

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ
ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ/ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΠΡΟΚΛΗΤΩΝ
ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ**

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΧΑΤΖΗΠΕΤΡΟΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ

DDS, MSc

ΑΘΗΝΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Τσιχλάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Μέλη:

Δοντά Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Χριστόπουλος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Τσιχλάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Μέλη:

Δοντά Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Χριστόπουλος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Καλύβας Δήμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Τόσιος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Ηλιόπουλος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Δαμάσκος Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Οδοντιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Οδοντιατρικής του Ε.Κ.Π.Α., δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	iv
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	vi
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	2
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ	2
• ΔΟΜΗ.....	2
• ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ.....	11
• ΒΑΣΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.....	17
• ΦΑΤΝΙΑΚΟ ΟΣΤΟΥΝ.....	21
• ΤΡΑΥΜΑ-ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	41
ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ	41
• ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ.....	41
• ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ.....	46
• ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ.....	60
• ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	66
• ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ.....	74
• ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ.....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	91
ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	91
• ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ.....	91
• ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ.....	94
• ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ.....	101
• ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ.....	104
• ΧΙΤΙΝΗ-ΧΙΤΟΖΑΝΗ.....	107
• ΙΚΡΙΩΜΑ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ/ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ.....	112

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	119
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	120
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	121
• ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΝ.....	121
• ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	123
• ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	127
• ΣΤΑΔΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	143
• ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	164
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	165
• ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	165
• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ CBCT ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	166
• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	170
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	189
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	204
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	206
SUMMARY	209
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	216

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επιλογή του κατάλληλου οστικού μοσχεύματος για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων της φατνιακής ακρολοφίας αποτελεί ένα κρίσιμο θέμα για την επιτυχία της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης, προκειμένου να επιτευχθεί η σωστή χειρουργική τοποθέτηση, αλλά και η μακροβιότητα των οστεοενσωματούμενων οδοντικών εμφυτευμάτων.

Η σύγχρονη τάση επιβάλλει τη χρήση συνθετικών κυρίως μοσχευματικών υλικών. Τα τρισδιάστατα σύνθετα ικρίωματα χιτοζάνης/υδροξυαπατίτη συγκεντρώνουν πολλά πλεονεκτήματα και πιθανόν να αποτελέσουν τη λύση σε κλινικά προβλήματα εκτεταμένων οστικών ελλειμμάτων της φατνιακής ακρολοφίας.

Με το τέλος της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς τους ανθρώπους οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου, σε κάθε μου βήμα, ανιδιοτελώς και με απόλυτη πίστη σε μένα και στα όνειρά μου.

Κατά αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και μέντορα μου, κ. Τσιχλάκη Κώστα, Καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την έμπνευση, την ηθική στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δοντά Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά τη συγγραφή της Διδακτορικής μου Διατριβής και για την αμέριστη αγάπη που μου έδωσε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Χριστόπουλο Πάνο, Επίκουρο Καθηγητή της Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη μεταλαμπάδευση όλων εκείνων των βασικών αρχών χειρουργικής τεχνικής και για το ενδιαφέρον του που δε διστάζει να μου το προσφέρει απλόχερα όποτε χρειαστεί.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Τόσιο Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της ιστολογικής και ιστομορφομετρικής ανάλυσης της μελέτης μου, για την υπομονή του και για το ήθος του.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη φίλη μου κ. Καλογήρου Ελένη-Μαρίνα, Υποψήφια Διδάκτωρ της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη βοήθειά της, την ανιδιοτελή προσφορά της και το πραγματικό ενδιαφέρον της για την περάτωση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη φίλη μου κ. Μάνου Μαίρη, Τεχνολόγο του Εργαστηρίου της Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε ακούραστα και για την άριστη ποιότητα της εργασίας της.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Καλύβα Δήμο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για το ενδιαφέρον του και την καθοδήγηση του στον τομέα της έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσιούρβα Δημήτρη, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Νανο-επιστήμης και Νανο-τεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την ανιδιοτελή προσφορά του, τις πολύτιμες γνώσεις του και την άριστη συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, στον κ. Δαμάσκο Σπύρο, Επίκουρο Καθηγητή της Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για το ουσιαστικό ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα στην ολοκλήρωση της ακτινολογικής ανάλυσης της μελέτης μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω από καρδιάς τη φίλη μου κ. Υφαντή Ζαφειρούλα, Υποψήφια Διδάκτωρ της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανεξάντλητη υπομονή της και το πραγματικό ενδιαφέρον της.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Τσιαμπά Ευάγγελο, Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμβολή του στην ιστομορφομετρική ανάλυση της μελέτης μου.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Γιέτο Στέλιο, Ηλεκτρονικό Μηχανικό, για το ήθος του και την ανιδιοτελή προσφορά του στην ολοκλήρωση της μελέτης μου στον τομέα της ψηφιακής ανάλυσης εικόνας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Α΄ και Β΄ κύκλου και όλους τους επιστημονικούς συνεργάτες της Κλινικής Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω το τεχνικό και νοσηλευτικό προσωπικό και όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την άψογη συνεργασία και τον επαγγελματισμό τους.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου την ψυχή τη μητέρα μου Ευδοκία, τον πατέρα μου Νικόλα και τον αδερφό μου Δημήτρη, οι οποίοι είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, στηρίζοντας με αγάπη και τρυφερότητα όλα μου τα όνειρα.

Το παρόν πόνημα είναι αφιερωμένο με όλη μου την αγάπη,

...στη σύζυγό μου, Άννα

...και στα παιδιά μου, Νικόλα και Γιώργη

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

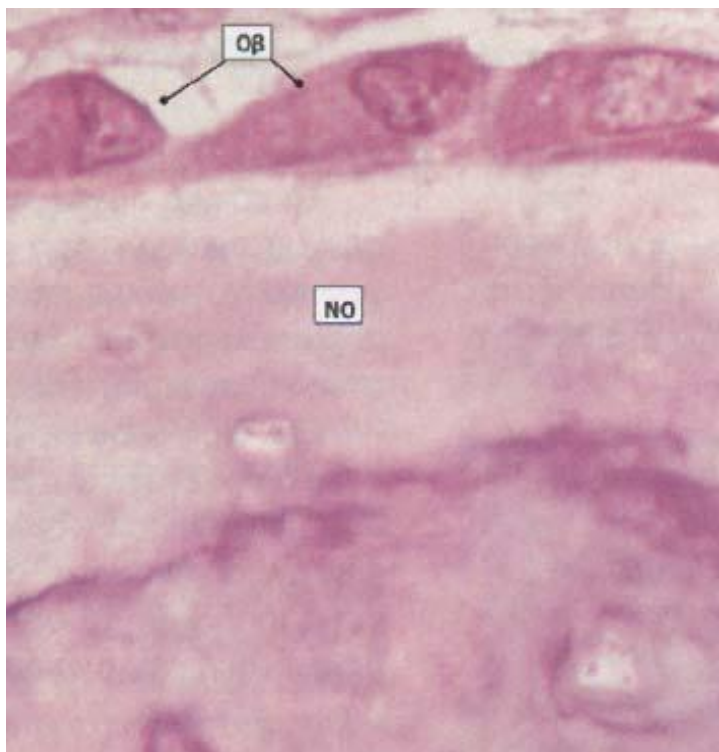
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

ΔΟΜΗ

ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

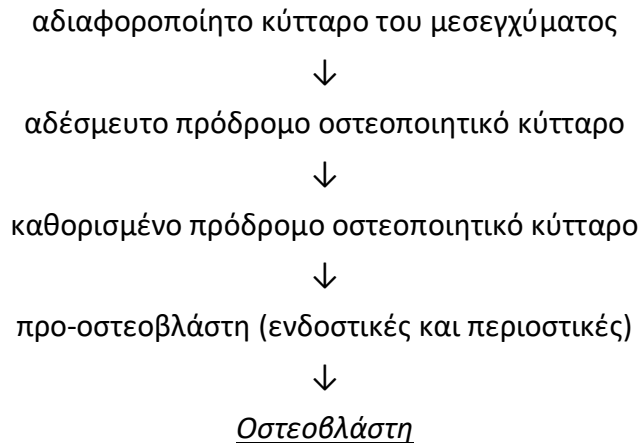
ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ

Η οστεοβλάστη είναι κύτταρο μεσεγχυματικής προέλευσης στο οποίο έχουν αποδοθεί όλες σχεδόν οι βιολογικές λειτουργίες της παραγωγής του οστίτη ιστού (Εικόνα 1). Παρουσιάζει ενεργό συμμετοχή στην παραγωγή του κολλαγόνου, των πρωτεογλυκανών και των γλυκοπρωτεϊνών, δηλαδή στη δημιουργία του οργανικού υποστρώματος. Καθοριστική είναι η συμμετοχή της οστεοβλάστης στη διαδικασία ενασβεστίωσης του οργανικού υποστρώματος σε ώριμο οστίτη ιστό. Η προέλευσή της σχετίζεται με τα πρόδρομα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα του συνδετικού ιστού και με τα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών (Urist 1980, Zaidi et al 1993).



Εικόνα 1: Ιστολογική εικόνα λεπτής τομής εποξυρητίνης, χρωσμένης με κυανούν της τολουιδίνης, οστού που βρίσκεται σε ενεργό αύξηση. Παρατηρείται η στιβάδα των κυβοειδών οστεοβλαστών (Οβ), οι οποίες συνθέτουν και εκκρίνουν οργανική θεμέλια ουσία (οστεοειδές, ΝΟ). Τα κύτταρα έχουν άφθονο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα που οφείλεται στο καλά αναπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου λαμβάνει χώρα η πρωτεϊνοσύνθεση. Ένα μέρος από το οστεοειδές έχει υποστεί ενασβεστίωση. (Stevens & Lowe 1998)

Η ωρίμανση της προ-οστεοβλάστης σε οστεοβλάστη είναι μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχει τόσο το γενετικό υλικό των κυττάρων, όσο και τα παράγωγα αυτού του γενετικού υλικού. Η εξέλιξη του φαινομένου χαρακτηρίζεται από τα εξής στάδια (Βρότσος 1999):



Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της οστεοβλάστης είναι τα εξής:

- Διαστάσεις 15-30μm
- Ασύμμετρο σχήμα
- Πυρήνας που, συνήθως, βρίσκεται προσανατολισμένος σε επιφάνεια αντίθετη με το οστόν και φέρει έντονο πυρηνίσκο
- Παρατηρούνται επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια, σε μεγάλο αριθμό
- Έχουν έντονο και εκτεταμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο που χαρακτηρίζει την αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση. Οι μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου βρίσκονται σε στενή σχέση με τα ριβοσώματα τα οποία είναι επίσης πολυάριθμα
- Πολύ κοντά στον πυρήνα παρατηρείται σύστημα Golgi. Το σύστημα Golgi φέρει καλά ανεπτυγμένες μεμβράνες που βρίσκονται σε στενή επαφή με πολλά κενοτόπια
- Υπάρχουν φυσαλλιδώδη κοκκία μεγάλου μεγέθους που περιέχουν άμορφο υλικό και που πιθανώς αντιστοιχούν στα PAS+ κοκκία, ορατά στο συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο

Τα κύρια ιστοχημικά χαρακτηριστικά των οστεοβλαστών είναι τα εξής:

- Έντονη αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης στη διάρκεια της οστεοποίησης
- Έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα λόγω μεγάλης περιεκτικότητας σε ριβονουκλεϊνικά οξέα (RNA)
- Μικρά κοκκία, ροδόχρωμα στην αντίδραση PAS, που πιστεύεται ότι είναι πρόδρομες μορφές θεμέλιας ουσίας του οστού (Μαυράκος & Βρότσος 1988)

Μία από τις κύριες ουσίες που συνθέτουν οι οστεοβλάστες είναι κολλαγόνο τύπου I. Το κολλαγόνο τύπου I είναι το μόνο κολλαγόνο που μπορεί να μεταλλικοποιηθεί. Όμως, το κολλαγόνο τύπου I που παράγουν οι οστεοβλάστες δεν είναι αρχικά έτοιμο να μεταλλικοποιηθεί. Ως εκ τούτου, χρειάζεται ένα χρονικό διάστημα περίπου 10 ημερών προκειμένου να αρχίσει η διαδικασία της εναλλάτωσης. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία γιατί προφυλάσσει την οστεοβλάστη από τον εγκλωβισμό της στο παραγόμενο από αυτήν οστόν, επιτρέποντας της να συνεχίσει το οστεοπαραγωγικό της έργο (Terminé 1992).

Οι οστεοβλάστες σχηματίζουν επίσης και μικρή ποσότητα κολλαγόνου τύπου III. Η σύνθεση κολλαγόνου από τις οστεοβλάστες επηρεάζεται ορμονικά. Η παραθορμόνη (Parathormone, PTH), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) και η βιταμίνη 1,25(OH)₂D₃ είναι οι κυριότεροι παράγοντες με ανασταλτική, κυρίως, δράση (Dempster et al 1993, Γκισάκης 2011).

Ο οστίτης ιστός περιέχει περίπου 10% μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες με ιδιαίτερη βιολογική δράση. Οι οστεοβλάστες, μέσω της παραγωγής των τεσσάρων ομάδων μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, ασκούν καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο. Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών βοηθά τις οστεοβλάστες στο να προσκολληθούν στη θεμέλια ουσία. Η δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών συντελεί στη δημιουργία συνοχής των ινιδίων του κολλαγόνου. Η τρίτη και η τέταρτη ομάδα μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών βοηθούν στην δέσμευση ιόντων ασβεστίου από το οστεοειδές (Terminé 1992).

Η επικρατέστερη ποσοτικά είναι η οστεοκαλσίνη (Bone Gla-Protein, BGP). Η οστεοκαλσίνη αποτελείται από 47-51 αμινοξέα και 3 μόρια γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος που της δίνουν τη δυνατότητα να αντιδρά με το Ca και τον υδροξυαπατίτη. Η πρωτεΐνη αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως δείκτης στη μελέτη μεταβολικών νόσων του οστίτη ιστού. Από in vivo μελέτη, η οστεοκαλσίνη φαίνεται να σχετίζεται με τον ρυθμό της απορρόφησης και το σχηματισμό νέου οστίτη ιστού (Deftos et al 1982).

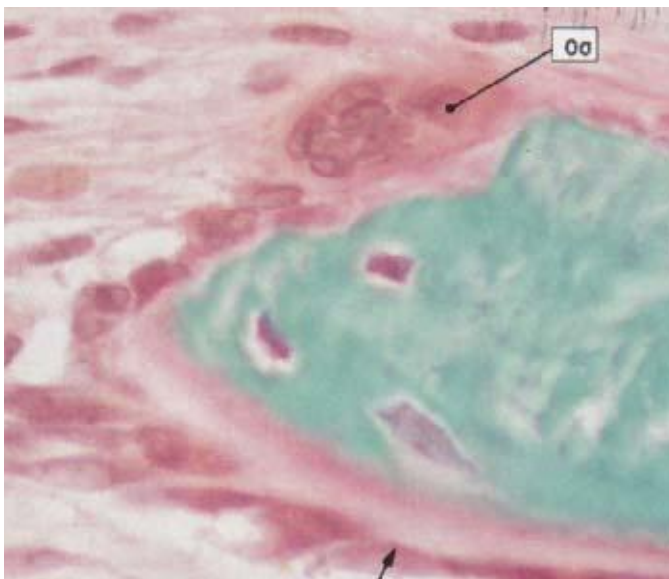
Οι οστεοβλάστες συμμετέχουν στην παραγωγή και εναπόθεση οστού ταυτόχρονα

με τη δράση σειράς πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται ως ρυθμιστικοί παράγοντες. Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), οι μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β), καθώς και ο παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), αποτελούν τους πιο μελετημένους μέχρι τώρα παράγοντες (Schliephake 2002).

Η εξέλιξη της δράσης των οστεοβλαστών οδηγεί σταδιακά στον εγκλεισμό τους σε οστεοειδές και στη μετατροπή τους σε οστεοκύτταρα (Stevens & Lowe 1998, Γκισάκης 2011).

ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

Η οστεοκλάστη είναι το κύτταρο που βασικά ευθύνεται για την οστική απορρόφηση. Πρόκειται για ιδιαίτερα ευμεγέθες κύτταρο, με διάμετρο που φθάνει τα 100 μm και με όγκο μέχρι 200.000 μm^3 . Το γιγαντοκύτταρο αυτό έχει πολλούς πυρήνες (10-20), ενώ έχουν μελετηθεί και οστεοκλάστες με 100 πυρήνες. Ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας είναι η κροσσωτή επιφάνεια του, μέσω της οποίας γίνεται η διαδικασία της απορρόφησης (Γκισάκης 2011) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ιστολογική εικόνα τομής ακρυλικής ρητίνης χρωσμένης με τη μέθοδο Goldner, στην οποία φαίνεται η ενεργός απορρόφηση του οστού στη μία επιφάνεια του, που επιτελείται από μία πολυπύρρηνη οστεοκλάστη (Οσ), η οποία βρίσκεται μέσα σε ένα βοθρίο του Howship. Παράλληλα, στην αντίθετη οστική επιφάνεια (μαύρο βέλος), παρατηρείται εναπόθεση νέου οστεοειδούς από ενεργές οστεοβλάστες, που έχει ως αποτέλεσμα την ανακατασκευή αυτού του οστού. (Stevens & Lowe 1998)

Το κυτταρόπλασμα της οστεοκλάστης είναι πλούσιο σε ακτίνη, η οποία σχετίζεται άμεσα με την οστική απορρόφηση (sealing zone). Στο κυτταρόπλασμα των οστεοκλαστών βρίσκονται πολυάριθμα μιτοχόνδρια, κυστίδια μεταφοράς λυσοσωματικών ενζύμων και συμπλέγματα Golgi με χαρακτηριστική διάταξη γύρω από κάθε πυρήνα. Οι οστεοκλάστες εντοπίζονται πάντα σε επαφή με τις οστικές

επιφάνειες. Ιδιαίτερα αυξημένος είναι ο αριθμός τους σε περιοχές με μεγάλη οστεοκυτταρική δραστηριότητα, όπως στις μεταφύσεις των υπό αύξηση οστών, ενώ παρατηρείται μεγάλη αύξηση εκεί που υφίσταται παθολογική απορρόφηση όπως σε νεοπλάσματα οστών (Ten Cate 1998, Γκισάκης 2011). Ιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει αυξημένη περιεκτικότητα σε όξινη φωσφατάση, αμινοπεπτιδάση, Β-D-γαλακτοσιδάση, 6-D- γλυκοσιδάση, ουδέτερες φωσφατάσες. Η ύπαρξη όλων αυτών των ουσιών προσδίδει ακριβώς τη μεγάλη βιολογική σημασία που έχει η οστεοκλάστη (Baron 1993, Suba et al 1996).

Όλες αυτές οι ουσίες συντελούν στη διαδικασία της οστικής απορρόφησης. Από το χρονικό σημείο που η οστεοκλάστη λάβει το σήμα για να αρχίσει την απορρόφηση, καθλώνεται στην προς απορρόφηση επιφάνεια μέσω της κροσσωτής της επιφάνειας. Η απορρόφηση πραγματοποιείται από την απομονωμένη περιοχή (ζώνη φραγής, sealing zone). Η απομόνωση αυτή της περιοχής απορρόφησης από την υπόλοιπη οστική περιοχή γίνεται μέσω τοιχωμάτων διαχωρισμού και με τη βοήθεια ειδικών ουσιών, των ιντεγκρινών, που συνδέονται με μόρια φμπρονεκτίνης. Στο χώρο αυτό θα δράσουν τα οστεολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται από τους κροσσούς της οστεοκλάστης. Η αναδίπλωση και τα εγκοιλώματα της οστεοκλάστης συντελούν στην καλύτερη καθήλωση της στην υπό απορρόφηση επιφάνεια (Marks & Walker 1981, Chambers et al 1984, Marks & Poroff 1988, Marks et al 1997).

Η δράση της οστεοκλάστης στο ενασβεστιωμένο οστόν είναι η βασική της λειτουργία η οποία οδηγεί στην αποδόμηση-απορρόφηση του οστού. Πολλοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, μερικοί από τους οποίους είναι οι προσταγλανδίνες και το πεπτίδιο ενδοθηλίνη. Επίσης, έχουν μελετηθεί ουσίες όπως το σύμπλεγμα κυτοκινών της θεμέλιας ουσίας, ιντερλευκίνες και παράγοντες διέγερσης των αποικιών (Colony Stimulating Factors, CSFs) (Jilka et al 1992, Kadoya et al 1994).

Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τη δράση των οστεοκλαστών (καλσιτονίνη, κορτιζόλη, φωσφονικά, γ-ιντερφερόνη, διφωσφονικά, υδροκεθυλιδίνη-1 (Chambers & Magnus 1992, Erlebacher et al 1995, Fuller & Chambers 1995).

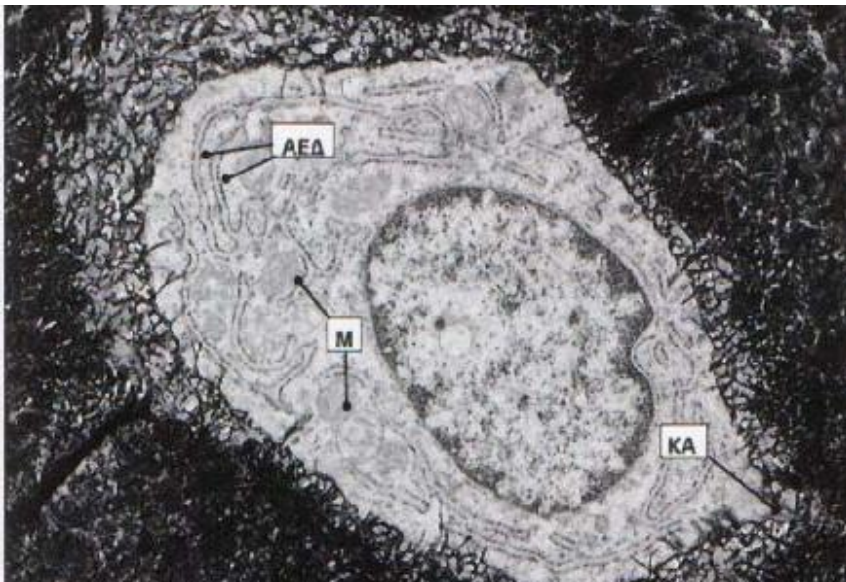
ΟΣΤΕΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα οστεοκύτταρα είναι οστεοβλάστες, οι οποίες εγκλωβίστηκαν στο οστικό υπόστρωμα που οι ίδιες παρήγαγαν και στη συνέχεια αυτό ενασβεστιώθηκε. Δεν εξελίσσονται, όμως, όλες οι οστεοβλάστες σε οστεοκύτταρα. Το 15% των οστεοβλαστών εξελίσσονται σε οστεοκύτταρα. Όταν μία οστεοβλάστη εξελιχθεί σε

οστεοκύτταρο, η κοιλότητα στην οποία εγκλείεται καλείται οστική κοιλότητα. Ο αριθμός τους μπορεί να φθάσει στις 25.000/mm³ οστού. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι οι κοιλότητες αυτές δεν αφορίζονται μεταξύ τους, αλλά συνδέονται με κυτταροπλασματικές αποφυάδες που καλούνται οστεοσωληνάρια και μέσω των οποίων εξασφαλίζεται η επικοινωνία μεταξύ των οστεοκυττάρων, καθώς επίσης και η θρέψη τους (Palumbo et al 1990, Marotti et al 1992) (Εικόνα 3).

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι με τον εγκλεισμό των οστεοβλαστών και την εξέλιξη τους σε οστεοκύτταρα επέρχεται και η βιολογική τους αδράνεια. Σύγχρονες έρευνες, όμως, έδειξαν ότι η μεταβολική τους δραστηριότητα, παρά το γεγονός ότι ελαττώνεται σημαντικά, δεν αίρεται, αλλά εξακολουθεί να υφίσταται έστω και σε περιορισμένο βαθμό (Marotti et al 1992, Γκισιάκης 2011).

Από λειτουργικής άποψης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική η ύπαρξη περιστεοκυτταρικών χώρων που είναι γεμάτοι από εξωκυττάριο υγρό. Η σημασία των χώρων αυτών έγκειται στη μεταφορά ιόντων ασβεστίου από την οστική επιφάνεια προς την αιματική κυκλοφορία (Yoshida et al 1991, Cheng et al 1996). Μελετήθηκε, ακόμη, η συμμετοχή στην οστική σύνθεση, οστεοκυττάρων που έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά οστεοβλαστών, αλλά και οστική απορρόφηση μέσω οστεοκυττάρων που έχουν δομικά χαρακτηριστικά φαγοκυττάρων, δηλαδή λυσοσωματικά κενοτόπια (Braidman et al 1995, Fermor et al 1998).



Εικόνα 3: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ενός οστεοκυττάρου. Παρατηρείται μέρος του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΑΕΔ) και μιτοχόνδρια (Μ), παρόμοια με τα αντίστοιχα της οστεοβλάστης από την οποία προέρχεται. Σημειώστε την έκφυση μιας από τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες (ΚΑ). (Stevens & Lowe 1998)

Η ηλικία επηρεάζει τη μορφολογία των οστεοκυττάρων. Έτσι τα νεαρά σε ηλικία οστεοκύτταρα έχουν εμφανώς κοινά σημεία με τις οστεοβλάστες από τις οποίες προήλθαν, εκτός από τον κυτταρικό τους όγκο και από τα οργανίδια που εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση και είναι σαφώς μειωμένα. Με την πάροδο της ηλικίας οι διαφορές αυτές καθίστανται εντονότερες. Τελική τύχη των οστεοκυττάρων είναι η φαγοκυττάρωση και η αποδόμησή τους, κατά τη διάρκεια της οστεοκλαστικής απορρόφησης (Frost 1993, Kerr et al 1996, Γκισιάκης 2011).

ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ανόργανη φάση του ώριμου σκελετού αποτελεί περίπου το 80% του βάρους του. Η ακριβής ποσοστιαία αναλογία είναι διαφορετική από φλοιώδες σε σπογγώδες οστόν. Βασικά στοιχεία της ανόργανης μοίρας είναι το ασβέστιο και ο φώσφορος. Ποσοτικά υπολογίζεται ότι στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν περίπου 1000gr ασβεστίου και 600gr φωσφόρου. Το ασβέστιο βρίσκεται σε συντριπτικό ποσοστό δεσμευμένο στο σκελετό (περίπου 99%) και μόνο το 1%, περίπου, είναι διαθέσιμο για ανταλλαγή στον εξωκυττάριο χώρο. Τόσο το ασβέστιο, όσο και ο φώσφορος έχουν σημαντική συμμετοχή στις βιοχημικές διαδικασίες της φυσιολογίας του οστού. Πρέπει, ακόμη, να προσθέσουμε ότι στον οργανισμό υπάρχουν και μικρές ποσότητες μαγνησίου (περίπου 25gr) που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρομυϊκή λειτουργία και στις ενζυματικές αντιδράσεις (Sahni 1993).

Είναι γνωστό ότι τα ανόργανα συστατικά βρίσκονται κυρίως με τη μορφή του υδροξυαπατίτη σε αναλογία 1,67 ιόντα Ca προς ιόντα P. Η όλη διαδικασία του σχηματισμού και της εγκατάστασης κρυστάλλων υδροξυαπατίτη ακολουθεί ένα πολύπλοκο μηχανισμό μέσω ενυδάτωσης και σχηματισμού «κελύφους υδάτωσης». Όσο η θεμέλια ουσία δεν έχει πλήρως ενασβεστιωθεί λέγεται οστεοειδές (Bronner 1996).

ΕΝΑΣΒΕΣΤΙΩΣΗ ΟΣΤΕΟΕΙΔΟΥΣ

Η ακαμψία και σκληρότητα του οστίτη ιστού οφείλονται στην παρουσία ανόργανων αλάτων στην οργανική θεμέλια ουσία του οστεοειδούς. Τα άλατα αυτά αποτελούν ένα κρυσταλλικό σύμπλεγμα υδροξειδίου του ασβεστίου και φωσφόρου που ονομάζεται υδροξυαπατίτης $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.

Η ενασβεσίωση του οστού απαιτεί την παρουσία τοπικής συγκέντρωσης τόσο Ca^{+2} όσο και PO_4^{-2} πάνω από συγκεκριμένη τιμή, γεγονός που είναι αποτέλεσμα επίδρασης πολλών παραγόντων. Μία γλυκοπρωτεΐνη του οστεοειδούς (οστεοκαλσίνη) δεσμεύει τα εξωκυττάρια ιόντα Ca^{+2} , με αποτέλεσμα την αύξηση

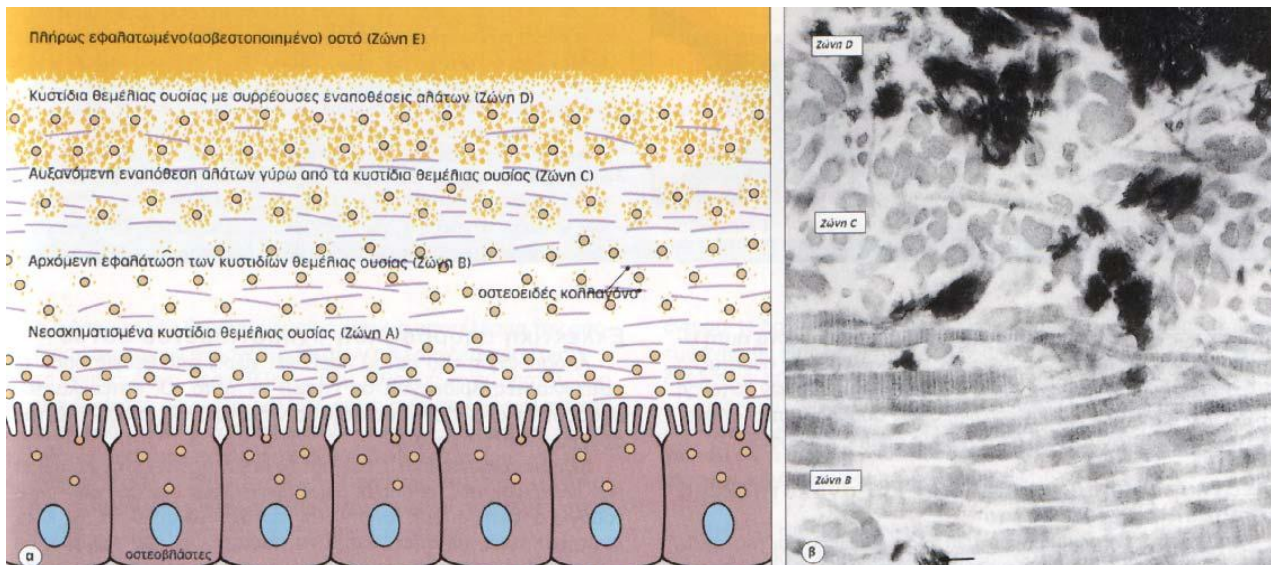
της τοπικής συγκέντρωσής τους. Το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, που βρίσκεται άφθοο στις οστεοβλάστες αυξάνει την τοπική συγκέντρωση των ιόντων Ca^{+2} και PO_4^{-2} . Οι οστεοβλάστες παράγουν κυστίδια θεμέλιας ουσίας, τα οποία συσσωρεύουν ιόντα Ca^{+2} και PO_4^{-2} και είναι, επίσης, πλούσια στα ένζυμα αλκαλική φωσφατάση και φωσφορυλάση, που μπορούν να αποσπούν PO_4^{-2} από μεγαλύτερα μόρια. Τα κυστίδια θεμέλιας ουσίας είναι υποστρόγγυλα και περιβάλλονται από μεμβράνη που, πιθανότατα, προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού οστεοειδούς, τα κυστίδια αυτά αποσπώνται από τις οστεοβλάστες μέσα στο μεσοκυττάριο χώρο και δημιουργούν τους πυρήνες εναπόθεσης αλάτων υδροξυαπατίτη (Ten Cate 1998, Γκισάκης 2011).

Οι σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα κυστίδια της θεμέλιας ουσίας που προέρχονται από τις οστεοβλάστες είναι ο κυριότερος παράγοντας ελέγχου της αρχικής θέσης εναπόθεσης αλάτων στο οστεοειδές. Όταν εναποτεθούν οι πρώτοι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη, συσσωρεύονται γρήγορα μέχρι να συναντήσουν και άλλες εστίες ενασβεστίωσης. Με αυτόν τον τρόπο, ένα κύμα ενασβεστίωσης επεκτείνεται κυκλικά μέσα στο νέο οστεοειδές (Marx & Garg 1998, Stevens & Lowe 1998).

Άλλα είδη κυττάρων που παράγουν κυστίδια θεμέλιας ουσίας είναι οι αδαμαντινοβλάστες και οι οδοντινοβλάστες των αναπτυσσόμενων δοντιών (Τζαμουράνης 1995), καθώς και τα χονδροκύτταρα, γεγονός που ερμηνεύει την ενασβεστίωση που παρατηρείται συχνά στους χόνδρους (Γκισάκης 2011).

Αν οι τοπικές συγκεντρώσεις των ιόντων Ca^{+2} και PO_4^{-2} είναι σε φυσιολογικά επίπεδα, τότε η ενασβεστίωση πραγματοποιείται λίγο μετά το σχηματισμό του νέου οστεοειδούς. Σε καταστάσεις, όμως, αυξημένης οστεογένεσης, οι οστεοβλάστες παράγουν, σε μικρό χρονικό διάστημα, μεγάλες ποσότητες οστεοειδούς, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ενασβεστίωσής του (Γκισάκης 2011).

Ο συγχρονισμός ενασβεστίωσης και παραγωγής οστεοειδούς επιτυγχάνεται μόνο όταν η παραγωγή οστεοειδούς επανέλθει στο φυσιολογικό ρυθμό. Κατά τη διάρκεια της καθυστέρησης της ενασβεστίωσης μπορούν να παρατηρηθούν στιβάδες μη ενασβεστιωμένου οστεοειδούς μεταξύ της στιβάδας των ενεργών οστεοβλαστών και του ήδη ενασβεστιωμένου οστού. Η εικόνα αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής στις φάσεις της ταχείας οστικής ανάπτυξης κατά την εμβρυϊκή ζωή ή κατά τη διάρκεια περιόδων έντονης οστεογένεσης κατά την ενήλικη ζωή, όπως συμβαίνει στην αποκατάσταση ενός κατάγματος ή στην πορεία ορισμένων νόσων (Marx & Garg 1998, Stevens & Lowe 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004, Γκισάκης 2011) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4:

α) Διάγραμμα που απεικονίζει το σχηματισμό νέου οστεοειδούς. Ακριβώς μπροστά από την ακανόνιστη επιφάνεια των οστεοβλαστών βρίσκεται η ζώνη A, η οποία αποτελείται από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες και περιέχει κυστίδια θεμέλιας ουσίας, που έχουν μόλις απελευθερωθεί. Στην επόμενη ζώνη B, αρχίζουν να εναποτίθενται κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη στα κυστίδια της θεμέλιας ουσίας, ενώ στη ζώνη C που ακολουθεί, οι εστίες ενασβεστίωσης αυξάνουν σε μέγεθος, λόγω της ταχείας εναπόθεσης των αλάτων ασβετίου. Στη ζώνη D, οι μεμονωμένες εστίες ενασβεστίωσης, γύρω από τα αντίστοιχα υπολείμματα των κυστιδίων θεμέλιας ουσίας, συρρέουν και ενώνονται μεταξύ τους. Στη ζώνη E, η ενασβεστίωση είναι πλήρης, ενώ το κολλαγόνο του οστεοειδούς δεν είναι πλέον ορατό. Η περιοχή μεταξύ των ζωνών C και D ονομάζεται πρώτη γραμμή ενασβεστίωσης.

β) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, στην οποία διακρίνεται η αρχόμενη εναπόθεση αλάτων Ca σε πρόσφατα σχηματισμένο οστεοειδές (οστούν εμβρύου). Απεικονίζεται η ενασβεστίωση ενός κυστιδίου θεμέλιας ουσίας (μαύρο βέλος) στη ζώνη B και η αύξηση του μεγέθους των εστιών ενασβεστίωσης στη ζώνη C, οι οποίες συρρέουν στη ζώνη D.

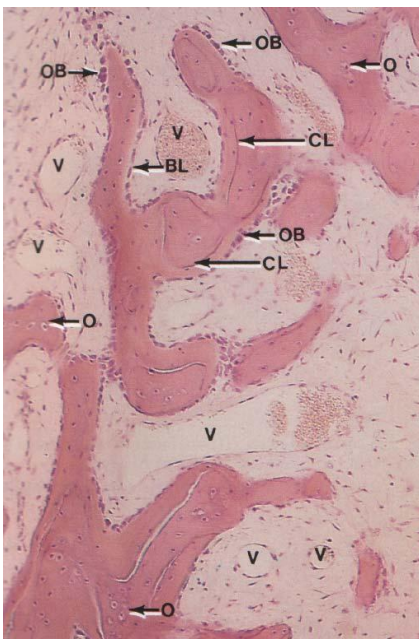
(Stevens & Lowe 1998)

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ο οστίτης ιστός είναι ένα διφασικό υλικό που αποτελείται από ένα οργανικό μέρος (υπόστρωμα-θεμέλια ουσία και ίνες κολλαγόνου), καθώς επίσης και ένα ανόργανο μέρος, αποτελούμενο από μία άμορφη μάζα κρυστάλλων. Η αρχική μορφή του οστού που εμφανίζεται στο έμβρυο προέρχεται από το *μεσέγγυμα* (Ten Cate 1998). Στα αρχικά στάδια της οστεοποίησης παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός και πύκνωση των μεσεγγυματικών κυττάρων τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό ενός φαινότυπου χόνδρου. Ο χόνδρος αυτός θα αποτελέσει σταδιακά τη θέμελια ουσία στην οποία θα εγκατασταθούν οι οστεοβλάστες. Η μετέπειτα πορεία είναι δυνατό να ακολουθήσει δύο κατευθύνσεις, άμεσα (*ενδοχόνδρια οστεοποίηση*) ή έμμεσα (*ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση*) (Aharinejad et al 1995, Buckwalter et al 1995). Και στις δύο περιπτώσεις απαραίτητη είναι η ύπαρξη ενός καλά ανεπτυγμένου αγγειακού δικτύου για τη σύνθεση και την εναλλάτωση της εξωκυττάριας θέμελιας ουσίας (Junqueira et al 1988).

Διακρίνονται δύο τύποι οστίτη ιστού, ανάλογα με τον τρόπο που γίνεται η διάταξη των ινών κολλαγόνου προκειμένου να σχηματιστεί το οστεοειδές (Berman 1993, Stevens & Lowe 1998):

- η δικτυωτή μορφή χαρακτηρίζεται από τυχαία διάταξη των ινών κολλαγόνου, γεγονός το οποίο έχει ως συνέπεια την ελαττωμένη μηχανική ισχύ,
- η πεταλιώδης μορφή παρουσιάζει κανονική παράλληλη διάταξη του κολλαγόνου σε λεπτές δεσμίδες, προσδίδοντας στον οστίτη ιστό μηχανική ισχύ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ιστολογική εικόνα σπογγώδους οστίτη ιστού, από τη γνάθο αναπτυσσόμενου ποντικού. Τα αποπλατυσμένα κύτταρα που επενδύουν την επιφάνεια του σπογγώδους οστού είναι αδρανή προγονικά κύτταρα (BL). Αυτά δίνουν γένεση στις οστεοβλάστες (OB), κυβοειδή κύτταρα που συνθέτουν τη θέμελια ουσία του οστού. Οι γραμμές συγκολλησεως (CL) αφορίζουν τις περιοχές στις οποίες έγινε εναπόθεση οστού. Απεικονίζονται επίσης τα οστεοκύτταρα (O) και τα πολυάριθμα αιμοφόρα αγγεία (V) σε άμεση γειτονία με τις οστικές δοκίδες. (Berman 1993)

Ο σχηματισμός του δικτυωτού οστίτη ιστού πραγματοποιείται κατά την ταχεία παραγωγή οστεοειδούς από τις οστεοβλάστες. Η εναπόθεση των ινών κολλαγόνου γίνεται με έναν ακανόνιστο, χαλαρό, δικτυωτό τρόπο διάταξης. Η μορφή αυτή του οστού αρχικά παρατηρείται στα οστά του εμβρύου, αντικαθίσταται, όμως στη συνέχεια της ανάπτυξης από την ανθεκτικότερη μορφή του πεταλιώδους οστού (Marx & Garg 1998).

Ο δικτυωτός τύπος οστίτη ιστού σχηματίζεται στους ενήλικες, σε περιπτώσεις ταχύτατης παραγωγής νέου οστού, όπως συμβαίνει στην αποκατάσταση ενός κατάγματος ή στη νόσο Paget. Το δικτυωτό οστόν αντικαθίσταται σταδιακά από πεταλιώδες κατά την αποκατάσταση ενός κατάγματος με το μηχανισμό της ανακατασκευής (remodeling).

Στη νόσο Paget, όμως, εξακολουθεί να παραμένει το δικτυωτό οστόν, προκαλώντας μηχανική αδυναμία και δυσμορφία. *Συμπερασματικά, όλος ο οστίτης ιστός σε ένα υγιές ενήλικο άτομο είναι πεταλιώδους τύπου* (Marx & Garg 1998, Stevens & Lowe 1998).

Η διάταξη και η δομή των κολλαγόνων ινών παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντοχή που θα παρουσιάζει το οστόν στις ασκούμενες δυνάμεις (Frost 1990, Schoenau 1998). Είναι πράγματι ενδιαφέρον το γεγονός ότι *ο ανθρώπινος σκελετός λειτουργεί και αντιδρά έτσι ώστε να εξασφαλίζει τη μεγαλύτερη δυνατή αντοχή, διατηρώντας κατά το δυνατό τη μικρότερη μάζα*. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην επαναδιευθέτηση και επαναπροσαρμογή του συμπλέγματος των κολλαγόνων ινών και της ανόργανης φάσης κατά την άσκηση δυνάμεων (Roberts & Hartsfield 2004). Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι τα κύτταρα του οστίτη ιστού έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται τις μηχανικές εξωγενείς επιδράσεις, αλλά και να ανταποκρίνονται με τον κατάλληλο τρόπο σε αυτές. Η αρχιτεκτονική του οστίτη ιστού επηρεάζεται από τη δραστηριότητα των οστικών κυττάρων πολύ περισσότερο από ότι επηρεάζεται από τη δομή και τη διεύθυνση των κολλαγόνων ινών (Gibson et al 1995, Yoder & Williams 1995, Rossert & Crombrughe 1996).

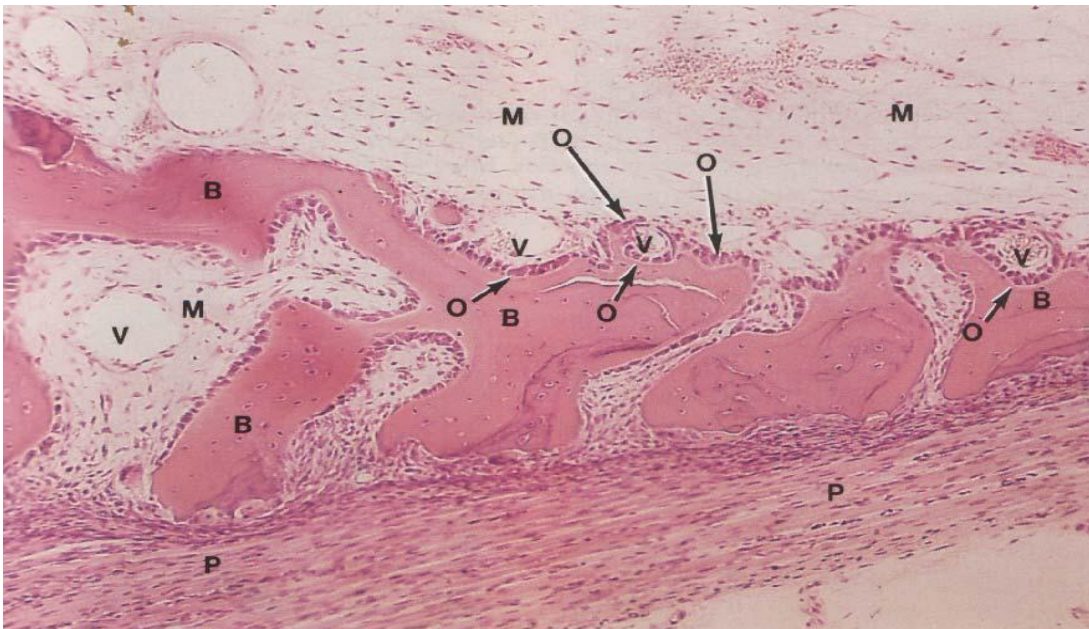
Τα οστά αναπτύσσονται στο έμβρυο με δύο μηχανισμούς:

- *ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση*: συμπύκνωση δεσμίδων μεσεγχυματικών κυττάρων οι οποίες δρουν σαν μεμβράνες που σχηματίζουν οστό ή
- *ενδοχόνδρια οστεοποίηση*: μετατροπή προσηματισμένου χόνδρου (Aharinejad et al 1995, Buckwalter et al 1995)

Με την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση σχηματίζονται κυρίως τα πλατιά οστά, όπως είναι για παράδειγμα τα οστά του κρανιακού θόλου. Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση συμβάλλει, επίσης, και στην κατά πάχος αύξηση των επιμήκων οστών. Κατά την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση ορισμένα από τα αρχέγονα ατρακτόμορφα κύτταρα της μεσεγχυματικής μεμβράνης διογκώνονται, αναπτύσσουν άφθονο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μετατρέπονται σε ενεργά οστεοπρογονικά κύτταρα και εν τέλει, σε οστεοβλάστες.

Οι οστεοβλάστες αρχίζουν την εναπόθεση του οστού σε μεμονωμένες νησίδες, ενώ παράλληλα αρχίζει και η ανακατασκευή του οστού με τη συνδυασμένη δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών που σχηματίζουν τελικά σπογγώδες οστόν.

Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από τις υπολειμματικές νησίδες μεσεγχυματικού ιστού, ενώ ταυτόχρονα άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα σχηματίζουν τελικά τον αιμοποιητικό μυελό των οστών (Stevens & Lowe 1998) (Εικόνα 6).



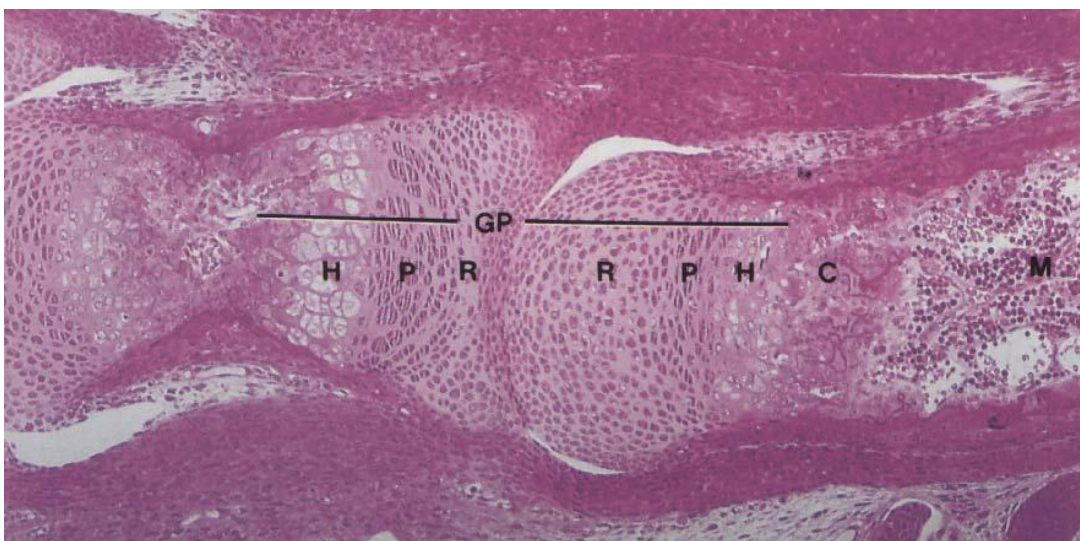
Εικόνα 6: Ιστολογική εικόνα ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης. Διακρίνεται η ανάπτυξη περιostίου (P). Ο εγκλεισμός των αιμοφόρων αγγείων (V) μέσα σε οστόν με οστεοβλαστική (O) δραστηριότητα είναι ενδεικτικός της μετατροπής του σπογγώδους (B) σε συμπαγή οστίτη ιστό. M: μεσεγχυμα. (Berman 1993)

Κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, αρχικά σχηματίζεται ένα πρόπλασμα οστού από υαλοειδή χόνδρο, το οποίο στη συνέχεια οστεοποιείται με εναπόθεση οστεοειδούς και ενασβεστίωση. Με την ενδοχόνδρια οστεοποίηση επιτυγχάνεται η επιμήκυνση και η πάχυνση του οστού στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η ενδοχόνδρια οστεοποίηση παρατηρείται και κατά την παιδική ηλικία, μέχρι την ολοκλήρωση της οστικής ανάπτυξης. Ο υαλοειδής χόνδρος αναπτύσσεται από μια μάζα άωρου μεσεγχυματικού ιστού, λαμβάνοντας κατά προσέγγιση το σχήμα του οστού. Στα επιμήκη οστά παρατηρείται ένα στέλεχος το οποίο καλείται διάφυση

και οι προεκτάσεις σε σχήμα ροπάλου στα δύο άκρα του που ονομάζονται επιφύσεις. Οι χονδροβλάστες περιβάλλουν το χόνδρινο πρόπλασμα του οστού, σχηματίζοντας το περιχόνδριο. Αργότερα, καθώς τα οστικά αρχέγονα κύτταρα υπερέχουν αριθμητικά από τις πρόδρομες χονδροβλάστες, δημιουργείται η στιβάδα που καλείται περίοστεο (Γκισάκης 2011).

Στη μεσότητα της διάφυσης, τα οστεοπρογονικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε οστεοβλάστες, οι οποίες εναποθέτουν οστεοειδές που ενασβεσιώνεται για να σχηματίσει μια οστέϊνη περιχειρίδα γύρω από τη διάφυση. Παράλληλα, τα χονδροκύτταρα του χόνδρινου προπλάσματος πολλαπλασιάζονται έτσι ώστε το χόνδρινο πρόπλασμα να αυξηθεί σε μήκος και πάχος. Οι χονδροβλάστες στο περιχόνδριο/περίοστεο παράγουν νέο χόνδρινο ιστό. Έπειτα, τα άλατα ασβεστίου εναποτίθενται πάνω στο χόνδρινο πρόπλασμα. Μόλις ξεκινήσει ο σχηματισμός της οστέϊνης περιχειρίδας, η διάφυση αυξάνει σε διάμετρο από την εναπόθεση οστεοειδούς στην εξωτερική επιφάνεια της, ενώ συγχρόνως επιτελείται απορρόφηση του οστού στην εσωτερική του επιφάνεια (Stevens & Lowe 1998).

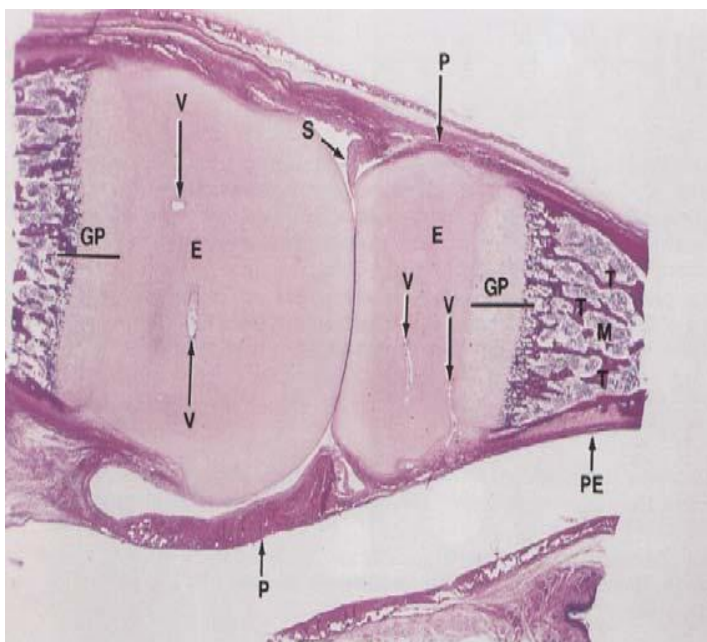
Μέσα στη διάφυση του προπλάσματος αναπτύσσονται τριχοειδή αγγεία, τα οποία διαπερνούν το περίοστεο. Τα αγγεία αυτά μεταφέρουν οστεοπρογονικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν ένα πρωτογενή πυρήνα οστεοποίησης στο μέσο της διάφυσης. Τα αρχέγονα κύτταρα του πρωτογενούς πυρήνα οστεοποίησης της διάφυσης μετασχηματίζονται σε οστεοβλάστες και αρχίζουν να εναποθέτουν οστεοειδές, το οποίο σταδιακά αντικαθιστά το χόνδρο του αρχικού προπλάσματος (Carano & Filvaroff 2003, Mayani et al 2003, Szilvassy 2003) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Ιστολογική εικόνα ενδοχόνδριας οστεοποίησης σε φάλαγγα αναπτυσσόμενου ποντικού. Παρουσιάζονται δύο επιφυσιακές αυξητικές ζώνες (GP), οι ζώνες ηρεμίας (R), πολλαπλασιασμού (P), υπερτροφίας (H) και ενασβεσίωσης (C) του χόνδρου: M: κοιλότητα οστικού μυελού. (Berman 1993).

Η ενασβεστίωση του οστεοειδούς που συνοδεύεται από κάποιου βαθμού ανακατασκευή (*remodelling*) δημιουργεί ένα δίκτυο δοκιδώδους οστού, το οποίο σταδιακά καταλαμβάνει τον πυρήνα της διάφυσης και ενώνεται με το πυκνό συμπαγές οστόν της περιφερικής οστέινης περιχειρίδας. Κατά τη γέννηση αυξάνουν τα αιμοφόρα αγγεία και τα οστεοπρογονικά κύτταρα μέσα στα χόνδρινα άκρα του αναπτυσσόμενου οστού (επιφύσεις) που βρίσκονται εκατέρωθεν της διάφυσης και έχουν σχήμα ροπάλου. Έτσι σχηματίζονται οι δευτερογενείς ή επιφυσιακοί πυρήνες οστεοποίησης (Roberts & Hartsfield 2004).

Τα μακρά οστά αυξάνουν σε μήκος και πλάτος σε όλη τη διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας. Η κατά μήκος αύξηση οφείλεται στο συνεχιζόμενο ενδοχόνδριο σχηματισμό οστού και στα δύο άκρα των μακρών οστών. Κατά μήκος του ορίου επίφυσης και διάφυσης διατηρείται ένας ενεργός πυρήνας αύξησης του χόνδρου (συζευκτικός χόνδρος, *epiphyseal plate*). Ο αυξητικός πυρήνας προάγει το σχηματισμό νέου χόνδρου στα άκρα της διάφυσης. Ο νέος χόνδρινος ιστός μετατρέπεται σταδιακά σε σπογγώδες ή δοκιδώδες οστόν, οδηγώντας σε προοδευτική αύξηση του συνολικού μήκους του οστού. *Η ενεργός δραστηριότητα του συζευκτικού χόνδρου διακόπτεται φυσιολογικά μετά την εφηβεία* (Berman 1993, Stevens & Lowe 1998) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ιστολογική εικόνα σχηματισμού μακρού οστού με ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Στην εικόνα εμφανίζονται η αυξητική ζώνη της επιφύσεως (GP), δοκίδες εφλατωμένου ιστού (T), το περιχόνδριο (P) του υαλοειδούς χόνδρου της επιφύσεως (E), το περίοστεο του οστού της διαφύσεως (PE) και ο αναπτυσσόμενος αρθρικός θύλακας (S). Παρουσιάζονται επίσης τα αιμοφόρα αγγεία (V) στον ανάγγειο επιφυσιακό χόνδρο (E): η παρουσία τους προοιωνίζεται την ανάπτυξη δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης. M: κοιλότητα οστικού μυελού. (Berman 1993)

Στη διαφυσιακή πλευρά του συζευκτικού χόνδρου σχηματίζεται νέο οστόν. Ο χόνδρινος ιστός της επιφυσιακής επιφάνειας του συζευκτικού χόνδρου υπερπλάσσεται, παράγοντας επιμήκεις στήλες από χονδροκύτταρα τα οποία εισέρχονται στη μεσοκυττάρια ουσία. Τα χονδροκύτταρα που προσεγγίζουν τη

διαφυσιακή επιφάνεια του συζευκτικού χόνδρου μεγεθύνονται και γίνονται πιο αραιοχρωματικά, ενώ παράλληλα ξεκινούν την παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης. Η αλκαλική φωσφατάση διευκολύνει την ενασβεστίωση της μεσοκυττάριας ουσίας. Οι οστεοβλάστες εναποθέτουν οστεοειδές στην ενασβεστωμένη χόνδρινη μεσοκυττάρια ουσία. Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο στάδιο της οστεοποίησης των χόνδρινων δοκίδων. Το οστόν που έχει ήδη εναποτεθεί ανακατασκευάζεται, καθώς ενσωματώνεται στη διάφυση (Stevens & Lowe 1998, Γκισάκης 2011).

Ο συζευκτικός χόνδρος και η ζώνη της οστεοποιούμενης χόνδρινης δοκιδώδους μεσοκυττάριας ουσίας σχηματίζουν τη μετάφυση. Η αύξηση της περιμέτρου της διάφυσης επιτυγχάνεται με το σχηματισμό νέου οστού στην εξωτερική επιφάνεια του φλοιώδους οστού, το οποίο υφίσταται μία όχι τόσο ενεργό απορρόφηση στην εσωτερική του επιφάνεια. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαμέτρου της διάφυσης, αλλά και την πάχυνση του φλοιώδους οστού. Η πάχυνση του φλοιώδους οστού είναι απαραίτητη εξαιτίας των πολλαπλών απαιτήσεων που απορρέουν από το αυξανόμενο σωματικό βάρος και την αυξανόμενη σωματική δραστηριότητα (Roberts & Hartsfield 2004, Γκισάκης 2011).

ΒΑΣΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Ο οστίτης ιστός είναι ένας στηρικτικός ιστός, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση, ιδιαίτερα σκληρή σύσταση και ακαμψία. Οι βασικές λειτουργίες των οστών είναι οι εξής:

- Κίνηση του σώματος
- Μηχανική στήριξη
- Προστασία ευαίσθητων ανατομικών περιοχών
- Μεταβολική αποθήκη για τα άλατα

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από:

- Στηρικτικά κύτταρα (*οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα*)
- Κύτταρα αποδόμησης του οστού (*οστεοκλάστες*)
- Οργανική εξωκυττάρια ουσία, αποτελούμενη από κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες (*οστεοειδές*)
- Ανόργανα άλατα, τα οποία εναποτίθενται εντός της εξωκυττάριας ουσίας (Stevens & Lowe 1998)

Ο οστίτης ιστός αποτελεί έναν εξειδικευμένο ιστό, ο οποίος βρίσκεται σε συνεχή διαδικασία αποδόμησης και ανακατασκευής. Διαθέτει πολυάριθμες οστικές κοιλότητες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ειδικά σωληνάρια, τα οστικά σωληνάρια. Ο οστίτης ιστός περιέχει κυτταρικά στοιχεία που ονομάζονται οστικά κύτταρα και εντοπίζονται στη μεσοκυττάρια ουσία (θεμέλια ουσία). Τα οστικά κύτταρα διακρίνονται σε οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες. Πρόκειται για διαφορετικά λειτουργικά στάδια του ίδιου τύπου κυττάρου. Τα οστεοκύτταρα εντοπίζονται στις οστικές κοιλότητες και εμφανίζουν λεπτοφυείς αποφυάδες, που διεισδύουν στα οστικά σωληνάρια. Στον αναπτυσσόμενο οστίτη ιστό τα οστεοκύτταρα έχουν τη μορφή οστεοβλαστών, οι οποίοι παράγουν τα οργανικά στοιχεία της θεμέλιας ουσίας, το κολλαγόνο και τις πρωτεογλυκάνες. Προέρχονται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία ονομάζονται οστεοπρογονικά κύτταρα και ενεργοποιούνται όταν προκύπτει ανάγκη για ανάπτυξη και αναγέννηση του οστίτη ιστού. Αποτέλεσμα της δράσης των οστεοβλαστών είναι η παραγωγή μη ενασβεστιωμένου οστίτη ιστού, που ονομάζεται οστεοειδές. Το οστεοειδές είναι ένας στηρικτικός ιστός που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I. Το κολλαγόνο τύπου I βρίσκεται σε ένα περιβάλλον με γλυκοζαμινογλυκάνες, οι οποίες περιέχουν ειδικές γλυκοπρωτεΐνες, με ιδιότητες ισχυρής δέσμησης του ασβεστίου. Η εναπόθεση των αλάτων ασβεστίου στο οστεοειδές προσδίδει στο οστό τη μηχανική του ισχύ και σταθερότητα (Roberts & Hartsfield 2004).

Οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα τρέφουν το οστεοειδές, στο οποίο θα εναποτεθούν τα ανόργανα άλατα που του προσδίδουν τη σκληρή του σύσταση (Marx & Garg 1998, Garg 2004).

Οι οστεοκλάστες είναι τα κύτταρα του οστίτη ιστού τα οποία ευθύνονται για την αποδόμησή του κατά την ανακατασκευή του. Επανασχηματίζουν, επίσης, σταθερά το εναποτιθέμενο οστόν, δηλαδή το ενασβεστωμένο οστεοειδές. Ταυτόχρονα, προκαλούν διάσπαση των οργανικών συστατικών του οστίτη ιστού και διάλυση των ανόργανων αλάτων που περιέχει η θεμέλια ουσία (Marx & Garg 1998, Garg 2004).

Η θεμέλια ουσία είναι το ακύτταρο τμήμα του οστίτη ιστού, το οποίο περιέχει τα οργανικά και τα ανόργανα συστατικά του. Αποτελείται από νερό, πρωτεϊνούχες οργανικές ενώσεις και ανόργανα άλατα. Το νερό αποτελεί το διαλύτη, μέσα στον οποίο βρίσκονται διαλυμένες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Η σημαντικότερη οργανική ένωση της θεμέλιας ουσίας και του οστίτη ιστού είναι το κολλαγόνο (τύπου I και II), μία πρωτεΐνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες και διατάσσεται στη θεμέλια ουσία με την μορφή ινών, επάνω στις οποίες εναποτίθενται τα ανόργανα άλατα ασβεστίου και φωσφόρου με την μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται ενασβεστίωση του οργανικού μέρους της θεμέλιας ουσίας και αποκτάται η σκληρότητα και η σταθερότητα της δομής του οστού. Άλλες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας είναι οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοπρωτεΐνες. Οι πρωτεογλυκάνες είναι σύνθετες μακρομοριακές ενώσεις, που αποτελούν τους συνδετικούς κρίκους για τη δημιουργία πολύπλοκων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Κυριότερες πρωτεογλυκάνες είναι η ντεκορίνη και η διγλυκάνη, ο ρόλος των οποίων είναι να συνδέουν το κολλαγόνο τύπου I με αυξητικούς παράγοντες, όπως τον TGF- β . Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι μακροπρωτεΐνες που απεκκρίνονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και τους οστεοβλάστες και συμβάλλουν στην πρόσφυση των τελευταίων στο προϋπάρχον οστικό υπόστρωμα προκειμένου να παράγουν νέο οστίτη ιστό. Κυριότερες γλυκοπρωτεΐνες είναι η οστεοποντίνη, η φιμπρονεκτίνη, η θρομβοσποντίνη, η οστική σιαλοπρωτεΐνη (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004).

Ο οστίτης ιστός, ανάλογα με την πυκνότητα των οστικών κοιλοτήτων του και τη διάταξη των οστικών δοκίδων, διακρίνεται σε σπογγώδη και συμπαγή μοίρα. Επίσης, ανάλογα με τον τρόπο της διάταξης των ινών κολλαγόνου στη θεμέλια ουσία διακρίνεται στην ανώριμη/πρωτογενή μορφή και στην πεταλιδώδη/δοκιδωτή μορφή. Ο ανώριμος οστίτης ιστός χαρακτηρίζεται από την παρουσία κολλαγόνων ινιδίων που σχηματίζουν αδρές δεσμίδες, διάσπαρτες προς

διάφορες κατευθύνσεις. Η μορφή αυτή του οστού έχει μικρή περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά. Αντίθετα, η πεταλιδώδης μορφή διαθέτει πυκνές κολλαγόνες ίνες με παράλληλη διάταξη μεταξύ τους και θεμέλια ουσία πλούσια σε ανόργανα άλατα. Με τον τρόπο διάταξης των κολλαγόνων ινών στην πεταλιδώδη μορφή δημιουργούνται λεπτές δεσμίδες, οι οποίες σχηματίζουν τα οστέινα πετάλια, που διασταυρώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τις οστικές δοκίδες, ανάμεσα στις οποίες υπάρχουν μικρά διαστήματα, οι μυελοκυψέλες (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004).

Μεταξύ των οστέινων πεταλιών εντοπίζονται οι οστικές κοιλότητες στις οποίες εντοπίζονται τα οστεοκύτταρα. Από τις οστικές κοιλότητες εκπορεύονται ακτινοειδώς τα οστικά σωληνάρια, τα οποία διακλαδίζονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο, το οποίο επικοινωνεί με τους σωλήνες του Havers. Οι σωλήνες του Havers περιέχουν λεπτά αιμοφόρα αγγεία και χαλαρό συνδετικό ιστό, ενώ περιβάλλονται από πολυάριθμα οστέινα πετάλια σχηματίζοντας τον οστεώνα ή σύστημα Havers. Οι οστεώνες αποτελούν τις δομικές μονάδες του οστού (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004).

Σε κάθε καταστροφή ή απώλεια οστίτη ιστού ο οργανισμός αναλαμβάνει την αποκατάστασή του με μία σειρά βιολογικών διαδικασιών, οι οποίες αποτελούν την οστική αναγέννηση. Η οστική αναγέννηση οδηγεί στη δημιουργία δύο διαφορετικών τύπων οστίτη ιστού, του δικτυωτού ή ανώριμου και του πεταλιδώδους ή δοκιδωτού. Σε κάθε ταχεία οστική αναγέννηση εμφανίζονται πολυάριθμοι οστεοβλάστες και εναποθέτουν ίνες κολλαγόνου που προσανατολίζονται ακανόνιστα (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004).

Παράλληλα, δημιουργούνται νέα οστεοκύτταρα μεγαλύτερα σε μέγεθος τα οποία μαζί με το κολλαγόνο δημιουργούν τους αρχικούς οστεώνες του ανώριμου οστίτη ιστού. Ο ανώριμος οστίτης ιστός έπειτα υφίσταται ενασβεστίωση και περαιτέρω ωρίμανση μέσα σε διάστημα τριών ημερών. Αντίθετα από το δικτυωτό οστίτη ιστό η δράση του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό και το ρυθμό πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών, ο πεταλιδώδης οστίτης ιστός οφείλει τη δομή του στον αργό ρυθμό ανάπτυξής του. Η παραγωγή ινών κολλαγόνου γίνεται βραδύτερα από ότι στο δικτυωτό οστίτη ιστό. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να προσανατολίζονται παράλληλα μεταξύ τους οι ίνες κολλαγόνου. Το οστεοειδές που παράγεται από τους οστεοβλάστες αναπτύσσεται κατά στιβάδες διακριτές μεταξύ τους και η ενασβεστίωσή του ολοκληρώνεται 10 ημέρες μετά την παραγωγή του. Τα οστά είναι ένας ιστός που βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση σύνθεσης και αποδομής, κάτω από τον έλεγχο ορμονικών και φυσικών παραγόντων (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield

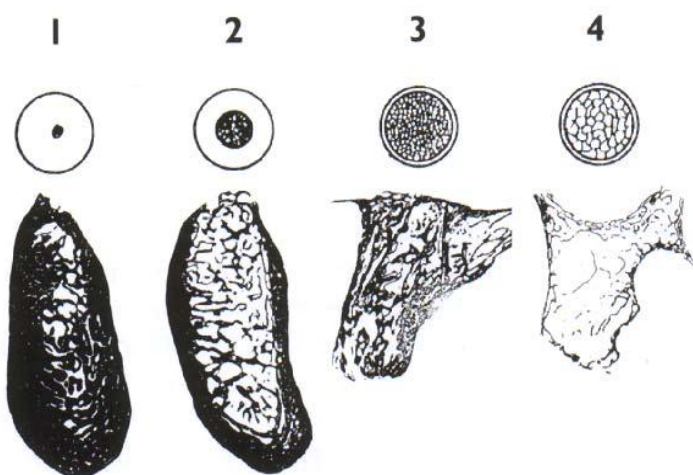
2004, Garg 2004).

Αυτή η σταθερή δραστηριότητα επιτρέπει τη διαδικασία της ανακατασκευής του οστού (τροποποίηση της αρχιτεκτονικής του οστού για την αντιμετώπιση καταστάσεων φυσικής και σωματικής έντασης). Ο κύκλος ανακατασκευής του οστού φυσιολογικά διατηρείται σε χαμηλούς ρυθμούς στον ώριμο ενήλικα, αλλά στα βρέφη και στα παιδιά είναι έντονος, επιτρέποντας την ανάπτυξη και την ενεργό τροποποίηση των οστών που απαιτείται από τις νέες ανάγκες που προκύπτουν, όπως για παράδειγμα την έναρξη της βάδισης. Στους ενήλικες, ο ρυθμός ανακατασκευής των οστών μπορεί να αυξηθεί σε σύγκριση με τα βασικά του επίπεδα, για να αντιμετωπίσει οποιαδήποτε αύξηση των αναγκών όπως είναι, για παράδειγμα, η αποκατάσταση ενός κατάγματος. Επιπλέον, ο αυξημένος ρυθμός ανακατασκευής των οστών μπορεί να είναι αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων που οδηγούν σε κάποια οστική νόσο (Marx & Garg 1998, Roberts & Hartsfield 2004, Garg 2004)

ΦΑΤΝΙΑΚΟ ΟΣΤΟΥΝ

Η ανατομία της φατνιακής απόφυσης είναι ανομοιογενής, όσον αφορά στην αναλογία συμπαγούς και σπογγώδους οστού, σε αντίθεση με την ανατομία των σπονδύλων και της κεφαλής του μηριαίου οστού (Martinez et al 2001, Kanis 2002). Επομένως, η εκτίμηση της ποιότητας του οστού των γνάθων και της φατνιακής απόφυσης βασίζεται σε αυτήν την αναλογία, σύμφωνα με τις οδηγίες των Lekholm και Zarb (1985). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό διακρίνονται 4 τύποι οστικής ποιότητας, ξεκινώντας από τον τύπο 1 (κυρίως ομοιογενές φλοιώδες οστούν) έως τον τύπο 4 (ένα μικρό τμήμα φλοιώδους οστού που περιβάλλει χαμηλής πυκνότητας σπογγώδες οστούν) (Εικόνα 9). Η κατηγοριοποίηση αυτή βασίζεται στην εμπειρία του χειρουργού. Επιπλέον, η ποιότητα του οστού της φατνιακής ακρολοφίας μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τη ροπή διάνοιξης φρεατίου ή με υπολογιστική τομογραφία (Jaffin & Berman 1991, Meredith 1998, Friberg et al 1999, Norton & Gamble 2001).

Παρόλο που οι παραπάνω μέθοδοι ανάλυσης είναι χρήσιμες, ένα εξελιγμένο σύστημα καθορισμού της οστικής ποιότητας θα έπρεπε να βασίζεται σε κυτταρικές παραμέτρους οστικής κατασκευής και επανόρθωσης. Η παραπάνω προσέγγιση θα επέτρεπε στον κλινικό οδοντίατρο την εκτίμηση της πρόγνωσης της θεραπείας με εμφύτευμα ή της οστικής ανάπλασης, γνωρίζοντας την ικανότητα και τις δυνατότητες επούλωσης του οστού του ασθενούς, που αποτελεί την σημαντικότερη παράμετρο επιτυχίας της επέμβασης. Για να γίνουν αντιληπτά τα παραπάνω χαρακτηριστικά θα πρέπει να είναι κατανοητοί οι μηχανισμοί και οι κυτταρικές διαδικασίες ανάπτυξης, κατασκευής και απώλειας του οστού (Gruber 2004).



Εικόνα 9: Η ταξινόμηση της ποιότητας του οστού των γνάθων κατά Lekholm και Zarb (1985)

Τύπος 1: κυρίως φλοιώδες οστούν.

Τύπος 2: σπογγώδες οστούν που περιβάλλεται από μεγάλο πάχους φλοιώδη οστικά πέταλλα.

Τύπος 3: σπογγώδες οστούν περιβάλλεται από λεπτά φλοιώδη οστικά πέταλλα.

Τύπος 4: κυρίως σπογγώδες οστούν χαμηλής πυκνότητας. (Gruber 2004)

Το φατνιακόν οστού ή φατνιακή απόφυση είναι το τμήμα του οστού της γνάθου μέσα στο οποίο εντοπίζονται οι ρίζες των οδόντων. Η διάπλαση του φατνιακού οστού αρχίζει παράλληλα με τη διάπλαση των δοντιών και παραμένει όσο διάστημα διατηρείται η φυσική οδοντοφυΐα. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτελείται ο σχηματισμός του φατνιακού οστού κατά την ανατολή των δοντιών, είναι πολύπλοκος και έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών. Τόσο ο σχηματισμός του δοντιού, όσο και ο σχηματισμός του οστού, καθώς και το φαινόμενο της ανατολής, είναι ανεξάρτητα γεγονότα που συνυπάρχουν και συνεργούν. Το γεγονός ότι είναι ανεξάρτητα φαινόμενα, φαίνεται από μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα που εμφανίζουν οστεοπέτρωση, όπου παρά την απουσία ανατολής το φατνιακόν οστού σχηματίζεται κανονικά (Marks & Cahill 1986). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε άτομα με κλειδοκρανική δυσόσωση όπου υπάρχει καθυστερημένη ή έκτοπη ανατολή της μόνιμης οδοντοφυΐας (Jensen & Kreiborg 1990). Η άποψη ότι το οδοντοθυλάκιο (dental follicle) παίζει καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό φαίνεται να εδραιώνεται με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ανατολή των δοντιών αποτελεί ένα αμφοτερόπλευρο συμμετρικό γεγονός, υπαγορευόμενο από τη λειτουργία του μεσεγχυματικής προελεύσεως οδοντοθυλακίου (Marks & Schroeder 1996). Η διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του οδοντοθυλακίου σε οστεοβλάστες, γίνεται κατά τη φάση της έναρξης ανατολής του δοντιού και ταυτόχρονα αρχίζει ο μηχανισμός του σχηματισμού του φατνιακού οστού. Η φάση της ανατολής είναι από τις πιο ενδιαφέρουσες για τη μελέτη των φαινομένων σχηματισμού και απορρόφησης οστού. Ο ιστός που σχηματίζεται φέρει όλα τα χαρακτηριστικά του ώριμου οστίτη ιστού. Το φατνιακόν οστού παύει να υφίσταται όταν απωλεσθεί η φυσική οδοντοφυΐα (Schroeder et al 1992, El-Amin et al 2004, Γκισάκης 2011).

Μορφολογικά το φατνιακόν οστού αποτελείται από το έξω και έσω συμπαγές πέταλο και από το σπογγώδες οστού που πληρεί το χώρο που δημιουργείται. Η μορφολογία του έχει αναλυτικά περιγραφεί και περιλαμβάνει την παρυφή του φατνιακού οστού, το φατνιακό πέταλο (έσω και έξω), το μεσοδόντιο διάφραγμα και τα φατνία. Σύγχρονες μελέτες, έδωσαν σημαντικά ευρήματα σχετικά με τη μορφολογία, το πάχος και τις διαστάσεις της παρυφής του φατνιακού οστού (MacMillan 1924, Schroeder et al 1992). Το φατνίο, το τμήμα στο οποίο βρίσκεται η ρίζα του δοντιού, σχηματίζεται από συμπαγές οστού το οποίο είναι διάτρητο από μεγάλο αριθμό οπών, μέσα από τις οποίες περνούν αγγεία από και προς το περιρρίζιο. Το οστού αυτό περιγράφηκε ανατομικά και ονομάστηκε *lamina dura*

από τον Horwell-Smith (1913). Έχουν δοθεί και άλλες ονομασίες, όπως διάτρητο πέταλο (cribiform plate) και «κυρίως φατνιακόν οστού» (alveolar bone proper) (Ten Cate 1998). Η ακτινολογική του απεικόνιση είναι σαν *λευκή γραμμή*. Το γεγονός αυτό οδήγησε για μεγάλο χρονικό διάστημα στην πεποίθηση ότι παρουσίαζε υψηλότερο βαθμό ενασβεστίωσης σε σχέση με το υπόλοιπο οστού (Goldman et al 1957, Manson 1994). Σε μελέτη, όμως, του φατνιακού οστού με 125 I και αφού προηγουμένως τόσο το σπογγώδες οστού, όσο και το φατνίο, αλλά και το συμπαγές οστού είχαν κονιοποιηθεί, βρέθηκε ότι δεν υφίσταται μεταξύ τους διαφορετική υφή αλλά μόνο διαφορετική αρχιτεκτονική (Βρότσος 1985). Η επιφάνεια του φατνίου είναι πλούσια σε οστικούς κυτταρικούς σχηματισμούς και παρατηρείται έντονα το φαινόμενο της ζεύξης (Odgren & Marks 1998). Η σύνδεση του δοντιού με το φατνίο γίνεται μέσω των ινών του περιρριζίου, το μέρος των ινών δε που εισέρχεται στο οστού και το δόντι ονομάζονται ίνες του Sharpey. Στο σημείο που γίνεται η ένωση των ινών με το φατνίο μορφολογικά δημιουργείται ένας ιδιαίτερος τύπος οστού που ονομάζεται δεσμιδωτό οστού (bundle bone). Υποστηρίχθηκε από πολλούς ερευνητές η άποψη του σχηματισμού δεσμιδωτού οστού σε περιοχές με αυξημένη μηχανική δραστηριότητα, χωρίς όμως αυτό να αποδειχθεί απόλυτα (Weinemann 1954, Ten Cate 1998). Το σπογγώδες οστού πληρεί όλες τις περιοχές μεταξύ των συμπαγών πετάλων και παρουσιάζει χαρακτηριστική εικόνα πλέγματος από συνένωση επιμηκών οστικών δοκίδων. Το κενό που αφήνουν μεταξύ τους αυτές οι δοκίδες ονομάζεται μυελοκυψέλη. Η κατανομή, το μήκος και ο προσανατολισμός των δοκίδων αυτών μελετήθηκε επίμονα, προσπαθώντας να βρεθεί κάποια συσχέτιση με τη μηχανική λειτουργία του οστού χωρίς αυτό να καταστεί δυνατό (Aisenberg 1952, Bender 1982, Γκισάκης 2011).

Οι μυελοκυψέλες πληρούνται από μυελό των οστών. Ο μυελός των οστών συνεπικουρεί στο σχηματισμό κυττάρων του αίματος και με την πάροδο της ηλικίας αποκτά περισσότερο ινώδη εικόνα. Η ενασβεστίωση του φατνιακού οστού πραγματοποιείται σταδιακά με εναπόθεση αλάτων και δημιουργία κρυστάλλων υδροξυαπατίτη οι οποίοι συσσωρεύονται γύρω από κάθε ίνα κολλαγόνου. Η όλη διαδικασία γίνεται κατά στάδια με αρχική δημιουργία ορισμένων νησίδων ή πυρήνων ενασβεστίωσης γύρω από τους οποίους συνεχίζεται η διαδικασία της ενασβεστίωσης. Στη διαδικασία αυτή παίρνουν μέρος και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη και η οστεονεκτίνη (Τζαμουράνης 1995).

ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η οστική ανάπτυξη στο έμβρυο είναι μια απόλυτα ρυθμιζόμενη διαδικασία η οποία εμφανίζεται με δύο τρόπους: ενδομεμβρανώδη και ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Κατά τη διάρκεια της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης, τα προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα μεταναστεύουν μέσα σε αγγειούμενες ζώνες πλούσιες σε κολλαγόνο, όπου συμπυκνώνονται. Μέσα σε αυτές τις δομές, που προσομοιάζουν με τα μελλοντικά σκελετικά στοιχεία, τα προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες παράγουν θεμέλια ουσία πλούσια σε κολλαγόνο, η οποία στη συνέχεια ενασβεστιώνεται προς πρόδρομο οστού. Το πρόδρομο οστού αρχικά σχηματίζεται ως σπογγώδες δίκτυο, το οποίο παρέχει το ικρίωμα για την πλήρωση με πεταλιώδες οστού. Τα σκελετικά στοιχεία του κρανιακού θόλου και των οστών του προσώπου, καθώς και τμήματα της κάτω γνάθου αναπτύσσονται μέσω ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης. Ενδομεμβρανώδης σχηματισμός πρόδρομου οστού παρατηρείται, επίσης, στα πρώιμα στάδια αποκατάστασης καταγμάτων και στην οστική επούλωση γύρω από τα εμφυτεύματα. Τα περισσότερα τμήματα του ανθρώπινου σκελετού αναπτύσσονται με ενδοχόνδρια οστεοποίηση, κατά την οποία συμπυκνούμενα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς χονδρογενή κύτταρα (Olsen et al 2000, Karsenty & Wagner 2002, Γκισάκης 2011).

Τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα πολλαπλασιάζονται και χαρακτηρίζονται από την έκφραση κολλαγόνου τύπου II^b, το οποίο είναι ειδικό για τα ώριμα χονδροκύτταρα και άλλων μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών όπως η πρωτεογλυκάνη αγγρεκάνη. Τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα εκφράζουν κυρίως κολλαγόνο τύπου X, μετά από περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Μπορούν, επιπλέον, να παράγουν μεταλλικοποιημένη θεμέλια ουσία. Μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα στο περιχόνδριο εγγύς των υπερτροφικών χονδροκυττάρων, διαφοροποιούνται προς οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες παράγουν μια μεταλλικοποιημένη ουσία γύρω από τη θεμέλια ουσία των χόνδρων. Η μεταλλικοποιημένη αυτή ουσία μειώνει την τροφοδοσία των ιστών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται και η μερική πίεση του οξυγόνου. Με τον τρόπο αυτόν ευνοείται η απελευθέρωση αγγειογενετικών μορίων όπως ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας των αγγείων (vascular endothelial growth factor, VEGF) από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα (Montero et al 2000, Kronenberg 2003). Παράλληλα, αγγεία εισχωρούν στην ουσία αυτή και μεταφέρουν προγονικά κύτταρα οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, τα οποία όταν διαφοροποιηθούν στον ώριμο φαινότυπό τους, αντικαθιστούν την

χονδρογενή θεμέλια ουσία με μεταλλικοποιημένη θεμέλια ουσία. Η νεοσχηματισμένη μεταλλικοποιημένη οστική θεμέλια ουσία περιβάλλεται από το περίοστεο, το οποίο παρουσιάζει δύο ιστικά στρώματα (στοιβάδες): το κάμβιο στρώμα (cambium layer) που περιέχει οστεογενή και χονδρογενή προγονικά κύτταρα και την εξωτερική ινοβλαστική στοιβάδα που παρέχει συνδέσεις με τους τένοντες και τους συνδέσμους. Τα κύτταρα που εντοπίζονται μέσα στο κάμβιο στρώμα χρειάζονται για την οστική αύξηση σε διάμετρο, ενώ στους ενήλικες εμπλέκονται στην οστική ανάπλαση (Marks & Hermey 1996, Olsen et al 2000, Kronenberg 2003, Γκισάκης 2011).

ΟΣΤΙΚΗ ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ

Η οστική θεμέλια ουσία παρουσιάζει πολύπλοκη σύνθεση. Αποτελείται από οργανικά και ανόργανα στοιχεία, τα οποία είναι απαραίτητα για την εμφάνιση των μοναδικών φυσικομηχανικών ιδιοτήτων του οστού. Το ανόργανο τμήμα της οστικής θεμέλιας ουσίας αποτελείται κυρίως από υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). Οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη βρίσκονται προσανατολισμένοι κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου στο ενασβεστιούμενο οστεοειδές (Robey 1996). Το κολλαγόνο αποτελεί την κύρια δομική πρωτεΐνη του οστίτη ιστού. Το κολλαγόνο τύπου I αποτελείται από δυο α_1 και μια α_2 αλυσίδες, οι οποίες συμπλέκονται μεταξύ τους. Παρόλο που στο πρόδρομο οστού οι ίνες του κολλαγόνου εμφανίζουν τυχαίο προσανατολισμό, στο πεταλιώδες οστού έχουν πυκνή και παράλληλη διάταξη. Οι οστεοβλάστες παράγουν, επίσης, κολλαγόνο τύπου III, V και XII. Οι οστεοβλάστες έχουν τη δυνατότητα να ενασβεστιώσουν το κολλαγόνο τύπου I. Το γεγονός αυτό ξεχωρίζει τις οστεοβλάστες από άλλα κύτταρα που παράγουν θεμέλια ουσία, όπως για παράδειγμα οι ινοβλάστες (Vuorio & de Crombrughe 1990, Karsenty & Park 1995, Sodek & McKee 2000).

Οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούν τις βασικές μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από μακριές αλυσίδες επαναλαμβανόμενων θειούχων δισακχαριτών, οι οποίες καλούνται γλυκοζαμινογλυκάνες και ενώνονται με ένα κεντρικό μόριο πρωτεΐνης. Η θειική χονδροϊτίνη είναι η κύρια γλυκοζαμινογλυκάνη της οστικής θεμέλιας ουσίας (Young et al 1992, Robey 1996).

ΟΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Οι οστεοβλάστες είναι τα μόνα κύτταρα τα οποία μπορούν να παράγουν οστική θεμέλια ουσία. Εντούτοις, η διατήρηση της οστικής θεμέλιας ουσίας, ποσοτικά και ποιοτικά απαιτεί την παρουσία και άλλων κυττάρων τα οποία είναι ικανά να

αντιληφθούν τις απαιτήσεις για οστική ανάπλαση. Ο ανθρώπινος σκελετός, επίσης, λειτουργεί σαν δεξαμενή ασβεστίου και φωσφόρου. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού απαιτούνται κύτταρα τα οποία μπορούν να απελευθερώσουν τα ιόντα αυτά από τη θεμέλια ουσία. Παρατηρούνται, λοιπόν, τέσσερις κυτταρικοί οστικοί τύποι: οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, οστεοκύτταρα και κύτταρα επιφανείας. Οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και τα κύτταρα επιφανείας είναι μεσεγγυματικής προέλευσης, ενώ οι οστεοκλάστες προέρχονται από αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα (Sodek & McKee 1996).

Η βασική λειτουργία των οστεοβλαστών είναι η σύνθεση και εναπόθεση της οστικής θεμέλιας ουσίας. Οι οστεοβλάστες εντοπίζονται αποκλειστικά στην επιφάνεια του οστού, στην οποία και εναποθέτουν την πλούσια σε κολλαγόνο θεμέλια ουσία, που ονομάζεται οστεοειδές (Puelo & Bizios 1991, Devin et al 1996).

Μικρός αριθμός οστεοβλαστών εγκλωβίζεται μέσα στη θεμέλια ουσία. Οι οστεοβλάστες οι οποίες εγκλωβίζονται μέσα στη θεμέλια ουσία που παράγουν ονομάζονται οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός πυκνού μικροαγγειακού δικτύου, το οποίο επιτρέπει τη διάχυση θρεπτικών συστατικών και μοριακών σημάτων. Μέσω του μικροαγγειακού δικτύου τα οστεοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν τις μεταβολές στην ροή των μεσοκυττάρων υγρών. Όταν το δίκτυο αυτό διακόπτεται λόγω μικροκαταγμάτων ή χειρουργικών επεμβάσεων, τα οστεοκύτταρα καταστρέφονται και δίνουν το έναυσμα για την οστική αναδιαμόρφωση. Τα οστεοκύτταρα συνδέονται, επίσης, με τις οστεοβλάστες, τα κύτταρα επιφανείας και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Η διάρκεια ζωής τους επηρεάζεται από ορμόνες όπως τα γλυκοκορτικοειδή, που επιταχύνουν την απόπτωσή τους, με αποτέλεσμα να σηματοδοτείται η έναρξη της οστικής αναδιαμόρφωσης (Cronowicz & McCarthy 1996, El-Amin et al 2002).

Τα κύτταρα επιφανείας προέρχονται από οστεοβλάστες, οι οποίοι έχουν απωλέσει την ικανότητα παραγωγής θεμέλιας ουσίας. Τα κύτταρα επιφανείας παρουσιάζουν επίπεδο σχήμα και σχηματίζουν μια δομή, η οποία προσομοιάζει με επιθήλιο. Η δομή αυτή συνδέεται με το δίκτυο των οστεοκυττάρων. Το δίκτυο των οστεοκυττάρων επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ των οστεοκυττάρων στο εσωτερικό του οστού και στην εξωτερική επιφάνεια. Τα οστεοκύτταρα είναι δυνατό να σηματοδοτούν την ανάγκη για οστική ανάπλαση στα κύτταρα επιφανείας, τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν μόρια σήματα που ενεργοποιούν την οστική αναδιαμόρφωση (Jackson & Simon 1996, Laurencin et al 1998, Γκισάκης 2011).

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από την αιματοποιητική σειρά κυττάρων και αποτελούν τα βασικότερα κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην οστική απορρόφηση

(Lerner 2000, Teitelbaum & Ross 2003). Οι ώριμες οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα κύτταρα με πλατύ σχήμα, τα οποία παρουσιάζουν μία ελικοειδή διαδρομή προς την θεμέλια ουσία. Η οστική θεμέλια ουσία περιβάλλεται από μία ζώνη κάλυψης, η οποία αποτελεί μία δομή που μοιάζει με τους δακτυλίους της ακτίνης και συνδέεται με τον κυτταροσκελετό (Suda και συν 1992, Roodman 1999, Teitelbaum 2000).

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Αγγειογένεση καλείται η δημιουργία νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων από ήδη υπάρχοντα αγγεία. Η αγγειογένεση είναι μία διαδικασία απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την αποκατάσταση των καταγμάτων και την επούλωση των τραυμάτων. Αρχικά, μεταλλοπρωτεΐνάσες προκαλούν αποσύνθεση της βασικής μεμβράνης των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων. Όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερωθούν από ένα αγγείο, μεταναστεύουν στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν δομές, οι οποίες προσομοιάζουν με τριχοειδή αγγεία. Η δημιουργία της μικροκυκλοφορίας αποτελεί και το τελικό αποτέλεσμα της αγγειογένεσης (Risau 1997, Gill et al 2001, Carano & Filvaroff 2003).

Αντίθετα, ο σχηματισμός των αγγείων εξαρτάται από την συγκέντρωση των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων του ενδοθηλίου στη θέση σχηματισμού. Αυτά τα κύτταρα μάλλον είναι αιμαγγειοβλάστες, οι οποίες προέρχονται από το μυελό των οστών και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς κύτταρα της μυελώδους σειράς και προς ενδοθηλιακά κύτταρα (Rafii & Lyden 2003, Γκισάκης 2011).

Ο αριθμός των ενδοθηλιακών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος αυξάνεται, ως απόκριση σε ένα αγγειακό τραύμα. Το γεγονός αυτό, δείχνει ότι απελευθερώνονται παράγοντες από τις θέσεις των τραυμάτων, οι οποίοι φαίνεται να ευνοούν την κινητοποίηση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στην αιματική κυκλοφορία. Τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα προσελκύονται στην περιοχή του τραύματος και συμβάλλουν στο σχηματισμό νέων αγγείων (Gerber et al 1999, Street et al 2002).

Η ρύθμιση των πολύπλοκων αυτών διαδικασιών πραγματοποιείται με την τοπική απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων. Ο VEGF αποτελεί έναν αυξητικό παράγοντα, ο οποίος αυξάνει τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό σωληναριακών δομών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGF εντοπίζεται στο αιμάτωμα που δημιουργείται ως συνέπεια ενός κατάγματος. Ενισχύει, επίσης, το σχηματισμό αγγείων, την ενασβεσίωση και ωρίμανση του πόρου, την ένωση των κατεαγότων οστικών τμημάτων, συνεπικουρώντας με αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη και αποκατάσταση των οστών. Τα μακροφάγα, τα μεσεγχυματικά

προγονικά κύτταρα και οι ώριμες οστεοβλάστες που συμβάλλουν στην οστική αποκατάσταση εκφράζουν τον VEGF (Yancopoulos et al 2000, Street et al 2002). Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της οστικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια σχηματισμού του αγγειοβριθούς κοκκιώδους ιστού. Στη συνέχεια η αγγειογένεση παρατηρείται κατά την οστική ανακατασκευή. Τα αγγεία παρέχουν τα προγονικά κύτταρα για την διαφοροποίηση προς οστεοβλάστες και οστεοκλάστες. Το γεγονός αυτό επισημαίνει ότι ο σχηματισμός τους παίζει κεντρικό ρόλο στην οστική ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της οστεοενσωμάτωσης των οδοντικών εμφυτευμάτων (Mori et al 1998, Hausman et al 2001).

Αρχικά, το ενδιαφέρον για τη νεοαγγειογένεση προκλήθηκε από το φαινόμενο της αγγειογένεσης στους όγκους. *Οι όγκοι δεν αυξάνονται πέρα των 2-3 χιλιοστών και δεν μπορούν να δώσουν μεταστάσεις εκτός αν αναπτυχθεί νεοαγγειογένεση.* Τα μακροφάγα δρουν ως επαγωγείς ή διαμορφωτές της αγγειογένεσης. Η αγγειογενετική δραστηριότητα των μακροφάγων συνδέεται με την εκκριτική τους δραστηριότητά (Folkman 2001, Kelsey et al 2002).

Η δημιουργία των νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων ακολουθεί μία πορεία διάφορων σταδίων. Η ακολουθία των γεγονότων για τα ενδοθηλιακά κύτταρα ξεκινά με την αποδόμηση της βασικής μεμβράνης και την τοπική αποσύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα, οι φλεγμένοντες ή νεοπλασματικοί ιστοί παρουσιάζουν διαρροή των τριχοειδών αγγείων με την έκκριση της ινικής, η οποία χρησιμεύει επίσης ως μια μεταναστευτική μήτρα για τα ενδοθηλιακά και άλλα κύτταρα. Για την επιμήκυνση των νέων τριχοειδών αγγείων, τα μεταναστεύοντα ενδοθηλιακά κύτταρα πρέπει να αντικατασταθούν από, πρόσφατα, διαιρεμένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εν τέλει, η μετανάστευση και η μίτωση πρέπει να σταματήσουν, ενώ οι νεαροί τριχοειδικοί βλαστοί διαφοροποιούνται στα ώριμα τριχοειδή αγγεία με μια νέα βασική μεμβράνη. Τα μακροφάγα μπορούν να προωθήσουν όλες τις φάσεις της αγγειογενετικής διαδικασίας με τη βοήθεια των εκκριτικών προϊόντων τους (Folkman 2001, Quesenberry & Gallin 2001).

Τα μακροφάγα είναι σε θέση να αλλάξουν τη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με διάφορους τρόπους:

- 1) με την απελευθέρωση ενζύμων αποσύνθεσης,
- 2) με τη σύνθεση μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως η ινονεκτίνη ή οι πρωτεογλυκάνες,
- 3) με την απελευθέρωση μονοκινών με τροποποιητικά αποτελέσματα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Quesenberry & Gallin 2001).

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι τα μοναδικά αιματικά κύτταρα εκτός από τα αιμοπετάλια που παράγουν τους PDGF. Οι PDGF είναι οικογένεια διμερών πρωτεϊνών που αποτελούνται από μία αλυσίδα Α ή/και μία αλυσίδα Β. Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, αλλά όχι τα κυκλοφορούντα στο αίμα μονοκύτταρα, εκφράζουν το γονίδιο για την Β-αλυσίδα των PDGF. Ο PDGF έχει επίδραση και σε άλλα κύτταρα που συμμετέχουν στην επούλωση των τραυμάτων, εκτός από τα άμεσα αποτελέσματα στο ενδοθήλιο. Ο PDGF είναι, επίσης, ισχυρός χημειοτακτικός και μιτογόνος παράγοντας για τα μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ ενεργοποιεί τα μακροφάγα και υποκινεί τη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Quesenberry & Gallin 2001, Murphy et al 2002).

Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (vascular endothelial growth factor, VEGF) είναι μία πρωτεΐνη, η οποία επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο VEGF αυξάνει επιπροσθέτως την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλεί έκκριση σερίνης και μεταλλοπρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Folkman 2001).

Η παρουσία μακροφάγων και κοκκιοκυττάρων αποτελεί μία βασική προϋπόθεση για την νεοαγγειογένεση, σύμφωνα με ιστολογικές εικόνες ιστών με τρέχουσα αγγειογένεση. Η αγγειογενετική δραστηριότητα των κοκκιοκυττάρων βρέθηκε μικρότερη από αυτήν των μακροφάγων, σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες (Folkman 2001, Quesenberry & Gallin 2001).

ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (BONE REMODELING)

Η κύρια διαδικασία, η οποία συνεπικουρεί στη διατήρηση της οστικής μάζας και στην προσαρμογή της στις λειτουργικές φορτίσεις καλείται οστική ανακατασκευή. Η οστική ανακατασκευή παράλληλα είναι απαραίτητη κατά την οστεοενσωμάτωση των οδοντικών εμφυτευμάτων. Αναφέρεται ως μία συντονισμένη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την οστική απορρόφηση από τις οστεοκλάστες και την ταυτόχρονη δημιουργία νέου οστού από τις οστεοβλάστες. Οι οστεοκλάστες δημιουργούν κανάλια απορρόφησης μέσα στην ενασβεστωμένη θεμέλια ουσία. Η οστεοκλαστική δραστηριότητα είναι παράλληλη με την ανάπτυξη των τριχοειδών αγγείων μέσα στα κανάλια απορρόφησης. Οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τη θεμέλια ουσία κατά την απορρόφηση, προσελκύουν μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, τα οποία καταφθάνουν στην περιοχή μέσω των τριχοειδών αγγείων και διεγείρουν τη διαφοροποίησή τους σε λειτουργικές οστεοβλάστες. Οι ώριμες οστεοβλάστες εναποθέτουν οστεοειδές μέσα στα κανάλια

απορρόφησης, το οποίο στη συνέχεια ενασβεστιώνεται. Ως αποτέλεσμα, τα κανάλια απορρόφησης γεμίζουν με στρώματα πεταλιώδους (ώριμου) οστού, με ένα αγγείο να παραμένει στο μέσον (Manolagas 2000, Parfitt 2000, Γκισάκης 2011).

Τα μεσεγχυματικής προέλευσης προγονικά κύτταρα είναι δυνατό να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες, αλλά μπορούν, επίσης, να διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα, κύτταρα λιπώδους ιστού και μυϊκά κύτταρα. Το φαινόμενο της διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης ελέγχεται από ορμόνες και τοπικούς παράγοντες. Τα μόρια σήματα ενώνονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς και είτε αυξάνουν, είτε περιορίζουν την έκφραση των επονομαζόμενων “master-genes” (κυρίαρχα γονίδια) (Manolagas 2000, Bianco et al 2001). Η οστική διάπλαση, ανάπτυξη και ανακατασκευή προϋποθέτει την παρουσία μοριακών σημάτων που ρυθμίζουν την έκφραση των οστεογενετικών γονιδίων στα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα (Yamaguchi et al 2000, Ducky et al 2000, Nakashima et al 2002, Harada & Rodan 2003). Οι BMPs (bone morphogenetic proteins, BMPs) κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, δρουν ως μορφογονίδια στις μεσεγχυματικές πυκνώσεις (*BMP-5*), στο περιχόνδριο (*BMP-2*, *BMP-4* και *BMP-7*) και στις αναπτυσσόμενες αρθρώσεις (*προερχόμενη από τους χόνδρους μορφογενετική πρωτεΐνη 1 -cartilage derived morphogenetic protein 1*) (Reddi 1998, 2001). Η πρωτεΐνη Sonic hedgehog (Shh) ρυθμίζει την εμβρυϊκή διαμερισματοποίηση. Σε πειραματικές μελέτες με μύες, η έλλειψη της πρωτεΐνης Shh οδηγεί σε απώλεια σπονδύλων. Η πρωτεΐνη Indian hedgehog (Ihh) εκφράζεται στους χόνδρους και ρυθμίζει την χονδρογενή διαφοροποίηση. Μεταλλάξεις της Ihh οδηγούν σε αποτυχία της ανάπτυξης των οστεοβλαστών στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση, ενώ η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση παραμένει ανεπηρέαστη. Οι πρωτεΐνες Shh και Ihh έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν την οστεογενετική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων και *in vitro*. Παρόμοια με τις BMPs, η μεταμόσχευση ινοβλαστών, που εκφράζουν σε υψηλό βαθμό τις Shh και Ihh, σε αθυμικά (athymic, χωρίς θύμο αδένες) ποντίκια προκαλεί έκτοπο σχηματισμό οστού (Reddi 1998, Iwamoto et al 1999, Karsenty & Wagner 2002, Kronenberg 2003). Η παραθυρεοειδική ορμόνη (parathyroid hormone, PTH) θεωρείται παράγοντας οστικού καταβολισμού. Εντούτοις, όταν χορηγείται διακεκομμένα σε χαμηλές δόσεις, είναι δυνατό να προκαλέσει αύξηση του φλοιώδους και σπογγώδους οστού. Οι αναβολικές αυτές δράσεις παρατηρούνται σε δόσεις που δεν αυξάνουν τα επίπεδα Ca^{2+} στο αίμα. Η διακεκομμένη χορήγηση ελαττώνει το ρυθμό απόπτωσης των οστεοβλαστών στην οστική επιφάνεια. Ως αποτέλεσμα, τα οστεοκύτταρα βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο οστόν που δημιουργείται κατά τη

διάρκεια θεραπείας με PTH. Η PTH χρησιμοποιείται σε τοπική και συστηματική θεραπεία οστικής ανάπτυξης (Kronenberg & Chung 2001, Lips 2001, Neer et al 2001, Seeman & Delmas 2001). Το τοπικό περιβάλλον των οστεοβλαστών και των προγονικών τους κυττάρων περιέχει μιτογόνα και χημειοτακτικούς παράγοντες. Οι ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες I και II (insulin-like growth factors – I, II, IGF-I, II) και οι ρυθμιστές τους, δρουν ως μιτογόνα των οστεοβλαστών (Croner 1996, Rosen 2000). Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor, PDGF) είναι ένα διμερές μόριο και είναι μιτογόνος για τις οστεοβλάστες, ενισχύοντας την οστεογενετική διαφοροποίηση.

Ως απάντηση στη δράση του PDGF ελαττώνεται η σύνθεση κολλαγόνου τύπου I, ενώ αυξάνεται η οστική απορρόφηση (Canalis & Rydziel 1996, Schliephake 2002). Παρουσία του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) ελαττώνεται η οστεογενετική διαφοροποίηση, ενώ διεγείρεται η παραγωγή οστεοκλαστών και ο σχηματισμός των αγγείων (Chikazu et al 2001, Schliephake 2002). Τα μοριακά σήματα που επηρεάζουν τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα ή τις διαφοροποιημένες οστεοβλάστες είναι δυνατό να εμπλέκονται και στην οστική απορρόφηση (Gruber 2004).

Ποικιλία τοπικών και συστηματικών παραγόντων διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη γένεση, στη δραστηριότητα και στη διάρκεια ζωής των οστεοκλαστών. Σε παθήσεις του οστικού μεταβολισμού, σε χρόνια λήψη φαρμάκων, σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής και σε ηλικιωμένους ασθενείς παρατηρείται διαταραχή της οστεοκλαστικής δραστηριότητας (Suda et al 1999, Roodman 1999, Teitelbaum 2000, Chambers 2000, Hofbauer et al 2000, Kong et al 2000, Lerner 2000). Η 1,25 διϋδροξυβιταμίνη D₃ (1,25[OH]₂D₃) και η PTH είναι δυνατό να διεγείρουν την οστική απορρόφηση. Παρόλα αυτά, στις ώριμες οστεοκλάστες και στα προγονικά οστεοκλαστικά κύτταρα απουσιάζουν οι υποδοχείς της βιταμίνης D και της PTH. Συνεπώς, αυτές οι ορμόνες δρουν εμμέσως στην γένεση των οστεοκλαστών.

Οι τοπικοί και συστηματικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή των οστεοκλαστών ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, αναφορικά με τον τρόπο μετάδοσης των πληροφοριών στα στρωματικά κύτταρα και στις οστεοβλάστες:

- α) Η 1,25[OH]₂D₃ συνδέεται με τον υποδοχέα της βιταμίνης D₃ (VDR),
- β) Η οικογένεια της ιντερλευκίνης 6 (interleukin-6, IL-6) μεταδίδει τα σήματα μέσω της γλυκοπρωτεΐνης 130 (glycoprotein 130),
- γ) Οι IL-1, PTH και προσταγλανδίνη E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) διεγείρουν την πρωτεϊνική κινάση A (Raisz 1999, Kong et al 2000, Γκισιάκης 2011)

ΟΣΤΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Ο οστίτης ιστός παρουσιάζει το φαινόμενο της διά βίου απορρόφησης. Η οστική σύνθεση και η οστική απορρόφηση διαδραματίζονται παράλληλα σε ένα οργανισμό, διατηρώντας μεταξύ τους ένα πηλίκιο ισορροπίας. Παρόλαυτά, η απορρόφηση παρουσιάζει αυξανόμενη τάση, διαταράσσοντας αυτό το πηλίκιο ισορροπίας. Η οστική απορρόφηση είναι ένα φαινόμενο σύνθετο: η δράση των οστεοκλαστών αυξάνει σε σχέση με τη δράση των οστεοβλαστών που παραμένουν σταθερές. Είναι πιθανόν, επίσης, να παρατηρηθεί αύξηση της απορροφητικής δραστηριότητας όταν οι οστεοβλάστες υπολείπονται σε παραγωγή, με τις οστεοκλάστες να είναι σταθερές. Μπορεί να συμβαίνουν και τα δύο ταυτόχρονα: μείωση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας με ταυτόχρονη αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας (Martin et al 1989, Robey 1989).

Δύο θεωρίες προσπαθούν να εξηγήσουν το σύνθετο φαινόμενο της οστικής απορρόφησης (Ziegler et al 1995).

Η πρώτη είναι η θεωρία του ενός κυττάρου. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η οστεοκλάστη παρουσιάζει όλους τους απαιτούμενους μηχανισμούς ώστε να ολοκληρώσει τη διαδικασία της απορρόφησης (Ziegler et al 1995). Το ανόργανο τμήμα αποδομείται με την εμφάνιση οξέων, ενώ το οργανικό αποδομείται από υδρολάσες, οι οποίες απελευθερώνουν τα οστεοκλαστικά λυσοσώματα (Bertolini et al 1986, Delmas 1990). Παράλληλα, παρατηρείται απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου και η κολλαγενάση παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην αποδόμηση του κολλαγόνου (Gunniess & Hock 1993, Hansen- Birkedaal 1993).

Η δεύτερη είναι η θεωρία των δύο κυττάρων. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι η οστεοκλάστη χρειάζεται και τη βοήθεια ενός άλλου κυττάρου προκειμένου να φθάσει στο αποτέλεσμα της οστικής απορρόφησης (Ziegler et al 1995). Τα κύτταρα αυτά που συνδράμουν τις οστεοκλάστες για να επιτευχθεί η απορρόφηση του οστού είναι κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες. Στην περίπτωση αυτή, η οστεοκλάστη αποδομεί το ανόργανο τμήμα, ενώ το κύτταρο που μοιάζει με ινοβλάστη (μονοκύτταρο) προσβάλλει το κολλαγόνο (Fuller & Chambers 1995, Goldring & Golarring 1996). Και στις δύο θεωρίες, στα αρχικά στάδια παρατηρείται η καταστροφή του κολλαγόνου και έπειτα συμβαίνει η φαγοκυττάρωση των ανόργανων συστατικών (Reynolds & Meikle 2000).

Η «αντλία πρωτονίων» η οποία συντελεί στη δημιουργία υπο-οστεοκλαστικού χώρου που οδηγεί στην έκκριση ιόντων υδρογόνου, έχει μελετηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια. Η καρβονική ανυδράση είναι ένα ένζυμο, το οποίο φαίνεται να

έχει ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία της αντλίας πρωτονίων. Η καρβονική ανυδράση καταλύει την αντίδραση του CO_2 προς H_2CO_3 (Gemmell & Seymour 1994). Σε αυτόν τον υπο-οστεοκλαστικό χώρο με pH 4,5-4,9 αρχίζει η διάλυση της ανόργανης φάσης, ενώ σταδιακά αρχίζει και η αποδόμηση του κολλαγονούχου υποστρώματος (Sunquist & Marks 1995, Γκισιάκης 2011).

Η οστική απορρόφηση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο στο οποίο εμπλέκονται σειρά από ανοσολογικούς μηχανισμούς. Τα λεμφοκύτταρα-μονοκύτταρα σχετίζονται με την εμφάνιση οστεοπέτρωσης σε πειραματόζωα. Ο ενεργοποιητικός παράγοντας των οστεοκλαστών (osteoclastic activating factor, OAF), ο παράγοντας αναστολής μετανάστευσης (migration inhibitory factor, MIF) και η κυκλοσπορίνη-A φαίνεται να σχετίζονται με τους μηχανισμούς της οστικής απορρόφησης (Chambers et al 1985, Bornefalk et al 1994).

Ο μηχανισμός της οστικής απορρόφησης και της οστικής σύνθεσης υφίσταται αρκετές επιδράσεις από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες σε τέτοιο βαθμό, ώστε να διαταράσσεται το πηλίκο της σχέσης αυτής και να παρατηρούνται εκδηλώσεις νοσημάτων του μεταβολισμού των οστών. Τα μεταβολικά νοσήματα των οστών, όπως η οστεοπόρωση, οφείλονται στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οστικής σύνθεσης και οστικής απορρόφησης. Σε παρόμοια διαταραχή του πηλίκου σύνθεσης-απορρόφησης οφείλονται και τα νοσήματα γενετικής προέλευσης, όπως η οστεοπέτρωση (Eder & Watzek 1999). Γενικά, μετά από την οστεοκλαστική δραστηριότητα, παρατηρείται το φαινόμενο της απόπτωσης και απομάκρυνσης (Hughes et al 1995).

ΤΡΑΥΜΑ – ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

Η παθολογική μεταβολή της φυσιολογικής κατάστασης ενός ιστού σε κλινικό και σε ιστολογικό επίπεδο καλείται *τραύμα*. Το τραύμα προκαλείται από φυσικά, χημικά και μηχανικά αίτια. Στα φυσικά αίτια περιλαμβάνονται οι ακραίες θερμοκρασίες, οι ακτινοβολίες, η αφυδάτωση, η παρεμπόδιση της αιμάτωσης. Στα χημικά αίτια κατατάσσονται ουσίες με μη φυσιολογικό pH, οι οποίες περιέχουν διάφορα ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά διασπούν την ακεραιότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στα χημικά αίτια περιλαμβάνονται, επίσης, ουσίες που προκαλούν ισχαιμία λόγω αγγειοσύσπασης ή θρόμβωσης. Τα μηχανικά αίτια του τραύματος είναι η τομή ή σύνθλιψη ενός ιστού (Μαρουφίδης 2009).

Ο οστίτης ιστός είναι ένας πολύ δυναμικός ιστός σε ιστολογικό επίπεδο. Η ικανότητά του να ανταπεξέρχεται στις συνεχείς φορτίσεις εξασφαλίζεται μέσω ενός μηχανισμού συνεχούς επιδιόρθωσης των μικροβλαβών τόσο στο σπογγώδες, όσο και στο συμπαγές οστό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οστική αναδιαμόρφωση (*bone remodeling*) και προϋποθέτει την ακριβή και συντονισμένη δράση των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών (Boyce & Xing 2008, Fink-Eriksen 2010). Η ρύθμιση της οστικής αναδιαμόρφωσης πραγματοποιείται με τη βοήθεια τοπικών και συστηματικών παραγόντων (Kempen et al 2010).

Οι τοπικοί αυξητικοί παράγοντες είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσης. Εντοπίζονται σε μικρές συγκεντρώσεις μέσα στην οστική θεμέλια ουσία και ελέγχουν την κυτταρική λειτουργία μέσω αυτοκρινούς, παρακρινούς και ενδοκρινούς μηχανισμού (Kempen et al 2010).

Οι συστηματικοί αυξητικοί παράγοντες αφορούν στις ορμόνες που συμμετέχουν στον οστικό μεταβολισμό. Τέτοιες ορμόνες είναι η παραθυρεοειδής ορμόνη, η 1,25-διυδροξυ-βιταμίνη D₃ και οι ορμόνες του φύλου (Qin et al 2003, Luvizuto et al 2010, Stein et al 2011).

Η επούλωση ενός τραύματος (*wound healing*) είναι μία πολύπλοκη βιολογική διαδικασία με την οποία ο οργανισμός αναλαμβάνει να αποκαταστήσει την ακεραιότητα του τραυματισμένου ιστού. Η επανόρθωση (*repair*), η αποκατάσταση (*rehabilitation*) και η επανακατασκευή (*reconstruction*) είναι όροι που αποδίδουν την έννοια της επούλωσης του τραύματος (Μαρουφίδης 2009). Μεγάλος αριθμός κυτταρικών και χυμικών συστατικών συνεργούν για την αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού. Οι διεργασίες αυτές επηρεάζονται και ελέγχονται από πολλούς παράγοντες όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, οι ορμόνες, διάφορα συστατικά του αίματος καθώς και γενετικοί παράγοντες και η ηλικία (Davidson

1995).

Οι αυξητικοί παράγοντες, μάλιστα, ενώ εντοπίζονται σε ποσότητες νανογραμμαρίων, εμφανίζουν ισχυρή επίδραση στην επουλωτική διεργασία (Davidson 1995). Οι αυξητικοί παράγοντες, επίσης, αλληλεπιδρούν με διάφορα είδη κυττάρων που σχετίζονται με την επουλωτική διαδικασία, όπως είναι οι οστεοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες (Grazul-Bilska et al 2003, Werner & Grose 2003).

Η επούλωση ενός τραύματος αποτελεί μια σύνθετη και πολύπλοκη διαδικασία, η οποία εμφανίζει τρία στάδια:

- το φλεγμονώδες-αιμοστατικό (*inflammatory/hemostatic phase*)
- το ινοπλαστικό- διηθητικό (*proliferative/cellular phase*) και
- το αναπλαστικό (*remodeling phase*)

(Adelmann & Cully 1990, Bhanot & Alex 2002)

Η επανορθωτική διαδικασία μιας τραυματικής βλάβης υποστηρίζεται από κυτταρικούς και χυμικούς παράγοντες. Αρχικά, παρατηρείται μια καταβολική λανθάνουσα περίοδος που διαρκεί περίπου μία βδομάδα. Έπειτα, ακολουθεί μία δεύτερη περίοδος πολλαπλασιασμού, διάρκειας περίπου 2 εβδομάδων. Τέλος, παρατηρείται η φάση αναδόμησης και επανόρθωσης, η οποία διαρκεί αρκετούς μήνες. Ο έντονος κυτταρικός μεταβολισμός εξασφαλίζει το απαραίτητο υπόστρωμα για τις μιτωτικές διαδικασίες και τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων (Schliephake 2002). Η ανεμπόδιστη και απρόσκοπτη αιματική παροχή, μέσω της μικροκυκλοφορίας στην περιοχή του τραύματος, αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για τη φυσιολογική αναγέννηση των ιστών (Lindeboom et al 2007).

Τα 3 στάδια της επούλωσης ενός τραύματος είναι τα εξής:

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΣ ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Η επουλωτική διαδικασία αρχίζει αμέσως μετά την πρόκληση του τραύματος με το φλεγμονώδες επουλωτικό στάδιο. Το φλεγμονώδες στάδιο επούλωσης διαρκεί 3-5 ημέρες. Αρχικά, τα τριχοειδή αγγεία του τραυματισμένου ιστού υφίστανται αγγειοσύσπαση. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ροή του αίματος και τη διακοπή της αιμορραγίας. Μέσα σε λίγα λεπτά τα λευκά αιμοσφαίρια εκκρίνουν ισταμίνη και προσταγλανδίνες E1 και E2, οι οποίες προκαλούν αγγειοδιαστολή. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει μεγέθυνση των διαστημάτων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος, προκειμένου να

διαφύγει το πλεονάζον πλάσμα και τα λευκά αιμοσφαίρια να εισχωρήσουν στο μεσοκυττάριο χώρο. Το πλάσμα από τα αγγεία περιέχει ινική που προκαλεί απόφραξη των λεμφαγγείων. Έτσι, το πλάσμα παραμένει εγκλωβισμένο και η περιοχή του τραύματος διογκώνεται. Οι ανωτέρω διεργασίες αποτελούν την *αγγειακή φάση* της φλεγμονής (Μαρουφίδης 2009).

Μετά από την αγγειακή φάση της φλεγμονής ακολουθεί η *κυτταρική φάση*, κατά την οποία προκαλείται και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος του ορού. Η διάσπαση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος δρα χημειοτακτικά και προκαλεί την προσκόλληση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων. Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα εισέρχονται στην περιοχή του τραύματος μέσω των επιθηλιακών κυττάρων. Σε αυτή τη χρονική στιγμή απελευθερώνουν πρωτεάσες από το περιεχόμενο των λυσοσωματίων τους, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν τους νεκρωτικούς ιστούς. Η απαρτίωση της αποδόμησης γίνεται με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Η κυτταρική φάση της φλεγμονής ολοκληρώνεται με την εμφάνιση στην περιοχή του τραύματος των Β- και Τ- λεμφοκυττάρων. Τα Β-λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν τα ξένα σώματα ως αντιγόνα και παράγουν αντισώματα έναντι αυτών, ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Τα Τ-λεμφοκύτταρα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των Β- λεμφοκυττάρων. Ταυτόχρονα, ως κατασταλτικά κύτταρα, ρυθμίζουν τη δράση των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, ενώ ως κυτταροτοξικά καταστρέφουν κύτταρα που φέρουν ξένα αντιγόνα (Μαρουφίδης 2009).

Η οστική επούλωση μετά από τραύμα ξεκινάει με την πλήρωση του οστικού ελλείμματος με νεκρωτικό ιστό, αίμα από τα παρεκείμενα τραυματισμένα αιμοφόρα αγγεία και φλεγμονώδη κύτταρα. Η μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή του τραύματος διεγείρεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο σημάτων (Schroeder & Mosheiff 2011). Η κυτταρική απάντηση συντονίζεται και περιλαμβάνει την έκκριση πληθώρας κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β (transforming growth factor-β, TGF-β), του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2), του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF), των ιντερλευκινών-1 (IL-1) και ιντερλευκινών-6 (IL-6), των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (bone morphogenetic proteins, BMPs) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) (Gerstenfeld et al 2003, Schindeler et al 2008). Η δράση των παραγόντων αυτών δημιουργεί ένα μονοπάτι θετικής ανατροφοδότησης για την

περαιτέρω προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων, αλλά και επάγει τη μετανάστευση πολυδύναμων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων στην περιοχή του οστικού ελλείμματος (Malizos & Paratheodorou 2005, Colnot et al 2006, Shapiro 2008).

ΙΝΟΠΛΑΣΤΙΚΟ-ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Στο δεύτερο στάδιο της επουλωτικής διαδικασίας δημιουργείται ένα δίκτυο ινών ινικής, το οποίο εντοπίζεται σε όλη την έκταση του τραύματος. Στο δίκτυο αυτό εγκαθίστανται ινοβλάστες, που παράγουν θεμέλια ουσία, άμορφο κολλαγόνο και ινονεκτίνη. Η θεμέλια ουσία αποτελείται από βλενοπολυσακχαρίτες. Στους βλενοπολυσακχαρίτες συγκολλώνται οι ίνες κολλαγόνου που παράγονται. Η ινονεκτίνη σταθεροποιεί το δίκτυο ινών ινικής και δρα χημειοτακτικά για την προσέλκυση ακόμα περισσότερων ινοβλαστών. Παράλληλα η ινονεκτίνη καθοδηγεί τα μακροφάγα στις ίνες της ινικής, προκειμένου αυτά να τη φαγοκυτταρώσουν. Δημιουργούνται, επίσης, νέα τριχοειδή αγγεία τα οποία στερεώνονται στο δίκτυο της ινικής. Τα νεοσχηματισθέντα τριχοειδή αγγεία προέρχονται από αγγεία, τα οποία εντοπίζονται σε γειτονικές περιοχές του τραύματος. Τα νέα αυτά τριχοειδή αγγεία αναλαμβάνουν να μεταφέρουν στην περιοχή του τραύματος το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά για το μεταβολισμό των κυττάρων που μεταναστεύουν στην περιοχή. Η δημιουργία νεόπλαστου αγγειακού δικτύου και συνδετικού ιστού συνδυάζεται από ταυτόχρονη αποδόμηση του δικτύου ινικής. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ινωδόλυση και προκαλείται από την πλασμίνη που παρέχουν τα νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία. Το κολλαγόνο που συντίθεται σε αυτό το στάδιο εναποτίθεται άμορφο και συντίθεται σε μεγάλες ποσότητες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται ακόμα και στο δεύτερο αυτό στάδιο σχετικά μικρή σταθερότητα του τραύματος, η οποία με την πάροδο του χρόνου διαρκώς αυξάνεται (Μαρουφίδης 2009).

Σε κυτταρικό επίπεδο, παρατηρούνται πολυάριθμα χονδροκύτταρα και ινοβλάστες, που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα. Τα χονδροκύτταρα πολλαπλασιάζονται και αντικαθιστούν με χόνδρο τον ινώδη/κοκκιοματώδη ιστό, ενώ οι ινοβλάστες πληρούν τα εναπομείναντα κενά με νέο ινώδη ιστό (Shindeler et al 2008). Έπειτα, η ινο-χόνδρινη αυτή μήτρα ενασβεστιώνεται από υπερτροφικά χονδροκύτταρα και λειτουργεί ως ικρίωμα για την παραγωγή νέου οστίτη ιστού. Η διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων και των ινοβλαστών διεγείρονται από τη συντονισμένη δράση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β2 (transforming growth factor-β2,

TGF- β 2) και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού- β 3 (TGF- β 3), του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών-1 (fibroblast growth factor-1, FGF-1) (Gerstenfeld et al 2003). Ταυτόχρονα, οι BMPs-2, -4, -5, -6 προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη χονδρογένεση (Ai-Agl et al 2008). Η παραγωγή πρωτογενούς οστίτη ιστού (woven bone) προϋποθέτει την αγγειοποίηση της ινο-χόνδρινης μήτρας. Ο VEGF, ο FGF-1, ο TGF- β και τα μέλη των BMPs συντονίζουν την προσέλκυση αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων εντός του χόνδρου, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη τριχοειδών στην περιοχή του οστικού ελλείμματος (Deckers et al 2002, Gerstenfeld et al 2003, Weiss et al 2009). Η δημιουργία του αγγειακού δικτύου είναι πολύ σημαντική διαδικασία, αφού η καλή οξυγόνωση των ιστών στην περιοχή του οστικού ελλείμματος διεγείρει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες. Άρα, με αυτόν τον τρόπο προάγεται η οστική εναπόθεση (Peng et al 2005). Η οστική επούλωση στην πλειοψηφία των ελλειμμάτων πραγματοποιείται με χονδρογενή οστεοποίηση (Schindeler et al 2008). Η αρχική μήτρα του πρωτογενούς οστίτη ιστού αποτελείται από οξινο-πρωτεϊνική και ενασβεστωμένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, που παράγεται από τις ώριμες οστεοβλάστες. Η διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων σε ώριμες οστεοβλάστες επιτελείται με τη συνεπικουρία οστεοεπαγωγικών παραγόντων. Ορισμένες BMPs έχουν έντονη οστεοεπαγωγική δράση και μπορεί να προκαλέσουν *de novo* σύνθεση οστού (Chen et al 2004, Nakase & Yoshikawa 2006). Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες προέρχονται κυρίως από το περίοστεο και το μυελό των οστών (Malizos & Paratheodorou 2005, Colnot et al 2006). Παρόλα αυτά, σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη και άλλων πηγών βλαστικών κυττάρων όπως για παράδειγμα η αιματική κυκλοφορία (Eghbali-Fatoureechi et al 2005), ο αγγειακός ιστός (Collett & Ganfield 2005) και γενικότερα οι περιβάλλοντες τοπικοί ιστοί (Rumi et al 2005).

ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ

Το ανασκευαστικό στάδιο επούλωσης αποτελεί το στάδιο της ωρίμανσης του τραύματος, κατά το οποίο αποδομούνται οι πρώτες τυχαία προσανατολισμένες ίνες κολλαγόνου που δημιουργήθηκαν στο προηγούμενο στάδιο και αντικαθίστανται από νέες, παράλληλα προσανατολισμένες. Συνεπώς, στην περιοχή του τραύματος παρατηρείται μεγαλύτερη σταθερότητα. Ταυτόχρονα, μειώνεται και ο συνολικός

αριθμός των ινών με αποτέλεσμα να μειώνεται και η σχετική σκληρότητα του τραύματος. Στο ανασκευαστικό στάδιο επούλωσης ελαττώνεται η μεταβολική δραστηριότητα της περιοχής του τραύματος. Ολοκληρώνεται, επίσης, το αγγειακό δίκτυο και ο προσανατολισμός των νέων ινών κολλαγόνου στο χώρο. Οι παράγοντες αυτοί είναι πιθανό να συμβάλλουν στη συρρίκνωση του τραύματος (Μαρουφίδης 2009).

Το τελικό στάδιο της επουλωτικής διαδικασίας περιλαμβάνει την οστική αναδιαμόρφωση (bone remodeling) του πρωτογενούς οστίτη ιστού προκειμένου να αποκτήσει τυπική πεταλιώδη δομή (lamellar bone) και να μετατραπεί τελικά σε συμπαγές ή/και σπογγώδες οστό (Gerstenfeld et al 2003, Boyce & Xing 2008). Η οστική αναδιαμόρφωση αρχίζει με την πρωτεόλυση από τις οστεοβλάστες του μη ενασβεστωμένου οστεοειδούς. Το γεγονός αυτό είναι απαραίτητο γιατί οι οστεοκλάστες δε μπορούν να προσκολληθούν σε μη ενασβεστωμένους ιστούς (Mulari et al 2004). Μετά την αποδόμηση του οστεοειδούς, οι οστεοβλάστες εκφράζουν ισχυρά το συνδέτη του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL) και τον παράγοντα διέγερσης αποικιών των μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor, M-CSF), ενώ παράλληλα ελαττώνεται και η έκφραση της οστεοπροτεγερίνης (OPG). Η OPG αναστέλλει τη δράση του RANKL και η έκφρασή της από τις οστεοβλάστες ελέγχεται από ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, αλλά και από τη Wnt/ β -κατενίνη οδό (Kieslinger et al 2005). Σε έλλειψη της OPG, ο παράγοντας RANKL μπορεί να συνδεθεί με τους υποδοχείς ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ στην επιφάνεια των προγονικών οστεοκλαστικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση του RANKL σε συνδυασμό με την επιπρόσθετη ενεργοποίηση του υποδοχέα c-Fms από τον M-CSF πυροδοτεί την έναρξη του προγράμματος διαφοροποίησης με τη σύντηξη των μονοπύρηνων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και τη δημιουργία πολυπύρηνων οστεοκλαστικών κυττάρων (Boyce & Xing 2008, Fink Eriksen 2010). Επίσης, η οστεοκλαστική διαφοροποίηση διεγείρεται από τη δράση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, όπως είναι οι ιντερλευκίνες, ο TNF- α , οι BMPs και ο TGF- β (Kaneko et al 2000, Quinn & Gillespie 2005). Τα οστεοκλαστικά κύτταρα προσκολλώνται στο οστόν μέσω ιντεγκρινών και μέσω μιας αντλίας πρωτονίων και καναλιών ιόντων χλωρίου εγκαθιστούν όξινο pH στην οστική επιφάνεια. Το όξινο περιβάλλον ευνοεί τη δράση των όξινων πρωτεασών, ενζύμων που διαθέτουν οι οστεοκλάστες και αποδομούν την ανόργανη φάση του οστού. Η αφαλατωμένη οργανική μήτρα του οστού αποδομείται στη συνέχεια από άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα. Με την απαρτίωση της απορροφητικής τους δράσης, τα

οστεοκλαστικά κύτταρα εγκαταλείπουν την οστική κοιλότητα και στην περιοχή εμφανίζονται μονοπύρρηνα κύτταρα, τα οποία καθαρίζουν τα υπολείμματα της οργανικής μήτρας (Teitelbaum 2007, Lerner 2006). Τέλος, παρατηρείται μετανάστευση των προγονικών οστεοβλαστικών κυττάρων στην οστική κοιλότητα, διαφοροποίησή τους σε ώριμες οστεοβλάστες και εναπόθεση νέου οστίτη ιστού. Η μετανάστευση και ενεργοποίηση των οστεοβλαστών πυροδοτείται από την απελευθέρωση του IGF-1 και του TGF-β. Οι αυξητικοί παράγοντες αυτοί εντοπίζονται στην εξωκυττάρια οστική θεμέλια ουσία και απελευθερώνονται κατά την πρωτεόλυση από τους οστεοκλάστες. Έτσι, οι IGF-1 και TGF-β λειτουργούν ως παράγοντες σύζευξης, συνδέοντας την οστική απορρόφηση με την οστική εναπόθεση (Lerner 2006).

Γενικά, η οστική επούλωση αποτελεί μία πολύπλοκη και σύνθετη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από μία αλληλουχία συχνά αλληλοεπικαλυπτόμενων γεγονότων και ρυθμίζεται με ακρίβεια κυρίως μέσω κυτταρικών και μοριακών/γενετικών παραγόντων (Schindeler et al 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση (Guided Bone Regeneration, GBR) στηρίζεται σε μία βιολογική αρχή: ο αποκλεισμός ενός οστικού ελλείμματος με ένα βιολογικά αδρανές μέσο, που λειτουργεί ως φραγμός των κυττάρων που προέρχονται από τους μαλακούς ιστούς, επιτρέπει τη διατήρηση ενός χώρου στον οποίο αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται αποκλειστικά και μόνον κύτταρα ικανά να παράγουν οστίτη ιστό. Τα μέσα που χρησιμοποιούνται για τον αποκλεισμό των οστικών ελλειμμάτων ή κοιλοτήτων είναι οι μεμβράνες. Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση είναι μία μέθοδος που εξελίχθηκε τα τελευταία έτη (Buser et al 1998) και αποτελεί μία αποδεκτή και άριστα τεκμηριωμένη χειρουργική διαδικασία αύξησης της ποιότητας και της ποσότητας του οστού σε τοπικά οστικά ελλείμματα της φατνιακής απόφυσης (Hammerle & Karring 1998). Επίσης, εφαρμόζεται για την επίτευξη επαρκούς αρχικής σταθερότητας των οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων σε περιοχές με ανεπαρκές οστικό υπόστρωμα (Zitzmann et al 2001) και όχι σπάνια συνδυάζεται με μοσχευματικά υλικά. Λίγα στοιχεία ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία σχετικά με τους υποκείμενους βασικούς μηχανισμούς που διέπουν την αρχή της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης. Γενικώς, είναι γνωστό ότι το νέο οστό σχηματίζεται από το περίοστεο, το ενδόστεο και από τα κύτταρα του μυελού των οστών, εν δυνάμει οστεογενετικά. Η εφαρμογή του μηχανικού φραγμού-μεμβράνη αποκλείει ουσιαστικά τη συμμετοχή του περιοστέου στην οστική ανάπλαση, ενώ πιστεύεται ότι η τοποθέτησή της σε πρώιμη επουλωτική φάση διεγείρει και διευκολύνει τη συγκέντρωση δυναμικά οστεογενετικών κυττάρων από τους κυτταρικούς πληθυσμούς των Αβέρσειων συστημάτων και των σωλήνων Volkman. Φαίνεται ότι η εξασφάλιση του απαραίτητου περιβάλλοντος επιτρέπει στην επουλωτική δυναμική του οργανισμού να αναπληρώσει τον απολεσθέντα ιστό με ιστό ακριβώς της ίδιας φύσης. Πιθανότατα αυτό είναι το αποτέλεσμα ενός συνδυασμού μηχανικών, κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών (παρεμπόδιση

ινοβλαστικής υπερδραστηριότητας, τοπική συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων) (Linde et al 1993).

Με βάση την κλασική μελέτη του Schenk et al 1994, εντελώς διαφορετική εμφανίζεται η επούλωση κάτω από τη μεμβράνη, καθώς αφορίζεται και διατηρείται ογκομετρικά ο χώρος του χειρουργικού ελλείμματος. Η μεμβράνη ως φραγμός διαχωρίζει, επιπλέον, τους εξωτερικά ευρισκόμενους μαλακούς ιστούς (εξωτερικό διαμέρισμα) από το χώρο του ελλείμματος (εσωτερικό διαμέρισμα), πρόσβαση στον οποίο έχει μόνο ο μυελός του οστού με αποτέλεσμα εξ αρχής να αποκλείεται η περιόστεος οστέωση. Αρχικά το εσωτερικό διαμέρισμα καταλαμβάνεται από πήγμα αίματος, υπολείμματα του οποίου αναγνωρίζονται ακόμη και μετά από δύο μήνες, κυρίως στο κέντρο του ελλείμματος. Το αιμόπηγμα αντικαθίσταται σταδιακά από κοκκιώδη ιστό στον οποίο εμφανίζονται νεόπλαστα αγγεία. Πολύ γρήγορα, ο κύριος όγκος του εσωτερικού διαμερίσματος συνίσταται πλέον από νεόπλαστο σπογγώδες οστό, που μεταξύ των δοκίδων του περικλείει ένα λαβύρινθο από μικρούς δακτυλιοειδείς μυελοχώρους που καταλαμβάνονται από αγγειοβριθή χαλαρό συνδετικό ιστό. Τόσο τα αγγεία όσο και ο συνδετικός ιστός συνεχονται με τον, εκτεθειμένο στο έλλειμμα, μυελό των οστών. Ο σχηματισμός οστού αρχίζει από τα όρια του ελλείμματος, αρχικά εξαπλώνεται πάνω από το μυελό και στη συνέχεια καταλαμβάνει όλο τον περικλειόμενο από τη μεμβράνη χώρο (Schenk et al 1994).

Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση (*Guided Bone Regeneration, GBR*) είναι μία χειρουργική τεχνική, η οποία εφαρμόζεται προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση του οστικού όγκου. Ο βιολογικός μηχανισμός της τεχνικής αυτής στηρίζεται στον αποκλεισμό ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών (κύτταρα του επιθηλίου και κύτταρα του συνδετικού ιστού) από την περιοχή στην οποία πραγματοποιείται η οστική ανάπλαση. Παράλληλα, με την κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση επιτυγχάνεται η πλήρωση του οστικού ελλείμματος με νεοσυντεθημένο οστόν, το οποίο παράγεται από οστεοβλάστες. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών μεμβρανών, οι οποίες λειτουργούν ως κυτταρικοί φραγμοί. Οι μεμβράνες αυτές έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν και να διατηρούν κενό χώρο για την πλήρωση του οστικού ελλείμματος από το νεοσχηματισθέν οστόν (Hammerle & Karring 1998).

Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση αποτελεί μια άριστα τεκμηριωμένη χειρουργική τεχνική αύξησης της ποιότητας και της ποσότητας του οστού σε τοπικά οστικά ελλείμματα της φατνιακής απόφυσης (Buser et al 1996, Hammerle & Karring 1998). Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση εφαρμόζεται για την επίτευξη επαρκούς αρχικής

σταθερότητας των οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων σε περιοχές με ανεπαρκές οστικό υπόστρωμα (Zitzmann et al 2000) και αρκετά συχνά συνδυάζεται με μοσχευματικά υλικά. Οι Dahlin και συν (1989) και οι Lazzara και συν (1999) σε μελέτες τους έδειξαν ότι η χρήση μεμβρανών προάγει την οστική ανάπτυξη γύρω από τα οδοντικά εμφυτεύματα σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη συμβάλλει στην αντιμετώπιση περιεμφυτευματικών οστικών ελλειμμάτων (Conner et al 2003). Ο ουσιαστικός σκοπός της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης είναι η προαγωγή της οστεογένεσης με τον ταυτόχρονο αποκλεισμό της εισβολής ανταγωνιστικών, μη οστεογενετικών και ταχύτερα αναπτυσσόμενων ιστών, όπως είναι ο συνδετικός και ο επιθηλιακός ιστός στην περιοχή της οστικής επούλωσης. Τα οστικά ελλείμματα καλύπτονται από μία βιολογικά αποδεκτή μεμβράνη προκαθορισμένης διαπερατότητας, η οποία επιτρέπει τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεογενετικών κυττάρων από τα όμορα του ελλείματος τοιχώματα του υγιούς οστού. Η παρουσία του βιολογικού ηθμού της μεμβράνης εμποδίζει την κατάληψη των θέσεων των οστεογενετικών κυττάρων και των πρόδρομων μορφών τους από τα κύτταρα του γειτονικού συνδετικού και επιθηλιακού ιστού. Εξάλλου, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του συνδετικού ιστού μπορούν να μεταφέρονται και να πολλαπλασιάζονται ταχύτερα στην περιοχή του ελλείματος, σε σχέση με τα οστεογενετικά κύτταρα. Στη συνέχεια διεισδύουν τριχοειδή αγγεία τα οποία διαπλέκονται μεταξύ τους και δημιουργούν ένα νεόπλαστο αγγειακό δίκτυο. Ταυτόχρονα, ενεργοποιούνται και μεταναστεύουν αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα στην περιοχή του οστικού ελλείματος. Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε προ-οστεοβλάστες και τελικά σε οστεοβλάστες. Παράλληλα, αναπτύσσονται και οστεοβλάστες περιαγγειακά. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να διαπλάθεται νεοσυντεθημένο οστού ανάμεσα στο αγγειακό δίκτυο. Από τη δράση των οστεοβλαστών αναπτύσσεται ανώριμο οστεοειδές. Το ανώριμο οστεοειδές περιβάλλει τα τριχοειδή αγγεία, τα οποία σχηματίζουν πλούσιο δίκτυο με ενδιάμεσους θύλακες χαλαρού συνδετικού ιστού. Η σύνθεση νεόπλαστου οστού αρχίζει με την ενεργοποίηση και τη μετανάστευση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων αλλά και με την παρουσία των ίδιων των τοιχωμάτων, τα οποία περιβάλλουν το οστικό έλλειμμα. Από τα οστικά τοιχώματα προέρχονται οστικές προσεκβολές, οι οποίες εκτείνονται μέχρι κάτω από τη μεμβράνη. Έτσι, δημιουργείται ένα αρχικό σπογγώδες οστικό ικρίωμα, το οποίο μέσα σε διάστημα 3-4 μηνών αποκαθιστά το έξω πέταλο του φατνιακού οστού. Μετά την ολοκλήρωση

της δημιουργίας του έξω φατνιακού οστικού πετάλου αρχίζει η επαναδιαμόρφωση του οστεοειδούς στην τελική του δομή, με τη μορφή των οστεώνων και των συστημάτων του Havers. Τέλος, το σπογγώδες ικρίωμα επαναδιαμορφώνεται με αντικατάσταση του ανώριμου δικτυωτού από ώριμο πεταλιδώδες οστό. Παράλληλα, η δοκίδωση του νεόπλαστου οστού οδηγεί στη δημιουργία δευτερογενούς σπογγώδους οστού, το οποίο αποτελεί ομαλή συνέχεια του γειτονικού προϋπάρχοντος υγιούς οστού (Μαρουφίδης 2009).

Για να επιτευχθεί η αύξηση του όγκου της φατνιακής ακρολοφίας έχουν εφαρμοσθεί διάφορες άλλες χειρουργικές τεχνικές. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους έχουν χρησιμοποιηθεί από σύγχρονους ερευνητές: η οστεοεπαγωγή, με την οποία γίνεται χρήση αυξητικών παραγόντων (Sigurdsson et al 2001), η οστεοκαθοδήγηση με τη χρήση μοσχευμάτων (Mayfield et al 2001) και η διατακτική οστεογένεση (Rachmiel et al 2001). Παρόλα αυτά, η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση, η οποία είναι *εξειδικευμένη εφαρμογή της κατευθυνόμενης ιστικής ανάπλασης* και η χρήση οστικών μοσχευμάτων έχουν τις περισσότερες κλινικές εφαρμογές. Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση έχει εφαρμοσθεί για την αποκατάσταση οστικών βλαβών τύπου οπών και σχισμών, για την αποκατάσταση περιφερικών οστικών βλαβών μετά από εξαγωγές δοντιών και για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων σε κατάκόρυφο (Simion et al 1998) και σε οριζόντιο επίπεδο (Calla & Rohrer 1993).

Στην εμφυτευματολογία η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση εφαρμόζεται με δύο τρόπους: (i) με τη *σταδιακή προσέγγιση*, κατά την οποία η οστική ανάπλαση προηγείται της τοποθέτησης του εμφυτεύματος και (ii) με την *ταυτόχρονη προσέγγιση*, κατά την οποία η οστική ανάπλαση με την τοποθέτηση μεμβράνης και η τοποθέτηση του εμφυτεύματος πραγματοποιούνται στον ίδιο χρόνο (Buser et al 1995).

Η σταδιακή προσέγγιση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης σε περιοχές με οστικά ελλείμματα παρουσιάζει μεγάλη προβλεψιμότητα και ασφαλή πρόγνωση. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση οδηγεί μετά το πέρας 6-9 μηνών σε ικανοποιητική ωρίμανση και αναδιαμόρφωση του νεόπλαστου οστού, σε απορροφημένες φατνιακές ακρολοφίες ή σε περιοχές με οστικά ελλείμματα, (Lang et al 1994). Μελέτες έδειξαν ότι η επίτευξη οστεοενσωμάτωσης είναι παρόμοια σε οστούς που είχε υποστεί κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση, σε σχέση το οστούς που δεν είχε υποστεί ανάπλαση (Buser et al 1996).

Η ταυτόχρονη προσέγγιση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης παρουσιάζει

αντίστοιχα αποτελέσματα με τη σταδιακή προσέγγιση. Η ταυτόχρονη προσέγγιση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης έχει το πλεονέκτημα της μίας χειρουργικής επέμβασης, αφού πραγματοποιείται ταυτόχρονα η χειρουργική τοποθέτηση του εμφυτεύματος και η τοποθέτηση της μεμβράνης ή/και του μοσχεύματος γύρω από τις εκτεθειμένες σπείρες (Christensen et al 2003).

ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεμβράνες φραγμού (barrier membranes) στην χειρουργική του στόματος άρχισαν να χρησιμοποιούνται στις αρχές της δεκαετίας του 1980, προκειμένου να επιτευχθεί η αποκατάσταση περιοδοντικών οστικών ελλειμμάτων με τη μέθοδο που ονομάστηκε Κατευθυνόμενη Ιστική Ανάπλαση (Guided Tissue Regeneration) (Nyman et al 1982a,b). Οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν για την κάλυψη οστικών ελλειμμάτων γύρω από τα φυσικά δόντια με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης των ιστών στην περιοχή της βλάβης. Η μεμβράνη αποτρέπει την ανάπτυξη, εντός της βλάβης, των μαλακών ιστών, ενώ επιτρέπει την μακρά επιθηλιακή πρόσφυση. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η απρόσκοπτη ανάπτυξη του οστού και του περιοδοντικού συνδέσμου.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 η τεχνική αυτή μεταφέρθηκε με επιτυχία στην εμφυτευματολογία για την ανάπτυξη του οστού της φατνιακής ακρολοφίας και η μέθοδος μετονομάστηκε σε Κατευθυνόμενη Οστική Ανάπλαση (Guided Bone Regeneration, GBR) (Dahlin et al 1990, Nyman 1991). Στις ημέρες μας η εφαρμογή μεθόδων κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων των γνάθων με σκοπό την τοποθέτηση εμφυτευμάτων αποτελεί συνήθη κλινική πρακτική με μεγάλη προβλεψιμότητα (Hammerle & Karring 1998). Οι τεχνικές εφαρμογής των μεμβρανών διευκολύνουν την αποκατάσταση εντοπισμένων ή εκτεταμένων οστικών ελλειμμάτων, υποβοηθούν την οστική ανάπτυξη γύρω από τα εμφυτεύματα και βελτιώνουν σημαντικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής οστικών μοσχευμάτων για την επίτευξη ανάπτυξης (Linde et al 1993, Payne et al 1996, Assenza et al 2001, Hammerle et al 2002, Lorenzoni et al 2002, Nemcovsky & Artzi 2002, Kohal & Hurzeler 2002).

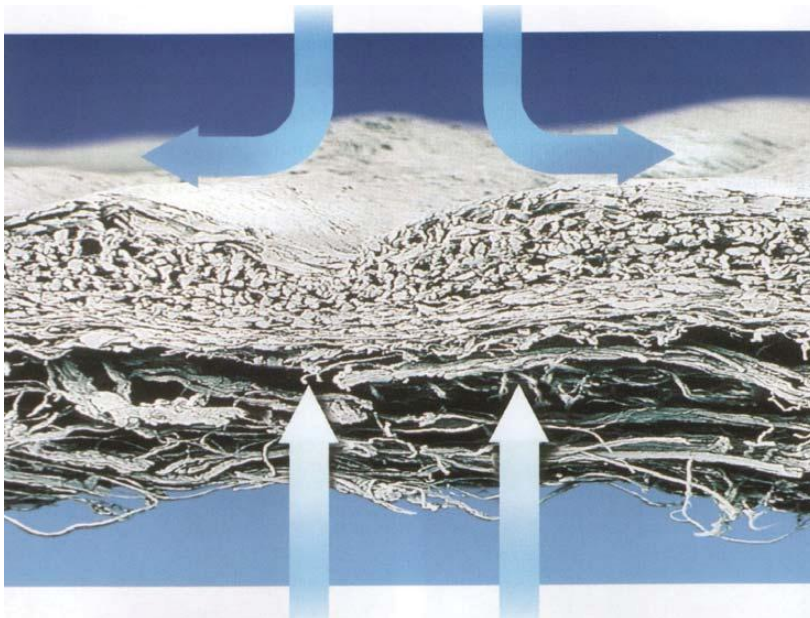
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός για την αποτροπή της εισόδου στο οστικό έλλειμμα άλλων γειτονικών ιστών, ιδιαίτερα κυττάρων του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού, και την εμπλοκή τους στις διεργασίες της οστεογένεσης και της

οστικής ανάπλασης (Linde et al 1993). Παράλληλα, οι μεμβράνες δρουν καλύπτοντας την περιοχή του τραύματος, σταθεροποιώντας και προστατεύοντας τον αιματικό θρόμβο (Mellonig & Triplett 1993). Ταυτόχρονα διαμορφώνουν και διατηρούν το χώρο για την ανάπλαση του οστού (Magnusson et al 1990). Γενικά, σκοπός της εφαρμογής των μεμβρανών είναι η δημιουργία του κατάλληλου υποστρώματος εντός του οποίου θα δράσει το φυσιολογικό βιολογικό δυναμικό του οργανισμού για την επίτευξη μιας λειτουργικής ανάπλασης (Hardwick et al 1995).

Οι κύριες λειτουργίες των μεμβρανών της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης είναι οι εξής:

- Δημιουργία και διατήρηση του χώρου που θα καλυφθεί από τον αιματικό θρόμβο
- Απομόνωση του οστικού ελλείμματος από την πιθανή εισδοχή ανεπιθύμητων ιστών
- Αποτροπή βακτηριακής εισόδου και προστασία από επιμόλυνση της περιοχής οστικής ανάπλασης
- Μηχανική υποστήριξη του υποκείμενου νεόπλαστου οστίτη ιστού
- Προστασία των οστικών μοσχευμάτων (Εικόνα 10) (Γκισιάκης 2011)



Εικόνα 10: Βασική αρχή λειτουργίας των μεμβρανών. Τα μπλε γωνιώδη άνω βέλη αναπαριστούν την αποτροπή μικροβιακής εισόδου στην περιοχή της οστικής ανάπλασης. Τα γαλάζια ευθεία κάτω βέλη αναπαριστούν τη μηχανική υποστήριξη που προσφέρουν οι μεμβράνες στο σχηματισμό του νεόπλαστου οστού. (Γκισιάκης 2011)

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Μία μεγάλη ποικιλία υλικών έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μεμβρανών κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης. Τα κλινικά και ιστολογικά αποτελέσματα της χρήσης των μεμβρανών είναι πολύ ενθαρρυντικά (Payne et al 1996). Παρολαυτά, δεν υπάρχει κάποιο υλικό το οποίο να αποτελεί την ιδανική λύση για το σύνολο των κλινικών περιπτώσεων, εξαιτίας των ιδιοτεροτήτων κάθε ασθενούς και των τεχνικών περιορισμών που εμφανίζει κάθε υλικό (Hardwick et al 1995, Bartee 1995, Yukna & Yukna 1996).

Τα κύρια χαρακτηριστικά των υλικών κατασκευής μεμβρανών κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης πρέπει να είναι τα εξής (Scantlebury 1993, Meffert 1996, Becker et al 1996):

- 1) βιοσυμβατότητα
- 2) κυτταρική αποφρακτική ικανότητα
- 3) εξασφάλιση της ιστικής ενσωμάτωσης
- 4) ογκομετρική διατήρηση του αποφρασσόμενου χώρου
- 5) εξασφάλιση της κυτταρικής μετανάστευσης
- 6) κλινική ευχρηστότητα

Βιοσυμβατότητα

Βιοσυμβατότητα καλείται η ιδιότητα ενός υλικού να μην επηρεάζει σημαντικά τις βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού στον οποίο τοποθετείται, αλλά και να μην επηρεάζει το φυσιολογικό περιβάλλον του οργανισμού τις ιδιότητες του υλικού. (Williams 1981). Ο ορισμός αυτός αν και είναι χρήσιμος, καλό θα ήταν να ερμηνευθεί με ιδιαίτερη προσοχή και όχι απόλυτα. Η ερμηνεία της έννοιας της βιοσυμβατότητας θα πρέπει να γίνει με γνώμονα τις προσδοκώμενες λειτουργίες ενός βιοϋλικού αλλά και του περιβάλλοντος εντός του οποίου πρόκειται να τοποθετηθεί. Η επιτυχής εφαρμογή πολλών βιοϋλικών, όπως είναι τα οστεοενσωματούμενα οδοντικά εμφυτεύματα, οι αγγειακές προθέσεις, τα ενθέματα προσώπου, μαστών αλλά και τα οστικά μοσχεύματα, εξαρτάται από μια ειδική και προβλέψιμη αλληλεπίδραση βιοϋλικού και ξενιστή για την επίτευξη του προσδοκώμενου θεραπευτικού αποτελέσματος (Θωμαΐδης 2004).

Η ασφάλεια του ασθενούς αποτελεί το βασικότερο κριτήριο στην επιλογή του βιοϋλικού από το οποίο θα είναι κατασκευασμένη μία μεμβράνη. Το βιοϋλικό δε θα

πρέπει να εμφανίζει γενική τοξικότητα και ογκογόνο δράση. Εκτεταμένοι έλεγχοι θα πρέπει να εξασφαλίζουν την ασφάλεια ενός υλικού. Έχουν θεσμοθετηθεί, επίσης, κριτήρια, οδηγίες και προδιαγραφές που πρέπει να πληρεί ένα βιοϋλικό για να επιτραπεί η κυκλοφορία του, όπως για παράδειγμα η Τριμερής Οδηγία Βιοσυμβατότητας Ιατρικών Μέσων (Tripartite Biocompatibility Guidance for Medical Devices) της Αγγλίας, των Η.Π.Α. και του Καναδά (FDA, 1986) (Θωμαιδης 2004).

Τα αδρανή εμφυτευματικά υλικά, τα οποία δεν αποδομούνται χημικά σε φυσιολογικές συνθήκες, εμφανίζουν μία λιγότερο πολύπλοκη κατάσταση ασφάλειας σε σχέση με τα υλικά που αποδομούνται εντός του οργανισμού ξενιστή. Ένα βιοϋλικό δεν απελευθερώνει δυνητικά επικίνδυνα παραπροϊόντα όταν παραμένει άθικτο. Τα χημικά υλικά είναι δυνατό να περιέχουν επιβλαβή στοιχεία, τα οποία περιορίζονται μέσα στη δομή του υλικού. Μόνο τα στοιχεία τα οποία εντοπίζονται στην επιφάνεια του υλικού είναι δυνατό να αλληλεπιδράσουν με τον ξενιστή. Η μεμβράνη διεσταλμένου πολυτετραφθοροαιθυλενίου (expanded polytetrafluoroethylene, e-PTFE) έχει ως χημική βάση το μόριο πολυτετραφθοροαιθυλένιο, αλλά είναι γνωστό ότι αυτό δε διασπάται και δεν απελευθερώνεται σε φυσιολογικές συνθήκες (Boyce 1982).

Τα αποδομούμενα εμφυτευματικά υλικά φαίνεται να είναι λιγότερο ασφαλή. Τα προϊόντα αποδομής της βιοδιάσπασης, φυσικά ή χημικά, είναι δυνατό να επηρεάσουν την κυτταρική και τη συστηματική απάντηση του οργανισμού. Οι μεμβράνες από συνθετικά πολυμερή (πολυγαλακτικό και πολυγλυκολικό οξύ) διασπώνται με υδρόλυση. Τα τελικά προϊόντα της διάσπασής τους μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνα του φυσιολογικού μεταβολισμού. Παρόλαυτά, κατά τη διάρκεια της υδρολυτικής αποδομής, οι μεμβράνες από συνθετικά πολυμερή χάνουν τη μηχανική τους ακεραιότητα και θρυμματίζονται. Τα τμήματα της θρυμματισμένης μεμβράνης είναι δυνατό να επιδράσουν σημαντικά στην τοπική ιστική απάντηση και να οδηγήσουν σε οστική απορρόφηση (Lewis 1990, Bostman 1992).

Κάθε εμφυτευματικό βιοϋλικό ερμηνεύεται από τον οργανισμό ως ξένο σώμα. Η αντίδραση του οργανισμού ξενιστή σε κάθε ξένο σώμα είναι η απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Coleman 1974). Η πιθανή αντιγονική αντίδραση, άμεσης ή έμμεσης υπερευαισθησίας, πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στην επιλογή του υλικού μιας μεμβράνης. Τα συνθετικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως εμφυτευματικά μέσα, συνήθως δε θεωρούνται δυνητικά αντιγονικά (Rae 1981). Τα βιοϋλικά που έχουν ως βάση το κολλαγόνο δεν είναι απαραίτητα ιδανικής σύνθεσης. Παρόλαυτά, η πρωτεϊνική σύνθεση και ο τρόπος επεξεργασίας του κολλαγόνου θα καθορίσει την εμφάνιση ή όχι της συστηματικής ανοσολογικής

απάντησης, ειδικά την υπερευαισθησία και τη διασταυρούμενη αντίδραση (Quteish & Dolby 1991).

Ο σκοπός τοποθέτησης μίας μεμβράνης κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης είναι η δημιουργία ενός κατάλληλου περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να επιτρέψει στους φυσιολογικούς επουλωτικούς μηχανισμούς να συνθέσουν οστίτη ιστό σε μία καθορισμένη περιοχή. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, η αλληλεπίδραση ξενιστή-βιοϋλικού δε θα πρέπει να επιδρά στη σύνθεση και τη διατήρηση του νεόπλαστου οστού (Omstead et al 1998). Έντονη αντίδραση ξένου σώματος, είναι δυνατό να οδηγήσει σε μειωμένη οστική σύνθεση ακόμη και οστεόλυση. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη κατά την επεξεργασία και κατασκευή των μοσχευματικών βιοϋλικών στην εμβιομηχανική των ιστών (Charnley 1963, Valentine et al 1989). Η δυνατότητα μίας μεμβράνης να απορροφά αυξητικούς παράγοντες ή παράγοντες διαφοροποίησης των κυττάρων αυξάνει την κυτταρική προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων. Η βαθμιαία απελευθέρωση των παραγόντων αυτών από το υπόστρωμα θεωρείται σημαντικό πλεονέκτημα των μεμβρανών αυτών (De Groot 1998, Bhatnagar et al 1999).

Κυτταρική απόφραξη

Δεν υπάρχει απόλυτη ομοφωνία για το βαθμό της κυτταρικής απόφραξης τον οποίο θα πρέπει να παρέχει μία μεμβράνη. Εξάλλου στην πρώτη πειραματική μελέτη για τη διερεύνηση της κυτταρικής απόφραξης των μεμβρανών, ο Murrey (1957) χρησιμοποίησε με επιτυχία θυριδωτούς πλαστικούς κλωβούς για να αποκαταστήσει ένα οστικό έλλειμμα (Murrey 1957, Hurley et al 1959, Boyne 1964, 1968, 1969).

Η κυτταροαποφρακτική ιδιότητα των μεμβρανών της κλασικής θεωρίας της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης δεν έχει ανααιρεθεί με κανένα τρόπο. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι το επιθήλιο δε θα πρέπει να εξαιρείται εντελώς από τους ανεπιθύμητους ιστούς, διότι πιστεύεται ότι σχηματίζει μία μηχανική προστασία στις υποκείμενες ευαίσθητες αναγεννητικές διαδικασίες (Vanheusden et al 1999). Όσο όμως τα πειραματικά δεδομένα δεν αποδεικνύουν το αντίθετο η πιο συντηρητική προσέγγιση στο σχεδιασμό μιας μεμβράνης είναι να εξασφαλίζει την κυτταρική απόφραξη, κάτι που έχει επιβεβαιώσει την κλινική της προβλεψιμότητα (Θωμαιδης 2004).

Ιστική Ενσωμάτωση

Ιστική ενσωμάτωση καλείται η διαδικασία της εισδοχής και της ανάπτυξης των γειτονικών ιστών εντός της μάζας μιας μεμβράνης. Η ιστική ενσωμάτωση είναι ένα

φαινόμενο το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως δεσμός σταθεροποίησης. Τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας ή της μικροδομής της μεμβράνης είναι αποκλειστικά υπεύθυνα για την ανάπτυξη ή όχι του φαινομένου, το οποίο λαμβάνει χώρα κατά την περίοδο της οστικής επούλωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενσωμάτωσης η οποία συμβαίνει με τη δημιουργία δεσμού στην επιφάνεια είναι τα οστεοενσωματούμενα εμφυτεύματα (Θωμαιδης 2004).

Η ιστική ενσωμάτωση μιας μεμβράνης αυξάνει τη μηχανική της σταθερότητα, κυρίως στις περιπτώσεις που θα αποκαλυφθεί στο στοματικό περιβάλλον. Η ιστική ενσωμάτωση επιτυγχάνεται από την εισδοχή ινιδίων από τα μαλακά μόρια, σε όλο το πάχος της μεμβράνης και τη πρόσφυσή τους στο οστό, το οποίο περιφερικά εφάπτεται η μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ουσιαστικά ένας βιολογικός δεσμός σταθεροποίησης (Kon et al 1991). Η ύπαρξη μικροσκοπικών πόρων στην επιφάνεια της μεμβράνης επιτρέπει τη διείσδυση των ινιδίων σε όλη την επιφάνειά της. Οι μικροσκοπικοί αυτοί πόροι εξασφαλίζουν την ιστική ενσωμάτωση και αυξάνουν τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτό υποβοηθούν την επουλωτική διαδικασία, ιδιαίτερα όταν προκύψει διάσπαση του τραύματος και αποκάλυψη του βιοϋλικού (Haney et al 1993). Ο μηχανισμός αυτός παίζει σπουδαίο ρόλο κυρίως στην κατευθυνόμενη ιστική αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών, όπου θα πρέπει να εξασφαλιστεί βιολογική πρόσφυση της μεμβράνης και σε οδοντικούς ιστούς. Με την πρόσφυση της μεμβράνης σε οδοντικούς και περιοδοντικούς ιστούς είναι δυνατό να επιτευχθεί εξάλειψη των περιοδοντικών θυλάκων (Kon et al 1991, Warrer et al 1992).

Παρόλαυτά, οι δομικές και χημικές ιδιότητες, οι οποίες προάγουν την ιστική ενσωμάτωση, δε θα πρέπει να παρεμβαίνουν στην κύρια λειτουργία της μεμβράνης. Η πορώδης κατασκευή μιας μεμβράνης θα επέτρεπε την ιστική ενσωμάτωση, αλλά δε θα εξασφάλιζε την απόλυτη κυτταρική απόφραξη. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού κατασκευάστηκαν μεμβράνες e-PTFE στις οποίες μόνο το περιφερικό τμήμα, το οποίο έρχεται σε άμεση επαφή με το υγιές οστικό όριο, εμφανίζει μικροσκοπικούς πόρους διαμέτρου 20-25 μm. Το κεντρικό τμήμα των μεμβρανών e-PTFE, που ουσιαστικά καλύπτει το οστικό έλλειμμα, αποφράσσει πλήρως, παρεμποδίζοντας την είσοδο ινώδους ιστού και μικροβίων (Shanaman 1992, Mellonig & Triplett 1993). Η αρχική σταθερότητα μιας πορώδους μεμβράνης είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με αμιγώς μηχανικά μέσα (ράμματα, καρφίδες) (Busser et al 1993, 1995, 1996, Becker et al 1994).

Διατήρηση χώρου

Το βιοϋλικό πρέπει να περιβάλλει το οστικό έλλειμμα με τέτοιο τρόπο, ώστε να παραμένει σταθερό και να διευκολύνει τη ταχεία κυτταρική αποίκηση. Έτσι δημιουργείται ο κατάλληλος χώρος, ο οποίος επιτρέπει την υλοποίηση των μοριακών και κυτταρικών λειτουργιών που θα καθοδηγήσουν την οστική ανάπλαση. Για τη δημιουργία και τη διατήρηση του όγκου και του γεωμετρίας αυτού του χώρου, είναι απαραίτητο μία μεμβράνη να υποβαστάζει το ίδιο της το βάρος αλλά και να ανθίσταται στη πίεση των υπερκείμενων ιστών και των εξωτερικών δυνάμεων, όπως οι μασητικές (Seibert & Nyman 1990, Scantlebury 1993, Θωμαιδης 2004).

Η αντίσταση στην εμβύθιση μίας μεμβράνης, εξαρτάται από τη σκληρότητα και την ακαμψία του υλικού κατασκευής της. Υποθετικά, οι πολύ σκληρές και άκαμπτες μεμβράνες θα ήταν οι ιδανικές για τη διαδικασία της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης. Παρόλαυτά, η μεγάλη ακαμψία δε θα επέτρεπε την προσαρμογή και την προσκόλληση της μεμβράνης στο οστικό όριο της βλάβης. Το γεγονός αυτό ισχύει κυρίως στις περιπτώσεις αποκατάστασης της φατνιακής ακρολοφίας, όπου θα πρέπει να αποδοθεί το αρχικό οστικό περίγραμμα. Η ιδανική μεμβράνη πρέπει να συνδυάζει ταυτόχρονα τις ιδιότητες της σκληρότητας, της πλαστικότητας και της ελαστικότητας, λαμβάνοντας το ανατομικό περίγραμμα της περιοχής που αποκαθιστά (Pini Prato et al 1992).

Οι μεμβράνες ePTFE, ενισχυμένες με λωρίδες τιτανίου και οι μεμβράνες τιτανίου μειώνουν την πιθανότητα υποχώρησης τους (Lundgren et al 1995, 1998). Όμως, η ακαμψία των μεμβρανών αυτών ήταν και η αιτία του αυξημένου ποσοστού αποκάλυψης τους, λόγω τραυματικής διάτρησης του βλεννογόνου, καθιστώντας υποχρεωτική την αφαίρεσή τους (Θωμαιδης 2004).

Η οστική σύνθεση δικτυωτού οστού ξεκινάει από τις οστικές επιφάνειες του ελλείμματος και κατευθύνεται προς το κέντρο του (Schenk 1992, Hollinger & Chaudhari 1992). Ο ρυθμός της δημιουργίας του οστίτη ιστού εξαρτάται από το ρυθμό της επαναγγείωσης και της οστεοβλαστικής δραστηριότητας (Schenk 1992). Συνεπώς, η απόσταση που πρέπει να καλύψει η οστική ανάπλαση από το ένα όριο του οστικού χείλους μέχρι το άλλο, θα καθορίσει και το χρόνο που η μεμβράνη πρέπει να παραμείνει στη θέση της, λειτουργικά αναλλοίωτη, διατηρώντας τις φυσικομηχανικές της ιδιότητες (Θωμαιδης 2004).

Οι μη απορροφήσιμες μεμβράνες διατηρούν τον αναγκαίο χώρο για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί η οστική επούλωση. Αντίθετα, οι απορροφήσιμες μεμβράνες δεν αποδομούνται αμέσως αλλά μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, ανάλογα με

το υλικό κατασκευής τους, χάνοντας βαθμιαία τη μηχανική τους αντοχή άρα και την ικανότητά τους να διατηρούν τον αρχικό χώρο που πρέπει να αποκαταστήσουν (Lewis 1990). Η μηχανική σταθεροποίηση της μεμβράνης με ράμματα ή καρφίδες εξασφαλίζει την αναγκαία σταθερότητα διατηρώντας τον αναγεννώμενο χώρο (Busser et al 1993, 1995, Becker et al 1994).

Κυτταρική μετανάστευση

Άλλες μεμβράνες λειτουργούν εκτός από φραγμός, και ως υπόστρωμα το οποίο επιτρέπει τη μετανάστευση, την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό πρόδρομων αναγεννητικών κυττάρων επάνω στην επιφάνειά τους. Αυτό εξασφαλίζει όχι μόνο την ανάπτυξη των οστεογενετικών κυττάρων στην εσωτερική της πλευρά, αλλά και τη μετανάστευση, την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων του συνδετικού ιστού στην εξωτερική της επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο επιτελείται επούλωση και σε ελλείμματα των υπερκείμενων μαλακών ιστών (Payne et al 1996). Η τραχύτητα της επιφάνειας, η πρωτεϊνοδεσμευτική ικανότητά, ο βαθμός υδροφιλίας και το υλικό κατασκευής μίας μεμβράνης διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίησή των κυττάρων τα οποία προσκολλώνται στην επιφάνειά της (Locci et al 1997, Wang et al 1997).

Ευκολία κλινικών χειρισμών

Οι μεμβράνες κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης υφίστανται μια σειρά κλινικών χειρισμών, (αποκοπή, διευθέτηση επιθυμητού σχήματος, ακινητοποίηση ράμματα ή καρφίδες τιτανίου) έτσι ώστε να προσαρμοσθούν στις εκάστοτε τοπικές συνθήκες του χειρουργικού πεδίου.

Κάθε κλινική κατάσταση κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης προϋποθέτει εξατομικευμένους χειρισμούς της μεμβράνης. Εξάλλου, το οστικό έλλειμμα αντιπροσωπεύει μια τρισδιάστατη μορφολογία, ενώ οι διαθέσιμες μεμβράνες για πρακτικούς λόγους συσκευασίας και μεταφοράς είναι δισδιάστατες. Η προσαρμογή μιας μεμβράνης δύο διαστάσεων σε τρισδιάστατες μορφολογικές δομές προϋποθέτει, εκτός από υπομονή και επιδεξιότητα, κατάλληλο υλικό που θα διευκολύνει την πλαστική μορφοποίηση, λαμβάνοντας το σχήμα του οστικού περιγράμματος (Θωμαιδής 2004).

Η σκληρότητα και η ακαμψία του υλικού κατασκευής της μεμβράνης αποτελούν σημαντικές παράμετροι για τη διατήρηση χώρου. Παρόλαυτά, δε θα πρέπει να υπάρχει η τάση να επαναφερθεί η προσαρμοσμένη μεμβράνη στο αρχικό της σχήμα

(Scantlebury 1993).

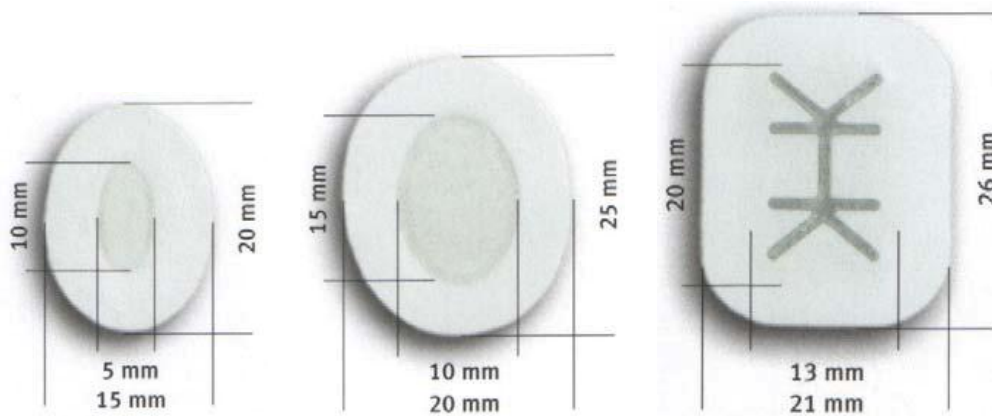
Στις κλινικές περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μη απορροφήσιμη μεμβράνη πραγματοποιείται μία δεύτερη χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεσή της μεμβράνης. Το υλικό της μεμβράνης θα πρέπει να επιτρέπει την απρόσκοπτη και αβίαστη χειρουργική αφαίρεσή της. Με τη χρήση των απορροφήσιμων μεμβρανών, αντίθετα, αποφεύγεται η δεύτερη χειρουργική επέμβαση, κάνοντας την κλινική τους εφαρμογή απλούστερη (Hardwick et al 1994).

