



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

---

Α' ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π. ΠΑΠΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ «Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΙΚΗΤΑΣ Π. ΣΧΙΖΑΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ

*«ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΖΩΪΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΙΚΡΟΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT / β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ, ΣΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟ.»*

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΟΛΓΑ ΣΑΒΒΙΔΟΥ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2019



Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ἸΜΜΥΜΙ ΔΡΟΜΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΙ-  
ΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΛΑΚΕΙΔΑ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑ  
ΜΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΜ ΚΑΤΑ Δ  
ΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ  
ΤΗΝΔΕ ἩΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧ-  
ΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ἸΣΑ ΓΕΜΕΤΗΣΙΜ ἘΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘ  
ΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΛΛΑ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕ-  
ΝΟΣ ΤΟ ἘΞ ἸΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ἸΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΜΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣ-  
Ι, ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ἢ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑ-  
ΝΘΑΝΕΙΝ ΑΜΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ  
ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ  
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ἘΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙ-  
ΣΙ ΤΟΥ ἘΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜ  
ΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ὈΙΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ἸΗΤΡΗΣΙ, Αἰῶσι, ΔΕ Ο  
ΥΔΕΜΙ ΜΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ἘΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ-  
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ἘΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ  
ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΜ. ΟΥ ΔΕ ὈΣΙΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜ-  
ΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣ-  
ΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΥΝ-  
ΑΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΙΩΣΩ. Αἰῶσι ΔΕ ΚΑΙ ὈΣΙΩΣ  
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ἘΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  
ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΜΙΘΙΖΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ  
ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ἈΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ἘΣ ΟΙΚΙΩΣ Δ  
Ε ΟΚΟΘΑΣ ἈΝ ἘΣΙΩ ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ἘΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ,  
ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ἘΚΤΟΣ ἘΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ἘΚΟΥΣΙ-  
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΜΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ  
ΕΡΓΩΝ ἘΠΙ ΤΕ ΓΥΜΝΑΣΙΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ ΚΑΙ ΑΜΑ-  
ΡΩΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Ἀ Δ' ἈΝ ἘΝ  
ΘΕΡΑΠΕΙΗ, ἢ ἸΔΩ, ἢ ΑΚΟΥΣΩ, ἢ ΚΑΙ ΑΜΕΥ ΘΕΡΑΠΗ  
ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ἈΝΘΡΩΠΩΝ, Ἀ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ἘΚΚΛΑ-  
ΡΕΣΘΑΙ ἘΞ ἸΩ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ἈΡΡΗΤΑ ἨΓΕΙΜΕΝΟΣ ΕΙΝ-  
ΑΙ ΤΑ ΤΟ ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕ-  
ΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΡΑΥΡΑΣΘ  
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ ΤΟΜΕΜΩ, ΠΑΡΑ ΒΑ-  
ΣΙΝ ἈΝΘΡΩΠΩΙΣ ἘΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΜΙ  
Ι ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΜΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕ ὈΝ

ΛΕΝΑ SEPTEMBER

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Θερμές ευχαριστίες αξίζουν στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, χωρίς τη συμβολή των οποίων δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Την κ. Όλγα Σαββίδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, που ήταν ανά πάσα στιγμή παρούσα και παρείχε αμέριστη υποστήριξη για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Τον κ. Ιωάννη Τριανταφυλλόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής, του οποίου το ενδιαφέρον για το επιστημονικό αντικείμενο συνετέλεσε στη θετική έκβαση και ολοκλήρωση της εργασίας.

Τον κ. Παναγιώτη Παπαγγελόπουλο, Καθηγητή Ορθοπαιδικής, που με τους ανοιχτούς επιστημονικούς ορίζοντες και το διεθνές κύρος υποστήριξε την εκπόνηση της εργασίας.

***Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παρ. 2).***

«ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΖΩΪΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΜΙΚΡΟΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ WNT / β-ΚΑΤΕΝΙΝΗΣ, ΣΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟ.»

Ημερομηνία αίτησης: 11/05/2016

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 29/07/2016

Ημερομηνία ορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής: 14/03/2017

Ημερομηνία κατάθεσης Α' έκθεσης προόδου: 17/07/2017

Ημερομηνία κατάθεσης Β' έκθεσης προόδου: 18/07/2018

Ημερομηνία κατάθεσης Γ' έκθεσης προόδου: 05/06/19

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 27/11/2019

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 18/12/2019

# ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

---

**1. Όλγα Δ. Σαββίδου, επιβλέπουσα**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**2. Παναγιώτης Ι. Παπαγγελόπουλος, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής**

Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**3. Ιωάννης Κ. Τριανταφυλλόπουλος, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής**

Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**4. Βασίλειος Α. Κοντογεωργάκος**

Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**5. Παναγιώτης Σ. Κουλουβάρης**

Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**6. Βασίλειος Σ. Νικολάου**

Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**7. Δημήτριος Σ. Μαστρόκαλος**

Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

---

## Προσωπικά στοιχεία

**Όνοματεπώνυμο:** Νικήτας Σχίζας

**Πατρώνυμο:** Παναγιώτης

**Ημερομηνία γεννήσεως:** 21/07/1980

**Τόπος γεννήσεως:** Καλαμάτα Μεσσηνίας

**Οικογενειακή κατάσταση:** Άγαμος

**Διεύθυνση κατοικίας:** Πλουτάρχου 9 , 15122 Μαρούσι

**Τηλέφωνο επικοινωνίας:** 6932683598

**E-mail:** nikit.schizas@gmail.com

## **Εκπαίδευση**

**1986-1992** : Πρωτοβάθμια εκπαίδευση (δημοτικό).

**1992-1995** : Δευτεροβάθμια εκπαίδευση (γυμνάσιο) – 4<sup>ο</sup> Γυμνάσιο Καλαμάτας.

**1995-1998** : Δευτεροβάθμια εκπαίδευση (Λύκειο) – 4<sup>ο</sup> Λύκειο Καλαμάτας.

**1998-2005**: Τριτοβάθμια εκπαίδευση - Πτυχίο Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**2007-2008** : Ειδικότητα χειρουργικής – Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Καλαμάτας Β' Χειρουργική Κλινική, Διευθυντής Δρ. Παναγιώτης Χρυσομάλλης.

**2011 – 2016** : Ειδικότητα Ορθοπαιδικής – ΓΝΑ «ΚΑΤ» Δ' Ορθοπαιδική κλινική, Διευθυντής Δρ Γεώργιος Μαχαιράς.

**5 Σεπτεμβρίου 2016** : Λήψη τίτλου ιατρικής ειδικότητας, Χειρουργός Ορθοπαιδικός Τραυματιολόγος.

## **Προϋπηρεσία**

**10/10/2005 έως 10/03/07** : Στρατιωτική θητεία (Έφεδρος αξιωματικός του υγειονομικού της Πολεμικής Αεροπορίας).

**25/05/07 έως 24/05/08** : Β' Χειρουργική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Καλαμάτας, σε θέση έμμισθου βοηθού, ώστε να εκπαιδευτώ για ένα χρόνο

στη γενική χειρουργική. Στη θέση αυτή η θητεία μου παρατάθηκε έως τις **08/10/08**.

**11/05/09 έως 29/06/10** : Υπηρεσία υπαίθρου στο ΠΙ, Αβραμίου Μεσσηνίας ΚΥ.Μεσσήνης.

**08/08/11 – 07/08/16** : Άσκηση στην ειδικότητα της ορθοπαιδικής στην Δ' Ορθοπαιδική κλινική ΓΝΑ «ΚΑΤ». Στη θέση αυτή η θητεία μου παρατάθηκε έως τις **05/05/17**.

**Μάιος 2017 – Ιούνιος 2019** : Επικουρικός επιμελητής Β'– ΓΝΑ «ΚΑΤ», τμήμα Αθλητικών Κακώσεων.

## **Σεμινάρια**

1) **Study design, reviewing and writing in orthopaedics, arthroscopy and sports medicine**. Provided by the Greek Arthroscopy association and the orthopaedic sports medicine center - University of Ioannina, Corfu Ionian University 30-31/ 3/ 2012.

2) **AO Trauma “Upper Limb Advanced Symposium”**, provided by the AO Trauma Chapter Greece and the Dept. of Orthopedics, University Hospital of Patras, in Patras, Greece, 23 – 24/11/2012.

3) **Εργαστηριακή Άσκηση του Τμήματος Ώμου – Αγκώνος της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας: «Βασικές Αρχές Αρθροσκόπησης Ώμου»**, στο ΓΝΑ ΚΑΤ, Αθήνα (18/10/2013).

4) **1<sup>st</sup> Musculoskeletal Tumor Course**, in Athens, Greece (1/11/2013).

5) **Β' Πρακτική άσκηση Μικροχειρουργικής** διάρκειας 10 εβδομάδων.

Εργαστήριο Έρευνας «Θ.Γαροφαλίδης» ΓΝΑ ΚΑΤ, Αθήνα, 19/1/2015 -27/3-2015.

### **Επιστημονικό έργο**

**Σεπτέμβριος 2010 – Ιούνιος 2012** : Μεταπτυχιακός φοιτητής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τίτλος διπλωματικής εργασίας: «Ο ρόλος του μονοπατιού Wnt/ β-Κατενίνης στην πώρωση των καταγμάτων».

**Ιούλιος 2016:** Υποψήφιος Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ. (Αρ. Πρ.1516034413).

### **Διδακτικό έργο**

1) Επιβλέπων εκπαιδευτής στην πρακτική άσκηση Μικροχειρουργικής για το εκπαιδευτικό έτος 2014-2015. Κέντρο Έρευνας «Θ.Γαροφαλίδης».

2) Συμμετοχή ως Διδάσκων στο πλαίσιο του προγράμματος σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών», με διάλεξη:

«Ο ρόλος του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης στην πώρωση των καταγμάτων».

η οποία διεξήχθη κατά το πρώτο και τρίτο εξάμηνο του Ακαδημαϊκού Έτους 2016- 2017.

### **Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά**

1. Ismene Dontas, Anna-Aikaterini Neri, Christos Zafeiris, **Nikitas Schizas**, Cleopatra Nacopoulos, Anna-Maria Vesalas, Triantaphyllos Papadopoulos,

Dionysios Mouzakis and Nikolaos Papaioannou. The Rabbit Model of Femoral Bone Defects: Steps to Overcome Potential Pitfalls. *British Journal of Medicine & Medical Research* 13(4): 1-8, 2016, Article no.BJMMR.22857.

2. Ioannis K. Triantafyllopoulos, MD, MSc, PhD, FEBOT, Kalliopi Lampropoulou-Adamidou, MD, MSc, PhD, **Nikitas P. Schizas, MD, MSc**, Eleftherios V. Karadimas, MD, MSc Surgical treatment of acute type V acromioclavicular joint dislocations in professional athletes: an anatomic ligament reconstruction with synthetic implant augmentation. *J Shoulder Elbow Surg* (2017).

3. Panagiotis Valianatos, Evgenia Papadakou, Dimitrios Erginoussakis, Dimitrios Kampras, **Nikitas Schizas**, Anastasios Kouzoupis Treatment of Chronic Patellar Tendon Rupture with Hamstrings Tendon Autograft . *J Knee Surg* accepted after revision March 18, 2019.

4. **Nikitas Schizas**, Olga Savvidou, Ioannis Triantafyllopoulos, Stamatios Papadakis, Ismene Dontas, Panayiotis Papagelopoulos. Adjuvant therapies for the enhancement of microfracture technique in cartilage repair. *Orthopedic Reviews* 2019; volume 11:7950.

5. **Nikitas P. Schizas**, Olga Savvidou, Kalliopi Diamantopoulou, Stamatios Papadakis, Panayiotis J. Papagelopoulos and Ioannis K. Triantafyllopoulos. The combination of microfracture with induction of Wnt /  $\beta$ - Catenin pathway, leads to enhanced cartilage regeneration. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (2019) 14:428

#### **Προφορικές Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια:**

**1. Stripped screws during ankle fracture osteosynthesis do not influence the final outcome.**

*S. Papadakis, A. Koutroufinis, N. Schizas, P. Lepetsos, P. Anastasopoulos, A. Karras, G. Macheras* XXVI SICOT Triennial World Congress (Rio, November 2014). International Hip Society Closed Meeting (Rio, November 2014).

**2. A two-stage re-implantation protocol for the treatment of deep periprosthetic hip infection. Mid to long-term results in a tertiary referral center.**

*G. Macheras, P. Lepetsos, A. Stylianakis, S. Michail, D. Argyris, P. Anastasopoulos, N. Schizas, M. Lelekis.* 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Bone & Joint Infection Society (EBJIS) (Utrecht, September 2014).

**3. Efficiency of tranexamic acid and diluted epinephrine combination in total hip arthroplasty with a minimally invasive direct anterior approach.**

*Macheras G., Anastasopoulos P., Georgoulas C., Lepetsos P., Karras A., **Schizas N.**, Mavromati P., Gampopoulou Z. . 15<sup>th</sup> Congress EFORT (European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology) (London, June 2014).*

**4. Compartment syndrome of the foot after an ankle sprain. A case report.**

*Papadakis S., Lepetsos P., **Schizas N.**, Koutroufinis A., Karras A., Anastasopoulos P., Michail S., Macheras G. .15<sup>th</sup> Congress EFORT (European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology) (London, June 2014).*

**5. Long term results of Muller reinforcement rings in acetabular revision surgery for large bone defects.**

*G. Macheras, **N. Schizas**, C. Paganias, A. Koutroufinis-Tatatsis, P. Lepetsos, P. Anastasopoulos, S. Koutsostathis. 20th Annual Meeting of European Orthopedic Research Society (EORS 2012) (Amsterdam, September 2012).*



## Αναρτημένες ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια:

1. **Results of the surgical treatment of Rorabeck II periprosthetic knee fractures.** *Macheras G., Lepetsos P., Michail S., Kyriakopoulos N., Schizas N., Karras A., Anastasopoulos P., Tsiamtsouris K.*

16<sup>th</sup> Congress EFORT (European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology) (Prague, May 2015).

2. **Use of sonication of removed hip and knee implants for diagnosis of prosthetic joint infections.**

*Lepetsos P., Stylianakis A., Argyris D., Anastasopoulos P., Lelekis M., Michail S., Schizas N., Macheras G.*

15<sup>th</sup> Congress EFORT (European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology) (London, June 2014).

3. **Clinical outcome of the surgical management of 87 periprosthetic femoral fractures at a tertiary referral center.**

*Macheras G., Lepetsos P., Schizas N., Kontou E., Anastasopoulos P., Karras A., Koutsostathis S., Papadakis S.*

15<sup>th</sup> Congress EFORT (European Federation of National Associations of Orthopedics and Traumatology) (London, June 2014).

**4. THE COMBINATION OF MICROFRACTURE TECHNIQUE WITH PHARMACEUTICAL INDUCTION OF WNT/  $\beta$ - CATENIN PATHWAY FOR TREATING CARTILAGE DEFECTS, LEADS TO FIBROCARILAGE TISSUE WITH SUPERIOR HISTOLOGICAL PROPERTIES.**

*Nikitas P. Schizas , Olga D. Savvidou , Kalliopi Diamantopoulou , Stamatios A. Papadakis , Panayiotis J. Papagelopoulos ,Ioannis K. Triantafyllopoulos*  
*ICRS FOCUS MEETING ROME, JUNE 2019.*

**Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών**

1. Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών.
2. Μέλος του Κολλεγίου Ελλήνων Ορθοπαιδικών Χειρουργών.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός :** Έχει τεκμηριωθεί πως η πρόκληση μικροκαταγμάτων στο υποχόνδριο οστό ως αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών, οδηγεί σε σχηματισμό ινοχόνδρινου ιστού βιολογικά υποδεέστερου του υαλώδους χόνδρου.

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανότητας ανάπτυξης ιστού πλησιέστερου προς τον υαλώδη χόνδρο, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης, σε συνδυασμό με πρόκληση μικροκαταγμάτων.

**Υλικό – Μέθοδοι :** Σε 18 ενήλικες, αρσενικούς κονίκλους Νέας Ζηλανδίας, υπό γενική αναισθησία και συνθήκες ασηψίας, προκλήθηκε χόνδρινη βλάβη κυκλικού σχήματος, διαμέτρου 4 mm στη μεσότητα της τροχιλίας του δεξιού γόνατος. Εφαρμόστηκε η τεχνική μικροκαταγμάτων, όπως έχει καθιερωθεί από τους Steadman et al.

Η τροποποίηση του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης επιτυγχάνεται με τη χορήγηση από του στόματος διαλύματος καρβονικού λιθίου σε συγκέντρωση 7mM.

Σχηματίστηκαν τρεις ομάδες:

Ομάδα Α (ελέγχου) : (n=6)

Ομάδα Β (χρήση λιθίου 1 εβδομάδα ) : (n=6) .

Ομάδα Γ (χρήση λιθίου 4 εβδομάδες ) : (n=6)

Τα ζώα θυσιάσθηκαν 9 εβδομάδες μετεγχειρητικά και συνελέγησαν τα χειρουργηθέντα μηριαία οστά.

Διενεργήθηκε ιστομορφομετρία στα συλλεγόμενα δείγματα με βάση τα ιστοπαθολογικά κριτήρια αναγέννησης για χόνδρινες βλάβες, όπως αυτά έχουν καθορισθεί από τη διεθνή εταιρία επούλωσης του αρθρικού χόνδρου (ICRS).

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα τεστ είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided).

Η τιμή p-value <0.05 καθορίσθηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

**Αποτελέσματα :** Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε από τις έξι παραμέτρους του ιστοπαθολογικού score ICRS ( επιφάνεια, θεμέλια ουσία, κατανομή χονδροκυττάρων, βιωσιμότητα κυττάρων, υποχόνδριο οστό κι επιμετάλλωση) στις τέσσερις (επιφάνεια, θεμέλια ουσία, κατανομή χονδροκυττάρων, υποχόνδριο οστό) στατιστικά σημαντική υπεροχή της ομάδας Γ σε σχέση με την ομάδα Α.

**Συμπεράσματα:** Η χορήγηση διαλύματος καρβονικού λιθίου 7mM για 4 εβδομάδες, σε συνδυασμό με μικροκατάγματα ως αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών σε κονίκλους, οδηγεί σε στατιστικά σημαντική βελτίωση του ιστοπαθολογικού score ICRS τεσσάρων από τα έξι κριτήρια.

## SUMMARY

**Goals:** The aim of this study was to evaluate the effect of modifying Wnt/  $\beta$ -catenin signaling following microfracture, on the restoration of a full-thickness cartilage defect in a rabbit model. The modification of the canonical Wnt pathway was achieved through per os administration of lithium carbonate, which is an intracellular inhibitor of Gsk3- $\beta$  and therefore induces Wnt /  $\beta$  -catenin signaling.

**Materials and methods:** Full-thickness cartilage defects 4 mm in diameter were created in the right patellar groove of 18 male New Zealand White rabbits. Three groups were formed (n= 6): microfracture only (group 1), microfracture plus Lithium carbonate 7 mM in the drinking water for one week (group 2), microfracture plus Lithium carbonate 7 mM in the drinking water for four weeks (group 3). All animals were sacrificed nine weeks after surgery. The outcome was assessed histologically, by using the the International Cartilage Repair Society (ICRS) visual histological scale.

