμός των δειγμάτων ορού που εξετάστηκαν εμφάνισε αιμόλυση ή πήγματα ινικής. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επηρέασε το σήμα κατά την ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού σε αυτά τα δείγματα.
- Δεδομένου του μεγάλου αριθμού παραγόντων που εξετάστηκαν δεν μπόρεσε να αποφευχθεί πλήρως ο κύκλος επανειλημμένων αποψύξεων στα δείγματα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επηρέασε και πάλι το σήμα κατά την ανίχνευση των δεικτών οστικού μεταβολισμού στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προς το τέλος των αναλύσεων.
- Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξέτασε τις μεταβολές των επιπέδων δεικτών οστικού μεταβολισμού στο αίμα κατά την επούλωση πειραματικά προκλειθισών οστικών βλαβών. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών, οι οποίες στο σύνολό τους αφορούν στη μεταβολή των επιπέδων δεικτών οστικού μεταβολισμού στο αίμα κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων.
- Για τους δείκτες οστικού μεταβολισμού που μελετήθηκαν δεν έχουν οριστεί τα φυσιολογικά επίπεδα για το ζωικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Ως εκ τούτου, είναι αδύνατον να πραγματοποιηθεί άμεση αντιστοίχιση μεταξύ της παρουσίας ή απουσίας στατιστικής σημαντικότητας με την παρουσία ή απουσία κλινικής σημαντικότητας στις μεταβολές των επιπέδων των δεικτών

οστικού μεταβολισμού που ανευρέθησαν μεταξύ των ομάδων και μεταξύ των
διαφόρων χρονικών στιγμών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη με τους περιορισμούς που παρουσίαζε αποκάλυψε ότι:

- Η πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών CTX-I και PINP στον ορό του αίματος κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες επούλωσης, ενώ δεν οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές των δεικτών BALP, N-MID-OC και TRAP5b στον ορό. Παρά την απουσία σημαντικής επίδρασης σε BALP και TRAP5b, ορισμένες από τις διαχρονικές μεταβολές αυτών των δύο δεικτών προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.
- Στα αρχικά στάδια της επούλωσης των πειραματικά προκληθεισών οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών υπήρχε σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων των δεικτών N-MID-OC και TRAP5b στον ορό του αίματος.
- Στις 6 εβδομάδες επούλωσης των προκληθεισών οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών οι δείκτες οστικού μεταβολισμού που μελετήθηκαν ήταν περίπου στα προεγχειρητικά επίπεδα ανεξάρτητα από την χρήση ή μη μοσχευματικού υλικού και τα επίπεδα τους στον ορό του αίματος δεν επηρεάστηκαν από την χρήση μοσχευματικού υλικού.
- Στις 6 εβδομάδες επούλωσης οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου είχαν παρόμοια επίδραση με το αυτογενές οστικό μόσχευμα στα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού.
- Η διαχρονική πορεία των επιπέδων CTX-I στο διάστημα των πρώτων 6 εβδομάδων επούλωσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε όλες τις ομάδες. Οι διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων CTX-I στην ομάδα PTGM διέφεραν σημαντικά σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Η αντιμετώπιση των πειραματικά προκληθεισών οστικών βλαβών με πορώδεις κόκκους τιτανίου επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα του

δείκτη CTX-I στον ορό του αίματος για τις πρώτες 6 εβδομάδες επούλωσης, ενώ η αντιμετώπιση τους με αυτογενές οστικό μόσχευμα δεν επηρέασε τα επίπεδα τους. Τα επίπεδα CTX-I αυξήθηκαν σημαντικά στις 2 και 4 εβδομάδες στην ομάδα PTGM και στις 4 εβδομάδες στην ομάδα CM σε σύγκριση με προεγχειρητικά. Ο δείκτης CTX-I έφθασε στα μέγιστα επίπεδα στην ομάδα PTGM την 2η εβδομάδα ενώ στην ομάδα CM την 4η, επομένως στην ομάδα PTGM νωρίτερα και με μεγαλύτερη αύξηση έναντι της ομάδας CM.

- Οι διαχρονικές μεταβολές των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες επούλωσης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκε μοσχευματικό υλικό (PTG ή αυτογενές) για την αντιμετώπιση των οστικών βλαβών. Το εύρημα αυτό δηλώνει ότι η αντιμετώπιση των πειραματικά προκληθεισών οστικών βλαβών είτε με αυτογενές οστικό μόσχευμα ή με πορώδεις κόκκους τιτανίου δεν είχε σημαντική επίδραση στις μεταβολές των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b κατά τις πρώτες 6 εβδομάδες επούλωσης.

- Σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των ζευγών N-MID OC και PINP, N-MID-OC και TRAP5b καθώς και PINP και TRAP5b βρέθηκαν για τις ομάδες PTGM και AGM, οι οποίες ήταν ισχυρότερες και ίσχυαν για όλες τις χρονικές περιόδους στην PTGM.

- Χρήση μεγαλύτερου δείγματος πειραματοζώων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την πορεία των επιπέδων των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό του αίματος κατά την διάρκεια της επούλωσης των οστικών βλαβών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η χρήση οστικών μοσχευμάτων για την ανάπλαση οστικών ελλειμμάτων αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τακτική σήμερα στον τομέα της οδοντιατρικής και της εμφυτευματολογίας. Παρότι το αυτόλογο οστικό μόσχευμα παραμένει η χρυσή σταθερά σε κάθε περίπτωση που επιδιώκεται οστική ανάπλαση, τα μειονεκτήματα που σχετίζονται εγγενώς με την λήψη του έχουν περιορίσει αισθητά την χρήση του στην κλινική πράξη. Πληθώρα υποκατάστατων μοσχευματικών υλικών είναι εμπορικά διαθέσιμα, το καθένα από τα οποία εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά και ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, οι πορώδεις κόκκοι τιτανίου αποτελούν ένα αλλοπλαστικό υποκατάστατο μοσχευματικό υλικό και αρκετές προκλινικές και κλινικές μελέτες υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά του, τόσο στον τομέα της οδοντιατρικής όσο και της ορθοπεδικής. Παρότι υπάρχουν διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα για την επίδραση των διαφόρων τύπων οστικών μοσχευμάτων τοπικά στους ιστούς κατά την προσπάθεια ανάπλασης οστικών βλαβών, εν τούτοις δεν υπάρχει έως σήμερα κανένα διαθέσιμο στοιχείο για τη συστηματική επίδραση της χρήσης διαφόρων τύπων οστικών μοσχευμάτων κατά την προσπάθεια αντιμετώπισης οστικών βλαβών.

Μελέτες από τον τομέα της ορθοπεδικής δείχνουν ότι κατά την επούλωση οστικών καταγμάτων τα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό πιθανόν να μεταβάλλονται. Οι συστηματικές αυτές μεταβολές φαίνεται πως αντικατοπτρίζουν τις υποκείμενες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε ιστολογικό επίπεδο στην περιοχή της βλάβης. Παράγοντες που περιλαμβάνουν το είδος της βλάβης, τον τρόπο αντιμετώπισης και την πορεία της επούλωσης πιθανόν να μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος και τη χρονική διάρκεια αυτών των μεταβολών.

Τα οστικά ελλείμματα αποτελούν ένα είδος οστικής βλάβης, οι μηχανισμοί επούλωσης της οποίας σε ιστολογικό επίπεδο διαφέρουν αισθητά από τον μηχανισμό επούλωσης ενός οστικού κατάγματος, λόγω των διαφορετικών μηχανικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή κατά τη διάρκεια επούλωσης. Στη βιβλιογραφία έως σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για την πιθανή επίδραση της επούλωσης οστικών ελλειμμάτων στα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό.

