



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΗΣ**

**“Ν.Σ. ΧΡΗΣΤΕΑΣ”**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΟΝΤΖΟΓΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΣΕ ΠΡΟΚΛΗΤΑ ΟΣΤΙΚΑ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ**

**ΚΡΙΣΙΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ.**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΧΟΙΡΟΥΣ.**

**Τιτσινίδης Σάββας**

**Χειρουργός Οδοντίατρος**

**Αθήνα 2021**

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. ΚΑΡΑΤΖΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ - Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. ΠΕΡΡΕΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ - Ομότιμη Καθηγήτρια
3. ΑΓΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΓΙΩΡΓΟΣ - Αναπληρωτής Καθηγητής

### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. ΚΑΡΑΤΖΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ - Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. ΠΕΡΡΕΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ - Ομότιμη Καθηγήτρια
3. ΑΓΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΓΙΩΡΓΟΣ - Αναπληρωτής Καθηγητής
4. ΚΟΝΤΖΟΓΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ - Καθηγητής
5. ΔΟΝΤΑ ΙΣΜΗΝΗ - Καθηγήτρια
6. ΔΗΜΗΤΡΟΥΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ - Αναπληρωτής Καθηγητής
7. ΚΥΚΑΛΟΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ – Επίκουρος Καθηγητής

**Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα (Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, παράγραφος 2 του Νόμου 5343).**



## ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πᾶσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. ἠγίσσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοίσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρῃσι, καὶ διδάσειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζοσι μαθᾶνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παρατελής τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοίσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκειμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσθαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δαήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρειν. Οὐ δῶσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δῶσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμῶ δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκκωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἦν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πᾶσης ἀδικίης ἐκούσιης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἦν ἐν θεραπείῃ ἢ ἰδῶ, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπιῆς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἢ μὴ κρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης ἀσθεζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπισρκούντι, τάναντία τούτων.

## Ευχαριστίες:

Η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης είναι αποτέλεσμα μιας εντατικής και διαρκούς ομαδικής συνεργασίας που ξεκίνησε τον Μάρτιο του 2015. Διανύοντας όλη αυτή την πορεία προσπαθειών, δυσκολιών και εμπειριών το εγχείρημα ολοκληρώθηκε, δίνοντας μου βαθύτερη γνώση στον τόσο ενδιαφέροντα και συνάμα πολυδιάστατο τομέα των οστικών μοσχευμάτων.

Από αυτή τη θέση θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής και Πειραματικής Χειρουργικής Κο **Καρατζά Θεόδωρο**, επιβλέποντα του Διδακτορικού, που μου εμπιστεύθηκε την ανάθεση του θέματος της εργασίας και ο οποίος με το συνεχές ενδιαφέρον του εξασφάλισε τις καλύτερες δυνατές συνθήκες για την ολοκλήρωσή της. Επίσης, την Καθηγήτρια Πειραματικής Παθολογίας και τέως Διευθύντρια του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας Κα **Περρέα Δέσποινα** για την καθοδήγηση και φιλοξενία στο Εργαστήριο κατά τη διάρκεια διενέργειας του πειράματος.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στο σεβαστό μου δάσκαλο, τέως Καθηγητή Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής Κο **Ελευθεριάδη Ευστάθιο** από τον οποίο αποκόμισα ιδιαίτερη χειρουργική εμπειρία καθόλη τη διάρκεια της μεταξύ μας συνεργασίας ενώ παράλληλα διέλυσε τους αρχικούς μου δισταγμούς και με παρότρυνε να ξεκινήσω αυτή την Διατριβή, συμμετέχοντας ενεργά στο πειραματικό σκέλος κατά την εκπόνησή της.

Αναφορικά με την ιστολογική και ιστομορφομετρική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων θα ήθελα να αναφερθώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Κο **Αγρογιάννη Γεώργιο**, η συμβολή του οποίου ήταν καθοριστική στο εργαστηριακό μέρος.

Επίσης ιδιαίτερα ευχάριστη ήταν η συνεργασία, συμπαράσταση και έμπρακτο ενδιαφέρον κατά την ολοκλήρωση της μελέτης με τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας Κο **Κωνσταντίνο Κόντζογλου**.

Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω τις ευχές μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Κο **Δημήτριο Βλαχοδημητρόπουλο** για την ψυχολογική υποστήριξη, το ενδιαφέρον και το ήθος του ως δασκάλου, που συνέβαλε καθοριστικά σε μια σχετικά κρίσιμη καμπή για την ολοκλήρωση της εργασίας όσο και τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Κο **Ανδρέα Λάζαρη** για την καταλυτική συμβολή του.

Ιδιαίτερο ρόλο έπαιξε η συμμετοχή του Κου **Λεωνίδα Ποδαρόπουλου** αναφορικά με τις εύστοχες υποδείξεις και την ενεργό συμμετοχή του στην συγγραφή του ερευνητικού άρθρου της Διδακτορικής Διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ τον μαθηματικό και οικογενειακό φίλο Κο **Χρήστο Κατοπόδη** που συμμετείχε στην στατιστική ανάλυση του υλικού.

Αμέριστη ευγνωμοσύνη επίσης χρωστάω στη βοηθό μου Κα **Καγκίδη Μαρία** για την συμμετοχή, ενδιαφέρον και στήριξη σε όλη αυτή την πορεία.

Τέλος θα ήθελα να αναφέρω το ζωνρό ενδιαφέρον του προσωπικού του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας που συνέβαλαν στην φροντίδα των πειραματόζωων όσο και το γεγονός ότι οι εταιρείες οστικών μοσχευμάτων στάθηκαν στο πλευρό μου, προσφέροντας τα υλικά που απαιτούσε το πειραματικό σκέλος της μελέτης.

Καταλήγοντας, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου, τη σύζυγο και τα παιδιά μου για τη συμπαράσταση, αγάπη και προσμονή κατά τη διάρκεια της μακρόχρονης αυτής διαδικασίας.