**Results:** Statistical analysis of the ICRS scores showed that group 3 was significantly superior to group 1 in four out of six ICRS categories, while Group 2 was not.

**Discussion:** In group 1, all samples presented an irregular cartilage surface, with a fibrocartilage matrix, and disorganized cell distribution. Group 2 showed a more regular surface. In group 3, the tissue surface was regular, with a hyaline matrix mixed with fibrocartilage, but with chondrocytes more organized in the tissue.

**Conclusions:** The combination of microfracture and systematic administration of Lithium carbonate 7 mM for four weeks shows statistical significant superiority in four out of six ICRS categories compared to microfracture only for the treatment of full thickness cartilage defects in a rabbit experimental model.

## **Περιεχόμενα**

<b>Βιογραφικό σημείωμα.....</b>	<b>9</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>20</b>
<b>Summary.....</b>	<b>22</b>
<b>Περιεχόμενα.....</b>	<b>24</b>
<b>Πίνακας εικόνων.....</b>	<b>26</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>27</b>
<b>Κεφάλαιο 1 : Στοιχεία εμβρυολογίας του Μυοσκελετικού.....</b>	<b>28</b>
<b>Κεφάλαιο 2: Σύσταση και φυσιολογία του αρθρικού χόνδρου.....</b>	<b>34</b>
<b>Κεφάλαιο 3: Μονοπάτι Wnt / β – κατενίνης.....</b>	<b>39</b>
<b>Κεφάλαιο 4: Επικουρικές θεραπείες για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μικροκαταγμάτων σε χόνδρινες βλάβες.....</b>	<b>49</b>



<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>65</b>
<b>Σκοπός της μελέτης.....</b>	<b>66</b>
<b>Υλικό – Μέθοδος.....</b>	<b>67</b>
<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>80</b>
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>93</b>
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>98</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>100</b>

## *Πίνακας Εικόνων*

• ΕΙΚΟΝΑ	
1.....	48
• ΕΙΚΟΝΑ	
2.....	50
• ΕΙΚΟΝΑ	
3.....	69
• ΕΙΚΟΝΑ	
4.....	69
• ΕΙΚΟΝΑ	
5.....	70
• ΕΙΚΟΝΑ	
6.....	70
• ΕΙΚΟΝΑ	
7.....	72
• ΕΙΚΟΝΑ	
8.....	81

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## **Κεφάλαιο 1 : Στοιχεία εμβρυολογίας του Μυοσκελετικού.**

### **1.1 ΓΕΝΙΚΑ**

Το μυοσκελετικό σύστημα αναπτύσσεται από το μέσο βλαστικό δέρμα του εμβρύου. Συγκεκριμένα προέρχεται από τον εμβρυϊκό συνδετικό ιστό ή μεσέγχυμα. Τα κύτταρα του μεσεγγύματος είναι πολυδύναμα, μπορούν να διαφοροποιηθούν προς διάφορες κυτταρικές σειρές και να σχηματίσουν ινοβλάστες, χονδροβλάστες ή οστεοβλάστες. [1]

Τα περισσότερα οστά πρωτοεμφανίζονται σαν συμπυκνώσεις μεσεγγυματικών κυττάρων, που σχηματίζουν χόνδρινα προπλάσματα. Αυτά οστεοποιούνται με ενδοχόνδρινη οστεογένεση. Κάποια οστά αναπτύσσονται από το μεσέγχυμα, χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων σταδίων, με ενδομεμβρανώδη οστεογένεση. Μεσεγγυματικές συμπυκνώσεις είναι εμφανείς σε έμβρυα, ηλικίας πέντε εβδομάδων. [1]

### **1.2 ΑΚΡΑ**

Τα άκρα σχηματίζονται σαν προσεκβολές, οι οποίες γίνονται ορατές στην αρχή της πέμπτης εβδομάδας της ανάπτυξης. Πρόκειται για προσεκβολές μεσεγγύματος, που δημιουργείται από το μεσόδερμα και καλύπτεται από ένα στρώμα εξωδέρματος, την Κορυφαία Εξωδερμική Ακρολοφία (ΚΕΑ). Αυτή

διαδραματίζει μια επαγωγική επήρεια στο υποκείμενο μεσέγγυμα. Το τμήμα της μεσεγγυματικής προσεκβολής, που πρόσκειται στην ΚΕΑ, θα διαφοροποιηθεί προς οστά και συνδέσμους, ενώ τα απομακρυσμένα από αυτήν, προς χόνδρο και μύες. Αρχικά, αναπτύσσεται το κεντρικό τμήμα του άκρου, ακολουθούμενο κατά σειρά από τα πιο περιφερικά, ώστε χέρια και πόδια αναπτύσσονται τελευταία. Το κάτω άκρο αναπτύσσεται περίπου δύο ημέρες αργότερα από το άνω άκρο. [2]

Από την έκτη εβδομάδα, είναι αναγνωρίσιμα τα χόνδρινα προπλάσματα των οστών και των άκρων. Οι πρωτογενείς πυρήνες οστέωσης παρουσιάζονται από την δωδέκατη εβδομάδα της ανάπτυξης στην μεσότητα της διάφυσης του μελλοντικού οστού. Η οστεοποίηση προχωρεί προς τα άκρα του οστού, τις επιφύσεις. Στις φάλαγγες μόνο ένα οστικό άκρο έχει επιφυσιακή πλάκα. Όταν οστεοποιηθούν οι επιφυσιακές πλάκες, ολοκληρώνεται η κατά μήκος ανάπτυξη. Κατά την έβδομη εβδομάδα, επέρχεται περιστροφή των άκρων. Το άνω άκρο περιστρέφεται προς τα έξω κατά ενενήντα μοίρες ( $90^\circ$ ), ενώ το κάτω άκρο προς τα έσω κατά ενενήντα μοίρες ( $90^\circ$ ). Στις δέκα έξι εβδομάδες, το περιφερικό τμήμα των εκβλαστήσεων των άκρων, θα σχηματίσει τις προσεκβολές του χεριού και του ποδιού. Μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης, επέρχεται ο σχηματισμός των δακτύλων σε χέρι και πόδι. [2]

Τα ιστολογικά στάδια στην ανάπτυξη των μακρών οστών και των επιφύσεων, μπορούν να συνοψισθούν ως εξής :

- 1) Σχηματισμός καταβολών των άκρων, συμμετρική κατατομή μεσεγγυματικών κυττάρων και σχηματισμός της κορυφαίας εξωδερμικής ακρολοφίας.

- 2) Σχηματισμός συμπύκνωσης μεσεγχυματικών κυττάρων.
- 3) Διαφοροποίηση προς χόνδρο. Αρχικά σχηματισμός ενδιάμεσης ζώνης.  
Εν συνεχεία υπερτροφία των χονδροκυττάρων στο μέσο των χόνδρινων μοντέλων των μακρών οστών.
- 4) Σχηματισμός των επιφύσεων. Ξεκινά με σχηματισμό ενδομεμβρανώδους περισστικού οστού στο μέσο της διάφυσης (πρωτογενής πυρήνας οστέωσης).
- 5) Απορρόφηση της ενδιάμεσης ζώνης της άρθρωσης και σχηματισμός λείας χόνδρινης αρθρικής επιφάνειας. Πυροδοτείται από τη διείσδυση αγγείων στην περιοχή των υπερτροφικών χονδροκυττάρων, συνεχίζεται με ενδοχόνδρινο οστικό σχηματισμό (στο μέσο της διάφυσης) και ολοκληρώνεται με το σχηματισμό του πρωτογενούς πυρήνα οστέωσης.
- 6) Σχηματισμός της περιφερικής περιχονδρικής αύλακας. Επιτυγχάνεται η μέγιστη εξάπλωση του ορίου επίφυσης-διάφυσης.
- 7) Αγγείωση του επιφυσιακού χόνδρου με σχηματισμό χόνδρινων καναλιών.
- 8) Κεντρική υπερτροφία των χονδροκυττάρων και σχηματισμός σφαιρικής μάζας. Σχηματισμός της αυξητικής πλάκας, που περιβάλλει τον δευτερογενή πυρήνα οστέωσης.
- 9) Είσοδος αγγείων στον αναπτυσσόμενο δευτερογενή πυρήνα οστέωσης.
- 10) Σχηματισμός οστού και μυελικής κοιλότητας στον δευτερογενή πυρήνα οστέωσης, σχηματισμός αιμοποιητικού μυελού.

- 11)Αύξηση του μεγέθους του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης.
- 12)Υπερτροφία των χονδροκυττάρων και αλλαγή του σχήματος της αυξητικής πλάκας του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης από σφαιρικό σε ημισφαιρικό.
- 13)Παρουσία λιποκυττάρων στον μυελό. Παρουσία αιμοποιητικού μυελού εγγύς της αυξητικής πλάκας του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης. Σχηματισμός επιφυσειακής πλάκας.
- 14)Πλήρης εξάπλωση του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης στον επιφυσειακό χόνδρο.
- 15)Λέπτυνση της αυξητικής πλάκας. Εμπλοκή του δευτερογενούς πυρήνα οστέωσης της αυξητικής πλάκας. Σχηματισμός υποχόνδριας πλάκας.
- 16)Απορρόφηση της αυξητικής πλάκας με σύνδεση επιφυσειακής και μεταφυσειακής κυκλοφορίας. Επασβέστωση της κατώτερης ζώνης του αρθρικού χόνδρου, μετατροπή του μυελού σε λιπώδη ιστό. [3]

### **1.3 Ο ΑΞΟΝΙΚΟΣ ΣΚΕΛΕΤΟΣ**

#### **1.3.1 ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΗ ΣΤΗΛΗ**

Η εμβρυϊκή δομή, που θα σχηματίσει τον μελλοντικό νωτιαίο μυελό, είναι ο νευρικός σωλήνας. Αμφοτερόπλευρα στην νωτιαία χορδή και τον νευρικό

σωλήνα, σχηματίζονται δύο στήλες μεσοδέρματος. Οι τμηματικοί σωμίτες αναπτύσσονται από αυτές τις μεσοδερματικές στήλες, αρχίζοντας περίπου στις είκοσι ημέρες της ανάπτυξης του εμβρύου. Κάθε σωμίτης αποτελείται από μεσεγχυματικά κύτταρα και διαφοροποιείται σε δύο δομές : το σκληροτόμιο και το δερμομυοτόμιο. Από τα κύτταρα του σκληροτομίου θα σχηματισθούν οι αρχέγονοι σπόνδυλοι και πλευρές. [2]

Η νωτιαία χορδή εκφυλίζεται στα νεοσχηματιζόμενα σπονδυλικά σώματα. Τα υπολείμματά της μεταξύ των σπονδύλων δημιουργούν το μαλακό παχύρρευστο πηκτοειδή πυρήνα του μεσοσπονδύλιου δίσκου, που θα περιβληθεί από τον ινώδη δακτύλιο. Κατά την έκτη εβδομάδα, οι μεσεγχυματικοί σπόνδυλοι αρχίζουν την διαφοροποίησή τους σε χόνδρινα αρχέγονα όργανα. Η οστεοποίηση ακολουθεί κατά την όγδοη εβδομάδα. Κατά την ενήβωση, εμφανίζονται δευτερεύοντες πυρήνες οστέωσης, οι οποίοι συνενώνονται με τον υπόλοιπο σπόνδυλο περίπου στην ηλικία των είκοσι πέντε. [2]

### 1.3.2 ΠΛΕΥΡΕΣ – ΣΤΕΡΝΟ

Οι πλευρές αναπτύσσονται από μικρές αποφύσεις των θωρακικών σπονδύλων, τις πλευρικές αποφύσεις. Δύο επιμήκεις μεσεγχυματικές ταινίες του στέρνου αναπτύσσονται στο θωρακικό τοίχωμα, γίνονται χόνδρινες, και προσκολλώνται στους πρώτους έξι πλευρικούς χόνδρους. Στο μέσο τους,



συμφύονται, σχηματίζοντας το στέρνο. Πυρήνες οστέωσης εμφανίζονται πριν από την γέννηση. [2]

## Κεφάλαιο 2: Σύσταση και φυσιολογία του αρθρικού χόνδρου

### 2-1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

Ο αρθρικός χόνδρος είναι μεσεγγυματικής προέλευσης ιστός και χαρακτηρίζεται από υψηλή διαφοροποίηση. Η σύστασή του είναι συμπαγής και ελαστική. Δεν έχει αιμοφόρα ή λεμφοφόρα αγγεία και νεύρα και εμφανίζει περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα. Ο αρθρικός χόνδρος υποδιαιρείται σε 4 στιβάδες:

α) την επιφανειακή ζώνη, που αποτελείται από επίπεδα και αποπλατυσμένα κύτταρα, διατεταγμένα παράλληλα,

β) τη μεταβατική ζώνη, που περιλαμβάνει κύτταρα με αραιή και άτακτη διάταξη

γ) την ακτινωτή ζώνη, που αποτελείται από κύτταρα μικρότερου μεγέθους και είναι στοιβαγμένα σε κάθετες στήλες,

δ) την αποπιτανωμένη ζώνη, με πυκνωτικά κύτταρα, που αποτελεί τη ζώνη σύνδεσης χόνδρου και υποχόνδριου οστού.

Βασικά συστατικά του είναι τα χονδροκύτταρα και η θεμέλια ουσία. [1]

#### 2-1-1 Χονδροκύτταρα

Τα χονδροκύτταρα εντοπίζονται σε κοιλότητες εντός της θεμέλιας ουσίας. Μορφολογικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία προσεκβολών και κολπωμάτων, που συνεισφέρουν στην αύξηση της συνολικής επιφάνειάς τους

και διευκολύνουν την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών με τον εξωκυττάριο χώρο. Βασικός ρόλος των χονδροκυττάρων είναι η σύνθεση κι έκκριση της θεμέλιας ουσίας. [4]

## 2-1-2 Θεμέλια ουσία

Κύρια συστατικά της θεμέλιας ουσίας είναι το νερό κατά το 80% του υγρού βάρους του χόνδρου και μακρομόρια όπως το κολλαγόνο, οι πρωτεογλυκάνες, το υαλουρονικό οξύ και οι γλυκοπρωτεΐνες. Οι πρωτεογλυκάνες και τα μόρια νερού που συγκρατούν, ευθύνονται για την ελαστικότητα του χόνδρου, ενώ οι ίνες κολλαγόνου για την αντοχή του αρθρικού χόνδρου σε δυνάμεις εφελκυσμού. [4]

Οι πρωτεογλυκάνες προσδίδουν στον αρθρικό χόνδρο αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης, ενώ αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό κέντρο στο οποίο προσφύονται αλυσίδες πολυσακχαριτών (γλυκοζαμινογλυκάνες). Η κύρια πρωτεΐνη του αρθρικού χόνδρου είναι η αγγρεκάνη, η οποία αποτελείται από ένα κέντρο υαλουρονικού οξέος με πολυάριθμες πλάγιες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών. [5]

Κύριος τύπος κολλαγόνου στον αρθρικό χόνδρο είναι το κολλαγόνο τύπου II, το οποίο του προσδίδει τις σημαντικότερες μηχανικές ιδιότητες και σχηματίζει ικρίωμα για τη συγκράτηση των πρωτεογλυκανών. Άλλος τύπος κολλαγόνου είναι το τύπου VI που παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση των χονδροκυττάρων με την θεμέλια ουσία, το τύπου IX το οποίο καθορίζει τις

αλληλεπιδράσεις των ινιδίων κολλαγόνου με τα υπόλοιπα μακρομόρια και το τύπου X που είναι υπεύθυνο για την επιμετάλλωση του αρθρικού χόνδρου. Παρόλα αυτά το 90% του συνόλου του κολλαγόνου στον αρθρικό χόνδρο είναι το τύπου II. [6]

Επιπλέον, ο αρθρικός χόνδρος περιέχει μη κολλαγόνες πρωτεΐνες οι οποίες μαζί με τις γλυκοπρωτεΐνες αποτελούν το 15-20% του ξηρού βάρους του και βοηθούν στην οργάνωση και διατήρηση της μακρομοριακής κατασκευής της μεσοκυττάριας ουσίας. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν την ινωδονεκτίνη, την ολιγομερή πρωτεΐνη του χόνδρου, την θρομβοσπονδίνη, την τενασκίνη, την αγκυρίνη, την ντεκορίνη την διγλυκάνη και την χονδροκαλσίνη, οι οποίες συμβάλλουν στην πρόσφυση των χονδροκυττάρων στη θεμέλια ουσία. [5]

## **2-2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ**

Κύριος μεταβολικός ρόλος του αρθρικού χόνδρου είναι η σύνθεση και αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Ρυθμιστές είναι τα χονδροκύτταρα, των οποίων η συνολική δραστηριότητα είναι αρκετά περιορισμένη. Η μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων και των προϊόντων του μεταβολισμού προς τον αρθρικό χόνδρο και από αυτόν επιτυγχάνεται μέσω του αρθρικού υγρού. Η μετακίνηση ουσιών μικρού μοριακού βάρους, όπως η γλυκόζη, γίνεται με διάχυση, ενώ η μετακίνηση ουσιών μεγαλύτερου μοριακού βάρους διευκολύνεται μέσω των μηχανικών φορτίων που εξασκούνται σε κάθε

φόρτιση και αποφόρτιση, που υφίσταται η άρθρωση. Η παροχή οξυγόνου στον αρθρικό χόνδρο των ενηλίκων είναι τόσο περιορισμένη που στην ουσία τα χονδροκύτταρα ζουν σε συνθήκες μεγάλης υποξίας [7] .

### **2-3. ΣΧΕΣΗ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΜΕ ΑΛΛΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ**

#### **2-3-1. Αρθρικός υμένας**

Ο αρθρικός υμένας αποτελείται από αγγειοβριθή συνδετικό ιστό και καλύπτει την άρθρωση σχηματίζοντας ένα περίβλημα. Δύο βασικά είδη κυττάρων εντοπίζονται στον αρθρικό υμένα, τα κύτταρα τύπου Α και Β. Τα κύτταρα τύπου Α είναι μακροφάγα, παράγουν κυτοκίνες και έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Τα κύτταρα τύπου Β προέρχονται από ινοβλάστες και παράγουν προσταγλανδίνες, υαλουρονικό οξύ, πρωτεάσες, κολλαγενάσες και άλλα ένζυμα. Ο αρθρικός υμένας παράγει το αρθρικό υγρό, το οποίο αποτελεί υπερδιήθημα του αίματος. [8]

#### **2-3-2. Υποχόνδριο οστό**

Το υποχόνδριο οστό προσφέρει στον εύκαμπτο αρθρικό χόνδρο, ένα σκληρό υπόστρωμα για την υποστήριξη και διατήρηση της συνέχειάς του. Περιέχει τελικούς κλάδους αρτηριδίων, τριχοειδή και φλεβίδια, που σχηματίζουν το υποχόνδριο φλεβικό πλέγμα. Λόγω της διαφορετικής τους

σκληρότητας, στη διεπιφάνεια μεταξύ του αρθρικού χόνδρου και του υποχόνδριου οστού, αναπτύσσονται δυνάμεις διάτμησης σε κάθε φόρτιση. Ο ρόλος της αποπιτανωμένης στιβάδας του αρθρικού χόνδρου, η οποία παρουσιάζει κυματοειδή μορφή, είναι η παροχή μιας μεταβατικής ζώνης που να μετριάζει τις δυνάμεις αυτές. Έχει διαπιστωθεί πειραματικά, ότι οι οστεοβλάστες του υποχόνδριου οστού προκαλούν ελάττωση της παραγωγής πρωτεογλυκανών και αυξάνουν την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών στον αρθρικό χόνδρο [9] . Η αλληλεπίδραση χόνδρου – οστού στο επίπεδο αυτό μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών HIF-2a, OPG/RANK/RANKL, TGF-β και Wnt / β – κατενίνης παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιόσταση των γειτονικών ιστών και την ανάπτυξη οστεοαρθρίτιδας [10] .