Επίσης, ανεξάρτητα από το είδος της οστικής βλάβης που μελετάται, δεν υπάρχει έως σήμερα κανένα βιβλιογραφικό δεδομένο αναφορικά με την επίδραση της χρήσης οστικού μοσχεύματος για την αντιμετώπιση της εκάστοτε οστικής βλάβης στα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού συστηματικά.

Σκοπός: Ο πρώτος σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας παρέμβασης σε κουνέλια που υποβλήθηκαν σε πειραματική πρόκληση οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν ήταν η μελέτη στον ορό του αίματος των επιπέδων των δεικτών ειδική για το οστόν αλκαλική φωσφατάση (BALP), ενδιάμεσο κλάσμα της οστεοκαλσίνης (N-MID-OC), προπεπτίδιο αμινοτελικού άκρου προκολλαγόνου τύπου I (PINP), καρβοξυτελικά διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου τύπου I (CTX-I) και ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (TRAP5b) κατά τη διάρκεια της επούλωσης. Ο δεύτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση της διαχρονικής εξέλιξης στον ορό του αίματος των επιπέδων των παραγόντων BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I και TRAP5b σε κουνέλια στα οποία προκλήθηκαν πειραματικά οστικές βλάβες στο μηριαίο οστόν και οι οποίες αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με πορώδεις κόκκους τιτανίου ή με αυτογενές οστικό μόσχευμα ή αφέθηκαν να επουλωθούν χωρίς μοσχευματικό υλικό, ανάλογα με τη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Υλικά και μέθοδοι: Το υλικό της παρούσας μελέτης είναι δείγματα φλεβικού αίματος που προήλθαν 45 κουνέλια τύπου New Zealand στα οποία είχαν προκληθεί πειραματικά τυποποιημένες ενδοοστικές βλάβες στο δεξί μηριαίο οστόν και είχαν αντιμετωπισθεί με βάση τυχαιοποιημένο πρωτόκολλο με μία από τις τρεις κάτωθι θεραπευτικές επιλογές:

1. Πορώδεις κόκκοι τιτανίου (PTG) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα PTGM
2. Αυτογενές οστικό μόσχευμα (AG) και απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα AGM
3. Απορροφήσιμη μεμβράνη κολλαγόνου (M) - Ομάδα CM

Σε κάθε πειραματόζωο πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες προεγχειρητικά και στην 1η, 2η, 4η και 6η (τελική) μετεγχειρητική εβδομάδα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης, Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά μέσω μοντέλων παλινδρόμησης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των διαφόρων δεικτών ανά ομάδα και εβδομάδα μέτρησης υπολογίστηκαν με τον συντελεστή συσχέτισης Pearson {Pearson correlation coefficient (r)}.

Αποτελέσματα: Η επούλωση πειραματικά προκληθέντων οστικών βλαβών χωρίς τη χρήση μοσχεύματος (ομάδα CM) οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών CTX-I και PINP. Επίσης, ορισμένες μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP και TRAP5b προσέγγισαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας

Η διαχρονική πορεία των επιπέδων των δεικτών CTX-I, PINP, TRAP5b στο διάστημα των έξι εβδομάδων επούλωσης ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο σε όλες τις ομάδες, ενώ το πρότυπο διέφερε για τις μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP και N-MID-OC. Η πορεία όμως των επιπέδων του δείκτη N-MID-OC ήταν παρόμοια για τις ομάδες PTGM και AGM από την 2^η εβδομάδα και μετά.

Τα τελικά επίπεδα όλων των δεικτών ήταν παρόμοια με τα προεγχειρητικά σε όλες τις ομάδες και δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Και οι τρεις ομάδες παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντικά διαφορετικές διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP, N-MID-OC, PINP και TRAP5b.

Οι διαχρονικές μεταβολές στα επίπεδα του δείκτη CTX-I διέφεραν στατιστικά στην ομάδα PTGM σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Στις περιόδους στις οποίες οι μεταβολές διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων και οι τρεις ομάδες αντέδρασαν με ανάλογο τρόπο, δηλαδή όλες με αύξηση ή όλες με μείωση των επιπέδων.

Ορισμένες διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών N-MID-OC και PINP μεταξύ των τριών ομάδων προσέγγισαν τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Στην ομάδα PTGM υπήρχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των ζευγών N-MID OC και PINP, N-MID-OC και TRAP5b καθώς και PINP και TRAP5b, που διατηρήθηκαν σε όλες τις χρονικές στιγμές και εμφάνιζαν κατά διαστήματα υψηλούς συντελεστές συσχέτισης. Παρόμοιο πρότυπο συσχετίσεων υπήρχε και στην ομάδα AGM, με τα τρία αυτά ζεύγη δεικτών να αποτελούν τις βασικές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν σε αυτή την ομάδα (σε όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την 4η εβδομάδα). Οι συσχετίσεις ανά χρονική στιγμή ήταν ισχυρότερες στην ομάδα PTGM έναντι της AGM.

Συμπεράσματα: Η επούλωση πειραματικά προκληθέντων οστικών βλαβών στο μηριαίο οστόν κουνελιών προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών CTX-I και PINP στον ορό. Επίσης, ορισμένες μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών BALP και TRAP5b ήταν οριακά μόνο μη στατιστικά σημαντικές.

Η χρήση πορωδών κόκκων τιτανίου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεταβολή των επιπέδων του δείκτη CTX-I σε σύγκριση με τη χρήση αυτομοσχεύματος ή την επούλωση χωρίς τη χρήση οστικού μοσχεύματος. Ορισμένες διαχρονικές μεταβολές των επιπέδων των δεικτών N-MID-OC και PINP μεταξύ των τριών ομάδων προσέγγισαν επίσης τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Χρήση μεγαλύτερου δείγματος πειραματοζώων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την επίδραση της χρήσης και του τύπου του οστικού μοσχεύματος στα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στον ορό του αίματος κατά την διάρκεια της επούλωσης οστικών ελλειμμάτων.

ABSTRACT

Introduction: The use of bone grafts for the regeneration of osseous defects constitutes a widely spread technique nowadays in the field of dentistry and implantology. Despite the fact that autogenous bone graft remains the gold standard in every case when bone regeneration is the endpoint, the disadvantages that are intrinsically associated with its harvesting have significantly restricted its use in clinical practice. A large variety of bone replacement grafts are commercially available, each of them showing different behavior and properties. Within them, porous titanium granules constitute an alloplastic bone replacement grafting material and several preclinical and clinical studies have supported its efficacy both in the fields of dentistry and orthopedics. Despite the fact that several evidence exists on the effect of various bone grafts locally on the tissues when applied for the treatment of osseous defects, no evidence exists up to now on the systemic effects of the use of bone grafts.

Studies in the field of orthopedics have shown that during fracture healing serum levels of bone turnover markers possibly change. Those systemic changes may reflect the underlying procedures that take place at a histological level at the site of injury. Factors such as the type of injury, the treatment strategy applied and the outcome of healing are likely to affect the magnitude and the overall duration of these changes.

Osseous defects are a type of tissue damage whose healing mechanisms at the histological level differ significantly from those of fracture healing, due to the different mechanical conditions that prevail at the injury site during healing. No

literature data exist on the possible effect of osseous defects healing on the serum levels of bone turnover markers.

Moreover, irrespective of the type of defect that is studied, no literature data exist on the effect of the use of bone grafts for the treatment of any type of osseous lesion on the serum levels of bone turnover markers.