Η αποκάλυψη της μεμβράνης μέσα στη στοματική κοιλότητα αποτελεί μία σοβαρή επιπλοκή. Στην περίπτωση αυτή η οστεογένεση παρεμποδίζεται τόσο από την αποκάλυψη της μεμβράνης όσο και από τη διείσδυση μικροβίων και την επακόλουθη οξεία φλεγμονή. Με τα κατάλληλα δομικά συστατικά της μεμβράνης (κυτταρική απόφραξη, ιστική ενσωμάτωση, μηχανική σταθερότητα) και συχνό επανέλεγχο, η επιμόλυνση μπορεί να περιορισθεί στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης εξασφαλίζοντας την αδιατάρακτη οστική αναγέννηση στο εσωτερικό της, απλοποιώντας την κλινική παρέμβαση (Shanaman 1992, Mellonig & Triplett 1993, Θωμαϊδης 2004). Σε αντίθετη περίπτωση ή σε έντονη φλεγμονή με πυορροή απαιτείται χειρουργική αφαίρεση της μεμβράνης και απόξεση της βλάβης.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Οι μεμβράνες κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: μη απορροφήσιμες και απορροφήσιμες (Εικόνα 11).

ΜΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΙΜΕΣ



ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΙΜΕΣ



Εικόνα 11: Είδη μεμβρανών κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (Γκισάκης 2011)

Μη απορροφήσιμες μεμβράνες

Η μη απορροφήσιμη μεμβράνη, η οποία παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η μεμβράνη από διεσταλμένο πολυτετραφθοριοαιθυλένιο (expanded polytetrafluoroethylene, ePTFE). Το διεσταλμένο πολυτετραφθοριοαιθυλένιο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χειρουργική. Η εφαρμογή μεμβρανών ePTFE στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση τεκμηριώθηκε από τις πειραματικές μελέτες των Dahlin και συν το 1988 και το 1990. Ο Dahlin μελέτησε την επίδραση της μεμβράνης ePTFE σε διαμπερή ελλείμματα της γωνίας της κάτω γνάθου ποντικών. Στην πειραματική ομάδα, στην οποία τοποθετήθηκε μεμβράνη ePTFE, επιτεύχθηκε πλήρης οστική επούλωση. Στην ομάδα ελέγχου το οστικό έλλειμμα πληρώθηκε από ινώδη συνδετικό ιστό, με ελάχιστη οστική σύνθεση, η οποία παρατηρήθηκε κυρίως στα χείλη του οστικού ελλείμματος (Dahlin et al 1988). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε πειραματικές μελέτες σε πιθήκους (Dahlin et al 1990).

Παρόλο που ένα διάτρητο πλέγμα δεν εξασφαλίζει τη λειτουργία της κυτταρικής απόφραξης, πλέγματα τιτανίου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φραγμός στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση, προσφέροντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Δημητρακόπουλος και συν 1998, Lemberle et al 1998, Lundgren et al 1998).

Η οστική μεμβράνη αποτελείται από λεπτά (250 μm) φύλλα αφαλατωμένου και αφυδατωμένου φλοιώδους οστού. Είναι ένας τύπος μεμβράνης που δεν είναι ούτε απορροφήσιμη αλλά ούτε μη απορροφήσιμη. Η οστική μεμβράνη μπορεί να ενσωματώνεται, χωρίς να χρειάζεται χειρουργική αφαίρεση (Barboza 1999, Barboza & Lugao 2001).

Βασικό χαρακτηριστικό όλων των μη απορροφούμενων μεμβρανών είναι η ανάγκη μιας δεύτερης χειρουργικής επέμβασης, για την αφαίρεσή τους. Η συχνότερη επιπλοκή των μη απορροφήσιμων μεμβρανών είναι η πρόωρη αποκάλυψή τους. Το σύμβαμα αυτό έχει αρνητική επίδραση στην τελική έκβαση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (Soldatos 2017).

Η πλειοψηφία των μελετών με μη απορροφήσιμες μεμβράνες αφορά στις μεμβράνες e-PTFE (expanded-polytetrafluoroethylene). Οι μεμβράνες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε κλινικές έρευνες με ανθρώπους ή σε πειραματικές μελέτες σε ζώα και θεωρούνται μία καλή επιλογή σε σύγκριση με οποιαδήποτε άλλη μεμβράνη, καθώς η χρήση τους είναι ασφαλής και το αποτέλεσμα προβλέψιμο (Gottlow 1993, Hardwick et al 1995, Becker et al 1996, Soldatos 2017). Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι οι μη απορροφήσιμες μεμβράνες έχουν δείξει καλύτερα αποτελέσματα σε περιπτώσεις κάθετης αύξησης της φατνιακής ακρολοφίας κατά

την κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (Soldatos 2017).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεμβράνης e-PTFE είναι τα εξής (Tinti & Vincenzi 1994, Schenk et al 1994, Bartee 1995, Becker et al 1996):

- Βιοσυμβατότητα
- Διαπερατότητα σε υγρά και θρεπτικά συστατικά
- Αδιαπέραστη από κύτταρα επιθηλίου και συνδετικού ιστού
- Δημιουργία και διατήρηση χώρου (και σχήματος)
- Προστασία των οστικών μοσχευμάτων από απορρόφηση
- Διατήρηση των λειτουργικών χαρακτηριστικών της για όσο χρόνο απαιτείται για την οστική ανάπτυξη (Γκισιάκης 2011)

Τα κύρια μειονεκτήματα της μεμβράνης e-PTFE είναι τα εξής:

- η ανάγκη δεύτερης χειρουργικής επέμβασης για την αφαίρεσή της, γεγονός που αυξάνει την ταλαιπωρία του ασθενούς
- ο κίνδυνος επιμόλυνσης αν αποκαλυφθεί πρόωρα (Gottlow 1993, Γκισιάκης 2011, Soldatos 2017)

Απορροφήσιμες μεμβράνες

Οι απορροφήσιμες μεμβράνες ανάλογα με το υλικό κατασκευής τους ταξινομούνται ως εξής: (i) μεμβράνες *συνθετικών πολυμερών* και (ii) βιολογικής προέλευσης μεμβράνες, κυρίως *κολλαγόνου*.

Τα συνθετικά πολυμερή (πολυλακτίνη, πολυγαλακτικό και πολυγλυκολικό οξύ) έχουν εφαρμοσθεί ευρύτατα στην κλασική χειρουργική αλλά και στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη. Οι μεμβράνες συνθετικών πολυμερών, σε σύγχρονες έρευνες, δεν έδειξαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η φλεγμονώδης αντίδραση που επιφέρει η αποδόμησή του υλικού είναι πιθανό να είναι επιζήμια στην οστική επούλωση (Duroirieux et al 2001).

Οι μεμβράνες κολλαγόνου έχουν και αυτές χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη. Οι βιολογικής προέλευσης μεμβράνες παίζουν, επίσης, ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Shi et al 1996).

Οι βιολογικές μεμβράνες κολλαγόνου μπορεί να έχουν βόεια, χοίρεια αλλά και ανθρώπινη προέλευση. Οι μεμβράνες κολλαγόνου, επίσης, εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως είναι η αιμόσταση, η χημειοταξία των ινοβλαστών, η

ασθενής ανοσολογική αντίδραση, η ευκολία χειρισμών και η ικανότητα να αυξάνουν το πάχος των ιστών (Locci et al 1997, Schlegel et al 1997, Soldatos 2017).

Οι απορροφήσιμες βιολογικές μεμβράνες κολλαγόνου υπερέχουν συγκριτικά με τις μη απορροφήσιμες σε σχέση με την οστική επούλωση, καθώς στις δεύτερες παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό διάσπασης, αποκάλυψης και τελικά πρόωρης και επιβεβλημένης απομάκρυνσής τους (Colangelo et al 1993, Sevor et al 1993, Zitsmann et al 1997, Brunel et al 1998). Η αποκάλυψη μίας μεμβράνης στη στοματική κοιλότητα, οδηγεί σε υποδιπλασιασμό της ποσότητας του αναγεννώμενου οστού και σε φτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με την επιτυχή έκβαση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (Simion et al 1994).

Ο βασικός στόχος μιας μεμβράνης-φραγμού είναι ο αποκλεισμός των ανεπιθύμητων κυττάρων και η διατήρηση του κατάλληλου χώρου, όπου τα επιθυμητά κύτταρα θα εποικίσουν την περιοχή του οστικού ελλείμματος. Για το λόγο αυτό, μια απορροφήσιμη μεμβράνη θα πρέπει να διατηρήσει τη δομική της ακεραιότητα, πριν αποδομηθεί, κυρίως κατά τη διάρκεια της πρώιμης επουλωτικής διαδικασίας (Bunyaratavej & Wang 2001). Ο ρυθμός αποδόμησης των βιολογικών μεμβρανών κολλαγόνου ποικίλει και εξαρτάται από την προέλευση του κολλαγόνου (Γκισιάκης 2011). Μελέτες έδειξαν ότι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η μεμβράνη κολλαγόνου παραμένει άθικτη, πριν ξεκινήσει η αποδόμησή της, είναι αρκετό προκειμένου να εμποδιστεί η εισβολή των ανεπιθύμητων κυττάρων του ινώδους συνδετικού ιστού (Brunel et al 1996, Crigger et al 1996). Η κρίσιμη περίοδος που η μεμβράνη πρέπει να παραμείνει άθικτη, είναι η αρχική περίοδος της οστικής επούλωσης. Τα οστεογενετικά κύτταρα ξεκινούν να αναπτύσσονται στην περιοχή του οστικού ελλείμματος κατά την 3^η με 4^η εβδομάδα. Επομένως, για 3-4 εβδομάδες θα πρέπει να παραμείνει η μεμβράνη άθικτη, χωρίς να αποδομείται (Bunyaratavej & Wang 2001).

Το κύριο πλεονέκτημα των απορροφήσιμων μεμβρανών είναι ότι δεν απαιτείται δεύτερη χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεσή τους, γεγονός το οποίο μειώνει την ταλαιπωρία του ασθενούς (Yukna & Yukna 1996, Soldatos 2017). Η διαδικασία της αποδόμησης των απορροφήσιμων μεμβρανών πρέπει να μην επιδρά αρνητικά στο αποτέλεσμα της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (Gottlow 1993, Hardwick et al 1995). Η απορρόφηση είναι δυνατό να συνδέεται με αποσύνθεση μέσω ενζυμικής δράσης ή υδρόλυση, ως κυτταρική απάντηση από τους περιβάλλοντες ιστούς. Η φλεγμονώδης απάντηση πρέπει να είναι ελάχιστη και αντιστρεπτή, και να μην αλληλεπιδρά με το νεόπλαστο οστό (Gottlow 1993, Γκισιάκης 2011).

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των απορροφήσιμων μεμβρανών είναι τα εξής (Schenk et al 1994, Yukna & Yukna 1996):

- Βιοσυμβατότητα
- Περιορισμένη χειρουργική παρέμβαση για την τοποθέτησή τους
- Ευκολία κλινικών χειρισμών
- Πρόσφυση στους ιστούς

Οι απορροφήσιμες μεμβράνες παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα σε περιπτώσεις εντοπισμένων οστικών βλαβών, σε μετεξακτικά φατνία, στην κάλυψη οστικών ελλειμμάτων τύπου "διάσχισης" ή "παραθύρου", στην κάλυψη εκτεθειμένων σπειρών οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων και σε μικρής έκτασης αύξησης της φατνιακής ακρολοφίας σε οριζόντιο επίπεδο (Γκισιάκης 2011).

Τα κυριότερα μειονεκτήματα των απορροφήσιμων μεμβρανών είναι τα εξής:

- Μηδενική αντοχή στην αποκάλυψη. Για παράδειγμα κατά το σύμβαμα της διάσχισης του κρημού και αποκάλυψη της απορροφήσιμης μεμβράνης παρατηρείται ταχύτατη αποδόμησή της. Έτσι, ελλοχεύουν κίνδυνοι για την τελική έκβαση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης λόγω βακτηριακής επιμόλυνσης, αλλαγής της μορφολογίας των ινοβλαστών και κατάδυσης κυττάρων του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού.
- Αυξημένος κίνδυνος κατακρήμνισης του νεοσυντεθειμένου οστού, εξαιτίας της μειωμένης υποστήριξης των υπερκείμενων ιστών (Anson 1996).

ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ MEMBRANES

ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΧΩΡΙΣ MEMBRANE

Το αρχικό στάδιο της αποκατάστασης ενός οστικού ελλείμματος είναι η πλήρωσή του με πήγμα αίματος. Η μετατροπή του αιμοπήγματος σε κοκκιώδη ιστό πραγματοποιείται με τη σύγχρονισμένη δράση των αγγειοβλαστών και των ινοβλαστών. Η διαδικασία αυτή στον άνθρωπο ολοκληρώνεται μέσα σε 14 ημέρες. Μέσα στον κοκκιώδη ιστό εντοπίζεται πυκνό κολλαγόνο, κυρίως τύπου I, II και III, λόγω της έντονης ινοβλαστικής δραστηριότητας των ινοβλαστών. Ταυτόχρονα, στη θεμέλια ουσία, η οποία έχει ήδη παραχθεί από τους πρώιμους οστεοβλάστες, εμφανίζονται πρωτεογλυκάνες και μία γλυκοζαμίνη, η θειική κερατάνη (Bruce & Dziewiatowski 1987). Η μεσοκυττάρια ουσία, η οποία ονομάζεται και οστεοειδές, επαναλαττώνεται με τη μετατροπή των μεσεγχυματογενών κυττάρων σε οστεοβλάστες και την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αλκαλικής φωσφατάσης (Καρακάσης 1986). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν τρεις ομάδες κυττάρων. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις ήδη διαφοροποιημένες οστεοβλάστες που βρίσκονται στην παρυφή του οστικού τραύματος. Τα κύτταρα αυτά δεν πολλαπλασιάζονται και δε μεταναστεύουν προς το κέντρο του ελλείμματος, με αποτέλεσμα η συνεισφορά τους στην οστεοποίηση του οστεοειδούς να είναι μικρή. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από τους περιαγγειακούς χώρους των τροφοφόρων αγγείων των οστών. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται διάσπαρτα μέσα στο συνδετικό ιστό. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται πρόδρομα οστεοκύτταρα και όταν ενεργοποιηθούν αποτελούν την πηγή των πρόδρομων οστεοβλαστών (Lang et al 1998). Σε ένα επόμενο στάδιο παρατηρείται μείωση του όγκου του δικτυωτού οστίτη ιστού, η οποία οφείλεται στη δραστηριότητα των οστεοκλαστών. Τέλος, ακολουθεί ο σχηματισμός του πεταλιώδους οστίτη ιστού και η επαναδιαμόρφωση του σχήματος του οστού. Έρευνες σε κουνέλια έδειξαν ότι την 28^η ημέρα έχει σχηματισθεί πυκνό οστό στην περιφέρεια και στο κέντρο εμφανίζονται οι πρώτοι μυελώδεις χώροι, ενώ την 35^η ημέρα διακρίνεται η σπογγώδης και η φλοιώδης μοίρα του οστού (Bruce & Dziewiatowski 1987).

Το μέγεθος του οστικού ελλείμματος κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην οστική επούλωση, διότι από την απόσταση μεταξύ σκληρών και μαλακών ιστών θα προσδιοριστεί και

το είδος του ιστού που θα κυριαρχήσει στη βλάβη. Το γεγονός αυτό συμβαίνει κατά την επούλωση όλων των οστικών ελλειμμάτων ανεξάρτητα από τη θέση τους, είτε εντοπίζονται στις γνάθους, είτε στο κρανίο, είτε στα άκρα (Λαζαρίδης και συν 1986, Dahlin et al 1988, 1990, Lundengren et al 1992). Το όριο για τα μη διαμπερή οστικά ελλείμματα θεωρείται η διάμετρος των 10 mm (Λαζαρίδης και συν 1986), ενώ το όριο για τα διαμπερή οστικά ελλείμματα είναι η διάμετρος των 5 mm (Bosh et al 1998).

Στη μελέτη του Schenk et al (1994), τα οστικά ελλείμματα στα οποία δεν είχε χρησιμοποιηθεί μεμβράνη επιδείκνυαν ένα σταθερό μηχανισμό επούλωσης: Ο σχηματισμός νέου οστού περιοριζόταν στα όρια του ελλείμματος, καλύπτοντας σε μικρή μόνο έκταση τον πυθμένα (μυελώδη χώρο) και τα δύο περιφερικά τοιχώματα. Σε διάστημα δύο μηνών, το νεόπλαστο οστόν κάλυπτε πλήρως το μυελώδη χώρο. Το αρχικό ύψος και ο όγκος της φατνιακής ακρολοφίας, όμως, δεν καλυπτόταν από οστίτη ιστό, αφού το μεγαλύτερο μέρος του οστικού ελλείμματος είχε αντικατασταθεί από ινώδη συνδετικό ιστό, δημιουργώντας μία χαρακτηριστική οδοντωτή παρυφή στο σημείο που εισέβαλλε στο πυθμένα. Η κατάσταση αυτή παρέμενε αναλλοίωτη και έπειτα από χρονικό διάστημα τεσσάρων περίπου μηνών. Παρατηρήθηκε μόνο μία μικρή αύξηση της πυκνότητας του νεόπλαστου οστού (Θωμαΐδης 2004).

Ο βιολογικός μηχανισμός με τον οποίον ο ταχύτατος σχηματισμός ινώδους συνδετικού ιστού παρεμποδίζει ή διαταράσσει εξ'ολοκλήρου την οστεογένεση δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. In Vitro πειράματα σε μελέτες έχουν δείξει ότι οι ινοβλάστες παράγουν έναν ή περισσότερους παράγοντες διαλυτότητας, οι οποίοι εμποδίζουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της οστεογένεσης (Ogiso et al 1991).

Μία ακόμη ερμηνεία που προτάθηκε από τους Schmitz και συν (1990) ήταν η αδυναμία των κυττάρων σε μεγάλα οστικά ελλείμματα, να ενασβεσιώσουν τη θεμέλια ουσία, εξ αιτίας της ανεπάρκειας αυξητικών παραγόντων και παραγόντων διαφοροποίησης (Θωμαΐδης 2004).

ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η επούλωση κάτω από τη μεμβράνη είναι διαφορετική, καθώς αφορίζεται και διατηρείται ογκομετρικά ο χώρος του χειρουργικού ελλείμματος. Η μεμβράνη ως φραγμός, ουσιαστικά διαχωρίζει τους μαλακούς ιστούς που βρίσκονται εξωτερικά (εξωτερικό διαμέρισμα) από το χώρο του οστικού ελλείμματος (εσωτερικό

διαμέρισμα). Στο εσωτερικό διαμέρισμα του οστικού ελλείμματος πρόσβαση έχει μόνο ο μυελός των οστών. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να αποκλείεται, εξ αρχής, η περίσσεια οστέωση (Schenk et al 1994).

Το εσωτερικό διαμέρισμα του οστικού ελλείμματος καταλαμβάνεται, αρχικά, από πήγμα αίματος. Υπολείμματα του πήγματος αίματος αυτού αναγνωρίζονται ακόμη και έπειτα από διάστημα δύο μηνών, κυρίως στο κέντρο του οστικού ελλείμματος. Το πήγμα αίματος αντικαθίσταται σταδιακά από κοκκιώδη ιστό στον οποίο εμφανίζονται νεόπλαστα αγγεία. Σε σύντομο χρονικό διάστημα, ο κύριος όγκος του εσωτερικού διαμερίσματος αποτελείται πλέον από νεόπλαστο σπογγώδες οστό. Ανάμεσα στις δοκίδες του νεοσυντεθημένου οστού παρατηρούνται μικροί δακτυλιοειδείς μυελοχώροι, οι οποίοι καταλαμβάνονται από αγγειοβριθή χαλαρό συνδετικό ιστό. Τα αιμοφόρα αγγεία και ο συνδετικός ιστός έρχονται σε επαφή με το μυελό των οστών, ο οποίος βρίσκεται εκτεθειμένος μέσα στο οστικό έλλειμμα. Η οστική σύνθεση ξεκινάει από τα όρια του οστικού ελλείμματος. Στα πρώτα στάδια εξαπλώνεται πάνω από το μυελό των οστών και έπειτα καταλαμβάνει όλο το χώρο κάτω από τη μεμβράνη. Το νεόπλαστο οστό αναπτύσσεται από τον πυθμένα και τα αξονικά τοιχώματα προς το κέντρο του οστικού ελλείμματος. Η μεμβράνη δε γίνεται αποδεκτή ως βάση όπου θα εναποτεθεί νεοσχηματισθέν οστό. Συνεπώς, η μεμβράνη συνήθως διαχωρίζεται από την επιφάνεια του νεοσχηματισμένου οστού με ένα λεπτότατο στρώμα ινώδους συνδετικού ιστού (Θωμαΐδης 2004).

Η μικροσκοπική δομή του νεόπλαστου οστού αποκαλύπτει σημαντικές διαφοροποιήσεις. Παρατηρούνται τρία κέντρα οστικής σύνθεσης. Στο εγγύς πρώτο τμήμα, το νεοσχηματισμένο οστό συνεχεται με το προϋπάρχον φλοιώδες πέταλο και αρχίζει να οριοθετεί έναν ομοιόμορφο μυελώδη χώρο. Το δεύτερο μέσο τμήμα, καταλαμβάνεται από ένα συνεχόμενο στρώμα σπογγώδους οστού που συνεχεται με το αντίστοιχο τμήμα της άπω πλευράς. Το τρίτο κέντρο της οστικής σύνθεσης εντοπίζεται στον πυθμένα του οστικού ελλείμματος, κατά μήκος της διανοιγμένης μυελικής κοιλότητας και εμφανίζει σχήμα θολωτό. Τα τρία κέντρα της οστικής σύνθεσης στην αρχή διαχωρίζονται μεταξύ τους με ένα λεπτό στρώμα ινώδους συνδετικού ιστού. Το λεπτό στρώμα ινώδους συνδετικού ιστού στη συνέχεια εξαφανίζεται ενώνοντας, τελικά, τα τρία κέντρα του οστικού σχηματισμού (Schenk et al 1994).

ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η οργάνωση του αιμοπήγματος, μέσω του κοκκιώδους ιστού, ακολουθεί το βασικό πρότυπο της επούλωσης όλων των τραυμάτων. Οι νεοσχηματισθείσες αγγειακές

εκβλαστήσεις, συνοδεύονται από κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών. Αυτά τα κύτταρα καλούνται πρόδρομα οστεοκύτταρα και όταν ενεργοποιηθούν μετασχηματίζονται σε πρόδρομους οστεοβλάστες. Τα περισσότερα αιμοφόρα αγγεία προσομοιάζουν με τριχοειδικούς αιματοκόλπους ή με φλέβες πολύ λεπτού τοιχώματος, σχηματίζοντας ένα λεπτότατο αναστομούμενο πλέγμα (Schenk et al 1994).

Δικτυωτό οστόν, σχήματος λεπτών διχαλωτών πεταλιών, συντίθεται στα χείλη του οστικού ελλείμματος. Οι δοκίδες του δικτυωτού οστού, πορεύονται μεταξύ των νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων. Οι οστικές αυτές δοκίδες που περιβάλλουν τα νεόπλαστα αιμοφόρα αγγεία συγχωνεύονται και δημιουργούν ένα δαιδαλώδη χώρο (ενδοδοκιδώδη χώρο). Στα αρχικά στάδια οι οστικές δοκίδες αποτελούνται μόνο από οστεοειδές. Στη συνέχεια παρατηρείται η ενασβεστίωση των οστικών δοκίδων, κυρίως από το κέντρο προς στην περιφέρεια. Η επιφάνεια του οστεοειδούς καλύπτεται από στρώμα οστεοβλαστών, το οποίο εκτείνεται μέσα στα βαθύτερα στρώματα του πλέγματος των δοκίδων του δικτυωτού οστού (Schenk et al 1994).

Ο σχηματισμός αυτός, ο οποίος αποτελείται αποκλειστικά από δικτυωτό οστόν ονομάζεται πρωτογενές ικρίωμα (primary scaffold) ή πρωτογενής σπογγώδης ουσία (primary spongiosa, primary spongework) (Θωμαΐδης 2004).

Η πρωτογενής σπογγώδης ουσία παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με το ώριμο σπογγώδες οστόν στην αρχιτεκτονική της δομή. Οι οστικές δοκίδες της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας διατάσσονται με τυχαίο προσανατολισμό στο χώρο και όχι παράλληλα. Η μέση διάμετρος των οστικών δοκίδων είναι 60 μm στην πρωτογενή σπογγώδη ουσία, ενώ είναι 200 μm στο ώριμο σπογγώδες οστόν. Ο όγκος των πόρων αποτελεί το 50% του συνολικού όγκου στην πρωτογενή σπογγώδη ουσία, ενώ στο ώριμο οστόν ο όγκος των πόρων αποτελεί το 70-80% του συνολικού όγκου. Το εύρος των πόρων (ενδοδοκιδώδεις χώροι) της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας κυμαίνεται από 100-200 μm, ενώ στο ώριμο σπογγώδες οστόν το εύρος των πόρων είναι 500 μm. Τα βασικά στοιχεία του ενδοδοκιδώδους χώρου είναι τα μεγάλα, λεπτού τοιχώματος, νεόπλαστα αιμοφόρα αγγεία, τα οποία ενσωματώθηκαν κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας (Schenk et al 1994). Συνεπώς, το αγγειακό δίκτυο παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσανατολισμό των οστικών στοιχείων της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας, αν και το οστόν από μόνο του εμπεριέχει ένα ενυπάρχον αυξητικό πρότυπο, όπως διατυπώνεται στην παλιά υπόθεση της “πρωτογενούς αγγειογενετικής οστεοποίησης” (Murrey 1936, Θωμαΐδης 2004).

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η πρωτογενής σπογγώδης ουσία αποτελείται αποκλειστικά από δικτυωτό οστόν, το οποίο φαίνεται να είναι και η προσωρινή βάση για την ανάπτυξη του συμπαγούς οστού αλλά και για τον μετασχηματισμό σε ώριμη σπογγώδη ουσία. Τα βασικά στάδια αυτής της φάσης, που αντιστοιχεί στον τρίτο και τέταρτο μετεγχειρητικό μήνα στον άνθρωπο, είναι η *έναρξη του σχηματισμού της συμπαγούς φλοιώδους οστέινης ουσίας και η ανάπτυξη της σπογγώδους οστέινης ουσίας με τις μυελοκυψέλες* (Schenk et al 1994).

Σχηματισμός του συμπαγούς φλοιού

Ο σχηματισμός της φλοιώδους οστέινης ουσίας ξεκινάει από το όριο του εγγύς και του άπω τοιχώματος του οστικού ελλείμματος. Η οστική εναπόθεση λαμβάνει χώρα σε συνέχεια με τον άθικτο συμπαγή φλοιό και με φορά ανάπτυξης προς το κέντρο του οστικού ελλείμματος. Η επιφάνεια των οστικών δοκίδων της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας επικαλύπτεται από ένα στρώμα ενεργών οστεοβλαστών. Οι ενεργές αυτές οστεοβλάστες, με τη συνεχή εναπόθεση οστίτη ιστού, αυξάνουν τη διάμετρο των οστικών δοκίδων και μειώνουν το μεταξύ τους χώρο. Η δομή του νεόπλαστου οστού μεταβάλλεται βαθμιαία από *δικτυωτό* σε *πεταλιώδες*, ενώ ορισμένες παράλληλες ίνες ινώδους ιστού, αντιπροσωπεύουν το ενδιάμεσο στάδιο ωρίμανσης (Θωμαιδης 2004).

Η διαδικασία σχηματισμού του συμπαγούς φλοιού ολοκληρώνεται όταν οι χώροι μεταξύ των οστικών δοκίδων προσεγγίσουν το μέγεθος των φυσιολογικών σωλήνων του συμπαγούς φλοιού. Οι οστέινοι αυτοί σωλήνες και τα περιβάλλοντα ομόκεντρα οστικά πετάλια αποτελούν τους πρωτογενείς οστεώνες ή πρωτογενή συστήματα του Havers (Schenk et al 1994).

Σχηματισμός δευτερογενούς σπογγώδους ουσίας

Ο σχηματισμός της δευτερογενούς σπογγώδους ουσίας ξεκινάει από το κέντρο του οστικού ελλείμματος, όπου ο μυελοχώρος αυξάνεται με την απορρόφηση της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας. Οι λεπτές οστικές δοκίδες υφίστανται σημαντικό ανασχηματισμό και τα υπολείμματα του δικτυωτού οστού σταδιακά αντικαθίστανται από θυλάκους πεταλιώδους οστού. Η διαδικασία αυτή ξεκινάει ταυτόχρονα από όλα τα τοιχώματα του οστικού ελλείμματος και βαθμιαία επεκτείνεται προς το κέντρο του. Τελικά, το ώριμο σπογγώδες οστόν που δημιουργείται, βρίσκεται σε άμεση συνέχεια με τις προϋπάρχουσες οστικές δοκίδες του υπόλοιπου οστού (Schenk et al 1994).

ΕΠΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ

Η οστική επαναδιαμόρφωση ή οστική ανακατασκευή αποτελεί μία σημαντική διαδικασία, κατά την οποία λαμβάνει χώρα αντικατάσταση του οστίτη ιστού χωρίς μεταβολή της αρχιτεκτονικής του δομής. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ποιοτική βελτίωση των φυσικομηχανικών και των βιοχημικών ιδιοτήτων του οστίτη ιστού (Schenk et al 1994).

Κατά τη διάρκεια του τέταρτου μήνα της οστικής επούλωσης, η φλοιώδης οστέινη ουσία εισέρχεται στην τελική φάση της ανακατασκευής των συστημάτων του Havers. Η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών οδηγεί σε οστικές απορροφήσεις σχήματος καναλιών, οι οποίες ταυτόχρονα περιβάλλονται από ομόκεντρα διατεταγμένα οστικά πετάλια. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται τα ώριμα συστήματα του Havers. Η οστική ανακατασκευή ξεκινάει από τα όρια του οστικού ελλείμματος και επεκτείνεται βαθμιαία προς το κέντρο του (Θωμαΐδης 2004).

Παρόμοια δραστηριότητα παρατηρείται και στη σπογγώδη ουσία του οστού. Η ωρίμανσή του σπογγώδους οστού συνίσταται στη βελτίωση των αναστομών των μυελοκυψελών και στην περαιτέρω επαναλάτωση της θεμέλιας ουσίας (Schenk et al 1994).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας βρίσκεται ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παρουσιάζουν καινούριες κατευθύνσεις στον τομέα της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης. Ο όρος αυξητικοί παράγοντες περιλαμβάνει μια ομάδα πολυπεπτιδίων περίπου 6-45 kD, τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και μορφογένεση ιστών και οργάνων κατά την εμβρυογένεση, την βρεφική ανάπτυξη και την ενηλικίωση. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι δυνατό να δρουν ως μιτογόνα καθώς, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό ορισμένων κυτταρικών τύπων. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες παρουσιάζουν μορφογεντικό δυναμικό, μεταβάλλοντας το φαινότυπο των κυττάρων στόχων τους. Οι αυξητικοί παράγοντες δρουν με αυτοκρινή τρόπο, άμεσα στο κύτταρο από το οποίο εκκρίνονται και με παρακρινή τρόπο επηρεάζοντας γειτονικά κύτταρα. Για ορισμένους αυξητικούς παράγοντες έχει υποστηριχθεί πως έχουν ενδοκρινή δράση, εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων τους στον ορό του αίματος. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες εναποτίθενται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, από την οποία απελευθερώνονται κατά την αποδόμησή της και δρουν ως μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου σημάτων με καθοριστική επίδραση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και αναδιαμόρφωσης των ιστών. Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων διαμεσολαβείται από υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων στόχων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων φωσφορυλιωμένων ενζύμων, τα οποία στη συνέχεια επάγουν ένα ενδοκυττάριο σύστημα μετάδοσης πληροφοριών με άθροιση συμπαραγόντων και άλλων πρωτεϊνών που μεταναστεύουν στον πυρήνα. Με τη συνεπικουρία άλλων παραγόντων αντιγραφής ενεργοποιούν ομάδες γονιδίων που προκαλούν συγκεκριμένες αλλαγές στην κυτταρική δραστηριότητα και στο φαινότυπο. In vivo, η δράση των αυξητικών παραγόντων ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο σύστημα ανάδρασης, στο οποίο εμπλέκονται αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα και πρωτεΐνες προσκόλλησης (Schliephake 2002, Καπαρού 2012).

Η θεραπευτική εφαρμογή των αυξητικών παραγόντων για την αποκατάσταση κατεστραμμένων ιστών και οργάνων βασίζεται στην επίτευξη ανάπτυξης ή σχηματισμού ιστών. Η ανάπτυξη αυτή των ιστών επιτελείται με την επαγωγή εκ νέου της αναπτυξιακής διαδικασίας που δημιούργησε ένα όργανο ή τμήμα του

σώματος, κατά την εμβρυϊκή ή βρεφική ανάπτυξη. Η αύξηση και η ανάπτυξη υπόκεινται σε πολύπλοκη ρύθμιση, η οποία είναι απαραίτητη για την αποτροπή νοσηρής αύξησης. Για το λόγο αυτό η μη αντανεκλαστική ενίσχυση μεμονωμένων σημάτων είναι δυνατό να αποτελέσει και το έναυσμα για μία ανεξέλεγκτη αύξηση, η οποία μπορεί να έχει ως επακόλουθο την ανάπτυξη κακοήθων όγκων (Ehrnberg et al 1993).

Ο μηχανισμός της ρύθμισης της κυτταρικής δραστηριότητας κατά την οστική αναγέννηση διενεργείται από μία πληθώρα βιοενεργών μορίων. Μεγάλος αριθμός αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών συντονίζουν και ελέγχουν την ομαλή πορεία της οστικής επούλωσης και εμφανίζουν οστεοεπαγωγική δράση (Gesterfeld et al 2003, Ripamonti et al 2006, Schindeler et al 2008, Weiss et al 2009). Η θεραπευτική χρήση των αυξητικών παραγόντων για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους σε πειραματικές μελέτες εμφανίζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Blumenfeld et al 2002, Srouji et al 2004, Rabie & Lu 2004, Arosarena & Collins 2005, Srouji et al 2005, Patel et al 2008, Liang et al 2010).

Η προαγωγή της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης οφείλεται, κυρίως, στην αλληλεπίδραση του εξωγενώς χορηγούμενου αυξητικού παράγοντα με τους ενδογενώς παραγόμενους αυξητικούς παράγοντες και τις κυτοκίνες. Η πολυπλοκότητα της διαδικασίας της οστικής επουλωτικής, αλλά και της συνδυαστικής και ταυτόχρονης δράσης πολλών διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων καθιστούν αναγκαία την κατανόηση του ακριβούς ρόλου των αυξητικών παραγόντων και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων (Kempen et al 2010).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και στην αύξηση των ιστών. Οι δράσεις των αυξητικών παραγόντων στους ιστούς είναι πολύπλοκες, καθώς κάθε παράγοντας μπορεί να έχει διαφορετική δράση σε διαφορετικό κάθε φορά ιστό. Συχνά, επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο ένας αυξητικός παράγοντας να αλληλεπιδρά με κάποιον άλλο (Hom & Maisel 1992). Οι αυξητικοί παράγοντες έχει διαπιστωθεί ότι δρουν άλλοτε με αυτοκρινή τρόπο, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη λειτουργία των ίδιων των κυττάρων που τους εκκρίνει, και άλλοτε με παρακρινή τρόπο, επηρεάζοντας τη δράση άλλων γειτονικών κυττάρων. Πιθανώς ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες να διαθέτουν επιπλέον ενδοκρινή δράση εξαιτίας των αυξημένων συγκεντρώσεων τους στον ορό του αίματος (Schliephake 2002).

Οι αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν τις εξής γενικές λειτουργίες (Schliephake 2002, Μαρουφίδης 2009):

- Δρουν μιτογενετικά και επιτείνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που συμμετέχουν στην οστική αναγέννηση
- Επιταχύνουν την νεοαγγειογένεση καθώς συμβάλλουν στο σχηματισμό νεόπλαστων τριχοειδών αγγείων
- Επιδρούν χημειοτακτικά σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως στους ινοβλάστες, στα μακροφάγα και στα μονοκύτταρα, προκειμένου αυτά να εκδηλώσουν τις εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες τους, όπως είναι η σύνθεση κολλαγόνου και η φαγοκυττάρωση
- Καλύπτουν αντιμικροβιακά την περιοχή της οστικής ανάπλασης, καθώς προκαλούν αύξηση των λευκοκυττάρων
- Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες αλλάζουν το φαινότυπο των κυττάρων στα οποία επιδρούν.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Στους αυξητικούς παράγοντες περιλαμβάνονται κυρίως (Καπαρού 2012):

1. Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (*Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*)
2. Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (*Transforming Growth Factor-β, TGF-β*)
3. Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (*Fibroblast Growth Factor, FGF*)
4. Αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη (*Insuline-like Growth Factor, IGF*)
5. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (*Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*)
6. Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (*Platelet-Derived Growth Factor, PDGF*)
7. Προγονικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης

ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (BMPs)

Οι BMPs περιλαμβάνουν περίπου είκοσι πρωτεΐνες, από τις οποίες τουλάχιστον οι επτά παρουσιάζουν οστεοεπαγωγική δράση (Chen et al 2004, Kempren et al 2010). Η βιολογικά ενεργή μορφή των BMPs αποτελείται από ένα μόριο 30-38 kDa, το οποίο παρουσιάζει δύο ίδιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών η δομή των BMPs είναι συντηρούμενη. Οι ισομορφές τους, επίσης, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων (Ripamondi et al 2006). Η σύνθεση των BMPs πραγματοποιείται στα οστά από τις οστεοβλάστες. Οι BMPs εκκρίνονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των οστών και εμπλέκονται σε διάφορες αναπτυξιακές και παθοφυσιολογικές διεργασίες (Canalis et al 2003, Chen et al 2004). Όσον αφορά στη μελέτη της οστεοεπαγωγικής τους δράσης, οι BMPs προάγουν *in vitro* τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προς οστεοβλαστικό φαινότυπο (Luu et al 2007). Η προσθήκη των BMPs σε κριώματα ή η απευθείας έγχυσή τους στην περιοχή του οστικού ελλείμματος αυξάνει την οστική σύνθεση *in vitro*. Σε πειραματικές μελέτες με πειραματόζωα η προσθήκη των BMPs σε κριώματα ή η απευθείας έγχυσή τους στην περιοχή του οστικού ελλείμματος αυξάνει, επίσης, την εναπόθεση οστού (Blonkhuis 2009). Η προσθήκη των BMPs σε άλλους ιστούς εκτός από τον οστίτη ιστό, διεγείρει την έκτοπη οστική σύνθεση μέσω χονδρογενούς ή υμενογενούς οστεοποίησης. Η οστεοποίηση αυτή καταλήγει σε εναπόθεση πρωτογενούς ή/και πεταλιώδους οστού (Wang et al 1990). Η προσθήκη της BMP-2 σε κριώμα υαλουρονικού οξέος ή κολλαγόνου/υδροξυαπατίτη, όταν τοποθετείται σε προκλητό οστικό έλλειμμα της κάτω γνάθου επιμύων, διεγείρει την οστική σύνθεση και αυξάνει την εναπόθεση οστού σε σχέση με τη χρήση των κριωμάτων χωρίς την προσθήκη της BMP-2 (Arosena & Collins 2005). Η προσθήκη της BMP-2 σε κριώμα συμπολυμερούς πολυγαλακτικού και πολυγλυκολικού οξέος, όταν τοποθετείται σε προκλητό οστικό έλλειμμα στην σπονδυλική στήλη επιμύων, διεγείρει επίσης την οστική σύνθεση και αυξάνει την εναπόθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού (Liang et al 2010).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ-β (TGF-β)

Οι TGFs-β είναι αυξητικοί παράγοντες με πολλές βιολογικές δράσεις σε διαφορετικούς ιστούς. Ο TGF-β στον άνθρωπο παρουσιάζει τρεις ισομορφές, οι οποίες αποτελούνται από ένα ομοδιμερές πρωτεϊνικό μόριο 25kDa. Οι ισομορφές του TGF-β εμφανίζουν, επίσης, ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων κατά 60-80%. Η σύνθεση των TGFs-β πραγματοποιείται από διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

Οι TGFs-β αποθηκεύονται συζευγμένοι με ένα πεπτίδιο ως ανενεργό σύμπλοκο στην εξωκυττάρια οστική θεμέλια ουσία (Lawrence 2001). Μία βασική πηγή του TGF-β είναι τα αιμοπετάλια, τα οποία εμπεριέχονται στον σχηματιζόμενο αιματικό θρόμβο σε ένα οστικό κάταγμα. Η απελευθέρωση του TGF-β από το ανενεργό σύμπλοκο στην εξωκυττάρια οστική θεμέλια ουσία και η επαγωγή της βιολογικής του δράσης ρυθμίζεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών (Annes et al 2003). Η βιολογική δράση του TGF-β περιλαμβάνει τα εξής: τη διέγερση της μετανάστευσης των οστεοπρογονικών κυττάρων, την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και τη ρύθμιση της σύνθεσης της εξωκυττάριας οστικής θεμέλιας ουσίας. Η επίδραση του TGF-β στην οστική σύνθεση μπορεί να είναι τόσο διεγερτική όσο και ανασταλτική. Γενικότερα, υπερισχύει η διεγερτική επίδραση του TGF-β στον οστικό σχηματισμό (Janssens et al 2005). Ο TGF-β συνεργεί συχνά με τις BMPs για την προσέλκυση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την οστεοβλαστική διαφοροποίησή τους (Janssens et al 2005), καθώς επίσης και την προαγωγή της αγγειογένεσης (Deckers et al 2002, Gerstenfeld et al 2003, Weiss et al 2009).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ (FGF)

Οι FGFs είναι αυξητικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν εικοσιπέντε μέλη. Το μέγεθός τους υπολογίζεται στα 17-34kDa και εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους κατά 15-65% (Eswarakumar et al 2005). Στα οστά οι FGFs παράγονται από οστεοβλάστες, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Έπειτα οι FGFs αποθηκεύονται σε ενεργή μορφή στην εξωκυττάρια οστική θεμέλια ουσία. Οι FGFs έχουν αυτοκρινή και παρακρινή μηχανισμό δράσης, λειτουργώντας ως μιτογόνα σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι FGFs συνεπικουρούν στις διαδικασίες της κυτταρικής διαφοροποίησης και της αγγειογένεσης (Schmid et al 2009). Στην αρχή της οστικής επούλωσης έπειτα από κάταγμα, η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων για τους FGF-1, -2 και -5 συσχετίζεται με τον αυξανόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η αύξηση της έκφρασης γονιδίων για τους FGFs συσχετίζεται, επίσης, με τη ρύθμιση της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης (Schmid et al 2009). Ο FGF-2 έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τη δράση του στη διαδικασία της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (Marie 2003). Ο FGF-2 διεγείρει την οστική σύνθεση και παράλληλα συμβάλλει στην οστική επούλωση (Nakajima et al 2001). Σε πειραματικές μελέτες, η προσθήκη FGF-2 σε αλλομόσχευμα για την αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων της κάτω γνάθου πειραματόζωων αυξάνει την έκφραση του VEGF στην περιοχή της βλάβης και προάγει τον σχηματισμό νεόπλαστου οστίτη

ιστού (Rabie & Lu 2004). Η συγχορήγηση μικρών δόσεων FGFs μαζί με BMPs προάγει την οστική ανάπτυξη, ενώ η χορήγηση μεγάλων δόσεων FGFs αναστέλλει την επαγόμενη από τις BMPs οστική σύνθεση (Nakamura et al 2005, Kakudo et al 2006).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΟΥ ΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ (IGF)

Οι IGF-1 και IGF-2 αποτελούνται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 7,5kDa και παίζουν σπουδαίο ρόλο στον οστικό μεταβολισμό, στη σκελετική ανάπτυξη και στη διατήρηση της οστικής μάζας. Η σύνθεση των ινσουλινομιμητικών αυξητικών παραγόντων λαμβάνει χώρα σε διάφορους ιστούς. Η βιολογική δράση των IGFs εκδηλώνεται με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή μηχανισμό. Η ρύθμιση της δράσης τους πραγματοποιείται με κυτταρο-ειδικό μηχανισμό, μέσω της σύζευξης τους με IGF-συνδετικές πρωτεΐνες (Copover 2008). Οι IGFs εντοπίζονται στην οστική θεμέλια ουσία. Οι IGFs ασκούν, επίσης, αντιαποπτωτική δράση επί των προ-οστεοβλαστών και προάγουν τη σύνθεση της θεμέλιας ουσίας (Niu & Rosen 2005). Η συστηματική χορήγηση IGFs αυξάνει *in vivo* την οστική σύνθεση, τον οστικό όγκο και το ρυθμό οστικής επαναδιαμόρφωσης, με βάση τα αποτελέσματα πειραματικών ζωικών μελετών και κλινικών μελετών για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης (Rosen 2004). Η συστηματική χορήγηση των IGFs έχει ως ανεπιθύμητες ενέργειες την εμφάνιση υπογλυκαιμίας, ενδοκρανιακής υπέρτασης, πονοκεφάλων και εύκολης κόπωσης. Παρόλα αυτά, η εντοπισμένη χορήγηση IGF-1 διεγείρει την οστική σύνθεση τοπικά, χωρίς να αυξάνει τα επίπεδα του IGF-1 στη συστηματική αιματική κυκλοφορία (Meinel et al 2003, Fowlkes et al 2006).

ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (VEGF)

Ο VEGF αποτελείται από ένα διμερές πρωτεϊνικό μόριο, 121-206 αμινοξέων. Η σύνθεση του VEGF αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας και ο σχηματισμός του διεγείρεται από τις κυτοκίνες. Ο VEGF *in vivo* προάγει την αγγειογένεση και αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων (Nefeuldt et al 1999, Hansen-Algenstaedt et al 2006). Η νεοαγγειογένεση και η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας είναι διαδικασίες πολύ σημαντικές για την τροφοδοσία με θρεπτικά συστατικά, τη μεταφορά μακρομορίων και την κυτταρική διείσδυση στην περιοχή του οστικού ελλείμματος. Συνεπώς, ο VEGF προάγει και την οστική ανάπτυξη. Η διέγερση ή η αναστολή της δράσης του VEGF σε πειραματικές μελέτες κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ή τη διαταραχή της οστικής επούλωσης αντίστοιχα (Street et al 2002, Eckardt et al 2005, Peng et al 2005).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PDGF)

Ο PDGF είναι ένας αυξητικός παράγοντας 30kDa, ο οποίος αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (Kempen et al 2010). Τα αιμοπετάλια, τα οποία συναθροίζονται στην περιοχή του τραύματος λόγω της αιμορραγίας αποτελούν την κύρια πηγή του PDGF. Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα μακροφάγα και τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία προσελκύνονται στην περιοχή του τραύματος από τον PDGF, διεγείρουν τη σύνθεση επιπλέον ποσότητας PDGF. Ο PDGF προάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και τη νεοαγγειογένεση, διεγείροντας παράλληλα την προσέλκυση άλλων μεσεγχυματικών κυττάρων (Greenberg et al 2008, Zhang et al 2009). Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (*Platelet Rich Plasma, PRP*) περιέχει PDGF σε μεγάλη συγκέντρωση. Τα αιμοπετάλια του PRP ενεργοποιούνται υπό ειδικές συνθήκες και εκκρίνουν πληθώρα αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των PDGF, TGF-β, IGF-1 και VEGF. Σε σύγχρονες κλινικές δοκιμές και πειραματικές μελέτες η χρήση του PRP στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση επιδρά θετικά ή δεν επηρεάζει καθόλου την οστική επούλωση, αποδίδοντας αντιφατικά αποτελέσματα (Kitoh et al 2004, Park et al 2008, Kempen et al 2010).

ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Τα προγονικά/βλαστικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης έχουν την *ιδιότητα της αυτό-ανανέωσης*. Τα προγονικά κύτταρα μπορούν, επίσης, να *διαφοροποιηθούν προς δύο τουλάχιστον ξεχωριστές κυτταρικές σειρές* (Parker et al 2004). Μόνο τα κύτταρα, τα οποία πληρούν αυτές τις δύο βασικές προϋποθέσεις ονομάζονται βλαστικά κύτταρα. Η ιδιότητα της αυτό-ανανέωσης υποδηλώνει ότι τα αδιαφοροποίητα θυγατρικά κύτταρα αποτελούν ακριβή αντίγραφα του πατρικού κυττάρου και μπορούν περαιτέρω να αναπαραχθούν για πολλές γενεές χωρίς να απωλέσουν τα αρχικά χαρακτηριστικά τους (Carlan 1991, Καπαρού 2012). Για το σκοπό αυτό τα προγονικά/βλαστικά κύτταρα υπόκεινται σε ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση που συνεπάγεται την παραγωγή ενός θυγατρικού κυττάρου με ιδιότητες βλαστικού κυττάρου και ενός κυττάρου που με διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις δίνει ένα διαφοροποιημένο απόγονο (Morrison et al 1997, Harada et al 1999, Καπαρού 2012). Τα προγονικά βλαστικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης εντοπίζονται στο αιμοποιητικό και νευρικό σύστημα, στις γονάδες, στο έντερο, στο δέρμα, στο οσφρητικό επιθήλιο, στα δόντια (Morrison et al 1997, Harada et al 1999, Fuchs & Serge 2000, Gronthos et al 2002). Συνεπώς, παρατηρούνται προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, του λιπώδους ιστού, του ομφαλίου λώρου, του

οδοντικού πολφού μόνιμων δοντιών, του περιοδοντικού συνδέσμου, της ακρορριζικής θηλής, του οδοντοθυλακίου και προγονικά κύτταρα προερχόμενα από αποπίπτοντα νεογιλά δόντια (Καπάρου 2012). Τα προγονικά βλαστικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης είναι δυνατό να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλαστική κατεύθυνση, αφού καλλιεργηθούν κάτω από ειδικές συνθήκες επαγωγής και διαφοροποίησής. Η συν-καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων μαζί με κατάλληλα βιοϋλικά είναι δυνατό να επιτρέπει την παραγωγή τρισδιάστατων βιολογικών οστικών κριωμάτων. Η ανάπτυξη βιολογικών οστικών υποκατάστατων, της μορφής των κριωμάτων, παρέχει μία νέα εναλλακτική προσέγγιση για την αποκατάσταση, διατήρηση ή βελτίωση της οστικής λειτουργίας στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (Seong et al 2010).

ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΡΙΣΜΟΙ

Η ανάγκη της οστικής μεταμόσχευσης για την αποκατάσταση των οστικών ελλειμμάτων ή για την αύξηση του οστικού όγκου, φαίνεται να είναι στις μέρες μας όλο και πιο επιτακτική, εξαιτίας της αυξημένης δυνατότητας να αντιμετωπίζονται επιτυχώς μεγάλες οστικές απώλειες (Schlierhake et al 2001, Γκισιάκης 2011). Τα μοσχευματικά υλικά συμβάλλουν στην αρχική εναπόθεση του ανώριμου οστεοειδούς λειτουργώντας ως ικρίωμα στήριξης. Κατά τη διάρκεια της οστικής επούλωσης τα μοσχεύματα απορροφώνται βαθμιαία, όπως εξάλλου και το ανώριμο οστεοειδές. Ο ρυθμός απορρόφησής τους, όμως, διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το είδος του μοσχεύματος. Τα μοσχευματικά υλικά αντικαθίστανται σταδιακά από οργανωμένο πεταλιδώδες οστόν. Παράλληλα, τα μοσχευματικά υλικά συμβάλλουν στη μηχανική υποστήριξη και συγκράτηση της μεμβράνης. Εμποδίζουν, επίσης την κατάρρευσή της στο οστικό έλλειμμα, στο οποίο πρόκειται να πραγματοποιηθεί η κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (Μαρουφίδης 2009).

Ένα ιδανικό μοσχευματικό υλικό θα πρέπει να διαθέτει τις εξής ιδιότητες: ικανότητα κυτταρικής προσκόλλησης, υποστήριξη κυτταρικής διαφοροποίησης, βιοσυμβατότητα, οστεοκαθοδήγηση, οστεοεπαγωγή, ελεγχόμενη βιοαποικοδομησιμότητα, οστική ανάπτυξη και οστική σύνθεση (Moore et al 2001, Rezwan et al 2006, Navarro et al 2008).

Ανάλογα με την προέλευσή του δότη, τα μοσχευματικά υλικά κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες: (i) Στα αυτογενή ή αυτόλογα μοσχεύματα (αυτομοσχεύματα), (ii) στα αλλογενή μοσχεύματα ή αλλομοσχεύματα, (iii) στα ξενογενή μοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα και (iv) στα αλλοπλαστικά συνθετικά υλικά ή συνθετικά μοσχεύματα. Επιπλέον, ανάλογα με τον τρόπο συντήρησής τους, διακρίνονται σε νωπά και συντηρημένα. Τα νωπά λαμβάνονται τη στιγμή της μεταμόσχευσης. Τα συντηρημένα μοσχεύματα λαμβάνονται σε χρόνο προηγούμενο της χρησιμοποίησής τους και συντηρούνται κυρίως με κατάψυξη, βρασμό ή αντισηπτικά διαλύματα. Τέλος, ανάλογα με τη σύστασή τους τα μοσχευματικά υλικά διακρίνονται σε σπογγώδη και σε συμπαγή (Burchatdt 1987, Goldberg 2001, Μαρουφίδης 2009).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Η βιολογική δραστηριότητα των οστικών μοσχευματικών υλικών είναι αποτέλεσμα δύο, κυρίως, λειτουργιών: της οστεογένεσης και της μηχανικής υποστήριξης. Η οστική ανάπλαση, συνήθως, απαιτεί τρεις διαδικασίες:

- οστεογένεση (osteogenesis)
 - οστεοεπαγωγή (osteoiduction),
 - οστεοκαθοδήγηση (osteocoDUCTION)
- (Urist 1980, Stevenson 1999, Kalfas 2001)

ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗ (osteogenesis)

Η οστεογενετική δράση των μοσχευματικών υλικών σχετίζεται με την ικανότητά τους να δημιουργούν νέο οστικό ιστό, εξαιτίας της ύπαρξης των ζωντανών οστεοβλαστών που περιέχουν. *Μόνον το οστικό αυτομόσχευμα έχει οστεογενετικές ιδιότητες.* Η διατήρηση αυτών των ιδιοτήτων επιβάλλει την άμεση χρησιμοποίηση του αυτομοσχεύματος ή την αποθήκευσή του σε αποστειρωμένο διάλυμμα φυσιολογικού ορού, προκειμένου να διατηρηθεί την ζωτικότητα του. Αντίθετα, η διατήρηση του αυτομοσχεύματος σε απεσταγμένο ύδωρ αντενδείκνυται, διότι λόγω της υποτονικότητας του ύδατος επέρχεται κυτταρική λύση των οστεοβλαστών. Επίσης, αντενδείκνυται η διατήρηση του αυτομοσχεύματος σε αιματικό περιβάλλον, καθώς τα ερυθροκύτταρα απελευθερώνουν κατά τη λύση τους κυτταροτοξικούς παράγοντες. Η διέγερση της οστικής σύνθεσης *in vivo* έχει διαπιστωθεί ότι είναι δυνατή και με τη χρήση αυξητικών παραγόντων όπως είναι ο PDGF, ο TGF-β και οι BMPs (Μαρουφίδης 2009). Οστεογένεση καλείται η φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία νεόπλαστο οστόν σχηματίζεται από κύτταρα του μοσχεύματος ή του ίδιου του οργανισμού. Κύτταρα της επιφανείας που επιβιώνουν κατά την μεταμόσχευση είτε φλοιώδους, είτε σπογγώδους μοσχεύματος, μπορούν να παράγουν νέο οστικό ιστό (Bassett 1972, Gray & Elvev 1982, Yaszemski et al 1996, Marie et al 2000). Αυτό το νεόπλαστο οστόν είναι αρχικά πολύ σημαντικό για τη δημιουργία του πώρου κατά την πρώιμη φάση ενσωμάτωσης του οστικού μοσχεύματος. Το σπογγώδες οστόν, εξαιτίας της μεγαλύτερης επιφάνειάς του, εμφανίζει αυξημένο οστεογενετικό δυναμικό για το σχηματισμό νεόπλαστου οστού σε σχέση με το φλοιώδες οστόν (Lemperle et al 1998, Moore et al 2001, Rezwan et al 2006, Navarro et al 2008).

ΟΣΤΕΟΕΠΑΓΩΓΗ (osteoiduction)

Η οστεοεπαγωγική δράση των μοσχευματικών υλικών σχετίζεται με τη

μετανάστευση κυττάρων (μακροφάγα) στη δέκτρια περιοχή του μοσχεύματος. Τα μεταναστευτικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των τοπικών μεσεγχυματικών κυττάρων σε ινοβλάστες, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η σύνθεση οστικής θεμέλιας ουσίας και νέου αγγειακού δικτύου. Η οστεοεπαγωγή έχει την έννοια της παροχής οστεογενετικού δυναμικού με την επαγωγή των κυττάρων του δέκτη οργανισμού για την παραγωγή νέου οστίτη ιστού. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται με την προσέλκυση μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται προς οστεοπαραγωγικά κύτταρα (Winn et al 2000, Vico et al 2001). Η διαδικασία αυτή επάγεται από τις προερχόμενες από το μόσχευμα πρωτεΐνες, οι οποίες καθοδηγούν τις φυσιολογικές διαδικασίες. Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs) είναι οι περισσότερο μελετημένες πρωτεΐνες (Wozney 2002). Οι πιο ενεργές BMPs, στο οστόν, είναι οι BMP-2, -4 και -7 (Muschler et al 1994, Cook 1995). Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες, στην επούλωση των καταγμάτων και στην οστική αναδιαμόρφωση (Long 1995, Azari et al 2002, Cheng et al 2003). Σε προηγούμενες μελέτες απομεταλλικοποίησης και τμηματικής αφαίρεσης κάθε αντιγονικού υλικού από την οστική θεμέλια ουσία διαπιστώθηκε η παρουσία των BMPs στο οστόν (Urist 1980). Η δραστηριότητα αυτή δεν απαιτεί την παρουσία ζώντων κυττάρων στο μοσχευματικό υλικό, αφού αποτελεί ιδιότητα της οστικής θεμέλιας ουσίας. Αυτός ο μηχανισμός δράσης παρατηρείται σε κάθε τύπο οστού είτε σε αυτομοσχεύματα, είτε σε αλλομοσχεύματα, αρκεί η μέθοδος επεξεργασίας που ακολουθείται να μην επιτρέψει την καταστροφή των BMPs, όπως ο κλιβανισμός (Wozney 2002, Cheng et al 2003).

ΟΣΤΕΟΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ (osteoconduction)

Η σύνθεση νέου οστίτη ιστού είναι δυνατή και με την οστεοκαθοδηγητική δράση των σύγχρονων μοσχευματικών υλικών. Στην οστεοκαθοδήγηση παρέχεται ένα βιολογικό πλαίσιο ως βάση εναπόθεσης νεόπλαστου οστού. Τα μοσχευματικά υλικά αυτά επιτρέπουν την εναπόθεση του νεόπλαστου οστίτη ιστού και του νέου αγγειακού δικτύου, λειτουργώντας ως ικρίωμα για την στήριξη των μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή της οστικής επούλωσης και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και ινοβλάστες. Η οστεοκαθοδήγηση χαρακτηρίζει όλα τα μοσχεύματα και τα βιοϋλικά. Η λειτουργία της οστεοκαθοδήγησης, με ικρίωμα το μοσχευματικό υλικό, επιτρέπει την

τριδιάστατη διαμόρφωση και ανάπτυξη των νέων τριχοειδών αγγείων, των περιαγγειακών ιστών και των οστεοπρογονικών κυττάρων του δέκτη οργανισμού (Kalfas 2001, Hing et al 2003). Για την ενσωμάτωση του οστικού μοσχεύματος απαιτείται η αλληλεπίδραση της οστεοεπαγωγής και της οστεοκαθοδήγησης. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σταδιακά στην αντικατάσταση του μοσχεύματος από οστούν του οργανισμού, με προβλέψιμο τρόπο, υπό την επίδραση των βιολογικών φορτίσεων (Urist 1980, Bauer & Muschler 2000, Parikh 2002). Η ενσωμάτωση του οστικού μοσχεύματος αποτελεί μία ακολουθία ορθά ισορροπημένων διαδικασιών ανάμεσα στο μόσχευμα και στον οργανισμό του δέκτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όλες οι παραπάνω διαδικασίες βρίσκονται ταυτόχρονα σε εξέλιξη (Marie et al 2000). Η αρχική φλεγμονώδης απάντηση έχει ως αποτέλεσμα την μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών στο μόσχευμα. Η δημιουργία του αιματώματος που παρατηρείται ενισχύει την απελευθέρωση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Εξαιτίας της οστεοεπαγωγής κινητοποιούνται η χημειοταξία, η μίτωση και η διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων του οργανισμού. Κατά την 5η ημέρα της επούλωσης, τα χονδροκύτταρα είναι, συνήθως, αναγνωρίσιμα. Οι οστεοβλάστες είναι εμφανείς κατά την 10^η ημέρα μετά την μεταμόσχευση (Stevenson 1999, Caplan & Bruder 2001). Τα νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία του οργανισμού, σε σύντομο χρονικό διάστημα, εισέρχονται στο μόσχευμα μέσω των υπάρχοντων αβέρσιων συστημάτων και των καναλιών του Volkmann παρέχοντας οστεοκλάστες που απορροφούν τις επιφάνειες του μοσχεύματος (Carano & Filvaroff 2003). Στις επιφάνειες του μοσχεύματος παρατηρούνται παράλληλα ενδομεμβρανώδης και ενδοχόνδρια οστεοποίηση (Stevenson 1997, 1999). Η οστεοκαθοδήγηση συνεχίζεται, στα μεγάλα φλοιώδη ή σπογγώδη μοσχεύματα, για πολλά έτη με τελικό αποτέλεσμα την απορρόφηση του αρχικού μοσχεύματος και την αντικατάσταση του με οστούν του οργανισμού. Η αναδιαμόρφωση είναι αποτέλεσμα και της επίδρασης των εμβιομηχανικών φορτίων στην περιοχή (Dwight 1999). Η επιτυχία της όλης διαδικασίας εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στην επαναγγείωση (νεοαγγειογένεση) και στην οστεογένεση, καθώς επίσης και από τη συμπεριφορά του μοσχεύματος στις εφαρμοζόμενες δυνάμεις. Για την επιτυχημένη ενσωμάτωση του μοσχεύματος απαιτείται η επίτευξη βιολογικής ισορροπίας μεταξύ οστού και δέτριας θέσης. Η ενσωμάτωση του οστικού μοσχεύματος είναι μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των βιολογικών ιδιοτήτων του μοσχεύματος, του περιβάλλοντος και της εμβιομηχανικής συμπεριφοράς του συστήματος μόσχευμα-δέτρια θέση (Stevenson et al 1996, Stevenson 1997, 1999, Roberts & Hartsfield 2004).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

ΑΥΤΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ

Το αυτομόσχευμα είναι το ιδανικό και πλέον χρησιμοποιούμενο είδος μοσχεύματος, καθώς η βιολογική του αξία είναι συγκριτικά υψηλότερη. Η χρήση των αυτομοσχευμάτων συνιστάται για την πλήρωση οστικών ελλειμμάτων στις περιπτώσεις εκείνες όπου υπάρχει καλή κάλυψη με μαλακά μόρια, χωρίς στοιχεία φλεγμονής. Η επιλογή μεταξύ φλοιώδους ή σπογγώδους αυτομοσχεύματος εξαρτάται από τις απαιτήσεις στις οποίες καλείται αυτό να ανταποκριθεί. Έτσι, το σπογγώδες αυτομόσχευμα χρησιμοποιείται για την κάλυψη κυστικών ελλειμμάτων ή για άλλες ενδογενώς σταθερές περιπτώσεις, ενώ το φλοιώδες αυτομόσχευμα χρησιμοποιείται ως δομικό-στηρικτικό στοιχείο (Friedlaender 1997).

Τα αυτομοσχεύματα διαθέτουν όλες τις ιδιότητες που καθιστούν ένα οστικό μόσχευμα ιδανικό όπως: οστεογενετικότητα, οστεοεπαγωγή, οστεοκαθοδήγηση και ιστοσυμβατότητα. Η μεγάλη πλειονότητα των ερευνητών (Nkenke et al 2004) θεωρεί ότι το οστικό αυτομόσχευμα είναι ιδανικό (gold standard) και όλα τα σύγχρονα μοσχευματικά υλικά συγκρίνονται προς αυτό. Το οστικό αυτομόσχευμα συλλέγεται από ενδοστοματικές περιοχές, όπως είναι η γενειακή σύμφυση, το οπισθογόμφιο τρίγωνο, το γναθιαίο κύρτωμα, η κορωνοειδής απόφυση και το ζυγωματικό τόξο (Hirsch & Ericsson 1991, John & Wenz 2004). Η πρόοδος στον τομέα της μικροχειρουργικής επέτρεψε τη μεταφορά των αυτομοσχευμάτων με τους αγγειακούς μίσχους τους. Συνήθεις δότες θέσεις αυτών των αυτομοσχευμάτων είναι η περόνη, η κνήμη, η κερκίδα, η λαγόνια ακρολοφία, οι πλευρές και ο θόλος του κρανίου (Hirsch & Ericsson 1991, Han et al 1992, Hubble 2001, Shin & Bishop 2001).

Στα πλεονεκτήματα του αυτομοσχεύματος συγκαταλέγονται η απουσία μετάδοσης λοιμογόνου νοσήματος και η μη πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης, γεγονός που σημαίνει ότι αποκλείεται η ανοσολογική απόρριψή του. Είναι το μοναδικό μοσχευματικό υλικό που διαθέτει ζωντανούς οστεοβλάστες για τη σύνθεση νέου οστίτη οστού. Επίσης, διαθέτει οστεοεπαγωγικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες και οδηγεί σε προβλέψιμα κλινικά αποτελέσματα (Hirsch & Ericsson 1991, Lundgren et al 1996, John & Wenz 2004, Scheerlinck et al 2013).

Εκτός από τα σημαντικά πλεονεκτήματα των αυτομοσχευμάτων υπάρχουν ορισμένες εγγενείς αδυναμίες σε ότι αφορά τη χρήση τους. Η λήψη τους συνδέεται αναγκαστικά με μια πρόσθετη επέμβαση και επακόλουθη αυξημένη νοσηρότητα της

δότριας θέσης. Παρατηρείται επίσης αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ορισμένων σημαντικών επιπλοκών, όπως είναι η φλεγμονή, η παρατεταμένη παροχέτευση του τραύματος, ο σχηματισμός αιματώματος, η πιθανότητα επανεγχείρησης, ο πόνος για περισσότερο από 6 μήνες, η απώλεια της αισθητικότητας της δότριας θέσης, οι δύσμορφες και οι επώδυνες ουλές. Οι επιπλοκές αυτές παρατηρούνται στο 8,6% περίπου των περιπτώσεων. Παρατηρούνται, επίσης και ελάσσονες επιπλοκές (επιπολής φλεγμονή, προσωρινή απώλεια αισθητικότητας, ήπιος πόνος), οι οποίες φθάνουν στο 20,6% των περιπτώσεων (Younger & Chapman 1989, Vail & Urbanian 1996, Goulet et al 1997, Shalash et al 2013, Scheerlinck et al 2013). Άλλα μειονεκτήματα είναι η περιορισμένη ποσότητα στην οποία λαμβάνεται το αυτομόσχευμα κυρίως από τις ενδοστοματικές περιοχές λήψης (Moy et al 1993), η ανάγκη εφαρμογής πιθανόν γενικής αναισθησίας και ο αυξημένος χρόνος επέμβασης (Nkenke et al 2004, Shalash et al 2013, Scheerlinck et al 2013). Προκειμένου να περιοριστούν σε σημαντικό βαθμό τα παραπάνω μειονεκτήματα, οι ερευνητές έχουν μελετήσει τη χρήση διάφορων άλλων μοσχευματικών υλικών, όπως είναι τα αλλομοσχεύματα, τα ξενομοσχεύματα και τα αλλοπλαστικά υλικά, με άλλοτε άλλα πειραματικά και κλινικά αποτελέσματα (Tadjoedin et al 2000). Υπάρχουν μοσχευματικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται μόνα τους, λειτουργώντας ως οστεοκαθοδηγητικό ικρίωμα και άλλα που συνδυάζονται με αυτόλογο οστικό μόσχευμα για να αποκτήσουν οστεογεννητικές ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ποιότητα του νεόπλαστου οστού στη δέκτρια περιοχή (Yildirim et al 2001).

ΑΛΛΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ

Το αλλομόσχευμα αποτελεί έναν ιστό, ο οποίος μεταφέρεται μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους. Η χρήση των αλλομοσχευμάτων παρακάμπτει τα προβλήματα της πρόσθετης χειρουργικής επεμβατικής πράξης και της νοσηρότητας της δότριας περιοχής. Διατίθενται απεριόριστα και σε κάθε ανατομικό σχήμα και η προέλευση τους είναι είτε από ζωντανούς, είτε από πτωματικούς δότες. Η συχνότερη πηγή ζωντανών δοτών είναι οι κεφαλές των μηριαίων οστών, οι οποίες αφαιρούνται σε χειρουργικές επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής. Τα πτωματικά μοσχεύματα μπορούν να αποδώσουν ογκωδέστερα τεμάχια (Κουζούμπασης & Δρόσος 2004). Το μειονέκτημα των αλλομοσχευμάτων είναι το γεγονός ότι ελλοχεύει ο κίνδυνος εμφάνισης ανοσολογικών αντιδράσεων και μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων στο δέκτη οργανισμό (Dimitriou et al 2011).

Για το λόγο αυτό δε διατίθενται σε νωπή αγγειούμενη μορφή, αλλά υφίστανται

διάφορες επεξεργασίες για τη συντήρηση και την αποστείρωση τους, όπως βαθιά κατάψυξη, κατάψυξη-ξήρανση (λυοφιλοποίηση), απαλλαγή από τα ανόργανα συστατικά, ακτινοβόληση ή επεξεργασία με οξείδιο του αιθυλενίου (Tomford 1995). Η επεξεργασία των αλλομοσχευμάτων αρχίζει με έκπλυση σε μια ποικιλία παραγόντων, κυρίως αιθανόλης, για την απομάκρυνση του αίματος και του μυελού. Το γεγονός αυτό μειώνει την αντιγονικότητα τους και την πιθανότητα βακτηριακής και ιογενούς μετάδοσης. Η επεξεργασία των αλλομοσχευμάτων συνεχίζεται με ψύξη στους -70°C . Η προσεκτική επιλογή των δοτών και η ακτινοβόληση ή η επεξεργασία των αλλομοσχευμάτων με οξείδιο του αιθυλενίου είναι πλέον επιτακτική ανάγκη, εξαιτίας της διαπιστωμένης σπάνιας μετάδοσης των ιών HIV και ηπατίτιδας B και C, καθώς και της πιθανής βακτηριακής επιμόλυνσης των μοσχευμάτων (Sommerville et al 2000, Dimitriou et al 2011). Η επιμελής διαλογή των δοτών συνιστάται για την αποφυγή μετάδοσης μιας δυνητικά σοβαρής νόσου στο δέκτη, αλλά και για την αποφυγή χρήσης οστού με αλλοιωμένες ή απρόβλεπτες βιολογικές ιδιότητες. Αντενδείξεις για τη δωρεά ιστών αποτελούν η φλεγμονή του οστού, οι κακοήθειες και ειδικά αυτές με τάση για μετάσταση στο σκελετό, ιογενείς νόσοι, όπως η ηπατίτιδα B και C, το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), η νόσος Creutzfeld-Jakob, τα αφροδίσια νοσήματα, οι συστηματικές νόσοι του συνδετικού ιστού, οι νόσοι άγνωστης αιτιολογίας και η παρουσία τοξικών ουσιών σε ικανή συγκέντρωση. Εκτός από τις συνήθεις δοκιμασίες διαλογής για τα παραπάνω, έχει προταθεί και η ιστολογική εξέταση των προς μεταμόσχευση ιστών, καθώς έχει διαπιστωθεί η παρουσία κακοηθών νεοπλασιών σε μικροσκοπικό επίπεδο (Sugihara et al 1999). Αυτή η διαδικασία της επισταμένης επεξεργασίας των αλλομοσχευμάτων επηρεάζει τις βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες τους (Akkus & Rimnac 2001, Randall et al 2002). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τις πιθανές οστεοεπαγωγικές ιδιότητες των αλλομοσχευμάτων. Οι Tadjoeidin και συν (2000) θεωρούν ότι τα αλλομοσχεύματα δρουν αποκλειστικά οστεοκαθοδηγητικά και σε σχέση με τα αυτομοσχεύματα εμφανίζουν ελαττωμένη πρόγνωση της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης. Το απομεταλλικοποιημένο άνυδρο οστικό αλλομόσχευμα, έχει αναφερθεί ότι υφίσταται μία αργή απορρόφηση των οστικών τεμαχιδίων του. Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι οι οστεοεπαγωγικές του ιδιότητες δεν είναι σταθερές αλλά ποικίλλουν από τράπεζα σε τράπεζα, ακόμα και σε δείγματα που προσφέρονται από την ίδια τράπεζα μοσχευμάτων (Sanchez et al 2008). Οι Schwartz και συν (1998) θεωρούν πως οι ιδιότητες του απομεταλλικοποιημένου άνυδρου οστικού αλλομοσχεύματος (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft, DFDBA) εξαρτώνται από την ηλικία του δότη. Όσο

νεαρότερη είναι η ηλικία του δότη, τόσο περισσότερο οστεοεπαγωγικές ιδιότητες διαθέτει το παρεχόμενο από αυτόν μοσχευματικό υλικό.

ΞΕΝΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ

Τα ξενομοσχεύματα αποτελούν ιστούς, οι οποίοι μεταφέρονται μεταξύ διαφορετικών ειδών. Στο παρελθόν η εμπειρία από τη χρήση τους δεν ήταν ικανοποιητική, εξαιτίας της υψηλής αντιγονικότητας και της αναξιόπιστης ενσωμάτωσής τους. Πρόσφατες εξελίξεις στις διαδικασίες της επεξεργασίας των ξενομοσχευμάτων επέτρεψαν την παρασκευή παραγώγων με μερική αποπρωτεΐνωση και απολίπωση. Με την επεξεργασία αυτή τα ξενομοσχεύματα είναι δυνατό να διαθέτουν μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με το ανθρώπινο οστό και χαμηλή αντιγονικότητα. Σε συνδυασμό με αυτόλογο μυελό των οστών και οστεοεπαγωγικούς παράγοντες, για τη δημιουργία σύνθετων μοσχευμάτων, έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε διάφορες κλινικές μελέτες. Η πιθανότητα μετάδοσης λοιμώδους νόσου είναι υπαρκτή (Dimitriou et al 2011). Οι εμπορικές μορφές ξενομοσχευμάτων που κυκλοφορούν σήμερα είναι βόειας κυρίως προέλευσης, κάτι που εγείρει το φάσμα της μετάδοσης της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (Hubble 2001).

Το ανόργανο βόειο οστό έχει διαπιστωθεί σε πλήθος κλινικών ερευνών ότι παρουσιάζει καλή οστική ενσωμάτωση (Haemmerle et al 1998, Hockers et al 1999) και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες (von Arx et al 2002). Επίσης, το ανόργανο βόειο οστό σε μικρά περιεμφυτευματικά ελλείμματα διαπιστώθηκε ότι έχει ικανοποιητικές επιδόσεις οστικής σύνθεσης (Artzi et al 2000), σε αντίθεση με τη χρήση του σε μετεξακτικά φατνία, όπου η δημιουργία νέου οστού ήταν περιορισμένη (Carmagnola et al 2003, Norton et al 2003).

Ενώ τα βόειας προέλευσης ξενομοσχεύματα διαθέτουν καλές οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, απορροφούνται ελάχιστα και αναπλάθονται με πολύ αργό ρυθμό. Τα ξενομοσχεύματα αυτά παραμένουν στον οργανισμό αμετάβλητα επί μακρό χρονικό διάστημα. *Ιστολογικά, θα πρέπει να θεωρούνται ως μόνιμα εμβιολειτουργικά ξένα σώματα* (Schlickewei & Kuner 1991, Troster 1993). Τα βόεια υλικά καθαρίζονται χημικά και επεξεργάζονται θερμικά έτσι, ώστε να απομακρυνθούν πλήρως όλα τα οργανικά συστατικά. Με την υψηλή θερμική επεξεργασία ο φυσικός υδροξυαπατίτης του βοείου σπογγώδους οστού μετατρέπεται σε ημισυνθετικό υδροξυαπατίτη, περιορίζοντας την απορρόφηση του. Αντίθετα, η ηπιότερη θερμική επεξεργασία του βοείου υλικού αφήνει αμετάβλητα τα ανόργανα βασικά συστατικά του. Με τον τρόπο αυτόν είναι δεδομένη η απορρόφηση του υλικού στα

πλαίσια της φυσιολογικής οστικής ανάπτυξης (Wetzel et al 1995, Jensen et al 1996). Η πλήρης μετατροπή των ξενομοσχευμάτων σε ανόργανα συστατικά εμφανίζεται να είναι εξαιρετικά βιοσυμβατή. Αντιδράσεις τύπου ξένου σώματος δεν εμφανίζονται (McAllister et al 1998). Η διαδικασία παραγωγής των βόειων ξενομοσχευμάτων επηρεάζει τη συμπεριφορά ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της οστικής επούλωσης. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, κατά τη χρησιμοποίηση παρόμοιων εμπορικών σκευασμάτων θα πρέπει να διακρίνεται με σαφήνεια η διαδικασία της παραγωγής τους (Honig et al 1999). Εκτός από τα βόεια ξενομοσχεύματα υπάρχουν και άλλες διαθέσιμες πηγές, όπως από χοίρο, από αρουραίο και από ίππο (Block & Poser 1995).

ΑΛΛΟΠΛΑΣΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Τα αλλοπλαστικά μοσχευματικά υλικά είναι συνθετικά ή ημισυνθετικά υλικά. Ο υδροξυαπατίτης (HA), το φωσφορικό τριασβέστιο (TCP) και τα υαλοκεραμικά υλικά αποτελούν τα κυριότερα αλλοπλαστικά υλικά. *Τα μοσχευματικά αυτά υλικά έχουν αποκλειστικά οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες.* Τα αλλοπλαστικά υλικά έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα αλλομοσχεύματα, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στον κίνδυνο πιθανής μετάδοσης νοσημάτων από τα αλλομοσχεύματα (Low et al 1997).

Ο υδροξυαπατίτης (hydroxyapatite, HA) είναι ένα κεραμικό βιοϋλικό με οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες. Είναι υλικό σταθερό στην πίεση και απορροφάται ελάχιστα (Prousaefs et al 2002, Taylor et al 2002). Ο HA είναι δυνατό να υποβληθεί σε επεξεργασία σε διάφορα σχήματα και πυκνότητες. Σε περίπτωση χρήσης *in vivo*, οι κολλαγόνες ίνες του HA που παράγονται από τις οστεοβλάστες σχηματίζουν μια ζώνη επαφής μεταξύ της ασβεστούχου επιφάνειας του HA και των οστεοβλαστών (Μαρουφίδης 2009).

Το φωσφορικό ασβέστιο (TCP) διατίθεται σε δύο διαφορετικές κρυσταλλοειδείς πλεγματοειδείς μορφές, την α-TCP και τη β-TCP. Η διαφορά των δύο μορφών σχετίζεται με το χρόνο απορρόφησής τους. Σε χρονικό διάστημα 7 μηνών το α-TCP απορροφάται κατά 70%, ενώ το β-TCP κατά 80%. Η ακτινολογική πυκνότητα του TCP μειώνεται και στις δυο μορφές μετά από 4-6 μήνες (Merten et al 2000). Το μόνο μειονέκτημα του TCP είναι το ακαθόριστο ποσοστό της απορρόφησής του, η οποία δε σχετίζεται πάντοτε με επακόλουθη απόθεση νέου οστού (Ohgushi et al 1991). Στην κλινική πράξη δε φαίνεται να υπάρχει διαδικασία απορρόφησης των μορφών TCP, αλλά μία φυσικοχημική διάλυση. Η ταχύτητα της φυσικοχημικής διάλυσης του TCP εξαρτάται από την πυκνότητα του υλικού και μπορεί να διαρκέσει έως και

8 μήνες (Wiltfang et al 2002). Εντούτοις, το TCP θεωρείται βιοενεργό και βιοσυμβατό υλικό, α φ ο ύ αποτελείται ουσιαστικά από ιόντα Ca και P, τα οποία συναντώνται και στον οστίτη ιστό (Trisi 2003).

Τα υαλοκεραμικά υλικά παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία μεγεθών και μορφών και διακρίνονται σε βιοαδρανή και βιοενεργά κεραμικά. Το διοξείδιο του ζirkονίου και το τριοξείδιο του αργιλίου είναι υαλοκεραμικά υλικά, τα οποία έχουν ως βάση το πυρίτιο. Θεωρούνται βιοαδρανή υλικά τα οποία δε σχηματίζουν άμεσο δεσμό με το οστόν (Wilson et al 1993). Η βιολογική συμπεριφορά και η απορρόφηση των υαλοκεραμικών υλικών είναι παρόμοια με τον υδροξυαπατίτη, παρόλο που τόσο ο HA αλλά και το τριφωσφορικό ασβέστιο είναι βιοενεργά υλικά που σχηματίζουν αληθή χημικό δεσμό με το οστόν. Διαθέτουν σταθερό σχήμα και λόγω της μικρής απορρόφησής τους χρησιμοποιούνται για την επίστρωση των εμφυτευμάτων (Schultze-Mosgau et al 2000, Torriceli et al 2001).

ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Η εμβιομηχανική συμπεριφορά ενός οστικού μοσχεύματος είναι μία λειτουργία, η οποία εξαρτάται από τις ιδιότητες του μοσχεύματος και της μεσόφασης μοσχεύματος-ξενιστή (Davy 1999, Dwight 1999). Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από τη γεωμετρία και τη σύσταση του μοσχεύματος, την επιφάνεια επαφής με το οστόν, την αντοχή και την ελαστικότητά του μοσχεύματος (Goldberg 2000). Το μόσχευμα θα πρέπει να ενσωματωθεί σταδιακά με το οστόν του οργανισμού, έτσι ώστε να λειτουργεί επιτυχώς κατά την άσκηση δυνάμεων. Στην περίπτωση που η ενσωμάτωση και η επούλωση του οστικού μοσχεύματος δεν είναι απόλυτα επιτυχής, η άσκηση υπέρμετρων φορτίσεων είναι δυνατό να οδηγήσει σε αποτυχία της αποκατάστασης. Σε μεγάλα οστικά ελλείμματα, είναι απαραίτητη η σταθεροποίηση της ένωσης μοσχεύματος-οστού του οργανισμού, με εξωτερική ή εσωτερική ακινητοποίηση, έτσι ώστε να προστατευθεί το μόσχευμα στη φάση της αναδιαμόρφωσης. Ο όγκος διάτμησης του ιστού είναι μία παράμετρος, η οποία καλείται και πορότητα (porosity). Η πορότητα σχετίζεται άμεσα με την ακαμψία (stiffness) του ιστού και την τάση διαρροής (yield stress) (Carter & Hayes 1977, Davy 1999, Dwight 1999). Συνεπώς, μικρές διαφοροποιήσεις στην πορότητα ενός ιστού είναι δυνατό να προκαλέσουν μεγάλες μεταβολές στις υλικές ιδιότητες του οστού. Τα φλοιώδη οστικά μοσχεύματα εμφανίζουν αρχική πορότητα 5-10%. Η βαθμιαία ενσωμάτωση του οστικού μοσχεύματος στο οστόν του οργανισμού μπορεί να προκαλέσει και αύξηση της πορότητας. Παρόλαυτά, αν η διαδικασία της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος διαταραχθεί, η οστική απορρόφηση μπορεί να

υπερκαλύψει την οστική εναπόθεση. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να συμβεί ταχεία απόρριψη του μοςχεύματος (Goldberg & Akhavan 2005).

Τα φλοιώδη και σπογγώδη οστικά μοςχεύματα εμφανίζουν διαφορετικές εμβιομηχανικές ιδιότητες, εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κάθε τύπου. Η πορότητα του σπογγώδους οστικού μοςχεύματος φτάνει το 70-80%. Το γεγονός αυτό κάνει το σπογγώδες μοςχευμα να έχει αντοχή ανάλογη μόλις με το 4% αυτής του φλοιώδους οστικού μοςχεύματος (Davy 1999). Η αντοχή του σπογγώδους οστικού μοςχεύματος αυξάνεται καθώς συντίθεται νεόπλαστο οστόν. Ο τύπος της ακινητοποίησης που θα εφαρμοστεί αποτελεί παράμετρο κεφαλαιώδους σημασίας. Στα όρια της ακινητοποίησης ασκούνται λειτουργικές φορτίσεις, μέχρι τη χρονική στιγμή κατά την οποία το μοςχευμα θα ενσωματωθεί εξολοκλήρου με το οστόν του ξενιστή. Η οστική αναδιαμόρφωση καθοδηγείται από τις λειτουργικές φορτίσεις και στα φλοιώδη και στα σπογγώδη οστικά μοςχεύματα. Η προστασία του μοςχεύματος από την άσκηση υπέρμετρων δυνάμεων και ταυτόχρονα η άσκηση φυσιολογικών δυνάμεων απαραίτητων για την οστική αναδιαμόρφωση, αποτελούν δύο διαφορετικές καταστάσεις οι οποίες θα πρέπει να βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία (Dwight 1999). Τα αλλομοσχεύματα είναι πιθανό να προκαλούν ανοσολογική απάντηση στον ξενιστή. Για το λόγο αυτόν κρίνεται απαραίτητη η τροποποίηση του μοςχεύματος με κατάλληλη επεξεργασία και αποστείρωση. Η θερμική επεξεργασία και η αποστείρωση είναι διαδικασίες, οι οποίες επιδρούν στις εμβιομηχανικές ιδιότητες του οστικού μοςχεύματος. Η κατάψυξη παρουσιάζει περιορισμένες αρνητικές επιδράσεις στις εμβιομηχανικές ιδιότητες του οστικού μοςχεύματος. Η ψύξη-ξηράνση ελαττώνει την τάση διαρροής και την ακαμψία του μοςχεύματος (Pelker et al 1983). Η αποστείρωση με αυτόκαυστο μπορεί να προκαλέσει μείωση της αντοχής και της σκληρότητας του οστικού μοςχεύματος (Tagushi 1995). Η ακτινοβολία, ενώ είναι αποτελεσματική στην καταστροφή των βακτηρίων σε σχετικά χαμηλές δόσεις (<20KGy), δεν καταστρέφει σε αυτές τις δόσεις τους ιούς. Οι ιοκτόνες δόσεις άνω των 30KGy ελαττώνουν τις φυσικομηχανικές ιδιότητες του μοςχεύματος. Η απομεταλλικοποίηση του οστικού μοςχεύματος μειώνει την ανοσογονικότητα, αλλά ταυτόχρονα επιδρά αρνητικά και στις φυσικομηχανικές ιδιότητες του μοςχεύματος (Carter & Hayes 1977, Pelker et al 1983).