### 2-3-3. Αρθρικό υγρό

Εκτός από το ρόλο του αρθρικού υγρού στη λίπανση των αρθρικών επιφανειών, εξυπηρετεί τη θρέψη των χονδροκυττάρων, μέσω διάχυσης των θρεπτικών ουσιών στη θεμέλια ουσία. [6]

## **Κεφάλαιο 3: Μονοπάτι Wnt / β - κατενίνης**

### **3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών συνδέεται σε σημαντικό βαθμό με την ικανότητα καθενός κυττάρου να λαμβάνει πληροφορίες για την κατάσταση των άμεσα γειτνιαζόντων κυττάρων με αυτό. Αυτού του τύπου η αλληλεπίδραση συμβαίνει στους ιστούς με την μορφή της δημιουργίας σημάτων στις συνδέσεις μεταξύ κυττάρων και, στη συνέχεια, της μεταφοράς του σήματος στον πυρήνα μέσω ειδικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Η μεταφορά του σήματος στον πυρήνα έχει, τελικά, σαν συνέπεια, την τροποποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. [11]

### **3.2 Wnt ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

#### **3.2.1 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ**

Η συνειδητοποίηση ότι το γονίδιο wingless (Wg) της *Drosophila* και το ογκογονίδιο int - 1 των σπονδυλωτών αποτελούν ορθόλογα, έθεσε τη βάση για την ανακάλυψη του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (Rijeswijk et al 1987). Η ανακάλυψη ότι η έκτοπη έκφραση του γονιδίου int - 1 σε έμβρυα *Xenopus*, επιφέρει αξονικό διπλασιασμό και γέννηση δικάφαλων βατράχων, εγκαθίδρυσε, περαιτέρω, το ρόλο των Wnt πρωτεϊνών, ως σημαντικών

ρυθμιστών στην εμβρυογένεση και την ογκογένεση (Mc Mahon and Moon 1989). Ο σύνδεσμος ανάμεσα σε Wnt πρωτεΐνες και β - κατενίνη ανακαλύφθηκε το 1990, όταν σε μία μελέτη σε *Drosophila* φάνηκε πως το γονίδιο Wnt / Wg έπαιζε ρυθμιστικό ρόλο στη μετα - μεταφραστική ρύθμιση του γονιδίου Armadillo της *Drosophila*. Το ομόλογο του Armadillo για τα σπονδυλωτά είναι η β - κατενίνη (Riggelman et al, 1990). Από τότε, έχουν αναγνωρισθεί δέκα εννέα ισομορφές των Wnt στον άνθρωπο. [12]

### 3.2.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Η οικογένεια πρωτεϊνών Wnt, που είναι εκκρινόμενες πλούσιες σε κυστεΐνη γλυκοπρωτεΐνες, έχει διατηρηθεί εξελικτικά στα μετόζωα. Ο ρόλος τους είναι να παρέχουν στα κύτταρα πληροφορίες θέσης στο χώρο και να πυροδοτούν κυτταρικές αποκρίσεις σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση στην οποία εμφανίζονται. Σε γενικές γραμμές, οι Wnt πρωτεΐνες εκκρίνονται από συγκεκριμένα κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο, στη συνέχεια προσλαμβάνονται από άλλα, εκτελώντας αντίστοιχες λειτουργίες. Σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι υφίστανται μετα - μεταφραστική τροποποίηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή έγκειται σε σύνδεση των Wnt πρωτεϊνών με λιπίδια, γεγονός σημαντικό για την έκκρισή τους, αλλά και τη σηματοδοτική τους δράση. [12, 13]

### 3.2.3 WNT ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ



Σηματοδότηση μέσω των πρωτεϊνών Wnt ανιχνεύεται στο αναπτυσσόμενο κρανίο και το περιχόνδριο, όπου οι οστεοβλάστες διαφοροποιούνται μέσω ενδομεμβρανώδους ή ενδοχονδρικής οστεοποίησης αντίστοιχα. Η ενίσχυση της σηματοδότησης μέσω Wnt βελτιώνει τον οστικό σχηματισμό και την έκφραση του Runx-2, αλλά αναστέλλει τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και την έκφραση του Sox-9. Αντίθετα κατάργηση του γονιδίου της β-κατενίνης σε πρόδρομα κύτταρα του σκελετού οδήγησε σε έκτοπη διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα αντί για οστεοβλάστες, τόσο στην ενδομεμβρανώδη όσο και στην ενδοχόνδρινη οστεογένεση. [14]

Φαίνεται έτσι πως τα πρόδρομα μεσεγχευματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν προς δύο σειρές. Κατά την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση η σηματοδότηση μέσω Wnt ενισχύεται και ευνοείται η διαφοροποίηση προς οστεοβλάστες. Κατά την ενδοχονδρική οστεοποίηση η σηματοδότηση μέσω Wnt διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να διαφοροποιούνται μόνο τα χονδροκύτταρα. Σε δεύτερο στάδιο ενισχύεται εκ νέου σηματοδότηση μέσω Wnt στην περιφέρεια του χόνδρου κι ευνοείται η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. [14]

### **3.3 Β - ΚΑΤΕΝΙΝΗ**

Βασικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, που παίζουν ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία, είναι οι καντερίνες και οι νεκτίνες. Το ενδοκυττάριο τμήμα των καντερινών μπορεί να συνδέεται με ειδικά μόρια, τις κατενίνες, σηματοδοτώντας την αφετηρία για τη μεταφορά του σήματος στον πυρήνα.[15]

Με μόνη εξαίρεση την α - κατενίνη, όλες οι κατενίνες περιέχουν μια κεντρική περιοχή «Armadillo», που μπορεί να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι καρβοξυτελικές και αμινοτελικές περιοχές των κατενινών εμφανίζουν σημαντικές ιδιότητες, όπως, η ενεργοποίηση γονιδίων σε απόκριση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, που προκαλεί το καρβοξυτελικό τμήμα της β - κατενίνης. [16]

Σε ένα κύτταρο, η β - κατενίνη εντοπίζεται σε διαμεμβρανικές, κυτταροπλασματικές ή πυρηνικές δεξαμενές. Οι δύο πρώτες εντοπίσεις καθορίζουν το φυσιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ομοίωση, σχετιζόμενες με την E - καντερίνη και την κυτταρική προσκόλληση. Το πυρηνικό κλάσμα σχετίζεται, κυρίως, με την ογκογένεση. [16]

### **3.4 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ**

Η κεντρική λογική του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt / β - κατενίνης έχει ως εξής : σε απουσία των πρωτεϊνών Wnt, η κυτταροπλασματική β - κατενίνη δεσμεύεται μέσω της δράσης του συμπλέγματος της ακτίνης (Axin), με τη συμμετοχή της GSK3-β. Στη συνέχεια, οδηγείται σε σταδιακή αποσύνθεση από το πρωτεάσωμα. Αυτός ο συνεχής αποκλεισμός της β - κατενίνης την εμποδίζει από το να φτάσει στον πυρήνα και, κατά συνέπεια, τα γονίδια στόχοι της μπλοκάρουν από τους παράγοντες TCF / LEF. [17]

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού επιτυγχάνεται όταν οι Wnt πρωτεΐνες συνδεθούν στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς τους, τις πρωτεΐνες Frizzled (Fz) και τους συνυποδοχείς τους LRP 6 και 5 (low – density lipoprotein receptor related protein). Το σχηματιζόμενο τριμερές με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης Dishevelled (Dvl) καταλήγει στη φωσφορυλίωση του LRP, την απενεργοποίηση του συμπλέγματος της Ακτίνης και τη σταθεροποίηση και συσσώρευση β - κατενίνης. Αυτή, τελικά, φθάνει στον πυρήνα, σχηματίζει σύμπλοκα με τους παράγοντες TCF / LEF κι ενεργοποιεί γονίδια στόχους. [17] (Εικόνα 1)

### **3.5 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΤΑ ΟΣΤΑ**

**β - Κατενίνη :** Ενδοκυττάριο μόριο που παίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση μέσω της αλληλεπίδρασής της με την E - καντερίνη και την α - κατενίνη. Η σταθεροποίηση και συσσώρευσή της στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην είσοδό της στον πυρήνα και το σχηματισμό ετεροδιμερών με τους παράγοντες LEF / TCF, ώστε να ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων στόχων. Στους ώριμους οστεοβλάστες, η ενεργοποίησή της οδηγεί σε φαινότυπο αυξημένης οστικής μάζας. [17,18,19]

**Wnt Πρωτεΐνες :** Η Wnt 7b εκφράζεται στους οστεοβλάστες και τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση των

οστεοβλαστών. Οι οστεοβλάστες, τα χονδροκύτταρα, τα μυοκύτταρα και τα λιποκύτταρα προέρχονται από το ίδιο προγονικό κύτταρο. Οι Wnt 1 και Wnt 10b καταστέλλουν τη λιπογένεση στα προλιποκύτταρα. Ειδικά, η Wnt 10b φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή σχηματισμού οστεοβλαστών αντί λιποκυττάρων. [17,18,19]

**LEF / TCF** : Οι παράγοντες LEF (Lymphoid Enhancer- binding Factor) και TCF (T-cell Factor) ,που συμμετέχουν στο κανονικό μονοπάτι Wnt σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι Tcf 1 και Tcf 4 εκφράζονται σε καλλιέργειες πρόδρομων οστεοβλαστών. [17,18,19]

**Lrp 5** : Έχουν την υψηλότερη ομολογία ακολουθιών με την πρωτεΐνη Arrow της *Drosophila*, που δρα σαν συνυποδοχέας για την «wingless» το ομόλογο της *Drosophila* για τις Wnt πρωτεΐνες. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου Lrp 5 σε ανθρώπους οδηγούν σε φαινότυπο αυξημένης οστικής μάζας. Με *in situ* υβριδισμό έχει εντοπισθεί η παρουσία του Lrp 5 σε οστεοβλαστικές σειρές κυττάρων. [17,18,19]

**Lrp 6**: Σε αντίθεση με τον Lrp 5, δεν υπάρχουν γνωστές ασθένειες ή σύνδρομα που να αποδίδονται σε μετάλλαξή του. (Αδρανοποιητική μετάλλαξη του Lrp 5 οδηγεί στο σύνδρομο οστεοπόρωσης – ψευδογλοιώματος). Ποντίκια με γονότυπο Lrp 6<sup>-/-</sup> πεθαίνουν στη γέννηση. Παρόλα αυτά, κατά την

εμβρυογένεση ο φαινότυπός τους μιμείται έναν συνδυασμό διαφόρων αδρανοποιητικών μεταλλάξεων πρωτεϊνών Wnt, όπως Wnt 1<sup>-/-</sup>, Wnt 3α<sup>-/-</sup>, Wnt 7α<sup>-/-</sup>. [17, 18, 19]

Οι υποδοχείς Lrp 5 / 6 ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων LDLR, που είναι πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, ικανές να προσλαμβάνουν συνδέτες και τους εισάγουν στο κύτταρο μέσω διαμεσολαβούμενης από υποδοχείς ενδοκύττωσης. Σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας δεν περιέχουν ακολουθία ενδοκύττωσης, έχει όμως αποδειχθεί ότι συνδέονται με τις Wnt πρωτεΐνες. Ο Lrp 5 αποτελείται από 1615 αμινοξέα και ο Lrp 6 1613, ενώ εμφανίζουν ομολογία μεταξύ τους κατά 71 %. Η κρυσταλλική ανάλυση της δομής τους έχει δείξει την παρουσία δύο ειδών ακολουθιών στο εξωκυττάριο τμήμα τους: μία που συνδέεται με τις Wnt πρωτεΐνες και τη σκληροστίνη και μία που συνδέεται με τον παράγοντα Dkk1. Όπως προαναφέρθηκε, έλλειψη του Lrp 6 σε ποντίκια οδηγεί σε θάνατο κατά τη γέννηση, ενώ αυτά με έλλειψη του Lrp 5 είναι βιώσιμα, χωρίς όμως να σημειώνεται διαφοροποίηση σχετικά με την ικανότητά τους να συνδέονται με τις Wnt πρωτεΐνες. [19]

**Dkks** : Πρωτοεντοπίστηκαν στον *Xenopus* ως παράγοντες αναγκαίοι και ικανοί για την επαγωγή του σχηματισμού της κεφαλής. Οι Dkk1 και Dkk4 αναστέλλουν το μονοπάτι Wnt, ο Dkk2 συμπεριφέρεται τόσο σαν αγωνιστής όσο και ανταγωνιστής, ενώ ο Dkk3 δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στο μονοπάτι Wnt. Ειδικά, ο Dkk1 είναι εξωκυττάριος ανταγωνιστής των πρωτεϊνών Wnt. [17,18]

**Sfrps** : Οι Sfrps (secreted frizzled related proteins) είναι μία άλλη τάξη ανταγωνιστών των Wnt πρωτεϊνών. Ο Sfrp1 εκφράζεται εκτεταμένα κατά τη μετάβαση από προοστεοβλάστες σε οστεοβλάστες. Φαίνεται πως ο Sfrp1 επιδρά ως αρνητικός ρυθμιστής στην οστεογένεση και τη χονδρογένεση. [17, 18]

**GSK3-β** : Είναι μια ενδοκυττάρια κινάση σερίνης- θρεονίνης που εντοπίζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή πολυάριθμων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών αποκρίσεων στις Wnt πρωτεΐνες και σχετίζεται με ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, από τη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου, ως τον κυτταρικό κύκλο. Δεδομένου ότι η αυξημένη δραστηριότητά της έχει συσχετισθεί με την παθογένεση ασθενειών όπως η διπολική νόσος, η νόσος Alzheimer's και ο μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αναστολείς της, με κυριότερους το λίθιο και την 6- βρωμο-ινδιρουβιν-3 οξίμη. [19]

Στα οστά είναι απαραίτητη για τη δράση του συμπλέγματος της ακτίνης, που οδηγεί τελικά στην αποσύνθεση της β - κατενίνης από το πρωτεάσωμα. Γνωστός αναστολέας της GSK3-β είναι το λίθιο, η χορήγηση του οποίου σε Lrp 5<sup>-/-</sup> ποντίκια καθίσταται ικανή να αποτρέψει την οστεοπενία. [17,18]

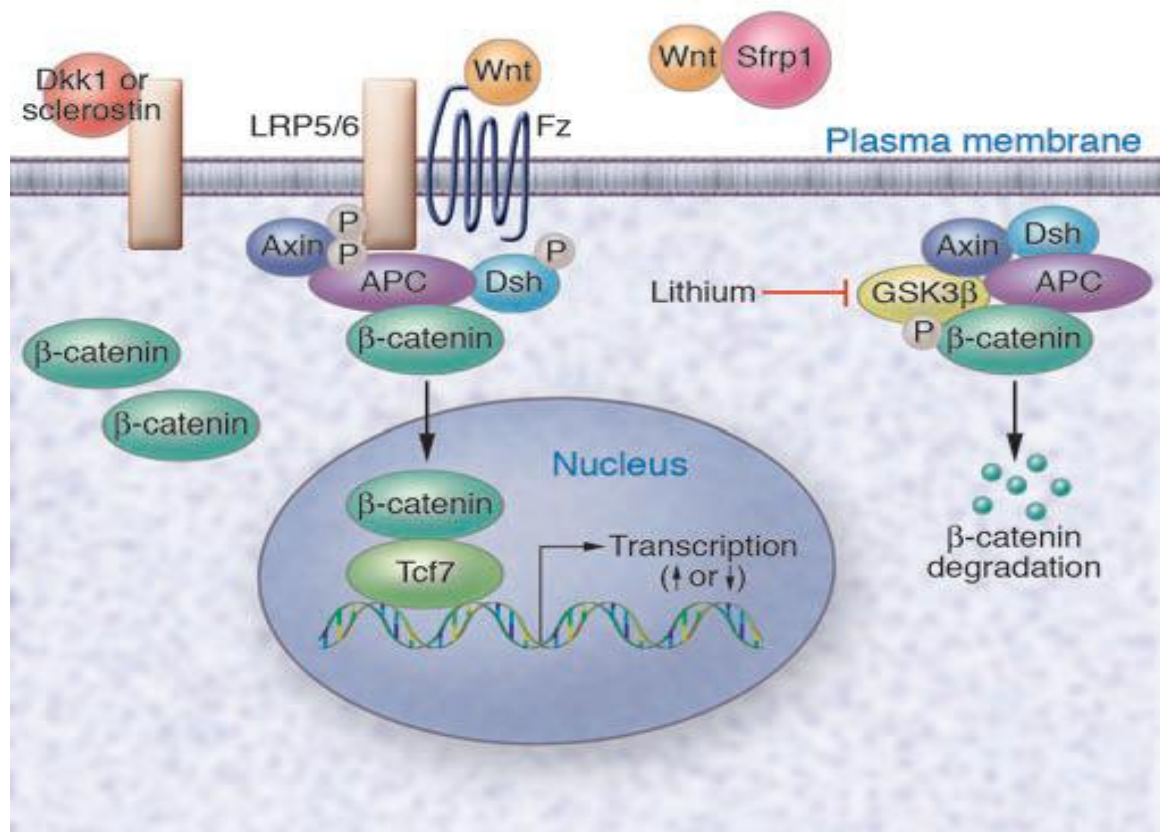
**Axin** : Ποντίκια με γονότυπο Axin 2<sup>-/-</sup> εμφανίζουν δυσμορφίες παρόμοιες με την κρανιοσυνόστωση, συμπεριλαμβανομένης της πρόωρης σύγκλεισης

των ραφών του κρανίου. Απώλεια δράσης της Axin - 2 βελτιώνει τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όσο και τη διαφοροποίηση, in vivo και in vitro.

[17,18]

**SOST** : Η σκληροστέωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια, που μοιάζει αρκετά με τις ασθένειες υψηλής οστικής μάζας και προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο SOST, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σκληροστίνη. Αυτή συνδέεται στους υποδοχείς Lrp 5 / 6 και αποτρέπει την αλληλεπίδραση Lrp – Frizzled, με τελικό αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση του σχηματισμού οστού. Κατά συνέπεια, αντίστοιχα η αδρανοποιητική μετάλλαξη του SOST, οδηγεί στην επαγωγή του οστικού σχηματισμού.