Purpose: the first purpose of the present experimental study on rabbits subjected to experimental induction of osseous defects in the femur was to evaluate the serum levels of Bone Alkaline Phosphatase (BALP), N-Terminal-Mid-molecule fragment of Osteocalcin (N-MID-OC), N-Terminal Procollagen type I Propeptides (PINP), C-Terminal Crosslinked Telopeptides of Type I Collagen (CTX), Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5 beta (TRAP5b) during the healing period. The second purpose was the comparative evaluation of BALP, N-MID-OC, PINP, CTX-I and TRAP5b serum level changes over time as related to the treatment strategy that was followed in rabbits subjected to experimental induction of osseous defects in the femur which were treated with the application of porous titanium granules, autogenous bone graft or were left to heal without the use of bone graft.

Materials and methods: The material of the present study was blood samples collected from 45 New Zealand type rabbits that had been subjected to experimental induction of standardized osseous defects in the right femur and which were randomized in three different treatment groups:

1. Porous titanium granules (PTG) and resorbable collagen membrane (M) – PTGM group
2. Autogenous bone graft (AG) and resorbable collagen membrane (M) – AGM group
3. Resorbable collagen membrane (M) – CM group

Blood samples had been collected from each animal prior to the initiation of the surgical procedure and 1, 2, 4 and 6(final) weeks postoperatively.

The quantitative evaluation of bone turnover markers serum levels was carried out by ELISA method (Enzyme-linked immunosorbent assay).

The results were analyzed through regression analysis models for repeated measurements. The correlations between the values of the various markers per group and measurement week were calculated with the Pearson correlation coefficient (r).

Results: Healing of osseous defects without the use of bone grafts resulted in statistically significant changes of CTX-I and TRAP5b levels. Moreover, some changes in the BALP and TRAP5b serum levels only marginally failed to reach statistical significance.

CTX-I, PINP and TRAP5b levels followed a similar pattern during the six week healing period in all three groups. BALP and N-MID-OC level followed a different pattern among the three groups, although N-MID-OC levels followed a similar pattern in groups PTGM and AGM after the second week of healing.

The final levels of all bone turnover markers were similar to baseline values for all groups and did not statistically significantly differ among groups. BALP, N-MID-OC, PINP and TRAP5b level changes over time did not statistically significantly differ among groups. CTX level changes statistically significantly differed between PTGM group and the other two groups. CTX levels followed a similar pattern for all groups during these time intervals. Some differences of N-MID-OC and PINP level serum level changes over time among the three groups only marginally failed to reach statistical significance.

For PTGM group, there were significant positive correlations between N-MID-OC and PINP, N-MID-OC and TRAP5b as well as between PINP and TRAP5b.

These correlations sustained for all time intervals showing high correlation coefficients for several time periods. A similar correlation pattern was found for group AGM for all time intervals, except for the 4th week. The correlations were stronger for group PTGM than AGM for all time intervals.

Conclusions: Healing of experimentally induced osseous defects in the rabbit femur led to statistically significant changes in the serum levels of CTX-I and PINP. Some changes in the levels of BALP and TRAP5b only marginally failed to reach statistical significance.

The use of porous titanium granules for the treatment of osseous defects led to statistically significantly different serum level changes of CTX-I when compared to the use of autogenous bone graft or healing without the use of bone graft. Some differences in the serum level changes of N-MID-OC and PINP only marginally failed to reach statistical significance.

A larger sample size might lead to safer conclusions on the effect of the use of various bone grafts for the treatment of osseous defects on serum levels of bone turnover markers during the healing of osseous defects.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development*. 2007 Sep;134(17):3133-44.
- Almainan M, Al-Bargi HH, Manson P. Complication of anterior iliac bone graft harvesting in 372 adult patients from may 2006 to may 2011 and a literature review. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr*. 2013 Dec;6(4):257-66. doi: 10.1055/s-0033-1357510.
- Al Nofal AA, Altayar O, BenKhadra K, Qasim Agha OQ, Asi N, Nabhan M, Prokop LJ, Tebben P, Murad MH. Bone turnover markers in Paget's disease of the bone: A Systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2015 Jul;26(7):1875-91.
- Alffram P-A, Bruce L, 70 Bjursten LM, Urban RM, Andersson GBJ (2007). Implantation of the femoral stem into a bed of titanium granules using vibration. A pilot study of a new method for prosthetic fixation in 5 patients followed for up to 15 years. *Ups J Med Sci*. 2007;112(2):183-9.
- Allan EH, Häusler KD, Wei T, Gooi JH, Quinn JM, Crimeen-Irwin B, Pompolo S, Sims NA, Gillespie MT, Onyia JE, Martin TJ. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2008 Aug;23(8):1170-81.
- Alvarez L, Torregrosa JV, Peris P, Monegal A, Bedini JL, Martinez De Osaba MJ, Filella X, Martin G, Ricos C, Oppenheimer F, Ballesta AM. Effect of hemodialysis and renal failure on serum biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Metab*. 2004;22(3):254-9.

- Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*. 1995 Apr;16(4):455-60.
- Araújo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *J Clin Periodontol*. 2002 Dec;29(12):1122-31.
- Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):433-40. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01705.x.
- Araújo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jan;22(1):9-13.
- Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 May-Jun;19(3):357-68.
- Bahrami B, Shahrabaf S, Mirzakouchaki B, Ghalichi F, Ashtiani M, Martin N. Effect of surface treatment on stress distribution in immediately loaded dental implants--a 3D finite element analysis. *Dent Mater*. 2014 Apr;30(4):e89-97. doi: 10.1016/j.dental.2014.01.012. Epub 2014 Feb 18.
- Bais R, Edwards JB. An optimized continuous-monitoring procedure for semiautomated determination of serum acid phosphatase activity. *Clin Chem*. 1976 Dec;22(12):2025-8.
- Barry ZT, Platt MO. Cathepsin S cannibalism of cathepsin K as a mechanism to reduce type I collagen degradation. *J Biol Chem*. 2012 Aug 10;287(33):27723-30.

- Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(8)Aug:911-7.
- Bauer D, Krege J, Lane N, Leary E, Libanati C, Miller P, Myers G, Silverman S, Vesper HW, Lee D, Payette M, Randall S. National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporos Int.* 2012 Oct;23(10):2425-33. doi: 10.1007/s00198-012-2049-z. Epub 2012 Jul 14.
- Bayer M. Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0–18 years. *Osteoporos Int.* 2014;25:729–36.
- Beaver R, Brinker MR, Barrack RL. An analysis of the actual cost of tibial nonunions. *J La State Med Soc*, 149 (1997), pp. 200–206
- Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996 Aug 15;382(6592):638-42.
- Berberi A, Bouserhal L, Nader N, Assaf RB, Nassif NB, Bouserhal J, Salameh Z. Evaluation of Three-Dimensional Volumetric Changes After Sinus Floor Augmentation with Mineralized Cortical Bone Allograft. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015 Sep;14(3):624-9. doi: 10.1007/s12663-014-0736-3. Epub 2014 Dec 24.
- Bettica P, Moro L, Robins SP, Taylor AK, Talbot J, Singer FR, Baylink DJ. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clin Chem.* 1992 Nov;38(11):2313-8.

- Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Tornetta P 3rd, Sprague S, Schemitsch EH. A lack of consensus in the assessment of fracture healing among orthopaedic surgeons. *J Orthop Trauma*. 2002 Sep;16(8):562-6.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 1991 Dec;49(6):421-6.
- Bitgood, M. J. and McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172, 126-138.
- Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Mar 1;92(3):1218-24. doi: 10.1002/jbm.a.32463.
- Blumsohn A, Colwell A, Naylor K, Eastell R. Effect of light and gamma-irradiation on pyridinolines and telopeptides of type I collagen in urine. *Clin Chem*. 1995 Aug;41(8 Pt 1):1195-7.
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem*. 1994 Nov;40(11 Pt 1):2022-5.
- Bonde M, Fledelius C, Qvist P, Christiansen C. Coated-tube radioimmunoassay for C-telopeptides of type I collagen to assess bone resorption. *Clin Chem*. 1996 Oct;42(10):1639-44.
- Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int*. 2002 Aug;71(2):145-54. Epub 2002 Jun 20.