Αθήνα 14 Απριλίου 2020

## **Βιογραφικό Σημείωμα**

Ο Τιτσινίδης Σάββας είναι εξειδικευμένος Στοματολόγος και Χειρουργός Στόματος. Αποφοίτησε από την **Οδοντιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)** το **2002**. Είναι κάτοχος δύο **Μεταπτυχιακών Τίτλων (Master of Science)** στην **Χειρουργική Στόματος (Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, 2007)** όσο και στην **Στοματολογία (Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, 2013)**. Έλαβε επίσης από την **European Association of Oral Medicine** τον τίτλο **Diploma of Oral Medicine (Gothenburg, Sweden, 2018)** όσο και τον τίτλο **Academic Fellowship Certification** από την **American Academy of Oral Medicine (New Orleans, LA, USA, 2019)**. Επί του παρόντος σπουδάζει στην **Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών** (προπτυχιακός φοιτητής) και ολοκληρώνει **μεταπτυχιακό Δίπλωμα με τίτλο "Master in Oral Implantology"** στο **Goethe University, Frankfurt, Germany**.

Υπήρξε για αρκετά έτη επιστημονικός συνεργάτης τόσο στην **Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής** όσο και στην **Κλινική Στοματολογίας του ΕΚΠΑ**.

Έχει δημοσιεύσει εργασίες σε Διεθνή και Ελληνικά επιστημονικά περιοδικά, έχει συμμετάσχει ως ομιλητής σε συνέδρια σε Αμερική, Ευρώπη και Ελλάδα ενώ είναι μέλος επιστημονικών εταιρειών (βλέπε παρακάτω).

Παράλληλα διατηρεί Ιδιωτικό Ιατρείο σε Αθήνα και Κόρινθο όπου ασχολείται κυρίως με το φάσμα της Στοματολογίας και της Χειρουργικής Στόματος.

## **Σπουδές - Τίτλοι**

- Χειρουργός Οδοντίατρος - Οδοντιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), 2002.
- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Παθολογίας Στόματος με κλινική εξειδίκευση στην Χειρουργική Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, 2007.
- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Παθολογίας Στόματος με κλινική εξειδίκευση στην Στοματολογία, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, 2013.
- Diploma of Oral Medicine - European Association of Oral Medicine, Gothenburg, Sweden, 2018.
- Academic Fellowship Certification - American Academy of Oral Medicine, New Orleans, LA, USA, 2019.

## **Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών**

- Επιστημονική Εταιρεία Χειρουργικής Στόματος.
- Ελληνική Οδοντιατρική Εταιρεία Χειρουργικής Στόματος.
- Ελληνική Εταιρεία Παθολογίας Στόματος.
- Στοματολογική Εταιρεία της Ελλάδος.
- European Association of Osseointegration.
- International Congress of Oral Implantologists.
- European Association of Oral Medicine.
- American Academy of Oral Medicine.



## **Επιστημονικές δημοσιεύσεις που εκπονήθηκαν στα πλαίσια ολοκλήρωσης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής:**

- 1.** Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55(1):26-32. doi: 10.1016/j.jdsr.2018.09.003. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30733842; PMCID: PMC6354279.
- 2.** Titsinides S, Karatzas T, Perrea D, Eleftheriadis E, Podaropoulos L, Kalyvas D, Katopodis C, Agrogiannis G. Osseous Healing in Surgically Prepared Bone Defects Using Different Grafting Materials: An Experimental Study in Pigs. *Dent J (Basel).* 2020;8(1):E7. doi: 10.3390/dj8010007. PMID: 31936576.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Πρόλογος	14
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>16</b>
1. Γενικά περί οστίτη ιστού	17
2. Τύποι οστίτη ιστού	19
3. Οργανική μήτρα του οστού	22
4. Ανόργανα συστατικά των οστών	23
5. Κυτταρικά στοιχεία των οστών	25
Α. Οστεοβλάστη	25
Β. Οστεοκλάστη	26
Γ. Οστεοκύτταρο	28
Δ. Επενδυματικά κύτταρα των οστών	31
Ε. Οστεοπρογονικά κύτταρα	31
6. Τύποι οστεοποίησης	33
Α. Ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση	33
Β. Ενδοχόνδρια οστεοποίηση	33
7. Οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση	36
8. Φυσιολογία επούλωσης καταγμάτων	39
Α. Οξεία φλεγμονώδης αντίδραση	39
Β. Συγκέντρωση μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων	40
Γ. Δημιουργία τύλου	41
Δ. Νεοαγγειογένεση και επαναγγείωση	41
Ε. Αντικατάσταση του χόνδρινου με οστικό τύλο	42

	<b>Στ.Οστική αναδιαμόρφωση</b>	<b>43</b>
<b>9.</b>	<b>Οστικά μοσχεύματα – Σύντομη ιστορική ανασκόπηση</b>	<b>46</b>
<b>10.</b>	<b>Οστικά μοσχεύματα</b>	<b>49</b>
<b>11.</b>	<b>Είδη οστικών μοσχευμάτων</b>	<b>52</b>
	<b>A. Αυτομοσχεύματα</b>	<b>52</b>
	<b>B. Αλλομοσχεύματα</b>	<b>53</b>
	<b>Γ. Ξενομοσχεύματα</b>	<b>55</b>
	<b>Γ1. Μοσχεύματα βόειας προέλευσης</b>	<b>56</b>
	<b>Γ2. Μοσχεύματα ίππειας προέλευσης</b>	<b>57</b>
	<b>Γ3. Μοσχεύματα χοίρειας προέλευσης</b>	<b>57</b>
	<b>Γ4. Μοσχεύματα άλγης</b>	<b>58</b>
	<b>Γ5. Μοσχεύματα κοραλλιογενούς προέλευσης</b>	<b>58</b>
	<b>Δ. Αλλοπλαστικά υλικά</b>	<b>58</b>
	<b>Δ1. Φωσφορικό ασβέστιο</b>	<b>59</b>
	<b>Δ2. Θεϊϊκό ασβέστιο</b>	<b>60</b>
	<b>Δ3. Πολυμερή υποκατάστατα</b>	<b>61</b>
	<b>Δ4. Βιοενεργός ύαλος</b>	<b>61</b>
<b>12.</b>	<b>Αυξητικοί παράγοντες</b>	<b>63</b>
	<b>A. Μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs)</b>	<b>64</b>
	<b>B. Αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs)</b>	<b>65</b>
	<b>Γ. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)</b>	<b>65</b>
	<b>Δ. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP)</b>	<b>66</b>
	<b>Ε. Ινική πλούσια σε αιμοπετάλια (PRF)</b>	<b>67</b>
<b>13.</b>	<b>Παράγοντες που επηρεάζουν την οστική ανάπτυξη με τη χρήση μοσχευματικών υλικών</b>	<b>69</b>
<b>14.</b>	<b>Οστικά ελείμματα κρίσιμου μεγέθους</b>	<b>78</b>
<b>15.</b>	<b>Ζωικά πρότυπα πειραματικής έρευνας – Χοίρος</b>	<b>80</b>
<b>16.</b>	<b>Τεχνικές αξιολόγησης των αποτελεσμάτων σε μελέτες με οστικά</b>	<b>85</b>