[17,18]



Εικόνα 1: Επισκόπηση του μονοπατιού wnt/β-catenin. Η σύνδεση της κατάλληλης Wnt με το σύμπλεγμα Fz - LRP-5/6 ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη Dishevelled. Αυτή αναστέλλει το ενδοκυττάριο ένζυμο GSK - 3β, που δεσμεύει τη β - κατενίνη και όταν είναι ενεργό, την οδηγεί σε αποσύνθεση. Έτσι η β - κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και αφού μεταφερθεί στον πυρήνα αλληλεπιδρά με τους παράγοντες TCF/LEF κι ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Αντίθετα, παρουσία των ανταγωνιστών των LRP- 5/6 που είναι ο Dkk-1 και η πρωτεΐνη σκληροστίνη η β - κατενίνη οδηγείται σε διάσπαση. Τροποποιημένο από Sundeep Khosla, Jennifer J. Westendorf, and Merry Jo Oursler (2008)



## **Κεφάλαιο 4 : Επικουρικές θεραπείες για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μικροκαταγμάτων στην αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών.**

### **4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο αρθρικός χόνδρος έχει πτωχή ικανότητα επούλωσης. [20] Οι χόνδρινες βλάβες μερικού πάχους εμφανίζουν χαμηλή ικανότητα επούλωσης, ενώ οι ολικού πάχους που διαπερνούν την αποτιτανωμένη ζώνη αναπτύσσουν ινοχόνδρινο ιστό. Φαίνεται πως η αλληλεπίδραση μεταξύ χόνδρου κι υποχόνδριου οστού που προκύπτει με τη διάτρηση της αποτιτανωμένης ζώνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επούλωση των χόνδρινων βλαβών. [21, 22] Η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη τεχνικών ενεργοποίησης του μυελού των οστών, όπως οι τρυπανισμοί και τα μικροκατάγματα στο υποχόνδριο οστό. Οι τεχνικές αυτές αντιμετωπίζουν χόνδρινες βλάβες ολικού πάχους και επιφάνειας έως 4 cm<sup>2</sup> με σύντομο, εύκολο και όχι δαπανηρό τρόπο. Εντούτοις το τελικό αποτέλεσμα είναι σχηματισμός ινοχόνδρινου ιστού, που σε σύγκριση με τον υαλώδη χόνδρο, διαθέτει κατώτερες εμβιομηχανικές ιδιότητες. [23 ,24] Διάφορα ιστολογικά συστήματα βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επούλωσης των χόνδρινων βλαβών. Αρκετά συχνά εφαρμόζονται τα κριτήρια αναγέννησης για χόνδρινες βλάβες, όπως αυτά έχουν καθορισθεί από τη διεθνή εταιρία επούλωσης του αρθρικού χόνδρου. (ICRS) (Εικόνα 2)

	<b>Feature</b>	<b>Score</b>
	Surface	
I	Smooth/continuous	3
	Discontinuities/irregularities	0
	Matrix	
II	Hyaline	3
	Mixture: hyaline/fibrocartilage	2
	Fibrocartilage	1
	Fibrous tissue	0
	Cell distribution	
III	Columnar	3
	Mixed columnar/clusters	2
	Clusters	1
	Individual cells/ disorganized	0
	Cell viability	
IV	Predominantly viable	3
	Partially viable	1
	<10% viable	0
	Subchondral bone	
V	Normal	3
	Increased remodeling	2
	Bone necrosis/granulation tissue	1
	Detached/callus/fracture	0
	Calcified cartilage	
VI	Normal	3
	Abnormal/ inappropriate location	0

**Εικόνα 2 : Ιστολογικό σύστημα βαθμονόμησης για επιδιόρθωση χόνδρινων βλαβών ICRS.**

Στα πλαίσια των τεχνικών ενεργοποίησης του μυελού των οστών, η διάτρηση του υποχόνδριου οστού επιτρέπει σε αίμα και κύτταρα προερχόμενα

από το μυελό να πληρώνουν την περιοχή της βλάβης και τελικά σχηματίζεται θρόμβος. Εν συνεχεία ενεργοποιείται ο καταρράκτης της επούλωσης με το συνδυασμό της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης και της κυτταρικής χημειοτακτικότητας. Τελικό προϊόν είναι ο σχηματισμός αγγειούμενου κοκκιωματώδους ιστού και ο πολλαπλασιασμός πολυδύναμων πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων, με τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται προς διάφορες κυτταρικές σειρές. [25] Τις πρώτες μέρες μετά τις διατρήσεις στο υποχόνδριο οστό σχηματίζονται ινώδεις αψίδες σε όλο το πλάτος της επιφάνειας της βλάβης. Σχηματίζεται έτσι ένα ικρίωμα που καθοδηγεί την ανάπτυξη κυττάρων και τον προσανατολισμό τους κατά τον επιμήκη άξονα. Στη συνέχεια τα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα σταδιακά διαφοροποιούνται προς ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και χονδροκύτταρα. Τελικά στις βαθύτερες ζώνες σχηματίζεται νέο οστό και στις επιφανειακές ινοχόνδρος. [26,27,28]

Η αποτελεσματικότητα της αντιμετώπισης χόνδρινων βλαβών με μικροκατάγματα σε κλινικό επίπεδο αναδείχθηκε σε πρόσφατη μελέτη, σύμφωνα με την οποία όλες οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν από τους ασθενείς είχαν στατιστικά σημαντική βελτίωση έως και τα 5.7 έτη παρακολούθησης. [29] Παρόλα αυτά ο ινοχόνδρος είναι μηχανικά πιο αδύναμος από τον υαλώδη χόνδρο κι εμφανίζει τάση να εκφυλίζεται ευκολότερα. [30, 31] Η επίτευξη σχηματισμού υαλώδους χόνδρου χωρίς ινώδη στοιχεία στην αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών συγκεντρώνει την προσοχή και τις προσπάθειες της έρευνας.

## 4.2 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Οι μελέτες που αποσκοπούν στην ανάπτυξη θεραπειών συμπληρωματικών προς τα μικροκατάγματα έχουν τρεις βασικές στοχεύσεις : α) τη βελτιστοποίηση του περιβάλλοντος του σχηματιζόμενου θρόμβου ώστε να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μεμβρανών κι ικριωμάτων που καλύπτουν το θρόμβο και προστατεύουν τα εσωκλειόμενα κύτταρα, β) την αξιοποίηση της δράσης φαρμακολογικών παραγόντων που είτε έχουν χονδροπροστατευτικές ιδιότητες, είτε επάγουν τη χονδρογένεση, γ) τη βιολογική βελτίωση του θρόμβου με την προσθήκη αυξητικών παραγόντων, που επιφέρουν αναβάθμιση στην ποιότητα και την ποσότητα του νεοσχηματιζόμενου ιστού. Επιπροσθέτως ο συνδυασμός περισσότερων από μιας εκ των ανωτέρω στρατηγικών σε ένα στάδιο οδηγεί σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

### I. Ικριώματα και μεμβράνες

Σε ένα πειραματικό ζωικό πρότυπο προκλήθηκαν χόνδρινες βλάβες ολικού πάχους στον αριστερό έσω μηριαίο κόνδυλο προβάτων. Η αντιμετώπιση έγινε με μικροκατάγματα μόνο στην ομάδα ελέγχου και με συνδυασμό μικροκαταγμάτων με χρήση ικριώματος πολυγλυκολικού οξέος (PGA) για κάλυψη του θρόμβου στην πειραματική ομάδα. Η ιστολογική εξέταση έδειξε

στατιστικά σημαντικά καλύτερη επούλωση της βλάβης στην πειραματική ομάδα. [32]

Σε ένα άλλο αντίστοιχο πειραματικό πρότυπο πρόκλησης χόνδρινων βλαβών στον έσω μηριαίο κόνδυλο προβάτων, η ομάδα ελέγχου αντιμετωπίστηκε μόνο με μικροκατάγματα ενώ στην πειραματική ομάδα, επιπλέον των μικροκαταγμάτων η βλάβη καλύφθηκε από μεμβράνη chitosan glycerol. Στην πειραματική ομάδα τα ευρήματα ανέδειξαν περισσότερα κύτταρα και περισσότερο κολλαγόνο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. [33]

## II. Φαρμακολογικοί παράγοντες

### IIα. Μικροκατάγματα και ενδοαρθρική έγχυση Υαλουρονικού οξέος

Σε πειραματικό ζωικό πρότυπο πρόκλησης χόνδρινων βλαβών στον έσω μηριαίο κόνδυλο κόνιων σχηματίστηκαν τρεις ομάδες: α) εφαρμογή μικροκαταγμάτων και 3 εβδομαδιαίες εγχύσεις υαλουρονικού, β) εφαρμογή μικροκαταγμάτων και 5 εβδομαδιαίες εγχύσεις υαλουρονικού, γ) εφαρμογή μικροκαταγμάτων και ενδοαρθρική έγχυση φυσιολογικού ορού. Η ανάλυση με βάση την ιστολογική κλίμακα ICRS ανέδειξε υπεροχή της πρώτης ομάδας. [34] Αντίθετα, σε αντίστοιχο μοντέλο δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που θεραπεύτηκε με μικροκατάγματα μόνο και της ομάδας που έλαβε επιπλέον των μικροκαταγμάτων ενδοαρθρική έγχυση υαλουρονικού 15 mg/ml τρεις φορές εβδομαδιαία. [35]

## IIβ. Μικροκατάγματα και ενδοαρθρική έγχυση Καρτογενίνης (KGN)

Η Καρτογενίνη είναι μικρομοριακή ένωση που στρέφει τα ανθρώπινα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού προς χονδροκύτταρα διαμεσολαβώντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι CBFβ- RUNX 1. [36] Σε μελέτη όπου προκλήθηκε χόνδρινη βλάβη στη δεξιά τροχιλία κονίκλων σχηματίστηκαν δύο ομάδες : α) εφαρμογή μικροκαταγμάτων κι εβδομαδιαία ενδοαρθρική έγχυση καρτογενίνης και β) εφαρμογή μικροκαταγμάτων κι ενδοαρθρική έγχυση εικονικού φαρμάκου. Η πειραματική ομάδα παρουσίασε στατιστικά σημαντική υπεροχή μακροσκοπικά και ιστολογικά με βάση την τροποποιημένη κλίμακα O'Driscoll. [37]

## IIγ. Μικροκατάγματα και υποδόρια έγχυση ανασυνδυασμένης 1-34 Παραθορμόνης σε διαλείπουσα χορήγηση

Σε πειραματικό ζωικό πρότυπο επούλωσης χόνδρινων βλαβών που εφαρμόστηκε σε κονίκλους σχηματίστηκαν τρεις ομάδες: μικροκατάγματα μόνο, μικροκατάγματα και 10mg/kg 1-34 Παραθορμόνης σε διαλείπουσα χορήγηση για 7 μέρες, μικροκατάγματα και 10mg/kg 1-34 Παραθορμόνης σε διαλείπουσα χορήγηση για 28 μέρες. Η παραθορμόνη χορηγήθηκε υποδορίως και σε δόση άπαξ ημερησίως. Η ιστολογική ανάλυση ανέδειξε πως η χορήγηση παραθορμόνης ανέστειλε την ανάπτυξη αρθρικού χόνδρου. [38]

### III. Αυξητικοί παράγοντες και βιολογικοί παράγοντες

#### IIIα. Μικροκατάγματα και μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από λιπώδη ιστό

Σε κονίκλους εργαστηρίου προκλήθηκαν πειραματικά χόνδρινες βλάβες στον έσω μηριαίο κόνδυλο και σχηματίστηκαν τρεις ομάδες: α) καμία θεραπευτική παρέμβαση, β) εφαρμογή μικροκαταγμάτων γ) μικροκατάγματα κι ενδοαρθρική χορήγηση μεσεγχυματικών κυττάρων από λιπώδη ιστό. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ιστολογικά ευρήματα ανάμεσα στις ομάδες β και γ. [39]

#### IIIβ. Μικροκατάγματα και εναιώρημα αυτόλογου φυγοκεντρημένου πλάσματος

Σε πειραματικό ζωικό πρότυπο προκλήθηκαν χόνδρινες βλάβες στον έσω μηριαίο κόνδυλο προβάτων και σχηματίστηκαν δυο ομάδες: η πειραματική ομάδα έλαβε 5 εβδομαδιαίες ενδοαρθρικές εγχύσεις αυτόλογου πλάσματος, ενώ η ομάδα ελέγχου τίποτα. Τα ιστολογικά και μακροσκοπικά αποτελέσματα της ομάδας ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικά υπέρτερα. [40]

#### IIIγ. Μικροκατάγματα και ενδοαρθρική έγχυση ανασυνδυσμένου IGF-1

Σε πειραματικό ζωικό πρότυπο χόνδρινης βλάβης στο μηριαίο κόνδυλο κονίκλων συγκρίθηκε η ενδοαρθρική έγχυση ανασυνδυσμένου IGF-1 0,1 ml

τρεις φορές την εβδομάδα για 4 εβδομάδες κατόπιν μικροκαταγμάτων, με μικροκατάγματα μόνο. Τα ιστολογικά αποτελέσματα ήταν σημαντικά ανώτερα στην ομάδα του ανασυνδυασμένου IGF-1. [41]

#### IIIδ. Μικροκατάγματα και ενδαρθρική έγχυση ανασυνδυασμένου FGF-18

Σε μελέτη πρόκλησης χόνδρινων βλαβών στον έσω μηριαίο κόνδυλο προβάτων, η ομάδα ελέγχου αντιμετωπίστηκε μόνο με μικροκατάγματα ενώ στην πειραματική ομάδα, επιπλέον των μικροκαταγμάτων χορηγήθηκε ενδαρθρική έγχυση ανασυνδυασμένου FGF-18 τρεις φορές την εβδομάδα για μια ή δύο εβδομάδες. Τα ιστολογικά δεδομένα της πειραματικής ομάδας ανέδειξαν βελτιωμένη ποσότητα και ποιότητα του νεοσχηματισθέντος ιστού. [42]

### IV. Συνδυασμός θεραπειών

IVα. Μικροκατάγματα σε συνδυασμό με έγχυση αυτόλογου πλάσματος και κάλυψη της βλάβης με περίοστεο ως ικρίωμα

Σε πειραματικό ζωικό πρότυπο επούλωσης χόνδρινων βλαβών που εφαρμόστηκε στον έσω μηριαίο κόνδυλο κονίκλων σχηματίστηκαν τρεις ομάδες: μικροκατάγματα μόνο, μικροκατάγματα και εναιώρημα αυτόλογου φυγοκεντημένου πλάσματος και μικροκατάγματα, έγχυση πλάσματος και



κάλυψη της βλάβης με περίοστεο. Τα ιστολογικά ευρήματα για τις δύο πειραματικές ομάδες ήταν ανώτερα από της ομάδας ελέγχου. [43]

IVβ. Μικροκατάγματα σε συνδυασμό με χορήγηση ανασυνδυσμένου Sox-9 (SRY –type high mobility group box -9) και κάλυψη της βλάβης με μεμβράνη κολλαγόνου.

Σε μελέτη όπου προκλήθηκε χόνδρινη βλάβη στη δεξιά τροχιλία κονίκλων σχηματίστηκαν τρεις ομάδες: α) καμία θεραπεία, β) μικροκατάγματα μόνο, γ) μικροκατάγματα και κάλυψη της βλάβης με μεμβράνη όπου είχε προσδεθεί ανασυνδυσμένος Sox-9. Ο παράγων Sox-9 αποτελεί βασικό ρυθμιστή της στρατολόγησης πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων προς χονδροκύτταρα. Η ιστολογική ανάλυση ανέδειξε πως στην ομάδα του Sox-9 ο νεοσχηματισθείς ιστός εμφάνιζε χαρακτηριστικά παρεμφερή προς υαλώδη χόνδρο. [44]

IVγ. Μικροκατάγματα σε συνδυασμό με χορήγηση ανασυνδυσμένης Οστικής Μορφογενετικής Πρωτεΐνης -7 (BMP- 7) προσδεμένης σε μεμβράνη κολλαγόνου.

Η αποτελεσματικότητα της BMP- 7 σε συνδυασμό με μεμβράνη κολλαγόνου και μικροκατάγματα σε σχέση με μικροκατάγματα μόνο, ή μικροκατάγματα και μεμβράνη χωρίς BMP-7 μελετήθηκε σε πειραματικό ζωικό πρότυπο χόνδρινης βλάβης στην τροχιλία του γόνατος κονίκλων. Ο συνδυασμός μικροκαταγμάτων και μεμβράνης με BMP- 7 εμφάνισε βελτιωμένη ποιότητα και ποσότητα νεοσχηματισθέντος χόνδρου σε σχέση με καθεμιά άλλη θεραπεία. [45]

IVδ. Μικροκατάγματα σε συνδυασμό με χορήγηση ανασυνδυσασμένης Οστικής Μορφογενετικής Πρωτεΐνης -4 (BMP- 4) και κάλυψη της βλάβης με ικρίωμα

Σε μελέτη όπου προκλήθηκε χόνδρινη βλάβη στην τροχιλία κονίκλων εφαρμόστηκαν μικροκατάγματα και χορηγήθηκε ανασυνδυσασμένη BMP- 4 προσδεμένη σε ικρίωμα. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά έναντι μικροκαταγμάτων μόνο, ή μικροκαταγμάτων με ικρίωμα μόνο, ανέδειξαν σχηματισμό χόνδρου ανώτερης ποιότητας. [46]

IVε. Μικροκατάγματα σε συνδυασμό με χορήγηση ανασυνδυσασμένου FGF-18 και μεμβράνη κολλαγόνου

Σε μελέτη πρόκλησης χόνδρινων βλαβών στον έσω μηριαίο κόνδυλο προβάτων, η ομάδα ελέγχου αντιμετωπίστηκε μόνο με μικροκατάγματα. Στις δύο πειραματικές ομάδες, επιπλέον των μικροκαταγμάτων χορηγήθηκε ενδαρθρική έγχυση ανασυνδυσασμένου FGF-18 ή FGF-18 προσδεμένος σε μεμβράνη κολλαγόνου. Τη βέλτιστη επούλωση εμφάνισε η ομάδα του FGF-18 με μεμβράνη κολλαγόνου. [47]

## **Συζήτηση**

Η τεχνική των μικροκαταγμάτων είναι μια απλή, σύντομη, μη δαπανηρή επέμβαση με στόχο την επαγωγή της ενδογενούς επουλωτικής δυνατότητας

του χόνδρου, μέσω ενεργοποίησης του μυελού των οστών. Ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο τα εκλυόμενα πρόδρομα κύτταρα αντιδρούν εντός του θρόμβου, είναι περίπλοκος. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ σηματοδοτικών μονοπατιών που παίζουν ρόλο στην επούλωση της χόνδρινης βλάβης αποτελεί προϋπόθεση για την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος.

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των συμπληρωματικών προς τα μικροκατάγματα θεραπειών, ένα μέρος αυτών δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική ανωτερότητα σε σχέση με τα μικροκατάγματα μόνο. Αντίθετα, φαρμακολογικοί παράγοντες όπως η Καρτογενίνη και οι περισσότεροι τους αυξητικούς ή βιολογικούς παράγοντες εμφάνισαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επιπλέον η χρήση ικριωμάτων φαίνεται να βελτιώνει περαιτέρω την αποτελεσματικότητα των αυξητικών παραγόντων. Καθεμιά συμπληρωματική θεραπεία φαίνεται πως επιδρά αθροιστικά στην επουλωτική δυναμική των μικροκαταγμάτων, στοχεύοντας όμως ξεχωριστό μονοπάτι.