- Bouvard B, Gallois Y, Legrand E, Audran M, Chappard D. Glucocorticoids reduce alveolar and trabecular bone in mice. *Joint Bone Spine*. 2013 Jan;80(1):77-81.
- Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 1984 May 19;1(8386):1091-3.
- Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991 Jul;25(7):889-902.
- Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996 Apr;54(4):420-32; discussion 432-3.
- Bystedt H, Rasmusson L. Porous titanium granules used as osteoconductive material for sinus floor augmentation: a clinical pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009;11(2)Jun:101-5.
- Cabral de Menezes Filho H, Rodrigues JM, Radonsky V, Della Manna T, Kuperman H, Steinmetz L, Dichtchekian V, Damiani D, Setian N. Decrease of serum alkaline phosphatase after three cycles of pamidronate disodium in children with severe osteogenesis imperfecta. *Horm Res*. 2007;68 Suppl 5:207-8.
- Caldwell GR, Mills MP, Finlayson R, Mealey BL. Lateral alveolar ridge augmentation using tenting screws, acellular dermal matrix, and freeze-dried bone allograft alone or with particulate autogenous bone. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2015 Jan-Feb;35(1):75-83. doi: 10.11607/prd.2260.

- Capdevila J, Johnson RL. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol.* 1998 May 15;197(2):205-17.
- Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res.* 1992 Aug;7(8):987-97.
- Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res.* 1997 Jul;15(4):577-84.
- Cloos P, Fledelius C. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem. J.* (2000) 345, 473–480.
- Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone.* 2002 Jun;30(6):886-90.
- Chiapasco M, Gatti C, Gatti F. Immediate loading of dental implants placed in severely resorbed edentulous mandibles reconstructed with autogenous calvarial grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Feb;18(1):13-20.
- Chinoy MA, Javed MI, Khan A, Sadruddin N. Alkaline phosphatase as a screening test for osteomalacia. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2011 Jan-Mar;23(1):23-5.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002 Mar;17(3):513-20.
- Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA (2004) Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol* 269:55–69.

- Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 2009 Feb;24(2):274-82.
- Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest.* 1993 Jun;23(6):341-9.
- Cordaro L, Amadé DS, Cordaro M. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Feb;13(1):103-11.
- Cordaro L, Torsello F, Miuccio MT, di Torresanto VM, Eliopoulos D. Mandibular bone harvesting for alveolar reconstruction and implant placement: subjective and objective cross-sectional evaluation of donor and recipient site up to 4 years. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Nov;22(11):1320-6. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02115.x. Epub 2011 Mar 28.
- Cunningham LW, Ford JD, Segrest JP. The isolation of identical hydroxylysyl glycosides from hydrolysates of soluble collagen and from human urine. *J Biol Chem.* 1967 May 25;242(10):2570-1.
- Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Abboud M, Ramirez-Fernandez MP, Mate-Sanchez JE, Negri B, Won A, Romanos G. Porous titanium granules in critical size defects of rabbit tibia with or without membranes. *Int J Oral Sci.* 2014;6(2)Jun:105-10.
- Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone.* 1985;6(5):339-41.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res.* 1999 May;14(5):700-9.

- Dodds RA, James IE, Rieman D, Ahern R, Hwang SM, Connor JR, Thompson SD, Veber DF, Drake FH, Holmes S, Lark MW, Gowen M. Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2001 Mar;16(3):478-86.
- Du WX, Duan SF, Chen JJ, Huang JF, Yin LM, Tong PJ. Serum bone-specific alkaline phosphatase as a biomarker for osseous metastases in patients with malignant carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2014 Nov;10 Suppl:C140-3.
- Ducheyne P, Willems G, Martens M, Helsen J. In vivo metal-ion release from porous titanium-fiber material. *J Biomed Mater Res.* 1984 Mar;18(3):293-308.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996 Aug 1;382(6590):448-52.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- Dursun E, Dursun CK, Eratalay K, Orhan K, Celik HH, Tözüm TF. Do Porous Titanium Granule Grafts Affect Bone Microarchitecture at Augmented Maxillary Sinus Sites? A Pilot Split-Mouth Human Study. *Implant Dent.* 2015 May 19. [Epub ahead of print]
- Eames F, Helms J. Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis. *Developmental Dynamics* 2004;231(1):4–13.
- Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EF, Mann KG, Riggs BL. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone

- histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Oct;67(4):741-8.
- Ebert W, Muley T, Herb KP, Schmidt-Gayk H. Comparison of bone scintigraphy with bone markers in the diagnosis of bone metastasis in lung carcinoma patients. *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5B):3193-201.
 - Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995 Aug;10(8):1272-81.
 - El Hadidy el HM1, Ghonaim M, El Gawad SSh, El Atta MA. Impact of severity, duration, and etiology of hyperthyroidism on bone turnover markers and bone mineral density in men. *BMC Endocr Disord.* 2011 Aug 6;11:15. doi: 10.1186/1472-6823-11-15.
 - Emami A, Larsson A, Petré-Mallmin M, Larsson S. Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Nov;(368):220-9.
 - Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone.* 2006 Jun;38(6):864-70.
 - Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec.* 1996 Sep;246(1):39-46.
 - Erben RG. Hypothesis: Coupling between Resorption and Formation in Cancellous bone Remodeling is a Mechanically Controlled Event. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015 May 20;6:82.
 - Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1984;5(5):235-42.

- Farley JR, Chesnut CH 3rd, Baylink DJ. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem*. 1981 Dec;27(12):2002-7.
- Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):16666-72.
- Feinberg RN, Latker CH, Beebe DC. Localized vascular regression during limb morphogenesis in the chicken embryo. I. Spatial and temporal changes in the vascular pattern. *The Anatomical Record*. 1986;214:405–409.
- Felix R, Hofstetter W, Wetterwald A, Cecchini MG, Fleisch H. Role of colony-stimulating factor-1 in bone metabolism. *J Cell Biochem*. 1994 Jul;55(3):340-9.
- Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev*. 1999 Sep;87(1-2):57-66.
- Fessler LI, Morris NP, Fessler JH. Procollagen: biological scission of amino and carboxyl extension peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Dec;72(12):4905-9.
- Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 1990 Feb 5;265(4):2347-51.
- Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PA, Bonde M, Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11;272(15):9755-63.
- Fournier B, Gineyts E, Delmas PD. Evidence that free gamma carboxyglutamic acid circulates in serum. *Clin Chim Acta*. 1989 Jun 30;182(2):173-81.

- Fujimoto D, Moriguchi T, Ishida T, Hayashi H. The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978 Sep 14;84(1):52-7.
- Funck-Brentano T, Biver E, Chopin F, Bouvard B, Coiffier G, Souberbielle JC, Garnero P, Roux C. Clinical utility of serum bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis therapy monitoring: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2011 Oct;41(2):157-69.
- Galbraith CG, Sheetz MP. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9114-8.
- Garnero P, Fledelius C, Gineyts E, Serre CM, Vignot E, Delmas PD. Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type I collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 1997 Sep;12(9):1407-15.
- Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA, Pulvirenti I, Hawa G, Tringali G, Fiore CE. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May;95(5):2248-53.
- Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res.* 2003 Sep;18(9):1584-92.
- Glimcher MJ, Shapiro F, Ellis RD, Eyre DR. Changes in tissue morphology and collagen composition during the repair of cortical bone in the adult chicken. *J Bone Joint Surg Am.* 1980 Sep;62(6):964-73.