	<b>μοσχεύματα</b>	
<b>17.</b>	<b>Επίλογος γενικού μέρους</b>	<b>89</b>
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>		<b>90</b>
<b>1.</b>	<b>Σκοπός μελέτης</b>	<b>91</b>
<b>2.</b>	<b>Υλικό – Μέθοδοι</b>	<b>92</b>
	<b>A. Πειραματόζωα</b>	<b>92</b>
	<b>B. Δημιουργία οστικών ελλειμμάτων</b>	<b>92</b>
	<b>Γ. Τοποθέτηση οστικών μοσχευμάτων</b>	<b>97</b>
	<b>Δ. Ευθανασία πειραματόζωων</b>	<b>101</b>
	<b>Ε. Ιστολογική αξιολόγηση</b>	<b>103</b>
	<b>ΣΤ. Ιστομορφομετρική αξιολόγηση</b>	<b>103</b>
	<b>Z. Στατιστική ανάλυση</b>	<b>106</b>
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>107</b>
	<b>A. Μακροσκοπικές παρατηρήσεις - ευρήματα</b>	<b>107</b>
	<b>B. Ιστολογική αξιολόγηση</b>	<b>110</b>
	<b>B1. 8 εβδομάδες</b>	<b>110</b>
	<b>B2. 12 εβδομάδες</b>	<b>111</b>
	<b>Γ. Ιστομορφομετρική αξιολόγηση</b>	<b>116</b>
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>119</b>
<b>5.</b>	<b>Συμπεράσματα</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>Παράρτημα</b>	<b>130</b>
<b>7.</b>	<b>Περίληψη</b>	<b>138</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>140</b>
<b>9.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>142</b>



## Πρόλογος

Τα οστικά ελλείμματα που αναπτύσσονται στα πλαίσια τροχαίων και εργατικών ατυχημάτων, βιαιοπραγιών, αποπειρών αυτοκτονίας όσο και ογκολογικών χειρουργικών επεμβάσεων εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση.

Η αντιμετώπιση των οστικών ελλειμμάτων αποτελεί αντικείμενο πολυετών και εντατικών ερευνών, με τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές να χρονολογούνται από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα. Με την πρόοδο της Ιατρικής επιστήμης, η χειρουργική αποκατάσταση των ελλειμμάτων αυτών θεωρείται στις ημέρες μας επιτακτική, για λόγους λειτουργικότητας, αισθητικής και ψυχολογίας των ασθενών.

Μετά την ανάπτυξη ελλείμματος, ο οστίτης ιστός διαθέτει αναγεννητική εφεδρεία η οποία ωστόσο δεν είναι απεριόριστη, αλλά εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως το μέγεθος του ελλείμματος, η ηλικία και το είδος του οργανισμού όσο και ο τύπος του οστού. Βάσει των δεδομένων αυτών είναι πιθανό να μην είναι εφικτή η αυθόρμητη, πλήρης ανάπλαση του οστίτη ιστού και το κενό, στην περίπτωση αυτή, υποκαθίσταται με ινώδη συνδετικό ιστό.

Στο πλαίσιο αυτό είναι καθοριστική η συμβολή των μοσχευματικών υλικών σε διάφορες κατηγορίες. Τα αυτομοσχεύματα θεωρούνται το gold standard καθότι διαθέτουν οστεογενετικές ιδιότητες και απουσία ανάπτυξης ανοσολογικών αντιδράσεων ή μολυσματικών ασθενειών, ωστόσο διατίθενται σε περιορισμένη ποσότητα και εμφανίζουν αυξημένη νοσηρότητα λόγω πρόσθετης επέμβασης στην δότρια θέση. Στο σημείο αυτό βρίσκουν εφαρμογή διάφορα μοσχευματικά υλικά – αλλομοσχεύματα, ξενομοσχεύματα, αλλοπλαστικά υλικά και αυξητικοί παράγοντες – με ποικίλες ιδιότητες και χαρακτηριστικά, που έχουν βαθμιαία αναπτυχθεί σε μια προσπάθεια να υποστηριχθεί η επουλωτική διαδικασία χωρίς τα μειονεκτήματα που διαθέτουν

τα αυτομοσχεύματα. Μάλιστα τελευταία, μεταξύ άλλων, γίνεται προσπάθεια επικέντρωσης της επιστημονικής έρευνας στο πεδίο των συνθετικών – αλλοπλαστικών – υλικών καθότι διατίθενται σε σχετική αφθονία, με προσιτό κόστος, δίχως κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών όσο και στην δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά μοσχεύματα και αυξητικοί παράγοντες, προσθέτοντας νέες προσδοκίες στο επιστημονικό αυτό πεδίο.

Ειδικότερα, στον τομέα της Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής τα προαναφερθέντα υλικά εμφανίζουν ευρεία εφαρμογή ωστόσο μερικές φορές τα αποτελέσματα των ερευνών παρουσιάζονται αντιφατικά και προκύπτουν αναπάντητα ερωτήματα, με αποτέλεσμα η δημοσίευση περαιτέρω ερευνών να θεωρείται ιδιαίτερα ωφέλιμη.

Σε αυτό το πλαίσιο βρίσκεται έδαφος η διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης. Πιο ειδικά:

Στο γενικό μέρος γίνεται αναφορά σε βασικές έννοιες όπως η δομή και σύνθεση των οστών, η φυσιολογία της επούλωσης καταγμάτων, τα οστικά μοσχεύματα και οι ιδιότητες τους, ενώ τίγονται ζητήματα όπως τα οστικά ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους, τα ζωικά πρότυπα μελέτης όσο και οι διαθέσιμες τεχνικές αξιολόγησης των αποτελεσμάτων σε πειράματα με οστικά μοσχεύματα.