Η επιλογή του κατάλληλου τρόπου χορήγησης είναι κρίσιμος παράγοντας για την επίτευξη της βέλτιστης αποτελεσματικότητας των βιολογικών και φαρμακολογικών παραγόντων. Επιπλέον ο τρόπος χορήγησης επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα, άρα και το απαιτούμενο δοσολογικό σχήμα. Οι τεχνικές χορήγησης παραγόντων που στοχεύουν την αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών έχουν εξελιχθεί με το πέρασμα του χρόνου. Η απλή ενδαρθρική έγχυση στην περιοχή της βλάβης επισκιάστηκε από στοχευμένα συστήματα όπως μεμβράνες και ικριώματα πάνω στα οποία προσδένεται ο δραστικός παράγοντας. Η συστηματική χορήγηση εφαρμόστηκε σε ένα από τα πειραματικά μοντέλα που αναφέρθηκαν κι αυτό ήταν η μελέτη υποδόριας έγχυσης ανασυνδυασμένης 1-34 Παραθορμόνης σε διαλείπουσα χορήγηση.

Εντούτοις τα ευρήματα της μελέτης ως προς την αποτελεσματικότητα στην επούλωση του χόνδρου ήταν τα αντίθετα από τα επιθυμητά, καθώς στη χόνδρινη βλάβη αναπτύχθηκε οστό. Αναδείχθηκε αντίθετα η αποτελεσματικότητα ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα που επιτεύχθηκε με τη συστηματική χορήγηση.

Ο σχηματισμός χόνδρου είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα στις οστεοχόνδρινες βλάβες, υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπως η ψευδάρθρωση καταγμάτων, όπου είναι ανεπιθύμητος. Μια σημαντική παρατήρηση που έχει γίνει στην ψευδάρθρωση καταγμάτων είναι η παρουσία χόνδρου στην καταγματική εστία που συσχετίζεται με ανάπτυξη ινώδους ιστού και προβληματική οστική αναγέννηση. [48, 49, 50] Στην ενδοχόνδρινη οστεογένεση ο σχηματισμός χόνδρου είναι σημαντικό ενδιάμεσο στάδιο στο σχηματισμό νέου οστού. Σε διάφορα μοντέλα ψευδάρθρωσης κατάγματος το στάδιο σχηματισμού χόνδρου δεν ακολουθείται από επαρκή ενδοχόνδρινη οστεογένεση και τελικά σχηματίζεται ινώδης ιστός. Η μετάβαση από το χόνδρινο στον οστίτη ιστό ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται τοπικά. [51, 52] Σε μελέτη των Kwong et al. φάνηκε πως διαταραχή της ισορροπίας στην έκφραση BMPs και αναστολέων αυτών στην χόνδρινη περιοχή αναπτυσσόμενων ψευδαρθρώσεων μπορεί να ενοχοποιείται για την πλημμελή ανάπτυξη οστού. [53] Με βάση αυτά τα ευρήματα, αν θεωρηθεί η αναγεννητική διεργασία των μικροκαταγμάτων ως ειδική περίπτωση της πύρωσης, διάφορα μονοπάτια μπορούν να αξιοποιηθούν στην προσπάθεια της στρατολόγησης πρόδρομων κυττάρων προς χονδροβλάστες αντί για οστεοβλάστες στα πλαίσια της ενδοχόνδρινης οστεογένεσης. Παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την

ενδοχόνδρινη οστεογένεση είναι οι BMPs, [54, 55] ο FGF-2, [56] οι Wnt πρωτεΐνες και οι ανταγωνιστές τους. [57, 58] Επιπλέον πολλές από αυτές τις μορφογενετικές διαδικασίες συμμετέχουν σε διαδραστικά κυκλώματα ανατροφοδότησης, όπως η αλληλεπίδραση μεταξύ BMPs και μονοπατιού Wnt/  $\beta$  – κατενίνης. [59, 60]

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσαν να περιγραφούν οι βασικές ιδιότητες μιας «ιδανικής» συμπληρωματικής των μικροκαταγμάτων θεραπείας, ως προς τον τρόπο χορήγησης και το μηχανισμό δράσης. Η συστηματική χορήγηση του κατάλληλου παράγοντα εξασφαλίζει πως μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αυτός εισέρχεται στον ίδιο το σχηματιζόμενο θρόμβο επιτυγχάνοντας βέλτιστη δραστικότητα. Αντίθετα χορήγησή του με ενδαρθρική έγχυση επιτυγχάνει αλληλεπίδραση μόνο με την εξωτερική επιφάνεια του θρόμβου και δεν επιτρέπει την επίδραση στα κύτταρα που υπάρχουν σε βαθύτερα στρώματα. Επιπλέον φάνηκε πως η χρήση μεμβρανών κι ικριωμάτων βελτιώνει περαιτέρω τη δραστικότητα των παραγόντων. Αναφορικά με το επιθυμητό σήμα που μεταφέρεται από τον παράγοντα προς τα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα του θρόμβου, αυτό είναι η επαγωγή της χονδρογένεσης και η αποτροπή της διαφοροποίησής τους προς οστεοβλάστες.

Συμπερασματικά, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται σε συμπληρωματικές στρατηγικές με σκοπό τη βελτίωση του ινοχόνδρου που προκύπτει σε χόνδρινες βλάβες μετά τη θεραπεία με μικροκατάγματα. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας δείχνουν πως υπάρχει δυνατότητα βελτίωσής του. Η στόχευση στη στρατολόγηση των πρόδρομων κυττάρων του θρόμβου προς τη σειρά

των χονδροβλαστών μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική στρατηγική.

(Πίνακας 1)

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ / ΕΤΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ	ΖΩΑ ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ / ΧΡΟΝΟΣ ΕΥΘΑΝΑΣΙΑΣ	ΕΙΔΟΣ ΖΩΟΥ / ΠΕΡΙΟΧΗ ΒΛΑΒΗΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΑΤΑΓΜΑΤΑ ΜΟΝΟ
Erggelet et al. / 2009	n= 4 / 6 months	Sheep / Medial Femoral Condyle	PGA scaffold	Statistically significant superior histological scores
Hoemann et al. /2005	n=8 / 6 months	Sheep / Medial Femoral Condyle	Chitosan-glycerol phosphate membrane	Statistically significant superior histological scores
Strauss et al. / 2009	n=6 / 3 or 6 months	N.Z.W. Rabbits / Medial Femoral Condyle	Intrarticular hyaluronic acid (5 mg/0.50 mL)	Statistically significant higher ICRS and modified O'Driscoll scores
Gunes et al. / 2012	n=10/ 6 months	N.Z.W. Rabbits / Medial Femoral Condyle	Intrarticular hyaluronic acid (1 mL ,15 mg/mL)	No significant difference
Xu et al. / 2015	n=12/ 4 and 12 weeks	N.Z.W. Rabbits / Patellar groove	Kartogenin intrarticular inj. (0.3 ml of 10 μM KGN )	Statistically significant higher ICRS and modified O'Driscoll scores

Feeley et al. / 2010	n=4/ 3 months	N.Z.W. Rabbits / Patellar groove	10 µg/kg recombinant (1–34) PTH subcutaneously	Inhibited cartilage formation
Ceylan et al. / 2016	n= 10/ 8 weeks	N.Z.W. Rabbits / Medial Femoral Condyle	3×10(6) ADSCs to the defect area	No statistical significance
Milano et al. / 2012	n=15/ 6 months	Sheep / Medial Femoral Condyle	2ml of (ACP).	Statistically significant superior histological scores
Zhang et al. / 2014	n=6 / 4, 12, 24 weeks	N.Z.W. Rabbits / Medial Femoral Condyle	0.1 mL rhIGF-1 (0.01 microg/microL)	Statistically significant superior histological scores
Power et al. / 2014	n=16/ 13 or 26 weeks	Sheep / Medial Femoral Condyle	Intra-articular injection of 100ng/ml rhFGF- 18	Statistically significant superior histological scores
Karakaplan et al. / 2015	n=7/ 12 weeks	N.Z.W. Rabbits / Medial Femoral Condyle	2 ml ACP subperiostally and inarticularly	Statistically significant superior histological scores
Zhang et al. / 2017	n=4- 11/ 8 weeks	N.Z.W. Rabbits / Patellar groove	Bilayer membrane soaked in 25 µl of 100 µg/ml of scSOX9 solution	Statistically significant superior histological scores
Kuo et L. / 2006	n=8/	N.Z.W.	10 µg of BMP-	Statistically

	24 weeks	Rabbits / Patellar groove	7 on a type I collagen sponge	significant higher ICRS scores
Zhang et al. / 2008	n= 18 / 6, 12, 24 weeks	N.Z.W. Rabbits / Patellar groove	adenovirus-BMP-4 in a biomaterial scaffold of perforated decalcified cortical bone matrix (DCBM)	Statistically significant superior histological scores
Howard et al. / 2015	n=5/ 13 or 26 weeks	Sheep / Medial Femoral Condyle	rhFGF-18 applied on a bilayer collagen membrane (Chondrogide, Geistlich, Manchester, UK) at concentrations between 0.064 and 32 µg	Statistically significant higher modified O'Driscoll scores

**Πίνακας 1: Ανασκόπηση πειραματικών μελετών με επικουρικές των μικροκαταγμάτων θεραπείες για χόνδρινες βλάβες.**



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αυτό που έχει τεκμηριωθεί είναι πως η πρόκληση μικροκαταγμάτων στο υποχόνδριο οστό οδηγεί σε σχηματισμό ινοχόνδρινου ιστού βιολογικά υποδεέστερου του υαλώδους χόνδρου. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει τα αποτελέσματα της τροποποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης μετά τη διενέργεια μικροκαταγμάτων, στην επούλωση χόνδρινης βλάβης ολικού πάχους που προκλήθηκε σε κονίκλους εργαστηρίου. Η τροποποίηση του μονοπατιού επετεύχθη με από του στόματος χορήγηση ανθρακικού Λιθίου, το οποίο είναι ενδοκυττάριος αναστολέας του ενζύμου Gsk3-  $\beta$  και κατά συνέπεια επάγει τη σηματοδότηση μέσω Wnt /  $\beta$  – κατενίνης. Συγκεκριμένα η αναστολή της Gsk3-  $\beta$  προκαλεί άθροιση της  $\beta$  – κατενίνης στον πυρήνα των κυττάρων, όπου πυροδοτείται η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων- στόχων. Κρίσιμη παράμετρος είναι ο χρόνος επίδρασης στο μονοπάτι καθώς κατά τη διαδικασία της πώρωσης των μικροκαταγμάτων ο ρόλος που διαδραματίζει είναι διττός. Εξ ου και η ανάγκη σχηματισμού τριών συνολικά ομάδων. Συμπερασματικά η κύρια στρατηγική είναι η εκμετάλλευση του βιολογικού δυναμικού που απελευθερώνεται με έναυσμα το κάταγμα, στρέφοντας την αναγεννητική διαδικασία προς τη χονδροκυτταρική σειρά. Η επίτευξη του στόχου εξυπηρετείται από τη χρονικά συντονισμένη παρέμβαση στο μονοπάτι Wnt /  $\beta$  – κατενίνης.

### Επιλογή είδους ζώου

Η μελέτη ενός φαινομένου όπως η επούλωση ιστικής βλαβής και τι μπορεί να προκύψει τροποποιώντας μια παράμετρο που καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα, δε μπορεί παρά να μελετηθεί με πειραματικό ζωικό πρότυπο, καθώς μόνο αυτό μπορεί να εξομοιώσει την πολυπλοκότητα που διέπει το παραπάνω φαινόμενο.

Οι Κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας (KNZ) αποτελούν ιδανικό πειραματικό πρότυπο για την μελέτη της βιολογίας του αρθρικού χόνδρου. Η σκελετική ωρίμανση επισυμβαίνει στο συγκεκριμένο είδος με την σύγκλειση των επιφυσιακών πλακών, σε ηλικία περίπου 6 (έξι) μηνών (*Kilborn et al. 2002*). Ανάμεσα σε πειραματικά πρότυπα, οι KNZ έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως ο ρυθμός οστικής εναλλαγής, η σταθερότητα, η πειραματική επαναληψιμότητα, η ευκολία φιλοξενίας λόγω μικρού μεγέθους και το χαμηλό κόστος. Η οστική αναγεννητική ιδιότητα στους KNZ έχει δοκιμαστεί σε διάφορες ανατομικές περιοχές όπως η γνάθος (*Kahnberg 1979*), το μηριαίο οστό (*Wheeler et al. 2000*) και το κρανίο (*Frame 1980, Clokie et al. 2002, Mooney et al. 2001, Vesala 2002*).

Ελέγχονται εύκολα οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες υπόκεινται κατά την διάρκεια της μελέτης, όπως η θερμοκρασία, η διατροφή, ο φωτισμός, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους πειραματισμού, όπου δεν μπορεί πάντα να

ελεγχθεί για παράδειγμα η τοξικότητα, η παρουσία μικροβίων ή δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η δημιουργία άσηπτων συνθηκών.

### **Συνολικός αριθμός ζώων που θα χρησιμοποιηθούν – τεκμηρίωση βάσει στατιστικής ανάλυσης**

Βασιζόμενοι στο μοντέλο προηγούμενου παρόμοιου πειράματος , που όμως καταγράφει μεταβλητές διαφορετικές από αυτές που θα εκτιμηθούν στην μελέτη μας, επιλέγουμε τον αριθμό των 5 ζώων ανά ομάδα, για να ικανοποιήσουμε παράλληλα και την αρχή του Reduction, ένα από τα τρία R, που χαρακτηρίζει τις πειραματικές μελέτες. Αν συνυπολογίσουμε και μια απώλεια ζώων, 1 ανά ομάδα, μπορούμε να καταλήξουμε τελικά σε 6 ζώα ανά ομάδα.

### **Εκτίμηση δειγματος**

Ομάδα Α (ελέγχου) : 6 ζώα	}	<b><u>Σύνολο : 18 ζώα</u></b>
Ομάδα Β (χρήση λιθίου 1 εβδομάδα ) : 6 ζώα		
Ομάδα Γ (χρήση λιθίου 4 εβδομάδες ) : 6 ζώα		

## Σύντομη περιγραφή επέμβασης:

Η προνάρκωση και η μυοχάλαση των κονίκλων επετεύχθησαν με ξυλαζίνη ενώ για νάρκωση και αναλγησία χορηγήθηκαν κεταμίνη και καρπροφένη σε υποδόρια χορήγηση (sc), σε δοσολογίες συναρτήσεως του σωματικού βάρους καθενός. Μετεγχειρητικά έγινε καθημερινά έλεγχος των κονίκλων αναφορικά με τον πόνο και χορηγήθηκε αναλγητική αγωγή όποτε κρίθηκε απαραίτητο.

Διενεργήθηκε μέση τομή δέρματος στο δεξιό γόνατο του κονίκλου και στη συνέχεια έσω παραεπιγονατιδική προσπέλαση στην κατά γόνατο άρθρωση. Εξάρθρωση της επιγονατίδας και προετοιμασία βλαβών του αρθρικού χόνδρου κυκλικού σχήματος, διαμέτρου 4 mm στη μεσότητα της μηριαίας τροχιλίας. (Εικόνες 2 και 3)



**Εικόνα 3**



**Εικόνα 4**

**Εικόνες 3 και 4: απεικονίζεται το σημείο διενέργειας της χόνδρινης βλάβης κι ο αφαιρεθείς αρθρικός χόνδρος αντίστοιχα.**

Εφαρμογή της τεχνικής μικροκαταγμάτων, όπως έχει καθιερωθεί από τους Steadman et al., σύμφωνα με τους οποίους τα προκαλούμενα μικροκατάγματα πρέπει να ταξινομούνται κατά μήκος όλης της επιφάνειας της βλάβης του αρθρικού χόνδρου, σε απόσταση 3–4 χιλιοστά μεταξύ τους και σε βάθος 4-6 mm, αποδίδοντας 3–4 οπές ανά τετραγωνικό εκατοστό.

(Εικόνες 4 και 5)



**Εικόνα 5**



**Εικόνα 6**

**Εικόνες 5 και 6: απεικονίζεται η διενέργεια μικροκαταγμάτων στο υποχόνδριο οστό.**

Κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο, υπήρξε στενή παρακολούθηση, προκειμένου να εντοπιστεί άμεσα τυχόν διαταραχή της ευζωίας των κονίκλων. Τα ζώα εργαστηρίου είχαν καθημερινή φροντίδα και επίβλεψη από το προσωπικό του Ερευνητικού Κέντρου. Στους κονίκλους παρήχθη στέγαση, τροφή, νερό και φροντίδα, σε κλουβιά κατάλληλου εμβαδού και ύψους, διεθνών προδιαγραφών, σε χώρο κλιματιζόμενου σταβλισμού. Οι

εγκαταστάσεις υφίσταντο καθημερινά έλεγχο και καθαρισμό. Υπήρχε, επίσης, άμεσα διαθέσιμος υπεύθυνος κτηνίατρος για την παρακολούθηση της υγείας τους. Τα ζώα εργαστηρίου υπέστησαν με τον τρόπο αυτό την ελάχιστη δυνατή επιβάρυνση. Καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της έρευνας, δόθηκε έμφαση στην επίτευξη ευζωίας για τους κονίκλους εργαστηρίου και συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν τα παρακάτω μέτρα :

- α)** Σε όλα τα ζώα παρέχόταν στέγαση, περιβάλλον, κάποια ελάχιστη ελευθερία κινήσεων, τροφή, νερό και φροντίδα κατάλληλη για την υγεία και την καλή τους διαβίωση.
- β)** Κάθε περιορισμός της δυνατότητας ενός ζώου να ικανοποιεί τις φυσιολογικές του ανάγκες και τις συνήθειες του να μην υπερβαίνει το ελάχιστο δυνατό.
- γ)** Να διεξάγεται καθημερινός έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών κάτω από τις οποίες τα ζώα εργαστηρίου εκτρέφονταν, φυλάσσονταν ή χρησιμοποιούνταν.
- δ)** Η ικανοποιητική διαβίωση και η κατάσταση της υγείας των ζώων εργαστηρίου ελέγχονταν από κτηνίατρο, ώστε να αποφεύγεται ο πόνος ή άσκοπη ταλαιπωρία, η αγωνία ή μη μόνιμη βλάβη της υγείας τους.
- ε)** Λαμβάνονταν τα κατάλληλα μέτρα για την αποκατάσταση, το ταχύτερο δυνατό, κάθε διαταραχής ή ταλαιπωρίας που διαπιστωνόταν στο ζώο.

(Εικόνα 7)



**Εικόνα 7: Καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της έρευνας , δόθηκε έμφαση στην επίτευξη ευζωίας για τους κονίκλους εργαστηρίου.**



Η έναρξη χορήγησης λιθίου (διάλυμα καρβονικού λιθίου προς σε συγκέντρωση 7Mm στο πόσιμο νερό των κονίκλων) για τις δυο ομάδες και του εικονικού φαρμάκου αντίστοιχα για την ομάδα ελέγχου έγινε τη δεύτερη μέρα μετά το χειρουργείο. Σε όλα τα ζώα εργαστηρίου εφαρμόστηκε πρωτόκολλο άμεσης, ελεύθερης, πλήρους φόρτισης. Σε χρόνο 9 εβδομάδων από το χειρουργείο τα ζώα θυσιάσθηκαν και συνελέγησαν τα χειρουργηθέντα μηριαία οστά.