- Glowacki J, Lian JB. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ.* 1987 Sep;21(4):247-54.
- Godang K, Ueland T, Bollerslev J. Decreased bone area, bone mineral content, formative markers, and increased bone resorptive markers in endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 1999 Aug;141(2):126-31.
- Gomez B Jr, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem.* 1995 Nov;41(11):1560-6.
- Goodship AE, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br.* 1985 Aug;67(4):650-5.
- Goto T, Yamaza T, Tanaka T. Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2003;52(6):551-8.
- Green S, Anstiss CL, Fishman WH. Automated differential isoenzyme analysis. II. The fractionation of serum alkaline phosphatases into "liver", "intestinal" and "other" components. *Enzymologia.* 1971 Jul 31;41(1):9-26.
- Greenspan SL, Dresner-Pollak R, Parker RA, London D, Ferguson L. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women *Calc. Tissue Int.*, 60 (1997), pp. 419–423.
- Groothuis A, Duda GN, Wilson CJ, Thompson MS, Hunter MR, Simon P, Bail HJ, van Scherpenzeel KM, Kasper G. Mechanical stimulation of the pro-angiogenic capacity of human fracture haematoma: involvement of VEGF mechano-regulation. *Bone.* 2010 Aug;47(2):438-44.

- Gundberg CM, Clough ME. The osteocalcin propeptide is not secreted in vivo or in vitro. *J Bone Miner Res.* 1992 Jan;7(1):73-80.
- Guo CY, Thomas WE, al-Dehaimi AW, Assiri AM, Eastell R. CY, et al. Longitudinal changes in bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(10):3487–3491.
- Gurlek A, Kumar R 2001 Regulation of osteoblast growth by interactions between transforming growth factor- β and $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D₃. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11:299–317
- Habermann B, Eberhardt C, Feld M, Zichner L, Kurth AA. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop.* 2007 Apr;78(2):221-5.
- Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):22907-10.
- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 Jul;15(7):1337-45.
- Hannemann A, Wallaschofski H. Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women. *Bone.* 2015 Jun 26. pii: S8756-3282(15)00256-2. doi: 10.1016/j.bone.2015.06.020. [Epub ahead of print]
- Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I

- collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res.* 1992 Nov;7(11):1251-8.
- Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):339-45.
 - Heersche JN, Reimers SM, Wrana JL, Waye MM, Gupta AK. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proc Finn Dent Soc*, 88 (Suppl. 1) (1992), pp. 173–182
 - Hegdeus Z. The re-building of the alveolar process by bone transplantation. *Dent. Cosmos* 1923;65:736.
 - Hellman J, Käkönen SM, Matikainen MT, Karp M, Lövgren T, Väänänen HK, Pettersson K. Epitope mapping of nine monoclonal antibodies against osteocalcin: combinations into two-site assays affect both assay specificity and sample stability. *J Bone Miner Res.* 1996 Aug;11(8):1165-75.
 - Herrmann M, Klitscher D, Georg T, Frank J, Marzi I, Herrmann W. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem.* 2002 Dec;48(12):2263-6.
 - Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, Smith J, Moffitt S. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr.* 1983 Mar;37(3):478-94.
 - Holmberg L, Forsgren L, Kristerson L. Porous Titanium Granules for Implant Stability and BoneRegeneration – a Case Followed for 12 Years. *Upsala J Med Sci* 2008;113 (2):217–22.

- Hong J, Andersson J, Ekdahl KN, Elgue G, Axén N, Larsson R, Nilsson B. Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost.* 1999 Jul;82(1):58-64.
- Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JI, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3204-8.
- Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, Scheetz JP. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol.* 2003 Jul;74(7):990-9.
- Iwadate H, Kobayashi H, Kanno T, Asano T, Saito R, Sato S, Suzuki E, Watanabe H, Ohira H. Plasma osteopontin is correlated with bone resorption markers in rheumatoid arthritis patients. *Int J Rheum Dis.* 2014 Jan;17(1):50-6. doi: 10.1111/1756-185X.12115. Epub 2013 Jul 16.
- Iwamoto J, Takada T, Sato Y. Vitamin K nutritional status and undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women treated with bisphosphonates. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2014;23(2):256-62.
- Iyama K, Ninomiya Y, Olsen BR, Linsenmayer TF, Trelstad RL, Hayashi M. Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. *Anat Rec.* 1991 Apr;229(4):462-72.
- Jensen SS, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D. Long-term stability of contour augmentation in the esthetic zone: histologic and histomorphometric evaluation of 12 human biopsies 14 to 80 months after augmentation. *J Periodontol.* 2014 Nov;85(11):1549-56. doi: 10.1902/jop.2014.140182. Epub 2014 Jul 10.

- Jepsen K, Jepsen S, Laine ML, Anssari Moin D, Pilloni A, Zeza B, Sanz M, Ortiz-Vigon A, Roos-Jansåker AM, Renvert S. Reconstruction of Peri-implant Osseous Defects: A Multicenter Randomized Trial. *J Dent Res*. 2016 Jan;95(1):58-66. doi: 10.1177/0022034515610056. Epub 2015 Oct 8.
- Joerring S, Krogsgaard M, Wilbek H, Jensen LT. Collagen turnover after tibial fractures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1994;113(6):334-6.
- Jónsson BY, Mjöberg B. Surgical treatment of depression fractures of the lateral tibial plateau using porous titanium granules. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2009; 114: 52-54
- Jónsson BY, Mjöberg B. Porous titanium granules are better than autograft bone as a bone void filler in lateral tibial plateau fractures: A randomised trial. *Bone Joint J*. 2015 Jun;97-B(6):836-41.
- Jung RE, Philipp A, Annen BM, Signorelli L, Thoma DS, Hämmerle CH, Attin T, Schmidlin P. Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):90-8. doi: 10.1111/jcpe.12027. Epub 2012 Nov 19.
- Kanatani M, Sugimoto T, Kanzawa M et al (1999) High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261:144–148
- Kang KY, Hong YS, Park SH, Ju JH. Increased serum alkaline phosphatase levels correlate with high disease activity and low bone mineral density in patients with axial spondyloarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2015 Mar 25. pii: S0049-0172(15)00051-7. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.03.002. [Epub ahead of print]

- Karaplis AC. Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Bilizikian, JP.; Reisz, LG; Martin, TJ., editors. Principles of Bone Biology. Vol. 1. 3rd ed. Academic Press;2008. p. 53-84.
- Kauther MD, Bachmann HS, Neuerburg L, Broecker-Preuss M, Hilken G, Grabellus F, Koehler G, von Knoch M, Wedemeyer C. Calcitonin substitution in calcitonin deficiency reduces particle-induced osteolysis. BMC Musculoskelet Disord. 2011 Aug 15;12:186. doi: 10.1186/1471-2474-12-186.
- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, Wang MG, McBride OW, Young MF. The human bone sialoprotein gene (IBSP): genomic localization and characterization. Genomics. 1993 Aug;17(2):408-15.
- Kline SN, Rimer SR. Reconstruction of osseous defects with freeze-dried allogeneic and autogenous bone. Clinical and histologic assessment. Am J Surg. 1983 Oct;146(4):471-3.
- Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. Vet Clin Pathol. 2005;34(1):35-8.
- Krabben A, Knevel R, Huizinga TW, Cavet G, van der Helm-van Mil AH. Serum pyridinoline levels and prediction of severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2013 Aug;40(8):1303-6.
- Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ, Hwang SM, Tomaszek T, Yamashita DS, Marquis RW, Oh H, Jeong JU, Veber DF, Gowen M, Lark MW, Stroup G. A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys. Bone. 2007 Jan;40(1):122-31. Epub 2006 Sep 7.