Μια καλά αγγειούμενη δέκτρια θέση αποτελεί και το ιδανικό περιβάλλον για το οστικό μοςχευμα. Η χειρουργική αφαίρεση των κατεστραμμένων ιστών, η προηγηθείσα θεραπεία της λοίμωξης, η προστασία της αιματικής παροχής και η επάρκεια μαλακών ιστών για την κάλυψη της περιοχής αποτελούν βασικές

προϋποθέσεις μιας επιτυχημένης ενσωμάτωσης του μοσχεύματος με το οστόν του ξενιστή. Η ακινητοποίησή και η τέλεια αλληλεπίθεση μεταξύ μοσχεύματος και οστικού ελλείμματος αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για μία επιτυχημένη ενσωμάτωση. Όταν η μεσόφαση μοσχεύματος και οστού του οργανισμού δεν διαταράσσεται, η διαδικασία της οστικής επούλωσης συνεχίζεται βαθμιαία, ανεξάρτητα αν πρόκειται για αυτομόσχευμα ή αλλομόσχευμα, φρέσκο ή καταψυγμένο μόσχευμα (Enneking & Mindell 1991). Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν παρατηρείται αρχική σταθερότητα και καλή αλληλεπίθεση τα οστικά μόσχευμα αποτυγχάνουν. Το οστικό μόσχευμα θα πρέπει να προστατεύεται, επίσης, από την υπέρμετρη άσκηση δυνάμεων, μέχρι τη χρονική στιγμή κατά την οποία η διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης επιτρέψει την πλήρη λειτουργία του στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Όταν γίνει επιλογή του κατάλληλου οστικού μοσχεύματος και πραγματοποιηθεί άριστη χειρουργική τεχνική, τα οστικά μόσχευμα ενσωματώνονται βιολογικά και λειτουργικά, σχηματίζοντας οστόν ικανό να ανταπεξέλθει στις λειτουργικές ανάγκες του οργανισμού (Goldberg & Akhavan 2005, Γκισάκης 2011).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΛΑΣΗΣ

ΜΕΤΕΞΑΚΤΙΚΑ ΦΑΤΝΙΑ

Σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε ότι απαιτούνται 8-12 μήνες για την πλήρη οστική επούλωση, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αρχική σταθερότητα ενός οστεοενσωματούμενου οδοντικού εμφυτεύματος (Adell et al 1981, Lekholm & Zarb 1985, Albrektsson et al 1986). Σε νεότερες ιστολογικές και ιστομορφομετρικές μελέτες φάνηκε ότι το χρονικό διάστημα το οποίο απαιτείται για την πλήρη οστική επούλωση ενός μετεξακτικού φατνίου είναι περίπου 2 μήνες. Παρόλαυτά, η οστική αναδιαμόρφωση συνεχίζεται για αρκετό χρονικό διάστημα. Η άμεση τοποθέτηση ενός οδοντικού εμφυτεύματος στην περιοχή του μετεξακτικού φατνίου συμβάλλει στη διατήρηση του μεγαλύτερου τμήματος της φατνιακής ακρολοφίας, ενώ παράλληλα ελαττώνει σημαντικά το χρόνο θεραπείας του ασθενούς (Γκισιάκης 2011).

Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπλαση περιεμφυτευματικών οστικών ελλειμμάτων (Buser et al 1990, Nyman et al 1990, Nevins & Mellonig 1992, Buser et al 1993, Buser et al 1995a,b, Buser et al 2002). Με τη χρήση μεμβρανών φραγμού, προλαμβάνεται η εισδοχή του επιθηλίου και του ινώδους συνδετικού ιστού στο χώρο μεταξύ του εμφυτεύματος και του φατνιακού οστού. Ταυτόχρονα, η τοποθέτηση μοσχευματικού υλικού για την κάλυψη των εκτεθειμένων εμφυτευματικών σπειρών επιταχύνει τη διαδικασία οστικής ανάπλασης.

Τα κριτήρια της άμεσης τοποθέτησης ενός εμφυτεύματος στο μετεξακτικό φατνίο είναι τα εξής:

- (i) Η ύπαρξη 3-4 χιλιοστών οστίτη ιστού κάτω από το ακρορρίζιο του δοντιού που πρόκειται να αφαιρεθεί. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ικανοποιητική αρχική σταθερότητα του εμφυτεύματος.
- (ii) Η απομάκρυνση υπολειμμάτων κοκκιωματώδους ιστού και στοιχείων φλεγμονής από το μετεξακτικό φατνίο. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται με καλό χειρουργικό καθαρισμό και χειρουργική απόξεση όλων των οστικών τοιχωμάτων του μετεξακτικού φατνίου.

Η τοποθέτηση εμφυτευμάτων στα μετεξακτικά φατνία είναι δυνατό να γίνει με δύο μεθόδους: η άμεση τοποθέτηση και η άμεση καθυστερημένη τοποθέτηση:

- Η άμεση τοποθέτηση του εμφυτεύματος στο μετεξακτικό φατνίο είναι η μέθοδος κατά την οποία το εμφύτευμα τοποθετείται αμέσως μετά την εξαγωγή του δοντιού.
- Η άμεση καθυστερημένη τοποθέτηση συμβαίνει όταν το οδοντικό εμφύτευμα τοποθετείται στο μετεξακτικό φατνίο μετά από το πέρας 6-8 εβδομάδων έπειτα από την εξαγωγή του δοντιού (Γκισάκης 2011).

Πλεονεκτήματα άμεσης τοποθέτησης:

- Πλήρης διατήρηση της φατνιακής ακρολοφίας και ιδιαίτερα του παρειακού οστικού πετάλλου
- Πρόληψη της πρώιμης οστικής απορρόφησης
- Μείωση του χρόνου θεραπείας
- Μόνο μια χειρουργική επέμβαση, επομένως μείωση της ταλαιπωρίας του ασθενούς

Μειονεκτήματα άμεσης τοποθέτησης

- Αυξημένος κίνδυνος πρώιμης αποκάλυψης της μεμβράνης της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης
- Μη ικανοποιητική σύγκλιση των κρημών για την κάλυψη του τραύματος, εξαιτίας της ανεπάρκειας των μαλακών ιστών
- Αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης, εξαιτίας της ενδεχόμενης προϋπάρχουσας φλεγμονής από τα δόντια ή/και τους περιοδοντικούς ιστούς

Πλεονεκτήματα άμεσης καθυστερημένης τοποθέτησης

- Ικανοποιητικός σχεδιασμός της τομής και του κρημού, εξαιτίας της παρουσίας υγιών μαλακών ιστών
- Τοποθέτηση του εμφυτεύματος στην ιδανική προσθετικά θέση
- Ικανοποιητική πρωτογενής κάλυψη του τραύματος με μαλακούς ιστούς
- Μείωση του κινδύνου πρώιμης αποκάλυψης της μεμβράνης

Μειονεκτήματα άμεσης καθυστερημένης τοποθέτησης

- Πρώιμη οστική απορρόφηση του φατνιακού οστού
- Ανάγκη για μεγαλύτερης έκτασης κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη

- Ανάγκη δεύτερης χειρουργικής επέμβασης (Γκισάκης 2011)

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΟΡΙΖΟΝΤΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Η φατνιακή ακρολοφία θα πρέπει να έχει πλάτος τουλάχιστον 4 χιλιοστά σε οριζόντιο επίπεδο για την τοποθέτηση εμφυτευμάτων και την επιτυχή οστεοενσωμάτωση σε μακροχρόνια βάση. Ο τρόπος με τον οποίο απορροφάται η φατνιακή ακρολοφία, μετά την απώλεια των δοντιών, οδηγεί βαθμιαία σε ελάττωση κατά πλάτος της παρειογλωσσικής διάστασης (Adell et al 1981, Lekholm & Zarb 1985, Albrektsson et al 1986, Jensen et al 1999).

Η οστική απορρόφηση της φατνιακής ακρολοφίας και οι ανατομικές μεταβολές που προκύπτουν, μετά από την απώλεια των δοντιών, καθιστούν δύσκολη την τοποθέτηση του εμφυτεύματος με ορθή παρειογλωσσική θέση και κατάλληλη γωνίωση. Το γεγονός αυτό είναι δυνατό να έχει ως αποτέλεσμα τη δύσκολη προσθετική, λειτουργική και αισθητική αποκατάσταση (Dahlin et al 1995, Simion et al 1997).

Η κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη είναι δυνατό να βοηθήσει στο σχεδιασμό της θεραπείας ασθενών με οστικά ελλείματα σε οριζόντιο επίπεδο ως εξής (Simion et al 1997):

- Όταν παρατηρείται μειωμένο πάχος της ακρολοφίας σε οριζόντιο επίπεδο, αλλά ικανοποιητική αρχική σταθερότητα, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί οστικό μόσχευμα σε συνδυασμό με μία μεμβράνη φραγμό, προκειμένου να καταστεί δυνατή η άμεση τοποθέτηση του εμφυτεύματος εντός του οστικού ελλείματος (οστικό έλλειμμα τύπου "διάσχισης" ή "παραθύρου").
- Όταν παρατηρείται μειωμένο πάχος της φατνιακής ακρολοφίας σε οριζόντιο επίπεδο, σε βαθμό που δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητική αρχική σταθερότητα δεν επιτρέπεται η άμεση τοποθέτηση του εμφυτεύματος. Η χειρουργική αντιμετώπιση των περιπτώσεων αυτών πραγματοποιείται με τη χρήση οστικού μοσχεύματος σε μορφή "μπλοκ" ή πολτοποιημένο σε συνδυασμό με απορροφήσιμη ή μη μεμβράνη φραγμού.
- Η χειρουργική αντιμετώπιση της έλλειψης οστού σε οριζόντιο επίπεδο είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί και με την τεχνική διάσχισης της ακρολοφίας (Simion et al 1998, Γκισάκης 2011).

ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ΚΑΘΕΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Η δυσκολότερη τεχνική κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης θεωρείται η αύξηση της φατνιακής ακρολοφίας σε κατακόρυφο επίπεδο. Η κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση σε κάθετο επίπεδο είναι επιβεβλημένη στις περιπτώσεις εκείνες που το ύψος του φατνιακού οστού δεν εγγυάται την μακρόχρονη σταθερότητα του εμφυτεύματος. Εφαρμόζεται, επίσης, κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση σε κάθετο επίπεδο όταν η προσθετική αποκατάσταση είναι δυνατό να οδηγήσει στην κατασκευή ογκωδών στεφανών με κακή αναλογία στεφάνης-εμφυτεύματος (Simion et al 1998, Parma-Benfenati et al 1999). Ο συνδυασμός μη απορροφήσιμη μεμβράνης φραγμού με οστικό μόσχευμα αποτελεί προβλέψιμη διαδικασία στις περιπτώσεις κάθετης αύξησης της υπολειμματικής φατνιακής ακρολοφίας. Η χρησιμοποίηση οστικού αυτομοσχεύματος είναι δυνατό να οδηγήσει σε μείωση του χρόνου αποκατάστασης κάτω από τους 6 μήνες (Parma-Benfenati et al 1999, von Arx et al 2001, Γκισάκης 2011).

ΑΝΥΨΩΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΙΓΜΟΡΕΙΟΥ ΑΝΤΡΟΥ

Η ελάττωση του ύψους της φατνιακής ακρολοφίας στις οπίσθιες περιοχές της άνω γνάθου και η ενδεχόμενη γειτνίαση του εδάφους του ιγμορείου άντρου, η οποία παρατηρείται σε περιπτώσεις μερικής νωδότητας, αποτελούν συνήθη κλινικά προβλήματα για την ασφαλή τοποθέτηση οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων (Pikos 1999, Reiser et al 2001).

Οι βασικές αιτίες οστικής απώλειας είναι η περιοδοντική νόσος και η οστική απορρόφηση που προκαλείται μετά από τις εξαγωγές δοντιών. Στις οπίσθιες περιοχές της άνω γνάθου η ελάττωση της οστικής μάζας οφείλεται στην απορρόφηση του προστομιακού πετάλου της φατνιακής ακρολοφίας με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με άλλες περιοχές των γνάθων. Η αρχική οστική απορρόφηση ακολουθείται από σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας, εξαιτίας της σύστασης του σπογγώδους οστού στην περιοχή αυτή (Pietrokonvski 1975, Pikos 1999). Η μείωση της οστικής μάζας και της οστικής πυκνότητας οδηγούν στην αδυναμία τοποθέτησης εμφυτευμάτων, λόγω μειωμένης αρχικής σταθερότητας και επαφής με το οστό (Pikos 1999, Reiser et al 2001, Maksoud 2001).

Η χειρουργική τεχνική της ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου άντρου παρουσιάστηκε από τους Tatum (1986), Misch (1987), Boyne & James (1980). Ουσιαστικά χρησιμοποιείται η τεχνική Caldwell – Luc, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός οστικού παραθύρου στο παρειακό έξω τοίχωμα του ιγμορείου άντρου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποκόλληση και ανύψωση της μεμβράνης

του ιγμορείου (μεμβράνη του *Schneider*) μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό ύψος. Έπειτα τοποθετείται το οστικό μόσχευμα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η υποδοχή, η συγκράτηση και η οστεοενσωμάτωση των εμφυτευμάτων (Boyne & James 1980, Smiler 1997, Reiser et al 2001).

Μία άλλη χειρουργική τεχνική για την ανύψωση του εδάφους του ιγμορείου είναι η τεχνική με τη χρήση οστεοτόμων, η οποία περιγράφηκε από τον Tatum (1986) και εφαρμόστηκε από τον Summers (1994a,b,c), ως λιγότερο επεμβατική τεχνική. Η μέθοδος ανύψωσης του εδάφους του ιγμορείου άντρου με τη χρήση οστεοτόμων εμφανίζει χαμηλά ποσοστά επιπλοκών. Η συχνότερη επιπλοκή είναι η διάτρηση της μεμβράνης του *Schneider* (Pikos 1999, Maksoud 2001, Reiser et al 2001). Η αντιμετώπιση μικρών διατρήσεων της μεμβράνης του *Schneider* υλοποιείται με τη χρήση απορροφήσιμης μεμβράνης κολλαγόνου, με καλά αποτελέσματα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Σε εκτεταμένες διατρήσεις της μεμβράνης, παρόλαυτά, η αποκατάσταση είναι δυσκολότερη. Για την αντιμετώπιση μεγάλων διατρήσεων της μεμβράνης του *Schneider* χρησιμοποιείται λαγόνιο μόσχευμα με τη μορφή «μπλοκ». Στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η λήψη λαγονίου μοσχεύματος η επέμβαση διακόπτεται (Γκισιάκης 2011).

ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΙΣΘΗΤΙΚΗ ΖΩΝΗ

Με τον όρο αισθητική ζώνη εννοούμε τις πρόσθιες περιοχές της άνω και της κάτω γνάθου, δηλαδή τις περιοχές των δοντιών 14-24 και 34-44. Η αισθητική των μαλακών ιστών γύρω από τις αποκαταστάσεις με εμφυτεύματα και τα παρακείμενα δόντια θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν στην αισθητική ζώνη (Ericsson et al 2000, Haas et al 2002). Η υποκειμενική ικανοποίηση της αισθητικής του ασθενούς θεωρείται βασικό στοιχείο μίας επιτυχημένης θεραπείας. Σκοπός της χειρουργικής τοποθέτησης ενός εμφυτεύματος στην πρόσθια αισθητική ζώνη πρέπει να είναι η τελική προσθετική αποκατάσταση. Η προσθετική αποκατάσταση δε θα πρέπει να διακρίνεται από τα παρακείμενα φυσικά δόντια. Οι ασθενείς στις μέρες μας έχουν υψηλές προσδοκίες αισθητικής αποκατάστασης, επιθυμώντας γενικά ένα μακράς διάρκειας λειτουργικό και αισθητικό αποτέλεσμα με ένα υψηλό επίπεδο προβλεψιμότητας (Ericsson et al 2000, Haas et al 2002, Γκισιάκης 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΪΛΙΚΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Η ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται σε μη κυτταρικά υποστρώματα βασίζεται σε μια σειρά φυσικοχημικών και γεωμετρικών χαρακτηριστικών των υποστρωμάτων που επηρεάζουν ποικιλοτρόπως τις αντιδράσεις στη διεπιφάνεια επαφής. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορούν να επηρεάσουν την κυτταρική συμπεριφορά περιλαμβάνουν τη χημική σύσταση, τη χημική σταθερότητα και την επιφανειακή ενέργεια των υποστρωμάτων (Grinnell et al 1973, Maroudas 1975, Schakenraad et al 1986, Dekker et al 1991, Van Kooten et al 1992, Meyer et al 1993, Redey et al 2000). Οι ερευνητικές αυτές μελέτες έχουν καταδείξει καλή κυτταρική πρόσφυση, εξάπλωση και πολλαπλασιασμό σε επιφάνειες με υψηλή επιφανειακή ενέργεια. Ο μηχανισμός ενίσχυσης της κυτταρικής πρόσφυσης σε επιφάνειες με υψηλή επιφανειακή ενέργεια μπορεί να εξηγηθεί με την επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών στα υποστρώματα που ευνοούν την προσκόλληση των κυττάρων (Schakenraad et al 1986). Υδρόφιλες επιφάνειες με υψηλή επιφανειακή ενέργεια επηρεάζουν τη δομική διαμόρφωση των προσροφούμενων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να ευνοείται η αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς επιφανείας των κυττάρων (Juliano et al 1993).

Η χημική σταθερότητα αποτελεί μία ακόμη παράμετρο, η οποία επηρεάζει την κυτταρική συμπεριφορά. Υποστρώματα με αυξημένη τάση διάλυσης απελευθερώνουν διάφορα ιόντα στο κυτταρικό περιβάλλον, τα οποία είναι δυνατό να είναι καταστροφικά για τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Maxian et al 1994). Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η απελευθέρωση υψηλής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων από κεραμικά εμποδίζει την ανάπτυξη ενεργών κυττάρων (Cheung et al 1984). Παράλληλα, η απελευθέρωση διαφόρων ιόντων μετά από επαφή κεραμικών υποστρωμάτων με φυσιολογικά υγρά είναι δυνατόν να διαφοροποιήσει το pH και να επηρεάσει σημαντικά τον κυτταρικό μεταβολισμό (Busa et al 1984, El-Ghannam et al 1997α) είτε θετικά είτε αρνητικά ανάλογα πάντα

και με το είδος των κυττάρων (Cheung et al 1984, Busa et al 1984, El-Ghannam et al 1997α, Knabe et al 1997, Silver et al 2001).

Η επιφανειακή τοπογραφία των υποστρωμάτων είναι δυνατό να επηρεάσει σημαντικά την κυτταρική συμπεριφορά καθώς μεταφέρει ποικίλα ερεθίσματα στα κύτταρα (Curtis και Wilkinson 1998). Η προσκόλληση, η εξάπλωση, ο προσανατολισμός, η μορφολογία και ο φαινότυπος των κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων (αύλακες, ακρολοφίες, πόροι) (Curtis & Clark 1990, Curtis & Wilkinson 1998, Curtis & Wilkinson 1999, Dalby et al 2002). Η χημειοταξία ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων παράλληλα με τις μικροαύλακες της επιφάνειας έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες μελέτες (Curtis & Wilkinson 1997).

Ενώ δεν αναφέρεται μία σαφής ερμηνεία για το φαινόμενο αυτό της επιφανειακής καθοδήγησης, έχει προταθεί ότι η αρχική επαφή των κυττάρων με τα υποστρώματα λαμβάνει χώρα με τη δημιουργία κυτταρικών μικροπροσεκβολών. Έπειτα από αυτήν την αρχική σύνδεση, παρατηρείται αυξανόμενος αριθμός σχηματιζόμενων περιοχών σύνδεσης, που έχει σαν αποτέλεσμα την εξάπλωση και τον προσανατολισμό των κυττάρων. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων αντιδρούν διαφορετικά στη μικρογεωμετρία της επιφάνειας επαφής (Rajnicek & McCraig 1997, Dalton et al 1999). Διαφορετικές κυτταρικές παράμετροι (κυτταρική προσκόλληση, εξάπλωση, προσανατολισμός, μορφολογία ή και ρυθμός πολλαπλασιασμού) μπορεί να επηρεαστούν από τη μικρογεωμετρία της επιφάνειας επαφής (den Braber et al 1996 α,β, Walboomers et al 1998). Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει *in vitro* την κυτταρική συμπεριφορά απέναντι σε διάφορα βιοενεργά κεραμικά (Tsiourvas et al 2016, Atak et al 2017). Αρχικά, οι Van Blitterswijk και συν 1986 (Van Blitterswijk et al 1986) μελέτησαν τη συμπεριφορά επιθηλιακών κυττάρων σε επαφή με υδροξυαπατίτη και διαπίστωσαν καλή βιολογική συμπεριφορά χωρίς μορφολογικές διαφοροποιήσεις των κυττάρων. Οι Gregoire και συν 1987 (Gregoire et al 1987) μελέτησαν την κυτταρική συμπεριφορά ινοβλαστών σε επαφή με συνθετικό υδροξυαπατίτη και διαπίστωσαν αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της σύνθεσης DNA για κάθε τύπο ινοβλαστών που μελέτησαν (Cheung & McCarty 1985, Orly et al 1989, Niederauer et al 1994).

Η θετική συμπεριφορά των κυττάρων και των ιστών στα βιοενεργά κεραμικά οφείλεται στη δυνατότητα που αυτά έχουν να προσροφούν και να απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες (Langer 1990, Dard 1997, Midy et al 1998, Dard et al 2000, Tsiourvas et al 2016). Οι Midy και συν 1998 (Midy et al 1998) μελέτησαν δύο τύπους υποστρωμάτων απατίτη (υδροξυαπατίτη και υδροξυκαρβονικού απατίτη)

και διαπίστωσαν μεγαλύτερη προσρόφηση αυξητικού παράγοντα ανθρώπινων ινοβλαστών στον καρβονικό απατίτη (με ενσωμάτωση ανθρακικών ιόντων).

Η κυτταρική συμπεριφορά απέναντι στις βιοενεργές υάλους έχει διερευνηθεί σε πολλές *in vitro* μελέτες με μια πληθώρα κυτταρικών σειρών όπως οστεοβλάστες (Wilson et al 1981, El-Ghannam et al 1997α, Redey et al 2000, Dalby et al 2000, Tsiourvas et al 2016), ινοβλάστες (Matsuda et al 1987), επίμοιο (Seitz et al 1982, Neupert & Vogel 1984), ανθρώπινοι (Wilson et al 1981), ουλικοί άνθρωποι (Häkkinen et al 1988, Gregoire et al 1988), συνοβιακά κύτταρα (Bendall et al 1998), κύτταρα ανθρώπινου πλφού (Uo et al 1998). Από τις μελέτες αυτές γενικά προκύπτει καθόλου (Wilson et al 1981) έως ήπια (Bendall et al 1998) τοξική αντίδραση των βιοενεργών υάλων με τα κύτταρα. Διαπιστώνεται, επίσης, αργός αλλά σταθερός ρυθμός πρόσφυσης των κυττάρων με ικανοποιητικό ρυθμό πολλαπλασιασμού (Matsuda et al 1987, Häkkinen et al 1988, Gregoire et al 1988). Η εξάπλωση των κυττάρων στα υποστρώματα βιοενεργών υάλων ποικίλων συνθέσεων συνοδεύεται συνήθως από διατήρηση της αρχικής τους μορφολογίας με μικρές διαφοροποιήσεις (Seitz et al 1982, Bendall et al 1998, Kokoti et al 2001, Kontonasaki et al 2003, Κοντονασάκη 2003, Kontonasaki et al 2006).

ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Μία ειδική κατηγορία υλικών που έχει αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για τη θεραπεία ελλειμμάτων ή καταγμάτων διαφόρων περιοχών του σώματος, όπως η περιοχή του μέσου ωτός, η σπονδυλική στήλη, η κνήμη, το μηριαίο οστό, οι γνάθοι κ.λ.π., είναι τα βιοενεργά κεραμικά (Oonishi 1993, Wilson et al 1994, Wataha 1996). Βιοενεργά κεραμικά καλούνται όλες οι συνθέσεις υάλων, κεραμικών και υαλοκεραμικών, τα οποία μέσω μιας συγκεκριμένης βιολογικής αντίδρασης που εκδηλώνεται στη διεπιφάνεια επαφής με τους ιστούς, έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας σύνδεσης με το οστό ή και τους μαλακούς ιστούς (Hench & Paschall 1973, Hench & Paschall 1974, Kokubo et al 1982, Ito et al 1987, Schepers & Dycheyne 1997, Renth & Detamore 2012).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ

Βιοενεργές υάλαι

Μία συγκεκριμένη ομάδα βιοενεργών υάλων που έχει ιδιαίτερα μελετηθεί, δημιουργήθηκε από τις ερευνητικές ομάδες του Hench και των συνεργατών του. Η ομάδα αυτή των βιοενεργών υάλων ανήκει στο σύστημα $\text{NaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ και αναφέρεται ως βιοενεργή ύαλος (bioglasses) (Hench & Paschall 1973, Hench & Paschall 1974, Renth & Detamore 2012). Η εμφύτευση δειγμάτων βιοενεργούς υάλου σε μηριαία οστά πειραματόζων προκάλεσε οστική σύνθεση σε διάφορα τμήματα της διεπιφάνειας επαφής έπειτα από 4 εβδομάδες, ενώ το εμφύτευμα παρέμεινε συνδεδεμένο με το οστό έπειτα από 6 εβδομάδες (Hench & Paschall 1973, Hench & Paschall 1974). Οι Hench και Paschal (1973) μελετώντας τη βιολογική συμπεριφορά τριών διαφορετικών συνθέσεων βιοϋάλων μετά από εμφύτευση σε μύες πειραματόζων, διαπίστωσαν ότι μετά από 6 εβδομάδες στις περισσότερες περιοχές της διεπιφάνειας μεταξύ υάλων και κυττάρων η σύνδεση ήταν ισχυρή, με παρουσία ώριμων ινοβλαστών και ώριμες μεσοκυττάρια ίνες κολλαγόνου (Hench & Paschall 1973).

Η δημιουργία σύνδεσης των βιοενεργών υάλων με τους ιστούς είναι αποτέλεσμα μιας σειράς αντιδράσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια επαφής με

τους ιστούς. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός στρώματος πλούσιου σε Si, το οποίο στη συνέχεια καλύπτεται από ένα στρώμα πλούσιο σε Ca-P. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η κρυσταλλοποίηση του στρώματος Ca-P και η μετατροπή του σε υδροξυκαρβονικό απατίτη (HCAp) (Hench & Wilson 1991). Το αναπτυσσόμενο αυτό στρώμα παρουσιάζει μοριακή αναλογία Ca/P συνήθως $< 1,67$ (σπανιότερα και $>1,67$), η οποία είναι η αναφερόμενη αναλογία του στοιχειομετρικού απατίτη. Ο στοιχειομετρικός απατίτης δεν ανευρίσκεται στα βιολογικά συστήματα. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού το στρώμα του υδροξυκαρβονικού απατίτη περιλαμβάνεται στους βιολογικούς απατίτες, οι οποίοι καλούνται “μη στοιχειομετρικοί (nonstoichiometric)”, “ελλιπείς σε Ca (calcium-deficient)” ή και “καρβονικοί (carbonate-containing)” απατίτες (Young 1975, Brown & Chow 1976, Le Geros 1981, Posner 1985).

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των βιολογικών απατιτών είναι τα εξής:

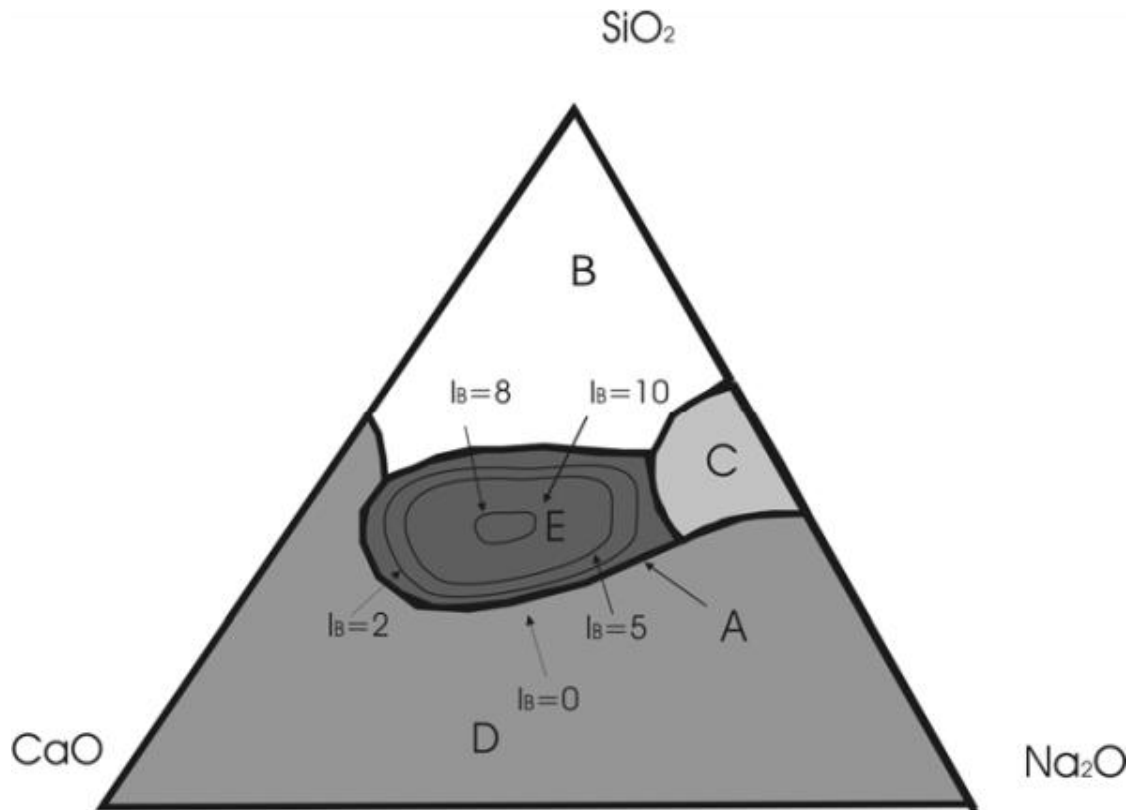
α) παρουσιάζουν μικρούς κρυστάλλους με μικρή ομοιογένεια, β) είναι μη στοιχειομετρικοί, γ) προέρχονται από πρόδρομες μορφές ενώσεων Ca-P όπως άμορφες ενώσεις Ca-P, ACP (Posner 1985) ή φωσφορικό οκτασβέστιο, OCP (Brown & Chow 1981) και δ) μπορεί να περιέχουν στοιχεία και ιχνοστοιχεία τα οποία είναι ενσωματωμένα στην κρυσταλλική δομή ή στην επιφάνεια των μικροκρυστάλλων τους (LeGeros 1981, Driessens & Verbeeck 1985).

Οι διαδικασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα περιλαμβάνουν την ανταλλαγή αλκαλικών ιόντων Na^+ από τις βιοενεργές υάλους, με H^+ και H_3O^+ από το διάλυμα. Αυτή η διαδικασία αποτελεί και το πρώτο στάδιο της αντίδρασης (Hench & Wilson 1991, Cao & Hench 1996). Έπειτα παρατηρείται μετακίνηση Si στη μορφή $\text{Si}(\text{OH})_4$ στο διάλυμα από τη ρήξη των δεσμών Si-O-Si και δημιουργία δεσμών Si-OH στη διεπιφάνεια υάλου-διαλύματος. Στην επόμενη φάση γίνεται συμπύκνωση και αναπολυμερισμός ενός στρώματος SiO_2 επιφανειακά και μετακίνηση μέσω του στρώματος των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου. Τα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου δημιουργούν ένα στρώμα ασβεστίου-φωσφόρου ($\text{CaO-P}_2\text{O}_5$) επάνω από το στρώμα του οξειδίου του πυριτίου. Το πλούσιο σε Ca και P στρώμα είναι απαραίτητο για τη σύνδεση των ενεργών υάλων με τους ιστούς. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται με την κρυσταλλοποίησή του στρώματος υπό την επίδραση OH^- και CO_3^- από το διάλυμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός κρυσταλλικού απατίτη, ο οποίος και αποτελεί φυσικό δομικό συστατικό του οστίτη ιστού. Παράλληλα, ινίδια κολλαγόνου προσκολλώνται στην επιφάνεια των βιοενεργών

υάλων, οπότε η ανάπτυξη των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη ταυτόχρονα στους υάλους και την βιοενεργή ύαλο, προσφέρει μια σταθερή διεπιφάνεια σύνδεσης με τους ζωντανούς ιστούς. Για την ανάπτυξη των στρωμάτων Si και Ca-P στην επιφάνεια των βιοενεργών υάλων, ιδιαίτερη σημασία έχει η σύνθεση της υάλου και ειδικότερα η περιεκτικότητά της σε συγκεκριμένες αναλογίες SiO₂ και P₂O₅ (Ogino et al 1980, Dycheyne 1985). Για το λόγο αυτό έχουν πειραματικά μελετηθεί διάφορες συνθέσεις βιοενεργών υάλων με τροποποιημένες περιεκτικότητες στα συστατικά αυτά (Ogino et al 1980, Dycheyne 1985, Hench & Wilson 1991). Έχει βρεθεί ότι όσο λιγότερη η περιεκτικότητα του SiO₂ στη σύνθεση της υάλου, τόσο αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά της (Ogino et al 1980). Ταυτόχρονα όμως, αυξημένος ρυθμός σύνδεσης σημαίνει αυξανόμενη διαλυτότητα. Η διαλυτότητα ενός βιοϋλικού είναι επιθυμητή όταν αυτή περιορίζεται στην επιφάνεια και δεν εισέρχεται στην κυρίως μάζα του υλικού, γεγονός που συμβαίνει σε συνθέσεις βιοενεργών υάλων με αυξημένη περιεκτικότητα σε Na₂O (Walker και Hench 1977). Τα στρώματα Ca-P και SiO₂ δημιουργούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε υάλους με λιγότερη περιεκτικότητα σε SiO₂ (~ 46mol% SiO₂). Το στρώμα Ca-P δε δημιουργεί δεσμό ούτε με το οστόν ούτε και με τους μαλακούς ιστούς σε υάλους με περιεκτικότητα σε SiO₂ >60 mol%.

Οι βασικές ιδιότητες των βιοενεργών κεραμικών που έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας σύνδεσης με τους ιστούς, είναι: α) περιεκτικότητα λιγότερο από 60% w/w σε SiO₂ β) υψηλή περιεκτικότητα σε Na₂O και CaO και γ) υψηλή μοριακή αναλογία Ca/P. Η πιο μελετημένη σύνθεση της ομάδας των βιοενεργών υάλων είναι γνωστή με το όνομα 45S5 Bioglass, περιέχει SiO₂ 45 % w/w, P₂O₅ 6% w/w, CaO 24,5% w/w και Na₂O 24,5% w/w και έχει μοριακή αναλογία Ca/P=5/1 (Hench & Wilson 1991). Συνθέσεις με σημαντικά χαμηλότερες αναλογίες δε σχηματίζουν δεσμό με το οστόν (Hench & Paschall 1973). Παρολαυτά, αντικαταστάσεις στον τύπο 45S5 με 5-15% w/w με B₂O₃ αντί για SiO₂ ή 12,5% w/w CaF₂ αντί για CaO δεν επηρεάζουν τη δυνατότητα του υλικού για τη δημιουργία σύνδεσης με το οστόν (Hench & Paschall 1973) . Προσθήκη όμως έστω και 3% w/w Al₂O₃ στον τύπο 45S5, παρεμποδίζει τη σύνδεση με το οστόν (Hench & Paschall 1973, Andersson et al 1990). Το 45S5 Bioglass έχει τον υψηλότερο δείκτη βιοενεργότητας. Η ιδιότητά του αυτή προσδίδει στο 45S5 Bioglass τη δυνατότητα επίτευξης σύνδεσης τόσο με το οστόν (Hench & Paschall 1973, Oonishi et al 1997) όσο και με τους μαλακούς ιστούς (Hench & Paschall 1973, Wilson & Nolletti 1990, Wilson & Low 1992, Tuominen et al 1993). Ο δείκτης βιοενεργότητας I_b προσδιορίζεται από το χρόνο που απαιτείται για να συνδεθεί με το οστόν περισσότερο από το 50% της

εμφυτευμένης επιφάνειας του βιοϋλικού (Hench & Wilson 1991). Έχει μελετηθεί, επίσης, και η σύνθεση απατίτη 45S5 Bioglass στην πορεία του χρόνου (Kontonasaki et al 2002). Οι Hench και Wilson (Hench & Wilson 1991) αναφέρουν ότι το πάχος του στρώματος Ca-P που αναπτύσσεται, παραμένει σχετικά σταθερό στα 30-40μm για 4 εβδομάδες σε οστά πειραματόζων. Οι Ito και συν (Ito et al 1987) αναφέρουν ότι στα ευρήματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM) δεν ανευρίσκεται στρώμα ινώδους ιστού αλλά απευθείας σύνδεση με το οστόν μετά από 4 εβδομάδες εμφύτευσης σε οστά κονίκλων. Άλλοι ερευνητές (Oonishi et al 1997) μελέτησαν κόκκους 45S5 Bioglass και διαπίστωσαν το σχηματισμό των στρωμάτων Si και Ca-P, καθώς και οστική σύνθεση γύρω από κάθε κόκκο, μετά από εμφύτευση σε οστικά ελλείματα σε οστά κονίκλων. Διερευνήθηκε, επίσης, και η δυνατότητα εκδήλωσης βιοενεργότητας σε οδοντιατρικά κεραμικά υλικά, μετά από τροποποίηση της επιφάνειας με 45S5 Bioglass (Papadopoulou et al 2003, Kontonasaki et al 2003, Chatzistavrou et al 2006). Η σημασία και η εξάρτηση της σύστασης των βιοενεργών κεραμικών του συστήματος $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ στη δημιουργία σύνδεσης με τους ιστούς, παρουσιάζεται στην *Εικόνα 12*. Όλα τα κεραμικά τα οποία εμφανίζονται στην εικόνα περιέχουν 6% w/w P_2O_5 . Όλες οι συνθέσεις που περιέχονται στην περιοχή A σχηματίζουν δεσμό με το οστόν. Συνθέσεις υάλων που περιέχονται στην περιοχή B συμπεριφέρονται σαν αδρανή υλικά, τα οποία είναι δυνατό να οδηγήσουν στο σχηματισμό ινώδους κάψας στη διεπιφάνεια επαφής με τους ιστούς. Υάλιοι που περιλαμβάνονται στην περιοχή C απορροφώνται ταχύτατα (10-30 μέρες μετά την εμφύτευση). Στην περιοχή D περιλαμβάνονται συνθέσεις υάλων που για πρακτικούς λόγους δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως υλικά εμφύτευσης. Αντίθετα στην μικρή περιοχή E που οριοθετείται από τη διακεκομμένη γραμμή περιλαμβάνονται κεραμικά τόσο βιοενεργά που μπορούν να δημιουργήσουν σύνδεση και με τους μαλακούς ιστούς. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των βιοενεργών κεραμικών είναι ο σχηματισμός του στρώματος βιολογικού απατίτη στη διεπιφάνεια επαφής με τους ιστούς. Παρόλαυτά, ο χρόνος σχηματισμού και κρυσταλλοποίησης αυτού του στρώματος διαφέρει σε κάθε υλικό. Όταν ο ρυθμός είναι αργός (χαμηλός δείκτης βιοενεργότητας), τότε δε σχηματίζεται δεσμός με τους ιστούς *in vivo* (Hench & Wilson 1991, Cao & Hench 1996) (*Εικόνα 12*).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της εξάρτησης της σύστασης των βιοϋλικών με τη δυνατότητα επίτευξης σύνδεσης με τους ιστούς (Hench & Wilson 1991)

Η ίδια αλληλουχία αντιδράσεων έως τη δημιουργία του κρυσταλλικού απατίτη, εμφανίζεται και *in vitro*, κατά την επαφή των βιοενεργών υάλων με πειραματικά διαλύματα, τα οποία περιέχουν ιόντα σε συστάσεις όμοιες με εκείνες των φυσιολογικών υγρών του σώματος (Kim et al 1989, Rehman et al 1994a). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Kim et al 1989), 2h μετά την επίδραση Tris Buffer Solution (TBS) σε δίσκους βιοενεργών υάλων σχηματίζεται το άμορφο στρώμα Ca-P, το οποίο κρυσταλλοποιείται μετά από 20h. Το στρώμα Ca-P εμφανίζεται έπειτα από 1h και μετατρέπεται σε κρυσταλλικό απατίτη μετά από 6-48 ώρες σε Simulated Body Fluid (SBF), για διάφορες συνθέσεις βιοενεργών υάλων. Το SBF είναι ένα υγρό διάλυμα το οποίο μοιάζει με τα βιολογικά υγρά του σώματος, έχει σύνθεση όμοια με τη σύσταση του ανθρώπινου πλάσματος και έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα στις *in vitro* μελέτες (Kokubo et al 1990, Li et al 1992, Cho et al 1997, Hayakawa et al 1999). Μετά την εμβύθιση δοκιμίων βιοϋάλων σε SBF, ο σχηματισμός του άμορφου στρώματος Ca-P αρχίζει μεταξύ 10-60min, ενώ ο κρυσταλλικός απατίτης σχηματίζεται μετά από 3h (Filgueiras et al 1993a, Filgueiras et al 1993 b). Έχουν μελετηθεί διάφορες παραλλαγές στη σύνθεση του SBF, οι

οποίες προκύπτουν από την προσθήκη ή την αφαίρεση ορισμένων ιόντων στο διάλυμα. Βασικός σκοπός των παραλλαγών στη σύνθεση του SBF είναι η όσο το δυνατόν ταχύτερη ανάπτυξη στρώματος ΗCΑρ στην επιφάνεια των βιοϋάλων (Kokubo et al 1990, Filgueiras et al 1993a, Ban & Maruno 1998, Cüneyt 2000). Το ασβέστιο και τα φωσφορικά ιόντα του διαλύματος επιταχύνουν ως ένα σημείο τον αναπολυμερισμό του πυριτίου και τη δημιουργία του άμορφου στρώματος ασβεστίου-φωσφόρου στην επιφάνεια της υάλου. Αντίθετα, τα ιόντα μαγνησίου καθυστερούν τη δημιουργία και την κρυσταλλοποίηση του στρώματος Ca-P (Filgueiras et al 1993a). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Helebrant και συν 2002 (Helebrant et al 2002) μελετώντας διάφορες συνθέσεις SBF, όσον αφορά στα ανθρακικά ιόντα. Τα ανθρακικά ιόντα καθυστερούν το ρυθμό ανάπτυξης και την κρυσταλλοποίηση του στρώματος απατίτη. Μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει την κινητική των αντιδράσεων των βιοενεργών υάλων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, είναι η αναλογία επιφάνειας αντίδρασης της υάλου προς τον όγκο του διαλύματος. Όσο μικρότερη είναι αυτή η αναλογία, τόσο παχύτερο είναι και το στρώμα του υδροξυαπατίτη που σχηματίζεται στην διεπιφάνεια επαφής. Το γεγονός αυτό αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επίτευξη πρόσφυσης κυττάρων και ιστών στα υλικά αυτά (Filgueiras et al 1993a, Andersson et al 1994, Greenspan et al 1994, Renth & Detamore 2012).

Χημικός Υδροξυαπατίτης (ΗΑρ)

Ο υδροξυαπατίτης (ΗΑρ) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ και η αλουμίνα (Al_2O_3) αποτελούν βιοϋλικά τα οποία χρησιμοποιούνται σε ανάμιξη με τη βιοενεργή ύαλο, προκειμένου να παρασκευαστούν σύνθετα υλικά με βιοενεργές ιδιότητες. Πρόκειται για υλικά σταθερά, με βιοενεργά και βιοαδρανή χαρακτηριστικά αντίστοιχα, τα οποία σε συνδυασμό με τη βιοενεργή ύαλο είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία μιγμάτων επίστρωσης πιο σταθερών, με καλύτερες μηχανοβιολογικές και φυσικομηχανικές ιδιότητες. Ο υδροξυαπατίτης (ΗΑρ) ανήκει στην κατηγορία των βιοενεργών κεραμικών. Τα βιοενεργά κεραμικά είναι σκληρά, δύσκαμπτα και χημικά σταθερά βιοϋλικά. Τα βασικά μειονεκτήματα που εμφανίζουν τα βιοενεργά κεραμικά υλικά είναι η ψαθυρότητά και η σχετικά δύσκολη επεξεργασία τους. Παρόλαυτά, παρουσιάζουν εκτεταμένες εφαρμογές σε επαφή με σκληρούς, αλλά και μαλακούς ιστούς. Η βιοενεργότητα του ΗΑρ τον καθιστά ικανό να χρησιμοποιηθεί και ως «μεταφορέας» φαρμάκου στον οργανισμό (Yu et al 1992).

Ο υδροξυαπατίτης, συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απελευθέρωση αντικαρκινικών παραγόντων ή αντιβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό (Otsuka et al 1990, Yu et al 1992). Ο υδροξυαπατίτης (HAp) χρησιμοποιείται ευρέως ως μοσχευματικό υλικό αποκατάστασης κατεστραμμένων σκληρών ιστών (δόντια ή οστά), αφού παρουσιάζει κρυσταλλογραφική ομοιότητα με ποικίλους ασβεστοφωσφορικούς ιστούς (Ruys et al 1995a, Hench 1998). Ο υδροξυαπατίτης, επίσης, είναι χημικά σταθερός σε επαφή με τα υγρά του σώματος, τόσο μόνος του όσο και σε συνδυασμό με άλλα βιοενεργά υλικά (Hench & Wilson 1991). Παρόλαυτά, ο υδροξυαπατίτης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη μη στοιχειομετρία και στις προσμίξεις (Fulmer et al 1992, Slosarczyk et al 1996). Εξαιτίας των δυσκολιών που παρουσιάζει στην επεξεργασία του και των μηχανικών ιδιοτήτων του, οι εφαρμογές του εμπορικού HAp περιορίζονται σε μορφή κόνεως, επίστρωσης και πορωδών σωμάτων (Suchanek & Yoshimura 1998). Σε υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά την όπτηση των οδοντιατρικών κεραμικών συχνά προκαλείται ακραία εκτράχυνση κρυσταλλιτών και αποσύνθεση του HAp, οδηγώντας σε περαιτέρω υποβάθμιση των μηχανικών του ιδιοτήτων (Chaki & Wang 1994). Σε βιολογικό περιβάλλον η επιφάνεια του χημικού υδροξυαπατίτη μετατρέπεται σε βιολογικό υδροξυαπατίτη, με μια σειρά αντιδράσεων (Hench & Wilson 1991). Η διαδικασία βασίζεται αρχικά στη μερική διάλυση της επιφάνειας του υδροξυαπατίτη με αποτέλεσμα τον υπερκορεσμό του διαλύματος σε τοπικό επίπεδο και την εναπόθεση ιόντων από το διάλυμα στην επιφάνεια. Η ιοντική ανταλλαγή μεταξύ του φυσιολογικού υγρού και των χημικών στοιχείων της επιφάνειας, και η δομική αναδιοργάνωση στη διεπιφάνεια του υλικού, συνοδεύονται από την προσρόφηση βιολογικών μορίων ή πρόσφυση κυττάρων στην επιφάνεια του βιοϋλικού (Kokubo 1990).

ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο όρος *απατίτης* αναφέρθηκε στα μέταλλα για πρώτη φορά από τον Werner το 1978 (Werner et al 1978). Γενικά ο όρος *απατίτης* δηλώνει μια οικογένεια κρυστάλλων με τον τύπο $M_{10}(RO_4)_6X_2$, όπου

M: είναι συνήθως ασβέστιο,

R: συνήθως φωσφόρος και

X: υδροξείδιο ή ένα άλλο αλλογόνο όπως το φθόριο.

Οι Albeys και Morison το 1920 πρώτοι ανέφεραν επιτάχυνση της πώρωσης με μία σκόνη φωσφορικού ασβεστίου παρόλο που αυτό αμφισβητήθηκε έντονα αργότερα.

Ως επίστρωμα για την επικάλυψη εμφυτευμάτων χρησιμοποιήθηκε πρώτα στην οδοντιατρική το 1971 και αργότερα αναφέρθηκαν επιτυχίες με τη χρήση του ως υποκατάστατο οστικών μοσχευμάτων.

Ο υδροξυαπατίτης $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ανήκει στην κατηγορία των κεραμικών υλικών. Σαν κεραμικά υλικά μπορούν να οριστούν όλα τα στερεά, τα οποία δεν είναι ούτε μέταλλα ούτε οργανικά υλικά.

Τα κεραμικά είναι ετερογενή υλικά αποτελούμενα από κόκκους, οι οποίοι συναρμολογούνται με μια θερμική διαδικασία (στάδιο σύντηξης). Ο υδροξυαπατίτης ταξινομείται ως ένα επιφανειοδραστικό υλικό με οστεοτροπικές και οστεοεπαγωγικές ιδιότητες. Αυτό σημαίνει ότι δημιουργείται ένας δεσμός μεταξύ του βιοϋλικού και του ιστού στον οποίον εμφυτεύεται (Αλευρογιάννης 2011).

ΧΗΜΕΙΑ

Ο υδροξυαπατίτης (HAp) είναι ένα οστεοαγώγιμο, βιοενεργό υλικό (Capello et al 1998, Munting 1995). Οι οστεοβλάστες «αγκιστρώνονται» στην επικάλυψη του HAp και παράγουν οστεοειδές κατά αντιστοιχία με την επιφάνεια του φυσιολογικού δοκιδώδους οστού (Rossi et al 1995, Blaker 2003, Castro 2013). Χημικώς ο HAp μπορεί να δημιουργηθεί από νιτρικό ασβέστιο και φωσφορικό αμμώνιο σε βασικό περιβάλλον. Η ένωση η οποία προκύπτει, θεωρητικά, έχει τον τύπο $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Στην πραγματικότητα διάφορα υποκατάστατα είναι δυνατά ως προς το ασβέστιο, τη φωσφορική ρίζα και το υδροξύλιο (Bonel et al 1995). Τα υποκατάστατα αυτά

τροποποιούν τις επιμέρους ιδιότητες του υδροξυαπατίτη και ιδιαίτερα τη διαλυτότητα του. Για παράδειγμα, ο φλουοραπατίτης, ο οποίος προκύπτει από την υποκατάσταση των ιόντων OH- από F- έχει μικρότερη διαλυτότητα από τον HAρ. Το ανόργανο τμήμα του οστίτη ιστού είναι ένας ανθρακικός υδροξυαπατίτης του οποίου η σύνθεση αποδίδεται από τον τύπο: $(Ca, X)_{10}(PO_4)_{6}(OH, Y)_2$, όπου X κατιόντα (μαγνήσιο, νάτριο, στρόντιο) που μπορούν να υποκαταστήσουν το ασβέστιο και Y ανιόντα (χλώριο, φθόριο) που μπορούν να υποκαταστήσουν το υδροξύλιο (Le Geros 2002).

Ο υδροξυαπατίτης σπάνια εμφανίζεται με μονοκρυσταλλική μορφή. Τα πολυκρυσταλλικά συστήματα υδροξυαπατίτη είναι τα πιο συνηθισμένα. Ο κρύσταλλος του υδροξυαπατίτη παρουσιάζει εξαγωνική συμμετρία. Η δομή του αποτελείται από ένα σκελετό, αποτελούμενο από τετράεδρα ιόντων PO_4^{3-} διαταγμένα σε πλέγμα σε δύο στρώματα όπου δημιουργούν εξάγωνες διατάξεις στα 1/4 και 3/4 του πλέγματος. Η έσω επιφάνεια κάθε στρώματος δημιουργεί μια επιφάνεια «καθρέπτη» και περιέχει τα φωσφορικά άτομα και δύο από τα τέσσερα οξυγόνα, ενώ τα υπόλοιπα δύο οξυγόνα βρίσκονται συμμετρικά τοποθετημένα σε σχέση με αυτή την επιφάνεια. Αν η κατασκευή θεωρηθεί παράλληλη με τον άξονα C, τα ιόντα ασβεστίου σε συνδυασμό με το οξυγόνο των φωσφορικών ιόντων δημιουργούν στήλες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο ώστε ένα άτομο φωσφόρου ενώνεται με τρία οξυγόνα μιας στήλης και με ένα τέταρτο οξυγόνο μιας γειτονικής στήλης. Μια κυψελιδωτή κατασκευή ιόντων PO_4^{3-} σχηματίζεται έτσι και αποτελεί το βασικό δίκτυο. Η κατασκευή αυτή διασχίζεται παράλληλα με το C άξονα από δύο τύπους καναλιών. Ο ένας τύπος, συμπίπτει με τον τριαδικό (ternary) άξονα του πλέγματος. Αυτά τα κανάλια, τα οποία είναι έξι ανά πλέγμα, είναι κατειλημμένα το καθένα από δύο ιόντα Ca^{2+} . Ονομάζονται Ca I και εντοπίζονται περίπου στα 0 και 1/2 επίπεδα. Ο άλλος τύπος, έχοντας μέσο όρο διαμέτρου σαφώς μεγαλύτερο, είναι επικεντρωμένος στον ελικοειδή άξονα του δικτύου και παίζει μεγάλο ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες του υδροξυαπατίτη. Τα ιόντα OH εντοπίζονται στον άξονα αυτού του τύπου καναλιών, δύο ανά πλέγμα, περίπου στα επίπεδα των Ca II (1/4 και 3/4 επίπεδα του πλέγματος) (Bonel et al 1995).

Ο HAρ είναι το καταλληλότερο βιολογικό φωσφορικού ασβεστίου, λόγω τόσο της «φυσικής» ύπαρξης του στο οστόν όσο και της καλά τεκμηριωμένης βιοσυμβατότητας και αξιοπιστίας του στη δημιουργία σταθερής ενδιάμεσης οστικής επιφάνειας (interface) *in vivo* (Geesink 1995, Kim & Mendis 2006).

Ο ΗΑρ είναι, επίσης, το πλέον χρησιμοποιούμενο βιοϋλικό φωσφορικού ασβεστίου, λόγω της κρυσταλλικής του δομής και της δυσδιαλυτότητας. Η κρυσταλλική δομή του υδροξυαπατίτη προσομοιάζει με την ανόργανη φάση του οστίτη ιστού (Bonel et al 1995, Geesink 2002, Blaker 2003, Kim & Mendis 2006, Castro 2013).

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί ένα εξαιρετικό βιοσυμβατό βιοϋλικό, μη τοξικό, με μη ανοσογόνο συμπεριφορά. Παρουσιάζει στενή κατανομή του μεγέθους των κρυστάλλων του, υψηλή ειδική επιφάνεια και υψηλή καθαρότητα. Ως μοσχευματικό υλικό κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης, ο υδροξυαπατίτης εμφανίζει ήπια φλεγμονώδη αντίδραση, ανάπτυξη νεόπλαστων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, αυξημένη κυτταρική προσκόλληση και οστική σύνθεση (Hench 1998, Bonucci 2000, Blaker 2003, Castro 2013, Atak et al 2017).

ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ικρίωματα καλούνται οι δομές εκείνες οι οποίες παρέχουν ένα τροποποιημένο δίκτυο (matrix, σκελετό) που καθοδηγεί την τρισδιάστατη ανάπτυξη κυττάρων. Το μέγεθος των ικριωμάτων και η εσωτερική αρχιτεκτονική τους πρέπει να επιτρέπουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα ικρίωματα προκειμένου να εκπληρώνουν το ρόλο τους και να προάγουν την ιστική ανάπλαση χρειάζεται να είναι βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά και βιοενεργά υλικά (Θεοχαρίδου 2009, Xu et al 2014):

- *Βιοαποικοδομήσιμο* ονομάζεται το υλικό που είναι δυνατό να αποσυντεθεί από ζωντανούς οργανισμούς (όχι απαραίτητα από τον άνθρωπο). Βιοαποικοδομήσιμα υλικά θεωρούνται το πολυγαλακτικό οξύ, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και από τον άνθρωπο, και η κυτταρίνη, η οποία αποικοδομείται ενζυμικά από μικροοργανισμούς (Xu et al 2014).
- *Βιοσυμβατό* είναι το υλικό που δεν είναι τοξικό, δεν προκαλεί αντιδράσεις υπερευαισθησίας και δεν απορρίπτεται από τους ζωντανούς οργανισμούς. Σε αντίθεση με τον όρο βιοαποικοδομήσιμο που σχετίζεται τόσο με τον άνθρωπο, ζώα όσο και με τους μικροοργανισμούς, ο όρος βιοσυμβατό υλικό στη συντριπτική πλειοψηφία αναφέρεται σε υλικά που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπινους ή ζωικούς οργανισμούς. Τα δύο βιοαποικοδομήσιμα υλικά που προαναφέρθηκαν (πολυγαλακτικό οξύ και κυτταρίνη) είναι και βιοσυμβατά. Άλλο παράδειγμα βιοσυμβατού υλικού είναι ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA) που δεν είναι όμως βιοαποικοδομήσιμο υλικό (Xu et al 2014).
- *Βιοενεργό* καλείται το υλικό το οποίο αλληλεπιδρά με τους γύρω ζώντες ιστούς με αποτέλεσμα την ανάπτυξη υδροξυκαρβονικού απατίτη. Παράδειγμα βιοενεργού υλικού είναι ένα ικρίωμα πολυμερούς-υδροξυαπατίτη το οποίο ευνοεί την προσκόλληση οστεοβλαστών και την ανάπτυξη οστίτη ιστού. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα βιοενεργό υλικό δεν είναι απαραίτητα και βιοσυμβατό και αντίστροφα. Τα υλικά, όμως που χρησιμοποιούνται για ιστική ανάπλαση θα πρέπει να χαρακτηρίζονται και από τις δύο ιδιότητες. Η βιοαποικοδομησιμότητα

στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι επιθυμητή αλλά όχι απαραίτητη. Εφόσον το ικρίωμα είναι βιοσυμβατό μπορεί να παραμείνει (χωρίς να αποικοδομηθεί) στον οργανισμό μετά την ανάπλαση ιστού, ή να αφαιρεθεί (Ma 2004, Xu et al 2014).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ

Τα ικρίωματα διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες σύμφωνα με (Θεοχαρίδου 2009):

- το ρυθμό αποικοδόμησης,
- τη σύνθεση και
- τη δομή τους.

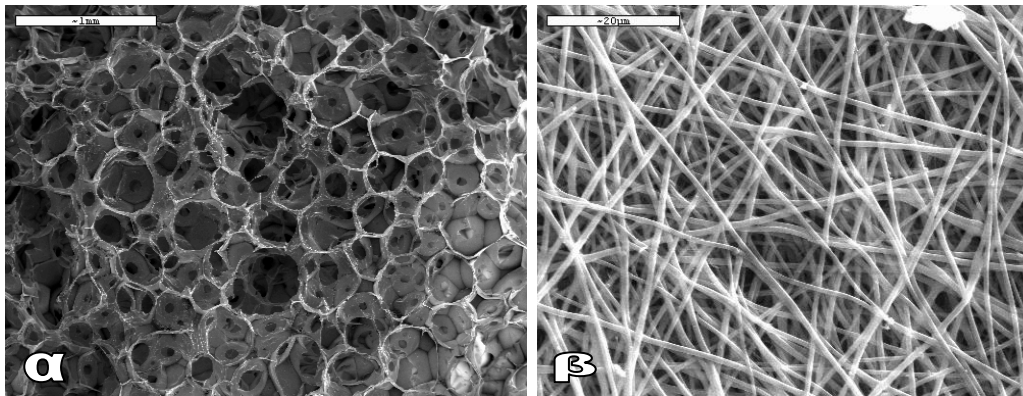
Σύμφωνα με το ρυθμό αποικοδόμησής τους χωρίζονται σε μόνιμα και σε προσωρινά. Τα μόνιμα ικρίωματα διατηρούν το σχήμα και την αντοχή τους κατά τη διάρκεια της αναγέννησης του ιστού, ενώ τα προσωρινά ικρίωματα διασπώνται σε απλούστερες δομές ή απορροφώνται.

Σύμφωνα με τη σύνθεσή τους διακρίνονται σε συνθετικά, σε ικρίωματα φυσικής προέλευσης και σε συνδυασμό αυτών των δύο (Yarlagadda et al 2005, Bartold et al 2006). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συνθετικά ικρίωματα είναι τα παράγωγα πολυλακτικού (PLLA) ή πολυγαλακτικού (PLDA) οξέος. Όμως, τα συνθετικά ικρίωματα, συχνά, προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση στους ιστούς (adverse tissue reaction) (Taboas et al 2003).

Τα φυσικά ικρίωματα παράγονται από ποικιλία ουσιών όπως το κολλαγόνο, η ζελατίνη, το υαλουρονικό οξύ (Wu et al 2015), η χιτίνη, η χιτοζάνη και εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα όσον αφορά τη χρήση τους στην ιστική εμβιομηχανική. Εμφανίζουν ανάλογη δομή με την εξωκυττάρια ουσία στον οργανισμό. Τα φυσικά ικρίωματα που αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου I ή II ή γλυκοζοαμινογλυκάνες έχουν υψηλό πορώδες (μεγαλύτερο από 90%) και μεγέθη πόρων που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 500 μm (Farrel et al 2006). Τα συστατικά που τα αποτελούν σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δομή, η ακεραιότητα της οποίας διατηρείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων τους και μέσω διάφορων χημικών δεσμών. Η τρισδιάστατη αυτή δομή καθιστά το ικρίωμα ικανό κυτταρικό μεταφορέα (Tsiourvas et al 2016). Παράλληλα, εξαιτίας της φυσικής τους προέλευσης, τα ικρίωματα αυτά συνήθως δεν προκαλούν φλεγμονώδη και ανοσολογική αντίδραση, φαινόμενο που συχνά παρατηρείται με τα συνθετικά ικρίωματα. Τα φυσικά

ικριώματα είναι, επίσης, βιοαποικοδομήσιμα. Όμως, παρουσιάζουν και μερικά προβλήματα, όπως η μεταβλητότητα στη σύνθεσή τους (Yarlagadda 2005, Bartold et al 2006).

Σύμφωνα με τη δομή τους διακρίνονται σε ικριώματα στερεάς κατάστασης και στα υδροπηκτώματα (hydrogels). Ταυτόχρονα, με βάση το κριτήριο της δομής τους, τα ικριώματα στερεάς κατάστασης είναι δυνατό να διακριθούν σε δύο υποτύπους: τα πορώδη και τα ινώδη ικριώματα (Ma 2004). Και οι δύο υποτύποι στερεού ικριώματος είναι πορώδη υλικά και παρουσιάζουν μικροκενά στο εσωτερικό τους. Στα ινώδη υλικά ένα πλέγμα ινών οδηγεί σε σχηματισμό πόρων. Οι πόροι σε αυτήν την περίπτωση έχουν διαφορετική μορφολογία από τους πόρους των πορωδών ικριωμάτων. Στην *Εικόνα 13* παρουσιάζονται οι δομές ινωδών και πορωδών ικριωμάτων (φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, SEM). Τα ινώδη ικριώματα συνήθως χρησιμοποιούνται για την ιστική ανάπτυξη μαλακού ιστού (ίνες κολλαγόνου) όπως δέρματος (Ehrenfreund-Kleinman et al 2006). Για την κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη του οστίτη ιστού χρησιμοποιούνται κυρίως πορώδη ικριώματα (Lee et al 2000, Seol et al 2004) (*Εικόνα 13*).



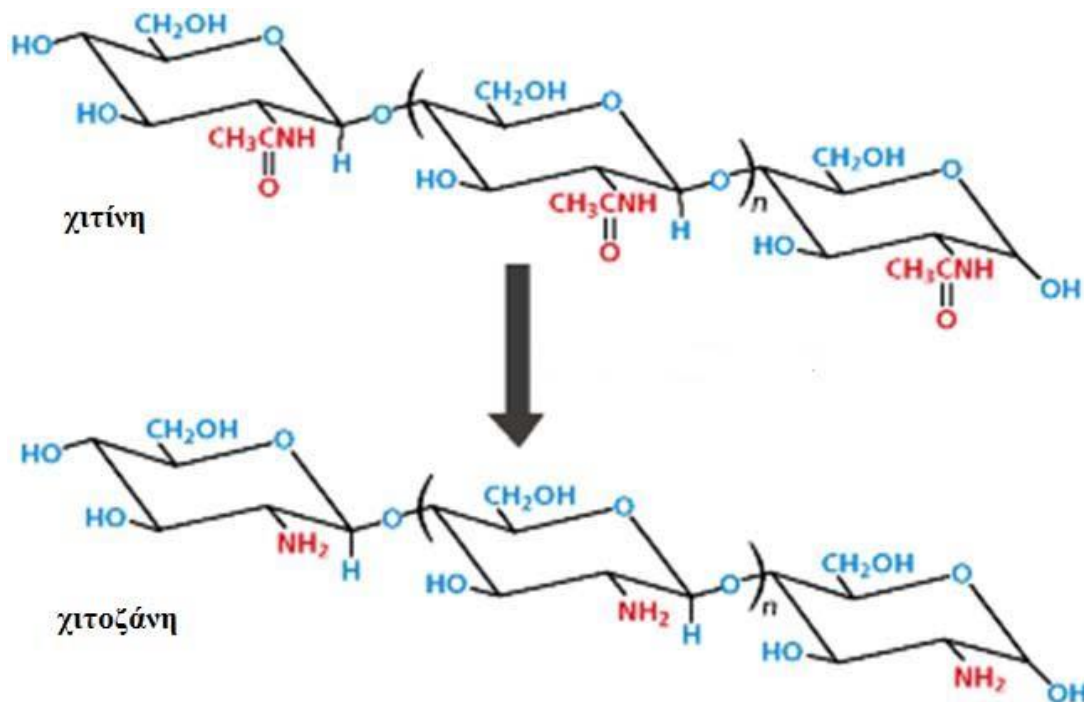
Εικόνα 13: α) Πορώδες ικρίωμα κυτταρίνης, β) Ινώδες ικρίωμα οξικής κυτταρίνης (Θεοχαρίδου 2009)

Μία ακόμη ξεχωριστή κατηγορία ικριωμάτων αποτελούν τα υδροπηκτώματα (hydrogels). Τα υδροπηκτώματα που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές ιστομηχανικής είναι κολλοειδείς διασπορές πολυμερών σε νερό (Θεοχαρίδου 2009).

ΧΙΤΙΝΗ-ΧΙΤΟΖΑΝΗ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Η χιτίνη [β -(1-4)-N-ακετυλ- D-γλυκοζαμίνη] ανήκει στην κατηγορία των φυσικών πολυμερών. Αποτελεί φυσικό μακρομόριο, το οποίο περιλαμβάνεται στην κατηγορία των πολυσακχαριτών (Εικόνα 14). Θεωρείται ότι είναι το δεύτερο βιοπολυμερές, μετά την κυτταρίνη, σε αφθονία σε παγκόσμιο επίπεδο. Το γεγονός αυτό συμβαίνει διότι η χιτίνη παράγεται από ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών. Η χιτίνη απαντάται στη φύση με τη μορφή διατεταγμένων κρυσταλλικών μικροϊνιδίων. Τα μικροϊνίδια αυτά συνθέτουν τα δομικά συστατικά του εξωσκελετού των αρθροπόδων. Έχουν αναφερθεί δύο κρυσταλλικές δομές της χιτίνης (α και β). Η δομική της μονάδα απαντάται και στο κυτταρικό τοίχωμα ορισμένων βακτηρίων και μυκήτων (Tharanathan & Kittur 2003, Rinaudo 2006). Παράγεται επίσης από μικρό αριθμό οργανισμών του κατώτερου φυτικού και ζωικού βασιλείου, εξυπηρετώντας διάφορες λειτουργίες στις οποίες απαιτείται στιβαρότητα και ανθεκτικότητα (Rinaudo 2006).



Εικόνα 14: Δομή χιτίνης και χιτοζάνης (Prashnanth & Tharanathan 2007)

ΧΗΜΕΙΑ

Η χιτοζάνη αποτελεί *D-N-ακετυλιωμένο ανάλογο της χιτίνης (Εικόνα 14)*. Στη φύση είναι δυνατό να εντοπιστεί με διαφορετικές πολυμορφικές δομές, οι ιδιότητες των οποίων ποικίλλουν (Prashnanth & Tharanathan 2007).

Ως βασικές ιδιότητες της χιτίνης και της χιτοζάνης αναφέρονται οι εξής (Θεοχαρίδου 2009, Ding et al 2014):

1. Αφθονία στη φύση
2. Βιοαποδόμηση
3. Βιοσυμβατότητα
4. Αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντιϊικές ιδιότητες
5. Αντιπηκτικές ιδιότητες
6. Αντικαρκινικές ιδιότητες
7. Ποικιλία μεθόδων παρασκευής ικρωμάτων χιτίνης ή χιτοζάνη

ΙΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ιστομηχανική (tissue engineering) ονομάζεται ο κλάδος της επιστήμης που ασχολείται με την εφαρμογή των αρχών της βιολογίας, της ιατρικής, της φυσικοχημείας και της μηχανικής. Η συμβολή της ιστομηχανικής στη συντήρηση, τροποποίηση και ανάπτυξη τεχνητών ιστών και μέρους των λειτουργιών τους (Berthiaume et al 2003, Ehrenfreund-Kleinman et al 2006) θεωρείται αναμφισβήτητη. Η πλήρης και καθολική αναγέννηση ενός ολόκληρου οργάνου είναι ένας απώτερος στόχος της ιστομηχανικής (Ma 2004).

Η ιστομηχανική είναι δυνατό να χωριστεί σε δύο μεγάλες κατευθύνσεις: α) την εργαστηριακή (*in vitro*) δημιουργία τεχνητών ιστών και β) την *in vivo* τροποποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και λειτουργίας (Berthiaume et al 2003). Οι τεχνητοί ιστοί που αναπτύσσονται μ π ο ρ ε ί ν α χρησιμοποιηθούν ως μοσχευματικά υλικά (Θεοχαρίδου 2009).

Η ιστομηχανική εφαρμόζεται σε πολλά επιστημονικά πεδία. Αρχικά αναπτύχθηκαν δισδιάστατες κυτταρικές σειρές με σκοπό την ιστική ανάπλαση. Έτσι, συμπαγή (μη πορώδη) φιλμ κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκαν για ανάπλαση του δέρματος. Επιπλέον, καρκινικά κύτταρα από ποντίκια εγκλείστηκαν σε πολυμερική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν π ε ι ρ α μ α τ ι κ ά σε γαστρική κοιλότητα χοίρου (Ehrenfreund-

Kleinman et al 2006). Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι τα κύτταρα επιζούσαν και δεν εκδηλωνόταν ανοσολογική αντίδραση. Τις δυσδιάστατες αυτές καλλιέργειες, στη συνέχεια, ακολούθησαν οι κυττροκαλλιέργειες σε τρεις διαστάσεις. Σε τέτοιου είδους καλλιέργειες οι τιμές κυτταρικού πληθυσμού που είναι κατάλληλες για την τρισδιάστατη ανάπτυξη κυττάρων είναι μεγαλύτερες συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιούνται για τις καλλιέργειες δύο διαστάσεων (Berthiaume et al 2003, Ehrenfreund-Kleinman et al 2006).

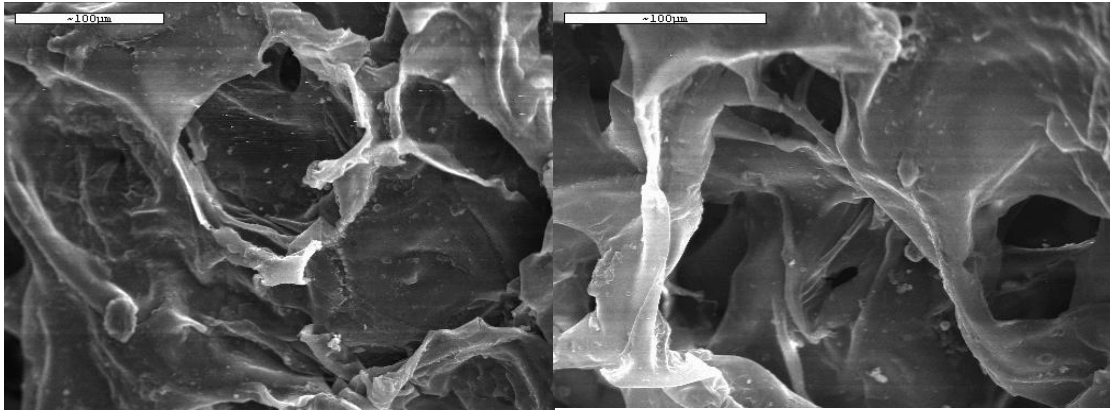
Η τρισδιάστατη καλλιέργεια/ανάπτυξη κυττάρων είναι δυνατή με τη χρήση ενός κατάλληλου υλικού-φορέα των κυττάρων, του ικρίωματος (*scaffold*), το οποίο δρα ως τεχνητή εξωκυττάρια ουσία (*extracellular matrix*). Η επιλογή του υλικού από το οποίο κατασκευάζεται το ικρίωμα, καθώς και τα λοιπά φυσικομηχανικά χαρακτηριστικά του, επηρεάζουν άμεσα την επιτυχή ανάπτυξη των κυττάρων και άρα τη δημιουργία νεόπλαστου ιστού (Θεοχαρίδου 2009, Atak et al 2017).

Σπουδαίος θεωρείται, επίσης, και ο ρόλος των κυττάρων που ενοφθαλμίζονται στο ικρίωμα. Το είδος τους και η προέλευσή τους καθορίζεται κυρίως από τον τύπο του προς ανάπτυξη ιστού. Παρόλο που αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται τα αντίστοιχα κύτταρα, για ένα συγκεκριμένο τύπο ιστού (χρήση οστεοβλαστών για ανάπτυξη οστίτη ιστού), είναι δυνατή και η χρήση εμβρυονικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε άλλους τύπους κυττάρων, υπό κατάλληλες συνθήκες (Hwang et al 2009). Η μέθοδος καλλιέργειας των κυττάρων (*in vivo* ή *in vitro*) παίζει σπουδαίο ρόλο στην επιλογή του είδους των κυττάρων. Το γεγονός αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ιδιαιτερότητας κάθε τύπου κυττάρων, αφού υπάρχουν κυτταρικοί τύποι που αναπαράγονται πιο εύκολα σε *in vitro* συνθήκες (ινοβλάστες), ενώ άλλοι δυσκολότερα (ηπατικά κύτταρα) (Berthiaume et al 2003).

Η πυκνότητα “σποράς” (*seeding density*) των κυττάρων στο φορέα-ικρίωμα αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό παράγοντα στην τρισδιάστατη καλλιέργεια. Η συγκέντρωση σποράς επηρεάζει την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων. Η προσκόλληση κυττάρων στο υπόστρωμα προαπαιτείται της ανάπτυξης και σωστής λειτουργίας τους. Έπειτα από τον ενοφθαλμισμό και την προσκόλληση των κυττάρων, αυτά πολλαπλασιάζονται και αναπτύσσονται σε ένα σταθερό σχήμα. Η τελική μορφολογία των κυττάρων εξαρτάται από την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, από την οξυγόνωση των κυττάρων, από τη σταθερότητα του υποστρώματος και από την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων (Berthiaume et al 2003).

Για την επίτευξη της ανάπτυξης ενός ιστού ή και οργάνου *in vivo*, είναι αναγκαία η αιμάτωση του ικρίωματος, μετά την τοποθέτησή του. Ανεπαρκής αιματική παροχή, δηλαδή μειωμένη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών,

είναι δυνατό να οδηγήσει σε θάνατο των κυττάρων (Rouwkema et al 2008). Η ιστομηχανική θεωρείται μια σημαντική και ταχέως εξελισσόμενη επιστήμη. Βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς τομείς της ιατρικής (Nisbet et al 2008, Melrose et al 2008, Siepe et al 2008, Atak et al 2017). Τα ικριώματα αποτελούν βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη κλινικών εφαρμογών στην ιστομηχανική. Τα μόνιμα ικριώματα όπως τα ικριώματα τιτανίου και τα κεραμικά ικριώματα χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την αναγέννηση ή την επούλωση ενός οργάνου (Berthiaume et al 2003). Μειονέκτημά τους ήταν τόσο η φθορά, όσο και η διάβρωση. Ακόμη, τα κεραμικά εμφυτεύματα χρησιμοποιήθηκαν στην ιστομηχανική, παρόλο που το μέτρο ελαστικότητάς τους είναι πολύ μικρότερο από αυτό του οστού και υστερούσαν σε μηχανικές ιδιότητες (Taboas et al 2003, Bayne 2005, Yarlagadda et al 2005). Τα συνθετικά ικριώματα όπως τα ικριώματα από παράγωγα πολυλακτικού ή πολυγαλακτικού οξέος έχουν χρησιμοποιηθεί για αναγέννηση οστίτη ιστού, αλλά και για ανάπλαση του περιοδοντικού συνδέσμου. Στα ικριώματα πολυλακτι-γαλακτικού οξέος, όταν τοποθετηθούν οστεϊνοβλάστες, φαίνεται να παράγεται νεόπλαστη οστεΐνη και να προάγεται η περιοδοντική αναγέννηση (Jin et al 2003). Τα φυσικά ικριώματα χρησιμοποιούνται σήμερα σε μεγάλο φάσμα κλινικών εφαρμογών: στη διατροφή, στη βιοτεχνολογία, στην ιατρική, στη μικροβιολογία, στη φαρμακευτική και στη γονιδιακή θεραπεία (Prashnanth & Tharanathan 2007). Η χιτίνη και το παράγωγό της χιτοζάνη χρησιμοποιήθηκαν ως ικριώματα φυσικής προέλευσης (Εικόνα 15) (Khor 2002, Rinaudo 2006, Prashnanth & Tharanathan 2007, Ding et al 2014). Τα ικριώματα χιτοζάνης εφαρμόζονται ευρέως στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση (Lee et al 2000, Nisbet et al 2008, Atak et al 2017), αλλά και στην ανάπλαση μαλακών ιστών (χόνδρος, δέρμα). Έχει μελετηθεί, επίσης, και η δυνατότητα ανάπλασης περιοδοντικού ιστού με τη χρήση ικριωμάτων χιτοζάνης (Peng et al 2008).



Εικόνα 15: Μικροφωτογραφίες ικριωμάτων χιτοζάνης ζελατίνης, μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας κυττάρων (μπάρα 100μm) (Θεοχαρίδου 2009)

Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης των ικριωμάτων χιτοζάνης στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση είναι τα εξής:

- αντιβακτηριδιακή φύση
- ελάχιστη αντίδραση ξένου σώματος
- ικανότητα παραγωγής πορωδών δομών
- κυτταρική προσκόλληση και ανάπτυξη
- οστεοκαθοδήγηση
- δομική ομοιότητα με γλυκοζαμινογλυκάνες
- κατασκευή τρισδιάστατων ικριωμάτων τα οποία πληρούν μηχανικές και βιολογικές προδιαγραφές για τη χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές

(Seol et al 2004, Di Martino et al 2005, Tigli et al 2007, Ding et al 2014, Younes & Rinaudo 2015)

ΙΚΡΙΩΜΑ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ/ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ (HAp/CS)

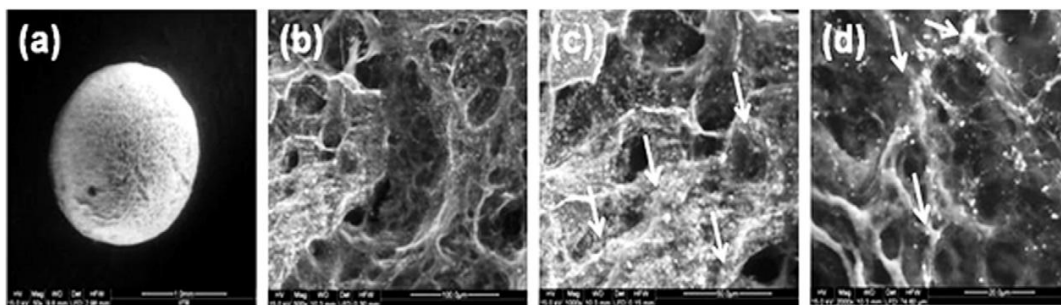
Είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα βιοϋλικά για εφαρμογές οστικών μοσχευμάτων θα πρέπει να διαθέτουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του φυσικού οστού (Bonucci 2000). Επίσης, θα πρέπει να διαθέτουν μία ελεγχόμενη στοιχειώδη πορώδη δομή («ικριώματα», *scaffolds*), η οποία θα επιτρέπει αρχικά την κυτταρική μετανάστευση και ανάπτυξη, και στη συνέχεια τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Tsiourvas et al 2016).

Οι σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες, λοιπόν, κατευθύνονται προς την ανάπτυξη πορωδών τρισδιάστατων ικριωμάτων, ανόργανης και οργανικής φύσης, τα οποία διαθέτουν ιδιότητες οστεοκαθοδήγησης, βιοσυμβατότητας και αιμοσυμβατότητας. Μία ποικιλία από φυσικά πολυμερή βιοϋλικά, όπως ζελατίνη, κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, αλγινικά και χιτοζάνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των ικριωμάτων στην εμβιομηχανική των ιστών (O'Brien 2011, Vlierberghe et al 2011, Ding et al 2014, Atak et al 2017).

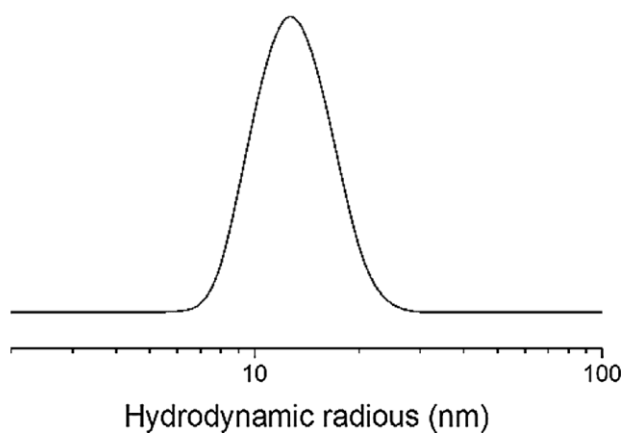
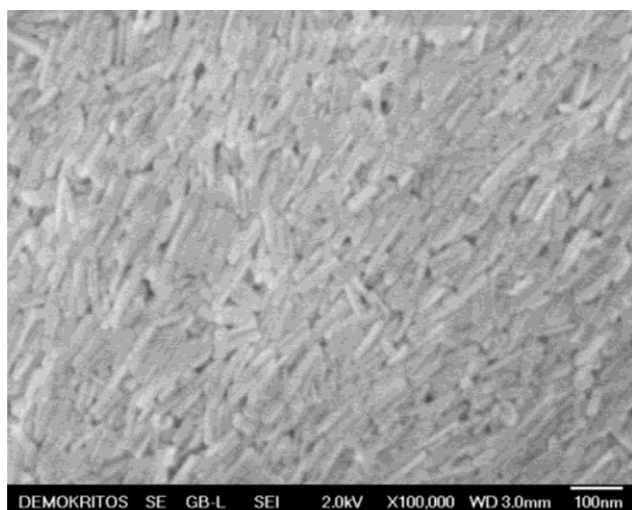
Η χιτοζάνη έχει προκαλέσει ενδιαφέρον στον τομέα της ιατρικής βιοτεχνολογίας λόγω της αντιβακτηριακής της φύσης, της ελάχιστης αντίδρασης ξένου σώματος που προκαλεί και της ικανότητάς της να παράγει πορώδεις δομές κατάλληλες για την κυτταρική ανάπτυξη και οστεοκαθοδήγηση. Παρουσιάζει, επίσης δομική ομοιότητα με τις γλυκοζαμινογλυκάνες και επιτρέπει την ανάπτυξη σύνθετων ικριωμάτων που πληρούν μηχανικές και βιολογικές προδιαγραφές για βιοϊατρικές εφαρμογές (Di Martino et al 2005, Tigli et al 2007, Ding et al 2014). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί η ιδιότητα των σύνθετων ικριωμάτων χιτοζάνης να ενσωματώνουν βιοκεραμικά υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης (Cui et al 2010, Ding et al 2014).