Οι ευθανασίες πραγματοποιήθηκαν εξ ολοκλήρου στο Πειραματικό Χειρουργείο του Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος “Θ. Γαροφαλίδης” Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Νοσοκομείο ΚΑΤ, Νίκης 2, Κηφισιά 14561, όπως εγκρίθηκε από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής (Αριθμ. Πρωτ.:8181, 14-12-2016 ) και σύμφωνα με τις προβλεπόμενες συνθήκες.

Η εισαγωγή των κονίκλων εργαστηρίου στην αναισθησία επετεύχθη με ενδομυϊκή χορήγηση μιδαζολάμης 2mg/kg (Dormicum) και κεταμίνης 30 mg/kg (Imalgene). Κατόπιν ακολούθησε καθετηριασμός της ωτιαίας φλέβας, δεδομένης της επίτευξης επαρκούς επιπέδου αναισθησίας, ώστε να αποφευχθεί τυχόν καταπόνηση του ζώου. Ακολούθως χορηγήθηκε ενδοφλεβίως νατριούχος θειοπεντάλη 30mg/kg (Thiopental), με σκοπό την περαιτέρω καταστολή του κόνικλου. Η διαδικασία της ευθανασίας ολοκληρώθηκε με υπερδοσία της νατριούχου θειοπεντάλης.

Μετά την ολοκλήρωση της ευθανασίας για κάθε κόνικλο εργαστηρίου, αφαιρέθηκε το δεξί μηριαίο οστό περιφερικά της μεσότητάς του, δεδομένου ότι

η προς μελέτη περιοχή αφορούσε τη χόνδρινη βλάβη στη μεσότητα της μηριαίας τροχιλίας.

Εν συνεχεία, ακολούθησε η μονιμοποίηση των οστεοχόνδρινων δειγμάτων σε διάλυμα φορμόλης. Η διαδικασία αφαλάτωσης επακολούθησε της μονιμοποίησης κι έγινε στο ιστοπαθολογικό εργαστήριο του Νοσοκομείου ΚΑΤ 2 περίπου ημέρες μετά την μονιμοποίηση σε φορμόλη.

Η επεξεργασία των οστεοχόνδρινων δειγμάτων και η προετοιμασία τους για ιστολογική εξέταση διενεργήθηκαν ως εξής:

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ : 10% NEUTRAL w/v PHOSPHATE BUFFER 0,05M

Για 24 -48 ώρες

ΑΦΑΛΑΤΩΣΗ : ΝΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ 2% για 1 μέρα

ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ 4% για 2 μέρες

Μετά την αφαλάτωση έγινε εξουδετέρωση του οξέος με διάλυμα LITHIUM SULPHATE 5% για 2 ώρες και ξέπλυμα με νερό για 30 λεπτά.

ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ : Ελήφθησαν τομές πάχους 3μm με αυτόματο μικροτόμο FINESSE ME+ του Οίκου THERMO SCIENTIFIC.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑ : EXCELSIOR AS του Οίκου THERMO

SCIENTIFIC για 16 ώρες (αφυδάτωση – διαύγαση – εμπέδωση σε παραφίνη)

ΧΡΩΣΗ ΤΟΜΩΝ :

HEMATOXYLENE – EOSIN και WEIGERT – VAN GIESON

Οι χρώσεις έγιναν σε αυτόματο μηχάνημα χρώσεων VARISTAIN GEMINI του Οίκου THERMO SCIENTIFIC

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ :

ΜΗΧΑΝΗΜΑ : AUTOSTAINER LINK, DAKO

KIT : ENVISION FLEX, DAKO

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΚΑΛΥΨΗΣ ΕΠΙΤΟΠΩΝ :HIER

(Heat Induced Epitope Retrieval)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ

ΧΡΩΣΗ ΤΟΜΩΝ : Οι χρώσεις έγιναν σε αυτόματο μηχάνημα χρώσεων VARISTAIN GEMINI του Οίκου THERMO SCIENTIFIC.

ΤΟΛΟΥΙΔΙΝΗ ΒΛΥΕ

**ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΤΟΛΟΥΙΔΙΝΗ ΒΛΥΕ Ο**

**ΧΡΩΣΗ ΤΟΜΩΝ** :

1. Κλιβανισμός των τομών για 20 λεπτά
2. Ενυδάτωση των τομών σε φθίνουσα σειρά αλκοολών
3. Ξέπλυμα με νερό
4. Διάλυμα χρώσης Toluidine Blue O 1% σε DW για 2 min.
5. Ξέπλυμα σε νερό
6. Αφυδάτωση
7. Διαύγαση

#### HEMATOXYLENE – EOSIN

1. Κλιβανισμός των τομών για 20 λεπτά
2. Ενυδάτωση των τομών σε φθίνουσα σειρά αλκοολών
3. Ξέπλυμα με νερό
4. HEMATOXYLINE για 10 λεπτά
5. Ξέπλυμα σε νερό
6. Διαφοροποίηση με Οξυνισμένη Αλκοόλη 70°
7. Ξέπλυμα και παραμονή σε νερό για 5 λεπτά
8. Αλκοόλη 80 °
9. EOSIN για 2 λεπτά

10. Αφυδάτωση

11. Διαύγαση

### WEIGERT – VAN GIESON

1. Κλιβανισμός των τομών για 20 λεπτά
2. Ενυδάτωση των τομών σε φθίνουσα σειρά αλκοολών
3. Ξέπλυμα με νερό
4. WEIGERT για 25 λεπτά
5. Ξέπλυμα σε νερό
6. Διαφοροποίηση με Οξυνισμένη Αλκοόλη 70°
7. Ξέπλυμα και παραμονή σε νερό για 5 λεπτά
8. VAN GIESON για 5 λεπτά
9. Αφυδάτωση
10. Διαύγαση

### ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ :

ΜΗΧΑΝΗΜΑ : AUTOSTAINER LINK, DAKO

KIT : ENVISION FLEX, DAKO

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΚΑΛΥΨΗΣ ΕΠΙΤΟΠΩΝ :

HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) σε υψηλό Ph 9 με το μηχάνημα PT του Οίκου DAKO

ΧΡΩΜΟΓΟΝΟ : DAB

ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ : 30 λεπτά

COLLAGEN II, THERMO SCIENTIFIC σε αρραίωση 1: 100

b- CATENIN, DAKO σε αρραίωση 1:50

#### ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ:

1. Κλιβανισμός τομών για 1 ώρα
2. Αποπαραφίνωση – αποκάλυψη επιτόπων (HIER) σε υψηλό Ph 9 για 20 λεπτά στους 98°
3. Ξέπλυμα με Buffer για 5 λεπτά
4. Δέσμευση με διάλυμα υπεροξειδίου της ενδογενούς υπεροξειδάσης των ιστών
5. Ξέπλυμα με Buffer
6. Αντιδραστήριο ανίχνευσης ενός σταδίου
7. Ξέπλυμα με Buffer
8. Αντίσωμα επώαση για 30 λεπτά
9. Ξέπλυμα με Buffer
10. Χρωμογόνο DAB για 7 λεπτά
11. Counterstain με αιματοξυλίνη για 1 λεπτό
12. Ξέπλυμα και παραμονή σε νερό για 5 λεπτά
13. Παραμονή σε Buffer για 5 λεπτά

14. Αφυδάτωση – Διαύγηση

**ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ** : 10% NEUTRAL w/v PHOSPHATE BUFFER 0,05M

Για 24 -48 ώρες

**ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ** :

Ελήφθησαν τομές πάχους **3μm** με αυτόματο μικροτόμο

FINESSE ME+ του Οίκου THERMO SCIENTIFIC

**ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑ** : EXCELSIOR AS του Οίκου THERMO

SCIENTIFIC για 16 ώρες (αφυδάτωση – διαύγηση – εμπέδωση σε παραφίνη).

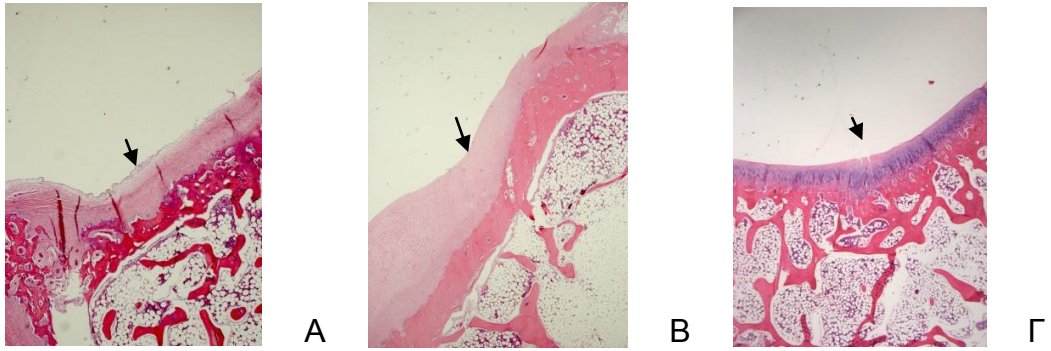
**Αξιολόγηση ευρημάτων**

Ακολούθως διενεργήθηκε ιστομορφομετρία στα συλλεγόμενα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια αναγέννησης για χόνδρινες βλάβες, όπως αυτά έχουν καθορισθεί από τη διεθνή εταιρία επούλωσης του αρθρικού χόνδρου. (ICRS) Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με βάση τη βαθμολογία καθεμιάς στην κλίμακα ICRS.

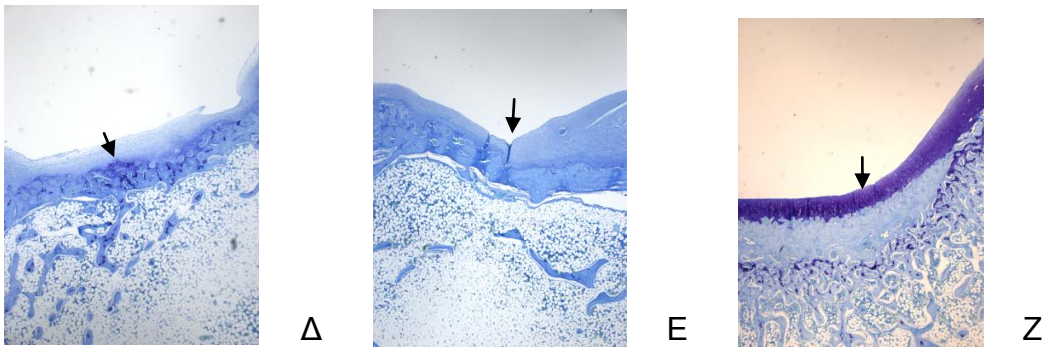
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ιστολογικά ευρήματα της ομάδας 1 χαρακτηρίζονταν από παρουσία ανώμαλης επιφάνειας στον νεοσχηματισθέντα ιστό, η κατανομή των κυττάρων ήταν αποδιοργανωμένη και η θεμέλια ουσία είχε εμφάνιση ινοχόνδρου. Στην ομάδα 2 η επιφάνεια ήταν πιο ομαλή, η θεμέλια ουσία αποτελείτο από υαλώδη χόνδρο αλλά και ινοχόνδρο, ενώ η κατανομή των κυττάρων ποίκιλε από αποδιοργανωμένη έως ανάμικτη με συνύπαρξη στηλών και συναθροίσεων. Τα ιστολογικά ευρήματα της ομάδας 3 ανέδειξαν νεοσχηματισθέντα ιστό με ομαλή επιφάνεια, θεμέλια ουσία υαλώδους χόνδρου, με παρουσία ινοχόνδρου σε κάποιες περιοχές, αλλά με τα χονδροκύτταρα κατανεμημένα σαφώς πιο οργανωμένα σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Η ασβεστοποίηση του χόνδρου ήταν φυσιολογική σε όλες τις ομάδες. Η κλίμακα ICRS εκτιμήθηκε για καθένα από τα ζώα εργαστηρίου. Οι κόνικλοι εργαστηρίου 3 και 11 αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω ιστολογικών ευρημάτων οστεομυελίτιδας, τα οποία όμως δε συνοδεύτηκαν από κλινική συμπτωματολογία. Η ανοσοϊστοχημεία για το Κολλαγόνο τύπου II στην ομάδα 3 ανέδειξε τακτικά οργανωμένες ίνες, ενώ στην ομάδα 2 η εικόνα τους ήταν ανοργάνωτη (Εικόνα 8 A - I).

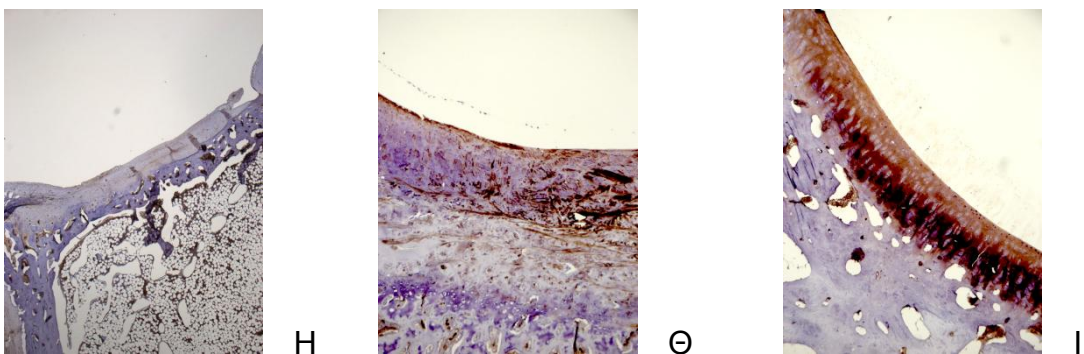




Χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Α, ομάδα 1. Β, ομάδα 2. Γ, ομάδα 3.



Χρώση κυανού της Τολουιδίνης. Δ ομάδα 1. Ε, ομάδα 2. Ζ, ομάδα 3.



Ανοσοϊστοχημεία για κολλαγόνο τύπου ΙΙ. Η, ομάδα 1. Θ, ομάδα 2. Ι, ομάδα 3.

**Εικόνα 8 Α – Ι: Τα ιστολογικά ευρήματα ανά ομάδα. Τα μαύρα βέλη οριοθετούν την επιφάνεια του νεοσχηματισθέντος χόνδρου.**

Η ομάδα 3 (θεραπεία με Λίθιο για 4 εβδομάδες) παρουσίασε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές για την επιφάνεια (  $p=0,028$  ) , τη θεμέλια ουσία (  $p=0,022$  ) , την κατανομή των κυττάρων(  $p=0,029$  ) και το υποχόνδριο οστό (  $p=0,004$  ) σε σχέση με την ομάδα 1(ελέγχου). Η ομάδα 2 (θεραπεία με Λίθιο για 1 εβδομάδα) παρουσίασε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές για την επιφάνεια (  $p=0,028$  ) και το υποχόνδριο οστό (  $p=0,050$  ) σε σχέση με την ομάδα 1(ελέγχου).

### **Στατιστική ανάλυση**

Οι τιμές των μεταβλητών θα παρουσιαστούν χρησιμοποιώντας την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση όπως και την διάμεσο και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR) όπου είναι απαραίτητα. Στις κατηγορικές μεταβλητές θα χρησιμοποιήσουμε τις συχνότητες ( $v$ ) και τα αντίστοιχα ποσοστά (%).

Οι συγκρίσεις των κατηγορικών μεταβλητών ανάμεσα στις ομάδες θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας το Χι-τετράγωνο τεστ ( Chi-square test) και το Fisher's exact test ενώ οι συγκρίσεις των ποσοτικών μεταβλητών θα πραγματοποιηθούν με τα μη παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis και Mann-Whitney test ( για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη, με και χωρίς την διόρθωση Bonferroni. )

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις θα πραγματοποιηθούν με το στατιστικό πακέτο SPSS , version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα τέστ είναι διπλής κατεύθυνσης ( two-sided ) .

Η τιμή p-value <0.05 καθορίσθηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς .

### Συγκριση της μεταβλητής Επιφάνεια

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR
Control	<b>1,20</b>	1,64	<b>0,00</b>	3,00
Λίθιο 1 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00
Λίθιο 4 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00
Overall p-	<b>0.022</b>			

	Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg		Mann-Whitney unadjusted	
	Λίθιο 1	Λίθιο 4	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.050</b>	<b>0.034</b>
Λίθιο 1 εβδ	---	1.000	---	1.000

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες (  $p=0.022$  ) σε σχέση με την μεταβλητή Επιφάνεια . Απο τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Mann-Whitney unadjusted παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες Λίθιο 1 εβδ (  $p=0,050$  ) , Λίθιο 4 εβδ (  $p=0,034$  ) . Αν συνυπολογίσουμε και την διόρθωση Bonferroni τότε το επίπεδο σημαντικότητας από 0,05 γίνεται 0,017 αρα οι παραπάνω διαφορές δεν διατηρούνται

Απο τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg FDR παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες Λίθιο 1 εβδ (  $p=0,028$  ) , Λίθιο 4 εβδ (  $p=0,028$  )

### Συγκριση της μεταβλητής Θεμέλια Ουσία

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR
Control	<b>1,60</b>	,55	<b>2,00</b>	1,00
Λίθιο 1 εβδ	<b>2,20</b>	,45	<b>2,00</b>	,50
Λίθιο 4 εβδ	<b>2,67</b>	,52	<b>3,00</b>	1,00
Overall p-	<b>0,028</b>			

	Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg		Mann-Whitney unadjusted	
	Λίθιο 1	Λίθιο 4	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	0.203	<b>0.022</b>	0.093	<b>0.018</b>
Λίθιο 1 εβδ	---	0,203	---	0.140

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ( $p=0.028$ ) σε σχέση με την μεταβλητή Θεμέλια Ουσία. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Mann-Whitney παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με την ομάδα Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,018$ ). Αν συνυπολογίσουμε και την διόρθωση Bonferroni τότε το επίπεδο σημαντικότητας από 0,05 γίνεται 0,017 αρα η παραπάνω διαφορά διατηρείται.

Από τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg FDR παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με την ομάδα Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,022$ ).

### Συγκριση της μεταβλητής Διάταξη κυττάρων

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR
Control	<b>1,40</b>	,55	<b>1,00</b>	1,00
Λίθιο 1 εβδ	<b>2,20</b>	,84	<b>2,00</b>	1,50
Λίθιο 4 εβδ	<b>2,50</b>	,55	<b>2,50</b>	1,00
Overall p-	<b>0.058</b>			

	Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg		Mann-Whitney unadjusted	
	Λίθιο 1	Λίθιο 4	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	0.179	<b>0.029</b>	0.118	<b>0.019</b>
Λίθιο 1 εβδ		0.337	---	0.545

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ( $p=0.058$ ) σε σχέση με την μεταβλητή Διάταξη κυττάρων. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Mann-Whitney παρατηρούμε σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με την ομάδα Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,019$ ). Αν συνυπολογίσουμε και την διόρθωση Bonferroni τότε το επίπεδο σημαντικότητας από 0,05 γίνεται 0,017 αρα η παραπάνω διαφορά διατηρείται οριακά.

Απο τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg FDR παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με την ομάδα Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,029$ ).

### Συγκριση της μεταβλητής Βιωσιμότητα

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	1.000	1.000
Λίθιο 1 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	---	1.000
Λίθιο 4 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	---	---
Overall ρ-	<b>1.000</b>					

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες ( $p=1,000$ ) σε σχέση με την μεταβλητή Βιωσιμότητα.