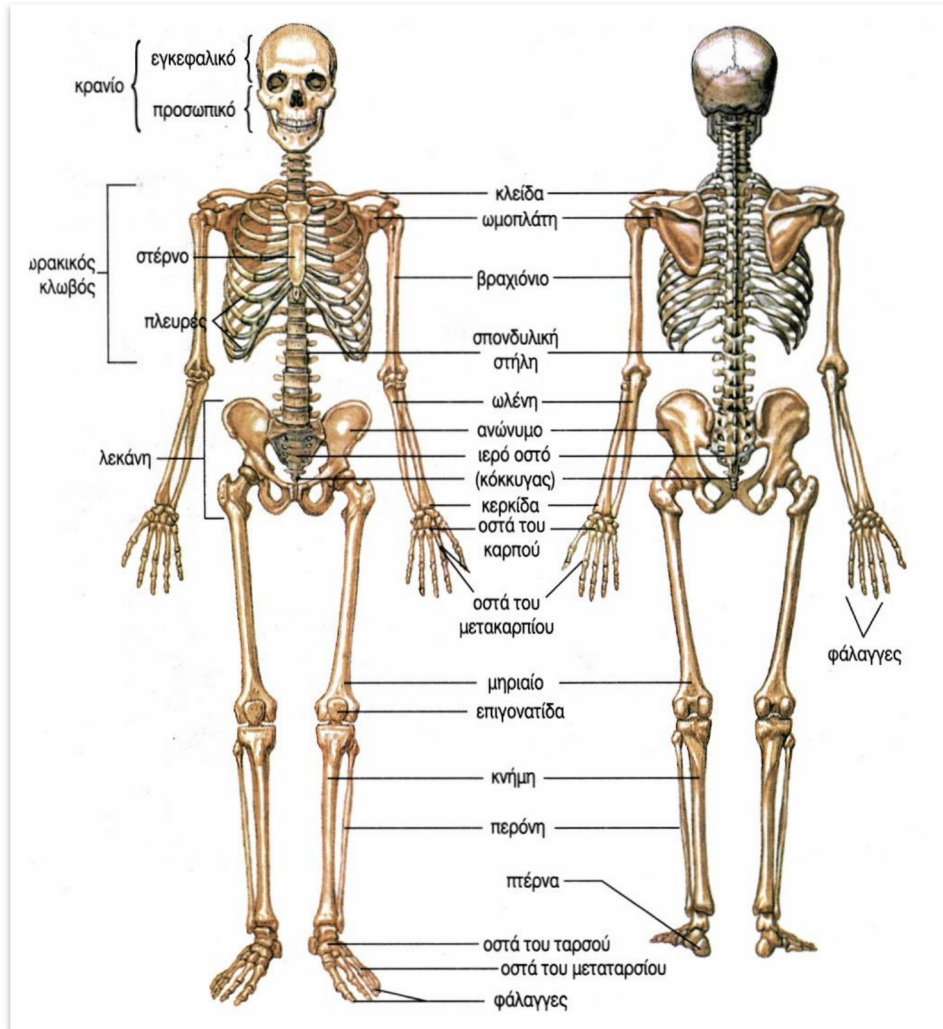
Στο ειδικό μέρος παρουσιάζονται με κάθε λεπτομέρεια το υλικό και η μεθοδολογία της δεδομένης εργασίας, τα ιστολογικά και ιστομορφομετρικά αποτελέσματα, γίνεται σχολιασμός των ευρημάτων σε σχέση με τα αντίστοιχα της διεθνούς βιβλιογραφίας και παρατίθενται συμπεράσματα που απορρέουν από την συγκεκριμένη έρευνα.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. Γενικά περί οστίτη ιστού

Ο σκελετός του ενήλικα ανθρώπου διαθέτει συνολικά 213 οστά, εξαιρουμένων των σησαμοειδών, τα οποία απαρτίζουν τμήματα του κρανίου, του κορμού και των άκρων (**Εικόνα 1**).



**Εικόνα 1:** Ο ανθρώπινος σκελετός – πρόσθια και οπίσθια άποψη ([www.digitalschool.minedu.gov.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-A105/321/2155,7810/](http://www.digitalschool.minedu.gov.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-A105/321/2155,7810/)).

Με μορφολογικά κριτήρια διακρίνουμε 3 γενικές κατηγορίες οστών: τα **μακρά** οστά; έχουν μήκος μεγαλύτερο από το πλάτος τους, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το μηριαίο, την κνήμη και το βραχιόνιο οστό, τα **βραχεία** οστά; εμφανίζουν μικρές διαφορές μεταξύ μήκους και πλάτους όπως είναι τα οστά του καρπού, του ταρσού και οι σπόνδυλοι, τέλος, τα **πλατιά** οστά; αποτελούνται από 2 κατά κανόνα παράλληλες πλάκες συμπαγούς οστέινης ουσίας μεταξύ των οποίων υπάρχει σπογγώδης ουσία, συμπεριλαμβανομένων των οστών του κρανίου, της ωμοπλάτης, του στέρνου και των πλευρών.

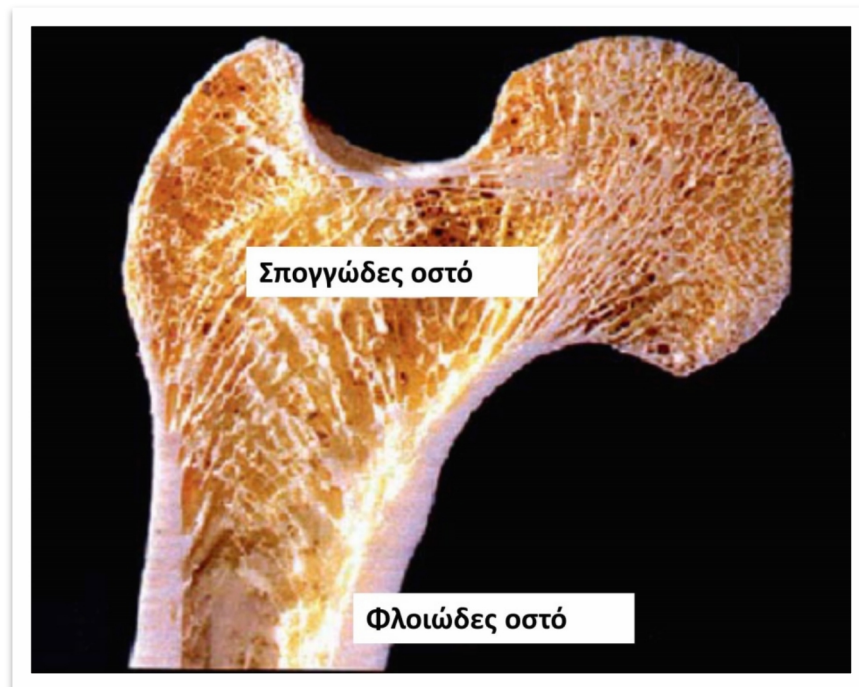
Ο οστίτης ιστός χαρακτηρίζεται ως ξεχωριστή μορφή συνδετικού ιστού αποτελούμενη από 3 στοιχεία: εξειδικευμένα κύτταρα, οργανικά και ανόργανα συστατικά. Η οργανική ουσία που αρχικά συντίθεται στα νεόπλαστα οστά, εκτιμάται στον ενήλικα άνθρωπο 30 % κατά βάρος ενώ τα ανόργανα άλατα συνιστούν 70 % του συνόλου της ώριμης σκελετικής μάζας [1].