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί το βασικό συστατικό του οστίτη ιστού. Ως εκ τούτου, ο συνθετικός υδροξυαπατίτης είναι ένα εξαιρετικό βιοϋλικό, το οποίο λόγω της βιοσυμβατότητάς του, της μη τοξικής και μη αντιγονικής συμπεριφοράς του έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην έρευνα των σύγχρονων βιοϋλικών και στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (Hench 1998, Bonucci 2000, Blaker et al 2003, Kim & Mendis 2006, Sun & Yang 2015, Atak et al 2017).

Τα σωματίδια του υδροξυαπατίτη πρέπει να έχουν στενή κατανομή μεγέθους μεταξύ των κρυστάλλων τους, μεγάλη ειδική επιφάνεια και υψηλή καθαρότητα (Castro et al 2013) (Εικόνα 16, 17).



Εικόνα 16 Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου της μορφολογίας κριωμάτων νάνο-υδροξυαπατίτη (a), χιτοζάνης (b), ζελατίνης (c) και αλγινικού (d) (Sharma και συν 2016)

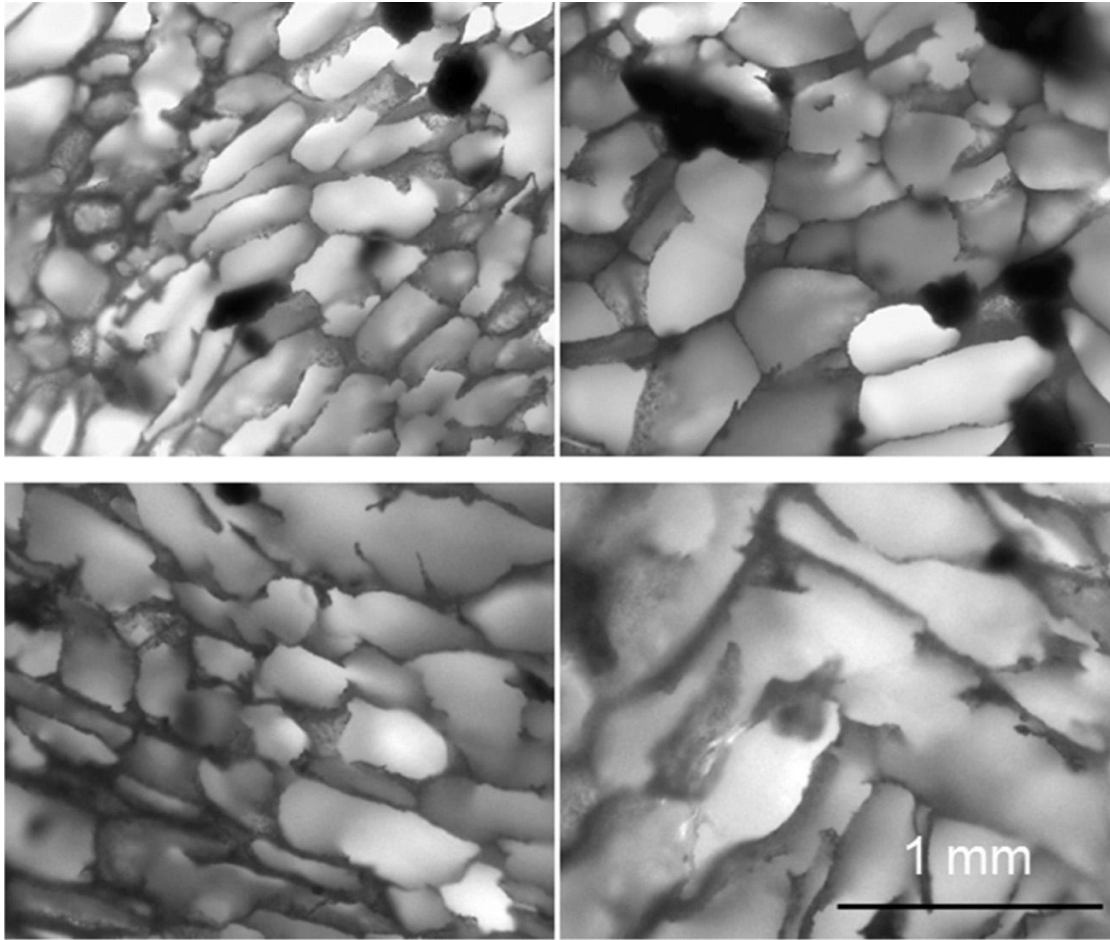


Εικόνα 17: Απεικόνιση κατανομής νανοσωματιδίων Υδροξυαπατίτη (nHAρ), εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM). Μήκος νανοσωματιδίων: 75-105nm, διάμετρος νανοσωματιδίων: 14-18nm. Παρατηρείται πληθυσμός με ομοιογενή κατανομή. (Tsiourvas et al 2016)

Στις σύγχρονες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοσχευματικά υλικά πορώδη ικρίωματα τα οποία αποτελούνται συνήθως από νάνο-υδροξυαπατίτη και χιτοζάνη (Kong et al 2006, Kashiwazaki et al 2009, Thein-Han et al 2009, Sun & Yang 2015, Oryan et al 2017).

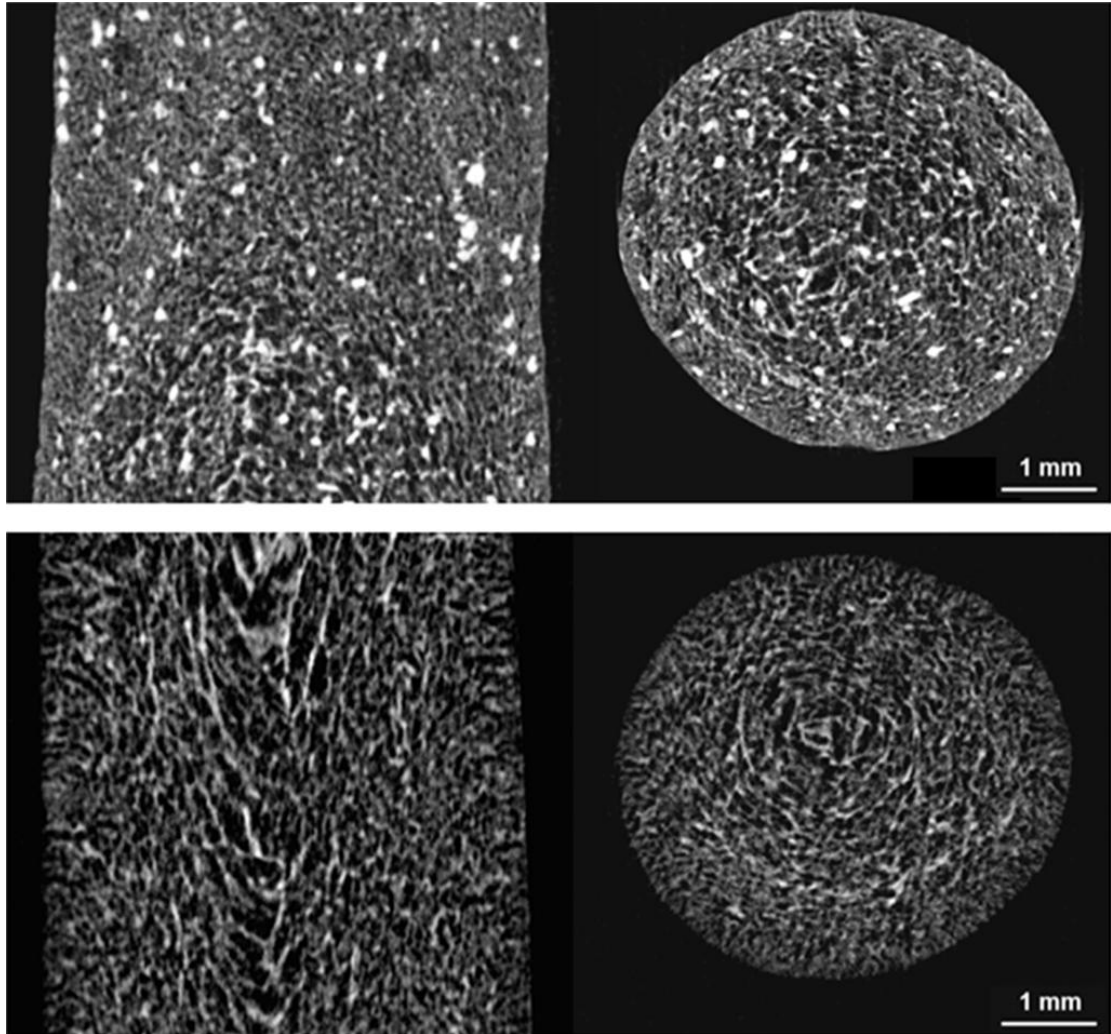
Τα ικρίωματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης παρουσιάζουν βελτιωμένη απόκριση προ-οστεοβλαστών, κυτταρική προσκόλληση, ταχύτερο πολλαπλασιασμό και πολύ καλή κατανομή μέσα στη μορφολογία του βιοϋλικού (Thein-Han et al 2009, Atak et al 2017). Ο nHAp αποτελεί ένα οστεοκαθοδηγητικό και βιοαποικοδομήσιμο βιοϋλικό. Μετά από την τοποθέτηση του nHAp σε ένα οστικό έλλειμμα παρατηρείται βαθμιαία αντικατάσταση του βιοϋλικού από οστίτη ιστό. Ο συνδυασμός βιοπολυμερών υλικών, όπως η χιτοζάνη, με το nHAp έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση των φυσικομηχανικών ιδιοτήτων του nHAp (Nath et al 2009, Sun & Yang 2015).

Έχει διεξαχθεί επίσης συγκριτική μελέτη, η οποία διερευνά τα ικρίωματα μικρο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης σε σχέση με τα ικρίωματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης. Ο συνολικός όγκος, η συνολική οστική πυκνότητα και η οστική επιφάνεια βρέθηκαν να είναι υψηλότερα στα ικρίωματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης σε σχέση με τα ικρίωματα μικρο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης, υποδηλώνοντας τα πλεονεκτήματα του πρώτου βιοϋλικού (Lee et al 2014) (Εικόνα 18, 19, 20).



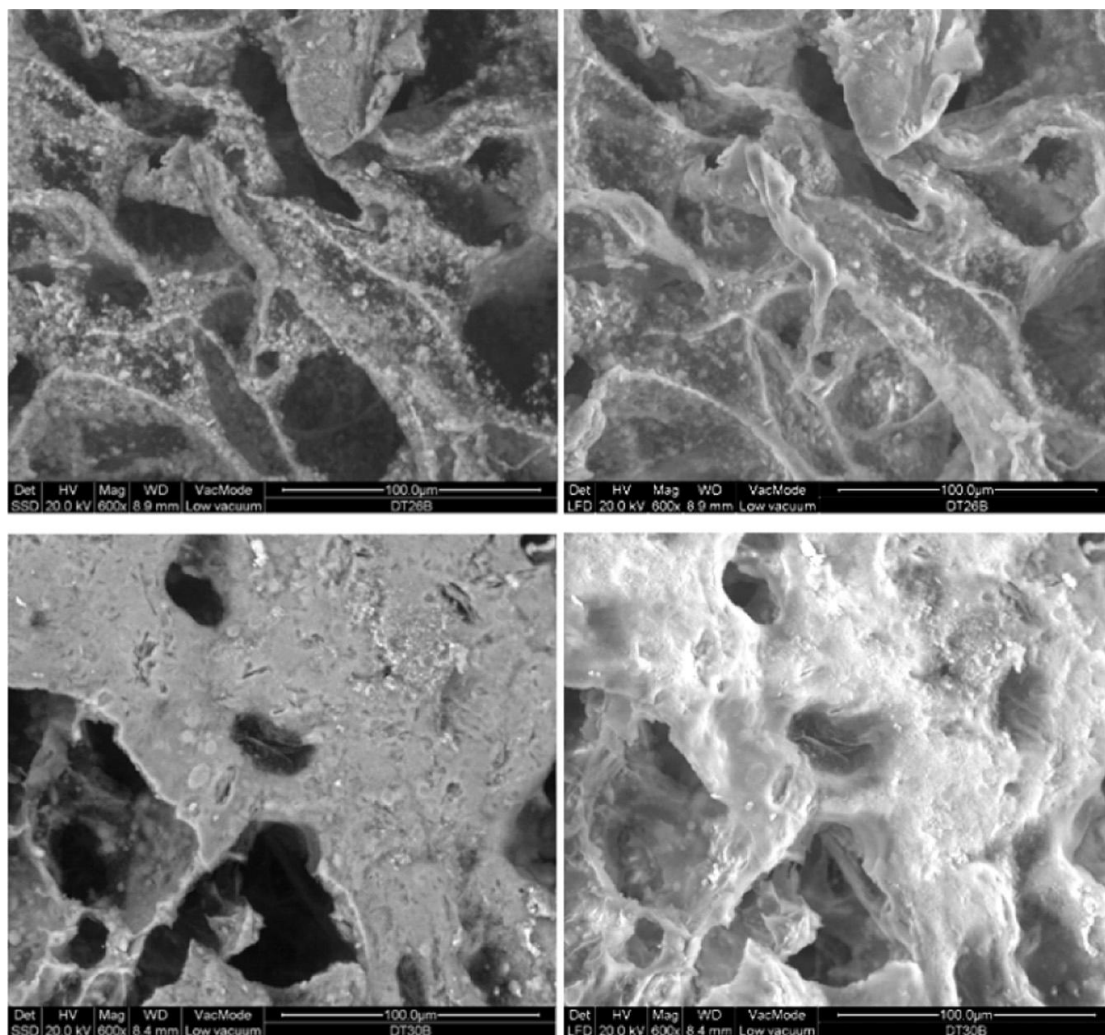
Εικόνα 18: Απεικόνιση οπτικού μικροσκοπίου ικριωμάτων Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης.

- Στην άνω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα μικρο-Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης (mHAp/CS): συσσωματωμένα σωματίδια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και απεικονίζονται ως σκοτεινές κηλίδες.
- Στην κάτω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης (nHAp/CS): παρατηρείται άριστη διασπορά των νανοσωματιδίων του Υδροξυαπατίτη. (Tsiourvas et al 2016)



Εικόνα 19: Απεικόνιση μCT ικριωμάτων Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης.

- Στην άνω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα μικρο-Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης (mHAp/CS): συσσωματωμένα σωματίδια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και απεικονίζονται ως έντονα λευκά στίγματα-ακτινοσκοιερές περιοχές.
- Στην κάτω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτιτοζάνης (nHAp/CS): παρατηρείται άριστη διασπορά των νανοσωματιδίων του Υδροξυαπατίτη και ομοιογενής ανάμειξη των nHAp με τη CS. (Tsiourvas et al 2016)



Εικόνα 20: Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ικριωμάτων Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης.

- Στην άνω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα μικρο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (mHAp/CS): παρατηρούνται μεγάλα σωματίδια HAρ.
- Στην κάτω εικόνα απεικονίζονται τα ικριώματα νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nHAp/CS): παρατηρείται άριστη διασπορά των νανοσωματιδίων του Υδροξυαπατίτη. (Tsiourvas et al 2016)

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διερευνηθεί η βιολογική συμπεριφορά του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) 80/20 w/w σε επίμυες (Kashiwazaki et al 2009, Organ et al 2017). Παρατηρήθηκε, εντούτοις, ότι όταν η συγκέντρωση του υδροξυαπατίτη υπερβαίνει το 80% τα δημιουργούμενα ικριώματα παρουσίαζαν μειωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες όπως για παράδειγμα μειωμένη αντοχή στη θραύση (Tsiourvas et al 2016). Με βάση τη μελέτη του Tsiourvas et al 2016 η προτεινόμενη αναλογία του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) είναι 75/25

w/w, παρέχοντας στα δημιουργούμενα ικρίσματα βελτιωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διερευνηθεί το βέλτιστο μέγεθος πόρου για εσωτερική ανάπτυξη οστίτη ιστού εντός πορωδών ικριωμάτων. Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στα 100-400 μm (Bobyg et al 1980, Cook et al 1985, Whang et al 1999, Itala et al 2001, Liao et al 2010, Otsuki et al 2006, Atak et al 2017).

Με βάση τη μελέτη του Tsiourvas et al 2016 το προτεινόμενο μέγεθος πόρου σε διαστάσεις εγκάρσιας διατομής πόρων έχει εύρος 200-700 μm , παρέχοντας στα δημιουργούμενα ικρίσματα βελτιωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες. Στη μελέτη αυτή επίσης, παρουσιάζονται βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, βελτιωμένη αντοχή στη θλίψη των ικριωμάτων nHAp/CS σε σχέση με αυτά mHAp/CS. Παρατηρούνται επίσης βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες στα ικρίσματα με βάση την N-ακετυλιωμένη CS σε σχέση με τα ικρίσματα που αποτελούνταν από CS. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ικανότητα της χιτίνης να σχηματίζει ένα εκτεταμένο δίκτυο μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων του πολυμερούς, λόγω της παρουσίας πλευρικών ομάδων αμιδίου (αμινομάδων) που προσδίδει στο πολυμερές πλέγμα αυξημένη αντοχή (Tsiourvas et al 2016).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα οστικά ελλείμματα στις γνάθους ασθενών αποτελούν περιοριστικό παράγοντα στην επιεμφυτευματική αποκατάσταση μερικής ή ολικής νωδότητας. Με την κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη γίνεται προσπάθεια να δοθούν λύσεις σε προβλήματα οστικών ελλειμμάτων στις γνάθους είτε με την τοποθέτηση μεμβρανών είτε με την προσθήκη διάφορων μοσχευματικών υλικών. Η υπόθεση της μελέτης αυτής είναι ότι η προσθήκη του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης 75/25 w/w σε κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων μπορεί να επιδράσει θετικά στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη, προάγοντας τη δημιουργία νεοσχηματισθέντος οστού.

Η πειραματική μελέτη αυτή έχει σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης 75/25 w/w στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη κρανιακών οστικών ελλειμμάτων επίμυων. Ο προσδιορισμός της επίδρασης του βιοϋλικού στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη θα γίνει με ανάλυση Κωνικής Δέσμης Υπολογιστικής Τομογραφίας (Cone Beam Computed Tomography, CBCT) και με ιστομορφομετρική ανάλυση στις περιοχές των κρανιακών οστικών ελλειμμάτων σε τρεις διαφορετικούς χρόνους ελέγχου (2, 4 και 8 εβδομάδες).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 36 ενήλικοι επίμυες Sprague Dawley, 18 άρρενες και 18 θήλεις ηλικίας 3 μηνών περίπου, με μέση τιμή βάρους 250g από το Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, στο οποίο υπάρχει οίκος πειραματόζωων με σταθερές συνθήκες θέρμανσης, αερισμού και σχετικής υγρασίας, καθημερινή παρακολούθηση της υγείας των ζώων από εξειδικευμένο κτηνίατρο καθώς επίσης και καθημερινή φροντίδα και διατροφή από εξειδικευμένο ζωοκόμο.

Το μέγεθος του δείγματος ελαχιστοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της "Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experimental Guidelines (ARRIVE)" (Kilkenny et al 2010). Το μέγεθος του δείγματος εκτιμήθηκε με ανάλυση ισχύος (Power $1-\beta$ err prob = 0,6949), με τη χρήση στατιστικής δοκιμασίας one-way ANOVA Fixed effects (IBM SPSS 25.0, IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Η εισαγωγή του φύλου ως μεταβλητής πραγματοποιήθηκε προκειμένου να περιοριστεί η χρήση μόνο αρσενικών αρουραίων σε πειραματικές μελέτες. Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με το National Institute of Health (NIH, NOT-OD-15-102) (Chatzipetros et al 2018). Οι επίμυες γενικότερα και ειδικότερα οι επίμυες Sprague Dawley έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τη μελέτη της γναθοπροσωπικής περιοχής και υπάρχουν τεκμηριωμένα δεδομένα όσον αφορά στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (Kim et al 2014, He et al 2015, Gao et al 2018). Ο αριθμός των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο αμέσως μεγαλύτερος από το μικρότερο δυνατό και παράλληλα επαρκής για να προκύψουν στατιστικώς αξιόπιστα αποτελέσματα (Kim et al 2014). Αυτή η πειραματική μελέτη εγκρίθηκε από τη Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής και Κτηνιατρικής της Διεύθυνσης Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφαρμογών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Βερανζέρου 46, 10438, Αθήνα), από τη Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Κεντρικού Τομέα Αθηνών (Συγγρού 80-88, 11741, Αθήνα), από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν. Σ. Χρηστέας» (Αγίου Θωμά 15B, 11527, Αθήνα) και από

την Επιτροπή Παρακολούθησης και Γνωμοδότησης για την Ευζωία των Ζώων του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν. Σ. Χρηστέας» (Αγίου Θωμά 15B, 11527, Αθήνα) με αριθμό πρωτοκόλλου 1181 / 2-03-2017 και κωδικό καταχώρησης EL 25 BIO 05, Αθήνα, Ελλάδα. Το πρωτόκολλο της μελέτης ήταν σύμφωνο με την οδηγία 2010/63/ΕΕ της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με βάση την εφαρμογή της Συνθήκης των 3R (Αντικατάσταση-Replacement, Μείωση-Reduction, Βελτίωση-Refinement) (Russell & Burch 1959). Το πρωτόκολλο της μελέτης ήταν επίσης σύμφωνο με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες “ARRIVE” (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experimental guidelines).

Πριν από την έναρξη της πειραματικής μελέτης πραγματοποιήθηκε μία πιλοτική μελέτη με την ίδια μεθοδολογία σε 6 επίμυες (3 αρσενικά και 3 θηλυκά), προκειμένου να διαπιστωθεί η βιοσυμβατότητα του βιοϋλικού και να γίνει μία πρόωμη ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση (Chatzipetros et al 2018).

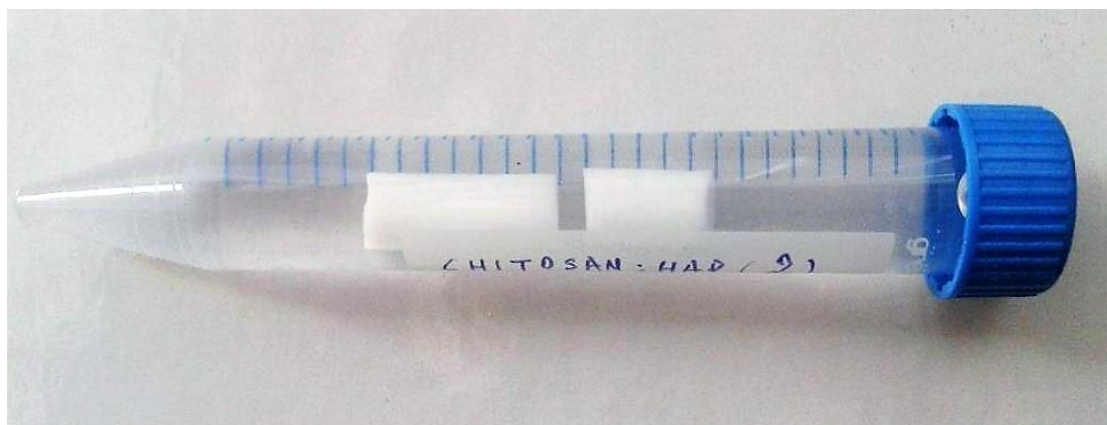
ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για όλα τα πειραματόζωα υπήρξε προεγχειρητική περίοδος προετοιμασίας 60 ημερών ώστε να πραγματοποιηθούν όλες οι τυπικές εξετάσεις ελέγχου της υγείας τους. Ειδικότερα, κάθε πειραματόζωο υποβλήθηκε σε λεπτομερή κλινική εξέταση και σε πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο πριν τη χρησιμοποίησή του. Από τις εξετάσεις αυτές διαπιστώθηκε η καλή κατάσταση της υγείας των ζώων και τα φυσιολογικά επίπεδα των έμμορφων συστατικών του αίματός τους. Όλα τα πειραματόζωα διατράφηκαν με ξηρή τροφή και διατηρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες υγιεινής σε ειδικούς κλωβούς (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Σταθερές συνθήκες διατροφής και διαβίωσης των επίμυων μέσα σε ειδικούς κλωβούς.

Η παραλαβή του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης με αναλογία 75:25 w/w σε σύσταση ικρίωματος, διαμέτρου 5mm και πάχους 1mm, κατάλληλο για χρήση ως μοσχευματικό υλικό έγινε από το Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε αποστειρωμένες συσκευασίες (Εικόνα 22).



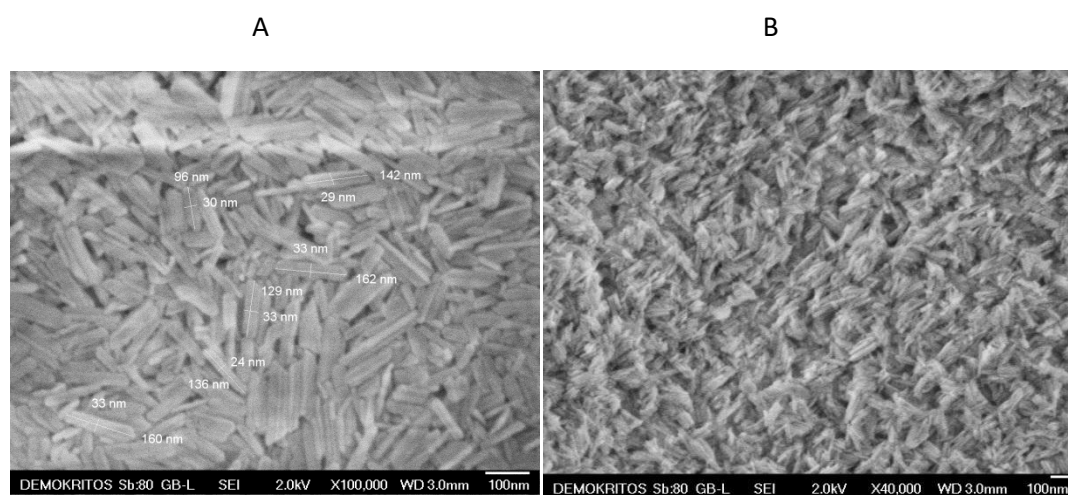
Εικόνα 22. Κυλινδρικά πορώδη ικρίωματα nHAp:CS (εξωτερικής διαμέτρου 5 mm). Τα ικρίωματα αποστειρώθηκαν με αιθανόλη και εκπλύθηκαν επιμελώς με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline).

Παρασκευή σύνθετων ικριωμάτων νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nHAp/CS)

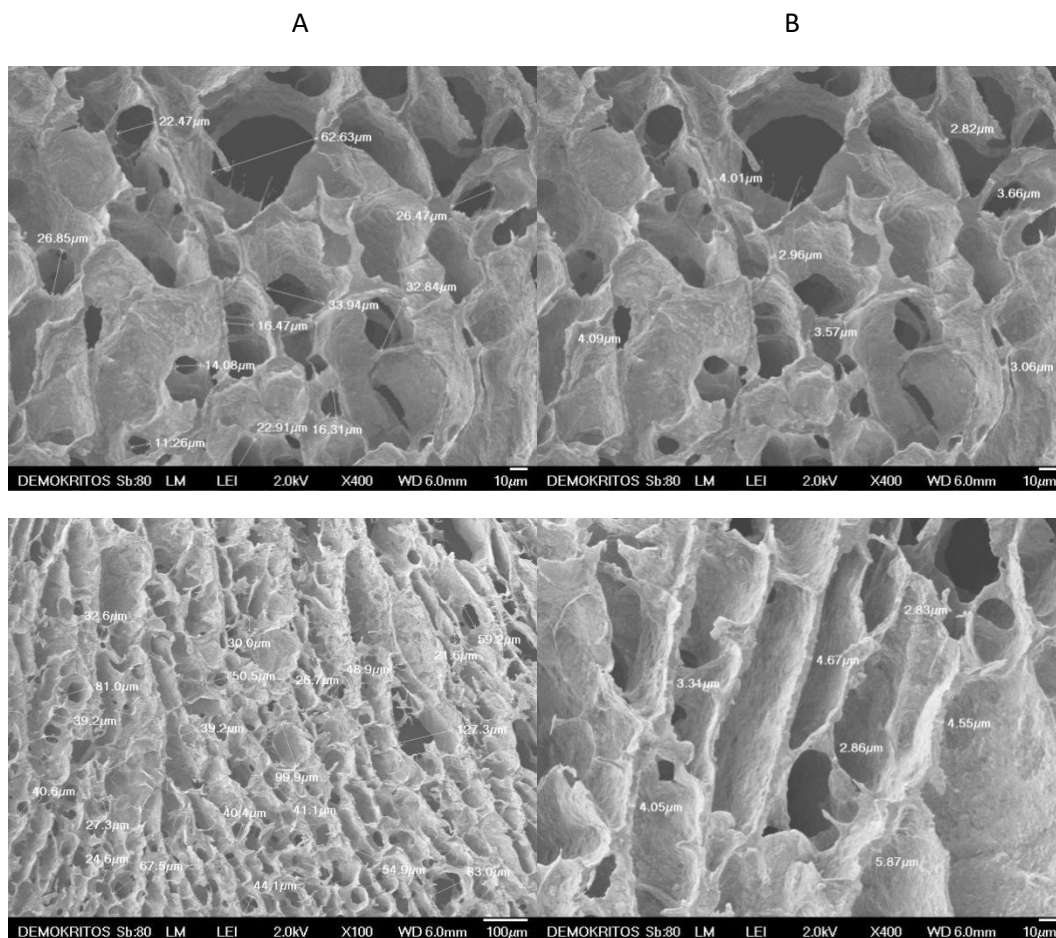
Τα νανοσωματίδια του υδροξυαπατίτη (nHAp) συντέθηκαν σύμφωνα με προηγούμενη εργασία (Tsiourvas et al 2011) παρουσία υπερ-διακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (polyethyleneimine, Lupasol G100, BASF, Greece) για τη ρύθμιση του μεγέθους και της μορφολογίας των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν σύνθετα πορώδη ικρίωματα (Tsiourvas 2016) με την προσθήκη σε ένα διάλυμα 3% w/w χιτοζάνης (CS, Aldrich, highmolecularweight, deacetylationdegree ≥ 75 %) νανοσωματιδίων nHAp σε τελική αναλογία βάρους HAρ:CS 75:25. Το προκύπτον πυκνό εναιώρημα αναμίχθηκε επιμελώς και χυτεύθηκε σε υάλινους σωλήνες (εσωτερικής διαμέτρου 5 mm) οι οποίοι στη συνέχεια καταψύχθηκαν στους -25 °C και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης. Μετά την λυοφιλίωση, τα κυλινδρικά πορώδη ικρίωματα HAρ:CS (εξωτερικής διαμέτρου 5 mm) κόπηκαν σε δίσκους πάχους 1 mm, αποστειρώθηκαν με αιθανόλη και εκπλύθηκαν επιμελώς με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα

φωσφορικών (phosphatebuffersaline). Το πορώδες και ο συνολικός όγκος των πόρων βρέθηκαν να είναι $85 \pm 2\%$ και $5,0 \pm 0,5$ mL/g, αντιστοίχως, όπως καθορίστηκαν με προσδιορισμό του όγκου υγρού που εγχύθηκε στους πόρους των ξηρών ικριωμάτων (Kuo & Tsai 2010).

Η ικανότητα διασποράς του nHAP στη μήτρα χιτοζάνης όπως επίσης και η μορφολογία, το μέγεθος και το σχήμα των υποστρωμάτων διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εκπομπής πεδίου (JSM 7401F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με λειτουργία Gentle Beam. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23A (Εικόνα 23A), τα νανοσωματίδια nHAP είναι ράβδοι επιμήκους μορφής με διάμετρο 20-40nm και μήκος περίπου 80 έως 160 nm. Οι μικροφωτογραφίες SEM υψηλής ανάλυσης των ικριωμάτων αποκαλύπτουν την εξαιρετική διασπορά τους στη μήτρα CS (Εικόνα 23B) και την απουσία συσσωματωμάτων. Εικόνες SEM της πορώδους δομής του ικριώματος nHAP:CS (Εικόνα 24A) αποκαλύπτουν την παρουσία πόρων με διαστάσεις που κυμαίνονται κυρίως μεταξύ 20-100 μm και, επίσης, επιτρέπουν τον προσδιορισμό του πάχους του τοιχώματος των πόρων υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης που ευρίσκεται μεταξύ 3-4 μm (Εικόνα 24B).



Εικόνα 23. Εικόνες SEM των νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη (nHAP) είτε σε μορφή κόνεως (A) είτε μετά την ενσωμάτωσή τους στη μήτρα χιτοζάνης των ικριωμάτων nHAP:CS (B).



Εικόνα 24. Εικόνες SEM των ικριωμάτων nHAP:CS που δείχνουν (στήλη A) το σχήμα και το μέγεθος των πόρων και (στήλη B) το πάχος του τοιχώματος των πόρων.

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Χρησιμοποιήθηκαν 36 επίμους Sprague Dawley, 18 αρρενες και 18 θήλεις από το Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, ηλικίας 3 μηνών περίπου, με μέση τιμή βάρους 250g (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Sprague Dawley επίμους, ηλικίας 3 μηνών περίπου, με μέση τιμή βάρους 250g.

Η γενική αναισθησία των ζώων περιελάμβανε ενδομυϊκή χορήγηση ξυλαζίνης (xylazine 5mg/kg, Rompun, Bayer Animal Health, Leverkusen, Germany) και κεταμίνης (ketamine hydrochloride 100mg/Vkg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) (Εικόνες 26, 27).

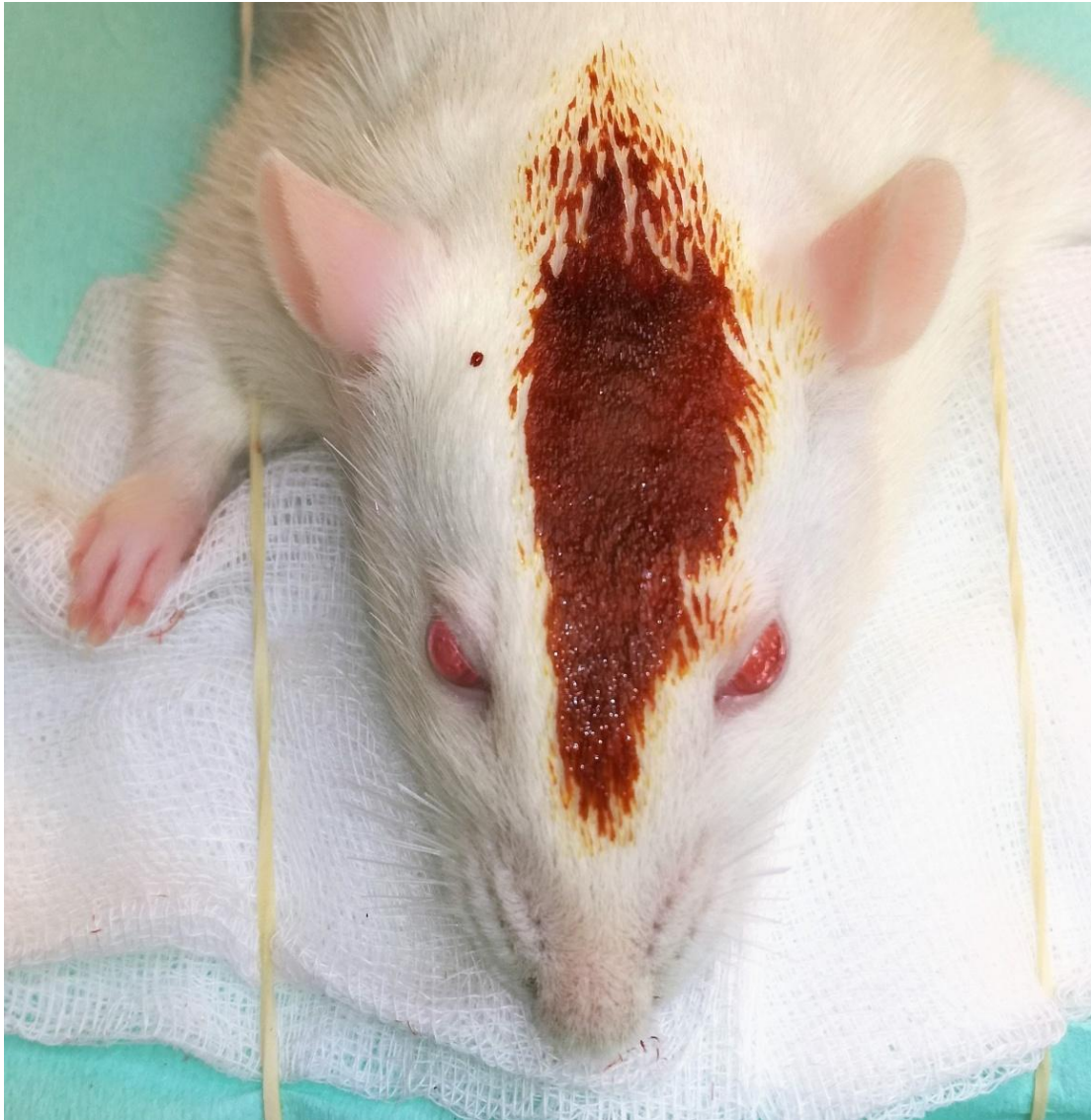


Εικόνα 26. Ενέσιμο διάλυμα ξυλαζίνης (xylazine 5mg/kg, Rompun, Bayer Animal Health, Leverkusen, Germany) και κεταμίνης (ketamine hydrochloride 100mg/Vkg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France)



Εικόνα 27. Η γενική αναισθησία των ζώων περιελάμβανε ενδομυϊκή χορήγηση ξυλαζίνης και κεταμίνης.

Μετά από ξύρισμα και απολύμανση του τριχωτού της κεφαλής με ιωδιούχο ποβιδόνη (Betadine Solution, Lavipharm, Athens, Greece) (Εικόνα 28) πραγματοποιήθηκε επιμήκης τομή ολικού πάχους και μήκους δύο εκατοστών περίπου, αντίστοιχα με τη μέση οβελιαία ραφή του κρανιακού θόλου (Εικόνα 29).

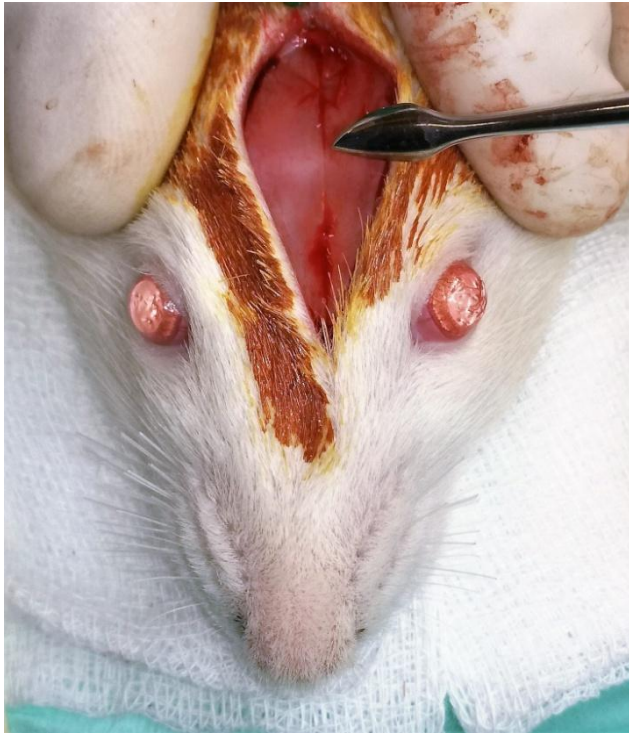


Εικόνα 28. Απολύμανση του τριχωτού της κεφαλής με ιωδιούχο ποβιδόνη.

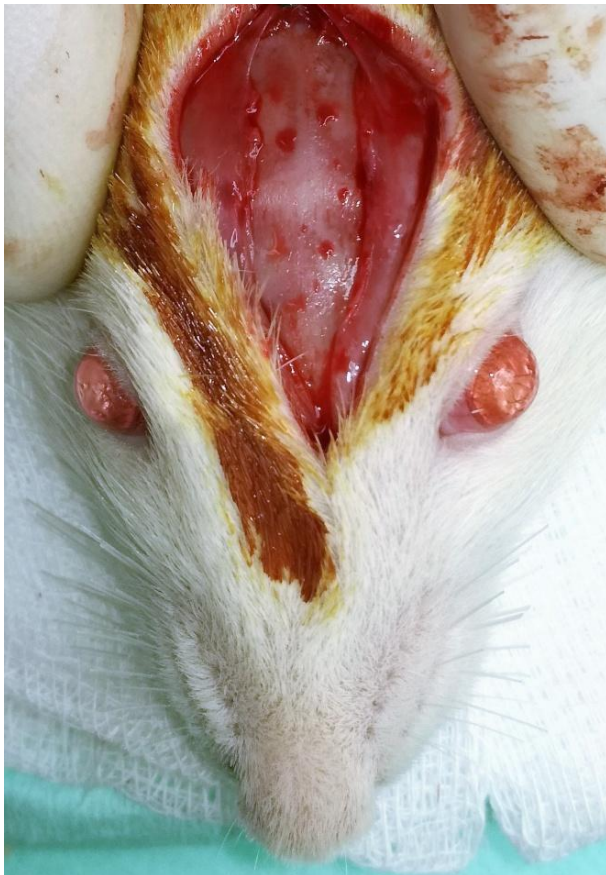


Εικόνα 29. Επιμήκης τομή ολικού πάχους και μήκους δύο εκατοστών περίπου, αντίστοιχα με τη μέση οβελιαία ραφή του κρανιακού θόλου.

Έπειτα, ακολούθησε η αποκόλληση του δέρματος (Εικόνα 30) και του περιostίου και η αποκάλυψη των βρεγματικών οστών του κρανίου (Εικόνα 31) (Kim et al 2014, Καπαρού 2016, Kim et al 2016).



Εικόνα 30. Αποκόλληση του δέρματος του τριχωτού της κεφαλής.

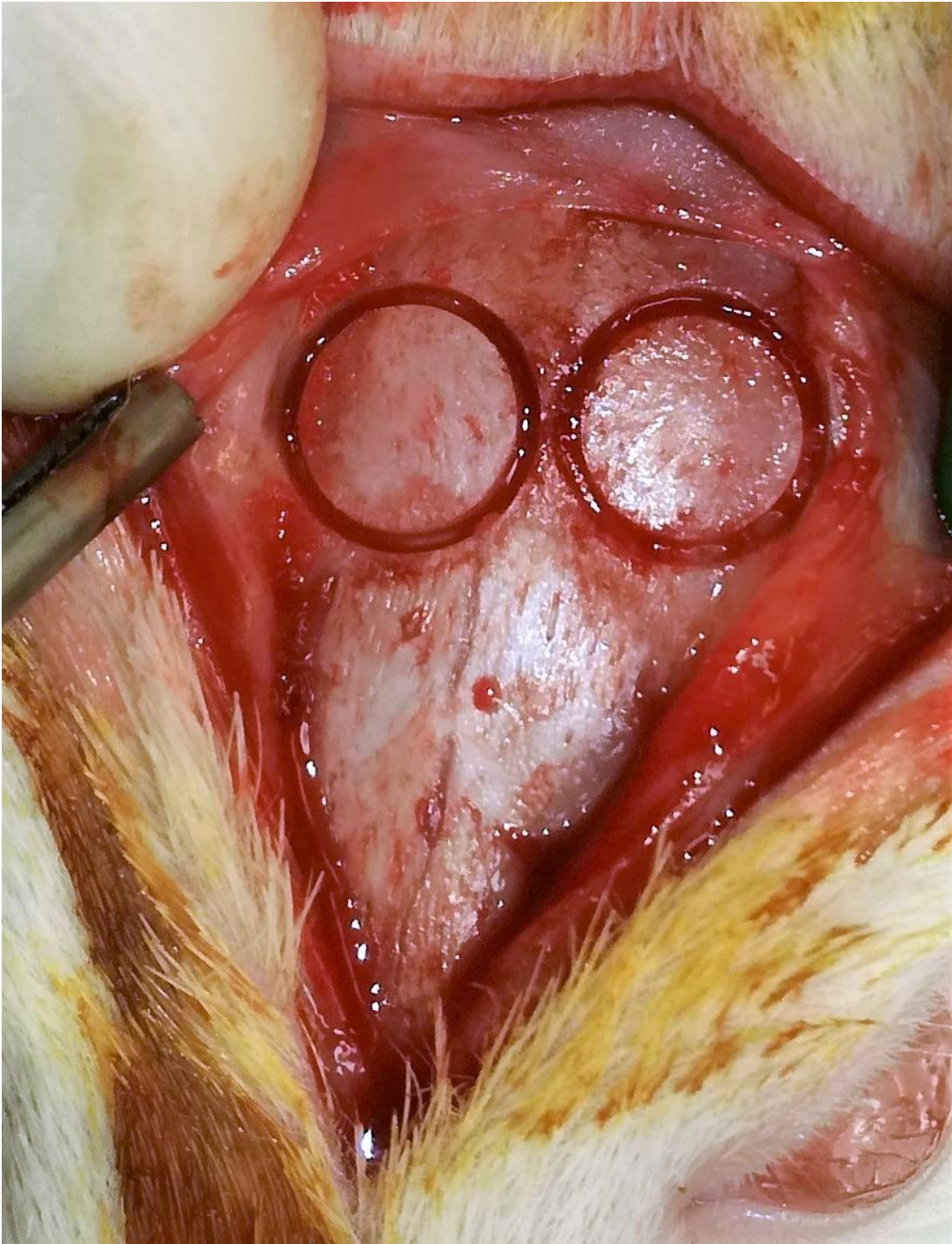


Εικόνα 31. Αποκόλληση του περιostίου και αποκάλυψη των βρεγματικών οστών του κρανίου

Με τη χρήση χειρουργικής φρέζας trephine διαμέτρου 5mm (MT-00500, MIS, Savion, Israel) (Εικόνα 32) σε χειρουργικό τροχό χαμηλών ταχυτήτων (Implantmed, W&H, Bürmoos, Austria) και κάτω από συνεχή καταιονισμό φυσιολογικού ορού (Sodium Chloride 0.9% Intravenous Infusion, BIOSER, Greece) διενεργήθηκαν 2 τυποποιημένα κυκλικά κρανιακά οστικά ελλείμματα διαμέτρου 5mm στα βρεγματικά οστά του κρανίου, εκατέρωθεν της μέσης οβελιαίας ραφής (Εικόνα 33) (Kim et al 2014, Kim et al 2016). Η χειρουργική φρέζα έπρεπε να είναι διαμέτρου 5mm, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σωστή εφαρμογή του τυποποιημένου ικρίωματος διαμέτρου 5mm και πάχους 1mm (Εικόνα 37).

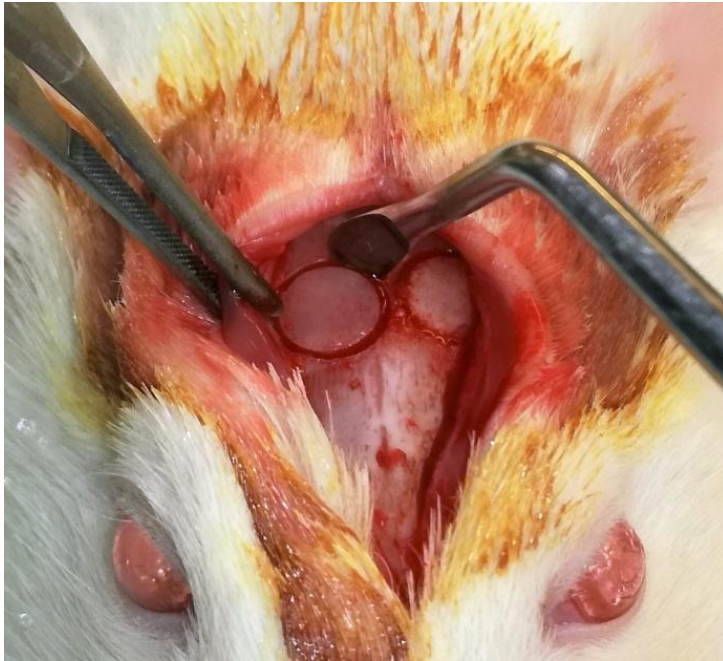


Εικόνα 32. Χειρουργική φρέζα trephine διαμέτρου 5mm.



Εικόνα 33. Τρυπανισμός των 2 τυποποιημένων κυκλικών κρανιακών οστικών ελλειμμάτων διαμέτρου 5mm στα βρεγματικά οστά του κρανίου, εκατέρωθεν της μέσης οβελιαίας ραφής.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε τα τυποποιημένα οστικά ελλείματα να έχουν βάθος 1mm, χωρίς όμως να θιγούν η σκληρά μήνιγγα του εγκεφάλου και η μέση οβελιαία ραφή του κρανίου (Kim et al 2014, Καπαρού 2016, Kim et al 2016) (Εικόνες 34, 35, 36).



Εικόνα 34. Αφαίρεση του κυκλικού τμήματος του δεξιού βρεγματικού οστού με κοχλιάριο.



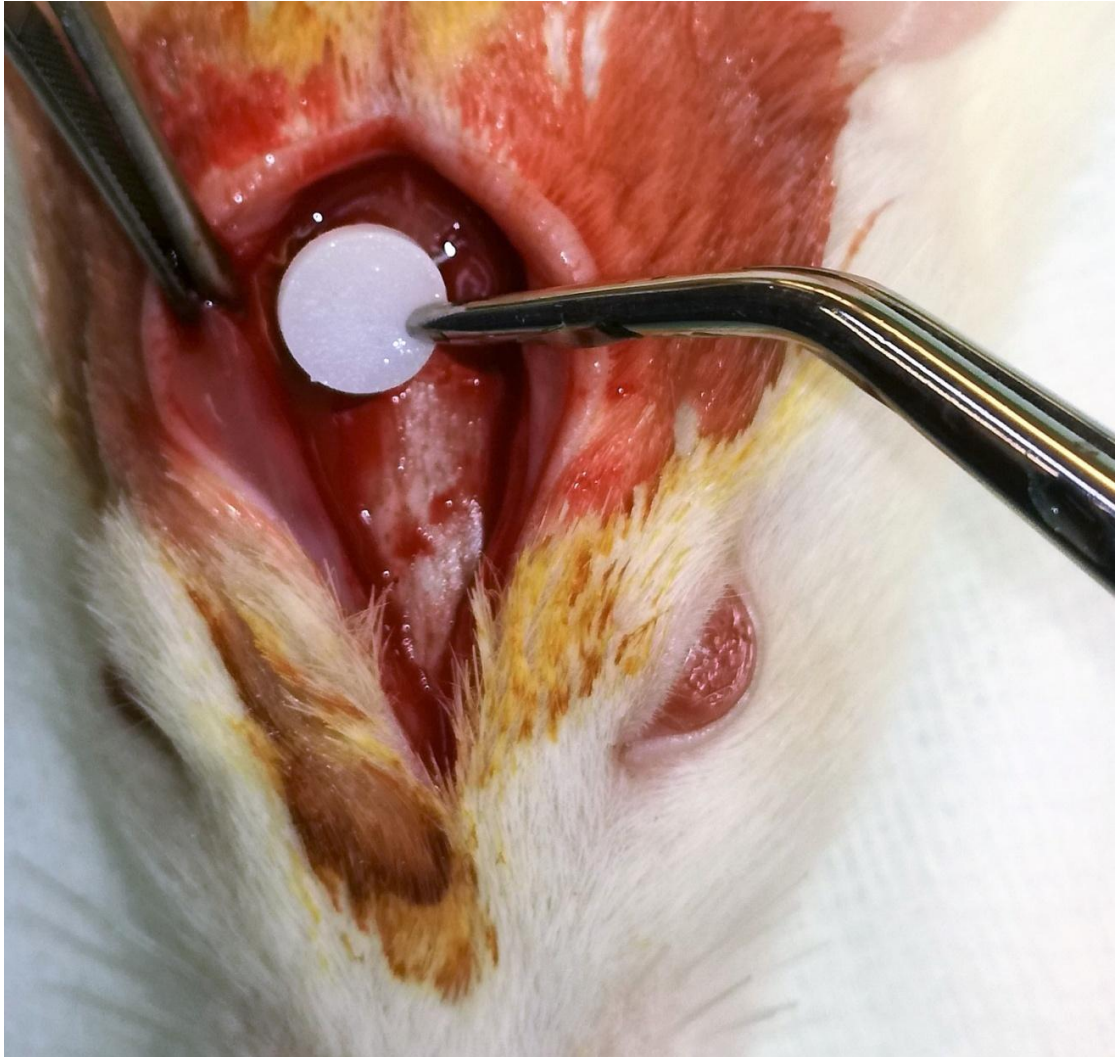
Εικόνα 35. Αφαίρεση του κυκλικού τμήματος του αριστερού βρεγματικού οστού με κοχλιάριο.



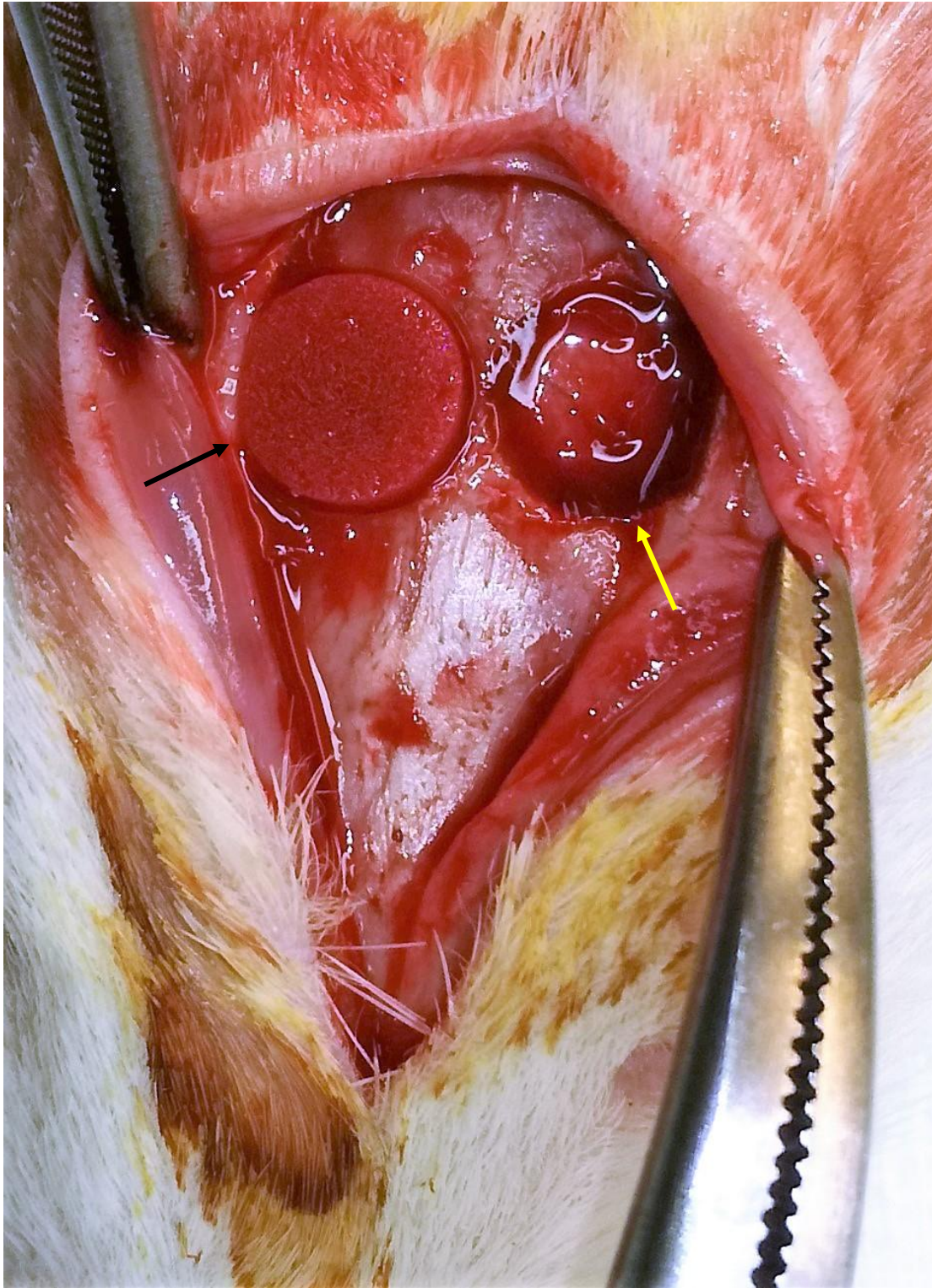
Εικόνα 36. Δημιουργία των 2 τυποποιημένων κυκλικών οστικών ελλειμμάτων 5mm. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε τα τυποποιημένα οστικά ελλείματα να έχουν βάθος 1mm, χωρίς όμως να θιγούν η σκληρά μήνιγγα του εγκεφάλου και η μέση οβελιαία ραφή του κρανίου.

Τα 2 κρανιακά οστικά ελλείματα που προκλήθηκαν σε κάθε κεφαλή αποτέλεσαν και τις ομάδες μελέτης, οι οποίες ήταν οι εξής: (i) Ομάδα A: ομάδα ελέγχου στο αριστερό βρεγματικό οστούν, όπου στο κρανιακό έλλειμμα δεν τοποθετήθηκε βιοϋλικό, (ii) Ομάδα B: πειραματική ομάδα στο δεξιό βρεγματικό οστούν, όπου στο

κρανιακό έλλειμμα τοποθετήθηκε βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης 75/25 w/w. Το βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης έχει αναλογία 75:25 w/w με σύσταση ικρίωματος, κατάλληλο για χρήση ως μοσχευματικό υλικό (Εικόνες 37, 38).

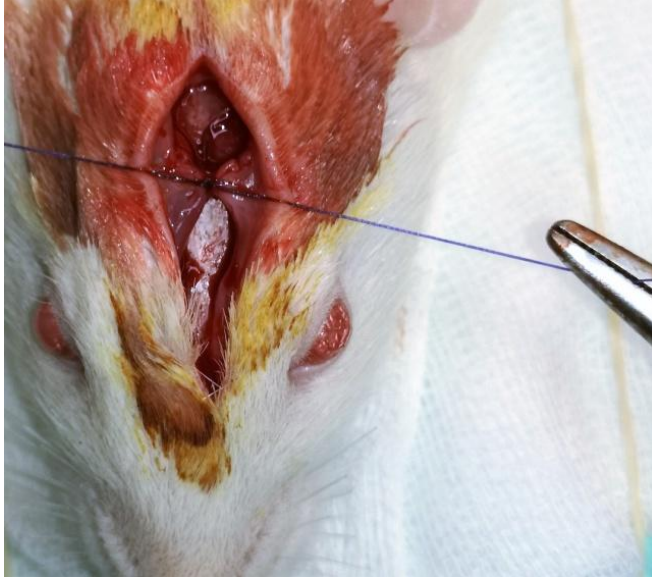


Εικόνα 37. Τοποθέτηση του ικρίωματος νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης στο δεξιό τυποποιημένο κυκλικό οστικό έλλειμμα.

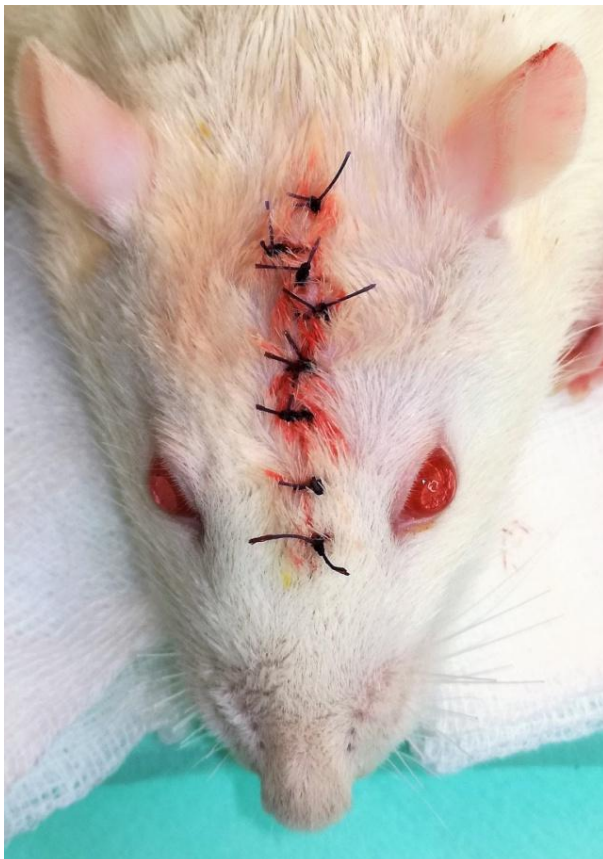


Εικόνα 38. Τα 2 κρανιακά οστικά ελλείμματα που προκλήθηκαν σε κάθε κεφαλή αποτέλεσαν και τις ομάδες μελέτης: (i) Ομάδα A: ομάδα ελέγχου στο αριστερό βρεγματικό οστόν, όπου στο κρανιακό έλλειμμα δεν τοποθετήθηκε βιοϋλικό (κίτρινο βέλος), (ii) Ομάδα B: πειραματική ομάδα στο δεξιό βρεγματικό οστόν, όπου στο κρανιακό έλλειμμα τοποθετήθηκε βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nHAp/CS) 75/25 w/w (μαύρο βέλος).

Η συρραφή του τραύματος πραγματοποιήθηκε κατά στρώματα με απορροφήσιμα ράμματα πολύ-γλυκολικού οξέος (poly-glycolic acid, PGA) μεγέθους 3-0 910 (Coated VICRYL, Ethicon, Johnson&Johnson, USA) (Εικόνες 39, 40).



Εικόνα 39. Συρραφή του περιοστέου.



Εικόνα 40. Συρραφή του δέρματος του τριχωτού της κεφαλής.

Το μετεγχειρητικό στάδιο περιελάμβανε αντιμικροβιακή αγωγή με ενροφλοξασίνη (enrofloxacin 2,5mg/kg, Baytril 5%, Bayer Animal Health GmbH D-51368, Leverkusen, Germany) και αναλγητική-αντιφλεγμονώδη αγωγή με καπροφένη (carprofen, Rimadyl, Pfizer, USA) μία φορά ημερησίως για 5 ημέρες (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Κλινική εικόνα των επίμυων κατά το στάδιο της ανάνηψης.

Κατά το μετεγχειρητικό στάδιο παρακολούθησης δύο θηλυκοί επίμυες απεβίωσαν 7 ημέρες μετά από στη χειρουργική διαδικασία. Συνεπώς, ο τελικός αριθμός των πειραματόζων που μελετήθηκαν ήταν 34 επίμυες (18 αρσενικοί, 16 θηλυκοί).

Μετά τη χειρουργική επέμβαση προκλήθηκε ευθανασία με εισπνεόμενο αιθέρα (diethyl ether, Sigma Aldrich, USA) σε 12 πειραματόζωα (6 αρσενικά, 6 θηλυκά) 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία, σε 11 πειραματόζωα (6 αρσενικά, 5 θηλυκά) 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία και σε 11 πειραματόζωα (6 αρσενικά, 5 θηλυκά) 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία (Εικόνα 42).



Εικόνα 42. Ευθανασία με εισπνεόμενο αιθέρα (diethyl ether, Sigma Aldrich, USA), 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία.

Οι κεφαλές των επίμυων αποκόπηκαν κατάλληλα με δύο οριζόντιες και δύο κάθετες οστεοτομίες με χειρουργική φρέζα (Εικόνες 43, 44) έτσι ώστε τα ιστοτεμάχια (διαστάσεων 15x2x10mm) περιφερικά να περιλαμβάνουν τμήματα του βρεγματικού, ινιακού και μετωπιαίου οστού του κρανιακού θόλου και κεντρικά να περιλαμβάνουν τα δύο τυποποιημένα κυκλικά οστικά ελλείμματα (Εικόνα 45).



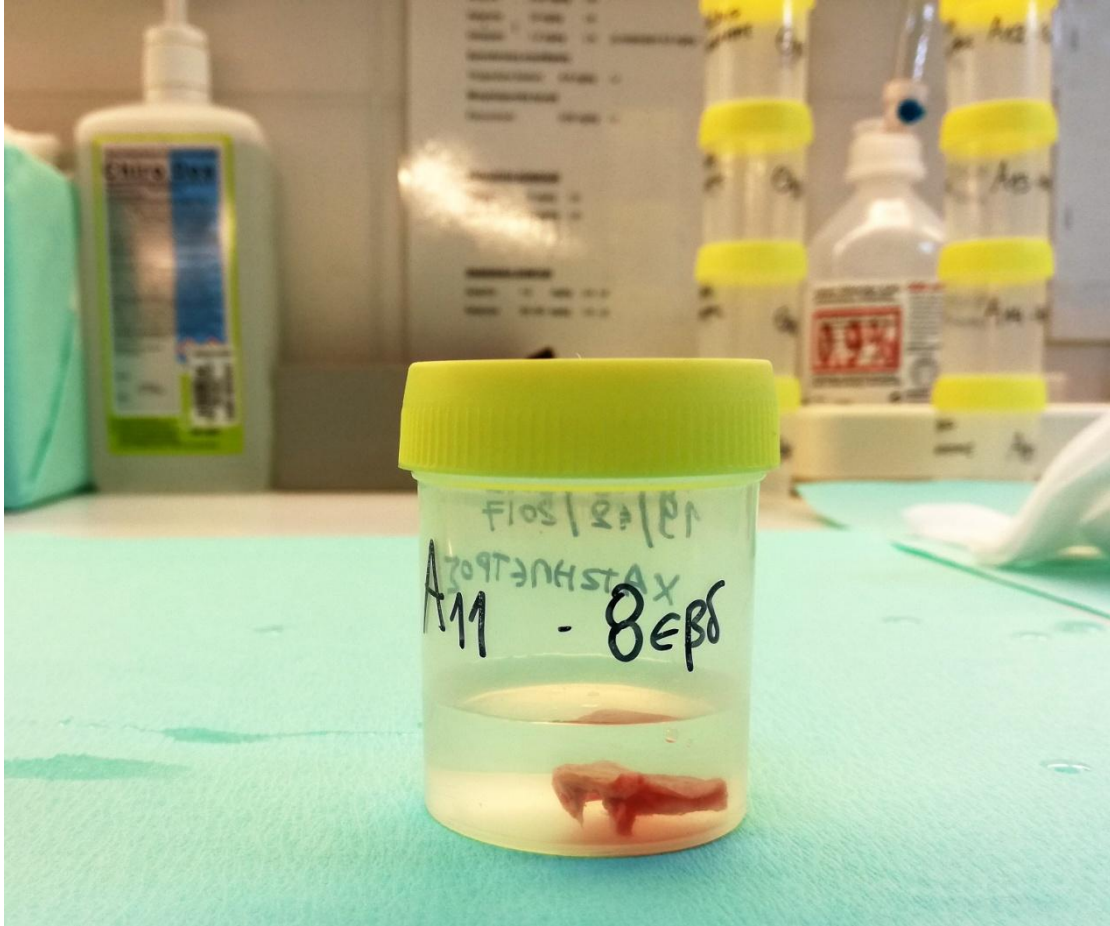
Εικόνα 43. Η κεφαλή του πειραματόζωου μετά τη χειρουργική αφαίρεση του δέρματος.

Εικόνα 44. Διενέργεια δύο κάθετων και δύο οριζόντιων οστεομιών με χειρουργική φρέζα, προκειμένου να γίνει η αποκόλληση του ιστοτεμαχίου που περιελάμβανε τις πειραματικές ομάδες. Το μαύρο βέλος δείχνει το τυποποιημένο κυκλικό οστικό έλλειμμα της πειραματικής ομάδας στην οποία έχει τοποθετηθεί το ικρίωμα του nHAp/CS.



Εικόνα 45. Λήψη ιστοτεμαχίου διαστάσεων 15x2x10mm. Το ιστοτεμάχιο περιελάμβανε περιφερικά, τμήματα του βρεγματικού, ινιακού και μετωπιαίου οστού του κρανιακού θόλου και κεντρικά περιελάμβανε τα δύο τυποποιημένα κυκλικά οστικά ελλείμματα. Περιελάμβανε, επίσης, προς τα έξω το περίοστεο και προς τα έσω τη σκληρά μήνιγγα του εγκεφάλου των επίμυων.

Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% (Formaldehyde solution, Sigma Aldrich, USA) για 1 ημέρα (Εικόνα 46).



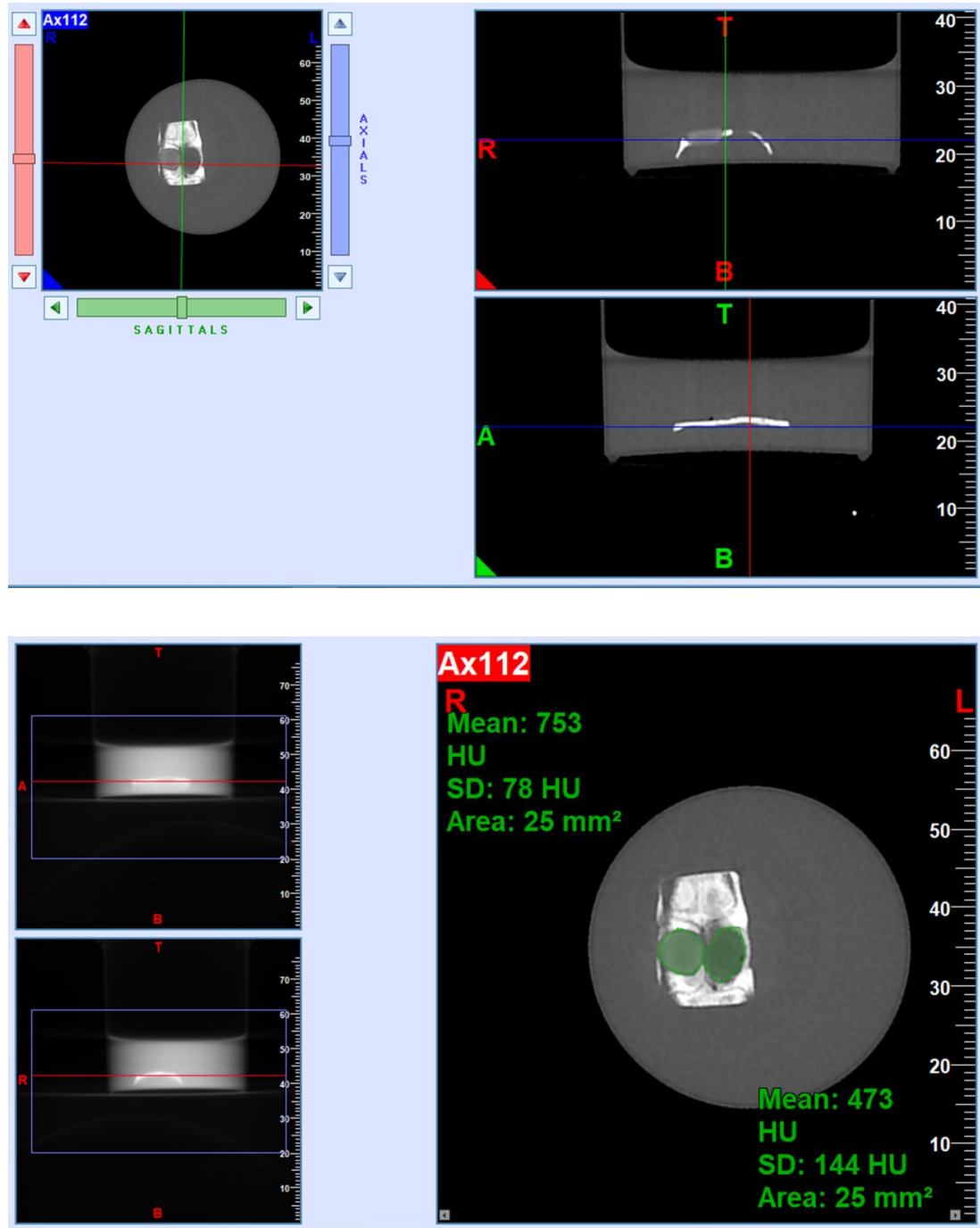
Εικόνα 46. Μονιμοποίηση ιστών για 24 ώρες σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% (Formaldehyde solution, Sigma Aldrich, USA).

ΣΤΑΔΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ανάλυση Κωνικής Δέσμης Οδοντιατρικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (Cone Beam Computed Tomography, CBCT)

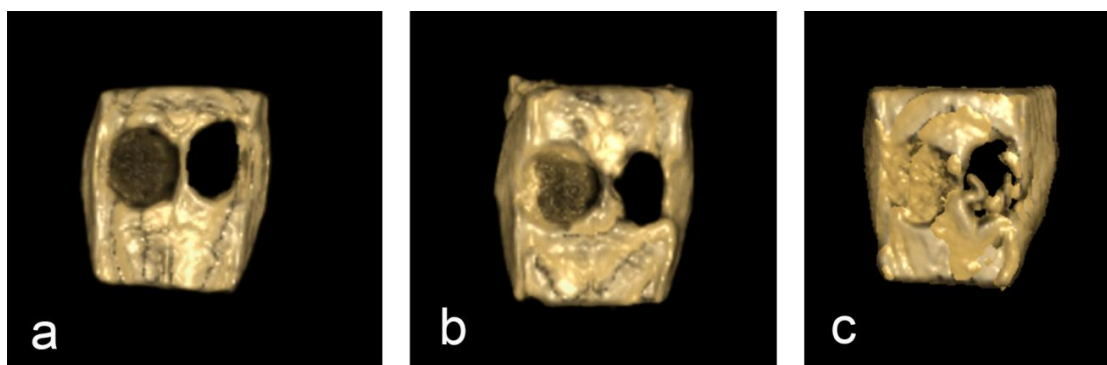
Μετά από παραμονή των ιστοτεμαχίων για 24 ώρες σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% πραγματοποιήθηκε Κωνικής Δέσμης Υπολογιστική Τομογραφία σε 28 ιστοτεμάχια (15 αρσενικά, 13 θηλυκά). Τα 6 πειραματόζωα της πιλοτικής μελέτης που προηγήθηκε εξαιρέθηκαν από την ακτινολογική ανάλυση. Πιο αναλυτικά, μετά το πέρας 2 εβδομάδων σαρώθηκαν 5 αρσενικά και 5 θηλυκά ιστοτεμάχια, μετά τις 4 εβδομάδες σαρώθηκαν 5 αρσενικά και 4 θηλυκά ιστοτεμάχια και τέλος στις 8 εβδομάδες σαρώθηκαν 5 αρσενικά και 4 θηλυκά ιστοτεμάχια. Η λήψη των τομογραφιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση New Tom VGi CBCT imaging unit (Verona, Italy, 110kV, 6mA, 8x8 High Resolution Field Of View-FOV voxel size 0.127mm, και 5.4sec exposure time). Όλα τα ιστοτεμάχια διαστάσεων 15x2x10mm παρέμειναν εντός πλαστικών κυλίνδρων (3.5cm διάμετρος x 7cm ύψος), οι οποίοι περιείχαν διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% (Εικόνα 46). Τα ιστοτεμάχια προσανατολίστηκαν παράλληλα με το οριζόντιο επίπεδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον προσανατολισμό των πλαστικών κυλίνδρων, οι οποίοι περιείχαν τα ιστοτεμάχια. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μία πλαστική επέκταση, τύπου πλατφόρμας, στην οποία κάθε κύλινδρος τοποθετήθηκε στο κέντρο της και ευθυγραμμίστηκε στη μεσότητα του επιλεγμένου FOV. Τα ιστοτεμάχια είχαν τέτοιο προσανατολισμό εντός του διαλύματος ουδέτερης φορμόλης έτσι ώστε να βρίσκονται πάντοτε στο κέντρο της διασταύρωσης των οπτικών δεσμών (σκοπευτικά laser) του μέσου οβελιαίου και αξονικού επιπέδου. Επιπλέον, το πάχος κάθε εγκάρσιας τομής προσαρμόστηκε στα 0.15mm. Ως ακολούθως, από κάθε ιστοτεμάχιο ελήφθησαν γύρω στις 10 εγκάρσιες τομές. Όλες οι εικόνες δημιουργήθηκαν με τη χρήση του ψηφιακού εργαλείου trace region profile tool σε εγκάρσιες τομές (NNT v6.2 software, Verona, Italy) από έναν παρατηρητή, εξειδικευμένο στην Γναθοπροσωπική Ακτινολογία. Ο παρατηρητής αγνοούσε το χρονικό διάστημα της ευθανασίας (2, 4, 8 εβδομάδες). Συνεπώς, αγνοούσε και την πορεία της οστικής επούλωσης (concealment: τυχαιοποίηση στην κατανομή των ομάδων σε σχέση με το χρόνο) (Schulz 1996). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν επάνω στην εγκάρσια τομή στην οποία απεικονίζονταν με σαφήνεια τόσο η ομάδα ελέγχου, όσο και η πειραματική ομάδα. Με τη χρήση

ειδικού λογισμικού (NNT v6.2 software, Verona, Italy) εκτιμήθηκαν η μέση τιμή του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι (grayscale value, σε $^{V_{Gi}}HU$), η τυπική απόκλιση αυτής της μέτρησης (standard deviation, $SD^{V_{Gi}}HU$) και η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Region Of Interest-ROI, σε mm^2) στην ομάδα ελέγχου και στην πειραματική ομάδα (Εικόνα 47).



Εικόνα 47. Εκτίμηση της μέσης τιμής του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι (grayscale value, σε $^{V_{Gi}}HU$), της τυπικής απόκλισης (standard deviation, $SD^{V_{Gi}}HU$) και της επιφάνειας (Area) του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Region Of Interest-ROI, σε mm^2) στην ομάδα ελέγχου και στην πειραματική ομάδα με τη χρήση ειδικού λογισμικού (NNT v6.2 software, Verona, Italy).

Όσο αυξανόταν η μέση τιμή του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι, τόσο περισσότερο ακτινοσκιερό απεικονιζόταν το βιοϋλικό. Όσο μειωνόταν η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, τόσο μεγαλύτερη παρουσιαζόταν η τάση για κεντρομόλο οστική πλήρωση του ελλείμματος. Επιπλέον, τρισδιάστατες εικόνες οι οποίες δημιουργήθηκαν με τη χρήση ειδικού λογισμικού (NNT v6.2 software, Verona, Italy) έδειξαν την απεικόνιση του ικριώματος nHAρ/CS, την επούλωση του τραύματος και τη δημιουργία νεόπλαστου οστού στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία (Εικόνα 48).



Εικόνα 48. Τρισδιάστατες εικόνες στις 2 (a), 4 (b) και 8 (c) εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία.

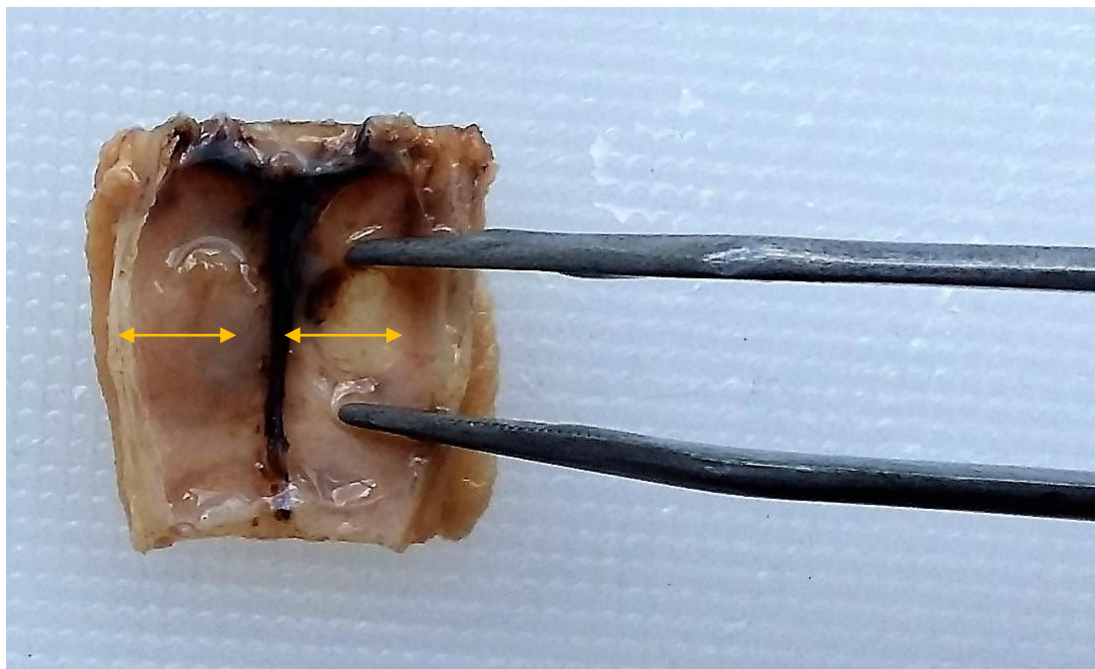
Ιστολογική Ανάλυση

Τα 34 ιστοτεμάχια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% (Formaldehyde solution, Sigma Aldrich, USA) για 24 ώρες (Εικόνα 46). Έπειτα, ακολούθησε απασβεσίωση των ιστών, μετά την ακτινοβόλησή τους, σε διάλυμα EDTA-based solution (MicroDec, Diapath, Italy) για 7 ημέρες. Μετά από το στάδιο της απασβεσίωσης των ιστοτεμαχίων (εικόνα 49) ακολούθησε το στάδιο της αποκοπής και επεξεργασίας (grossing).



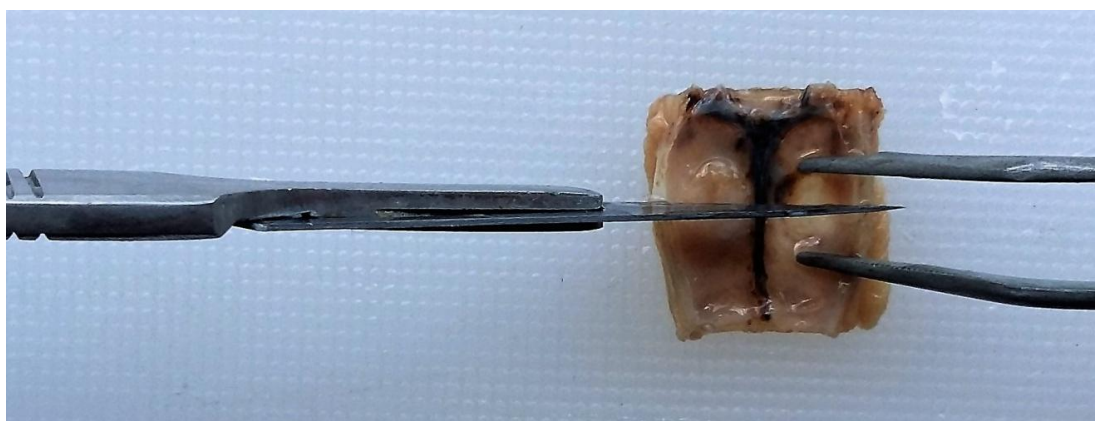
Εικόνα 49. Το απασβεστωμένο ιστοτεμάχιο. Το μαύρο βέλος δείχνει τα όρια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της ομάδας ελέγχου.

Σε αυτό το στάδιο μετά με μία λαβίδα οριοθετήθηκαν κλινικά τα προσθιοπίσθια όρια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 50).



Εικόνα 50. Με μία λαβίδα οριοθετήθηκαν κλινικά τα προσθιοπίσθια όρια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της ομάδας ελέγχου. Τα πορτοκαλί βέλη απεικονίζουν τις διαμέτρους των τυποποιημένων κυκλικών οστικών ελλειμμάτων και των δύο ομάδων.

Με τη χρήση ενός νυστεριού τα ιστοτεμάχια αποκόπηκαν ακριβώς στη μεσότητα του προσθιοπίσθιου επιπέδου του ιστού, στο σημείο εκείνο που ταυτίζονταν η διάμετρος του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της ομάδας ελέγχου με τη διάμετρο του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της πειραματικής ομάδας (Εικόνα 51).



Εικόνα 51. Αποκοπή των ιστοτεμαχίων ακριβώς στη μεσότητα του προσθιοπίσθιου επιπέδου του ιστού, στο σημείο εκείνο που ταυτίζονταν η διάμετρος του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της ομάδας ελέγχου με τη διάμετρο του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της πειραματικής ομάδας.

Τα ιστοτεμάχια προσανατολίστηκαν κατάλληλα και εγκλείστηκαν σε παραφίνη (tissue processor, EMBED 503, Kaltek, Padova, Italy) σύμφωνα με την ιστολογική τεχνική ρουτίνας (Εικόνα 52).



Εικόνα 52. Εγκλεισμός των ιστοτεμαχίων σε κιβωτίδια παραφίνης.