### Συγκριση της μεταβλητής Ασβεστοποίηση χόνδρου

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	1.000	1.000
Λίθιο 1 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	---	1.000
Λίθιο 4 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00	---	---
Overall ρ-	<b>1.000</b>					

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες (  $p=1,000$ ) σε σχέση με την μεταβλητή Ασβεστοποίηση χόνδρου .

### Συγκριση της μεταβλητής Υποχόνδριο Οστό

	Μέση	Τυπική	Διάμεσ	IQR
Control	<b>2,00</b>	,00	<b>2,00</b>	,00
Λίθιο 1 εβδ	<b>2,60</b>	,55	<b>3,00</b>	1,00
Λίθιο 4 εβδ	<b>3,00</b>	,00	<b>3,00</b>	,00
Overall p-	<b>0.005</b>			

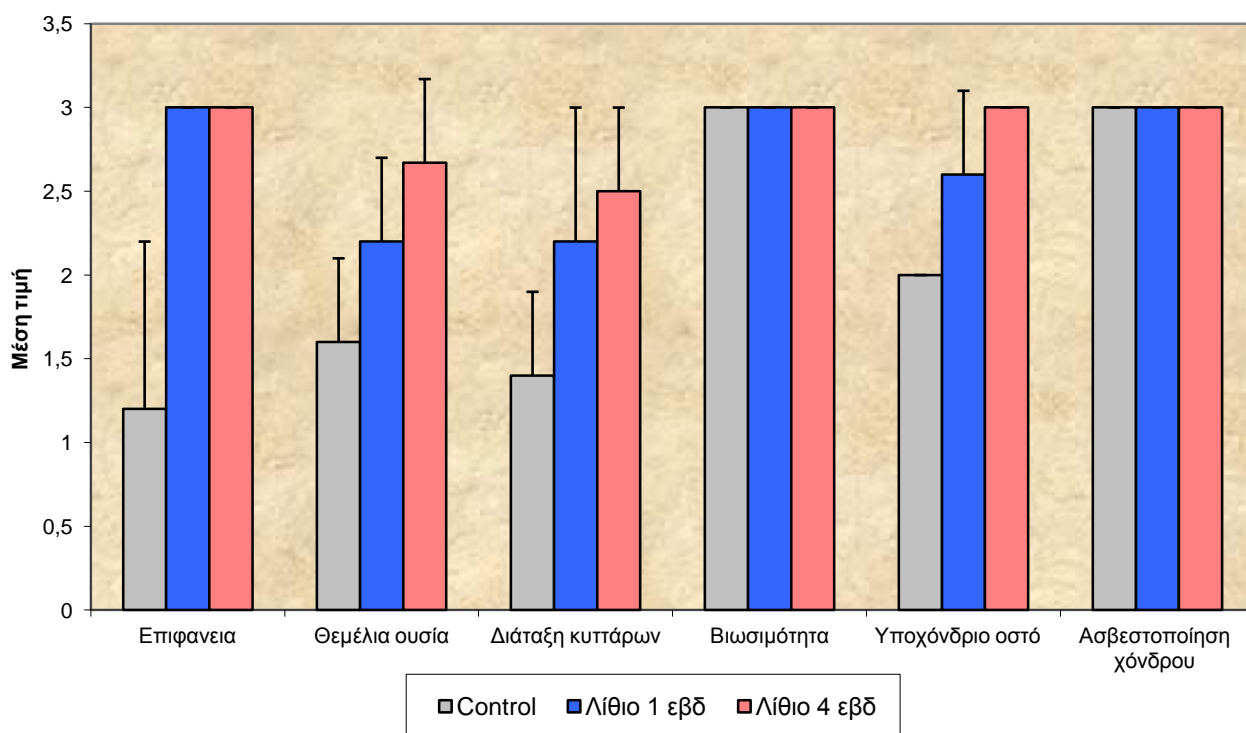
	Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg		Mann-Whitney unadjusted	
	Λίθιο 1	Λίθιο 4	Λίθιο 1	Λίθιο 4
Control	0,096	<b>0,004</b>	<b>0,050</b>	<b>0.002</b>
Λίθιο 1 εβδ		0,197	---	0.102

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες (  $p=0.005$  ) σε σχέση με την μεταβλητή Υποχόνδριο οστό. Από τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μέθοδο Mann-Whitney παρατηρούμε στατιστικά

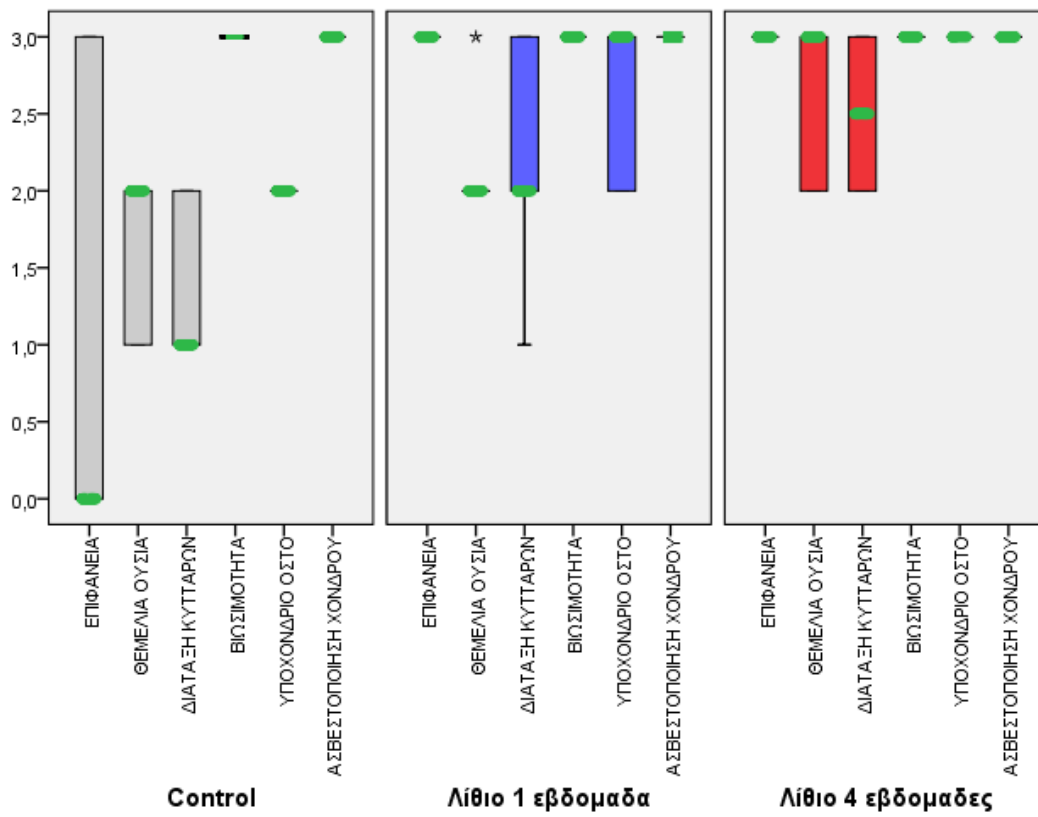


σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με τις ομάδες Λίθιο 1 εβδ ( $p=0,050$ ), Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,002$ ). Αν συνυπολογίσουμε και την διόρθωση Bonferroni τότε το επίπεδο σημαντικότητας από 0,05 γίνεται 0,017 αρα διατηρείται μόνο η διαφορά αναμεσα στο control και την ομάδα Λίθιο 4 εβδ.

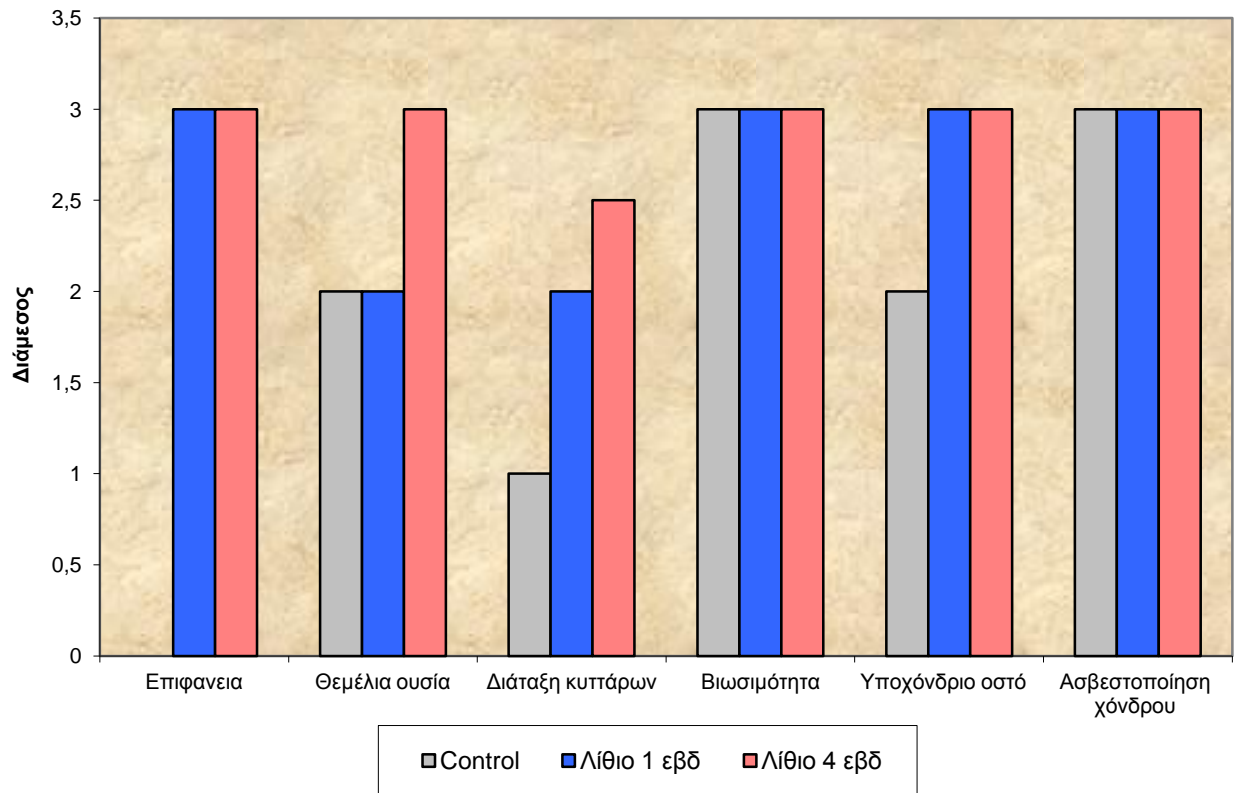
Από τις πολλαπλές συγκρίσεις με την μεθοδο Dunn adjusted by the Benjamini-Hochberg FDR παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα Control με την ομάδα Λίθιο 4 εβδ ( $p=0,004$ ).



**Γράφημα 1 :** Παθολογολογικοί δείκτες ανα ομάδα ( μέση τιμή )



**Γράφημα 2 :** Παθολογανατομικοί δείκτες ανα ομάδα (box plot )



**Γράφημα 3 :** Παθολογανατομικοί δείκτες ανα ομάδα (διάμεσος )

Σύνοψη αποτελεσμάτων : Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε από τις έξι παραμέτρους του ιστοπαθολογικού score ICRS (επιφάνεια, θεμέλια ουσία, κατανομή χονδροκυττάρων, βιωσιμότητα κυττάρων , υποχόνδριο οστό κι επιμετάλλωση) στατιστικά σημαντική υπεροχή της ομάδας Γ σε σχέση με την ομάδα Α στις τέσσερις (επιφάνεια, θεμέλια ουσία, κατανομή χονδροκυττάρων, υποχόνδριο οστό) .

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασικός ρυθμιστής του μονοπατιού Wnt /  $\beta$ -κατενίνης είναι το ένζυμο GSK3 $\beta$ . Σε απουσία κατάλληλων συνδετών του μονοπατιού σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα αποσύνθεσης αποτελούμενο από τα ένζυμα Axin και APC και καταλύει τη φωσφορυλίωση της  $\beta$ -κατενίνης από την GSK3 $\beta$ . Τελικά η κυτταροπλασματική  $\beta$ -κατενίνη οδηγείται σε αποσύνθεση από το πρωτεάσωμα. Η παρουσία παραγόντων όπως το Λίθιο φαίνεται πως επάγει τη φωσφορυλίωση της GSK3 $\beta$  καθιστώντας την ανενεργή. Η επακόλουθη μείωση της δραστηριότητας επιφέρει συσσώρευση της κυτταροπλασματικής  $\beta$ -κατενίνης, η οποία λειτουργεί σαν συμπαράγοντας των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF επάγοντας την έκφραση γονιδίων στόχων. Η δραστηριότητα της GSK3 $\beta$  είναι απαραίτητη τόσο για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, όσο και των χονδροκυττάρων. [61] Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/  $\beta$ -κατενίνης με τη χρήση Λιθίου σαν ανταγωνιστή της GSK3 $\beta$  σε κυτταρικές σειρές και πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα διεγείρει την έκφραση χονδρογενετικών παραγόντων. [62]

Το μονοπάτι Wnt /  $\beta$ -κατενίνης παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετού από το έμβρυο ως και τον ενήλικα κι έτσι διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει το δυναμικό της αναστολής της GSK-3 $\beta$  στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Τα ευρήματά τους εντούτοις είναι διφορούμενα.

Σε ένα πειραματικό ζωικό πρότυπο ενδαρθρικής έγχυσης GIN, που δρα σαν αναστολέας της GSK-3 $\beta$ , σε γόνατα επίμυων προκλήθηκε συσσώρευση της  $\beta$ -κατενίνης στα χονδροκύτταρα. Αυτό συσχετίσθηκε με ανωμαλία στην

επιφάνεια του χόνδρου και μείωση στην έκφραση γλυκοζαμινογλυκανών. Τελικά φάνηκε πως μειώνοντας τη σηματοδότηση της β-κατενίνης η GSK-3β διατηρεί το φαινότυπο των χονδροκυττάρων αλλά και την εξωκυττάρια ουσία. Η βραχυπρόθεσμη αύξηση στη σηματοδότηση της β-κατενίνης μπορεί να είναι αρκετή να προκαλέσει οστεοαρθρικού τύπου χαρακτηριστικά στο χόνδρο *in vivo*. [63]

Αντίθετα οι αναστολείς της GSK-3β βελτίωσαν σημαντικά την παραγωγή θεμέλιας ουσίας σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων. Σε *in vitro* μελέτη πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών οργανώθηκαν σε συσσωματώματα και τους παρασχέθηκε χονδρογενές μέσο που περιείχε Λίθιο ή SB216763, έναν άλλο αναστολέα της GSK3β. Η προσθήκη των παραγόντων αυτών ενίσχυσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις γλυκοζαμινογλυκανών στη θεμέλια ουσία. [64]

Σε άλλη μελέτη *in vitro* χορηγήθηκε σε καλλιέργεια χονδροκυττάρων Λίθιο μέσω γέλης σε γυαλί από SiO<sub>2</sub> - Li<sub>2</sub>O. Τα προϊόντα της αποσύνθεσής του περιείχαν 5 mM Λίθιο και 3.5 mM Πυρίτιο. Η χρήση αυτού του μέσου ευόδωσε τη διαφοροποίηση προς χόνδρο αλλά και το σχηματισμό θεμέλιας ουσίας χωρίς την παρουσία αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β. [65]

Στην παρούσα μελέτη η χονδρογενετική επίδραση του Λιθίου όπως αναδείχθηκε από *in vitro* πειράματα, εφαρμόστηκε στο θρόμβο των μικροκαταγμάτων. Η κλασσική ακολουθία της επούλωσης που πυροδοτείται στο θρόμβο και ο πολλαπλασιασμός πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων με τη δυνατότητα διαφοροποίησης προς διάφορες σειρές προσφέρουν ένα υπόστρωμα με αναγεννητικό δυναμικό. Αναφορικά με την περίπτωση της

ενδαρθρικής έγχυσης GIN σε γόνατα επίμυων, δεδομένης της χαμηλής ενδογενούς επουλωτικής ικανότητας του χόνδρου απουσιάζει το κατάλληλο υπόστρωμα που θα διευκόλυne τη χονδρογενετική δράση του Λιθίου. Η προαναφερθείσα αλληλεπίδραση μεταξύ του αναγεννητικού δυναμικού των μικροκαταγμάτων και της χονδρογενετικής δράσης του Λιθίου τεκμηριώνουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Ένα από τα μορφογενετικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την επούλωση των καταγμάτων και κατά συνέπεια και των μικροκαταγμάτων είναι το μονοπάτι Wnt /  $\beta$  – κατενίνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων παραγόντων του μονοπατιού οδηγεί σε άθροιση της  $\beta$  – κατενίνης στον πυρήνα των κυττάρων, όπου πυροδοτείται η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων- στόχων. Βασικός παράγοντας του μονοπατιού στο μυοσκελετικό σύστημα είναι η σκληροστίνη, που δρα ως εξωκυττάριος αναστολέας. Ο ρόλος της στη ρύθμιση των χονδροκυττάρων δεν είναι σαφώς καθορισμένος. Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η πτώση των επιπέδων της σκληροστίνης πιθανόν αναστέλλουν την πρωτεόλυση στο χόνδρο και ευοδώνουν τη σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού. [66] Παρόλα αυτά σε μια άλλη μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες εργαστηρίου με απενεργοποιημένο το γονίδιο της σκληροστίνης δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα ιστολογικά ευρήματα. [67] Σύμφωνα με μια πιο πρόσφατη μελέτη στο μηριαίο οστό μυών εργαστηρίου, μόνο τα οστεοκύτταρα του οστίτη ιστού και τα χονδροκύτταρα του αρθρικού χόνδρου εμφάνισαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ανοσοαντίδρασης στη σκληροστίνη. Επιπλέον ευρήματα έδειξαν αύξηση στο ποσοστό ανοσοαντίδρασης στη σκληροστίνη με τη γήρανση, ενώ ο αριθμός των χονδροκυττάρων με σκληροστίνη μειώθηκε αυξανόμενης της ηλικίας. [68] Μια

άλλη διάσταση του ρόλου του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης στη στρατολόγηση πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων είναι μέσω της φόρτισης. Τα μηχανικά φορτία ρυθμίζουν τα επίπεδα της  $\beta$  – κατενίνης όπως έδειξαν ζωικά πρότυπα, ενώ ο υποδοχέας LRP5/6 λειτουργεί ως μηχανοϋποδοχέας για τη ρύθμιση της οστικής μάζας.[69] Ο ακριβής έλεγχος του μηχανικού περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της επούλωσης οστικών βλαβών μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση σε επίπεδο ιστού (χόνδρινος ή οστίτης) και μοριακό (οργανωμένη ή αποδιοργανωμένη αρχιτεκτονική ινών κολλαγόνου.) [70]

Η αρχική ιδέα για την παρούσα μελέτη ήταν η βελτίωση του ιστού που προκύπτει μετά από μικροκατάγματα στην επούλωση χόνδρινης βλάβης, με επαγωγή του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης μέσω χρήσης αντισώματος κατά της σκληροστίνης. Εντούτοις τα αντισώματα κατά της σκληροστίνης δεν ήταν διαθέσιμα σαν υλικό κι έτσι επιλέξαμε μια διαφορετική πορεία για να φτάσουμε στον ίδιο στόχο, μέσω αναστολής της Gsk3- $\beta$ . Τελικά χρησιμοποιήθηκε από του στόματος χορήγηση ανθρακικού Λιθίου, το οποίο είναι ενδοκυττάριος αναστολέας του ενζύμου Gsk3-  $\beta$  και κατά συνέπεια επάγει τη σηματοδότηση μέσω Wnt /  $\beta$  – κατενίνης.