Οι δομές αυτές υφίστανται συνεχώς διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση, βιολογικές διεργασίες που συμβάλλουν στην τελική μορφοποίησή και προσαρμογή των οστών στις διαρκώς μεταβαλλόμενες εμβιομηχανικές δυνάμεις όσο και στην απομάκρυνση παλαιών οστικών θραυσμάτων και την αντικατάστασή τους με νέο, μηχανικά ανθεκτικό οστίτη ιστό για τη διατήρηση της αντοχής τους.

Ο σκελετός εξυπηρετεί ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών, που μπορεί να συνοψισθούν στα κάτωθι: 1. Δομική υποστήριξη του σώματος, 2. Κινητικότητα για τη μετακίνηση μελών ή ολόκληρου του σώματος, 3. Προστασία ζωτικών εσωτερικών οργάνων και δομών, 4. Διατήρηση της ομοιόστασης των ιχνοστοιχείων όσο και της οξεοβασικής ισορροπίας, 5. Δεξαμενή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών και, 6. Αιμοποίηση εντός των μυελικών χώρων του σπογγώδους οστού [2].

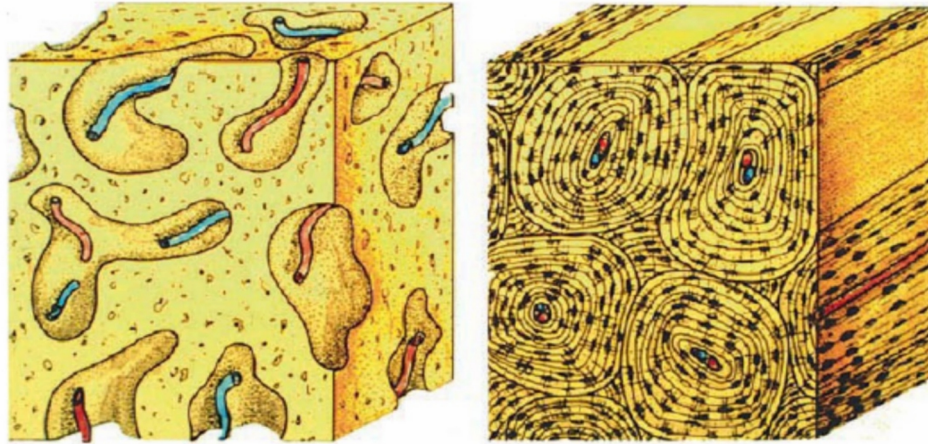
## 2. Τύποι οστίτη ιστού

Διακρίνουμε μακροσκοπικά 2 τύπους οστίτη ιστού το **φλοιώδες** και το **σπογγώδες** οστό. Το φλοιώδες οστό είναι πυκνό, συμπαγές και περιβάλλει τον μυελό των οστών, ενώ το σπογγώδες οστό αποτελείται από ένα κυψελοειδές δίκτυο δοκίδων που διαπλέκονται εντός των μυελικών χώρων (**Εικόνα 2**). Η αναλογία φλοιώδους : σπογγώδους οστού στον ενήλικα άνθρωπο είναι 80 : 20 % αντίστοιχα, ωστόσο παρατηρούνται διακυμάνσεις τόσο μεταξύ διαφορετικών οστών όσο και μεμονωμένων περιοχών εντός του ίδιου οστού [3].



**Εικόνα 2:** Διατομή οστού όπου παρατηρείται εξωτερικά φλοιώδης και εσωτερικά σπογγώδης οστική ουσία (τροποποιημένο από [4]).

Σε ιστολογικό επίπεδο τόσο το φλοιώδες όσο και το σπογγώδες οστό σχηματίζονται φυσιολογικά με εναποθέσεις στρωμάτων από ινίδια κολλαγόνου σε πυκνή και παράλληλη διάταξη, που ονομάζονται οστεΐνα πετάλια, αποτελώντας το **ώριμο ή δοκιδώδες** οστό. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι οστεοβλάστες εναποθέτουν ινίδια κολλαγόνου σε στρώματα δεν είναι γνωστός, αλλά ο ώριμος οστίτης ιστός εμφανίζει εξαιρετική αντοχή ως αποτέλεσμα των εναλλασσόμενων προσανατολισμών των ινών κολλαγόνου. Ο δεύτερος ιστολογικός τύπος οστίτη ιστού που ονομάζεται **ανώριμο ή δικτυωτό** οστό περιέχει μικρότερο ποσοστό μεταλλικών ανόργανων στοιχείων, ενώ τα ινίδια κολλαγόνου είναι διευθετημένα τυχαία, με ακανόνιστο τρόπο. Αυτοί είναι οι λόγοι για τους οποίους το δικτυωτό οστό είναι ασθενέστερο από το δοκιδώδες, παραγόμενο προσωρινά κατά τη διάρκεια του αρχικού σχηματισμού των οστών όσο και σε καταστάσεις υψηλού οστικού μεταβολισμού όπως π.χ. ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η νόσος Paget των οστών και η επούλωση οστικών ελλειμμάτων – καταγμάτων (**Εικόνα 3**)[5].



**Δικτυωτό οστό**

**Δοκιδώδες οστό**

**Εικόνα 3:** Δοκιδώδες και δικτυωτό οστό με εμφανείς δομικές διαφορές σε ιστολογικό επίπεδο (τροποποιημένο από [4]).

### 3. Οργανική μήτρα του οστού

Η οργανική ουσία των οστών που συνιστά 30 - 40 % των ακύτταρων συστατικών αποτελείται από 85 - 90% από ίνες κολλαγόνου, κυρίως τύπου I, με ίχνη των κολλαγόνων τύπου III και V που προσδίδουν αντοχή στον εφελκυσμό, στην διάτμηση, ελαστικότητα και ευελιξία. Υπάρχουν τουλάχιστον 28 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου στα σπονδυλωτά, αποτελώντας μια ετερογενή οικογένεια δομικών πρωτεϊνών σε αφθονία στον οργανισμό. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των κολλαγόνων είναι μια τριπλή ελικοειδής δομή αποτελούμενη από τρία πολυπεπίδια α-αλύσου. [6].

Μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες συνθέτουν το 10 - 15% της οργανικής μήτρας, απαρτίζοντας τη θεμέλια ουσία που αποτελείται κυρίως από πρωτεογλυκάνες όπως υαλουρονικό οξύ και θειϊκή χονδροϊτίνη καθώς και λοιπές πρωτεΐνες όπως οστεοκαλσίνη, οστεοποντίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη [7].

Ο ρόλος καθεμιάς από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν είναι πολύ καλά καθορισμένος προς το παρόν, και πολλές φαίνεται να εξυπηρετούν πολλαπλές - λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταλλοποίησης όσο και της ρύθμισης του κύκλου εργασιών - δραστηριότητας των οστικών κυττάρων [8].

#### 4. Ανόργανα συστατικά των οστών

Τα οστά αποτελούνται σε ποσοστό 50 έως 70% από μεταλλικά ανόργανα στοιχεία με κυριότερο τον υδροξυαπατίτη με χημική δομή  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , με μικρές ποσότητες μαγνησίου, νατρίου, ανθρακικού και φωσφορικού οξέος.

Η ακριβής σύνθεση και περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία ενδέχεται να τροποποιηθεί λόγω διατροφής και ορμονικής σηματοδότησης, με την αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο να ποικίλει μεταξύ 1.3 μέχρι 2.0 [9].

Η ωρίμανση της μήτρας συνδέεται με την έκφραση μορίων όπως της αλκαλικής φωσφατάσης, της βιταμίνης D, της παραθορμόνης και αρκετών μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της οστεοκαλσίνης, οστεοποντίνης και σιαλοπρωτεΐνης των οστών τα οποία συμβάλλουν στην ρύθμιση της εναπόθεσης μεταλλικών στοιχείων δεσμεύοντας ασβέστιο και φώσφορο.

Τα ανόργανα στοιχεία προσδίδουν ακαμψία και αντοχή στις μηχανικές φορτίσεις στο οστό (Εικόνα 4)[10].

## Οστίτης ιστός: Οργανικά και ανόργανα συστατικά



Απουσία  
ανόργανων αλάτων



Ευκαμπτότητα

Απουσία  
κολλαγόνου



Ευελιξία

**Εικόνα 4:** Τα οργανικά και ανόργανα στοιχεία του οστού προσδίδουν το καθένα ξεχωριστές ιδιότητες (τροποποιημένο από [www.slideshare.net/somallul/comonent-of-bone](http://www.slideshare.net/somallul/comonent-of-bone)).



## **5. Κυτταρικά στοιχεία των οστών**

### **A. Οστεοβλάστη**

Οι οστεοβλάστες αποτελούν κυβοειδή κύτταρα που βρίσκονται κατά μήκος της οστικής παρυφής, συνιστούν το 4-6 % του συνόλου των κυττάρων του οστίτη ιστού και πρωτοστατούν στη σύνθεση οστού.

Προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης τα οποία μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων όπως Runx2, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών και κοννεκτίνη 43 τροποποιούνται κατάλληλα για να μετατραπούν οριστικά σε διαφοροποιημένους οστεοβλάστες [11]. Εμφανίζουν οργανύλλια χαρακτηριστικά κυττάρων που συνθέτουν πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του άφθονου αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, της προέχουσας συσκευής Golgi καθώς και διαφόρων εκκριτικών κυστιδίων. Ποικίλες πρωτεΐνες και μονοπάτια σηματοδότησης με κύρια τις μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) και την μοριακή οδό wingless (Wnt) είναι σημαντικά στη ρύθμιση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και λειτουργίας [12], [13]. Η οδός Wnt επηρεάζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μέσω της ενεργοποίησης της β-κατενίνης και σχετίζεται επίσης με μηχανισμούς που εμπλέκονται στις αναβολικές επιδράσεις της παραθορμόνης στο σχηματισμό των οστών. Η Wnt σηματοδότηση διεγείρει επίσης την έκφραση OPG και RANKL σε διαφοροποιημένους οστεοβλάστες, καταστέλλοντας τον σχηματισμό οστεοκλαστών [14]. Η μείωση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και η επακόλουθη οστεοπόρωση σχετίζονται με ένα μετασχηματισμό που ευνοεί τη διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα έναντι οστεοβλαστών [15]. Τέλος, η λειτουργία των οστεοβλαστών ρυθμίζεται μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος καθότι τα κύτταρα αυτά διαθέτουν β-αδρενεργικούς υποδοχείς στις επιφάνειές τους οι οποίοι όταν διεγείρονται

αναστέλλουν τον σχηματισμό οστού και αυξάνουν την οστική απορρόφηση, μειώνοντας έτσι την οστική μάζα [16].

Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν κυρίως κολλαγόνο τύπου I και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας όπως πρωτεογλυκάνες – ντεκορίνη, διγλυκάνη – οι οποίες σχηματίζουν την οργανική μήτρα κατά μήκος της επιφάνειας των οστών. Μετέχουν επίσης στην προσθήκη ανόργανων στοιχείων στο νεόπλαστο οστό που καλείται οστεοειδές μέσω απελευθέρωσης φωσφορικών ενώσεων από εκκρινόμενα κυστίδια. Το τελικό αποτέλεσμα της μεταλλοποίησης είναι ο σχηματισμός κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Η σωστή αναλογία οργανικής μήτρας – μεταλλικών στοιχείων είναι ιδιαίτερα σημαντική για να εξασφαλιστεί η σωστή ισορροπία μεταξύ ακαμψίας και ευελιξίας του σκελετού. [17].

Οι πληθυσμοί των οστεοβλαστών είναι ετερογενείς, εκφράζοντας διαφορετικά γονίδια, γεγονός που εξηγεί την ποικιλότητα της δοκιδωτής μικροαρχιτεκτονικής σε διαφορετικές σκελετικές θέσεις, όσο και διακυμάνσεις στην ικανότητά τους να ανταποκρίνονται σε παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών με εκδηλώσεις από τα οστά [18].

Οι ώριμοι ενεργοί οστεοβλάστες έχουν τη δυνατότητα μέσω απόπτωσης να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο είτε να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα.