Ελήφθησαν τομές με μικροτόμο (Microtome RM 2145, Leica, Buffalo Grove, USA) πάχους 5μm από τη μεσότητα και των δύο τυποποιημένων κυκλικών οστικών ελλειμμάτων, παράλληλα με το στεφανιαίο επίπεδο. Ακολούθησε η χρώση των ιστοτεμαχίων με ηωσίνη και αιματοξυλίνη (Eosin G Aqueous Solution 1%, Diapath, Martinengo, Italy-Papanicolaou's Solution 1a Harris hematoxylin solution, Merk, Darmstadt, Germany).

Ιστομορφομετρική Ανάλυση

Ιστικά δείγματα ληφθέντα από 34 (n=34: 18 αρσενικοί και 16 θηλυκοί επίμυες) πειραματόζωα τύπου Sprague Dawley rats εμπεδωμένα σε παραφίνη, μικροτομημένα πάχους 4-5 μ m και χρωσμένα με συμβατική χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (HE) επιλέχθηκαν για το σκοπό της ερευνητικής μελέτης. Προς ανάλυση και μέτρηση γεωμετρικών και αριθμητικών παραμέτρων επί των ιστικών δειγμάτων και με εστίαση στην οστεοβλαστική δραστηριότητα (αναγεννητική διαδικασία οστού) με αντικειμενικό, ταχύ και απόλυτα όμοιο επαναλαμβανόμενο τρόπο εφαρμόστηκε σύστημα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας με τα χαρακτηριστικά:

Hardware:

- Intel CORE i5 7th Gen (Intel Corporation, California, USA)
- SAMSUNG Color Display Unit LS24F356FHUXEN (Samsung Electronics Ltd, United Kingdom)
- Creative Pen Tablet WACOM (Wacom Europe GmbH, Germany)
- Digital Camera OLYMPUS U-CMAD3 T7, U-TV1X-2 T7 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)
- Optical Microscope OLYMPUS CX 23LEDRFS2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)

Software:

- Windows 10 (Microsoft Corporation, NY, USA)
- Adobe Photoshop CC 2015 (San Jose, USA)
- Image Pro-Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)

Οι μετρήσεις αφορούσαν στην ανάδειξη του απόλυτου αριθμού των πυρήνων των οστεοκυττάρων στην επιφάνεια της περιοχής-ων οστεοβλαστικής δραστηριότητας. Το πεδίο μέτρησης ήταν σταθερό ως «κάδρο» σε μεγεθύνσεις με αντικειμενικό φακό σταθερής μεγέθυνσης 20x, οπτικού μικροσκοπίου. Μακροεντολές προσαρμόστηκαν στις απαιτήσεις των μετρήσεων με παραμέτρους όπως η κυκλικότητα των πυρήνων, ενώ ένα ψηφιακό πινέλο σάρωσε και χρωμάτισε τις περιοχές ενδιαφέροντος για να υπολογιστεί η επιφάνεια κάλυψης. Το φάσμα των συνεχών τιμών καλύπτει 0 (απόλυτη υπερέκφραση πρωτεΐνης) -255 (απόλυτη απουσία έκφρασης) κατά το πρότυπο RGB (combined Red, Green, Blue colors per pixel). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από έναν παρατηρητή, εξειδικευμένο

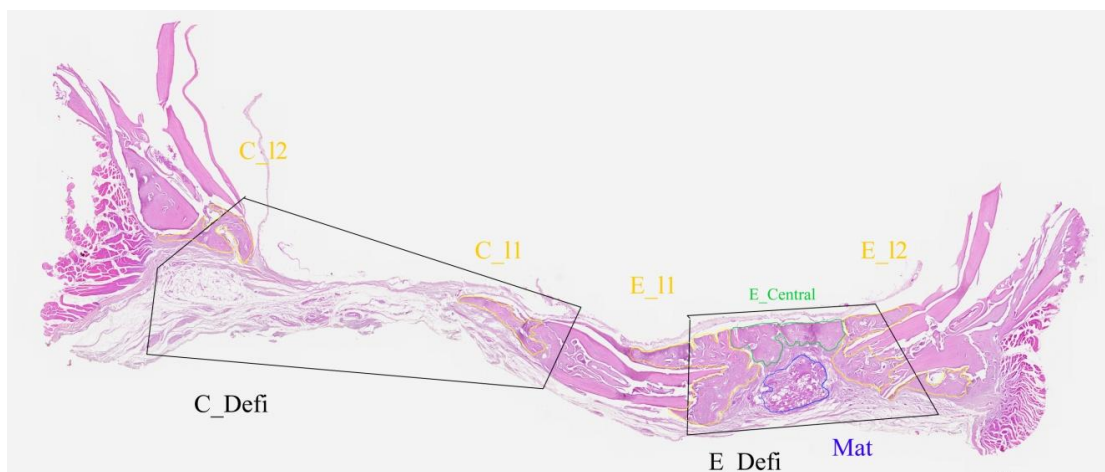
Ιστοπαθολόγο. Ο παρατηρητής αγνοούσε το χρονικό διάστημα της ευθανασίας (2, 4, 8 εβδομάδες). Συνεπώς, αγνοούσε και την πορεία της οστικής επούλωσης (concealment: τυχαιοποίηση στην κατανομή των ομάδων σε σχέση με το χρόνο) (Schulz 1996). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, κάθε αρχείο εικόνας τύπου Jpeg εισήχθη στο συγκεκριμένο και αμετάβλητο ψηφιακό παράθυρο. Στο επόμενο στάδιο της ψηφιακής ανάλυσης, ένα ψηφιακό εργαλείο περικύκλωσης και διαμερισματοποίησης-απομόνωσης αντικειμένων απόσπασε από το μικροπεριβάλλον τις περιοχές ενδιαφέροντος και εν κατακλείδι επήλθε η μέτρηση των αντίστοιχων εμβαδών σε μm^2 , ενώ παράλληλα υπολογίσθηκε και ο απόλυτος αριθμός των ενταγμένων στο ίδιο εμβαδόν πυρήνων των οστεοκυττάρων. Επιπρόσθετα, η κατευθυνόμενη αναγέννηση οστού μέσω επίθεσης συγκεκριμένου εξωγενούς υλικού (Guided Bone Regeneration, GBR mediated by nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS material insertion) στα αντίστοιχα χειρουργικά ιστοικά ελλείμματα επίσης υπολογίσθηκε. Στο τέλος της διαδικασίας ψηφιακής μέτρησης, πίνακες αρχείων excel συγκροτήθηκαν και οδήγησαν στη δημιουργία της τελικής βάσης δεδομένων για τη στατιστική ανάλυση.

Αρχικά, τοποθετήθηκαν τα πλακίδια σε οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS CX 23LEDRFS2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) και ακολούθησε η σάρωσή τους με ψηφιακή κάμερα OLYMPUS U-CMAD3 T7, U-TV1X-2 T7 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Οι ιστολογικές εικόνες οι οποίες προέκυψαν από τη σάρωση αυτή ήταν αρχεία TIFF και εμφανίζονταν σε μία οθόνη SAMSUNG Color Display Unit LS24F356FHUXEN (Samsung Electronics Ltd, United Kingdom) ενός Ηλεκτρονικού Υπολογιστή Intel CORE i5 7th Gen (Intel Corporation, California, USA) (Εικόνα 53).



Εικόνα 53. Ιστολογική εικόνα (TIFF) η οποία προέκυψε από τη σάρωση του πλακιδίου θηλυκού πειραματόζωου 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία.

Τα αρχεία των εικόνων τύπου TIFF μετατράπηκαν σε αρχεία JPEG προκειμένου να ακολουθήσει η σχεδίαση των περιοχών ενδιαφέροντος από εξειδικευμένο ιστοπαθολόγο με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC 2015 (San Jose, USA) σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή με λογισμικό Windows 10 (Microsoft Corporation, NY, USA). Οι περιοχές ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI- Area Of Interest, AOI) σχεδιάστηκαν με ένα ψηφιακό στυλό Creative Pen Tablet WACOM (Wacom Europe GmbH, Germany) με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC 2015 (San Jose, USA). Τα κριτήρια σχεδίασης των περιοχών ενδιαφέροντος ήταν ο σχηματισμός νεόπλαστου οστού στις περιφερικές και κεντρικές περιοχές των τυποποιημένων κυκλικών οστικών ελλειμμάτων. Γενικά, το νεοσχηματισθέν οστόν εμφανίζεται ως ινώδες οστόν με πολυάριθμα οστεοκύτταρα και χαρακτηριστική οστεοβλαστική δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό το κάνει ιδιαίτερος ευδιάκριτο σε σχέση με το προϋπάρχον οστόν, το οποίο απαντάται στα χείλη του τραύματος των τυποποιημένων κυκλικών οστικών ελλειμμάτων των επίμυων (Εικόνα 54, 55, 56).



Εικόνα 54. Ιστολογική εικόνα (JPEG), στην οποία απεικονίζονται οι χρωματικά σχεδιασμένες περιοχές ενδιαφέροντος της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου (20x).

Οι περιοχές ενδιαφέροντος (**Regions Of Interest, ROI**) ορίστηκαν ως οι περιοχές εκείνες στις οποίες παρατηρήθηκε νεόπλαστο οστόν και ήταν τρεις και στις δύο ομάδες:

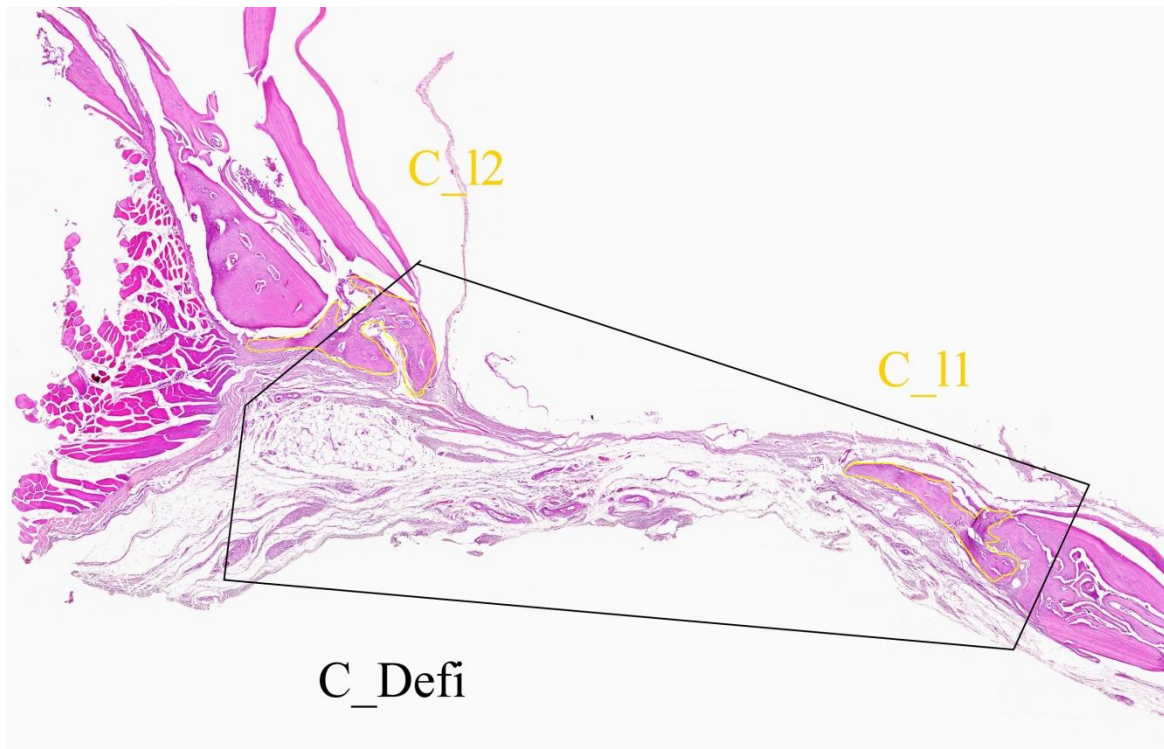
- Περιφερική περιοχή προς τα έσω της μέσης οβελιαίας ραφής (**lateral 1, I1**) (**κίτρινος χρωματισμός**).
- Περιφερική περιοχή προς τα έξω της μέσης οβελιαίας ραφής (**lateral 2, I2**) (**κίτρινος χρωματισμός**).
- Κεντρική περιοχή (**Central**) (**πράσινος χρωματισμός**).

Οι περιοχές των αρχικών τρυπανισμών των 5mm ορίστηκαν ως τα πραγματικά ελλείμματα (**Defects-Deficits, Defi**) (μαύρος χρωματισμός).

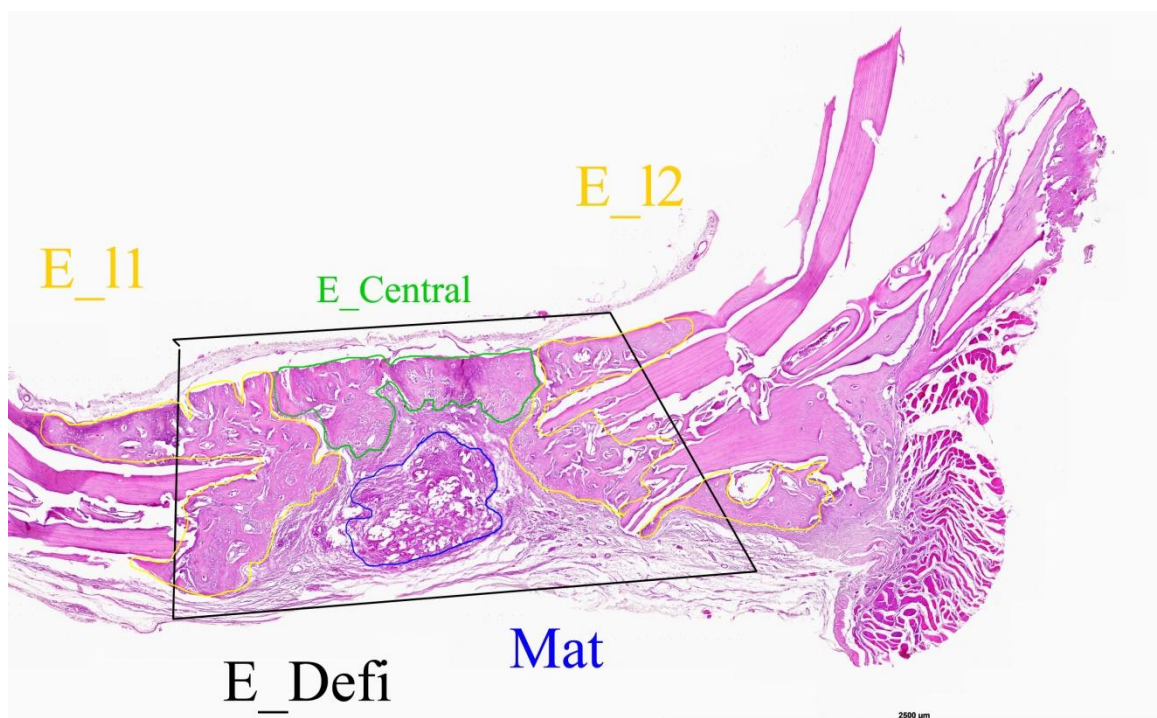
Η οστική ανάπλαση έχει κεντρομόλο κατεύθυνση (από την περιφέρεια προς το κέντρο).

Στις περιοχές ενδιαφέροντος (ROI) μετρήθηκαν το εμβαδόν τους (μm^2) και ο απόλυτος αριθμός των οστεοκυττάρων (**Osteocytes, Ost**).

Στις περιοχές των αρχικών τρυπανισμών της πειραματικής ομάδας (**Defects-Deficits, Defi**) μετρήθηκε η επιφάνεια κάλυψης και η βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (**Material, Mat**) (μπλέ χρωματισμός) σε μm^2 .

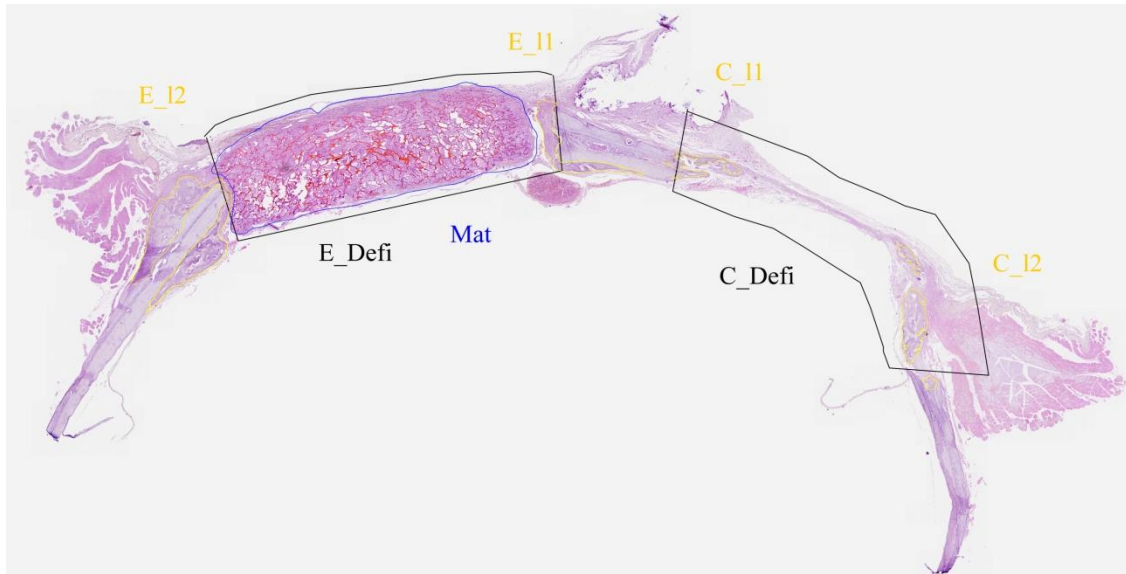


Εικόνα 55. Μεγέθυνση της Εικόνας 54 στην οποία διακρίνονται με σαφήνεια οι περιοχές ενδιαφέροντος της ομάδας ελέγχου. Όπου C_11: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_12: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της ομάδας ελέγχου (μm^2).

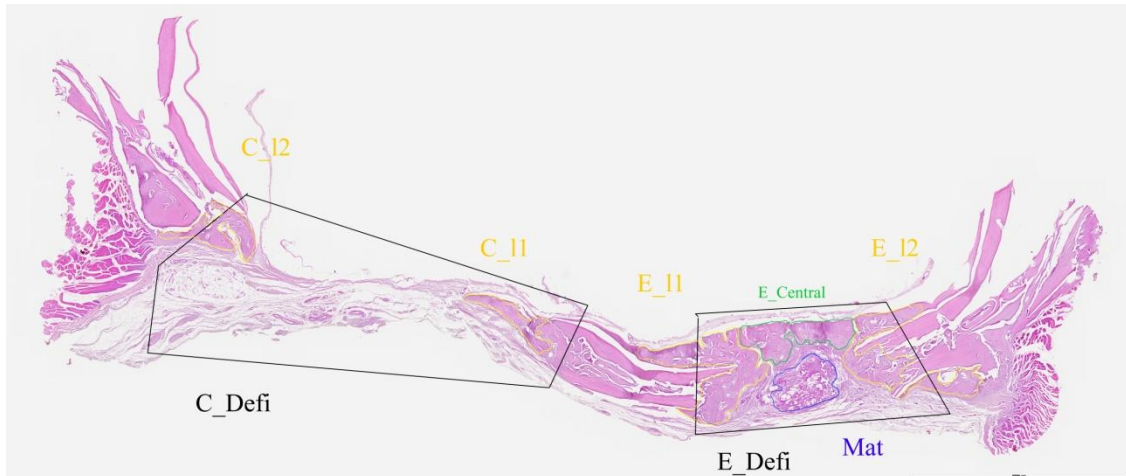


Εικόνα 56. Μεγέθυνση της Εικόνας 54 στην οποία διακρίνονται με σαφήνεια οι περιοχές ενδιαφέροντος της πειραματικής ομάδας. Όπου E_11: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_12: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Central: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην Central περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της πειραματικής ομάδας (μm^2), Mat: Επιφάνεια βιοϋλικού (μm^2). Η μαύρη ευθεία γραμμή απεικονίζει 2500 μm .

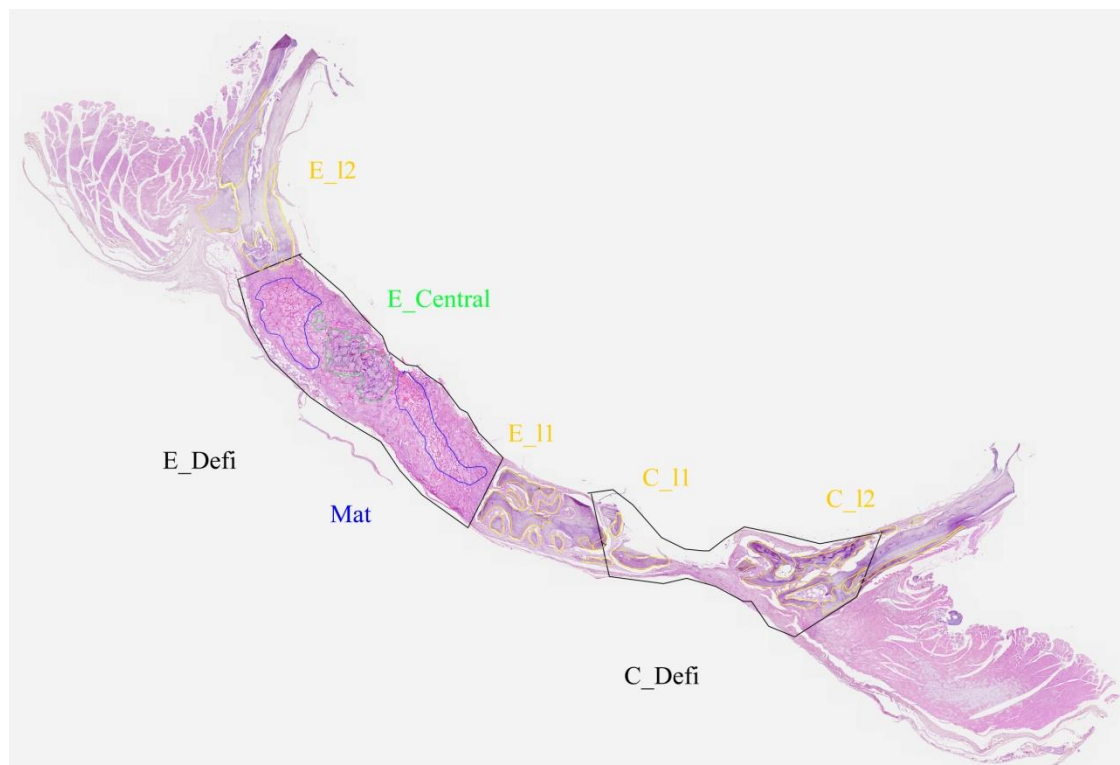
Οι εικόνες JPEG όλων των πειραματόζωων (34 εικόνες) εισήχθησαν στο πρόγραμμα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας Image Pro-Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ιστομορφομετρική τους ανάλυση (Εικόνες 57, 58, 59).



Εικόνα 57. Ιστολογική εικόνα (20x) στην οποία απεικονίζονται και τα δύο τυποποιημένα οστικά ελλείμματα 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Όπου C_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της ομάδας ελέγχου (μm^2), E_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της πειραματικής ομάδας (μm^2), Mat: Επιφάνεια βιοϋλικού (μm^2).

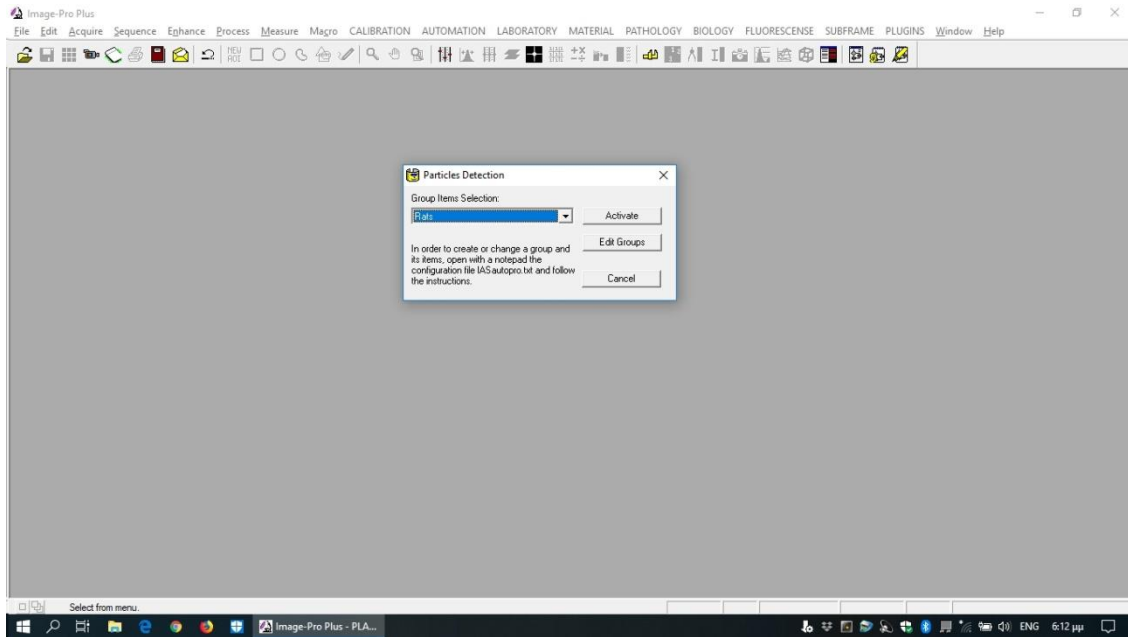


Εικόνα 58. Ιστολογική εικόνα (20x) στην οποία απεικονίζονται και τα δύο τυποποιημένα οστικά ελλείμματα 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Όπου C_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της ομάδας ελέγχου (μm^2), E_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Central: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην Central περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της πειραματικής ομάδας (μm^2), Mat: Επιφάνεια βιοϋλικού (μm^2).



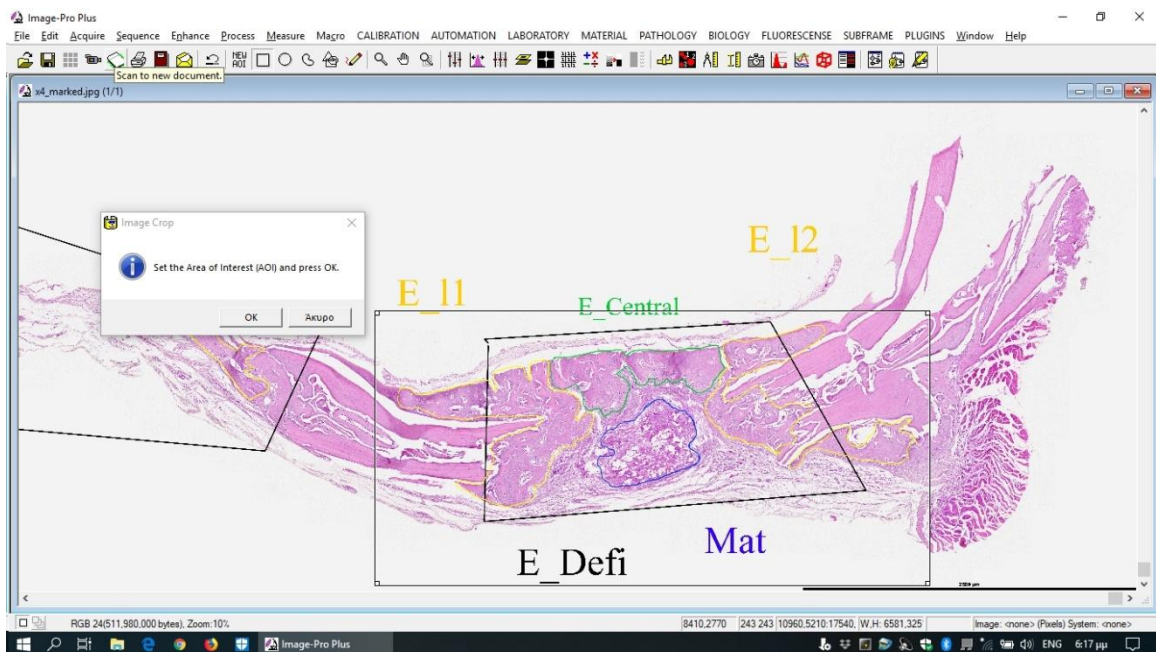
Εικόνα 59. Ιστολογική εικόνα (20x) στην οποία απεικονίζονται και τα δύο τυποποιημένα οστικά ελλείμματα 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Όπου C_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2), C_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της ομάδας ελέγχου (μm^2), E_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Central: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην Central περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2), E_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της πειραματικής ομάδας (μm^2), Mat: Επιφάνεια βιοϋλικού (μm^2).

Έπειτα από τη βαθμονόμηση όλων των εικόνων πραγματοποιήθηκε η επιλογή των μακροεντολών οι οποίες δόθηκαν στο πρόγραμμα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας. Αρχικά, επιλέχθηκε ο φάκελος (Rats) εντός του οποίου υπήρχαν όλα τα αρχεία των εικόνων (JPEG, 34 εικόνες) (Εικόνα 60).



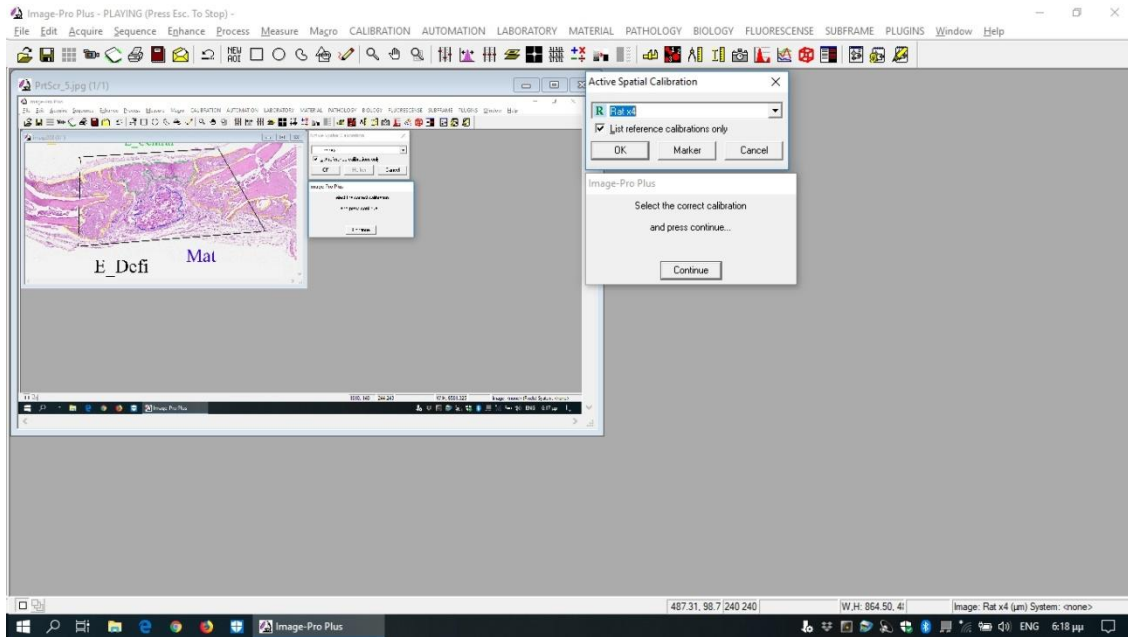
Εικόνα 60. Επιλογή φακέλου (Rats) εντός του οποίου υπήρχαν όλα τα αρχεία των εικόνων (JPEG, 34 εικόνες).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή κάθε εικόνας ξεχωριστά μέσα στο σύστημα και επιλέχθηκε η περιοχή ενδιαφέροντος (Area Of Interest, AOI) (Εικόνα 61).



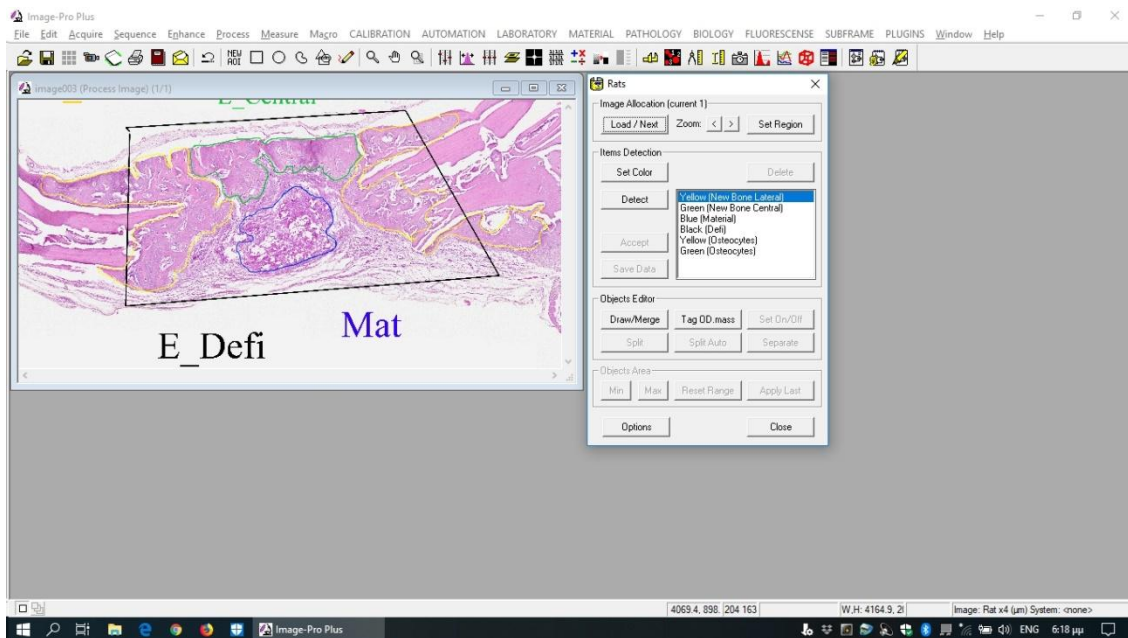
Εικόνα 61. Επιλογή της περιοχής ενδιαφέροντος (Area Of Interest, AOI).

Στη συνέχεια, εισήχθη στο σύστημα η συγκεκριμένη βαθμονόμηση της επιλεγείσας εικόνας (Εικόνα 62).



Εικόνα 62. Εισαγωγή στο σύστημα της συγκεκριμένης βαθμονόμησης της επιλεγείσας εικόνας (select the correct calibration).

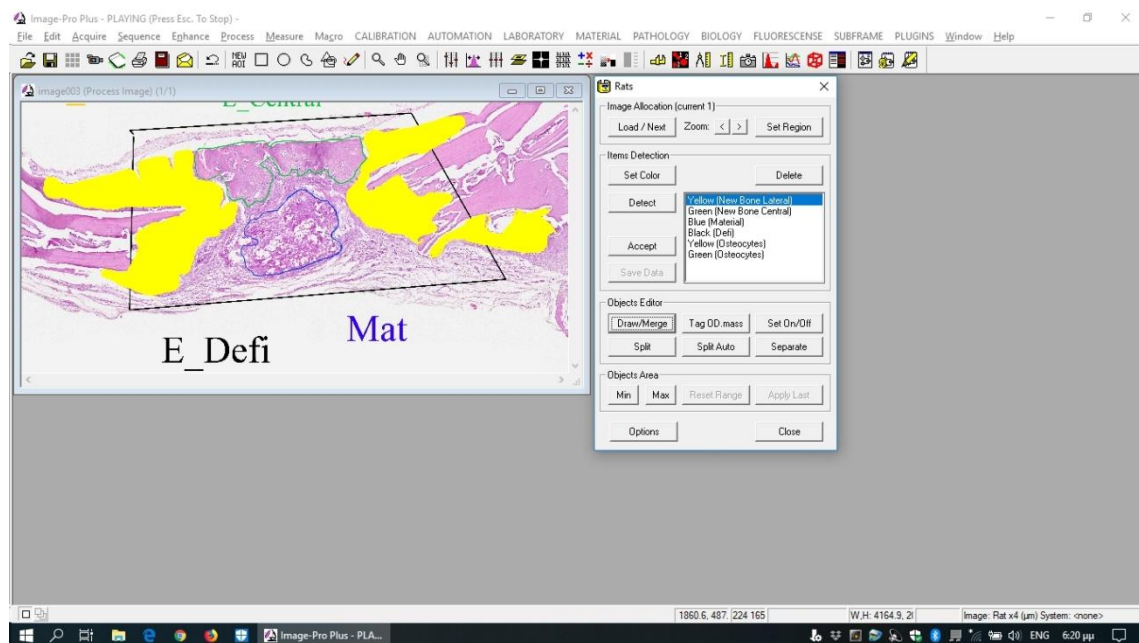
Μετά ακολούθησε η επιλογή του είδους της μέτρησης με βάση τον προκαθορισμένο και κωδικοποιημένο χρωματισμό (Εικόνα 63).



Εικόνα 63. Επιλογή του είδους της μέτρησης σύμφωνα με τον προκαθορισμένο από το σύστημα χρωματισμό (κίτρινο, πράσινο, μπλε, μαύρο).

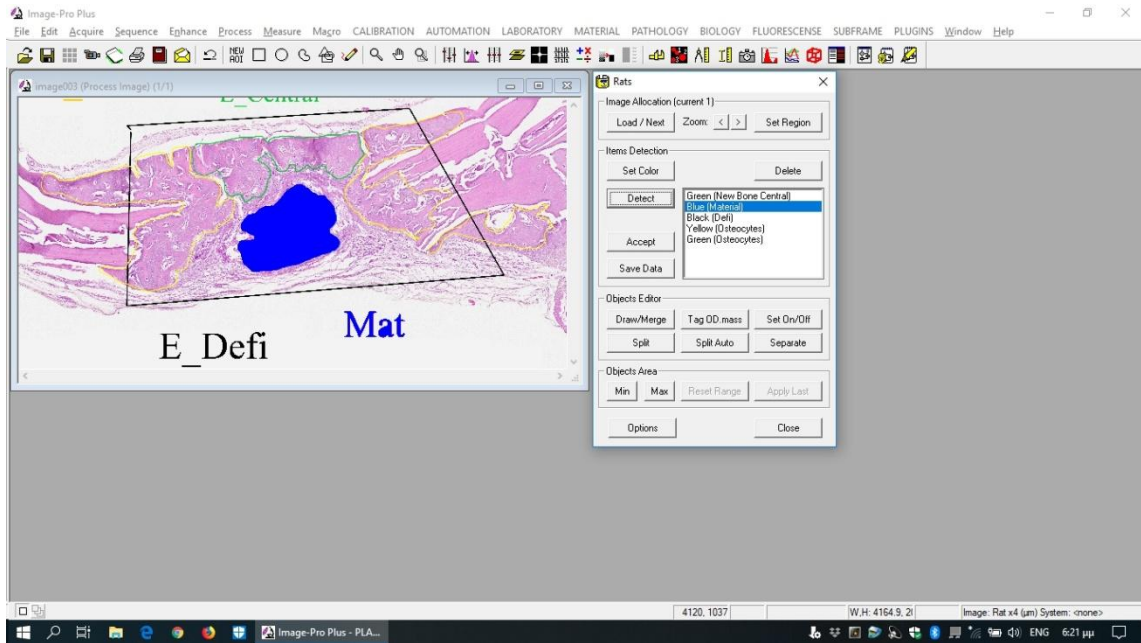
Ένα ψηφιακό πινέλο σάρωσε και χρωμάτισε τις περιοχές ενδιαφέροντος για να υπολογιστεί η επιφάνεια κάλυψης (σε μm^2). Με αυτόν τον τρόπο, υπολογίστηκε αρχικά η επιφάνεια κάλυψης των αρχικών τρυπανισμών (**Defects-Deficits-Defi, μαύρος χρωματισμός**) σε μm^2 (Εικόνα 63).

Έπειτα, με όμοιο και σταθερά επαναλαμβανόμενο τρόπο σαρώθηκε και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάλυψης των περιφερικών περιοχών του νεοσχηματισθέντος οστού (**lateral 1-I1 και lateral 2-I2, κίτρινος χρωματισμός**) σε μm^2 (Εικόνα 64).



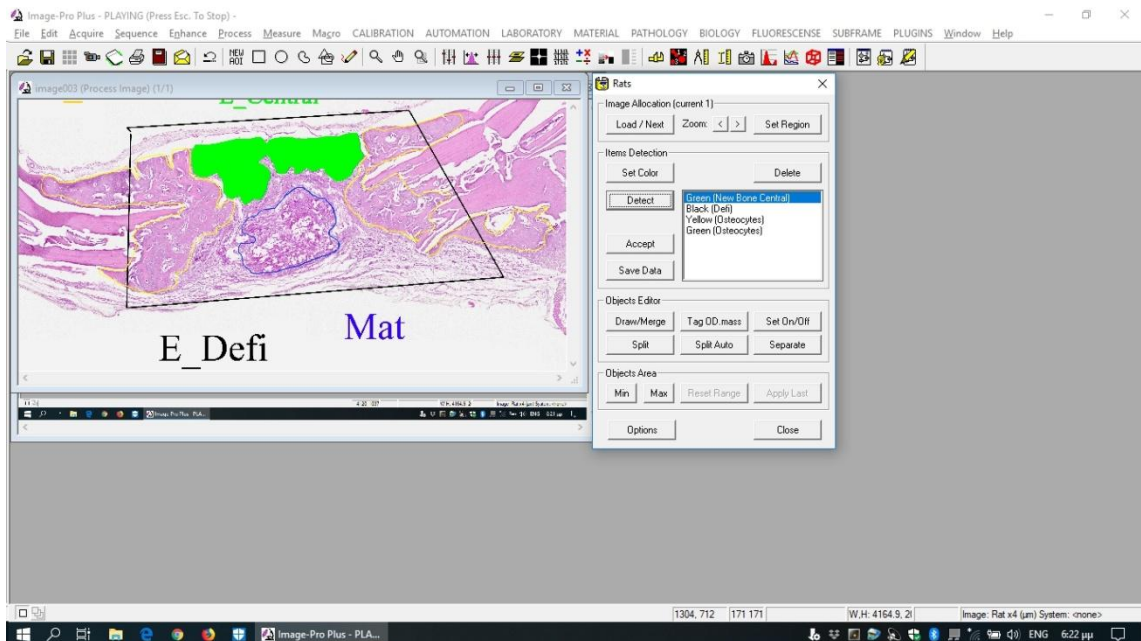
Εικόνα 64. Σάρωση και υπολογισμός με ένα ψηφιακό πινέλο της επιφάνειας κάλυψης των περιφερικών περιοχών του νεοσχηματισθέντος οστού (lateral 1-I1 και lateral 2-I2, κίτρινος χρωματισμός).

Στη συνέχεια, με όμοιο και σταθερά επαναλαμβανόμενο τρόπο σαρώθηκε και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάλυψης του βιοϋλικού (**Material-Mat, μπλέ χρωματισμός**) σε μm^2 (Εικόνα 65).



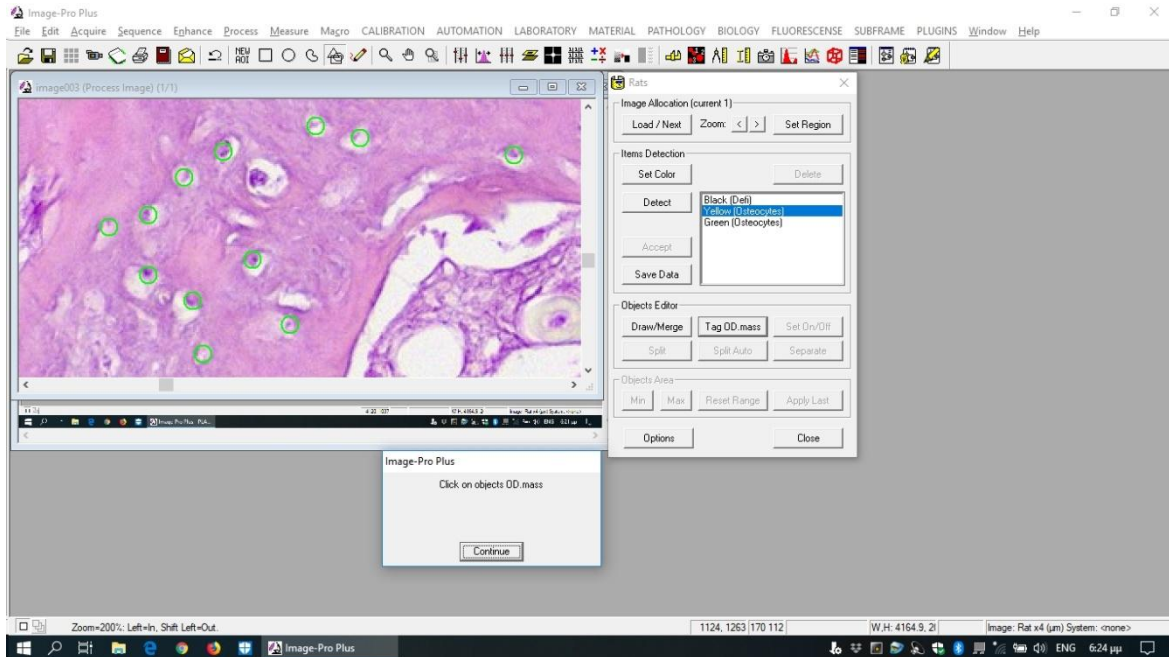
Εικόνα 65. Σάρωση και υπολογισμός με ένα ψηφιακό πινέλο της επιφάνειας κάλυψης του βιοϋλικού (Material-Mat, μπλέ χρωματισμός).

Ακολούθως, με όμοιο και σταθερά επαναλαμβανόμενο τρόπο σαρώθηκε και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάλυψης των κεντρικών περιοχών του νεοσηματισθέντος οστού (Central, πράσινος χρωματισμός) σε μm^2 (Εικόνα 66).

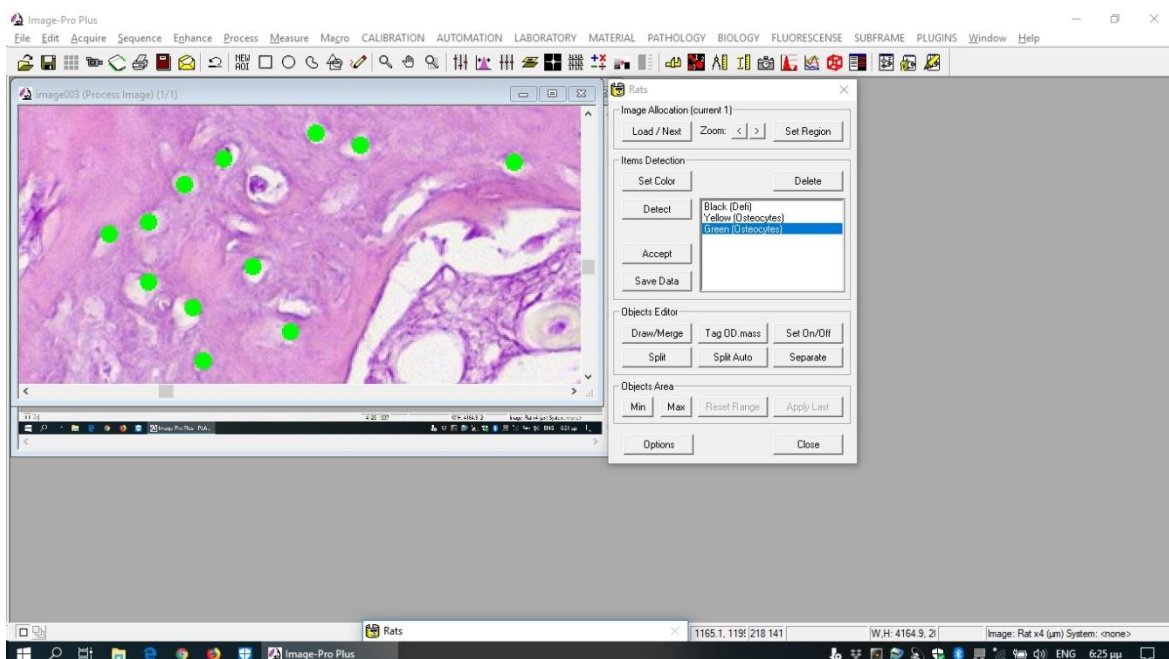


Εικόνα 66. Σάρωση και υπολογισμός με ένα ψηφιακό πινέλο της επιφάνειας κάλυψης των κεντρικών περιοχών του νεοσηματισθέντος οστού (Central, πράσινος χρωματισμός).

Τέλος, στην επιφάνεια κάλυψης των περιφερικών περιοχών του νεοσηματισθέντος οστού (**lateral 1-11 και lateral 2-12, κίτρινος χρωματισμός**) και στην επιφάνεια κάλυψης των κεντρικών περιοχών του νεοσηματισθέντος οστού (**Central, πράσινος χρωματισμός**) υπολογίσθηκε ο απόλυτος αριθμός των ενταγμένων στο ίδιο εμβαδόν πυρήνων των οστεοκυττάρων (**Osteocytes, Ost**) (Εικόνες 67, 68).



Εικόνα 67. Επιλογή των οστεοκυττάρων με το ψηφιακό εργαλείο TAG/OD.MASS, το οποίο προσθέτει «αντικείμενα»-πυρήνες οστεοκυττάρων.



Εικόνα 68. Υπολογισμός με μακροεντολή του αθροίσματος των επιλεγέντων οστεοκυττάρων.

Όλες οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό ψηφιακής ανάλυσης εικόνας, αφού αποθηκευτούν στη μνήμη του Ηλεκτρονικού Υπολογιστή, αποστέλλονται σε ξεχωριστά αρχεία τύπου excel για κάθε ένα πειραματόζωο (συνολικά 34 αρχεία excel).

Στο τέλος της διαδικασίας ψηφιακής μέτρησης, πίνακες αρχείων excel συγκροτήθηκαν και οδήγησαν στη δημιουργία της τελικής βάσης δεδομένων για τη στατιστική ανάλυση. Η τελική βάση δεδομένων παρουσιάστηκε σε ένα αρχείο τύπου excel, το οποίο περιελάμβανε το σύνολο των μετρήσεών μας και είχε την εξής μορφή (Εικόνα 69):

rats sex weeks

C_Ost_I1	C_Ost_I2	C_Ost_Central	C_Defi	C_I1	C_I2	C_Central	
E_Ost_I1	E_Ost_I2	E_Ost_Central	E_Defi	Mat	E_I1	E_I2	E_Central

Εικόνα 69. Η τελική βάση δεδομένων παρουσιάστηκε σε ένα αρχείο τύπου excel, το οποίο περιελάμβανε το σύνολο των μετρήσεών μας.

Όπου

rats: ο αύξων αριθμός του πειραματόζωου (**x1-x34**).

sex: το φύλο (**Male, Female**).

weeks: οι εβδομάδες έως την ευθανασία των πειραματόζωων (**2, 4, 8**).

C_Ost_I1: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου.

C_Ost_I2: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου.

C_Ost_Central: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην Central περιοχή της ομάδας ελέγχου.

C_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της ομάδας ελέγχου (μm^2).

C_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2).

C_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2).

C_Central: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην Central περιοχή της ομάδας ελέγχου (μm^2).

E_Ost_I1: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας.

E_Ost_I2: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας.

E_Ost_Central: Απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων στην Central περιοχή της πειραματικής ομάδας.

E_Defi: Επιφάνεια αρχικού τρυπανισμού της πειραματικής ομάδας (μm^2).

Mat: Επιφάνεια βιοϋλικού (μm^2).

E_I1: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I1 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2).

E_I2: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2).

E_Central: Επιφάνεια νεόπλαστου οστού στην Central περιοχή της πειραματικής ομάδας (μm^2).

Με βάση τα ανωτέρω μελετήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Κλάσμα Οστικής Ανάπλασης (**Fraction of Bone Regeneration, FBR**) [%]
(Kim et al 2016)

Το Κλάσμα Οστικής Ανάπλασης (FBR) αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την πορεία της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (GBR) (Kim et al 2016). Καταδεικνύει το σχηματισμό του νεόπλαστου οστού εντός των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και υπολογίζεται ξεχωριστά για την πειραματική ομάδα (Experimental) και για την ομάδα ελέγχου (Control).

$$\text{FBR}_C (\text{Control}) = (C_{I1} + C_{I2} + C_{\text{Central}}) / (C_{\text{Defi}}) \times 100\%$$

$$\text{FBR}_E (\text{Experimental}) = (E_{I1} + E_{I2} + E_{\text{Central}}) / (E_{\text{Defi}}) \times 100\%$$

- Βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (**Material, Mat**) [μm^2]
(Ying et al 2008)

Mat (2weeks)

Mat (4weeks)

Mat (8weeks)

- Κυτταρική πυκνότητα Οστεοκυττάρων (**Cell Density, CD**) [οστεοκύτταρα/ μm^2] και [οστεοκύτταρα/ mm^2]
(Norouzi et al 2017)

CD_C (Control)=(C_Ost_I1+C_Ost_I2+C_Ost_Central)/(C_I1+C_I2+C_Central)

CD_E (Experimental)=(E_Ost_I1+E_Ost_I2+E_Ost_Central)/(E_I1+E_I2+E_Central)

- Απόλυτος Αριθμός Οστεοκυττάρων (**Osteocytes, Ost**)
(Chatzipetros et al 2018)

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την επεξεργασία των δεδομένων της Ακτινολογικής (CBCT) Ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS 25.0 (Chicago, IL). Το επίπεδο διαβάθμισης του γκρι (grayscale value, σε $^{V_{Gi}}$ HU) και η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Region Of Interest-ROI, σε mm^2) αξιολογήθηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm Standard Deviation, SD). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική αξιολόγηση με πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (multivariate Analysis of Variance, ANOVA) και με Post Hoc Tests. Το γενικό ελάχιστο επιθυμητό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε σε $P<0.05$.

Για την επεξεργασία των δεδομένων της Ιστολογικής και Ιστομορφομετρικής Ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS 25.0 (Chicago, IL). Το κλάσμα οστικής ανάπλασης, η βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού nHAp/CS, η οστική πυκνότητα των οστεοκυττάρων και ο απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων αξιολογήθηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm Standard Deviation, SD). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική αξιολόγηση με ανάλυση διακύμανσης (one way Analysis of Variance, one way ANOVA), με T-test και με Post Hoc Tests (Bonferroni). Το γενικό ελάχιστο επιθυμητό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε σε $P<0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 36 ενήλικοι επίμυες Sprague Dawley, 18 αρρενες και 18 θήλειες από το Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Κατά τη διάρκεια της χειρουργικής διαδικασίας δεν παρατηρήθηκε καμία επιπλοκή σε κανένα πειραματόζωο. Κατά το μετεγχειρητικό στάδιο παρακολούθησης δύο θηλυκοί επίμυες απεβίωσαν 7 ημέρες μετά από στη χειρουργική διαδικασία. Συνεπώς, ο τελικός αριθμός των πειραματόζωων που μελετήθηκαν συνολικά ήταν 34 επίμυες (18 αρσενικοί, 16 θηλυκοί). Η επούλωση του τραύματος ήταν άριστη και στους 34 επίμυες.

Πραγματοποιήθηκε μία πιλοτική μελέτη σε 6 επίμυες (3 αρσενικά και 3 θηλυκά) από τους 36 συνολικά, προκειμένου να διαπιστωθεί η βιοσυμβατότητα του βιοϋλικού και να γίνει μία πρώιμη ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση (Chatzipetros et al 2018).

Πραγματοποιήθηκε Κωνικής Δέσμης Υπολογιστική Τομογραφία (CBCT) σε 28 ιστοτεμάχια επίμυων (15 αρσενικοί, 13 θηλυκοί). Τα 6 πειραματόζωα της πιλοτικής μελέτης που προηγήθηκε εξαιρέθηκαν από την ακτινολογική ανάλυση (Chatzipetros et al 2019).

Πραγματοποιήθηκε Ιστολογική και Ιστομορφομετρική Ανάλυση σε 34 ιστοτεμάχια επίμυων (18 αρσενικοί, 16 θηλυκοί).

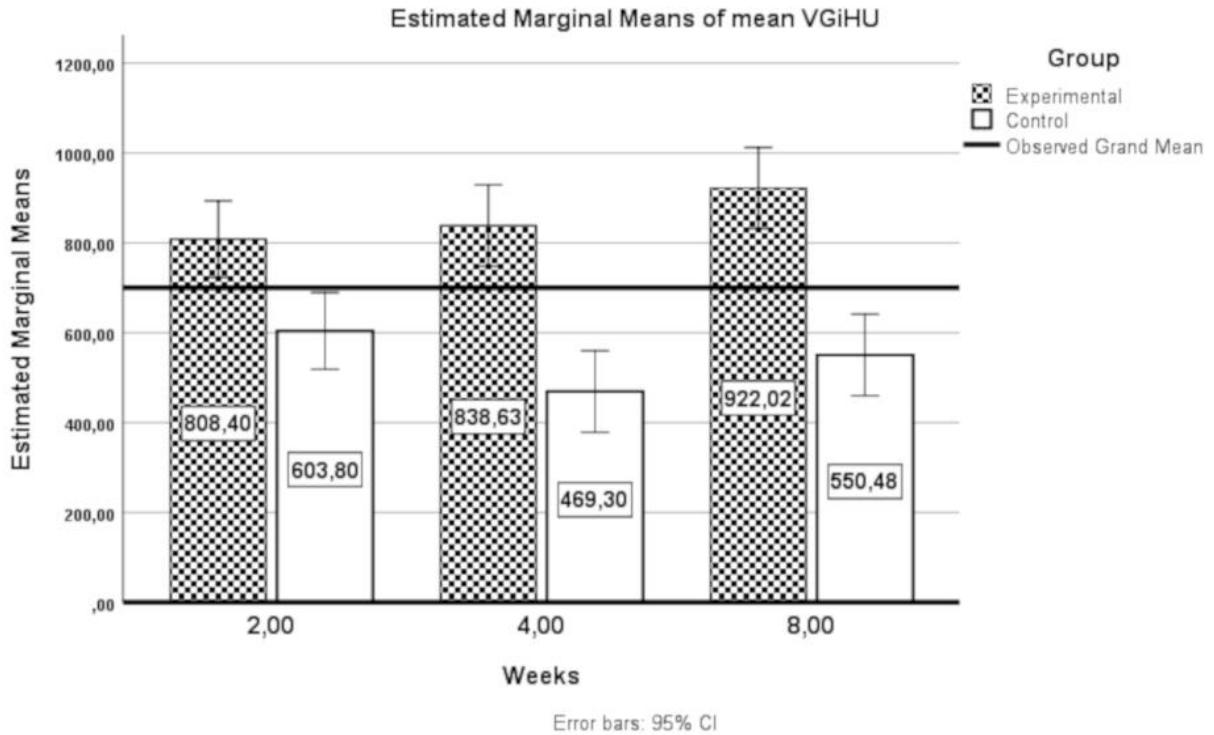
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ CBCT ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Σε αυτήν την ακτινολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε Κωνικής Δέσμης Υπολογιστική Τομογραφία σε 28 ιστοτεμάχια επίμυων (15 αρσενικοί, 13 θηλυκοί) προκειμένου να απεικονιστεί το βιοϋλικό nHAp/CS με τη χρήση CBCT.

Στη μελέτη μας οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν οι εξής: η μέση τιμή $^{V\text{Gi}}\text{HU}$ και η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Region Of Interest-ROI, σε mm^2). Με την εφαρμογή της πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης δημιουργείται μια νέα εξαρτημένη μεταβλητή, με βάση το γραμμικό συνδυασμό όλων των εξεταζόμενων εξαρτημένων μεταβλητών, η οποία μεγιστοποιεί, όσο περισσότερο γίνεται, τις διαφορές των μέσων όρων μεταξύ των ομάδων-επιπέδων της «ανεξάρτητης μεταβλητής». Η μέθοδος αυτή υλοποιεί ελέγχους των διαφορών των μέσων όρων σε δύο επίπεδα, το πολυμεταβλητό, όπου εξετάζεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω στο γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων μεταβλητών ταυτόχρονα, και το μονομεταβλητό, όπου ελέγχεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω σε καθεμιά εξαρτημένη μεταβλητή χωριστά (Scott & Windsor 2000). Η νέα εξαρτημένη μεταβλητή είναι ο συνδυασμός των δύο αυτών παραμέτρων ($^{V\text{Gi}}\text{HU}$ και ROI) και εκφράζει στην ουσία το επίπεδο διαβάθμισης του γκρι (grayscale value) με βάση το οποίο είναι δυνατό να απεικονιστεί το βιοϋλικό nHAp/CS με τη χρήση CBCT.

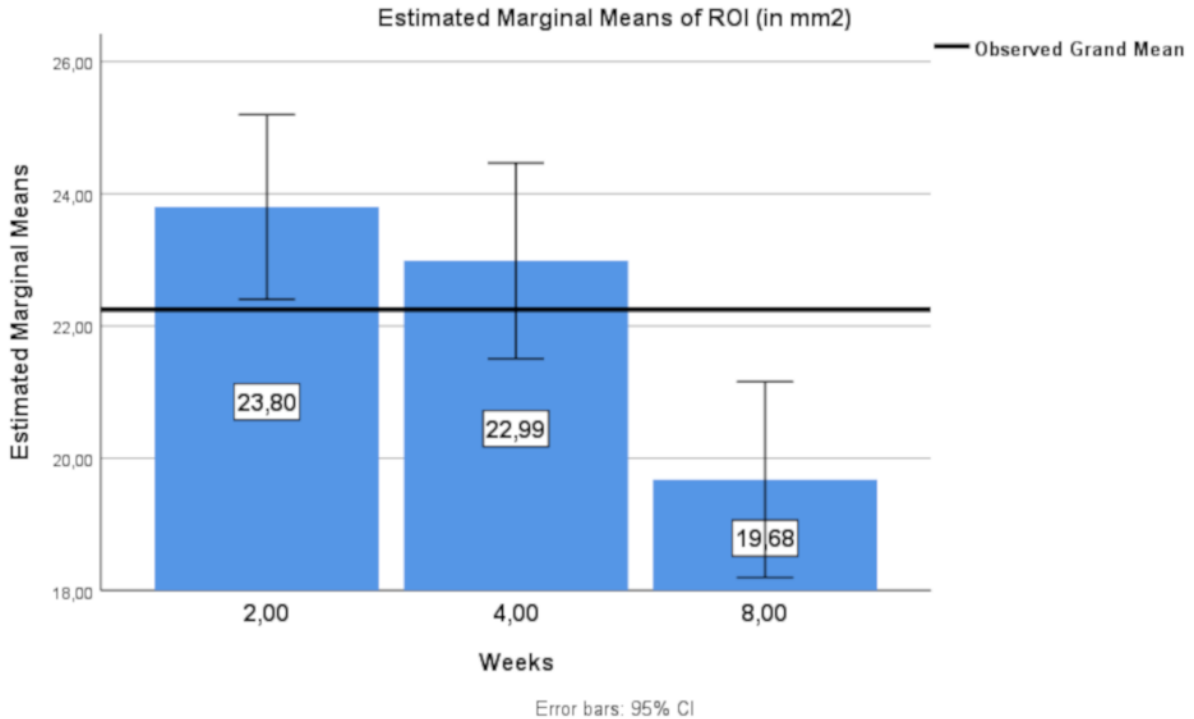
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων ($P=0.188$) όσον αφορά στη μέση τιμή του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι ($^{V\text{Gi}}\text{HU}$).

Η νέα εξαρτημένη μεταβλητή που δημιουργήθηκε περιελάμβανε το συνδυασμό του φύλου, του χρόνου σε εβδομάδες, των πειραματικών ομάδων (πειραματική ομάδα και ομάδα ελέγχου) και της σχέσης του χρόνου με τις πειραματικές ομάδες. Η προαναφερθείσα μεταβλητή είχε μία στατιστικά σημαντική επίδραση ($P<0.05$) στη μέση τιμή του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι ($^{V\text{Gi}}\text{HU}$) (Εικόνα 70).



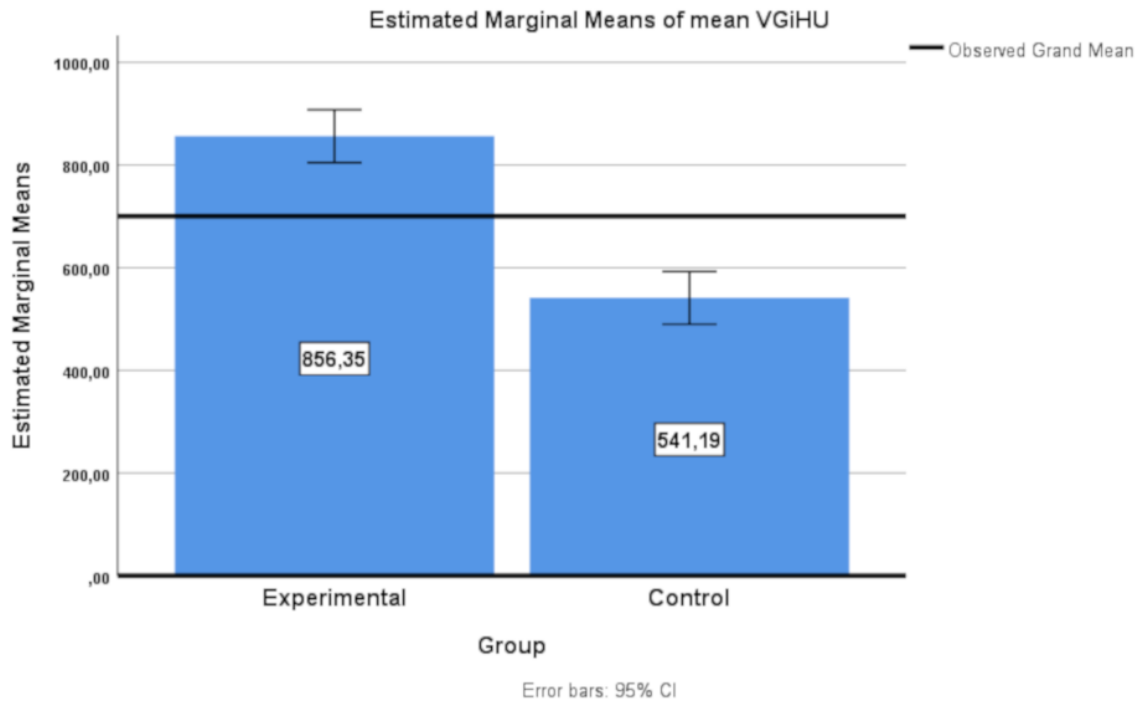
Εικόνα 70. Το επίπεδο διαβάθμισης του γκρι (mean ^{VGi}HU) ήταν υψηλότερο στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία (Chatzipetros et al 2019).

Η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, που ακτινολογικά εκφράζεται ως ROI (mm²), φαίνεται να μειώνεται από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου). Πιο συγκεκριμένα, από την 4^η στην 8^η εβδομάδα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της επιφάνειας του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (ROI) και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου) ($P=0.01$). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επιβεβαιώνει απεικονιστικά την κεντρομόλο οστική σύνθεση και την τάση που παρουσιάζεται τόσο στην πειραματική, όσο και στην ομάδα ελέγχου να πληρωθεί το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα με νεόπλαστο οστού (Εικόνα 71).



Εικόνα 71. Η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) μειώθηκε και στις δύο ομάδες από την 2^η (23.80mm²) στην 4^η (22.99mm²) εβδομάδα, και από την 4^η στην 8^η (19.68mm²) εβδομάδα (Chatzipetros et al 2019).

Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υψηλότερες μέσες τιμές ^{VGi}HU (856.35^{VGi}HU) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (541.19 ^{VGi}HU) σε όλες τις εβδομάδες (Εικόνα 72). Η μέση τιμή ^{VGi}HU προσδιορίστηκε ως ο μέσος όρος όλων των μετρήσεων ^{VGi}HU για κάθε ομάδα ξεχωριστά. Όσο υψηλότερες είναι οι τιμές αυτές, τόσο πιο ακτινοσκιερό απεικονίζεται το βιοϋλικό. Συνεπώς, το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα της πειραματικής ομάδας απεικονίζεται περισσότερο ακτινοσκιερό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0,000<<0,001$).



Εικόνα 72. Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε υψηλότερες μέσες τιμές ^{VGi}HU σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Chatzipetros et al 2019).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

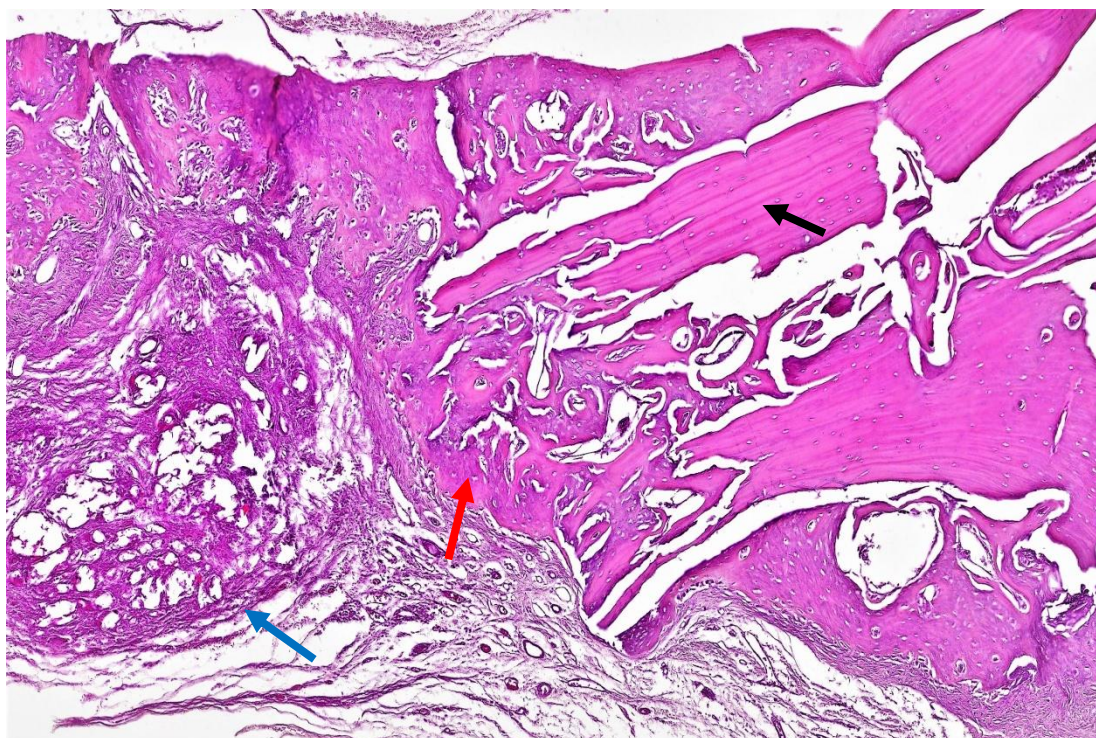
Χρησιμοποιήθηκαν 36 επίμυες Sprague Dawley (18 αρσενικοί και 18 θηλυκοί). Κατά τη μετεγχειρητική περίοδο 2 θηλυκοί επίμυες απεβίωσαν.

Συνεπώς, το δείγμα αποτελείτο από 34 επίμυες (18 αρσενικοί, 16 θηλυκοί).

Δημιουργήθηκαν 2 τυποποιημένα οστικά ελλείμματα 5mm στο δεξιό και αριστερό βρεγματικό οστούν κάθε πειραματόζωου αντίστοιχα. Στο δεξιό έλλειμμα τοποθετήθηκε το βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nHAp/CS) και αποτέλεσε την πειραματική ομάδα (Experimental, E). Το αριστερό έλλειμμα αφέθηκε κενό και αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (Control, C). Συνεπώς, 68 τυποποιημένα οστικά ελλείμματα ήταν διαθέσιμα για ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση (34 Experimental και 34 Control).

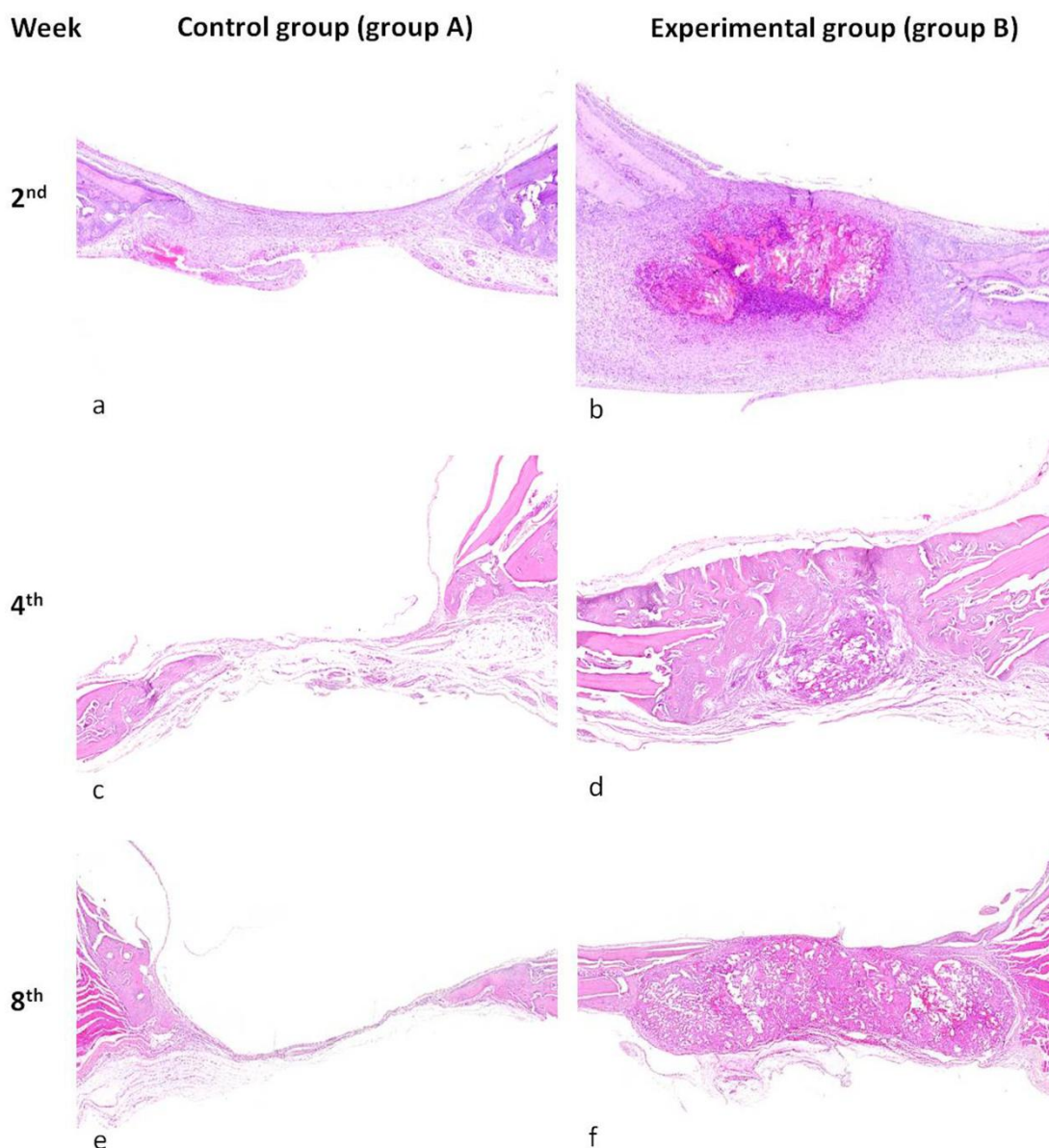
Πραγματοποιήθηκαν ευθανασίες σε διάστημα 2, 4 και 8 εβδομάδων (2, 4, 8 weeks).

Το νεοσχηματιζόμενο οστούν ήταν ινώδες με πολυάριθμα οστικά βοθρία. Κατά συνέπεια, το νεοσχηματιζόμενο οστούν θα μπορούσε εύκολα να διακριθεί από το προϋπάρχον οστούν στα όρια των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων, το οποίο ήταν πεταλιώδες και λιγότερο κυτταροβριθές (Εικόνα 73).



Εικόνα 73. Ιστολογική εικόνα τυποποιημένου οστικού ελλείμματος της πειραματικής ομάδας 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Με το κόκκινο βέλος διακρίνεται το νεοσχηματιζόμενο οστόν, το οποίο ήταν ινώδες με πολυάριθμα οστικά βοθρία. Με το μαύρο βέλος διακρίνεται το προϋπάρχον οστόν στα όρια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, το οποίο ήταν πεταλιώδες και λιγότερο κυτταροβριθές. Με το μπλε βέλος διακρίνεται το βιοϋλικό του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης.

Το ικρίωμα του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης παρουσίαζε καλή ενσωμάτωση στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε ιστολογικά από την απουσία σχηματισμού κοκκιώματος ξένου σώματος, πύου ή νέκρωσης (Εικόνα 74).



Εικόνα 74. Ιστολογικές εικόνες στις οποίες παρουσιάζεται ο σχηματισμός νεόπλαστου οστού τόσο στην ομάδα ελέγχου (Control group), όσο και στην πειραματική ομάδα (Experimental group) σε σχέση με το χρόνο-εβδομάδες ευθανασίας (2, 4, 8 εβδομάδες). Στους επίμυες που ευθανατώθηκαν στις 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε ελάχιστος σχηματισμός νεόπλαστου οστού μόνο στις περιφερικές περιοχές του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος και στις δύο ομάδες (a, b). Στις 4 (c, d) και στις 8 (e, f) εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε αυξημένος σχηματισμός νεόπλαστου οστού στις περιφερικές και στην κεντρική περιοχή του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (a, b, c, d, e, f: χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης x20) (Chatzipetros et al 2019).

Στις 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε ελάχιστος σχηματισμός νεόπλαστου οστού μόνο στις περιφερικές περιοχές (lateral 1, lateral 2) των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και των δύο ομάδων (πειραματική ομάδα και ομάδα ελέγχου). Παρατηρήθηκαν, επίσης, ήπια φλεγμονώδης διήθηση και λίγα

πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος περιφερικά του βιοϋλικού (Πίνακας 1). Στις κεντρικές περιοχές (central) των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και των δύο ομάδων δεν παρατηρήθηκε καμία εναπόθεση νεοσχηματισθέντος οστού (Εικόνα 74 a, b).

Εβδομάδες	Φλεγμονώδης διήθηση		Πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος		Σχηματισμός νεόπλαστου οστού	
	A	B	A	B	A	B
2 ^η	-	+	-	+	+	+
4 ^η	-	-	-	-	+	+++
8 ^η	-	-	-	-	+	++

“-” = καθόλου, “+” = λίγο, “++” = μέτριο, “+++” = πολύ

A= Ομάδα ελέγχου (Control), B= Πειραματική ομάδα (Experimental)

Πίνακας 1. Ιστολογική αξιολόγηση στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετεγχειρητικά.

Στις 4 και στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε περισσότερος σχηματισμός νεόπλαστου οστού (Πίνακας 1) στις περιφερικές περιοχές (lateral 1, lateral 2) της πειραματικής ομάδας (Ομάδα B) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Ομάδα A). Σε δεκατρία πειραματόζωα παρατηρήθηκε, επίσης, σχηματισμός νεόπλαστου οστού στις κεντρικές περιοχές (central) των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων της πειραματικής ομάδας (Εικόνα 74 d). Δεν υπήρχε καμία φλεγμονώδης διήθηση ή πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος σε γεινίαση με το βιοϋλικό (Εικόνα 74 c, d, e, f).

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic
C_Ost_I1	34	27.00	308.00	87.8824	60.93552
C_Ost_I2	34	50.00	425.00	165.9706	77.52360
C_Ost_Central	34	.00	103.00	10.2059	24.92386
C_Defi	34	2,527,330.00	7,501,960.00	4,357,912.7941	1,131,770.59767
C_I1	34	23,274.00	767,165.00	187,823.6765	144,210.76726
C_I2	34	166,777.00	908,828.00	455,725.6176	217,799.56215
C_Central	34	.00	395,315.00	33,551.3529	89,250.22930
E_Ost_I1	34	20.00	1,047.00	247.7059	215.04257
E_Ost_I2	34	126.00	1,465.00	465.8235	299.39560
E_Ost_Central	34	.00	288.00	39.3235	70.57071
E_Defi	34	2,878,851.00	7,741,718.00	4,824,005.9412	1,313,544.51599
Mat	34	338,994.00	6,279,613.00	2,229,117.2353	1,410,494.32799
E_I1	34	37,568.00	1,706,020.00	443,987.7735	398,374.28979
E_I2	34	98,469.00	2,564,927.00	1,005,525.1765	647,280.64267
E_Central	34	.00	764,414.00	116,619.5882	199,373.47523
FBR_C	34	6,38	37,41	15,9155	7,32262
FBR_E	34	6,75	77,82	33,8394	18,91056

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής ανάλυσης με βάση την προαναφερθείσα μεθοδολογία. Παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός των πειραματόζων (N), η ελάχιστη (Minimum), η μέγιστη (Maximum) και η μέση τιμή (Mean), καθώς επίσης και η τυπική απόκλιση (SD) των παραμέτρων που μελετήθηκαν.

Κλάσμα Οστικής Ανάπλασης (Fraction of Bone Regeneration, FBR) [%]

Το Κλάσμα Οστικής Ανάπλασης (FBR) αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την πορεία της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (GBR) (Kim et al 2016). Καταδεικνύει το σχηματισμό του νεόπλαστου οστού εντός των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και υπολογίζεται ξεχωριστά για την πειραματική ομάδα και για την ομάδα ελέγχου.

Η μέση τιμή του κλάσματος οστικής ανάπλασης της πειραματικής ομάδας (FBR_E) ήταν 33,8394% ενώ του κλάσματος οστικής ανάπλασης της ομάδας ελέγχου (FBR_C) ήταν 15,9155% (Πίνακας 2, 3). Με τη στατιστική δοκιμασία T-test παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 17,9239% του κλάσματος οστικής ανάπλασης της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0.000<<0.01$) (Πίνακας 4). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία του βιοϋλικού νάνο-Υδοξυαπατίτη/Χιτοζάνης συμβάλει σε αυξημένη οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού εντός των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Με τη δοκιμασία Power Analysis φαίνεται ότι τα αποτελέσματα αυτά θα συνεχίσουν να είναι στατιστικά σημαντικά με πιθανότητα 100% (Observed Power =1.000) όσον αφορά στη σχέση FBR με τις πειραματικές ομάδες ($P=0.000<<0.01$) (Πίνακας 5).

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	FBR_C	15,9155	34	7,32262	1,25582
	FBR_E	33,8394	34	18,91056	3,24313

Πίνακας 3. Η μέση τιμή του κλάσματος οστικής ανάπλασης της πειραματικής ομάδας (FBR_E) ήταν 33,8394% ενώ του κλάσματος οστικής ανάπλασης της ομάδας ελέγχου (FBR_C) ήταν 15,9155%.

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower	95% Confidence Interval of the Difference Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	FBR_C - FBR_E	-17,92394	17,50312	3,00176	-24,03107	-11,81681	-5,971	33	,000

Πίνακας 4. Το κλάσμα οστικής ανάπλασης της πειραματικής ομάδας ήταν αυξημένο κατά 17,9239% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0.000 < 0.01$).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ FBR αρσενικών και θηλυκών επίμυων ($P=0.06$) (Πίνακας 5). Οι αρσενικοί παρουσίαζαν FBR=27.596% ενώ οι θηλυκοί FBR=22.002% (Πίνακας 6).

Με τη στατιστική δοκιμασία one way ANOVA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του FBR σε σχέση με το χρόνο ($P=0.003$) (Πίνακας 5). Το FBR αυξήθηκε από την 2 έως την 8 εβδομάδα και στις δύο ομάδες (Πίνακας 7). Πιο συγκεκριμένα, με τη στατιστική δοκιμασία Post Hoc Tests (Bonferroni) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του FBR από τη 2^η στην 4^η εβδομάδα ($P=0,010$) και από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα ($P=0,03$) (Πίνακας 8). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την τάση που έχουν τα τυποποιημένα οστικά ελλείμματα και των δύο ομάδων να πληρωθούν από νεόπλαστο οστού με την πάροδο του χρόνου.

Με τη δοκιμασία Power Analysis φαίνεται ότι τα αποτελέσματα αυτά θα συνεχίσουν να είναι στατιστικά σημαντικά με πιθανότητα 90% (Observed Power =0.900) όσον αφορά στη σχέση FBR με το χρόνο ($P=0.003$) (Πίνακας 5).

Με τη στατιστική δοκιμασία one way ANOVA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ FBR των πειραματικών ομάδων και χρόνου ($P=0.009$) (Πίνακας 5). Πιο συγκεκριμένα, η μέση τιμή του FBR_C στις 2 εβδομάδες ήταν 14,881%, στις 4

εβδομάδες είναι 16,725% και στις 8 εβδομάδες ήταν 15,976%. Η μέση τιμή του FBR_E στις 2 εβδομάδες ήταν 19,957%, στις 4 εβδομάδες 39,130% και στις 8 εβδομάδες 42,126% (Πίνακας 9). Το FBR της πειραματικής ομάδας (FBR_E) παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες (2, 4, 8) σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 75). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το βιοϋλικό νάνο-Υδοξυαπατίτη/Χιτοζάνης φαίνεται να προάγει την οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού σε συνάρτηση με το χρόνο.