Παράμετροι που εκτιμήθηκαν αναφορικά με το σχεδιασμό του πειραματικού μας μοντέλου ήταν οι διαστάσεις της χόνδρινης βλάβης ολικού πάχους, όπως και οι διαστάσεις των εργαλείων με τα οποία προκλήθηκαν τα μικροκατάγματα. Αποσκοπώντας στην προσομοίωση των αντίστοιχων παραμέτρων σε κλινικό επίπεδο δημιουργήθηκαν τέσσερις οπές διαμέτρου 1mm στην επιφάνεια της χόνδρινης βλάβης που εκτεινόταν σε 12.56 mm<sup>2</sup> .Η αναλογία οπών προς επιφάνεια βλάβης ήταν 25%. Με βάση τη βιβλιογραφία



το αντίστοιχο ποσοστό στην κλινική πράξη είναι από 20% έως 40%. [71] Επιπλέον δεδομένου ότι η πειραματικά προκληθείσα βλάβη ήταν 10 φορές μικρότερη από μια τυπική χόνδρινη βλάβη σε ανθρώπους των  $1.5 \text{ cm}^2$ , χρησιμοποιήθηκε εργαλείο διαμέτρου 1mm. Το αντίστοιχο εργαλείο στην κλινική πράξη έχει διάμετρο 3mm, έτσι τηρήθηκε η κλίμακα τρίτης δύναμης για τις γραμμικές διαστάσεις.

Τα κύρια ευρήματα της μελέτης είναι τα εξής: 1) η επαγωγή του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης για 4 εβδομάδες μετά την εφαρμογή μικροκαταγμάτων σε χόνδρινη βλάβη οδηγεί σε στατιστικά σημαντική υπεροχή για τέσσερις από έξι κατηγορίες της ιστολογικής κλίμακας ICRS. 2) Η ανοσοϊστοχημεία στην ομάδα 3 ανέδειξε τακτικά οργανωμένες ίνες κολλαγόνου τύπου II, ενώ στην ομάδα 2 εμφανίστηκαν άτακτα τοποθετημένες. 3) Η επαγωγή του μονοπατιού κατά την πρώτη μόνο εβδομάδα μετά τα μικροκατάγματα δεν ήταν αρκετή ώστε να επιτευχθούν τα ιστολογικά αποτελέσματα της ομάδας 3. Παρόλα αυτά οδήγησε σε στατιστικά σημαντική υπεροχή στις κατηγορίες επιφάνεια και υποχόνδριο οστό, της ιστολογικής κλίμακας ICRS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Ο αναγεννητικός ιστός που προκύπτει μετά τα μικροκατάγματα σε χόνδρινες βλάβες εμφανίζει ικανοποιητικά βραχυπρόθεσμα κλινικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά ο ινοχόνδρος είναι μηχανικά ασθενέστερος από τον υαλώδη χόνδρο κι εκφυλίζεται ευκολότερα. Η εξασθένηση τείνει να ξεκινήσει μετά τα δυο έτη καθώς ο ινοχόνδρος υφίσταται ρήγματα. [72] Ένας περιορισμός της μελέτης είναι πως ο χρόνος παρακολούθησης δεν ήταν επαρκής για την ανάδειξη της διάρκειας του αναγεννητικού αποτελέσματος.

Αναφορικά με άλλους περιορισμούς της μελέτης είναι βέβαιο πως η χορήγηση Λιθίου απαιτεί παρακολούθηση των επιπέδων του στο αίμα, όπως ακριβώς εφαρμόζεται για τους ασθενείς που το λαμβάνουν ως θεραπεία της διπολικής νόσου. Η εξασφάλιση της απουσίας ανεπιθύμητων ενεργειών επιτυγχάνεται με τη διατήρηση των επιπέδων Λιθίου εντός των θεραπευτικών ορίων. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες οφειλόμενες στη χορήγηση Λιθίου. Επιπλέον το Λίθιο είναι ευρέως γνωστό σα φάρμακο για ψυχικές νόσους, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τη συμμόρφωση των ασθενών που θα το λάμβαναν με διαφορετική ένδειξη. Αυτές οι δυσκολίες θα μπορούσαν να ξεπεραστούν με τη χρήση χρήσης αντισώματος κατά της σκληροστίνης σαν ενεργοποιητή του μονοπατιού.

Αντιθέτως το Λίθιο είναι όχι δαπανηρό φάρμακο, αρκούντως ασφαλές και δοκιμασμένο για αρκετά χρόνια. Επιπρόσθετα η συστηματική χορήγηση εξασφαλίζει ότι μέσω της κυκλοφορίας του αίματος το Λίθιο μεταφέρεται εντός του σχηματιζόμενου θρόμβου κι έτσι η φαρμακευτική του δράση ασκείται αποτελεσματικά, ενώ μια ουσία που χορηγείται με ενδοαρθρική έγχυση έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια κυρίως του θρόμβου. Αυτό είναι κι ένα πλεονέκτημα της θεραπείας με αντισώματα κατά της σκληροστίνης, καθώς χορηγούνται συστηματικά με υποδόρια έγχυση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χορήγηση διαλύματος καρβονικού λιθίου 7mM για 4 εβδομάδες, σε συνδυασμό με μικροκατάγματα ως αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών σε

κονίκλους, οδηγεί σε στατιστικά σημαντική βελτίωση του ιστοπαθολογικού score ICRS τεσσάρων από τα έξι κριτήρια.

Με βάση τα ευρήματα της μελέτης η επαγωγή του μονοπατιού Wnt /  $\beta$  – κατενίνης μπορεί να βελτιώσει τον προερχόμενο από τα μικροκατάγματα ιστό κατά την αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών ολικού πάχους. Συγκεκριμένοι περιορισμοί πρέπει να αντιμετωπισθούν ώστε τα ευρήματα της μελέτης να εφαρμοστούν στην κλινική πράξη. Απαιτούνται πειραματικά μοντέλα που θα αναδείξουν τη βέλτιστη αλληλεπίδραση μεταξύ της αναγεννητικής διαδικασίας που πυροδοτείται από τα μικροκατάγματα και της επαγωγής του μονοπατιού Wnt/  $\beta$  – κατενίνης ενδογενώς. Άλλα μόρια που παίζουν ρόλο στο κανονικό μονοπάτι Wnt μπορεί να μελετηθούν, τελικά όμως το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι πως η επαγωγή του μονοπατιού σε συνδυασμό με μικροκατάγματα είναι αποτελεσματική επικουρική θεραπεία για την αντιμετώπιση χόνδρινων βλαβών ολικού πάχους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Seventh edition. American Society for Bone and Mineral Research.
2. Jeffrey M. Spivak, Paul E. Di Cesare, David S. Feldman, Kenneth J. Koval, Andrew S. Rokito, Joseph D. Zuckerman. Ορθοπαιδική. Οδηγός μελέτης. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2005.
3. Frederic Shapiro (2008) Bone Development and Its Relation To Fracture Repair. The Role of Mesenchymal Osteoblasts and Surface Osteoblasts. European Cells and Materials V o l. 1 5 (5 3 - 7 6)
4. Buckwalter JA, Mankin HJ, (1998), Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect. 47pp. 477-86.
5. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA, (2009), The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health. 1(6): pp. 461-8.
6. Huber M, Trattnig S, Lintner F, (2000), Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. Invest Radiol. 35(10): pp. 573-80.
7. Zhou S, Cui Z, Urban JP, (2004), Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. Arthritis Rheum. 50(12): pp. 3915-24.
8. Beekhuizen M, Bastiaansen-Jenniskens YM, Koevoet W, et al., (2011), Osteoarthritic synovial tissue inhibition of proteoglycan production in human

osteoarthritic knee cartilage: establishment and characterization of a long-term cartilage-synovium coculture. *Arthritis Rheum.* 63(7): pp. 1918-27.

**9.** Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE, (2005), Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(11): pp. 979-87.

**10.** Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al., (2014), Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage.* 22(8): pp. 1077-89.

**11.** Pierre D. McCrea, Dongmin Gu, and Maria S. Balda (2009) Junctional music that the Nucleus Hears: Cell- Cell Contact Signaling and the modulation of Gene Activity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002923.

**12.** Andy J. Chien, William H. Conrad and Randall T. Moon (2009) A Wnt Survival Guide: From Flies to Human Disease *Journal of Investigative Dermatology* (2009) 129, 1614–1627;

**13.** Yuko Komiya and Raymond Habas (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008; Vol. 4 Issue 2

**14.** K.H. Goss and M. Kahn (eds.), *Targeting the Wnt Pathway in Cancer* (2011). Chapter 2. Regulation of Wnt Secretion and Distribution

**15.** Pierre D. McCrea, Dongmin Gu (2010) The catenin family at a glance. *Journal of Cell Sci.* 2010 March 1; 123(5): 637–642.

**16.** Qiang Du and David A. Geller (2010) Cross-Regulation Between Wnt and

NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. For Immunopathol Dis Therap. 2010 ; 1(3): 155–181.

**17.** Bryan T. MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He (2009) Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell. 2009 July ; 17(1): 9–26.

**18.** Donald A. Glass and Gerard Karsenty (2007) In Vivo Analysis of Wnt Signaling in Bone. Endocrinology 2007 148:2630-2634.

**19.** Roland Baron and Georges Rawadi (2007) Minireview: Targeting the Wnt/  $\beta$ -Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. Endocrinology 148(6):2635–2643

**20.** Buckwalter JA. Evaluating methods for restoring cartilaginous articular Surfaces. Clin Orthop Relat Res. 1999; 367:224–38.

**21.** Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. Oper Tech Orthop. 1997; 7:300–4.

**22.** Krusche-Mandl I, Schmitt B, Zak L, Apprich S, Aldrian S, Juras V, et al. Long-term results 8 years after autologous osteochondral transplantation: 7 T<sub>2</sub> gadCEST and sodium magnetic resonance imaging with morphological and clinical correlation. Osteoarthritis Cartilage. 2012; 20:357–63.

**23.** Mithoefer K, Williams 3rd RJ, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am. 2006; 88 :294–304.

24. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*. 2003; 19:477–84.
25. Compston J. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 2002; 173:387–394.
26. Aroen A, Jones D, Fu F. Arthroscopic diagnosis and treatment of cartilage injuries. *Sports Med Arthrosc Rev* 1998; 6: 31–40.
27. Gill TJ, Asnis PD, Berkson EM. The treatment of articular cartilage defects using the microfracture technique. *J Orthop Sports Phys Ther* 2006; 36:728–738.
28. Shapiro F, Koide S, Glimcher M. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg [Am]* 1993; 75A:532–553.
29. Alexander E. Weber, Philip H. Locker, Erik N. Mayer, Gregory L. Cvetanovich, Annemarie K. Tilton, Brandon J. Erickson, Adam B. Yanke, Brian J. Cole. Clinical Outcomes after Microfracture of the Knee. Midterm Follow-up. *Orthop J Sports Med*. 2018 Feb 9;6(2):2325967117753572.
30. Gilbert JE. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. *Am J Knee Surg*. 1997; 11:42–6.
31. Steinwachs M, Gugli T, Kreuz P. Marrow stimulation techniques. *Injury*. 2008; 39:26–31.

- 32.** Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, et al. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res.* 2009; 27(10):1353-60.
- 33.** Caroline D. Hoemann, Mark Hurtig, Evgeny Rossomacha, Jun Sun, Anik Chevrier, Matthew S. Shive, Michael D. Buschmann. Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Improve Hyaline Cartilage Repair in Ovine Microfracture Defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2005; 87:2671-2686.
- 34.** Strauss E, Schachter A, Frenkel S, Rosen J. The efficacy of intra-articular hyaluronan injection after the microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions. *Am J Sports Med.* 2009 Apr; 37(4):720-6.
- 35.** Taner Gunes, Bora Bostan, Mehmet Erdem, Resid Dogan Koseoglu, Murat Asci, Cengiz Sen. Intraarticular Hyaluronic Acid Injection after the Microfracture Technique for the Management of Full-Thickness Cartilage Defects Does Not Improve the Quality of Repair Tissue. *Cartilage* 2012; 3(1)20–26.
- 36.** Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science.* 2012 May 11; 336(6082):717-21.
- 37.** Xu X, Shi D, Shen Y, Xu Z, Dai J, Chen D, Teng H, Jiang Q Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin. *Arthritis Res Ther.* 2015 Feb 2; 17:20.



- 38.** Brian T. Feeley, Steven B. Doty, Zlatko Devcic, Russell F. Warren, Joseph M. Lane. Deleterious Effects of Intermittent Recombinant Parathyroid Hormone on Cartilage Formation in a Rabbit Microfracture Model: a Preliminary Study. *HSSJ* 2010; 6: 79–84.
- 39.** Ceylan HH, Bilsel K, Buyukpinarbasili N, Ceylan H, Erdil M, Tuncay I, Sen C. Can chondral healing be improved following microfracture? The effect of adipocyte tissue derived stem cell therapy. *Knee*. 2016 Jun; 23(3):442-9.
- 40.** Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, Saccomanno MF, Fabbriani C. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy*. 2012 May; 28(5):688-701.
- 41.** Zhang F, Liu D, Wang G, Ren Z. Experimental research of articular cartilage defect repair using micro-fracture and insulin-like growth factor 1 in rabbits. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2014 May; 28(5):591-6.
- 42.** Jonathon Power, Paula Hernandez, Hans Guehring, Alan Getgood, Frances Henson. Intra-Articular Injection of rhFGF-18 improves the Healing in Microfracture Treated Chondral Defects in an Ovine Model. *J Orthop Res* 2014; 32:669–676.
- 43.** Mustafa Karakaplan, Nurzat Elmalı, Efe Mirel, Nurhan Şahin, Emre Ergen, Candan Elmalı. Effect of microfracture and autologous-conditioned plasma application in the focal full-thickness chondral defect of the knee: an experimental study on rabbits. *J Orthop Surg Res*. 2015; 10: 110.

- 44.** Xiaowei Zhang, Shili Wu, Ty Naccarato, Manan Prakash-Damani, Yuan Chou, Cong-Qiu Chu, and Yong Zhu. Regeneration of hyaline-like cartilage in situ with SOX9 stimulation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells PLoS ONE 2017; 12(6): e0180138.
- 45.** A. C. Kuo M.D., Ph.D.y, J. J. Rodrigo M.D.ya, A. H. Reddi Ph.D.y, S. Curtiss A.S.y, E. Grotkopp Ph.D.z and M. Chiu M.Sc Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. OsteoArthritis and Cartilage 2006; 14, 1126e1135.
- 46.** Zhang X, Zheng Z, Liu P, Ma Y, Lin L, Lang N, et al. The synergistic effects of microfracture, perforated decalcified cortical bone matrix and adenovirus-bone morphogenetic protein-4 in cartilage defect repair. Biomaterials. 2008; 29(35):4616-29.
- 47.** Daniel Howard, John Wardale, Hans Guehring, Frances Henson. Delivering rhFGF-18 via a Bilayer Collagen Membrane to Enhance Microfracture Treatment of Chondral Defects in a Large Animal Model. J Orthop Res 2015; 33:1120–1127.
- 48.** Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. Injury 1995; 26:681–686.
- 49.** Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, et al. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. J Orthop Res 2003; 21:503–510.
- 50.** Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. J Orthop Res 2007; 25:51–61.
- 51.** Harper J, Klagsbrun M. Cartilage to bone—angiogenesis leads the way. Nat Med 1999; 5:617–618.

- 52.** Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5:623–628.
- 53.** Francois N.K. Kwong, Judith A. Hoyland, Anthony J. Freemont, Christopher H. Evans. Altered Relative Expression of BMPs and BMP Inhibitors, in Cartilaginous Areas of Human Fractures Progressing towards Nonunion. *J Orthop Res* 2009; 27:752–757.
- 54.** Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20:481–488.
- 55.** Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J. Clin. Invest.* 2008; 118:421–428.
- 56.** Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J. Cell. Physiol.* 2011; 226:3094–3103.
- 57.** Virk MS, et al. Systemic administration of sclerostin antibody enhances bone repair in a critical-sized femoral defect in a rat model. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2013; 95:694–701.
- 58.** Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocr. Rev.* 2012; 33:747–783.
- 59.** Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2012; 5:153–163.
- 60.** Kakar S, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH treated fractures. *J. Bone Miner. Res.* 2007; 22:1903–1912.
- 61.** Chun JS, Oh H, Yang S, Park M. Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep* 2008; 41(7):485e94.
- 62.** Eslaminejad MB, Karimi N and Shahhoseini M. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated by GSK-3 inhibitors. *Histochem Cell Biol.* 2013; 140: 623-33.

- 63.** R.L. Miclea, M. Siebelt, L. Finos, J.J. Goeman, C.W.G.M. Löwik, W. Oostdijk, H. Weinans, J.M. Wit, E.C. Robanus-Maandag, M. Karperien. Inhibition of Gsk3b in cartilage induces osteoarthritic features through activation of the canonical Wnt signaling pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19: 1363-1372.
- 64.** Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Ph.D., Negar Karimi, Maryam Shahhoseini, Ph.D. Enhancement of Glycosaminoglycan-Rich Matrix Production in Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Culture by Lithium Chloride and SB216763 Treatment. *CELL JOURNAL(Yakhteh)*, Vol 13, No 2, Summer 2011.
- 65.** Li S, Maçon ALB, Jacquemin M, Stevens MM, Jones JR. Sol-gel derived lithium-releasing glass for cartilage regeneration. *J Biomater Appl.* 2017 Jul; 32(1):104-113.
- 66.** E. Michael Lewiecki. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. (2014) *Ther Adv Musculoskel Dis* , Vol. 6(2) 48– 57
- 67.** Chan BY, Fuller ES, Russell AK, Smith SM, Smith MM, Jackson MT, Cake MA, Read RA, Bateman JF, Sambrook PN, Little CB (2011). Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19:874-885.
- 68.** Roudier M, Li X, Niu QT, Pacheco E, Pretorius JK, Graham K, Yoon BR, Gong J, Warmington K, Ke HZ, Black RA, Hulme J, Babij P. (2013). Sclerostin is expressed in articular cartilage but loss or inhibition does not affect cartilage remodeling during aging or following mechanical injury. *Arthritis Rheum* 65:721-731.

- 69.** Michelle L. Thompson, Juan Miguel Jimenez-Andrade, Patrick W. Mantyh. (2016) Sclerostin immunoreactivity increases in cortical bone osteocytes and decreases in articular cartilage chondrocytes in aging mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2016, Vol. 64(3) 179–189.
- 70.** Cullinane DM, Fredrick A, Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, Salisbury K, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Induction of a nearthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res* 2002; 20:579-586.
- 71.** Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Oper Tech Orthop.* 1997; 7:300–4.
- 72.** Salzman GM, Sah B, Sudkamp NP and Niemeyer P. Reoperative characteristics after microfracture of knee cartilage lesions in 454 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013; 21: 365-71.