## **B. Οστεοκλάστη**

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα κύτταρα προερχόμενα από πρόδρομα κύτταρα τύπου μονοκύτταρου-μακροφάγου του μυελού των οστών, ικανά να απορροφούν ανόργανα συστατικά και οστεοειδές [19]. Η κυτταρική τους μεμβράνη αποτελείται από πολυάριθμες αναδιπλώσεις οι

οποιές αλληλεπιδρούν με την οστική επιφάνεια. Οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες διαθέτουν συνήθως 2-5 πυρήνες, άφθονο κυτταρόπλασμα με πολυάριθμα συστήματα Golgi και μιτοχόνδρια. Εντός 3-4 εβδομάδων από την έναρξη της δράσης τους οι πυρήνες τους μειώνονται σε αριθμό και καθίστανται ανενεργοί.

Μόρια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των οστεοκλαστών περιλαμβάνουν τον παράγοντα M-CSF όσο και το μόριο RANKL που παράγεται από οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και επενδυματικά κύτταρα. Η πρόσδεσή του με τον υποδοχέα σε προγονικά οστεοκλαστικά κύτταρα επάγει το σχηματισμό τους. Η ένωση του μορίου OPG που παράγεται από οστεοβλάστες, επενδυματικά κύτταρα και ινοβλάστες του περιοδοντίου με το RANKL, εμποδίζει την αλληλεπίδραση RANK/RANKL, αναστέλλοντας την παραγωγή οστεοκλαστών. Είναι συνεπώς εμφανές ότι το μοριακό σύμπλεγμα RANKL/RANK/OPG είναι κλειδί για την παραγωγή οστεοκλαστών [20].

Οι οστεοκλάστες συνδέονται με την οστική μήτρα μέσω υποδοχέων ιντεγκρίνης για να επακολουθήσει μέσω αλληλουχίας διεργασιών η απορρόφηση του οστού. Προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι οστεοκλάστες και να αρχίσει η απορρόφηση, μη πολωμένοι ώριμοι οστεοκλάστες δεσμεύονται με τη μήτρα του οστού. Η πρόσδεση με τον οστίτη ιστό προξενεί πόλωση των οστεοκλαστών και κατόπιν αναπτύσσονται ποδοσώματα καθώς και διακριτές αναδιπλώσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης. Η απορρόφηση οστού εξαρτάται από την έκκριση ιόντων υδρογόνου και το ένζυμο καθεψίνη K από οστεοκλάστες. Τα ιόντα μέσω μείωσης του pH συμβάλλουν στη διάλυση των ανόργανων συστατικών, ενώ η καθεψίνη K χωνεύει την πρωτεϊνική μήτρα, η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I [21].

Αύξηση του σχηματισμού και ενεργότητας των οστεοκλαστών παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η οστεοπόρωση κατά την οποία η απορρόφηση υπερκεράζει τον σχηματισμό οστού, με αποτέλεσμα μείωση της οστικής πυκνότητας και αύξηση των οστικών καταγμάτων. Επίσης, στην περίπτωση των οστικών μεταστάσεων και στις φλεγμονώδεις αρθρίτιδες παρατηρούνται περιαρθρικές και ενδοστικές οστεολυτικές βλάβες [22]. Στην περιοδοντίτιδα η απελευθέρωση κυτοκινών όπως IL-6 και RANKL από φλεγμονώδη κύτταρα επάγει την συσσώρευση οστεοκλαστών με αποτέλεσμα βαθμιαία λύση του φατνιακού οστού [23]. Από την άλλη πλευρά γενετικές μεταλλάξεις σχετιζόμενες με το σχηματισμό και την λειτουργικότητα των οστεοκλαστών όπως στην περίπτωση της οστεοπέτρωσης μειώνουν το ρυθμό απορρόφησης οδηγώντας σε άθροιση οστικής μάζας, καταδεικνύοντας τη σημασία της αναδιαμόρφωσης για την ομοίωση του οστίτη ιστού [24].

### **Γ. Οστεοκύτταρο**

Τα οστεοκύτταρα, τα οποία αποτελούν το 90-95% του συνόλου των κυττάρων του οστίτη ιστού, είναι τα πλέον άφθονα και μακρόβια κύτταρα, με διάρκεια ζωής έως και 25 χρόνια. Αντιπροσωπεύουν τερματικά διαφοροποιημένους οστεοβλάστες και λειτουργούν μέσα σε συγκυτιακά δίκτυα για την υποστήριξη της οστικής δομής και του μεταβολισμού. Επί δεκαετίες, λόγω των δυσκολιών στην απομόνωση των οστεοκυττάρων, επικράτησε η εσφαλμένη αντίληψη ότι αυτά τα κύτταρα ήταν παθητικά, ωστόσο η ανάπτυξη νέων μεθόδων παρατήρησης οδήγησε στην κατανόηση του βιολογικού τους ρόλου, ο οποίος επικεντρώνεται σε λειτουργίες που αφορούν στην ομοίωση του οστού [25].