Με τη δοκιμασία Power Analysis φαίνεται ότι τα αποτελέσματα θα συνεχίσουν να είναι στατιστικά σημαντικά με πιθανότητα 80.3% (Observed Power =0.803) όσον αφορά στη σχέση FBR με το χρόνο και τις πειραματικές ομάδες ($P=0.009$) (Πίνακας 5).

Dependent Variable: FBR

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Observed Power ^b	Sig.
Corrected Model	11021,010 ^a	11	1001,910	7,004	1,000	,000
Intercept	41512,324	1	41512,324	290,183	1,000	,000
sex	528,190	1	528,190	3,692	,472	,060
Group	5393,070	1	5393,070	37,699	1,000	,000
weeks	1911,386	2	955,693	6,681	,900	,003
sex * Group	499,883	1	499,883	3,494	,451	,067
sex * weeks	792,382	2	396,191	2,769	,525	,071
Group * weeks	1465,517	2	732,758	5,122	,803	,009
sex * Group * weeks	148,543	2	74,272	,519	,131	,598
Error	8011,127	56	143,056			
Total	61116,541	68				
Corrected Total	19032,137	67				

- a. R Squared = ,579 (Adjusted R Squared = ,496)
 b. Computed using alpha = .05

Πίνακας 5. Παρουσίαση της σχέσης του FBR με το φύλο (sex), τις πειραματικές ομάδες (Group) και το χρόνο (weeks).

Dependent Variable: FBR

sex	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
M	27,596	1,993	23,603	31,590
F	22,002	2,122	17,751	26,253

Πίνακας 6. Οι αρσενικοί επίμυες (Male, M) παρουσίαζαν FBR=27.596% ενώ οι θηλυκοί (Female, F) FBR=22.002%. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Dependent Variable: FBR

weeks	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
2	17,419	2,441	12,528	22,310
4	27,928	2,561	22,798	33,057
8	29,051	2,561	23,921	34,180

Πίνακας 7. Το FBR αυξήθηκε από την 2 έως την 8 εβδομάδα. Τη 2^η εβδομάδα το FBR ήταν 17,419%, την 4^η εβδομάδα 27,928% και την 8^η εβδομάδα 29,051%.

Dependent Variable: FBR

Bonferroni

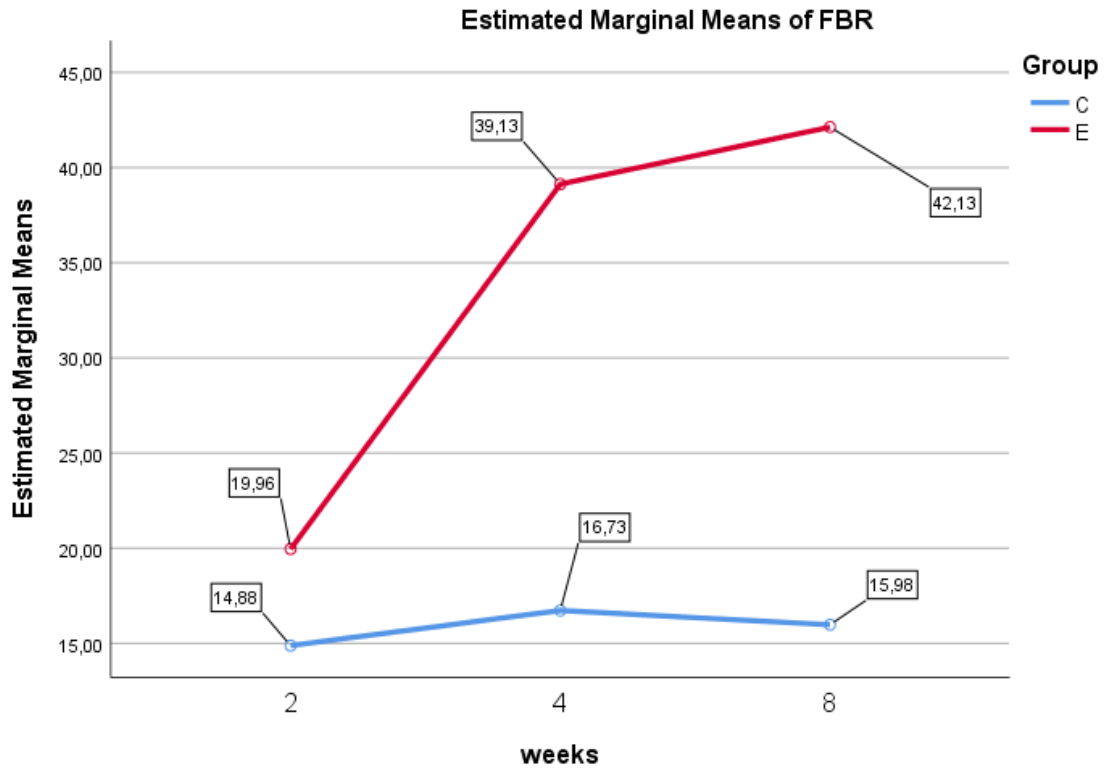
(I) weeks	(J) weeks	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2	4	-10,8260 [*]	3,53033	,010	-19,5390	-2,1131
	8	-12,2280 [*]	3,53033	,003	-20,9409	-3,5150
4	2	10,8260 [*]	3,53033	,010	2,1131	19,5390
	8	-1,4019	3,60626	1,000	-10,3022	7,4984
8	2	12,2280 [*]	3,53033	,003	3,5150	20,9409
	4	1,4019	3,60626	1,000	-7,4984	10,3022

Πίνακας 8. Το FBR αυξάνεται από τη 2^η στην 4^η εβδομάδα ($P=0,010$) και από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα ($P=0,03$) και στις δύο ομάδες.

Dependent Variable: FBR

Group	weeks	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
C	2	14,881	3,453	7,964	21,798
	4	16,725	3,621	9,471	23,980
	8	15,976	3,621	8,721	23,230
E	2	19,957	3,453	13,040	26,873
	4	39,130	3,621	31,876	46,385
	8	42,126	3,621	34,872	49,380

Πίνακας 9. Η μέση τιμή του FBR_C στις 2 εβδομάδες ήταν 14,881%, στις 4 εβδομάδες είναι 16,725% και στις 8 εβδομάδες ήταν 15,976%. Η μέση τιμή του FBR_E στις 2 εβδομάδες ήταν 19,957%, στις 4 εβδομάδες 39,130% και στις 8 εβδομάδες 42,126%.



Εικόνα 75. Το FBR της πειραματικής ομάδας (E, κόκκινη γραμμή) παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου (C, μπλε γραμμή) ($P=0.009$).

Βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (Material, Mat) [μm^2]

Κατά την ιστομορφομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της επιφάνειας του βιοϋλικού (σε μm^2). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών έδειξαν ότι το βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης έχει την τάση να απορροφάται σε σχέση με το χρόνο (2, 4, 8 εβδομάδες ευθανασίας) (Πίνακας 10).

Mat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
2	12	3,545,719.8333	1,339,540.27069	386,691.96794	2,694,616.5504	4,396,823.1163
4	11	1,114,298.1818	575,732.74560	173,589.95424	727,515.6605	1,501,080.7032
8	11	1,907,642.5455	836,147.56376	252,107.97621	1,345,910.9688	2,469,374.1222
Total	34	2,229,117.2353	1,410,494.32799	241,897.78160	1,736,972.4982	2,721,261.9724

Πίνακας 10. Η μέση τιμή (Mean) της επιφάνειας του βιοϋλικού μειώνεται από τη 2^η έως την 8^η εβδομάδα μετά τη χειρουργική διαδικασία. Κατά την 2^η εβδομάδα η μέση τιμή της επιφάνειας του βιοϋλικού είναι 3,545,719.8333 μm^2 , κατά την 4^η εβδομάδα 1,114,298.1818 μm^2 και κατά την 8^η εβδομάδα 1,907,642.5455 μm^2 .

Με τη στατιστική δοκιμασία one way ANOVA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιφάνειας του βιοϋλικού σε σχέση με το χρόνο ($P=0.000<<0.01$) (Πίνακας 11).

Mat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35609151294168,086	2	17804575647084,043	18,371	,000
Within Groups	30044158932164,030	31	969166417166,582		
Total	65653310226332,120	33			

Πίνακας 11. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιφάνειας του βιοϋλικού σε σχέση με το χρόνο ($P=0.000<<0.01$)

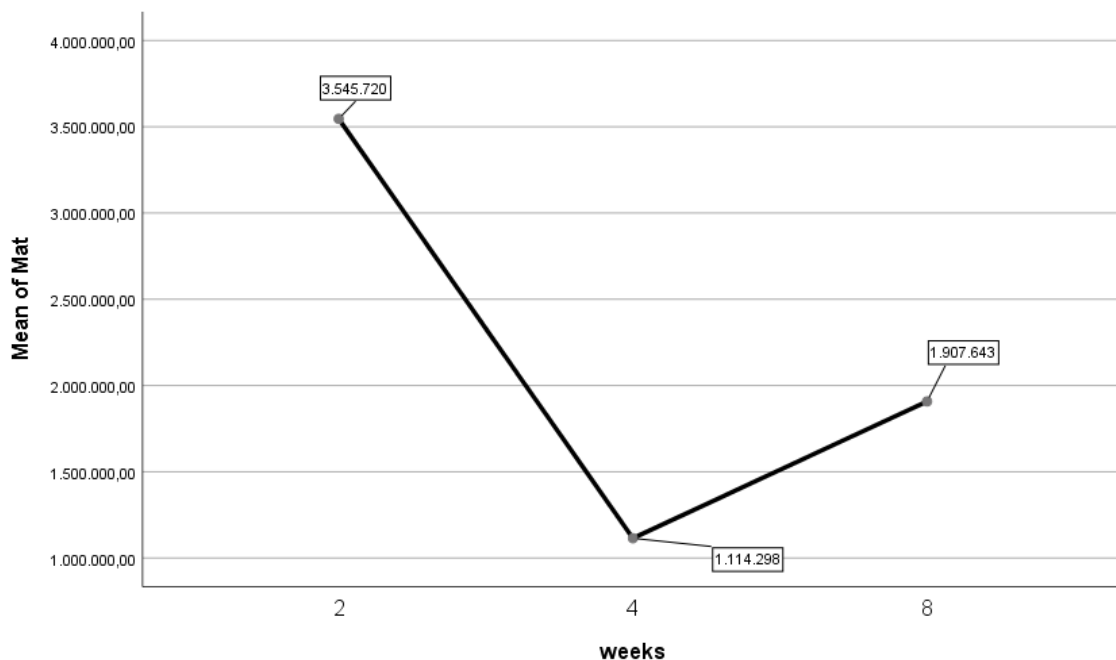
Πιο συγκεκριμένα με τη στατιστική δοκιμασία Post Hoc Tests (Bonferroni), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης τιμής της επιφάνειας του βιοϋλικού από τη 2^η (Mat= 3,545,719.8333 μm^2) στην 4^η εβδομάδα (Mat= 1,114,298.1818 μm^2) ($P=0.000$) και από τη 2^η (Mat= 3,545,719.8333 μm^2) στην 8^η εβδομάδα (Mat= 1,907,642.5455 μm^2) ($P=0.01$) (Πίνακας 12) (Εικόνα 76).

Dependent Variable: Mat

Bonferroni

(I) weeks	(J) weeks	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2	4	2,431,421.65152 [*]	410,937.83717	,000	1,391,368.4586	3,471,474.8444
	8	1,638,077.28788 [*]	410,937.83717	,001	598,024.0950	2,678,130.4808
4	2	-2,431,421.65152 [*]	410,937.83717	,000	-3,471,474.8444	-1,391,368.4586
	8	-793,344.36364	419,776.22116	,204	-1,855,766.8510	269,078.1237
8	2	-1,638,077.28788 [*]	410,937.83717	,001	-2,678,130.4808	-598,024.0950
	4	793,344.36364	419,776.22116	,204	-269,078.1237	1,855,766.8510

Πίνακας 12. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης τιμής της επιφάνειας του βιοϋλικού από τη 2^η (Mat= 3,545,719.8333μm²) στην 4^η εβδομάδα (Mat= 1,114,298.1818 μm²) (P=0.000) και από τη 2^η (Mat= 3,545,719.8333 μm²) στην 8^η εβδομάδα (Mat= 1,907,642.5455 μm²) (P=0.01)



Εικόνα 76. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η μείωση της μέσης τιμής της επιφάνειας του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα. Η φαινομενική αύξηση της επιφάνειας του βιοϋλικού από την 4^η στην 8^η εβδομάδα δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων ($P=0.330$) (Πίνακας 13, 14).

	sex	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mat	M	18	2,002,163.3333	1,347,028.50742	317,497.66402
	F	16	2,484,440.3750	1,479,569.03216	369,892.25804

Πίνακας 13. Η μέση τιμή της επιφάνειας του βιοϋλικού (Material, Mat) στους αρσενικούς επίμυες (Male, M) υπολογίστηκε $2002163\mu\text{m}^2$, ενώ στους θηλυκούς $2484440\mu\text{m}^2$.

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df				Lower	Upper
Mat	Equal variances assumed	,710	,406	-,995	32	,327	-482,277.04167	484,708.25207	-1,469,595.44215	505,041.35882
	Equal variances not assumed			-,989	30,593	,330	-482,277.04167	487,467.99814	-1,477,011.42158	512,457.33825

Πίνακας 14. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων ($P=0.330$).

Οστική πυκνότητα Οστεοκυττάρων (Cell Density, CD) [οστεοκύτταρα/ μm^2 ή οστεοκύτταρα/ mm^2]

Η κυτταρική πυκνότητα έχει υπολογιστεί ως οστεοκύτταρα/ μm^2 .

Για να είναι σαφέστερη και πιο ξεκάθαρη η κλινική ερμηνεία αυτού του κλάσματος πραγματοποιήθηκε αναγωγή των μm^2 σε mm^2 .

Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι $1 \text{ mm}^2 = 1.000.000 \mu\text{m}^2$, πολλαπλασιάσαμε τη μέση τιμή της κυτταρικής πυκνότητας με το 1.000.000.

Η μέση τιμή της κυτταρικής πυκνότητας της ομάδας ελέγχου ήταν 414,4889597 οστεοκύτταρα/ mm^2 . Η μέση τιμή της κυτταρικής πυκνότητας της πειραματικής ομάδας ήταν 519,56717669 οστεοκύτταρα/ mm^2 (Πίνακας 15).

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	CD_C	,00041448895970	34	,000117797393592	,000020202086334
	CD_E	,00051956717669	34	,000197891323694	,000033938082025

Πίνακας 15. Η μέση τιμή της κυτταρικής πυκνότητας της ομάδας ελέγχου ήταν 414,4889597 οστεοκύτταρα/ mm^2 . Η μέση τιμή της κυτταρικής πυκνότητας της πειραματικής ομάδας ήταν 519,56717669 οστεοκύτταρα/ mm^2 .

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της οστικής πυκνότητας (και των δύο ομάδων) στους αρσενικούς σε σχέση με τους θηλυκούς επίμυες.

Με τη στατιστική δοκιμασία T-test παρατηρήθηκε ότι η πειραματική ομάδα παρουσίαζε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης τιμής της κυτταρικής πυκνότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0.004$) (Πίνακας 16).

Paired Differences

		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower	95% Confidence Interval of the Difference Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	CD_C	-	,00019760	,00003388	-	-	-3,101	33	,004
	-	,00010507	4562526	8902891	,000174025	,000036130			
	CD_E	8216992			708337	725647			

Πίνακας 16. Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης τιμής της κυτταρικής πυκνότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0.004$).

Απόλυτος Αριθμός Οστεοκυττάρων (Osteocytes, Ost)

Υπολογίστηκε επίσης στην παρούσα μελέτη ο απόλυτος αριθμός των οστεοκυττάρων τα οποία εντοπίστηκαν στο νεόπλαστο οστού σε όλες τις καθορισμένες περιοχές ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI: lateral 1, lateral 2, central). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής σχετικά με τον απόλυτο αριθμό οστεοκυττάρων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Με τη στατιστική δοκιμασία T-test παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής του αριθμού των οστεοκυττάρων της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος (I1, I2, Central). Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε υψηλότερες μέσες τιμές απόλυτου αριθμού οστεοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος (Πίνακας 17, 18). Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή I1:

E_Ost_I1= 247 οστεοκύτταρα, C_Ost_I1= 87 οστεοκύτταρα ($P=0.000<<0.001$),

στην περιοχή I2:

E_Ost_I2= 465 οστεοκύτταρα, C_Ost_I2= 165 οστεοκύτταρα ($P=0.000<<0.001$),

στην περιοχή Central:

E_Ost_Central= 39 οστεοκύτταρα, C_Ost_Central= 10 οστεοκύτταρα ($P=0.040$)

Πίνακας 17. Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε υψηλότερες τιμές (μέση τιμή, Mean) απόλυτου αριθμού οστεοκυττάρων (E_Ost) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (C_Ost) σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος (I1, I2, Central).

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	C_Ost_I1	87.8824	34	60.93552	10.45035
	E_Ost_I1	247.7059	34	215.04257	36.87950
Pair 2	C_Ost_I2	165.9706	34	77.52360	13.29519
	E_Ost_I2	465.8235	34	299.39560	51.34592
Pair 3	C_Ost_Central	10.2059	34	24.92386	4.27441
	E_Ost_Central	39.3235	34	70.57071	12.10278

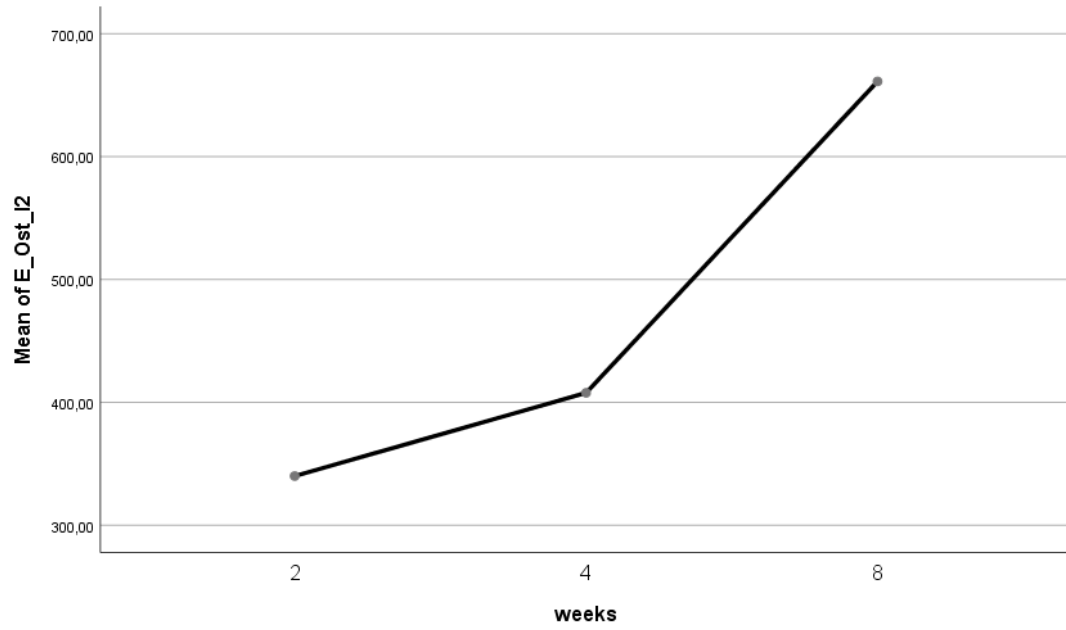
Paired Differences

		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower	95% Confidence Interval of the Difference Upper	t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	C_Ost_I1 - E_Ost_I1	-159.82353	218.26915	37.43285	-235.98124	-83.66582	-4,270	33	,000
Pair 2	C_Ost_I2 - E_Ost_I2	-299.85294	276.40814	47.40361	-396.29630	-203.40958	-6,326	33	,000
Pair 3	C_Ost_Central - E_Ost_Central	-29.11765	79.47356	13.62960	-56.84728	-1.38801	-2,136	33	,040

Πίνακας 18. Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε υψηλότερες τιμές απόλυτου αριθμού οστεοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή I1: E_Ost_I1=247,7059 οστεοκύτταρα, C_Ost_I1=87,8824 οστεοκύτταρα ($P=0.000 \ll 0.001$), στην περιοχή I2: E_Ost_I2=465,8235 οστεοκύτταρα, C_Ost_I2=165,9706 οστεοκύτταρα ($P=0.000 \ll 0.001$), στην περιοχή Central: E_Ost_Central=39,3235 οστεοκύτταρα, C_Ost_Central=10,2059 οστεοκύτταρα ($P=0.040$).

Οι αρσενικοί επίμυες παρουσίαζαν μεγαλύτερο αριθμό οστεοκυττάρων σε σχέση με τους θηλυκούς μόνο στην περιοχή I2 της πειραματικής ομάδας (E_Ost_I2) ($P=0.027$).

Με τη στατιστική δοκιμασία Post Hoc Test-Bonferroni παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των οστεοκυττάρων (μέση τιμή) αυξάνεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από την 2^η (340 οστεοκύτταρα) έως την 8^η εβδομάδα (661.1818 οστεοκύτταρα) στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (E_Ost_I2) ($P=0.025$) (Εικόνα 77).



Εικόνα 77. Ο αριθμός των οστεοκυττάρων (μέση τιμή) αυξάνεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από την 2^η (340 οστεοκύτταρα) έως την 8^η εβδομάδα (661.1818 οστεοκύτταρα) στην I2 περιοχή της πειραματικής ομάδας (E_Ost_I2) ($P=0.025$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η επίδραση του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nHAp/CS) 75/25 w/w με σύσταση ικριώματος (scaffold) στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (GBR) σε αμφοτερόπλευρα τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα (CSD) διαμέτρου 5mm ενήλικων επίμυων Sprague Dawley. Η επίδραση του nHAp/CS στην GBR αξιολογήθηκε με ιστομορφομετρική ανάλυση και το βιοϋλικό απεικονίστηκε με τη χρήση κωνικής δέσμης υπολογιστικής τομογραφίας (CBCT). Η μελέτη αυτή προσδίδει σημαντική υποστήριξη στα ακόλουθα ευρήματα: (1) Η χρήση του CBCT για την απεικόνιση βιοϋλικών όπως τα ικριώματα nHAp/CS 75/25 w/w κρίνεται επαρκής. (2) Το βιοϋλικό του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης επιδρά θετικά όσον αφορά στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε έπειτα από ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση. Τα ικριώματα nHAp/CS 75/25 w/w φαίνεται να προάγουν την οστική σύνθεση νεόπλαστου οστού εντός των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων, όπως καταδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές του κλάσματος οστικής ανάπτυξης (Fraction of Bone Regeneration, FBR), της κυτταρικής πυκνότητας των οστεοκυττάρων (Cell Density, CD) και του απόλυτου αριθμού των οστεοκυττάρων (Osteocytes, Ost) στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (3) Η βιοαποικοδομησιμότητα του nHAp/CS 75/25 w/w κρίνεται επαρκής. Η επιφάνεια του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης έχει την τάση να μειώνεται σε σχέση με το χρόνο (2, 4, 8 εβδομάδες ευθανασίας).

Διάφορα βιοϋλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως συνθετικά οστικά μόσχευματα, τα οποία παρέχουν μία μήτρα (matrix) οστεοκαθοδήγησης, η οποία ενισχύει τη σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού εντός τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων (CSD) (Buser et al 1998). Τα βιοϋλικά αυτά θα πρέπει να διαθέτουν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του φυσικού οστίτη ιστού, καθώς επίσης και μία πορώδη δομή, η οποία θα επιτρέπει τη μετανάστευση των οστεοβλαστών και θα προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους (Olszta et al 2007). Το ιδανικό συνθετικό οστικό μόσχευμα θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: αυξημένη κυτταρική προσκόλληση, υποστήριξη της κυτταρικής διαφοροποίησης αναγεννητικών κυττάρων και δημιουργία ακανόνιστων σχημάτων, βιοσυμβατότητα, οστεοκαθοδήγηση, οστεοεπαγωγή, ελεγχόμενη βιοαποικοδομησιμότητα και

ικανότητα ανάπτυξης νεόπλαστου οστίτη ιστού εντός της περιοχής της οστικής ανάπλασης (Moore et al 2001, Rezwan et al 2006, Navarro et al 2008).

Οι σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες, λοιπόν, κατευθύνονται προς την ανάπτυξη πορώδων τρισδιάστατων κριωμάτων (scaffolds), ανόργανης και οργανικής φύσης, τα οποία διαθέτουν ιδιότητες οστεοκαθοδήγησης, βιοσυμβατότητας και αιμοσυμβατότητας. Μία ποικιλία από φυσικά πολυμερή βιοϋλικά, όπως ζελατίνη, κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, αλγινικά και χιτοζάνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη των κριωμάτων στην εμβιομηχανική των ιστών (O'Brien 2011, Vlierberghe et al 2011, Ding et al 2014, Atak et al 2017).

Η χιτοζάνη έχει προκαλέσει ενδιαφέρον στον τομέα της ιατρικής βιοτεχνολογίας λόγω της αντιβακτηριακής της φύσης, της ελάχιστης αντίδρασης ξένου σώματος που προκαλεί, της βιοσυμβατότητας, της μη τοξικότητας και της ικανότητάς της να παράγει πορώδεις δομές κατάλληλες για την κυτταρική ανάπτυξη και οστεοκαθοδήγηση. Παρουσιάζει, επίσης δομική ομοιότητα με τις γλυκοζαμινογλυκάνες και επιτρέπει την ανάπτυξη σύνθετων κριωμάτων που πληρούν μηχανικές και βιολογικές προδιαγραφές για βιοϊατρικές εφαρμογές (Di Martino et al 2005, Tigli et al 2007, Chang et al 2013, Ding et al 2014, He et al 2015). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί η ιδιότητα των σύνθετων κριωμάτων χιτοζάνης να ενσωματώνουν βιοκεραμικά υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης (Cui et al 2010, Ding et al 2014).

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί το βασικό συστατικό του οστίτη ιστού. Ως εκ τούτου, ο συνθετικός υδροξυαπατίτης είναι ένα εξαιρετικό βιοϋλικό, το οποίο λόγω της βιοσυμβατότητάς του, της μη τοξικής και μη αντιγονικής συμπεριφοράς του έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην έρευνα των σύγχρονων βιοϋλικών και στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση (Hench 1998, Bonucci 2000, Blaker et al 2003, Kim & Mendis 2006, Sun & Yang 2015, Atak et al 2017). Τα σωματίδια του υδροξυαπατίτη πρέπει να έχουν στενή κατανομή μεγέθους μεταξύ των κρυστάλλων τους, μεγάλη ειδική επιφάνεια και υψηλή καθαρότητα (Castro et al 2013).

Στις σύγχρονες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοσχευματικά υλικά πορώδη κριώματα τα οποία αποτελούνται συνήθως από νάνο-υδροξυαπατίτη και χιτοζάνη (Kong et al 2006, Kashiwazaki et al 2009, Thein-Han et al 2009, Sun & Yang 2015, Organ και συν 2017). Τα κριώματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης παρουσιάζουν βελτιωμένη απόκριση προ-οστεοβλαστών, κυτταρική προσκόλληση, ταχύτερο πολλαπλασιασμό και πολύ καλή κατανομή μέσα στη μορφολογία του βιοϋλικού (Thein-Han et al 2009, Atak et al 2017). Ο nHAp αποτελεί ένα οστεοκαθοδηγητικό και

βιοαποικοδομήσιμο βιοϋλικό. Μετά από την τοποθέτηση του nHAp σε ένα οστικό έλλειμμα παρατηρείται βαθμιαία αντικατάσταση του βιοϋλικού από οστίτη ιστό. Ο συνδυασμός βιοπολυμερών υλικών, όπως η χιτοζάνη, με το nHAp έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση των φυσικομηχανικών ιδιοτήτων του nHAp (Nath et al 2009, Sun & Yang 2015).

Έχει διεξαχθεί επίσης συγκριτική μελέτη, η οποία διερευνά τα κριώματα μικρο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης σε σχέση με τα κριώματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης. Ο συνολικός όγκος, η συνολική οστική πυκνότητα και η οστική επιφάνεια βρέθηκαν να είναι υψηλότερα στα κριώματα νάνο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης σε σχέση με τα κριώματα μικρο-υδροξυαπατίτη/χιτοζάνης, υποδηλώνοντας τα πλεονεκτήματα του πρώτου βιοϋλικού (Lee et al 2014).

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διερευνηθεί η βιολογική συμπεριφορά του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) 80/20 w/w σε επίμυες (Kashiwazaki et al 2009, Oryan et al 2017). Παρατηρήθηκε, εντούτοις, ότι όταν η συγκέντρωση του υδροξυαπατίτη υπερβαίνει το 80% τα δημιουργούμενα κριώματα παρουσίαζαν μειωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες όπως για παράδειγμα μειωμένη αντοχή στη θραύση (Tsiourvas et al 2016). Με βάση τη μελέτη του Tsiourvas et al 2016 η προτεινόμενη αναλογία του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) είναι 75/25 w/w, παρέχοντας στα δημιουργούμενα κριώματα βελτιωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες. Στην παρούσα μελέτη (Chatzipetros et al 2018, Chatzipetros et al 2019) χρησιμοποιήθηκε το κριώμα νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) με αναλογία 75/25 w/w.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διερευνηθεί το βέλτιστο μέγεθος πόρου για εσωτερική ανάπτυξη οστίτη ιστού εντός πορωδών κριωμάτων. Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στα 100-400 μ m (Bobyn et al 1980, Cook et al 1985, Whang et al 1999, Itala et al 2001, Liao et al 2010, Otsuki et al 2006, Atak et al 2017).

Με βάση τη μελέτη του Tsiourvas et al 2016 το προτεινόμενο μέγεθος πόρου σε διαστάσεις εγκάρσιας διατομής πόρων έχει εύρος 200-700 μ m, παρέχοντας στα δημιουργούμενα κριώματα βελτιωμένες φυσικομηχανικές ιδιότητες. Στη μελέτη αυτή επίσης, παρουσιάζονται βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, βελτιωμένη αντοχή στη θλίψη των κριωμάτων nHAp/CS σε σχέση με αυτά mHAp/CS. Παρατηρούνται επίσης βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες στα κριώματα με βάση την N-ακετυλιωμένη CS σε σχέση με τα κριώματα που αποτελούνταν από CS. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ικανότητα της χιτίνης να σχηματίζει ένα εκτεταμένο δίκτυο μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων του πολυμερούς, λόγω της παρουσίας πλευρικών

ομάδων αμιδίου (αμινομαδων) που προσδίδει στο πολυμερές πλέγμα αυξημένη αντοχή (Tsiourvas et al 2016). Στην παρούσα μελέτη (Chatzipetros et al 2018, Chatzipetros et al 2019) χρησιμοποιήθηκε το ικρίωμα νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (nano-Hydroxyapatite/Chitosan, nHAp/CS) με πορώδες $85 \pm 2\%$, αναλογία 75/25 w/w, και παρουσία πόρων με διαστάσεις που κυμαίνονται κυρίως μεταξύ 20-100 μm .

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία, οι απόψεις δίστανται όσον αφορά στην προσθήκη αυξητικών παραγόντων και μορφωγενετικών πρωτεϊνών σε συνθετικά οστικά μοσχεύματα. Σύμφωνα με τη μελέτη των Nakamura et al 2017, η προσθήκη BMP-2 σε τυποποιημένα οστικά ελλείμματα επίμυων οδήγησε σε ταχύτερη οστική ανάπλαση σε 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία (Nakamura et al 2017). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η προσθήκη αυξητικών παραγόντων εντός των βιοϋλικών προάγει τη νεοαγγειογένεση, γεγονός το οποίο έχει ως συνέπεια την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης νεοπλασιών. Συνεπώς, συνίσταται η χρήση μοσχευματικών υλικών τα οποία δεν απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες (Lohmann et al 2017). Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε προσθήκη αυξητικού παράγοντα εντός του ικρίωματος nHAp/CS (Chatzipetros et al 2018, Chatzipetros et al 2019).

Η χρήση μεμβρανών και καρφίδων για την κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση τυποποιημένων κρανιακών οστικών ελλειμμάτων επίμυων τείνει να περιοριστεί. Σε σύγχρονες μελέτες δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη διατήρηση της ακεραιότητας του περιostίου και στη συρραφή του τραύματος κατά στρώματα. Το περίostιο διαθέτει κύτταρα με οστεοβλαστικά χαρακτηριστικά στις υποπεριοστικές περιοχές. Η θεωρία που υποστηρίζεται είναι ότι οι μεμβράνες μπορεί να εμποδίζουν την ανάπτυξη των νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων, περιορίζοντας έτσι την κυτταρική εσωτερική ανάπτυξη από το περίostιο και την ενσωμάτωση του μοσχεύματος με το προϋπάρχον οστόν (Ghiacci et al 2016). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συρραφή του περιostίου κατά στρώματα χωρίς την τοποθέτηση μεμβράνης ή καρφίδων (Chatzipetros et al 2018, Chatzipetros et al 2019).

Η επιλογή και των δύο φύλων σε αυτή τη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συμφωνία με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institute of Health, NIH) που έχει επισημάνει με ανακοίνωσή του («Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research», NOT-OD-15-102) την υπερβολική εξάρτηση σε αρσενικά ζώα και κύτταρα στην παγκόσμια έρευνα. Η χρήση και των δύο φύλων εξαλείφει επίσης το φύλο ως μεταβλητή στη στατιστική ανάλυση. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά

σημαντική διαφορά στο κλάσμα οστικής ανάπλασης, στην κυτταρική πυκνότητα των οστεοκυττάρων και στη βιοαποικοδομησιμότητα βιοϋλικού μεταξύ αρσενικών και θηλυκών αρουραίων στη μελέτη μας. Οι αρσενικοί επίμυες παρουσίαζαν μεγαλύτερο αριθμό οστεοκυττάρων σε σχέση με τους θηλυκούς μόνο στην περιοχή lateral 2 (I2) της πειραματικής ομάδας, γεγονός το οποίο κρίνεται μη αξιολογήσιμο και αποδίδεται σε τυχαιότητα. Η επιλογή και των δύο φύλων στην παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με άλλες σύγχρονες μελέτες (Townsend et al 2017), καθώς επίσης, είναι σε συμφωνία και με τις κατευθυντήριες οδηγίες του National Institute of Health (NIH, NOT-OD-15-102).

Η μελέτη της κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης (GBR) συχνά περιλαμβάνει τη χρήση *in vivo* πειραματικών μοντέλων. Το πειραματικό μοντέλο σε κεφαλές επίμυων αποτελεί μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την προ-κλινική αξιολόγηση βιοϋλικών-οστικών μοσχευμάτων, εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι σχετικά χαμηλού κόστους, παρέχοντας ταυτόχρονα επαρκή ανατομική πρόσβαση και σχετικά εύκολη χειρουργική τεχνική (Gomes et al 2011). Εντούτοις, το πειραματικό μοντέλο σε κεφαλές επίμυων αποτελεί ένα απαιτητικό μοντέλο, εξαιτίας του γεγονότος ότι το εγκεφαλικό κρανίο έχει σπουδαία ανατομικά στοιχεία όπως η σκληρά μήνιγγα του εγκεφάλου και ο άνω οβελιαίος κόλπος. Παρουσιάζει, επίσης, σχετικά φτωχή αιμάτωση και περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών (Kim et al 2016, Lohmann et al 2017). Το τυποποιημένο κρανιακό οστικό έλλειμμα σε κεφαλές επίμυων (Critical-Sized Defect, CSD) είναι «το μικρότερο δυνατό ενδοοστικό τραύμα το οποίο δεν επουλώνεται αυθόρμητα» (Donos et al 2015). Στη σύγχρονη βιβλιογραφία υπάρχει σύγχυση όσον αφορά στην επιλογή του κατάλληλου μεγέθους του κυκλικού τυποποιημένου κρανιακού οστικού ελλείμματος σε πειραματικό μοντέλο σε κεφαλή επίμυων. Οι περισσότεροι ερευνητές προτείνουν ένα κυκλικό τυποποιημένο κρανιακό οστικό έλλειμμα ολικού πάχους και διαμέτρου 5mm (Kim et al 2014, Vajgel et al 2014, Al-Kattan et al 2016, de Santana et al 2016, Ghiacci et al 2016, Zhang et al 2016, Gao et al 2018, Chatzipetros et al 2018, Chatzipetros et al 2019), ενώ αρκετοί προτείνουν ένα CSD 8mm (Kim et al 2016, Mukherjee et al 2003, Lohmann et al 2017, Townsend et al 2017). Τα CSD διαμέτρου 5mm διευκολύνουν τη χειρουργική διαδικασία, επιτρέποντας την ταυτόχρονη δημιουργία δύο αμφοτερόπλευρων CSD. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η νοσηρότητα και η θνησιμότητα των επίμυων, και κατά συνέπεια μειώνεται και ο συνολικός αριθμός των πειραματόζων που απαιτούνται (Pryor et al 2005, Ghiacci et al 2016). Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή CSD ολικού πάχους διαμέτρου 5mm επέτρεψε τη δημιουργία αμφοτερόπλευρων CSD στο δεξιό και αριστερό βρεγματικό

οστούν της κεφαλής 36 επίμυων. Έτσι, σε κάθε κεφαλή υπήρχε ταυτόχρονα η πειραματική ομάδα (δεξιό βρεγματικό οστούν) και η ομάδα ελέγχου (αριστερό βρεγματικό οστούν). Με αυτόν τον τρόπο μειώθηκε ο συνολικός αριθμός των πειραματόζωων που απαιτούνταν για τη διενέργεια της μελέτης, γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experimental guidelines) (Kilkenny et al 2010). Στην παρούσα μελέτη, επίσης, η επιλογή αμφοτερόπλευρων CSD διαμέτρου 5mm, επέτρεψε την ταυτόχρονη συγκριτική αξιολόγηση της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου στο ίδιο πειραματόζωο, στην ακτινολογική, στην ιστολογική και στην ιστομορφομετρική ανάλυση. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία και με άλλες σύγχρονες μελέτες (Bosch et al 1998, Pryor et al 2005, Ghiacci et al 2016). Από την άλλη πλευρά, η επιλογή των αμφοτερόπλευρων CSD στην παρούσα μελέτη δεν επέτρεψε την τυχαιοποίηση των πειραματικών ομάδων. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να αποτελεί έναν περιορισμό για την ταυτόχρονη αξιολόγηση των CSD των δύο ομάδων. Παρόλαυτά, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε τυχαιοποίηση στην κατανομή των ομάδων σε σχέση με το χρόνο. Οι παρατηρητές ήταν τυφλοί όσον αφορά στις εβδομάδες ευθανασίας (2, 4 και 8 εβδομάδες). Επομένως, οι παρατηρητές έμειναν ανεπηρέαστοι όσον αφορά στην πορεία της οστικής ανάπτυξης (concealment, «απόκρυψη της σειράς» της κατανομής των υποκειμένων στις μελετώμενες ομάδες) (Schulz 1996). Ένας επιπλέον περιορισμός στην παρούσα μελέτη είναι το γεγονός ότι σε τέτοιου είδους προ-κλινικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα πειραματόζωων καθίσταται πολύ δύσκολη η «μεταφορά» (transferability) των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων στον άνθρωπο (Auer et al 2007). Επίσης, το πειραματικό μοντέλο σε κεφαλές επίμυων αποτελεί ένα μοντέλο μελέτης για ενδομεμβρανώδη κυρίως οστεοποίηση και λιγότερο για τη μελέτη της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, γεγονός το οποίο ίσως αποτελεί έναν ακόμα περιορισμό για τη μεταφορά των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων στην ανθρώπινη φαντασική απόφαση (Spicer et al 2012, Lohmann et al 2017). Το πειραματικό μοντέλο σε κεφαλές επίμυων αποτελεί μία από τις πλέον αξιόπιστες μεθόδους για την προ-κλινική αξιολόγηση βιοϋλικών-οστικών μοσχευμάτων και τη χρήση τους σε εφαρμογές κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η χρήση άλλων πειραματικών μοντέλων για την περαιτέρω αξιολόγηση βιοϋλικών όπως το ικρίωμα του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης.

Όσον αφορά στην ακτινολογική απεικόνιση, η μικρο-υπολογιστική τομογραφία (μ-CT) θεωρείται ως ο «χρυσός κανόνας» (gold standard) για την απεικόνιση των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων (CSD), καθώς επίσης για τη μελέτη της οστικής

σύνθεσης σε μικρά ιστοτεμάχια όπως οι κεφαλές των επίμυων (Song et al 2014, Zhang et al 2016, Nakamura 2017). Από την άλλη πλευρά, η κωνικής δέσμης υπολογιστική τομογραφία (CBCT) είναι ένα ακριβές εργαλείο, αφενός για την προεγχειρητική αξιολόγηση των οστικών δομών της στοματικής και γναθοπροσωπικής περιοχής, και αφετέρου για τη διερεύνηση της παρουσίας οστικών μοσχευμάτων (Ito et al 2001). Η δόση της ακτινοβολίας εξαρτάται από τον τύπο της συσκευής CBCT, τις ρυθμίσεις σάρωσης, όπως το πεδίο απεικόνισης (FOV), τις λειτουργίες σάρωσης και τον αριθμό των βασικών προβολών (Pauwels et al 2012). Η ποιότητα της εικόνας εξαρτάται από το επιλεγμένο FOV και τις ρυθμίσεις σάρωσης οποιασδήποτε συσκευής CBCT (Mah et al 2010). Χρησιμοποιώντας το CBCT, οι διαστάσεις των οστικών δομών και η εγγύτητα ενός οδοντικού εμφυτεύματος με φυσιολογικές ανατομικές δομές μπορούν να εκτιμηθούν με ακρίβεια, επειδή το CBCT παρουσιάζει υψηλή γεωμετρική ακρίβεια για γραμμικές μετρήσεις (Lagravère et al 2008). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κωνικής δέσμης υπολογιστική τομογραφία (CBCT) για την απεικόνιση των ικριωμάτων νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης (Chatzipetros et al 2019).

Επιπροσθέτως, σύγχρονες μελέτες παρουσιάζουν μία συσχέτιση μεταξύ των τιμών Hounsfield Units (HU) του πολύ-τομικού υπολογιστικού τομογράφου (MSCT) με τις τιμές διαβάθμισης του γκρι (gray values, GVs) του CBCT (Aranyarachkul et al 2005, Lagravère et al 2006, Naitoh et al 2009, Mah et al 2010, Naitoh et al 2010, Nomura et al 2010). Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, υποστηρίζουν ότι το CBCT δεν θα πρέπει να θεωρείται ως εξέταση εκλογής για τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας του οστίτη ιστού. Συχνά, αναμένονται σφάλματα όταν οι εικόνες CBCT χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της ποιότητας των σαρωμένων οστικών δομών. Οι εικόνες που προκύπτουν από CBCT εμφανίζουν ασυνέπειες και αυθαιρεσίες όσον αφορά στις εξής παραμέτρους: στις τιμές grayscale values (GVs), στη σκέδαση της ακτινοβολίας, στις διαφορετικές τιμές που προκύπτουν από διαφορετικές συσκευές CBCT, στις αλλαγές στο FOV, στο «X-ray beam hardening effect» και στο «projection data discontinuity effect» (Campos et al 2014). Επιπλέον, αναφέρεται σαφώς στο SEDENTEXCT (2011) ότι υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με τη χρήση του CBCT για την εξαγωγή τιμών HU ή άλλων μετρήσεων της πυκνότητας του οστού. Το CBCT δε συνίσταται ως καθημερινή κλινική πρακτική για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας και τη διερεύνηση της οστικής ποιότητας (ICRP 2011). Από την άλλη πλευρά, το CBCT έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην οδοντιατρική για πάνω από δύο δεκαετίες. Η κλινική του χρήση προσφέρει υψηλής ποιότητας εικόνα με χαμηλό κόστος και χαμηλή δόση ακτινοβολίας. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει

ότι η ακρίβεια της CBCT στην αξιολόγηση δοκιδωτών οστικών δομών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη του μ -CT. Η χρήση του έχει επίσης εφαρμοστεί σε πειραματικές μελέτες *in vivo* και *ex vivo* (Ponder et al 2013, Van Dessel et al 2017, Liang et al 2017, Kulah et al 2018). Στην παρούσα μελέτη με τη χρήση μίας συσκευής New Tom VGi CBCT imaging unit (Verona, Italy, 110kV, 6mA, 8x8 High Resolution Field Of View-FOV voxel size 0.127mm, και 5.4sec exposure time) και με τη χρήση του ειδικού λογισμικού (NNT v6.2 software, Verona, Italy) εκτιμήθηκαν η μέση τιμή του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι (grayscale value, σε ^{VGi}HU), η τυπική απόκλιση αυτής της μέτρησης (standard deviation, $SD^{VGi}HU$) και η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Region Of Interest-ROI, σε mm^2) στην ομάδα ελέγχου και στην πειραματική ομάδα. Με αυτόν τον τρόπο απεικονίστηκε το ικριώμα nHAP/CS της πειραματικής ομάδας και πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις του επιπέδου της διαβάθμισης του γκρι στα CSD (Chatzipetros et al 2019).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε οστική σύνθεση νεόπλαστου οστού στα CSD της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου κατά τη διάρκεια της επουλωτικής διαδικασίας. Η πειραματική ομάδα (nHAP/CS) παρουσίαζε υψηλότερες τιμές ^{VGi}HU σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός το οποίο τεκμηριώθηκε και με ιστολογική/ιστομορφομετρική ανάλυση (Chatzipetros et al 2019). Συνεπώς, το CSD το οποίο περιείχε το βιοϋλικό απεικονιζόταν περισσότερο ακτινοσκοπικό σε σχέση με το CSD το οποίο δεν πληρώθηκε με το βιοϋλικό. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει στην αυξημένη οστική σύνθεση της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, λόγω της παρουσίας του ικριώματος nHAP/CS. Η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, που ακτινολογικά εκφράζεται ως ROI (mm^2), φαίνεται να μειώνεται από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επιβεβαιώνει απεικονιστικά την κεντρομόλο οστική σύνθεση και την τάση που παρουσιάζεται τόσο στην πειραματική, όσο και στην ομάδα ελέγχου να πληρωθεί το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα με νεόπλαστο οστού. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων παρόμοιων σύγχρονων μελετών (Johari et al 2016, Zhang et al 2016, Oryan et al 2017, Gao et al 2018). Παρόλα αυτά, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα της μελέτης μας βασίζονται μόνο στη χρήση συγκεκριμένου λογισμικού που παρέχεται από μια συγκεκριμένη μονάδα CBCT. Ωστόσο, η μονάδα CBCT υψηλής ανάλυσης (NewTom VGi CBCT) που χρησιμοποιείται στη μελέτη μας μπορεί να παρέχει διάφορες ρυθμίσεις έκθεσης για διαφορετικές κλινικές καταστάσεις, όπως για ορθοδοντική και ορθογναθική αξιολόγηση. Επειδή το μέγεθος των voxel συνήθως αυξάνεται σε

μεγαλύτερο πεδίο FOV, αυτό μπορεί να επηρεάσει την απεικόνιση του εμφυτευμένου βιοϋλικού. Ως εκ τούτου, απαιτούνται περαιτέρω πειραματικές μελέτες οι οποίες θα χρησιμοποιούν διαφορετικές μονάδες CBCT, διαφορετικούς σχεδιασμούς μελέτης, διαφορετικές παραμέτρους έκθεσης και διαφορετικά λογισμικά ανάλυσης της εικόνας προκειμένου να υπάρξουν σαφείς ενδείξεις για την επίδραση του nHAp / CS στη διαδικασία επούλωσης του CSD. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι η απεικόνιση με ακρίβεια της δοκιδώδους μικροδομής ξηρών γνάθων με τη χρήση διαφορετικών μονάδων CBCT, παρουσιάζει ένα υψηλό επίπεδο συγκρισιμότητας με το μ -CT (Van Dessel et al 2017, Liang et al 2017, Kulah et al 2018). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών οι οποίες με τη χρήση MSCCT απεικονίζουν βιοϋλικά βασισμένα σε nHAp/CS. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν ότι ο σχηματισμός νέου οστού αρχίζει να λαμβάνει χώρα στις 2 εβδομάδες μετά την εμφύτευση των βιοϋλικών nHAp/CS (He et al 2015, Oryan et al 2017). Σε μία πρόσφατη μελέτη απεικονίστηκαν μη τυποποιημένα οστικά ελλείμματα σε κεφαλές επίμυων με τη χρήση CBCT. Εντός των μη τυποποιημένων αυτών οστικών ελλειμμάτων έγινε τοποθέτηση βιοϋλικού Υδροξυαπατίτη (HAp) με μεμβράνη poly- ϵ -caprolactone (PCL). Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης ότι η παρουσία του HAp βελτίωσε την επίδραση του θρόμβου αίματος, προκαλώντας ταχύτερη μείωση του όγκου του μη τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Groppe et al 2017).

Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η συμβολή του CBCT με τη χρήση των τιμών διαβάθμισης του γκρι ($^{V\text{Gi}}\text{HU}$) στην αξιολόγηση της διαδικασίας επούλωσης των CSD (ROI, mm^2) θεωρείται αμφισβητήσιμη. Το γεγονός αυτό είναι δυνατό εν μέρει να αποδοθεί στην εγγενή διακύμανση η οποία υπάρχει μεταξύ των πραγματικών τιμών HU που προέρχονται από το CT σε σχέση με τις τιμές διαβάθμισης του γκρι (GVs ή $^{V\text{Gi}}\text{HU}$) που προέρχονται από το CBCT (Pauwels et al 2015). Προφανώς, η σχέση μεταξύ των μετρήσεων των τιμών διαβάθμισης του γκρι $^{V\text{Gi}}\text{HU}$ και ROI (σε mm^2) σχετίζεται γραμμικά με την τοποθέτηση των ιστοτεμαχίων εντός του πεδίου (FOV) καθώς εξασφαλίζει τη βέλτιστη ομοιογένεια της δέσμης των ακτίνων X (Pauwels et al 2015). Στην παρούσα μελέτη, τα ιστοτεμάχια ευθυγραμμίστηκαν και τοποθετήθηκαν στη μεσότητα του επιλεγμένου πεδίου (FOV) εντός πλαστικών κυλίνδρων που περιείχαν 10% διάλυμα ουδέτερης φορμόλης. Επίσης, η χρήση πλαστικών κυλίνδρων που περιείχαν 10% διάλυμα ουδέτερης φορμόλης αποτελεί ένα «περιβάλλον» το οποίο φαίνεται να προσομοιάζει - τουλάχιστον εν μέρει - με τους μαλακούς ιστούς οι οποίοι περιέβαλλαν τις ανατομικές δομές των ιστοτεμαχίων. Η απουσία του υγρού περιβάλλοντος της φορμόλης και των πλαστικών κυλίνδρων θα μπορούσε να

έχει σημαντική επίδραση στις τιμές διαβάθμισης του γκρι ($^{V_{Gi}}HU$) (Chatzipetros et al 2019). Ως εκ τούτου, πιθανά σφάλματα απεικόνισης (artifacts) όπως ο θόρυβος (noise), το scattering, το beam hardening, το aliasing και το cone beam effect φαίνεται να μειώνονται με τη χρήση του «υποκατάστατου» των μαλακών δομών (πλαστικοί κύλινδροι, διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης). Γι αυτόν ακριβώς το λόγο θεωρήθηκε η επιλογή μας κατάλληλη.

Στην παρούσα μελέτη υποστηρίζεται ότι η χρήση CBCT με τις τιμές διαβάθμισης του γκρι ($^{V_{Gi}}HU$) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της οστικής επούλωσης και την απεικόνιση των ικριωμάτων nHAp/CS σε τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων. Παρόμοια μεθοδολογία έχει ακολουθηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Cankaya et al 2011). Όσον αφορά στην απεικόνιση της μικροδομής των οστών σε *ex vivo* μελέτες, φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική συμφωνία μεταξύ μ -CT και CBCT (Ponder et al 2013, Van Dessel et al 2017, Liang et al 2017, Kulah et al 2018). Αναλυτικότερα, οι Van Dessel et al (2017) έδειξαν ότι: "... οι περισσότερες συσκευές CBCT μπορούν να αξιολογήσουν ποσοτικά την ποιότητα του σπογγώδους οστού, με ένα επίπεδο ακρίβειας και αξιοπιστίας που προσεγγίζει αυτό του μ -CT..." (Van Dessel et al 2017). Παρόλαυτά, το μ -CT θεωρείται ότι είναι ο «χρυσός κανόνας» (gold standard) για την απεικόνιση των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και για την πορεία της οστικής επούλωσης μικρά ιστοτεμάχια, όπως οι κεφαλές των επίμυων (Zhang et al 2016, Nakamura et al 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρούσα μελέτη εστιάζει, επίσης, στην πιθανή σχέση που υπάρχει μεταξύ ακτινολογικών και ιστολογικών αποτελεσμάτων, όσον αφορά στην πορεία της οστικής σύνθεσης και την ενσωμάτωση του ικριώματος nHAp/CS. Ως εκ τούτου, το CBCT μπορεί να θεωρηθεί επαρκής τεχνική για να περιγράψει την οστική αναδιαμόρφωση-οστική επούλωση σε τυποποιημένα οστικά ελλείμματα. Το CBCT απεικονίζει με σχετική ακρίβεια τις μεταβολές των CSD, τόσο στην ομάδα ελέγχου, όσο και στην πειραματική ομάδα, η οποία περιείχε το ικρίωμα του nHAp/CS. Σε αυτό το σημείο, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι υπάρχει μία πιθανή κλινική σημασία των αποτελεσμάτων της μελέτης μας με την οδοντιατρική επιστήμη: η χρήση του CBCT θα μπορούσε να συμβάλλει στην απεικόνιση της πιθανής επίδρασης του ικριώματος nHAp/CS στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη (GBR) και στην περαιτέρω αξιολόγηση της φατνιακής ακρολοφίας.

Η ιστομορφομετρική ανάλυση αποτελεί το «χρυσό κανόνα» (gold standard) για την αξιολόγηση νεόπλαστου οστίτη ιστού σε τυποποιημένα κυκλικά οστικά ελλείμματα (CSD) σε κεφαλές επίμυων (de Santana et al 2016, Ghiacci et al 2016, Kim et al 2016,

Nakamura et al 2017, Chatzipetros et al 2018). Στην παρούσα μελέτη η ιστομορφομετρική ανάλυση με σύστημα ανάλυσης ψηφιακής εικόνας (digital image analysis, Image Pro-Plus v6.0.0.260) επέτρεψε μία αντικειμενική σύγκριση του σχηματισμού νεόπλαστου οστίτη ιστού μεταξύ των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων (CSD) της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο σχηματισμός νεόπλαστου οστίτη ιστού εκτιμήθηκε από το κλάσμα οστικής ανάπλασης (FBR) (Kim et al 2016), από την κυτταρική πυκνότητα οστεοκυττάρων (CD) (Norouzi και συν 2017) και από τον απόλυτο αριθμό των οστεοκυττάρων (Ost) (Chatzipetros et al 2018). Με ιστομορφωμετρική ανάλυση εκτιμήθηκε, επίσης, και η βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (Mat) του ικριώματος nHAp/CS (Ying και συν 2008).

Σε μία πειραματική μελέτη σε οστικά ελλείμματα στην κνήμη επίμυων, καταδείχθηκε ότι η προσθήκη nHAp σε υδρογέλη (Zn-CS/nHAp/ β -Gr hydrogel) είχε ως αποτέλεσμα καλύτερη επούλωση του τραύματος και βελτιωμένη οστική σύνθεση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και σε σχέση με την ομάδα στην οποία δεν προστέθηκε nHAp στην υδρογέλη (Zn-CS/ β -Gr hydrogel). Η προσθήκη nHAp/CS στην υδρογέλη είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη πρόσφυση πρωτεϊνών και εξωγενούς μεταλλικοποίησης: η προσθήκη HAp στην υδρογέλη αύξησε σημαντικά την πρόσφυση πρωτεϊνών στις πρώτες 24 ώρες εξαιτίας της αυξημένης υδροφιλικότητας της υδρογέλης και εξαιτίας του γεγονότος ότι οι νανοδομές του HAp προσέφεραν αυξημένη επιφάνεια για την πρόσφυση των πρωτεϊνών (Dhivya et al 2015). Στην παρούσα μελέτη, το κλάσμα οστικής ανάπλασης παρουσιάστηκε αυξημένο σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στην πειραματική ομάδα (nHAp/CS) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Άρα η προσθήκη των ικριωμάτων nHAp/CS σε τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων φαίνεται να προάγει την κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση.

Σε πειραματική μελέτη έκτοπης οστεογένεσης σε ενδομυϊκό χώρο στο μηριαίο οστού επίμυων Sprague Dawley καταδείχθηκε ότι η οστεογενετική επίδραση και η βιοαποικοδομησιμότητα ικριωμάτων nHAp/CS που είχαν εμπλουτιστεί με Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) ήταν βελτιωμένη σε σχέση με τα μη εμπλουτισμένα με BMSCs ικριώματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι τα εμπλουτισμένα με BMSCs ικριώματα nHAp/CS παρουσίαζαν αυξημένη de novo οστική σύνθεση και βιοαποικοδομησιμότητα του υλικού σε σχέση με τα μη εμπλουτισμένα με BMSCs ικριώματα nHAp/CS (He et al 2015). Σε παρόμοια συγκριτική μελέτη της επίδρασης των τροποποιημένων μορφογενετικών πρωτεϊνών εντός απορροφήσιμου σπόνγου κολλαγόνου (rhBMP-2/ACS, rhBMP-9/ACS) στην οστική ανάπλαση τυποποιημένων κρανιακών οστικών ελλειμμάτων 28 αρσενικών

επίμυων Wistar, καταδείχθηκε ότι η προσθήκη rhBMP-2/ACS εντός του ελλείμματος οδήγησε σε ταχύτερη οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού σε σχέση με την rhBMP-9/ACS, 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Επιπροσθέτως, 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία, η rhBMP-9/ACS οδήγησε σε αυξημένο σχηματισμό νεόπλαστου οστού σε σχέση με την rhBMP-2/ACS (Nakamura et al 2017). Στην παρούσα μελέτη δε χρησιμοποιήθηκαν αυξητικοί παράγοντες. Παρόλαυτά, η κυτταρική πυκνότητα των οστεοκυττάρων ήταν αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στην πειραματική ομάδα (nHAρ/CS) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η επαρκής βιοαποικοδομησιμότητα ενός βιοϋλικού αποτελεί βασικό παράγοντα επιτυχίας μίας *in vivo* πειραματικής μελέτης (Dhivya et al 2015, Ghiacci et al 2016). Η βιοαποικοδομησιμότητα ενός μοσχευματικού βιοϋλικού τύπου κριώματος (scaffold) αποτελεί, επίσης, βασικό στοιχείο της πορείας της οστικής ανάπλασης (He et al 2015). Σε μία πρόσφατη μελέτη με τυποποιημένα οστικά ελλείμματα διαμέτρου 5mm σε κεφαλές Sprague Dawley επίμυων τοποθετήθηκαν 3-D εκτυπωμένα κριώματα poly(lactic acid)/hydroxyapatite (PLA/HA), β-tricalcium phosphate (β-TCP), partially demineralized bone matrix (DBM). Σε σύγκριση με το β-TCP και το DBM, τα 3-D εκτυπωμένα PLA / HA κριώματα εμφάνισαν καλή βιοσυμβατότητα και βιοδραστικότητα *in vitro*. Τα 3-D εκτυπωμένα κριώματα PLA / HA παρουσίασαν, επίσης, *in vivo* ήπια φλεγμονώδη αντίδραση, βελτιωμένη οστεοεπαγωγική δράση, αυξημένη παραγωγή νεόπλαστου οστίτη ιστού και σχετικά αυξημένο ρυθμό βιοαποικοδόμησης (Zhang et al 2016). Σε μία πειραματική μελέτη σε τυποποιημένα οστικά ελλείμματα σε κνήμες επίμυων παρουσιάστηκε επαρκής βιοαποικοδομησιμότητα των εμφυτευμένων κριωμάτων HAρ/CS, δέκα έως εικοσιτέσσερις ημέρες μετά τη χειρουργική τοποθέτηση, με ταυτόχρονη αύξηση της σύνθεσης νεόπλαστου οστίτη ιστού (Danilchenko et al 2011). Η βιοαποικοδομησιμότητα ενός βιοϋλικού σε *in vivo* πειραματικές μελέτες είναι ένα αποτέλεσμα της τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης, της απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών και ανιόντων υπεροξειδίου (ROS) τοπικά. Πρόκειται για μία διεργασία κατά την οποία με τη συνέργεια της τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης, της αγγειογένεσης και της οστεογένεσης προάγεται η τοπική δράση των μακροφάγων (Tamariz et al 2013, He et al 2015). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή απορρόφηση του εμφυτευμένου βιοϋλικού και την αντικατάστασή του από οστίτη ιστό. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης τιμής της επιφάνειας του βιοϋλικού από τη

2^η στην 4^η εβδομάδα και από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα. Επομένως, η βιοαποικοδόμηση του ικρίωματος nHAρ/CS κρίνεται επαρκής.

Σύμφωνα με δική μας προηγούμενη πιλοτική μελέτη (Chatzipetros et al 2018), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην επιφάνεια του οστού που σχηματίστηκε στις πλευρικές περιοχές των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων μεταξύ της 2ης και 4ης εβδομάδας. Επιπλέον, ο αριθμός των οστεοκυττάρων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στην 4η εβδομάδα μετά τη χειρουργική επέμβαση. Τα αποτελέσματα της πιλοτικής αυτής μελέτης ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Στην παρούσα μελέτη, η πειραματική ομάδα (nHAρ/CS) παρουσίαζε υψηλότερες μέσες τιμές απόλυτου αριθμού οστεοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος.

Σχετικά με τη σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού και την επίδραση του ικρίωματος nHAρ/CS στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση, στην παρούσα μελέτη, το κλάσμα οστικής ανάπλασης (FBR) της πειραματικής ομάδας παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες (2, 4, 8) σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το βιοϋλικό νάνο-Υδοξυαπατίτη/Χιτοζάνης φαίνεται να προάγει την οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων σύγχρονων πειραματικών μελετών (He et al 2015, Johari et al 2016, Kim et al 2016, Zhang et al 2016). Στη μελέτη των Zhang et al 2016, το κεντρικό τμήμα του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος στην ομάδα ελέγχου στις 4 και στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία πληρώθηκε με ινώδη συνδετικό ιστό (Zhang et al 2016). Το νεοσχηματισθέν οστόν στη μελέτη αυτή αναπτύχθηκε στα πλευρικά όρια του ελλείμματος και σε στενή σχέση με τα βιοϋλικά. Το νεόπλαστο οστόν απέτυχε να προχωρήσει προς το κέντρο του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (Zhang et al 2016). Και στη μελέτη των Kim et al 2016, το περιφερικό τμήμα φαίνεται να εμφανίζει μία υψηλότερη οστική ανάπλαση σε σχέση με το κεντρικό τμήμα (Kim et al 2016). Στην ίδια μελέτη, στις 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία η ομάδα που περιείχε HAρ παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στην οστική ανάπλαση στα περιφερικά όρια του ελλείμματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και σε σχέση με την ομάδα που περιείχε Bio-Oss (Kim et al 2016). Σε μία συγκριτική μελέτη της επίδρασης των μεμβρανών HAρ/CS σε σχέση με τις μεμβράνες κολλαγόνου στην οστική ανάπλαση τυποποιημένων κρανιακών οστικών ελλειμμάτων 8mm σε 54 επίμυες βρέθηκε ότι στις 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε αυξημένη οστική σύνθεση σε όλες τις ομάδες μελέτης, ενώ στις 8 εβδομάδες παρατηρήθηκε

αυξημένη μεταλλικοποίηση και πλήρωση των ελλειμμάτων με νεόπλαστο οστού στις πειραματικές ομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Song et al 2014). Στην παρούσα μελέτη, στις 4 και στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία παρατηρήθηκε περισσότερος σχηματισμός νεόπλαστου οστού στις περιφερικές περιοχές της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σε δεκατρία πειραματόζωα παρατηρήθηκε, επίσης, σχηματισμός νεόπλαστου οστού στις κεντρικές περιοχές των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων της πειραματικής ομάδας. Δεν υπήρχε καμία φλεγμονώδης διήθηση ή πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος σε γειτνίαση με το βιοϋλικό. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να επιβεβαιώνει ιστολογικά την κεντρομόλο οστική σύνθεση των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων και την θετική επίδραση που ασκεί το ικρίωμα του nHAp/CS στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη τυποποιημένων κρανιακών οστικών ελλειμμάτων επίμυων.

Στην παρούσα μελέτη το κλάσμα οστικής ανάπτυξης (FBR) της πειραματικής ομάδας παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες (2, 4, 8) σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, στις 2 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία η μέση τιμή του FBR της ομάδας ελέγχου ήταν 14,88%, ενώ της πειραματικής ομάδας 19,95%, στις 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία το FBR της ομάδας ελέγχου ήταν 16,72%, ενώ της πειραματικής ομάδας 39,23%, ενώ στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία το FBR της ομάδας ελέγχου ήταν 15,97%, ενώ της πειραματικής ομάδας 42,12%. Στη μελέτη των Kim et al 2016 στις 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία η μέση τιμή του FBR της ομάδας ελέγχου ήταν 30,50%, της ομάδας που περιείχε Bio-Oss ήταν 28,53% και της ομάδας που περιείχε HAp ήταν 42,90% (Kim et al 2016). Στην ίδια μελέτη, στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία η μέση τιμή του FBR της ομάδας ελέγχου ήταν 50,21%, της ομάδας που περιείχε Bio-Oss ήταν 54,12% και της ομάδας που περιείχε HAp ήταν 50,92% (Kim et al 2016). Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι παρόμοια με εκείνα άλλων μελετών όσον αφορά στο κλάσμα οστικής ανάπτυξης.

Σε πειραματικές μελέτες σε γνάθους χοίρων για την επίδραση βόειου ανόργανου οστικού μοσχεύματος (Bio-Oss) στην οστική ανάπτυξη, το κλάσμα οστικής ανάπτυξης παρουσίαζε διακυμάνσεις από τη 2^η στην 4^η και στην 8^η εβδομάδα μετά το χειρουργείο. Πιο συγκεκριμένα, οι Jensen et al 2005 ανέφεραν ότι το FBR του Bio-Oss ήταν 4% (2 εβδομάδες), 26% (4 εβδομάδες) και 42% (8 εβδομάδες). Το ποσοστό ήταν χαμηλότερο από αυτό του αυτόλογου μοσχεύματος ή του συνθετικού

μοσχεύματος τριφωσφορικού ασβεστίου (TCP), αλλά το αποτέλεσμα θεωρήθηκε ιδιαίτερα ευνοϊκό (Jensen et al 2005). Οι Kim et al 2007 σε μία πειραματική μελέτη οστεοκαθοδήγησης σε γνάθους σκύλων ανέφεραν ότι ο σχηματισμός νεόπλαστου οστού ήταν εντονότερος στην ομάδα που περιείχε HAρ σε σχέση με την ομάδα που περιείχε βόειο ανόργανο οστικό μόσχευμα. Παρόλαυτά, η διαφορά αυτή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική (Kim et al 2007). Στην παρούσα μελέτη, η μέση τιμή του κλάσματος οστικής ανάπλασης παρουσιάστηκε αυξημένη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στην πειραματική ομάδα (nHAρ/CS) (33,8394%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (15,9155%). Άρα η προσθήκη των ικτριωμάτων nHAρ/CS σε τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων φαίνεται να αυξάνει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τη σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού, προάγοντας παράλληλα την κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτης/Χιτοζάνη (nHAp/CS) 75/25 w/w επιδρά θετικά στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη τυποποιημένων προκλητών κρανιακών ελλειμμάτων επίμυων.
- Το ικρίωμα του nHAp/CS 75/25 w/w θα πρέπει να θεωρείται κατάλληλο, βιοσυμβατό υλικό οστικού μοσχεύματος για μελέτες κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης.
- Η χρήση της κωνικής δέσμης υπολογιστικής τομογραφίας (CBCT) για την απεικόνιση βιοϋλικών, όπως τα ικρίωματα του nHAp/CS κρίνεται επαρκής.
- Το ικρίωμα του nHAp/CS απεικονίζεται ως ακτινοσκοιρό υλικό με τη χρήση CBCT.
- Το επίπεδο διαβάθμισης του γκρι (mean ^{60}Co HU) παρουσιάζεται υψηλότερο στην πειραματική ομάδα (nHAp/CS) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία.
- Η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, που ακτινολογικά εκφράζεται ως ROI (mm^2), μειώνεται από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επιβεβαιώνει απεικονιστικά την κεντρομόλο οστική σύνθεση.
- Η πειραματική ομάδα (nHAp/CS), παρουσιάζει υψηλότερη μέση τιμή ^{60}Co HU σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία (2, 4 και 8). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επιβεβαιώνει απεικονιστικά ότι το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα της πειραματικής ομάδας απεικονίζεται περισσότερο ακτινοσκοιρό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Το ικρίωμα του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης παρουσιάζει καλή ενσωμάτωση στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται ιστολογικά από την απουσία σχηματισμού κοκκιώματος ξένου σώματος, πύου ή νέκρωσης.
- Η βιοαποικοδομησιμότητα του ικρίωματος nHAp/CS 75/25 w/w κρίνεται επαρκής. Η επιφάνεια του βιοϋλικού μειώνεται σε σχέση με το χρόνο, όπως καταδεικνύεται από την ιστομορφομετρική ανάλυση.

- Το κλάσμα οστικής ανάπλασης (FBR) της πειραματικής ομάδας παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες (2, 4, 8) σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το βιοϋλικό nHAp/CS φαίνεται να προάγει την οστική ανάπλαση σε συνάρτηση με το χρόνο.
- Η κυτταρική πυκνότητα των οστεοκυττάρων της πειραματικής ομάδας (nHAp/CS) παρουσιάζεται πιο αυξημένη σε σχέση με αυτή της ομάδας ελέγχου. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι το ικρίωμα nHAp/CS φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη αυξημένου αριθμού οστεοκυττάρων/mm².
- Ο απόλυτος αριθμός οστεοκυττάρων της πειραματικής ομάδας (nHAp/CS) παρουσιάζει υψηλότερες μέσες τιμές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος.
- Με την εφαρμογή ιστολογικής και ιστομορφομετρικής ανάλυσης, το ικρίωμα του nHAp/CS 75/25 w/w φαίνεται να προάγει την οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού εντός των τυποποιημένων κρανιακών οστικών ελλειμμάτων επίμυων, γεγονός το οποίο καταδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές του κλάσματος οστικής ανάπλασης, της κυτταρικής πυκνότητας των οστεοκυττάρων και του απόλυτου αριθμού των οστεοκυττάρων της πειραματικής ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Τα ικρίωματα του nHAp/CS ενσωματώνονται άριστα εντός το οστίτη ιστού και παρέχουν ένα αποτελεσματικό χώρο για τον σχηματισμό νεόπλαστου οστού σε τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι κατά ανάγκη εφαρμόσιμα στο οστόν της ανθρώπινης φατνιακής ακρολοφίας. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των ικριωμάτων nHAp/CS σε μελέτες κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης σε χειρουργικές διαδικασίες αποκατάστασης οστικών ελλειμμάτων της ανθρώπινης φατνιακής ακρολοφίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΪΛΙΚΟΥ ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗ/ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΠΡΟΚΛΗΤΩΝ ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΧΑΤΖΗΠΕΤΡΟΣ

DDS, MSc

Σκοπός

Η πειραματική μελέτη αυτή έχει σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση του βιοϋλικού νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης 75/25 w/w στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη κρνιακών οστικών ελλειμμάτων επίμυων. Ο προσδιορισμός της επίδρασης του βιοϋλικού στην κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη θα γίνει με ανάλυση Κωνικής Δέσμης Υπολογιστικής Τομογραφίας (Cone Beam Computed Tomography, CBCT) και με ιστομορφομετρική ανάλυση στις περιοχές των κρνιακών οστικών ελλειμμάτων σε τρεις διαφορετικούς χρόνους ελέγχου (2, 4 και 8 εβδομάδες).

Υλικά και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 36 ενήλικοι επίμυες Sprague Dawley (18 αρσενικοί και 18 θηλυκοί). Με τη χρήση χειρουργικής φρέζας δημιουργήθηκαν 2 αμφοτερόπλευρα, τυποποιημένα οστικά ελλείμματα, διαμέτρου 5mm, στο δεξιό και αριστερό βρεγματικό οστόν της κεφαλής κάθε επίμου. Στο δεξιό έλλειμμα τοποθετήθηκε το ικρίωμα του νάνο-Υδροξυαπατίτη/Χιτοζάνης και αποτέλεσε την πειραματική ομάδα, ενώ το αριστερό έλλειμμα παρέμεινε άδειο, αποτελώντας την ομάδα ελέγχου. Δύο θηλυκοί επίμυες πέθαναν μετεγχειρητικά. Οι 34 επίμυες ευθανατώθηκαν στις 2, 4 και 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική διαδικασία. Διεξήχθη ακτινολογική ανάλυση των 28 ιστοτεμαχίων με τη χρήση CBCT (ανάλυση του επιπέδου διαβάθμισης του γκρι, grayscale value, ^{60}Co HU) και ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση των 34 ιστοτεμαχίων σε επιλεγμένες περιοχές ενδιαφέροντος: περιφερική περιοχή προς τα έξω της μέσης οβελιαίας ραφής (lateral 1, l1), περιφερική περιοχή προς τα έξω της μέσης οβελιαίας ραφής (lateral 2, l2), κεντρική περιοχή (central). Στις περιοχές ενδιαφέροντος (ROI) μετρήθηκαν το εμβαδόν τους (μm^2) και ο απόλυτος αριθμός των οστεοκυττάρων (Osteocytes, Ost). Στις περιοχές των αρχικών τρυπανισμών της

πειραματικής ομάδας (Defects-Deficits, Defi) μετρήθηκε η επιφάνεια κάλυψης και η βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (Material, Mat) σε μm^2 . Με βάση τα ανωτέρω μελετήθηκαν οι εξής παράμετροι: Κλάσμα Οστικής Ανάπλασης (Fraction of Bone Regeneration, FBR) [%], η βιοαποικοδομησιμότητα του βιοϋλικού (Material, Mat) [μm^2], η Κυτταρική πυκνότητα Οστεοκυττάρων (Cell Density, CD) [οστεοκύτταρα/ μm^2] και [οστεοκύτταρα/ mm^2] και ο Απόλυτος Αριθμός Οστεοκυττάρων (Osteocytes, Ost).

Αποτελέσματα

Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό υψηλότερες μέσες τιμές ^{67}Ge HU (856.35 ^{67}Ge HU) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (541.19 ^{67}Ge HU) σε όλες τις εβδομάδες. Συνεπώς, το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα της πειραματικής ομάδας απεικονίζεται περισσότερο ακτινοσκοπικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0,000<<0,001$). Η επιφάνεια του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος, που ακτινολογικά εκφράζεται ως ROI (mm^2), φαίνεται να μειώνεται από τη 2^η στην 8^η εβδομάδα και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου). Πιο συγκεκριμένα, από την 4^η στην 8^η εβδομάδα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της επιφάνειας του τυποποιημένου οστικού ελλείμματος (ROI) και στις δύο ομάδες (πειραματική και ομάδα ελέγχου) ($P=0.01$). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να επιβεβαιώνει απεικονιστικά την κεντρομόλο οστική σύνθεση και την τάση που παρουσιάζεται τόσο στην πειραματική, όσο και στην ομάδα ελέγχου να πληρωθεί το τυποποιημένο οστικό έλλειμμα με νεόπλαστο οστόν.

Η μέση τιμή του κλάσματος οστικής ανάπλασης της πειραματικής ομάδας ήταν 33,8394% ενώ του κλάσματος οστικής ανάπλασης της ομάδας ελέγχου ήταν 15,9155% ($P=0.000<<0.01$). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία του βιοϋλικού νάνο-Υδοξυαπατίτη/Χιτοζάνης συμβάλει σε αυξημένη οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού εντός των τυποποιημένων οστικών ελλειμμάτων της πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το FBR της πειραματικής ομάδας παρουσιάζεται πιο αυξημένο σε όλες τις εβδομάδες (2, 4, 8) σε σχέση με το FBR της ομάδας ελέγχου ($P=0.009$). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το βιοϋλικό νάνο-Υδοξυαπατίτη/Χιτοζάνης φαίνεται να προάγει την οστική σύνθεση νεόπλαστου οστίτη ιστού σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρήθηκε, επίσης, στατιστικά σημαντική μείωση της επιφάνειας του βιοϋλικού σε σχέση με το χρόνο ($P=0.000<<0.01$). Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης τιμής της κυτταρικής πυκνότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P=0.004$). Ο αριθμός των οστεοκυττάρων (μέση τιμή) αυξάνεται σε στατιστικά

σημαντικό βαθμό από την 2^η (340 οστεοκύτταρα) έως την 8^η εβδομάδα (661 οστεοκύτταρα) στην lateral 2 περιοχή της πειραματικής ομάδας ($P=0.025$). Η πειραματική ομάδα παρουσίαζε υψηλότερες μέσες τιμές απόλυτου αριθμού οστεοκυττάρων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις περιοχές ενδιαφέροντος: lateral 1 ($P=0.000<<0.001$) , lateral 2 ($P=0.000<<0.001$), central ($P=0.040$).

Συμπεράσματα

Το βιοϋλικό νάνο-Υδροξυαπατίτης/Χιτοζάνη (nHAp/CS) 75/25 w/w επιδρά θετικά στην κατευθυνόμενη οστική ανάπλαση τυποποιημένων προκλητών κρανιακών ελλειμμάτων επίμυων, όπως καταδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές του κλάσματος οστικής ανάπλασης, της κυτταρικής πυκνότητας των οστεοκυττάρων και του απόλυτου αριθμού των οστεοκυττάρων στην πειραματική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το ικρίωμα του nHAp/CS απεικονίζεται ως ακτινοσκοπικό υλικό με τη χρήση CBCT. Η βιοαποικοδομησιμότητα του ικριώματος nHAp/CS 75/25 w/w κρίνεται επαρκής. Συμπερασματικά, τα ικρίωματα του nHAp/CS ενσωματώνονται άριστα εντός το οστίτη ιστού και παρέχουν ένα αποτελεσματικό χώρο για τον σχηματισμό νεόπλαστου οστού σε τυποποιημένα κρανιακά οστικά ελλείμματα επίμυων. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι κατά ανάγκη εφαρμόσιμα στο οστόν της ανθρώπινης φατνιακής ακρολοφίας. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των ικριωμάτων nHAp/CS σε μελέτες κατευθυνόμενης οστικής ανάπλασης σε χειρουργικές διαδικασίες αποκατάστασης οστικών ελλειμμάτων της ανθρώπινης φατνιακής ακρολοφίας.

SUMMARY

THE EFFECT OF NANO-HYDROXYAPATITE/CHITOSAN SCAFFOLDS ON RAT CALVARIAL CRITICAL-SIZE DEFECTS FOR GUIDED BONE REGENERATION

EMMANOUIL CHATZIPETROS

DDS, MSc

Objectives

This study aims at determining the effect of 75/25 w/w nHAp/CS scaffolds on Guided Bone Regeneration (GBR) in rat calvarial critical-size defects (CSD) and the ability of Cone Beam Computed Tomography (CBCT) to visualize CSD created at rat calvaria and filled with 75/25 w/w nHAp/CS scaffolds.

Materials and Methods

Thirty six Sprague Dawley adult rats, approximately 3 months old, 18 males and 18 females, weighing more than 250g, were used. These were housed in the Laboratory of Experimental Surgery of the Medical School of the University of Athens, where stable conditions of heating, ventilation and relative humidity were maintained. Also, daily animal health monitoring, as well as daily care and nutrition were performed by a specialized veterinarian and by a specialized animal dietician respectively. All animal handling and surgical procedures were conducted in accordance with the guidelines of animal care and the use of laboratory experimental animals. This experimental study was approved by the Directorate of Agricultural and Veterinary Policy with protocol number 1181/2-03-2017 and registration code EL 25 BIO 05, Athens, Greece. Also, this study protocol was in line with EU Directive 2010/63/EU, based on the concept of replacement, reduction and refinement of animal studies (the 3R principle). The sample size was minimized in accordance with the aims of "Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experimental guidelines (ARRIVE)". Also, the size of the sample was estimated with power analysis (Power $1-\beta$ err prob=0.6949) using one-way ANOVA Fixed effects (IBM SPSS 25.0, IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). The introduction of gender as a variable was intended to limit the use of only male rats, in agreement with the National Institute of Health (NIH, NOT-OD-15-102) notice. Thus, three study groups were created for each time period up to euthanasia (2, 4 and 8 weeks, respectively). Each group

comprised of twelve rats (6 males and 6 females). The number of animals used was comparable to that of previous GBR studies.

Nanoparticles of hydroxyapatite (nHAp) were synthesized according to our previous work, in the presence of hyperbranched polyethylene imine (Lupasol G100, BASF, Greece), to regulate the size and morphology of hydroxyapatite crystals. Composite porous scaffolds were developed by preparing a 3% w/w chitosan (Aldrich, high molecular weight, deacetylation degree $\geq 75\%$) solution in aqueous acetic acid (1.5% w/w), and adding nHAp to a final HAp:CS weight ratio of 75:25. The resulting thick slurry was thoroughly mixed and molded in glass tubes (5mm inner diameter) that were subsequently frozen at -25°C and lyophilized. After lyophilization the resulting HAp:CS cylindrical porous scaffolds (5mm diameter) were cut into disks of 1mm thickness, ethanol sterilized and extensively washed with sterile phosphate buffer saline inside a laminar flow cabinet. By determining the volume of liquid infused in their pores, porosity and total pore volume were found to be $85\pm 1\%$ and $5.0\pm 0.5\text{mL/g}$ respectively.

Preoperatively, a 10-day preparation time was spent on standard rat health tests. In particular, prior to use each rat was subjected to a thorough clinical examination and complete hematological and biochemical tests prior to use. General anesthesia was given by intramuscular injection with xylazine 5mg/kg (Rompun, Bayer Animal Health GmbH D-51368, Leverkusen, Germany) and ketamine hydrochloride 100mg/kg (IMALGENE 1000, MERIAL, 29 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France). After shaving and painting with povidone-iodine (Betadine Solution, Lavipharm, Athens, Greece) a 2cm-sized longitudinal midsagittal cutaneous incision was made on the scalp. The musculature and the periosteum were exposed under the skin to allow for the periosteal dissection procedure. Subsequently, two symmetrical round bone CSD were created in the dorsal part of the right and the left parietal bones, using a diameter of 5mm dental trephine burr (MT-00500, MIS, Israel) operated at 10000rpm under sterile saline irrigation (Sodium Chloride 0.9% Intravenous Infusion, BIOSER, Greece). The diameter of the trephine burr was chosen in order to allow proper fitting of a 5mm in diameter and 1mm thick nHAp/CS scaffold. The procedure mentioned above was done with caution in order to avoid any damage to the dura mater or the superior sagittal sinus, also avoiding the engagement of the midsagittal suture. The CSD on the left parietal bone remained empty as no biomaterial was inserted (group A), while the CSD on the right parietal bone was loaded with a scaffold 75/25 w/w nHAp/CS (group B). Thus, two groups were created, with group A being used as control and group B as experimental. The

wound was sutured in layers. The periosteal flap was reflected over the defects and sutured to the contralateral side using 4-0 polyglycolic acid suture (PGA 4-0, medipac, Greece). The skin was then closed using 3-0 polyglactin 910 suture (Coated VICRYL, Ethicon, Johnson&Johnson, USA). The postoperative stage included an antimicrobial treatment by intramuscular injection with enrofloxacin 2.5mg/kg (Baytril 5%, Bayer Animal Health GmbH D-51368 Leverkusen, Germany). Post-operatively, analgesic and anti-inflammatory treatment with caprofen (Rimadyl, Pfizer, USA) was administered also. Two female rats died post-operatively. The 34 rats, 18 males and 16 females, were euthanized with diethyl ether (Sigma Aldrich, USA) inhalation at 2, 4 and 8 weeks after surgery. More in detail, 12 rats (6 males, 6 females) were euthanized at 2 weeks, 11 rats (6 males, 5 females) at 4 weeks and 11 rats (6 males, 5 females) at 8 weeks after surgery accordingly. The rat calvaria were properly cut off with two horizontal and two vertical osteotomies and excised using a surgical sawmill. The 34 specimens included both the parietal bones and also the parts of occipital and frontal bones. The dimensions of each specimen were approximately 15mm wide, 2mm thick and 10 mm long (15x2x10mm). Subsequently, the specimens were immediately fixed in 10% neutral buffered formalin solution (Formaldehyde solution, Sigma Aldrich, USA) for 1 day. Initially, a pilot study was conducted in 6 animals (3 males, 3 females) to investigate biocompatibility of the biomaterial. Then a CBCT analysis was conducted in 28 animals. The 6 animals of the pilot study were excluded from the CBCT analysis. The 28 specimens (15x2x10mm) housed in plastic cylindrical tubes (3.5cm in diameter, 7cm in height) filled with 10% neutral buffered formalin solution were scanned using a New Tom VGi CBCT imaging unit (QR s.r.l., Rev 2.6, 2014, Verona, Italy). The manufacturer's software trace region profile tool (NNT v6.2, Verona, Italy) was used in selected axial slices. The greyscale value (in ^{VGi}HU) and the traced/selected region of interest (ROI, in mm²) of those areas were automatically calculated. Following CBCT, all the 34 specimens (including experimental animals of the pilot study) were submitted to decalcification by using EDTA-based solution (MicroDec, Diapath, Italy) for 7 days. The histological samples were serially dehydrated in ethanol in a tissue processor (Citadel Shandon 1000, Thermo Scientific, Langenselbold, Germany) and paraffin embedded in another tissue processor (EMBED 503, Kaltek, Padova, Italy). Histological sections of 5µm in thickness were prepared from the mid-point of the critical sized defects in the coronal plane using a Microtome (RM 2145, Leica, Buffalo Grove, USA). The slides were deparaffinized with xylene and rehydrated with serial concentrations of ethanol. The slides were stained with hematoxylin-

eosin (Eosin G Aqueous Solution 1%, Diapath, Martinengo, Italy-Papanicolaou's Solution 1a Harris hematoxylin solution, Merck, Darmstadt, Germany) for the use of optical microscope (Olympus Microscope, Shinjuku, Tokyo, Japan).