- Kurdy NM. Serology of abnormal fracture healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP. *J Orthop Trauma*. 2000 Jan;14(1):48-53.
- Kyro A, Usenius JP, Aarnio M, Kunnamo I, Avikainen V. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol*. 1993;82(4):254–262.
- Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2000 Aug;157(2):435-48.
- Lai JC, Shoback DM, Zipperstein J, Lizaola B, Tseng S, Terrault NA. Bone Mineral Density, Bone Turnover, and Systemic Inflammation in Non-cirrhotics with Chronic Hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2015 Jun;60(6):1813-9.
- Lam WK, Eastlund DT, Li CY, Yam LT. Biochemical properties of tartrate-resistant acid phosphatase in serum of adults and children. *Clin Chem*. 1978 Jul;24(7):1105-8.
- Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ. Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem*. 1981 Aug;14(4):177-81.
- Lam KW, Desnick RJ. Biochemical properties of the tartrate-resistant acid phosphatase activity in Gaucher disease. *Prog Clin Biol Res*. 1982;95:267-78.
- Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):538-45.

- Lambert F, Lecloux G, Léonard A, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Bone regeneration using porous titanium particles versus bovine hydroxyapatite: a sinus lift study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(3) Jun:412-26.
- Landis WJ, Jacquet R, Hillyer J, Zhang J. Analysis of osteopontin in mouse growth plate cartilage by application of laser capture microdissection and RT-PCR. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:28-32.
- Lane JM, Suda M, von der Mark K, Timpl R. Immunofluorescent localization of structural collagen types in endochondral fracture repair. *J Orthop Res.* 1986;4(3):318-29.
- Lang M, Seibel MJ, Zipf A, Ziegler R. Influence of a new protease inhibitor on the stability of osteocalcin in serum. *Clin Lab.* 1996;42:5-10.
- Langlois MR, Delanghe JR, Kaufman JM, De Buyzere ML, Van Hoecke MJ, Leroux-Roels GG. Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic bone disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994 Sep;32(9):675-80.
- Lanske, B., Amling, M., Neff, L., Guiducci, J., Baron, R. and Kronenberg, H. M. (1999). Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J. Clin. Invest.* 104, 399-407.
- Lecaille F, Brömme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie.* 2008 Feb;90(2):208-26. Epub 2007 Sep 2.
- Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, Kimura S, Jankowski R, Cummins J, Usas A, Gates C, Robbins P, Wernig A, Huard J. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol.* 2000 Sep 4;150(5):1085-100.

- Lee JS, Sohn JY, Lim HC, Jung UW, Choi SH. Different bone regeneration patterns in periimplant circumferential gap defects grafted with two types of osteoconductive biomaterial. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Jun 18.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005 May 20;280(20):19883-7. Epub 2005 Mar 18.
- Lim SV, Marenzana M, Hopkinson M, List EO, Kopchick JJ, Pereira M, Javaheri B, Roux JP, Chavassieux P, Korbonits M, Chenu C. Excessive growth hormone expression in male GH transgenic mice adversely alters bone architecture and mechanical strength. *Endocrinology*. 2015 Apr;156(4):1362-71. doi: 10.1210/en.2014-1572. Epub 2015 Feb 3.
- Lin YF, Shieh SD, Diang LK, Lin SH, Chyr SH, Li BL, Lu KC. Influence of rapid correction of metabolic acidosis on serum osteocalcin level in chronic renal failure. *ASAIO J*. 1994 Jul-Sep;40(3):M440-4.
- Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;(232):210–216.
- Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, Koskivirta I, Kleuser B, Vacher J, Vuorio E, Horne WC, Baron R. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest*. 2013 Feb;123(2):666-81. doi: 10.1172/JCI64840.
- Lotz J, Gaertner T, Hahn M, Prellwitz W. Collagen type I metabolism after bone surgery. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1999;119(3-4):212-6.
- Lowry M, Hall DE, Brosnan JT. Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism*. 1985 Oct;34(10):955-61.

- Lutz R, Berger-Fink S, Stockmann P, Neukam FW, Schlegel KA. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Jun;26(6):644-8. doi: 10.1111/clr.12352. Epub 2014 Feb 20.
- Ly TV, Swiontkowski MF. Treatment of femoral neck fractures in young adults. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(10):2254–2266.
- Lyngstadaas SP, Verket A, Pinholt EM, Mertens C, Haanaes HR, Wall G, Wallström M, Rasmusson L. Titanium Granules for Augmentation of the Maxillary Sinus - A Multicenter Study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015 Apr 15. doi: 10.1111/cid.12291. [Epub ahead of print]
- Martin M, Van Hoof V, Couttenye M, Prove A, Blockx P. Analytical and clinical evaluation of a method to quantify bone alkaline phosphatase, a marker of osteoblastic activity. *Anticancer Res.* 1997 Jul-Aug;17(4B):3167-70.
- Masters PW, Jones RG, Purves DA, Cooper EH, Cooney JM. Commercial assays for serum osteocalcin give clinically discordant results. *Clin Chem.* 1994 Mar;40(3):358-63.
- Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol.* 2006 Oct;169(4):1440-57.
- Melkko J, Hellevik T, Risteli L, Risteli J, Smedsrød B. Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med.* 1994 Feb 1;179(2):405-12.

- Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV, Dunstan CR, Seibel MJ. Serum cathepsin K concentrations reflect osteoclastic activity in women with postmenopausal osteoporosis and patients with Paget's disease. *Clin Lab.* 2006;52(1-2):1-10.
- Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol.* 1992 Dec;63(12):979-83.
- Merry AH, Harwood R, Woolley DE, Grant ME, Jackson DS. Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxyl-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976 Jul 12;71(1):83-90.
- Mijiritsky E, Yatzkaier G, Mazor Z, Lorean A, Levin L. The use of porous titanium granules for treatment of peri-implantitis lesions: preliminary clinical and radiographic results in humans. *Br Dent J.* 2013;214(5)Mar:E13.4
- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 29;247(3):610-5.
- Moghaddam A, Müller U, Roth HJ, Wentzensen A, Grützner PA, Zimmermann G. TRACP 5b and CTX as osteological markers of delayed fracture healing. *Injury.* 2011 Aug;42(8):758-64.
- Mori-Akiyama Y, Akiyama H, Rowitch DH, de Crombrughe B. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 5;100(16):9360-5. Epub 2003 Jul 23.

- Mundy GR, Shapiro JL, Bandelin JG, Canalis EM, Raisz LG. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *J Clin Invest.* 1976 Sep;58(3):529-34.
- Muraio H, Yamamoto K, Matsuda S, Akiyama H. Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture. *J Bone Miner Metab.* 2013 Jul;31(4):390-8.
- Nakagawa H, Kamimura M, Takahara K, Hashidate H, Kawaguchi A, Uchiyama S, Miyasaka T. Changes in total alkaline phosphatase level after hip fracture: comparison between femoral neck and trochanter fractures. *J Orthop Sci.* 2006 Mar;11(2):135-9.
- Naganawa T, Xiao L, Abogunde E, Sobue T, Kalajzic I, Sabbieti M, Agas D, Hurley MM. In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 13;339(2):490-8.
- Nasz H., Reidy M., Yukna R. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000 1999; 19: 74-86.
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001 May 10;344(19):1434-41.
- Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilde L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 May;70(5):1431-7.
- Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Oct;13(5):514-21.