Histomorphometric assessment was performed by a certified in oral pathology, who was blind to the intervention and to euthanasia period. Digital image analysis required a semi-automated system with Intel CORE i5 7th Gen (Intel Corporation, California, USA), SAMSUNG Color Display Unit LS24F356FHUXEN (Samsung Electronics Ltd, United Kingdom), Creative Pen Tablet WACOM (Wacom Europe GmbH, Germany), Digital Camera OLYMPUS U-CMAD3 T7, U-TV1X-2 T7 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), Optical Microscope OLYMPUS CX 23LEDRFS2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) hardware features, and the following software: Windows 10 (Microsoft Corporation, NY, USA), Adobe Photoshop CC 2015 (San Jose, USA), Image Pro-Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)

Parameters assessed were new bone formation in CSDs expressed as μm^2 and the total number of osteocytes in newly formed bone surface. This number may be considered as a surrogate maker of bone formation speed, as the more rapid the bone formation the more osteocytes are present. For those purposes, division of the corresponding histological sections was implemented by splitting the whole image in continuous areas. A digital drawing and crop tool separated the area of interest from the near environment and at the final stage digital analysis was performed. As bone regeneration process from the edge towards the center of the defect, bone formation was evaluated separately on the central and two lateral areas of the defect, defined as Regions of Interest (ROI), as follows: (a) lateral area inward of the middle sagittal seam (lateral 1, l_1); (b) lateral area outward of the middle sagittal seam (lateral 2, l_2), (c) central area (c, central), (d) area of the original defect (defi). These measurements were used in the following formula to determine the fraction of bone regeneration (FBR): $\text{FBR} = (\text{lateral 1} + \text{lateral 2} + \text{central}) / (\text{original defect}) \times 100\%$. Biodegradability of the nHAp/CS scaffolds was also investigated. The absolute number of osteocytes (Ost) was measured, as well as cell density of the osteocytes (CD, osteocytes/ mm^2). These parameters were calculated for each ROI of both the experimental (group B) and the control group (group A).

All the data were analyzed using IBM SPSS 25.0 (Chicago, IL). The greyscale value (in $^{\text{VGi}}\text{HU}$) and the ROI (in mm^2) of 28 specimens were assessed as mean \pm Standard Deviation (SD). Multivariate ANOVA and Post Hoc Tests were used for statistical analysis. The data, i.e. new bone surface as μm^2 (lateral 1, lateral 2, central, original

defect area, biomaterial's area) and total number of osteocytes (Ost), fraction of bone regeneration (FBR), cell density (CD) of all the 34 specimens were estimated as mean±Standard Deviation (SD). One way Analysis of Variance (one way ANOVA), T-test and Post Hoc Tests (Bonferroni) were used for statistical analysis. The significance level was set to $P<0.05$.

Results

No statistically significant difference between male and female subjects ($P=0.188$) was observed with respect to ^{VGi}HU . A new unified dependent variable was created that included gender, time in weeks, groups (A and B) and time's relationship (in weeks). The aforementioned variable had a statistically significant effect ($P < 0.05$) on the ^{VGi}HU . The surface of the CSDs, radiographically expressed as ROI (in mm^2), appears to be reduced from the 2nd to the 8th week in both groups (experimental and control group). A statistically significant reduction ($P=0.01$) in ROI from the 4th to the 8th week was observed in both groups. This may possibly confirm the centripetal bone regeneration in terms of radiographic display and the tendency that occurred in both groups to fill the CSDs with newly formed bone. Group B showed statistically significantly higher mean ^{VGi}HU (856.35 ^{VGi}HU) than group A (541.19 ^{VGi}HU) in all weeks. The mean ^{VGi}HU was determined as the average of all ^{VGi}HU measurements for each group individually. The higher these values were, the more radiopaque the biomaterial was depicted. Thus, the CSD of group B showed a more radiopaque display than this of group A ($P=0.000$).

Fifty eight CSDs were available for microscopic evaluation. Newly formed bone appeared as fibrous bone with numerous osteocytic lacunae. Consequently it could be easily distinguished by the pre-existing calvarial bone at the edges of the CSDs that was lamellar and sparsely cellular. The biomaterial of nHAp/CS showed good integration at 2, 4 and 8 weeks, as shown by lack of foreign body granuloma formation, pus formation, or necrosis in any of the CSD of the experimental or control group. At 2 weeks following surgery, a few newly formed bone was observed on the lateral region of both the CSDs (group A and group B). Mild inflammatory infiltration and few osteoclast-like, multinucleated giant cells were observed around the biomaterial. In the central portion no newly formed bone was observed. At 4 and 8 weeks after surgery, more newly formed bone was observed on the lateral region of group B. Newly bone formation in the central area of CSD with the biomaterial was observed in 13 rats. There was no inflammatory infiltration or multinucleated giant cells in relation to the biomaterial. No statistically significant difference between male and female subjects ($P=0.06$) was

observed with respect to FBR. The mean value of FBR of experimental group (group B) was 33.8394% while the FBR of control group (group A) was 15.9155%. A statistically significant increase in FBR of group B was observed compared to FBR of group A ($P=0.000<<0.01$). This suggests that the presence of nHAp/CS scaffold contributes to increased bone regeneration. The FBR of group B appears to be increased from the 2nd to the 8th week compared to FBR of group A ($P=0.009$). This suggests that the nHAp/CS scaffold seems to promote the newly bone formation in relation to time. There was a statistically significant decrease in the surface area of biomaterial from the 2nd to the 8th week ($P=0.000<<0.01$). No statistically significant difference was observed with respect to biomaterial biodegradability between male and female rats ($P=0.330$). It was observed that the experimental group (519 osteocytes / mm²) had a statistically significant increase in the mean value of the cell density relative to the control group (414 osteocytes / mm²) ($P=0.004$). The experimental group showed a statistically significant increase in mean absolute number of osteocytes (Ost) relative to the control group in all areas of interest: lateral 1 ($P=0.000<<0.001$), lateral 2 ($P=0.000<<0.001$), central ($P=0.040$). The number of osteocytes (mean) was significantly increased from the 2nd (340 osteocytes) to the 8th week (661 osteocytes) in the lateral 2 region of the experimental group ($P=0.025$).

Conclusions

The present study shows that nHAp/CS scaffolds exhibits a positive effect on Guided Bone Regeneration (GBR) in rat calvarial critical-size defects (CSD) and they can be visualized using a particular high-resolution CBCT imaging unit. The higher the GV_s (in ^vGiHU), the more radiopaque the scaffolds of nHAp/CS were. It is worth noting that only high-resolution CBCT systems may allow these measurements to be performed. Both CBCT measurements and histological results showed that the nHAp/CS scaffold presence contributes to new bone formation in rat calvarial CSD. The nHAp/CS 75/25 w/w scaffold should be considered as a suitable, biocompatible bone graft material for GBR studies. The biodegradability of the nHAp/CS 75/25 w/w scaffold is considered adequate. The surface of biomaterial decreases with respect to time, as demonstrated by histomorphometric analysis. Based on histological and histomorphometric analysis, the scaffold of nHAp/CS 75/25 w/w appears to promote newly bone formation in rat calvarial critical-size defects (CSD), as demonstrated by elevated the fraction of bone regeneration (FBR), the total number of osteocytes (Ost), as well as cell density of the osteocytes (CD) in the

experimental group relative to the control group. In conclusion, scaffolds of nHAp/CS integrate bone tissue and provide an effective space for new bone formation. However, those results are not necessarily applicable to alveolar bone. Thus, further investigation of nHAp/CS scaffolds for GBR in oral and periodontal reconstructive procedures is required.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10(6): 387-416.

Adelmann-Grill BC & Cully Z. Signal perception of fibroblasts or directional migration to platelet-derived growth factors in Boyden-type chambers. *J Cell Physiol.* 1990; 143:172-177.

Aharinejad S, Marks S, Bock P et al. Microvascular pattern in the metaphysis during bone growth. *Anat Rec.* 1995; 242: 111.

Ai-Agl ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res.* 2008; 87(2): 107-118.

Aisenberg MS. Histology and physiology of the supporting structures. *JADA.* 1952; 44: 628.

Akkus O, Rimnac CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res.* 2001; 19: 927-934.

Αλευρογιάννης Σ. Μακροπρόθεσμα Αποτελέσματα Ολικής Αρθροπλαστικής Γόνατος με επικάλυψη Υδροξυαπατίτη. Διδακτορική Διατριβή. Λάρισα, 2011.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986; 1(1): 11-25.

Al-Kattan R, Retzepe M, Calciolari E, Donos N. Microarray gene expression during early healing of GBR-treated calvarial critical size defects. *Clin Oral Impl Res.* 2016; 00: 1-10.

Andersson ÖH, Liu G, Karlsson KH, Niemi L, Miettinen J, Juhanoja J. In vivo behavior of glasses in the SiO₂- Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ system. *J Mater Sci: Mater Med* 1990; 1: 219-227.

Andersson Ö, Vähätalo K, Happonen R, Yli-Urpo A, Karlsson K. Short-term reaction kinetics of bioactive glass in simulated body fluid and in subcutaneous tissue In: Andersson Ö, Happonen R, Yli-Urpo A, eds. *Bioceramics Volume 7 Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine.* Turku, Finland: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994; 67-72.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF-beta activation. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 2): 217-224.

Anson D. Calcium sulfate: a 4-year observation of its use as a resorbable barrier in guided tissue regeneration of periodontal defects. *Compend Contin Educ Dent.* 1996; 17(9): 895-899.

Aranyarachkul P, Caruso J, Gantes B, Schulz E, Riggs M, Dus I et al. Bone density assessments of dental implant sites. 2. Quantitative cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20:416–424.

Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: A comparison of two carries. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132: 592-597.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol.* 2000; 71: 1015-1023.

Assenza B, Piattelli M, Scarano A, Lezzi G, Petrone G, Piattelli A. Localized ridge augmentation using titanium micromesh. *J Oral Implantol.* 2001; 27(6): 287-292.

Atak BH, Buyuk B, Huysal M, Isik S, Senel M, Metzger W, Cetin G. Preparation and characterization of amine functional nano-hydroxyapatite/chitosan bionanocomposite for bone tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers.* 2017; 164: 200–213.

Auer J.A., Goodship A., S. Arnoczky, S. Pearce, J. Price, L. Claes, B. von Rechenberg, M. Hofmann-Antenbrinck, E. Schneider, R. Müller-Terpitz, F. Thiele, K.-P. Rippe, D.W. Grainger, Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use, *BMC Musculoskelet. Disord.* 8 (2007) 72, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-8-72>.

Azari K, Doctor JS, Doll BA, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins. A review for cranial and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am.* 2002; 14:1-14.

Ban S, Maruno S. Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid. *Biomaterials.* 1998; 19: 1245-1253.

Barboza EP. Clinical and histologic evaluation of the demineralized freeze-dried bone membrane used for ridge augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999; 19(6): 601-607.

Barboza EP, Lugao CE. Treatment of a human transosseous mandibular defect by guided bone regeneration. *J Periodontol.* 2001; 72(4): 538-541.

Baron R, Chakraborty M, Chatterjee D, Horne W, Lomrt A, Ravesloot J-H. *Biology*

of the osteoclast. In: Mundy GR, Martin TJ (eds). Physiology and pharmacology of bone. Springer-Verlag. 1993: 22-24.

Bartee BK. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent.* 1995; 4(1): 21-26.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol.* 2006; 24: 253-269.

Bassett C. Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop.* 1972; 87: 49-59.

Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res.* 2000; 371: 10-27.

Bayne SC. Dental biomaterials: where are we and where are we going? *J Dent Educ.* 2005; 69: 571-585.

Bendall SP, Gaies M, Frondoza C, Jinnah RH, Hungerford D. Effect of particulate bioactive glass on human cynoviocyte cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41: 392-397.

Becker W, Becker BE, McGuire MK. Localized ridge augmentation using absorbable pins and e-PTFE barrier membranes: A new surgical technique. Case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994; 14(1): 48-61.

Becker W, Becker BE, Mellonig J, Caffesse RG, Warrer K, Caton JG, Reid T. A prospective multi-center study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results. *J Periodontol.* 1996; 67(7): 641-649.

Bender I. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endontol.* 1982; 8: 161.

Berman I. Έγχρωμος άτλας βασικής ιστολογίας. Εκδόσεις Ζεβελεκάκης, Αθήνα 1993; σελ: 38-51.

Berthiaume F, Yarmush ML, in "Tissue engineering", Edited by Palsson B, Hubbell JA, Plonnsy R, Bronzino JD, CRC Press, New York, 2003.

Bertolini D, Nedwin G, Bringman T et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vivo by human tumor necrosis factor. *Nature.* 1986, 319: 516.

Bhanot S & Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Fac Plast Surg.* 2002; 18: 27-33.

Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng.* 1999; 5(1): 53-65.

Bianco R, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001; 19: 180-192.

Blaker JJ, Gough JE, Maquet V, Notingher I, Boccaccini AR. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67: 1401-1411.

Block JE, Poser J. Does xenogeneic demineralized bone matrix have clinical utility as a bone graft substitute? *Med Hypotheses.* 1995; 45: 27-32.

Blokhuis TJ. Formulations and delivery vehicles for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions. *Injury.* 2009; 40(Suppl. 3): 8-11.

Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp Gerontol.* 2002; 37(4): 553- 565.

Bobynd JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1980; 150: 263-270.

Bonel G, Tourenne F, Rouquet N, Frayssinet P. Hydroxyapatite and plasma spraying. Hydroxyapatite Coated Hip and Knee Arthroplasty, Cahiers d'enseignement de la SOFCOT, Paris 1995; 51: 21.

Bonucci E. Basic composition and structure of bone, in: Y.H. An, R.A. Draughn (Eds.), *Mechanical Testing of Bone and the Bone Implant Interface.* CRC Press, Boca Raton. 2000; 3-21.

Bornefalk E, Ljunghall S, Johansson A et al. Interleukin-16 induces cyclic AMP formation in isolated human osteoblasts: a signalling mechanism that is not related to enhanced prostaglandin formation. *Bone Miner.* 1994; 27: 97.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998; 9(4): 310-316.

Böstman OM. Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of polyglycolide in ankle fractures. *Clin Orthop.* 1992; 278: 193-197.

Boyce B.: Physical characteristics of expanded polytetrafluoroethylene grafts. In: Stanley JC (ed). *Biologic & Synthetic Vascular Prostheses.* Philadelphia: Grune & Stratton, 1982; 33.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473: 139-146.

Boyne PJ. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J Dent Res.* 1964; 43:827-834.

Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc.* 1969; 78(4): 767-776.

Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980; 38(8): 613-616.

Boyne PJ, Mikels TE. Restoration of alveolar ridges by intramandibular transposition osseous grafting. *J Oral Surg.* 1968; 26(9): 569-576.

Braidman I, Davenport L, Carter D et al. Preliminary in situ identification of estrogen target cells in bone. *J Bone Min Res.* 1995; 10: 74.

Bronner F. Metals in bone. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds). *Principles of bone biology.* Academic Press. 1996: 295-303.

Βρότσος Ι. Ο οστίτης ιστός και η δράση των προσταγλανδινών. Αθήνα 1999.

Brown WE, Chow LC. Chemical properties of bone mineral. *Ann Res Mater Sci.* 1976; 6: 213-226.

Brown WE, Chow LC. Thermodynamics of apatite crystal growth and dissolution. *J Crystal Growth* 1981; 53: 31-41.

Bruce RA, Dziewiatowski DD. Differentiation of the organic matrix in bone repair. *J Oral Maxillofac Surg.* 1987; 45: 939-944.

Brunel G, Benque E, Elharar F, Sansac C, Duffort JF, Barthet P, Baysse E, Miller N. Guided bone regeneration for immediate non-submerged implant placement using bioabsorbable materials in Beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(5): 303-312.

Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benque E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J Periodontol.* 1996; 67(12): 1342-1348.

Buckwalter J, Glimcher M, Cooper M et al. Bone Biology III. *J Bone Joint Surg.* 1995, 77: 1276.

Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin N Am.* 1987; 18: 187-196.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001; 72(2): 215-229.

Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular Ph. *Am J Physiol.* 1984; 246: 409-438.

Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990; 1(1): 22-32.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13: 29-45.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1995; 15: 10-29.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk R. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54: 420-432.

Buser D, Dula K, Lang NP, Nyman S. Long-term stability of osseointegrated implants in bone regenerated with the membrane technique. 5-year results of a prospective study with 12 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 175-183.

Buser D, Hoffman B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9: 137-150.

Buser D, Ingimarsson S, Dula K, Lussi A, Hirt HP, Belser UC. Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002; 22(2): 109-117.

Calla DP, Rohrer MD. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *J Periodontol.* 1993; 64: 575-582.

Campos MJ, de Souza TS, Mota Júnior SL, Fraga MR, Vitral RW. Bone mineral density in cone beam computed tomography: Only a few shades of gray. *World J Radiol* 2014; 28;6(8): 607-612.

Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24(2): 218-235.

Canalis E, Rydziel S. Platelet-derived growth factor and the skeleton. In: Bilezikian JR, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic Press. 1996: 619-626.

Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Oral CK. Use of Cone-Beam Computerized Tomography for Evaluation of Bisphosphonate-

Associated Osteonecrosis of the Jaws in an Experimental Rat Model. *Int J Med Sci.* 2011; 8(8): 667-672.

Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceramics Int.* 1996; 22: 493-507.

Capello WN, D'Antonio JA, Mantley MT, Feinberg JR. Hydroxyapatite in total hip arthroplasty. Clinical results and critical issues. *Clin Orthop.* 1998; 355: 200.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641-650.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Molecul Med.* 2001; 7: 259-264.

Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Disvov Today.* 2003; 8: 980-989.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14: 137-143.

Carter D, Hayes W. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg.* 1977; 59: 954.

Castro F, Kuhn S, Jensen K, Ferreira A, Rocha F, Vicente A, Teixeira JA. Continuous-flow Precipitation of hydroxyapatite in ultrasonic Microsystems. *Chem Eng J.* 2013; (215): 979–987.

Chambers JJ, Magnus CJ. Calcitonin alters the behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol.* 1992; 136: 27.

Chambers T, McSheehy P, Thomson B, Fuller K et al. The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts. *Endocrinol.* 1985; 60: 234.

Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol.* 2000; 192: 4-13.

Chambers TJ, Revell PA, Fuller K et al. Resorption of bone isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci.* 1984; 66: 383.

Chang HW, Lin YS, Tsai YD. Effects of chitosan characteristics on the physiochemical properties, antibacterial activity, and cytotoxicity of chitosan/2-glycerophosphate/nanosilver hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science.* 2013; 127(1): 169-176.

Chaki TK, Wang PE. Densification and strengthening of silver-reinforced hydroxyapatite-matrix composite prepared by sintering. *J Mater Sci.* 1994; 5: 533-542.

Charnley J. Tissue reactions to polytetrafluoroethylene. *Lancet*. 1963; 2: 1379-1385.

Chatzipetros E, Christopoulos P, Donta C, Tosios KI, Tsiambas E, Tsiourvas D, Kalogirou E-M, Tsiklakis K. Application of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018; 23(5): 625-632.

Chatzipetros E, Yfanti Z, Christopoulos P, Donta C, Damaskos S, Tsiambas E, Tsiourvas D, Kalogirou E-M, Tosios KI, Tsiklakis K. Imaging of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds using a cone beam computed tomography device on rat calvarial defects with histological verification. *Clin Oral Invest*. 2019; <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02939-4>.

Chatzistavrou X, Chrissafis K, Polychroniadis E, Kontonasaki E, Koidis P, Paraskevopoulos KM. Inducing bioactivity in dental porcelain through bioglass. Changes in thermal behavior. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2006; 86(1): 255-259.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004; 22(4): 233-241.

Cheng H, Jiang W, Phillips F, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins. *J Bone Joint Surg*. 2003, 85: 1544-1552.

Cheng MZ, Zaman G, Rawlinson S et al. Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures of rat ulna. *J Bone Min Res*. 1996; 11: 502.

Cheung HS, McCarty DS. Mitogenesis induced by calcium containing crystals: role of intracellular dissolution. *Exp Cell Res*. 1985; 157: 63-70.

Cheung HS, Story MT, McCarty DJ. Mitogenic effects of HA and calcium pyrophosphate dihydrate crystals on cultured mammalian cells. *Arthritis Rheum*. 1984; 27: 665-74.

Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T et al. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: Stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res*. 2001; 16: 2074-2081.

Cho SB, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Induction of bioactivity of a non-bioactive glass-ceramic by a chemical treatment. *Biomaterials*. 1997; 18: 1479-1485.

Christensen DK, Karoussis IK, Joss A, Hammerle CHF, Lang NP. Simultaneous or staged installation with guided bone augmentation of transmucosal titanium implants. A 3-year prospective cohort study. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14: 680-

686.

Γκισιάκης Ι. Κατευθυνόμενη οστική ανάπτυξη σε μετεξακτικά φατνία: ιστολογική και ιστομορφομετρική μελέτη σε ανθρώπους, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2011.

Colangelo P, Piattelli A, Barrucci S, Trisi P, Formisano G, Caiazza S. Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits: a pilot study. *Implant Dent.* 1993; 2(2): 101-105.

Coleman DL, King RN, Andrade JD. The foreign body reaction: a chronic inflammatory response. *J Biomed Mater Res.* 1974; 8(5): 199-211.

Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res.* 2005; 96(9): 930-938.

Colnot C, Huang S, Helms J. Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 350(3): 557-561.

Cook S. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg.* 1995; 79: 734-750.

Cook SD, Walsh KA, Haddad RJ.Jr. Interface mechanics and bone growth into porous Co-Cr-Mo alloy implants. *Clin Orthop Relat Res.* 1985; 193: 271-280.

Conover CA. The role of insulin-like growth factors and binding proteins in bone cell biology. In: Bilezikian JR, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology.* San Diego, CA: Academic Press, 1996; pp: 607-618.

Conover CA. Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(1): 10-14.

Conner KA, Sabatini, Mealey BL, Takacs VJ, Mills MP, Cochran DL. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol.* 2003; 74: 658-668.

Crigger M, Bogle GC, Garrett S, Gantes BG. Repair following treatment of circumferential periodontal defects in dogs with collagen and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. *J Periodontol.* 1996; 67(4): 403-413.

Cui W, Li X, Xie C, Chen J, Zou J, Zhou S, Weng J. Controllable growth of hydroxyapatite on electrospun poly (dl-lactide) fibers grafted with chitosan as potential tissue engineering scaffolds. *Polymer.* 2010; 51: 2320-2328.

Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials.* 2000; 21: 1429-1438.

Curtis A, Wilkinson CD. Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998; 9: 1313-1329.

Curtis ASG, Clark P. The effects of topographic and mechanical properties of materials on cell behavior. *Crit Rev Biocompat.* 1990; 5: 343-362.

Curtis A, Wilkinson CD. New depths in cell behavior: reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp.* 1999; 65: 15-26.

Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997; 18: 1573-1583.

Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1990; 24: 13-19.

Dahlin C, Lekholm U, Becker W, Becker B, Higuchi K, Callens A, van Steenberghe D. Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(3): 312-318.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 81(5): 672-676.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Lindhe A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989; 4: 19-25.

Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W. Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J Mater Sci: Mater Med.* 2000; 12: 805-810.

Dalby MJ, Kayser MV, Bonfield W, Di Silvio L. Initial attachment to osteoblasts to an optimized HAPEXTM topography. *Biomaterials.* 2002; 23: 681-90.

Dalton BA, Evans MDM, McFarland GA, Steele JG. Modulation of corneal epithelial stratification by polymer surface topography. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45: 384-94.

Danilchenko SN, Kalinkevich OV, Pogorelov MV, Kalinkevich AN, Sklyar AM, Kalinichenko TG, et al. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2011; 96(4):639-47.

Dard M. Delivery systems of growth factors for bone regeneration. *Cell Engineering.* 1997; 2: 84-91.

Dard M, Sewing A, Meyer J, Verrier S, Roessler S, Scharnweber D. Tools for tissue engineering of mineralized oral structures. *Clin Oral Invest.* 2000; 4: 126-9.

Davidson J. Growth factors in wound healing. *Wounds* 7 (Suppl. A): 1995; 53-64.

Davy D. Biomechanics of bone transplants. *Orthop Clin N Am.* 1999; 30: 584-594.

Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002; 143(4): 1545-1553.

Defetos L, Parthemore J, Price P. Changes in plasma bone Gla protein during treatment of bone disease. *Calcif Tiss Int.* 1982; 34: 121.

De Groot K. Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein in vivo. *Tissue Eng.* 1998; 4: 337-341.

Dekker A, Reitsma K, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, van Aken WG. Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene. *Biomaterials.* 1991; 12: 130-138.

Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assesement of metabolic bone disease. *Endoc Metabol CAN.* 1990; 19: 1.

Dempster DW, Cosman F, Parisieu M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocrine Rev.* 1993; 14: 690-709.

den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Janssen JA. (β) Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials.* 1996; 17: 2037-2044.

den Braber ET, de Ruijter JE, Smits HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Janssen JA. (α) Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves. *Biomaterials.* 1996; 17: 1093-1099.

de Santana WM, de Sousa DN, Ferreira VM, Duarte WR. Simvastatin and biphasic calcium phosphate affects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. *Acta Cir Bras.* 2016; 31: 300-307.

Devin JE, Attawia MA, Laurencin CT. Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair. *J Biomater Sci Polymer Ed.* 1996; 7: 661-669.

Δημητρακόπουλος Ι, Καρακάσης Δ, Λαζαρίδης Ν, Ζουλούμης. Αυξητική οστεοπλαστική των περιοχικών ελλειμμάτων της φατνιακής απόφυσης της άνω

γνάθου με οστική αυτομεταμόσχευση και τη χρήση μικροπλέγματος τιτανίου (M-TAMTM). Εμφυτευματολογία; 1998; 4: 337-348.

Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, Selvamurugan N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *J Nanobiotechnol.* 2015; 40: 1-13.

Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 2005; 26: 5983–5990.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011; 9:66.

Ding F, Deng H, Du Y, Shi X, Wang Q. Emerging chitin and chitosannanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale.* 2014; 6(16): 9477–9493.

Donos N, Dereka X, Mardas N. Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontology 2000.* 2015; 68: 99-121.

Driessens FCM, Verbeeck RMH. Dolomite as a possible magnesium- containing phase in human tooth enamel. *Calc Tiss Int.* 1985; 37: 376-80.

Ducy R, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289(5484): 1501 -1504.

Dupoirieux L, Pourquoi D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30(1): 58-62.

Dwight DT. Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop Clin N Am.* 1999; 30: 553-562.

Dychevne P. Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials *J Biomed Mater Res.* 1985; 19: 273-91.

Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br.* 2005; 87(10): 1434-1438.

Eder A, Watzek G. Treatment of a patient with severe osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: A case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 587-590.

Eghbali-Fatourechi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med.* 2005; 352(19): 1959-1966.

Ehrenfreund-Kleinman T, Golenser J, Domb A J, in "Scaffolding in tissue engineering" Edited by Ma P X, Elisseeff J, Taylor & Francis, New York, 2006.

Ehrnberg A, Brosjo O, Laftman P, Nilsson O, Stromberg L. Enhancement of bone formation in rabbits by recombinant human growth hormone. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64: 562-566.

El-Amin SF, Attawia M, Lu HH, et al. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *J Orthop Res.* 2002; 20: 20-28.

El-Amin S, Kofron MD, Attawia MA, Lu HH, Tuan RS, Laurencin CT. Molecular regulation of osteoblasts for tissue engineered bone repair. *Clin Orth Rel Res.* 2004; 427: 220-225.

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. (α) Porous bioactive glass and hydroxyapatite ceramic affect bone cell function in vitro along different time lines. *J Biomed Mater Res.* 1997; 36: 167-180.

Enneking W, Mindell E. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73: 1123-1142.

Ericsson I, Nilson H, Lindh T, Nilner K, Randow K. Immediate functional loading of Branemark single tooth implants. An 18 months clinical pilot follow-up study. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11(1): 26-33.

Erlebacher A et al. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell.* 1995; 80: 371.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(2): 139-149.

Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA, O'Connell B, Prendergast PJ, Campbell VAA collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng.* 2006; 12(3): 459-468.

Fermor B, Gundle R, Evans M, Emerton M et al. Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E2 release in response to mechanical strain in vitro. *Bone.* 1998; 22: 637.

Filgueiras M, La Torre G, Hench LL (α). Solutions effects on the surface reactions of a bioactive glass. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 445-453.

Filgueiras MR, La Torre GP, Hench LL (β). Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1485-1493.

Fink-Eriksen E. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010; 11: 219-227.

Folkman J. Angiogenesis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* (15th Edition), eds. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, New York, McGraw- Hill, 2001; pp: 517-530.

Fowlkes JL, Thraikill KM, Liu L, Wahl EC, Bunn RC, Cockrell GE, Perrien DS, Aronson J, Lumkin CK Jr. Effects of systemic and local administration of recombinant human IGF-I (rhIGF-I) on de novo bone formation in an aged mouse model. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(9): 1359-1366.

Friberg B, Sennerby L, Grondahl K, Bergstrom C, Back T, Lekholm U. On cutting torque measurements during implant placement: A 3-year clinical prospective study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 1999; 175-83.

Friedlaender GE. Bone grafting. In: *Dee R, Hurst LC, Gruber MA, Kottmeier SA (eds) Principles of Orthopaedic Practice*. McGraw-Hill, New York. 1997; pp: 79-84.

Frost HM. Structural adaptations to mechanical usage. Redefining Wolffs Law. *Anat Rec*. 1990; 41: 226.

Frost HM. Suggested fundamental concepts in skeletal physiology. *Calc Tiss Int*. 1993; 1: 52.

Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 2000; 100(1): 143-155.

Fuller K, Chambers TJ. Localization of mRNA for collagenase in osteocytic bone surface and chondrocyte cells but not osteoclasts. *J Cell Sci*. 1995; 108: 2221.

Fulmer MT, Martin RI, Brown PW. Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med*. 1992; 3: 299-305.

Gao R, Watson M, Callon KE, Tuari D, Dray M, Naot D, Amirapu S, Munro JT, Cornish J, Musson DS. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12: 620-626.

Garg AK. *Bone Biology, harvesting, grafting for dental implants. Rational and clinical applications*. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago. 2004.

Geesink RGT. Hydroxyapatite in 1995. *Cahiers d'enseignement de la SOFCOT*, Paris 1995; 51: 1.

Geesink RGT. Osteoconductive Coatings for Total Joint Arthroplasty. *Clin Orthop*. 2002; 395: 53.

Gemmell E, Seymour G. Cytokines and T-cell switching. *Cut Rev Oral Biol Med*. 1994;

5: 249.

Gerber HRV, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999; 5: 623-628.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 873-884.

Ghiacci G, Graiani G, Ravanetti F, Lumetti S, Manfredi E, Galli C, et al. "Over-inlay" block graft and differential morphometry: a novel block graft model to study bone regeneration and host-to-graft interfaces in rats. *J Periodontal Implant Sci.* 2016; 46: 220-223.

Gibson G, Kohler W, Schaffec M. Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Dev Dynamics.* 1995; 203: 468.

Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001; 88: 167-174.

Goldberg V. Bone grafts and their substitutes: facts fiction and failures. *Orthopaedics.* 2001; 24: 875-876.

Goldberg V. Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop.* 2000; 381: 68-76.

Goldberg VM, Akhavan S. Biology of bone grafts. In: Lieberman JR, Friedlaender GE. Bone regeneration and repair. Humana Press, Totowa, New Jersey. 2005: 57-65.

Goldman H, Millsap R, Brenman E. Origin and registration of the architectural pattern, the lamina dura and the alveolar crest in the dental radiograph. *Oral Surg.* 1957; 10: 749.

Goldring S, Goldring M. Cytokines and Skeletal Physiology. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 324: 13.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011; 45: 14-24.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol.* 1993; 64(11): 1157-1165.

Goulet JA, Senunas LE, De Silva GL, et al. Autogenous iliac crest bone graft.

Complications and functional assessment. *Clin Orthop*. 1997; 339: 76-81.

Gray J, Elves M. Donor cells' contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clin Orthop* 1982 290(163): 261.

Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today*. 2003; 39: 787-800.

Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresch DA. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*. 2008; 456(7223): 809-813.

Greenspan D, Zhong J, La Torre g. Effect of surface area to volume ratio on in vitro surface reactions of bioactive glass particulates In: Andersson Ö, Happonen R, Yli-Urpo A, eds. *Bioceramics Volume 7 Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine*. Turku, Finland: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994; 55-60.

Gregoire M, Orly I, Kerebel LM, Kerebel B. In vitro effects of calcium phosphate biomaterials on fibroblastic cell behavior. *Biol Cell*. 1987; 59: 255-60.

Gregoire N, Orly J, Menanteau J, Heughbaert M, Kerebel B. In vitro interactions between calcium phosphate biomaterials and human fibroblastic cells II. Incidences on the behavior of cultured gingival cells. *Implant Mater Biofunction*. 1988; 8: 215-20.

Grinnell F, Milam M, Srere PA. Attachment of normal and transformed hamster kidney cells to substrata varying in chemical composition. *Biochem Med*. 1973; 7: 87-90.

Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin mediated adhesion. *J Orthop Res*. 1996, 14:878-887.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002; 81(8): 531-535.

Gropo MF, Caria PH, Freire AR, Figueroba SR, Ribeiro-Neto WA, Bretas RES. The effect of a hydroxyapatite impregnated PCL membrane in rat subcritical calvarial bone defects. *Archives of Oral Biology*. 2017; 82: 209-215.

Gruber R. Mechanisms of bone development, remodeling and loss. In Watzek G. *Implants in qualitatively compromised bone*. QuintessencePublishing Co, 2004.

Guniess M, Hock JM. Anabolic effect of parathyroid hormone on cancellous and cortical bone histology. *Bone*. 1993, 14: 277.

Haas R, Polak C, Furhauser R, Mailath-Pokorny G, Dortbudak O, Watzek G. A long-term follow-up of 76 Branemark single-tooth implants. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13(1): 38-43.

Häkkinen L, Yli-Upro A, Heino J, Larjava H. Attachment and spreading of human gingival fibroblasts on potentially bioactive glasses in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1988; 22: 1043-1059.

Haemmerle CH, Jung RE, Feloutzis A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(3): 226-233.

Haemmerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000.* 1998; 17: 151-175.

Han CS, Wood MB, Bishop AT et al. Vascularized bone transfer. *Bone Surg Am.* 1992; 74A: 1441-1449.

Haney JM, Nilveus RE, McMillan PJ, Wikesjo UM. Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. *J Periodontol.* 1993; 64(9): 883- 890.

Hansen Birkedal H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res.* 1993, 28: 500.

Hansen-Algenstaedt N, Joscheck C, Wolfram L, Schaefer C, Muller I, Bottcher A, Deuretzbacher G, Wiesner L, Leunig M, Algenstaedt P, Ruther W. Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair. *Acta Orthop.* 2006; 77(3): 429-439.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol.* 1999; 147(1): 105-120.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003; 423: 349-355.

Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol.* 1995; 66(6): 495-505.

Hardwick R, Scantlebury T, Sanchez R, Whitley N, Ambruster J. Membrane Design Criteria for Guided Bone Regeneration of the Alveolar Ridge. In Buser D, Dahlin C, Schenk R (eds). *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry.* Quintessence Publishing Co, Chicago, 1994.

Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 2001; 29: 560-564.

Hayakawa S, Tsuru K, Ohtsuki C, Osaka A. Mechanism of apatite formation on a sodium silicate glass in a simulated body fluid. *J Am Ceram Soc.* 1999; 82: 2155-2160.

He Y, Dong Y, Cui F, Chen X, Lin R. Ectopic Osteogenesis and Scaffold Biodegradation of Nano- Hydroxyapatite-Chitosan in a Rat Model. *PLoS ONE.* 2015; 10(8): 1-15.

Helebrant A, Jonášová L, Šanda L. The influence of simulated body fluid composition on carbonated hydroxyapatite formation. *Ceramics-Silikáty.* 2002; 46: 9-14.

Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998; 81: 1705-1728.

Hench L, Paschall H. Histo-chemical responses at biomaterials interface. *J Biomed Mater Res.* 1974; 8: 49-64.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res Symposium.* 1973; 4: 25-42.

Hench LL, Wilson J. Bioceramics. *MRS Bulletin.* 1991; 62-74.

Hing KA, Buckland T, Moseley P. Maximizing osseointegration. Unique bone grafting solutions for different surgical applications. *Global Surgery.* 2003; 1: 1-4.

Hirsch JM & Ericsson I. Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clin Oral Implants Res.* 1991; 2: 91-96.

Hockers T, Abensur D, Valentin P, Legrand R, Haemmerle CH. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10: 487-498.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 2-12.

Hollinger J, Chaudhari A. Bone regeneration materials for the mandibular and craniofacial complex. *Cell Mater.* 1992; 2: 143-151.

Hom DB & Maisel RH. Angiogenic growth factors: Their effects and potential in soft tissue wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992; 101: 349-354.

Honig JF, Merten HA, Heinemann D. Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jacob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103: 1324-1325.

Hubble MJW. Bone transplantation. *Curr Orthopaed*. 2001; 15: 199-205.

Hughes DE, Wright KR, Uyti L, et al. Biophosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Min Res*. 1995; 10: 1478.

Hurley LA, Stinchfield FE, Basset CAL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. *J Bone Joint Surg*. 1959; 41a: 1243-1248.

Hwang NS, Elisseff J. Application of stem cells for articular cartilage regeneration. *J Knee Surg*. 2009; 22(1): 60-71.

Θεοχαρίδου Άννα: Μελέτη κυτταρικής αντίδρασης στην τροποποιούμενη –με βιοπολυμερή ικρίώματα- επιφάνεια οδοντιατρικών κεραμικών υλικών, Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, 2009.

Θωμαΐδης Β. Κατευθυνόμενη οστική αναγέννηση με βιολογικής προέλευσης μεμβράνες σε προκλητά οστικά ελλείμματα γνάθων κονίκλων. Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη, 2004.

ICRP (2011) Radiation protection: Cone-beam CT for dental and maxillofacial radiology. Evidence Based Guidelines [Online]. Report prepared by the SEDENTEXCT project. March 2011. Available from: http://www.sedentexct.eu/files/radiation_protection_172.pdf

Itala AI, Ylanen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58: 679-683.

Ito G, Matsuda T, Inoue N, Kamegai T. A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica glass. *J Biomed Mater Res*. 1987; 21: 485-497.

Ito K, Gomi Y, Sato S, Arai Y, Shinoda K. Clinical application of a new compact CT system to assess 3-D images for the preoperative treatment planning of implants in the posterior mandible. A case report. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 539-542.

Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Kurisu K. Actions of hedgehog proteins on skeletal cells. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(4): 477-4.

Jackson DW, Simon TM. Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clin Orthop*. 1999; 367: 31-45.

Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. *J Periodontol*. 1991; 62: 2-4.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta 1 to the bone. *Endocr Rev*. 2005; 26(6): 743-774.

Jensen B, Kreiborg M. Development of the dentition in the cleidocranial dysplasia. *J Oral Path Med.* 1990; 19: 89.

Jensen J, Joss A, Lang NP. The smile line of different ethnic groups depending on age and gender. *Acta Med Dent Helv.* 1999; 4: 38-46.

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjoring-Hansen E. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11: 55-66.

Jensen SS, Broggin N, Weibrich G et al. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20: 703–712.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G et al. Increased osteoclast development after estrogen loss mediation by Interleukin-G. *Science.* 1992; 257: 88.

Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Giannobile WV. Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67(1): 54–60.

Johari B, Ahmadzadehzarajabad M, Azami M, Kazemi M, Soleimani M, Kargozar S et al. Repair of rat critical size calvarial defect using osteoblast-like and umbilical vein endothelial cells seeded in gelatin/hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2016; 104: 1770-1778.

John HD, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19: 199–207.

Juliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1103-1113.

Junqueira L, Carneiro J, Long J. Βασική Ιστολογία. Εκδ. Πασχαλίδη (5^η έκδοση), Αθήνα 1988: 180-185.

Kadoya Y, Alsaffar N, Kobayashi A, Revell P. The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells. *Bone Min.* 1994; 27: 85.

Kakudo N, Kusumoto K, Kuro A, Ogawa Y. Effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 on intramuscular ectopic osteoinduction by recombinant human morphogenetic protein-2 in rats. *Wound Repair Regen.* 2006; 14(3): 336-342.

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001; 10: 1-4.

Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M et al. Direct

stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*. 2000; 27(4): 479-486.

Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*. 2002; 359: 1929-1936.

Καπαρού Α.: Μελέτη της επίδρασης ανθρώπινων οδοντικών πολφικών κυττάρων συνδυασμένων με ικρίωμα υαλουρονικού οξέος στην επούλωση οστικών ελλειμμάτων της κάτω γνάθου επιμύων, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία στη Βιολογία Στόματος, 3: 13-23, Αθήνα, 2012.

Καπαρού Α.: Μελέτη της επίδρασης οδοντικών βλαστικών κυττάρων μόνιμων δοντιών στα πρώτα στάδια επούλωσης κρανιακών ελλειμμάτων σε επίμυες, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Αθήνα, 2016.

Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol*. 1995; 12: 177-185.

Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002; 2: 389-406.

Καρακάσης ΔΘ: Μαθήματα Οδοντογναθικής Χειρουργικής, Μέρος Γ', Εκδόσεις Αλτιντζή, Θεσσαλονίκη, σελ. 18-21, 1986.

Kashiwazaki H, Kishiya Y, Matsuda A, Yamaguchi K, Iizuka T, Tanaka J, Inoue N. Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: their mechanical and biological properties. *BioMed Mater Eng*. 2009; 19: 133–140.

Kelsey SM, Gallagher CJ, Tate T. Medical oncology including haematological malignancy. In: *Clinical Medicine (5th Edition)*, eds. Kumar P, Clark M., Edinburg, WB Saunders. 2002: 489-496.

Kempen DH, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert WJ. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010; 16(6): 551-566.

Kerr D, Morton A, Dick I et al. Exercise effects on bone mass in postmenopausal women are site-like specific and load dependent. *J Bone Min Res*. 1996; 11: 218.

Khor E. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002; 6: 313–317.

Kieslinger M, Folberth S, Dobrova G, Dorn T, Croci L, Erben R, Consalez GG, Grosschedl R. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2005; 9(6): 757-767.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010; 8(6):e1000412

Kim CY, Clark AE, Hench LL. Early stages of calcium-phosphate layer formation in bioglasses. *J Non-Crystal Sol.* 1989; 113: 195-202.

Kim J-Y, Yang B-E, Ahn J-H, Park SO, Shim H-W. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects. *J Adv Prosthodont.* 2014; 6: 539-546.

Kim DK, Cho TH, Song YM et al. A study about early osteoconductivity of porous alloplastic carbonapatite and anorganic bovine xenograft in canine maxillary augmentation model. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2007; 29:485–493

Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery.* 2016; 38(26): 1-6.

Kim S-K, & Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. *Food Research International.* 2006; 39: 383–393.

Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis- a preliminary result of three cases. *Bone.* 2004; 35(4): 892-898.

Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzer R, Radlanski RJ, Gross U. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1997; 18: 1339-1347.

Kohal RJ, Hurzeler MB. Bioresorbable barrier membranes for guided bone regeneration around dental implants. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2002; 112(12): 1222-1229.

Kokoti M, Sivropoulou A, Koidis P, Garefis P. Comparison of cell proliferation on modified dental ceramics. *J Oral Rehabilitation.* 2001; 28: 880-887.

Kokubo T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J Non-Crystal Sol.* 1990; 120: 138-151.

Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y, Tashiro M, Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S. Apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic for prosthetic application. *Bull Inst Chem Res, Kyoto Univ.* 1982; 60: 260-268.

Kon S, Ruben MP, Bloom AA, Mardam-Bey W, Boffa J. Regeneration of periodontal ligament using resorbable and nonresorbable membranes: clinical, histological, and

histometric study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991; 11(1): 58-71.

Kong YX, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today.* 2000; 21: 495-502.

Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Polymer J.* 2006; 42: 3171–3179.

Κοντονασάκη Ε. Διερεύνηση της δυνατότητας δημιουργίας βιοενεργής επιφάνειας σε υλικά ακίνητων προσθετικών αποκαταστάσεων. Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 2003.

Kontonasaki E, Papadopoulou L, Zorba T, Pavlidou E, Paraskevopoulos K.M, Koidis P. Apatite Formation on Dental Ceramics Modified by a Bioactive Glass. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 893–902.

Kontonasaki E, Sivropoulou A, Papadopoulou L, Garefis P, Paraskevopoulos K, Koidis P. Attachment and proliferation of human periodontal ligamentfibroblasts on bioactive glass modified ceramics. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2006; 1-11.

Kontonasaki E, Zorba T, Papadopoulou L, Pavlidou E, Chatzistavrou X, Paraskevopoulos K, Koidis P. Hydroxy Carbonate Apatite Formation on Particulate Bioglass In Vitro as a Function of Time. *Cryst Res Technol.* 2002; 37: 1165–1171.

Κουζούμπασης ΠΧ, Δρόσος ΠΙ. Οστικά μοσχεύματα. *Ιατρική.* 2004, 85: 347-358.

Kronenberg HM, Chung U. The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate. *Novartis Found Symp.* 2001; 232: 144-152.

Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003; 423: 332-336.

Kulah K, Gulsahi A, Kamburoglu K, Geneci F, Ocak M, Celik HH, Ozen T. Evaluation of maxillary trabecular microstructure as an indicator of implant stability by using 2 cone beam computed tomography systems and micro-computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.11.014>

Kuo YC, Tsai YT. Inverted Colloidal Crystal Scaffolds for Uniform Cartilage Regeneration. *Biomacromolecules.* 2010; 11: 731-739.

Lagravère MO, Carey J, Toogood RW, Major PW. Three-dimensional accuracy of measurements made with software on cone-beam computed tomography images. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008; 134: 112–116.

Lagravère MO, Fang Y, Carey J, Toogood RW, Packota GV, Major PW. Density conversion factor determined using a cone-beam computed tomography unit NewTom QR-DVT 9000. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006; 35: 407–409.

Lang N, Becker W, Karring T. Alveolar bone formation. In: Lindhe J: *Clinical periodontology and implant dentistry*. 3rd ed, Munksgaard, Copenhagen, 1998; 906-936.

Lang NP, Hammerle CHF, Bragger U, Lehmann B, Nyman SR: Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clin Oral Implants Res.* 1994; 5: 92-97.

Langer R. New methods of drug delivery. *Science.* 1990; 249: 1527-33.

Laurencin CT, Ko FK, Attawia MA, Borden MD. Studies on the development of a tissue engineered matrix for bone regeneration. *Cells and Materials.* 1998; 8: 175-181.

Lawrence DA. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2001; 219(1-2): 163-170.

Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histological analysis of osseotites and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J Periodont Restor Dent.* 1999; 19: 117-129.

Λαζαρίδης N, Merten HA, Luhr HG. Πειραματική σε ζώα μελέτη της επούλωσης οστικών ελειμμάτων μετά την πλήρωση αυτών με συγκολλητική ουσία ινώδους και ετερόλογου κολλαγόνου. *Ελλ Π Στομ. Γναθοποσωπ. Χειρ.* 1986; (1): 15-20.

Lee JS, Baek SD, Venkatesan J, Bhatnagar I, Chang HK, Kim HT, Kim SK. In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds. *Int J Biol Macromol.* 2014; 67: 360–366.

Lee Y-M, Park Y-J, Lee S-J, Ku Y, Han S-B, Klokkevold PR, Choi S-M, Chung C-P. Tissue Engineered Bone Formation Using Chitosan/Tricalcium Phosphate Sponges. *Periodontol.* 2000; 71: 410-417.

LeGeros RZ. Apatites in biological systems. *Prog Crystal Growth Charact.* 1981; 4: 1-5.

LeGeros RZ. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clin Orthop.* 2002; 395: 81.

Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence. 1985: 199-209.

Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE. Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft-tissue interposition. A comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 101: 660-672.

Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 2000; 19: 107-120.

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85(7): 584-595.

Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R (eds). *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* New York: Marcel Dekker, 1990.

Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N. Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid. *J Am Ceram Soc.* 1992; 75: 2094-2097.

Liang H, Wang K, Shimer AL, Li X, Balian G, Shen FH. Use of bioactive scaffold for the repair of bone defects in a novel reproducible vertebral body defect model. *Bone.* 2010; 47(2): 197-204.

Liang X, Zhang Z, Gu J, Wang Z, Vandenberghe B, Jacobs R, Yang J, Ma G, Ling H, Ma X. Comparison of micro-CT and cone beam CT on the feasibility of assessing trabecular structures in mandibular condyle. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017; 46 (5) doi: 10.1259/dmfr.20160435.

Liao F, Chen Y, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. A novel bioactive three-dimensional b-tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med.* 2010; 21: 489-496.

Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol.* 1993; 64(11): 1116-1128.

Lindeboom J, Mathura K, Aartman I, Kroon F, Milstein D, Ince C. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 133-139.

Lips R. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001; 22: 477-501.

Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, Staffolani N, Becchetti E. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1997; 68(9): 857-863.

Lohmann P, Willuweit A, Neffe AT, Geisler S, Gebauer TP, Beer S, Coenen HH, Fisher

H, Hermanns-Sachweh B, Lendlein A, Shah NJ, Kiessling F, Langen K-J. Bone regeneration induced by a 3D architecture hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. *Biomaterials*. 2017; 113: 158-169.

Long M. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest*. 1995; 95: 881-887.

Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA. Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(3): 274-280.

Low SB, King CJ, Krieger J. An evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontal Restor Dent*. 1997; 17: 359-367.

Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1995; 6(2): 67-72.

Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11: 760-766.

Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *Craniofacial Surg*. 1992; 20(6): 257-260.

Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 27(2): 135-140.

Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, Montag AG, Haydon RC, He TC. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2007; 25(5): 665-677.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Gacia JR, Okamoto R. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomised rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. 2010; 55: 52-59.

Ma PX. Scaffolds in tissue engineering. *Materials Today*. 2004; 7: 30-40.

MacMillan H. The structure and function of the alveolar process. *JADA*. 1924; 11: 1054.

Magnusson I, Stenberg WV, Batich C, Egelberg J. Connective tissue repair in circumferential periodontal defects in dogs following use of a biodegradable membrane. *J Clin Periodontol*. 1990; 17(4): 243-248.

Mah P, Reeves TE, McDavid WD. Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography. *DentomaxillofacRadiol* 2010; 39: 323–335.

Maksoud MA. Complications after maxillary sinus augmentation: a case report. *Implant Dent*. 2001; 10(3): 168-171.

Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of periosteum. *Molecular aspects. Injury*. 2005; 36(3): 13-19.

Manolagas SC, Weinstein RS. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 1061 -1066.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21: 115-137.

Manson PN. Facial bone healing and bone grafts. A review of clinical physiology. *Clin Plast Surg*. 1994; 21: 331.

Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 2003; 316: 23-32.

Marie PJ, Jones D, Vico L, Zallone A, Hinsenkamp M, Cancedda. Osteobiology, strain and microgravity: Part 1. Studies at the cellular level. *Calcif Tissue Int*. 2000; 67: 2-9.

Marks S, Cahill D. The ultrastructure of alveolar bone during tooth eruption. *Am J Anat*. 1986; 177: 427.

Marks SC Jr, Hermey DC. The structure and development of bone. In: Bilezikian JR, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*. San Diego, CA: Academic Press, 1996: 3-14.

Marks S, Schroeder H. Tooth eruption: Theories and facts. *Anat Rec*. 1996; 245: 374.

Marks SC, Lizuka T, MacCay C, Mason-Savas A et al. The effects of colony-stimulating factor-1 on the number and ultrastructure of osteoclasts in toothless rats and osteopetrotic mice. *TissCell*. 1997; 29: 5897.

Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology. *Am J Anat*. 1988; 183: 1.

Marks SC, Walker DG. The hematologic origin of osteoclasts. *Am J Anat*. 1981; 16: 1.

Marotti G, Ferretti M, Muglia M et al. Quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal of rabbit tibiae. *Bone*. 1992; 13: 363.

Maroudas NG. Adhesion and spreading of cells on changed surfaces. *J Theoret Biol*. 1975; 47: 417-24.

Μαρουφίδης Ν. Πειραματική Μελέτη της Συμβολής του Εμπλουτισμένου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) στην Κατευθυνόμενη Οστική Αναγέννηση τεχνητών οστικών ελλειμμάτων με και χωρίς την προσθήκη διαφόρων μοσχευματικών υλικών. Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη, 2009.

Martin T, Wah K, Suda T. Bone cell physiology. *Euro J Clin Invest*. 1989; 18: 833.

Martinez H, Davarpanah M, Missika R, Celletti R, Lazzara R. Optimal implant stabilization in low density bone. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 423-432.

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998, 7: 267-276.

Matsuda T, Yamauchi K, Ito G. The influence of bioglass on the growth of fibroblasts. *J Biomed Mater Res*. 1987; 21: 499-507.

Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG. Effect of calcium phosphate coating resorption and surgical fit on the bone/implant interface. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28: 1311-9.

Mayani H, Alvarado-Moreno A, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res*. 2003, 34: 476-488.

Mayfield LJ, Skoglund A, Hising P, Lang NP, Attstrom R. Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 508-514.

Μαυράκος Α, Βρότσος Ι. Οστεοβλάστες. Μορφολογία και συνθετική δραστηριότητα. *Οδοντ. Πρόοδος*. 1988; 42: 351.

Mc Allister BS, Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Wollins J. Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein-1 or Bio-Oss[®] in the chimpanzee. *Int J Periodontics Restorative Den*. 1998; 18:227-239.

Meffert RM. Guided tissue regeneration/guided bone regeneration: a review of the barrier membranes. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1996; 8(2): 142-144.

Meinel L, Zoidis E, Zapf J, Hassa P, Hottiger MO, Auer JA, Schneider R, Gander B, Luginbuehl V, Bettschart-Wolfisberger R, Illi OE, Merkle HP, von Rechenberg B. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone*. 2003; 33(4): 660-672.

Mellonig JT, Triplett RG. Guided tissue regeneration and endosseous dental implants. *Int J Periodontics Restorative Den*. 1993; 13: 108-119.

Melrose J, Chuang C, Whitelock J. Tissue engineering of cartilages using

biomatrices. *J Chem Technol Biotechnol.* 2008; 83: 444-463.

Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont.* 1998; 1: 491 -501.

Merten HA, Wiltfang J, Honig JF, Funke M, Luhr HG. Intraindividuellem Vergleich von a- und b-TCP Keramik im Tierexperiment. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2000; 4: 509-515.

Meyer U, Szulczewski DH, Möller K, Heide H, Jones DB. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cells and Mater.* 1993; 3 (2): 129-140.

Midy V, Bres C, Dard M. Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41: 405-11.

Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans. *Int J Oral Implantol.* 1987; 4(2): 49-58.

Molly SM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today.* 2008; 11: 18-25.

Montero A, Okada Y, Tomita M, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1085-1093.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001; 71: 354-361.

Mori S, Yoshikawa H, Hashimoto J, et al. Anti-angiogenic agent (TNP-470) inhibition of ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone.* 1998; 22: 99-105.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997; 88(3): 287-298.

Moy PK, Lundgren S, Holmes RE. Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51: 857-862.

Mukherjee DP, Tunkle AS, Roberts RA, Clavenna A, Rogers S, Smith D. An Animal Evaluation of a Paste of Chitosan Glutamate and Hydroxyapatite as a Synthetic Bone Graft Material *Biomater.* 2003; 67: 603-609.

Mulari MT, Qu Q, Harkonen PL, Vaananen HK. Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calif*

Tissue Int. 2004; 75(3): 253-261.

Munting E: Prosthetic Design and Surface Characteristics: the keys to implant fixation. Hydroxyapatite Coated Hip and Knee Arthroplasty, Cahiers d'enseignement de la SOFCOT, Paris. 1995; 51.

Murphy MF, Wainscoat J, Colvin BT. Haematological disease. In: Clinical Medicine (5th Edition), eds. Kumar P, Clark M., Edinburg, WB Saunders. 2002: 405-410 & 451-453.

Murray G, Holden R, Roachlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. Am J Surg. 1957; 41: 1243.

Murray PDF. Bones. A Study of the Development and Structure of the Vertebrate Skeleton. Cambridge: University Press, 1936.

Muschler G, Hyodo A, Manning T. Evaluation of human bone morphogenetic protein 2 in a canine fusion model. Clin Orthop. 1994; 308: 229-240.

Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Ariji E. Evaluation of voxel values in mandibular cancellous bone: relationship between cone-beam computed tomography and multislice helical computed tomography. Clin Oral Implants Res. 2009; 20: 503–506.

Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Ariji E. Prospective study to estimate mandibular cancellous bone density using large-volume cone-beam computed tomography. Clin Oral Implants Res 2010; 21: 1309–1313.

Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, Moriya H, Ninomiya Y, Einhorn TA, Yamazaki M. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. J Orthop Res. 2001; 19(5): 935-944.

Nakamura Y, Tensho K, Nakaya H, Nawata M, Okabe T, Wakitani S. Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)- induced ectopic bone formation in mice. Bone. 2005; 36(3): 399-407.

Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. Clin Oral Invest. 2017; doi 10.1007/s00784-017-2069-3.

Nakase T, Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. J Bone Miner Metab. 2006; 24(6): 425-433.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002; 108:17-29.

Nath S., Dey A., Mukhopadhyay A., & Basu B. Nanoindentation response of novel hydroxyapatite-mullite composites. *Materials Science and Engineering*. 2009; 513/514. (A): 197–201.

Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008; 5: 1137–1158.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1434-1441.

Nemcovsky CE, Artzi Z. Comparative study of buccal dehiscence defects in immediate, delayed, and late maxillary implant placement with collagen membranes: clinical healing between placement and second-stage surgery. *J Periodontol*. 2002; 73(7): 754-761.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999; 13(1): 9-22.

Neupert G, Vogel W. Growth of fibroblasts and epithelioid cells on a new machinable bioactive glass ceramic in comparison with non reactive materials. *Exp Pathol*. 1984; 26: 113-116.

Nevins M, Mellonig JT. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1992; 12: 96-111.

Niederauer GG, McGee TD, Keller JC, Zaharias RS. Attachment of epithelial cells and fibroblasts to ceramic materials. *Biomaterials*. 1994; 15: 342-52.

Nisbet DR, Crompton KE, Horne MK, Finkelstein DI, Forsythe JD. Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2008; <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31000>.

Niu T, Rosen CJ. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene*. 2005; 361: 38-56.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33: 157- 163.

Nomura Y, Watanabe H, Honda E, Kurabayashi T. Reliability of voxel values from cone-beam computed tomography for dental use in evaluating bone mineral density. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21: 558–562.

Norouzi N, Bhakta HC, Grover WH. Sorting cells by their density. *PLOS ONE*. 2017;

12(7): 1-16.

Norton MR, Gamble C. Bone classification. An objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12: 79-84.

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14: 775-783.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982; 9: 257-265.

Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990; 5: 9-14.

Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(6): 494-498.

O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011; 14: 88-95.

Odgren PR, Marks S. The complexities of osteoclast biology lessons from eleven osteopetrotic mutations. *Ital J Elec Metab.* 1998; 12: 9.

Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Marrow induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: A comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res.* 1991; 24: 1563-1570.

Ogino M, Ohuchi F, Hench L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *J Biomed Mater Res.* 1980; 14: 55-64.

Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralized, bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1991; 146(3): 442-450.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 191-220.

Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ et al. Bone structure and formation: A new perspective, *Materials Science and Engineering R.* 2007; 58: 77-116.

Omstead DR, Baird LG, Christenson L, Du Moulin G, Tubo R, Maxted DD, Davis J, Gentile FT. Voluntary guidance for the development of tissue-engineered products. *Tissue Eng Fall* 1998; 4(3): 239-266.

Oonishi H. Clinical results versus experimental data in orthopaedic applications of bioceramics In: Dychene P, Christiansen D. Bioceramics Volume 6 Proceedings of the 6th International Symposium on ceramics in Medicine. Philadelphia, USA: Butterworth-Heinemann Ltd. 1993; 93-98.

Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. Clin Orthop Rel Res. 1997; 334: 316-25.

Orly I, Gregoire M, Menenteau J, Dard M. Effects of synthetic phosphates on the ³H-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity of human fibroblasts in culture. J Biomed Mater Res. 1989; 23: 1433-1440.

Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Meimandi-Parizi A. Chitosan/gelatin/platelet gel enriched by a combination of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate in healing of a radial bone defect model in rat. International Journal of Biological Macromolecules. 2017; 101: 630–637.

Otsuka M, Matsuda Y, Yu D, Wong J, Fox JL, Higuchi WI. A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement. Chem Pharm Bull. 1990; 38: 3500-3502.

Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. Biomaterials. 2006; 27: 5892-5900.

Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit. Ada Anat. 1990; 137: 350.

Papadopoulou L, Kontonasaki E, Zorba T, Chatzistavrou X, Pavlidou E, Paraskevopoulos K, Sklavounos S, Koidis P. Dental ceramic coated with bioactive glass: surface changes after exposure in a simulated body fluid under static and dynamic conditions. Physic stat. sol.(a) 198, 2003; 1: 65- 75.

Parfitt AM. The mechanism of coupling: A role for the vas-culature. Bone. 2000; 26:319-323.

Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med. 2002; 48: 142-148.

Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, Guenin LM, Huss R, Moldovan NI, Rao M, Srour EF, Yoder MC. Stem cells: shibboleths of development. Stem Cells Dev. 2004; 13(6): 579-584.

Parma-Benfenati S, Tinti C, Albrektsson T, Johansson C. Histologic evaluation of

guided vertical ridge augmentation around implants in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999; 19(5): 424-37.

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008; 43(5): 931-940.

Pauwels R, Beinsberger J, Collaert B, Theodorakou C, Rogers J, Walker A et al. Effective dose range for dental cone beam computed tomography scanners. *Eur J Radiol.* 2012; 81:267–271.

Pauwels R, Jacobs R, Singer SR, Mupparapu M. CBCT-based bone quality assessment: are Hounsfield units applicable? *Dentomaxillofac Radiol.* 2015; 44: 1-16.

Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol.* 1996; 67(3): 236-244.

Pelker R, Friedlaneder G, Markham T. Biomechanical properties of bone allograft. *Clin Orthop.* 1983; 174: 54.

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP-2 induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(11): 2016-2017.

Peng L, Zhuo R-X. Biological Evaluation of Porous Chitosan/collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008. ICBBE 2008, 2008; 16-18 May 2008: 897 – 900.*

Pietrokovski J. The bony residual ridge in man. *J Prosthet Dent.* 1975; 34(4): 456-462.

Pikos MA. Maxillary sinus membrane repair: report of a technique for large perforations. *Implant Dent.* 1999; 8(1): 29-34.

Pini Prato G, Tinti C, Vincenzi G, Magnani C, Cortellini P, Clauser C. Guided tissue regeneration versus mucogingival surgery in the treatment of human buccal gingival recession. *J Periodontol.* 1992; 63(11): 919-928.

Ponder SN, Benavides E, Kapila S, Hatch NE. Quantification of external root resorption by low-vs high- resolution cone-beam computed tomography and periapical radiography: A volumetric and linear analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013; 143: 77-91.

Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop.* 1985; 200: 87-99.

Prashnanth KVH, Tharanathan RN. Chitin/Chitosan: modifications and their

uplimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Technology*. 2007; 18: 117-131.

Prousaefs P, Lozada J, Valencia G, Rohrer MD. Histologic evaluation of a hydroxyapatite onlay bone graft retrieved after 9 years: A clinical report. *J Prosthet Dent*. 2002; 87: 481-484.

Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 966-972.

Puelo DA, Bizios R. RGDS tetrapeptide binds to osteoblasts and inhibits fibronectin-mediated adhesion. *Bone*. 1991; 12: 271-276.

Qin L, Qiu P, Wang L, Li X, Swarthout JT, Soteropoulow P, Tolias P, Partridge NC. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem*. 2003; 278(22): 19723-19731.

Quesenberry PJ, Gallin JI. Hematopoiesis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine (15th Edition)*, eds. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, New York, McGraw-Hill. 2001; 4: 653-660.

Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoblast formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328(3): 739-745.

Quteish D, Singrao S, Dolby AE. Light and electron microscopic evaluation of biocompatibility, resorption and penetration characteristics of human collagen graft material. *J Clin Periodontol*. 1991; 18(5): 305-311.

Rabie AB, Lu M. Basic fibroblast growth factor up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor during healing of allogenic graft. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(12): 1025-1033.

Rachmiel A, Srouji S, Peled M: Alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30: 510-517.

Rae T. Cell biochemistry in relation to the inflammatory response for foreign materials. In: Williams DF (ed). *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981.

Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003; 9: 702-712.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999; 45: 1353-1358.

Raisz LG. Prostaglandins and bone: Physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis*

Cartilage. 1999; 7: 419-421.

Rajnicek AM, McCraig CD. Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *J Cell Sci.* 1997; 110: 2915-2924.

Randall RL, Pelker RR, Friedlaender GE et al. Sequential dependence of freeze-drying and irradiation on biomechanical properties of rat bone. *Am J Orthop.* 2002, 31: 129-134.

Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83: 1-6.

Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998; 16: 247-252.

Redey SA, Nardin M, Bernache-Assolant D, Rey C, Delannoy P, Sedel L, Marie PJ. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50: 353-364.

Rehman I, Smith R, Hench L, Bonfield W (β). FT-Raman Spectroscopic Analysis of natural bones and their comparison with bioactive glasses and hydroxyapatite In: Andersson Ö, Happonen R, Yli-Urpo A, eds. *Bioceramics Volume 7 Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine.* Turku, Finland: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994; 7: 79-84.

Reiser GM, Rabinovitz Z, Bruno J, Damoulis PD, Griffin TJ. Evaluation of maxillary sinus membrane response following elevation with the crestal osteotome technique in human cadavers. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16(6): 833-840.

Renth AN, Detamore MS. Leveraging “raw materials” as building blocks and bioactive signals in regenerative medicine. *Tissue Eng B Rev.* 2012; 18(5): 341–362.

Reynolds J, Meikle M. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 144.

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27: 3413–3431.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006; 31: 603–632.

Ripamonti U, Ferretti C, Heliotis M. Soluble and insoluble signals and the induction of bone formation: molecular therapeutics recapitulating development. *J Anat.* 2006; 209: 447-468.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386: 671-674.

Roberts EW, Hartsfield JK. Bone development and function: Genetic and environmental Mechanisms. *Semin Orthod.* 2004; 10: 100-122.

Robey PG. The biochemistry of bone. *Endoc Metab CAN.* 1989, 18: 859.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: Structure and function. *Connect Tissue Res.* 1996; 35: 3-36.

Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999; 27: 1229-1241.

Rosen CJ. Growth hormone and aging. *Endocrine.* 2000; 12: 197-201.

Rosen CJ. Insulin-like growth factor I and bone mineral density: experience from animal models and human observational studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004; 18(3): 423-435.

Rosert J, Crombrughe B. Type I collagen structure synthesis and regulation. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds) *Principles of Bone Biology.* Academic Press 1996: 127-141.

Rossi P, Sibelli P, Fumerò S, Crua E: Short-term results of HA-coated primary Total Hip Arthroplasty - *Clin Orthop.* 1995; 310: 98.

Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering, *Trends in Biotechnology.* 2008; 26: 434-441.

Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pelegri VD Jr. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res.* 2005; 23(1): 34-40.

Russell WM, Burch RL: *The principles of humane experimental technique.* London: Methuen, 1959.

Ruys AJ, Brandwood A, Milthorpe BK, Dickson MR, Zeigler KA, Sorrell CC (α). The effect of sintering atmosphere on the chemical compatibility of hydroxyapatite and particulate additives at 1200⁰C. *J Mater Sci.* 1995; 6: 297-301.

Sahni M. Biphosphanates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest.* 1993; 95: 167.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26(5): 910-913.

Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1993; 64(11): 1129-1137.

Schakenraad JM, Busscher HJ, Wildevuur CRH, Arends J. The influence of substratum free surface energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J Biomed Mater Res.* 1986; 20: 802-808.

Scheerlinck LM, Muradin MS, van der Bilt A, Meijer GJ, Koole R, Van Cann EM. Donor site complications in bone grafting: comparison of iliac crest, calvarial, and mandibular ramus bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013; 28: 222–227.

Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Brower BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (eds). *Skeletal Trauma.* Philadelphia: Saunders. 1992; 31-75.

Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994; 9(1): 13-29.

Schepers EJJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 171-81.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(5): 459-466.

Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials.* 1997; 18(7): 535-538.

Schlickewei W, Kuner EH. Initial clinical findings with Bio-Oss[®]. In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg.): *Heffe zur Unfallheilkunde.* Heft 216. Springer, Berlin 1991.

Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31: 469-484.

Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30: 531-537.

Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, Ornitz DM. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn.* 2009; 238(3): 766-774.

Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat.* 1990; 138(3): 185-192.

Schoenau E. The development of the skeletal system in children and the effect of muscle strength. *Bone.* 1998; 9: 221.

Schroeder H, Luder U, Bosshardt D. Morphological and labeling evidence

supporting and extending a modern theory of tooth eruption. *Sch Monat Zahn Med.* 1992; 102: 20.

Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence. *Injury.* 2011; 42(6): 609-613.

Schultze-Mosgau S, Schliephake H, Neukam FW. Soft tissue profile changes after autogenous iliac crest onlay grafting for the extremely atrophic maxilla. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58: 971-977.

Schulz KF: Randomised trials, human nature, and reporting guidelines. *Lancet.* 1996; 348: 596-598.

Schwartz Z, Somers A, Mellonig et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol.* 1998; 69: 470-478.

Scott Ch, Windsor J. General Language Performance Measures in Spoken and Written Narrative and Expository Discourse of School-Age Children With Language Learning Disabilities. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research.* 2000; 43: 324-339.

Seeman E, Delmas PD. Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12: 281-283.

Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J Periodontol.* 1990; 61(3): 157-165.

Seitz TL, Noonan KD, Hench LL, Noonan NE. Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16: 195-207.

Seol Y-J, Lee J-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Ku Y, R I-C, Lee S-J, Han S-B, Chung C-P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters.* 2004; 26: 1037-1041.

Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010; 5(6): 1-15.

Sevor JJ, Meffert RM, Cassingham RJ. Regeneration of dehiscenced alveolar bone adjacent to endosseous dental implants. utilizing a resorbable collagen membrane: clinical and histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13(1): 71-83.

Shalash MA, Rahman HA, Azim AA, et al. Evaluation of horizontal ridge augmentation using beta tricalcium phosphate and demineralized bone matrix: a comparative study. *J Clin Exp Dent.* 2013; 5: 253-259.

Shanaman RH. The use of guided tissue regeneration to facilitate ideal prosthetic

placement of implants. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1992; 12(4): 256-265.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater.* 2008; 15: 53-76.

Sharma C, Dinda AK, Potdar PD, Chou CF, Mishra NC. Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 64: 416-427.

Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 1996; 11(8): 1139-1145.

Shin AY, Bishop AT. Vascular anatomy of the distal radius: implications for vascularized bone grafts. *Clin Orthop.* 2001, 383: 60-73.

Siepe M, Akhyari P, Lichtenberg A, Schlensak C, Beyersdorf F. Stem cells used for cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio- thoracic Surgery.* 2008; 34: 242-247.

Sigurdsson TJ, Nguyen S, Wikesjo UM. Alveolar ridge augmentation with rhBMP-2 and bone- to-implant contact in induced bone. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21: 461-473.

Silver I, Deas J, Erecińska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials.* 2001; 22: 175-85.

Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994; 14(2): 166-180.

Simion M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998; 18(1): 8-23.

Simion M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A: Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998; 18: 8-23.

Simion M, Misitano U, Gionso L, Salvato A. Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(2): 159-167.

Slosarczyk A, Stobierska E, Pazkiewicz Z, Gawlicki M. Calcium Phosphate Materials

Prepared from Precipitates with Various Calcium:Phosphorus Molar Ratios. *J Am Caram Soc.* 1996; 79: 2539-2544.

Smiler DG. The sinus lift graft: basic technique and variations. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1997; 9(8): 885-893.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000.* 2000; 24(99): 26.

Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 2017; 48(2): 131-147.

Sommerville SM, Johnson N, Bryce SL, et al. Contamination of banked femoral head allograft: incidence, bacteriology and donor follow up. *Aust NZJ Surg.* 2000, 70: 480-484.

Song JM, Shin SH, Kim Y D, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, Kim HS. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *International Journal of Oral Science.* 2014; 6: 87-93.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012; 7: 1918-1929, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.113>.

Srouji S, Blumenfeld I, Rachmiel A, Livne E. Bone defect repair in rat tibia by TGF-beta1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. *Cell Tissue Bank.* 2004; 5(4): 223-230.

Srouji S, Rachmiel A, Blumenfeld I, Livne E. Mandibular defect repair by TGF-beta and IGF-1 released from a biodegradable osteoconductive hydrogel. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005; 33(2): 79-84.

Stein EM, Dempster DW, Udesky J, Zhou H, Bilezikian JP, Shane E, Silverberg SJ. Vitamin D deficiency influences histomorphometric features of bone in primary hyperparathyroidism. *Bone.* 2011; 48(3): 557-561.

Stevens A, Lowe J. Ιστολογία του ανθρώπου. Ιατρικές Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης, Αθήνα 1998, σελ: 233-248.

Stevenson S, Shaffer J, Goldberg V. The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone. *Clin Orthop.* 1996; 323: 86-95.

Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin N Am.* 1999; 4: 543-550.

Stevenson S. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. *J Bone Joint Surg.* 1997; 19: 1-6.

Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 2399: 9656-9661.

Suba T, Udagawa N, Takahasi N. Cells of bone. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds) *Principles of bone biology.* Academic Press, 1996: 87-102.

Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev.* 1992; 3: 66-80.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin Tj. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20: 345-357.

Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res.* 1998; 13: 94-117.

Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, et al. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *J Bone Joint Surg.* 1999, 81: 336-341.

Summers RB. The osteotome technique. Part 3--Less invasive methods of elevating the sinus floor. *Compendium.* 1994; 15(6): 698.

Summers RB. A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique. *Compendium.* 1994; 15(2): 152, 154-156.

Sun H & Yang HL. Calcium phosphate scaffolds combined with bonemorphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissueengineering. *Chinese Medical Journal.* 2015; 128(8): 1121–1127.

Sunaquist K, Marks S. Bafilomycin A1 inhibits bone resorption and tooth eruption in vivo. *J Bone Miner Res.* 1995, 9: 1575.

Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 2003, 34: 446-460.

Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials.* 2003; 24:181-194.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger EH. Histological

observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11: 334-344.

Taguchi R. Autoclaved autograft bone combined with vascularized bone and bone marrow. *Clin Orthop.* 1995; 320: 220.

Tamariz E, Rios-Ramírez A. Biodegradation of medical purpose polymeric materials and their impact on biocompatibility. *Biodegradation-Life of Science Croatia: Intech.* 2013; 1–29.

Tatum H Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am.* 1986; 30(2): 207-229.

Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, Morra A, Anderson GI. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 17: 321-330.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; 289: 504-508.

Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007; 170(2): 427-435.

Teitelbaum SL, Ross FR. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003; 4: 638-649.

Ten Cate R. *Oral Histology. Development, structure and function* (5th Ed). Mosby, St. Louis 1998, p. 104-127.

Termine JD. Noncollagenous proteins in bone physiology and development. In: *Calcium regulation and bone metabolism.* 1992: 309-314.

Τζαμουράνης ΑΣ. *Ιστολογία και εμβρυολογία των οδοντικών και περιοδοντικών ιστών.* Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 1995.

Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43: 61-87.

Thein-Han WW, Misra RDK. Three-dimensional chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *JOM, J. Miner. Metals Mater. Soc.* 2009; 61: 41–44.

Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009; 5: 1182–1197.

Tigli RS, Karakeçili A, Gumusderelioglu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J Mater Sci: Mater Med.* 2007; 18: 1665–1674.

Tinti C, Vincenzi GP. Expanded polytetrafluoroethylene titanium-reinforced membranes for regeneration of mucogingival recession defects. A 12-case report. *J Periodontol.* 1994; 65(11): 1088-1094.

Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg.* 1995, 77A: 1742-1754.

Toricelli P, Verne E, Brovarone CV, Appendino P, Rustichelli F, Krajewski A, Ravagliolo A, Pierini G, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Biological glass coating on ceramic materials: in vitro evaluation using primary osteoblast cultures from healthy and osteopenic rat bone. *Biomaterials.* 2001; 22: 2535-2543.

Townsend JM, Dennis SC, Whitlow J, Feng Y, Wang J, Andrews B, et al. Colloidal Gels with Extracellular Matrix Particles and Growth Factors for Bone Regeneration in Critical Size Rat Calvarial Defects. *AAPS J.* 2017; 19: 703-711.

Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodont Restor Dent.* 2003; 23: 69-77.

Troster SD. Die Hydroxylapatitkeramik Endobon[®] - Eine alternative Therapiemöglichkeit für Knochendefekte. In: Venbrocks R, von Salis-Soglio G (Hrsg.): *Jahrbuch der Orthopädie* 1993. Biermann, Zulpich 1993.

Tsiourvas D, Tsetsekou A, Kammenou MI, Boukos N. Controlling the formation of hydroxyapatite nanorods with dendrimers. *J Am Ceram Soc.* 2011; 94: 2023–2029.

Tsiourvas D, Sapolidis A, Papadopoulos T. Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries. *Mater Today.* 2016; 7: 59-66.

Tuominen U, Salonen J, Haponnen R, Yli-Urpo A. Attachment of human oral mucosa to bioactive glass in vitro. In: Dychene P, Christiansen D, eds. *Bioceramics Volume 6 Proceedings of the 6th International Symposium on Ceramics in Medicine* Philadelphia, USA: Butterworth-Heinemann Ltd. 1993; 151-6.

Uo M, Mizuno M, Kuboki Y, Makishima A, Watari F. Properties and cytotoxicity of water soluble Na₂O-CaO-P₂O₅ glasses. *Biomaterials.* 1998; 19: 2277-2284.

Urist MR. *Fundamental and clinical bone physiology.* JB Lippincott, 1980.

Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965, 150: 893-899.

Vail TP, Urbaniak JR. Donor site morbidity with the use of vascularized autogenous fibular grafts. *J Bone Joint Surg.* 1996; 78A: 204-211.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimoës R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Impl Res.* 2014; 25: 879–893.

Valentine JD Jr, Reiman BE, Beuttenmuller EA, Donovan MG. Light and electron microscopic evaluation of Proplast II TMJ disc implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47(7): 689-696.

Van Blitterswijk CA, Kuijpers W, Faems TH, Grote JJ. Epithelial reactions to hydroxyapatite. *Acta Otolaryngol.* 1986; 101: 231-41.

Van Dessel J, Nicolielo LFP, Huang Y, Coudyzer W, Salmon B, Lambrichts I, Jacobs R. Accuracy and reliability of different cone beam computed tomography (CBCT) devices for structural analysis of alveolar bone in comparison with multislice CT and micro-CT. *Eur J Oral Implantol.* 2017; 10(1): 95-105.

Vanheusden AJ, Goffinet G, Zahedi S, Nusgens B, Lapiere CM, Rompen EH. In vitro stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditioning. *J Periodontol.* 1999; 70(6): 594-603.

Van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials.* 1992; 13: 897-904.

Vico L, Hinsenkamp M, Jones D, Marie PJ, Zallone A, Cancedda R. Osteobiology, strain and microgravity: Part 2. Studies at the tissue level. *Calcif Tissue Int.* 2001, 68: 1-10.

Vlierberghe SV, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as Scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules.* 2011; 2: 1387–1408.

von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16(3): 343-354.

von Arx T, Cochran DL, Schenk RK, Buser D. Evaluation of a prototype trilayer membrane (PTLM) for lateral ridge augmentation: an experimental study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31: 190-199.

Vuorio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes. *Ann Rev Biochem.* 1990; 59: 837-872.

Walboomers XF, Croes HJE, Ginsel LA, Jansen JA. Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials.* 1998; 19: 1861-1868.

Walker M, Hench L. Compositional dependence of the bone-bioglass bond In: An

investigation on bonding mechanisms of the interface of a prosthetic material U.S. Army Medical Research and Development Command, Contract #DAMD 17-76-C-6033, Report #8,1977; pp. 29-39.

Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(6): 2220-2224.

Wang HL, Takata T, Miyauchi M. Initial attachment of osteoblasts to various GTR membranes. *Journal of Dental Research*. 1997; 76:444.

Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(9): 633-640.

Wataha J. Materials for endosseous dental implants. *J Oral Rehabil*. 1996; 23: 79-90.

Weinmann J. Variations in the structure of bone and bones and their significance in radiology. *Oral Surg*. 1954; 9: 988.

Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009; 129(7): 989-997.

Werner F, Foster D, Murray DG: The influence of design on the transmission of torque across knee prostheses. *J Bone Joint Surg Am*. 1978; 60-A(3): 342-348.

Werner S & Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83: 835-870.

Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Impl Res*. 1995; 6: 155-163.

Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, Nuber GW, Glorieux FH, Travers R, Sprague SM. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng*. 1999; 5: 35-51.

Williams DF. Biomaterials and biocompatibility: An Introduction. In: Williams DF (ed). *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981.

Wilson J, Clark A, Douek E, Krieger J, King Smith W, Saville Zamet J. Clinical applications of Bioglass implants. In: Andersson Ö, Happonen R, Yli-Urpo A, eds. *Bioceramics Volume 7 Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine*. Turku, Finland: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994; 415-22.

Wilson J, Clark AE, Hall M, Hench LL. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantol*. 1993; 19: 295-302.

Wilson J, Low SB. Bioactive ceramics for periodontal treatment: comparative studies in the Patus monkey. *J Appl Biomater*. 1992; 3: 123-129.

Wilson J, Nolletti D. Bonding of soft tissues to Bioglass®. In Yamamuro T, Hench LL, Wilson J, eds. *Handbook of Bioactive Ceramics, Vol I*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990; 283-302.

Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, Hench LL. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *J Biomed Mater Res*. 1981; 15: 805-817.

Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P. Degradation characteristics of a- and b-TCP in minipigs. *J Biomed Mater Res*. 2002; 63: 115-121.

Winn SR, Hu Y, Sfeir C, Hollinger JO. Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Adv Drug Del Rev*. 2000; 42: 121-138.

Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*. 2002, 27: 2-8.

Wu Z, Fan L, Xu B, Lin Y, Zhang P, Wei X. Use of decellularized scaffolds combined with hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor for skin tissue engineering. *Tissue Eng A*. 2015; 21(1-2): 390-402.

Xu MC, Zhai D, Chang J, Wu CT. In vitro assessment of three-dimensionally plotted n agelschmidtite bioceramic scaffolds with varied macropore morphologies. *Acta biomaterialia*. 2014; 10: 463-476.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa I. *Endocr Rev*. 2000; 21: 393-411.

Yancopoulos G, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407: 242-248.

Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*. 2005; 15: 159-177.

Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*. 1996; 17: 175-185.

Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of

the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16: 23-33.

Ying TH, Ishii D, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Sudesh K, Samian R, Fujita M, Maeda M, Iwata T. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials*. 2008; 29: 1307-1317.

Yoder M, Williams DA. Matrix molecular interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 1995; 23: 961.

Yoshida S, Yamamuro T, Okumura M, et al. Microstructural changes of osteopenic trabeculae in the rat. *Bone*. 1991; 12: 85.

Younes I & Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. 2015; 13(3): 1133–1174.

Young MR, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major non-collagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop*. 1992; 28(1): 275-294.

Young RA. Biological apatites vs. Hydroxyapatite at the atomic level. *Clin Orthop*. 1975; 113: 249-256.

Younger E, Chapman M. Morbidity of bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989; 3: 192-195.

Yu D, Wong J, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Otsuka MJ. *Pharm. Sci*. 1992; 81: 529.

Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. *J Periodontol*. 1996; 67(7): 650-657.

Zaidi M, Alam A, Huang CL et al. Extracellular Ca⁺⁺ sensing by the osteoclast. *Cell Calcium*. 1993; 14: 271.

Zhang H, Mao X, Du Z, Jiang W, Han X, Zhao D, et al. Three dimensional printed macroporous poly(lactide acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater*. 2016; 17: 136-148.

Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006; 27(33): 5658-5668.

Ziegler R, Scheidt-Nave C, Schrla S. Pathophysiology of osteoporosis. *Am Inst Nutrition Int Conf Progress Bone Min Res*. 1995; 2033.

Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(6): 844-852.

Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16: 355-366.