- Nusgens B, Lapiere CM. The relationship between proline and hydroxyproline urinary excretion in human as an index of collagen catabolism. *Clin Chim Acta*. 1973 Oct 12;48(2):203-11.
- Obrant KJ, Ivaska KK, Gerdhem P, Alatalo SL, Pettersson K, Väänänen HK. Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently sustained fracture. *Bone*. 2005 May;36(5):786-92. Epub 2005 Mar 31
- Ohishi T, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Tsuchikawa T, Naitoh K, Inoue T. Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1998;118(3):126-30.
- Olefjord I, Hansson S. Surface analysis of four dental implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(1):32-40.
- Olerud S, Danckwardt-Lillieström G. Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *J Bone Joint Surg Br*. 1968 Nov;50(4):844-51.
- Olesen UK, Juul R, Bonde CT, Moser C, McNally M, Jensen LT, Elberg JJ, Eckardt H. A review of forty five open tibial fractures covered with free flaps. Analysis of complications, microbiology and prognostic factors. *Int Orthop*. 2015 Jun;39(6):1159-66. doi: 10.1007/s00264-015-2712-z.
- Oni OO, Mahabir JP, Iqbal SJ, Gregg PJ. Serum osteocalcin and total alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in tibial shaft fractures. *Injury*. 1989 Jan;20(1):37-8.
- Page AE, Hayman AR, Andersson LM, Chambers TJ, Warburton MJ. Degradation of bone matrix proteins by osteoclast cathepsins. *Int J Biochem*. 1993 Apr;25(4):545-50.
- Parker MJ, Raghavan R, Gurusamy K. Incidence of fracture-healing complications after femoral neck fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 May;458:175-9.

- Pecoraro V, Roli L, Germagnoli L, Banfi G. The prognostic role of bone turnover markers in multiple myeloma patients: The impact of their assay. A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 May 21. pii: S1040-8428(15)00090-6. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.001.
- Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgöwer M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Müller ME. The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1969;125:19-29.
- Poser JW, Price PA. A method for decarboxylation of γ -carboxy glutamic acid in proteins. *J Biol Chem*, 254 (1979), pp. 431–436.
- Pratt DA, Daniloff Y, Duncan A, Robins SP. Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1992 Nov 15;207(1):168-75.
- Quattlebaum JB, Mellonig JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1988 Jun;59(6):394-7.
- Raheja LF, Genetos DC, Wong A, Yellowley CE. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 α . *Cell Biol Int*. 2011 Oct;35(10):981-9.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 1998 A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13:763–773.

- Risteli J, Niemi S, Elomaa I, Risteli L. Bone resorption assay based on a peptide liberated during type I collagen degradation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1991;6:S251-s2.
- Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem*. 1984 Jul;30(7):1182-6.
- Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9901-7.
- Sabetrasekh R, Tiainen H, Lyngstadaas SP, Reseland J, Haugen H. A novel ultra-porous titanium dioxide ceramic with excellent biocompatibility. *J Biomater Appl*. 2011 Feb;25(6):559-80.
- Sabbieti MG, Marchetti L, Gabrielli MG, Menghi M, Materazzi S, Menghi G, Raisz LG, Hurley MM (2005) Prostaglandins differently regulate FGF-2 and FGF receptor expression and induce nuclear translocation in osteoblasts via MAP kinase. *Cell Tissue Res* 319:267–278.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13453-8.
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*. 1997 Apr 11;276(5310):270-3.
- Sbordone C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Bufo P, Sbordone L. Volume changes of autogenous bone after sinus lifting and grafting procedures: a 6-year

- computerized tomographic follow-up. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013 Apr;41(3):235-41.
- Schallhorn RG. Postoperative problems associated with iliac transplants. *J Periodontol.* 1972 Jan;43(1):3-9.
 - Scheven BA, Milne JS, Robins SP. A novel culture system to generate osteoclasts and bone resorption using porcine bone marrow cells: role of M-CSF. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Feb 3;231(1):231-5.
 - Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, Ornitz DM. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn.* 2009 Mar;238(3):766-74.
 - Schmitt C, Karasholi T, Lutz R, Wiltfang J, Neukam FW, Schlegel KA. Long-term changes in graft height after maxillary sinus augmentation, onlay bone grafting, and combination of both techniques: a long-term retrospective cohort study. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Feb;25(2):e38-46. doi: 10.1111/clr.12045. Epub 2012 Oct 17.
 - Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003 Aug;23(4):313-23.
 - Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, Karmatschek M, Horn E, Ludwig H, Armbruster FP, Ziegler R. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Sep;81(9):3289-94.
 - Seibel MJ, Lang M, Geilenkeuser WJ. Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem.* 2001 Aug;47(8):1443-50.

- Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov;26(4):97-122.
- Seifert-Klauss V, Mueller JE, Lupp P, Probst R, Wilker J, Höss C, Treumann T, Kastner C, Ulm K. Bone metabolism during the perimenopausal transition: a prospective study. *Maturitas.* 2002 Jan 30;41(1):23-33.
- Shibata S, Suda N, Suzuki S, Fukuoka H, Yamashita Y. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 at the onset of condylar cartilage formation in fetal mouse mandible. *J Anat.* 2006 Feb;208(2):169-77.
- Shimose S, Kubo T, Fujimori J, Furuta T, Ochi M. A novel assessment method of serum alkaline phosphatase for the diagnosis of osteosarcoma in children and adolescents. *J Orthop Sci.* 2014 Nov;19(6):997-1003.
- Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov;26(4):97-122.
- Singh A, Ali S, Mahdi AA, Srivastava RN. Evaluation of Serum Alkaline Phosphatase as a Biomarker of Healing Process Progression of Simple Diaphyseal Fractures in Adult Patients. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2013 Feb;2(2), 40-43.
- Smedsrød B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J.* 1990 Oct 15;271(2):345-50.
- Smit TH, Burger EH. Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis. *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):301-7.
- Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr, Li IW, Kim RH. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Apr 21;760:223-41.

- Sorva A, Tähtelä R, Risteli J, Risteli L, Laitinen K, Juntunen-Backman K, Sorva R. Familial high serum concentrations of the carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen. *Clin Chem*. 1994 Aug;40(8):1591-3.
- Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Evaluation of serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits. *Am J Vet Res*. 2003 Jun;64(6):727-35.
- Spoerke ED, Murray NG, Li H, Brinson LC, Dunand DC, Stupp SI. A bioactive titanium foam scaffold for bone repair. *Acta Biomater*. 2005 Sep;1(5):523-33. Epub 2005 Jul 14.
- Stoffel K, Engler H, Kuster M, Riesen W. Changes in biochemical markers after lower limb fractures. *Clin Chem*. 2007 Jan;53(1):131-4. Epub 2006 Nov 27.
- Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Sep;(378):224-37.
- Sun S, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Sørensen MG, Zheng Q, Dziegiel MH, Maksymowych WP, Henriksen K. The development and characterization of an ELISA specifically detecting the active form of cathepsin K. *Clin Biochem*. 2013 Oct;46(15):1601-6.
- Szulc P, Garnero P, Munoz F, Marchand F, Delmas PD. Cross-sectional evaluation of bone metabolism in men. *J Bone Miner Res*. 2001 Sep;16(9):1642-50.
- Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar;17(5-6):597-606. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0094. Epub 2010 Nov 9.

- Tähtelä R, Turpeinen M, Sorva R, Karonen SL. The aminoterminal propeptide of type I procollagen: evaluation of a commercial radioimmunoassay kit and values in healthy subjects. *Clin Biochem.* 1997 Feb;30(1):35-40.
- Taitzman LA, Lynch JR, Agel J, Barei DP, Nork SE. Risk factors for femoral nonunion after femoral shaft fracture. *J Trauma.* 2009;67(6):1389–1392.
- Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res.* 1998 Oct;13(10):1555-68.
- Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury.* 2003 Jul;34(7):477-9.
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007 Jun;5(6):464-75.
- Tavakoli M, Moghareabed A, Farsam T, Abbas FM, Badrian H, Khalighinejad N. Evaluation of dental socket healing after using of porous titanium granules: Histologic and histomorphometric assessment in dogs. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(5)Sep:600-6.
- Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science.* 1968 Jul 5;161(3836):54-6.
- Taylor JA, Richter M, Done S, Feldman KW. The utility of alkaline phosphatase measurement as a screening test for rickets in breast-fed infants and toddlers: a study from the puget sound pediatric research network. *Clin Pediatr (Phila).* 2010 Dec;49(12):1103-10.

- Thomas M. Turner, Robert M. Urban, Deborah J. Hall, Gunnar B. J. Andersson. Bone Ingrowth Through Porous Titanium Granulate Around a Femoral Stem. Histological assessment in a six-month canine hemiarthroplasty model. *Upsala J Med Sci* 2007;112 (2):191–197.
- Thor A, Rasmusson L, Wennerberg A, Thomsen P, Hirsch JM, Nilsson B, Hong J. The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(6):966-74. Epub 2006 Nov 13.
- Thor A. Porous Titanium Granules and Blood for Bone Regeneration around Dental Implants: Report of Four Cases and Review of the Literature - A case report. *Case Rep Dent*. 2013;2013:410515.
- Ting MC, Wu NL, Roybal PG, Sun J, Liu L, Yen Y, Maxson RE Jr. EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Development*. 2009 Mar;136(5):855-64. doi: 10.1242/dev.028605.
- Ulrich MM, Perizonius WR, Spoor CF, Sandberg P, Vermeer C. Extraction of osteocalcin from fossil bones and teeth *Biochem Biophys Res Commun*, 149 (1987), pp. 712–719.
- Ting M-C, Wu NL, Roybal PG, Sun J, Liu L, Yen Y, Maxson RE. EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Development*. 2009;136:855–864.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation*. 2002 Oct 22;106(17):2263-70.

- Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, Van Mullem M, Lepoutre LG, De Broe ME. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin Chem.* 1990 Jun;36(6):875-8.
- van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta.* 1991 Sep 14;201(1-2):27-33.
- Vandeweghe S, Leconte C, Ono D, Coelho PG, Jimbo R. Comparison of histological and three-dimensional characteristics of porous titanium granules and deproteinized bovine particulate grafts used for sinus floor augmentation in humans: a pilot study. *Implant Dent.* 2013 Aug;22(4):339-43. doi: 10.1097/ID.0b013e3182938d03.
- Veitch SW, Findlay SC, Hamer AJ, Blumsohn A, Eastell R, Ingle BM. Changes in bone mass and bone turnover following tibial shaft fracture. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):364-72. Epub 2005 Dec 15.
- Verket A, Lyngstadaas SP, Rasmusson L, Haanæs HR, Wallström M, Wall G, Wohlfahrt JC. Maxillary sinus augmentation with porous titanium granules: a microcomputed tomography and histologic evaluation of human biopsy specimens. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(3) May-Jun:721-8.
- Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, Constable MJ, Nicholson GC, Zhang JG, Nicola NA, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):582-92.
- Walschot L, Schreurs B, Verdonchot N, Buma P. The effect of impaction and a bioceramic coating on bone ingrowth in porous titanium particles. A bone chamber study in goats. *Acta Orthop.* 2011 Jun; 82(3): 372–377.

- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996 Jan 26;271(5248):509-12.
- Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*. 2000 Oct;15(10):1879-88.
- Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e25900.
- Wohlfahrt J C, Monjo M, Rønold H J, Aass A M, Ellingsen J E, Lyngstadaas S P. Porous titanium granules promote bone healing and growth in rabbit tibia periimplant osseous defects. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(2)Feb:165-73.
- Wohlfahrt JC, Aass AM, Ronold HJ, Lyngstadaas SP. Micro CT and human histological analysis of a peri-implant osseous defect grafted with porous titanium granules: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):e9-e14.
- Wohlfahrt JC, Lyngstadaas SP, Rønold HJ, Saxegaard E, Ellingsen JE, Karlsson S, Aass AM. Porous titanium granules in the surgical treatment of peri-implant osseous defects: a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012A Mar-Apr;27(2):401-10.
- Wohlfahrt JC, Aass AM, Rønold HJ, Heijl L, Haugen HJ, Lyngstadaas SP. Microcomputed tomographic and histologic analysis of animal experimental degree II furcation defects treated with porous titanium granules or deproteinized bovine bone. *J Periodontol*. 2012B;83(2)Feb:211-21.
- Wohlfahrt JC, Lyngstadaas SP, Heijl L, Aass AM. Porous titanium granules in the treatment of mandibular Class II furcation defects: a consecutive case series. *J Periodontol*. 2012C;83(1)Jan:61-9.

- Woitge HW, Scheidt-Nave C, Kissling C, Leidig-Bruckner G, Meyer K, Grauer A, Scharla SH, Ziegler R, Seibel MJ. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jan;83(1):68-75.
- Wöfl C, Schweppenhäuser D, Gühring T, Takur C, Höner B, Kneser U, Grützner PA, Kolios L. Characteristics of bone turnover in the long bone metaphysis fractured patients with normal or low Bone Mineral Density (BMD). *PLoS One.* 2014 May 1;9(5):e96058.
- Yamaza T, Goto T, Kamiya T, Kobayashi Y, Sakai H, Tanaka T. Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone.* 1998 Dec;23(6):499-509.
- Yang S, Lan L, Miron RJ, Wei L, Zhang M, Zhang Y. Variability in Particle Degradation of Four Commonly Employed Dental Bone Grafts. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014 Jan 3. doi: 10.1111/cid.12196.
- Yates DM, Brockhoff HC 2nd, Finn R, Phillips C. Comparison of intraoral harvest sites for corticocancellous bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Mar;71(3):497-504. doi: 10.1016/j.joms.2012.10.014.
- Yokoyama K, Itoman M, Uchino M, Fukushima K, Nitta H, Kojima Y. Immediate versus delayed intramedullary nailing for open fractures of the tibial shaft: A multivariate analysis of factors affecting deep infection and fracture healing. *Indian J Orthop.* 2008;42(4):410–419.
- Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics.* 1990 Aug;7(4):491-502.

- Yu-Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG, Hebel JR, Zimmerman SI, Shapiro J, Magaziner J. Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc.* 2001 Jul;49(7):877-83.
- Zernik J, Twarog K, Upholt WB. Regulation of alkaline phosphatase and alpha2 (I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation.* 1990;44:207–215.
- Zimmermann G, Müller U, Wentzensen A. The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. *Injury.* 2007 May;38 Suppl 2:S33-7.
- Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol.* 1997 Jan;170(1):88-100.
- Βλαχοδημήτρη Μ. & Πεπελάση Ε. Μεταβολές των διαστάσεων της φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγή δοντιού. *Ελληνικά Στοματολογικά Χρονικά* 2009; 53: 223-232.
- Πεπελάση Ε. Αναπλαστικές τεχνικές. Στο βιβλίο: «Κλινική Περιοδοντολογία» Μαντζαβίνος Ζ. & Βρότσος Ι., Λίτσας. Αθήνα 2002, Κεφ. 28, 441-463.
- Πεπελάση Ε. Αναπλαστικές τεχνικές. Στο βιβλίο: «Περιοδοντολογία-Εμφυτευματολογία» Βρότσος Ι.Α., Καρούσης Ι.Κ., Εκδόσεις Βήτα medical arts. Αθήνα 2016, Κεφ. 33, 466-488.
- Πεπελάση Ε. & Βρότσος Ι. Θεωρητική βάση και βιολογικές αρχές της εφαρμογής των οστικών μοσχευμάτων στην αποκατάσταση περιοδοντικών βλαβών *Οδοντοστοματολογική Πρόοδος* 1991; 45: 327-336.

- Πεπελάση Ε. & Βρότσος Ι. Η χρήση των μη-οστικής προέλευσης μοσχευμάτων στην αντιμετώπιση περιοδοντικών οστικών βλαβών. Οδοντοστοματολογική Πρόοδος 1993; 47: 53-66.
- Πεπελάση Ε. & Ξυνογαλά Ι. Η σημερινή θέση των αναπλαστικών τεχνικών. Οδοντοστοματολογική Πρόοδος 2009;63(1):126-145.