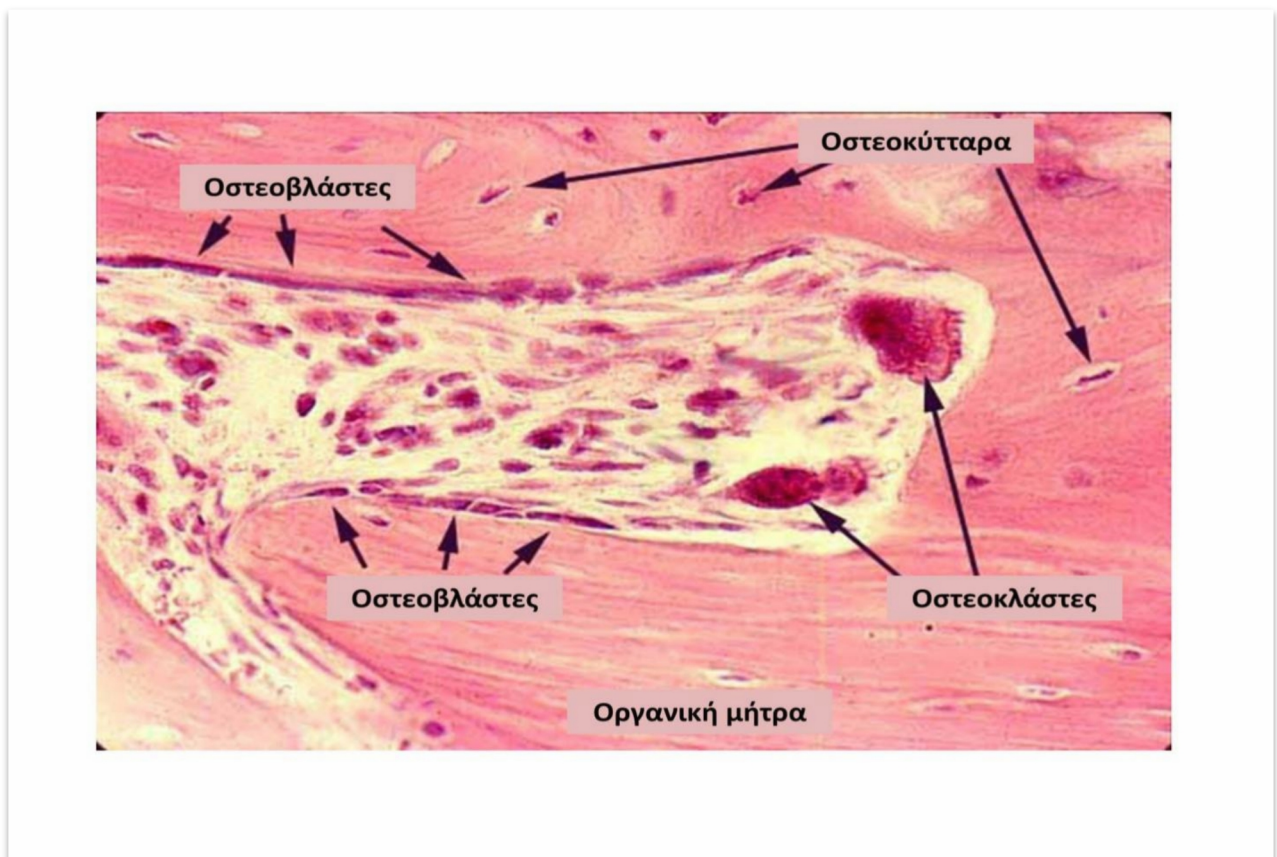
Τα οστεοκύτταρα εντοπίζονται μέσα σε οστικές κρύπτες, περιβαλλόμενα από μεταλλοποιημένη οστική μήτρα και εμφανίζουν δενδριτικές αποφυάδες. Η μορφολογία των ενσωματωμένων οστεοκυττάρων διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του οστού. Για παράδειγμα, τα οστεοκύτταρα στο σπογγώδες οστό είναι πιο αποστρογγυλεμένα από εκείνα που εντοπίζονται στο φλοιώδες οστό, τα οποία είναι εμφανώς πιο επιμήκη.

Ενώ το σώμα των οστεοκυττάρων βρίσκεται μέσα στις οστικές κοιλότητες, οι κυτταροπλασμικές αποφυάδες (μέχρι 50 ανά κύτταρο) εισέρχονται σε μικροσκοπικές σήραγγες, τα οστικά σωληνάκια. Αυτές οι κυτταροπλασμικές αποφυάδες συνδέονται με αντίστοιχες γειτονικών οστεοκυττάρων καθώς και με κυτταροπλασμικές αποφυάδες οστεοβλαστών και επενδυματικών κυττάρων στην επιφάνεια του οστού, διευκολύνοντας τη διακυτταρική μεταφορά σηματοδοτικών μορίων όπως προσταγλανδινών και νιτρικού οξειδίου μεταξύ τους. Επιπλέον, το δίκτυο κοιλοτήτων και σωληναρίων βρίσκεται σε στενή εγγύτητα με τα αγγεία που αρδεύουν το οστό, προμηθεύοντας άμεσα τα οστεοκύτταρα με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά [26].

Η διακυτταρική επικοινωνία επιτυγχάνεται με το διάμεσο υγρό που ρέει μεταξύ των οστεοκυττάρων και των σωληναρίων. Με τον μηχανισμό αυτό τα οστεοκύτταρα δρουν ως μηχανο-αισθητικοί υποδοχείς καθώς το διασυνδεδεμένο δίκτυο τους έχει την ικανότητα να ανιχνεύει μηχανικές πιέσεις και φορτία, μετατρέποντας μηχανικά ερεθίσματα σε βιοχημικά σήματα, διεργασία που ονομάζεται πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οστεοκύτταρα μετατρέπουν τα μηχανικά ερεθίσματα σε βιοχημικά σήματα δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στην προσαρμογή του οστού στις καθημερινές μηχανικές φορτίσεις, καθιστώντας τα ενόργανα της οστικής αναδιαμόρφωσης, μέσω της ρύθμισης των δραστηριοτήτων των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών [27]. Επιπλέον, η

απόπτωση των οστεοκυττάρων έχει αναγνωριστεί ως χημειοτακτικό σήμα για την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών [28].

Τα οστεοκύτταρα, όπως προαναφέραμε, μπορεί να ζουν για δεκαετίες στα οστά ενώ η παρουσία κενών οστικών κρυπών κατά την γήρανση υποδηλώνει αποπτωτικούς μηχανισμούς. Η απόπτωση των οστεοκυττάρων σε περιπτώσεις έλλειψης οιστρογόνων ή θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή είναι επιβλαβής για τη δομή του οστού. Θεραπεία με οιστρογόνα και διφωσφονικά όσο και η φυσιολογική φόρτιση του οστού μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη απόπτωσης των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων (**Εικόνα 5**) [29].



**Εικόνα 5:** Τμήμα οστίτη ιστού όπου διακρίνονται τα βασικότερα κυτταρικά στοιχεία της δομής του ([www.siumed.edu/~dking2/ssb/remodel.htm](http://www.siumed.edu/~dking2/ssb/remodel.htm)).

#### **Δ. Επενδυματικά κύτταρα των οστών**

Τα επενδυματικά οστικά κύτταρα είναι ανενεργοί οστεοβλάστες επίπεδου σχήματος, που καλύπτουν τις οστικές επιφάνειες, χωρίς ικανότητα παραγωγής οστού. Εμφανίζουν σχετικά μικρό πυρήνα ενώ στο κυτταρόπλασμα παρατηρείται μειωμένος αριθμός οργανιδίων όπως ενδοπλασμικό δίκτυο και συσκευή Golgi [30]. Μερικά εξ'αυτών παρουσιάζουν αποφυάδες που εκτείνονται εντός των σωληναρίων, χαρακτηριστικό στο οποίο αποδίδεται η επικοινωνία μεταξύ γειτονικών επενδυματικών κυττάρων όσο και μεταξύ αυτών και οστεοκυττάρων [31].

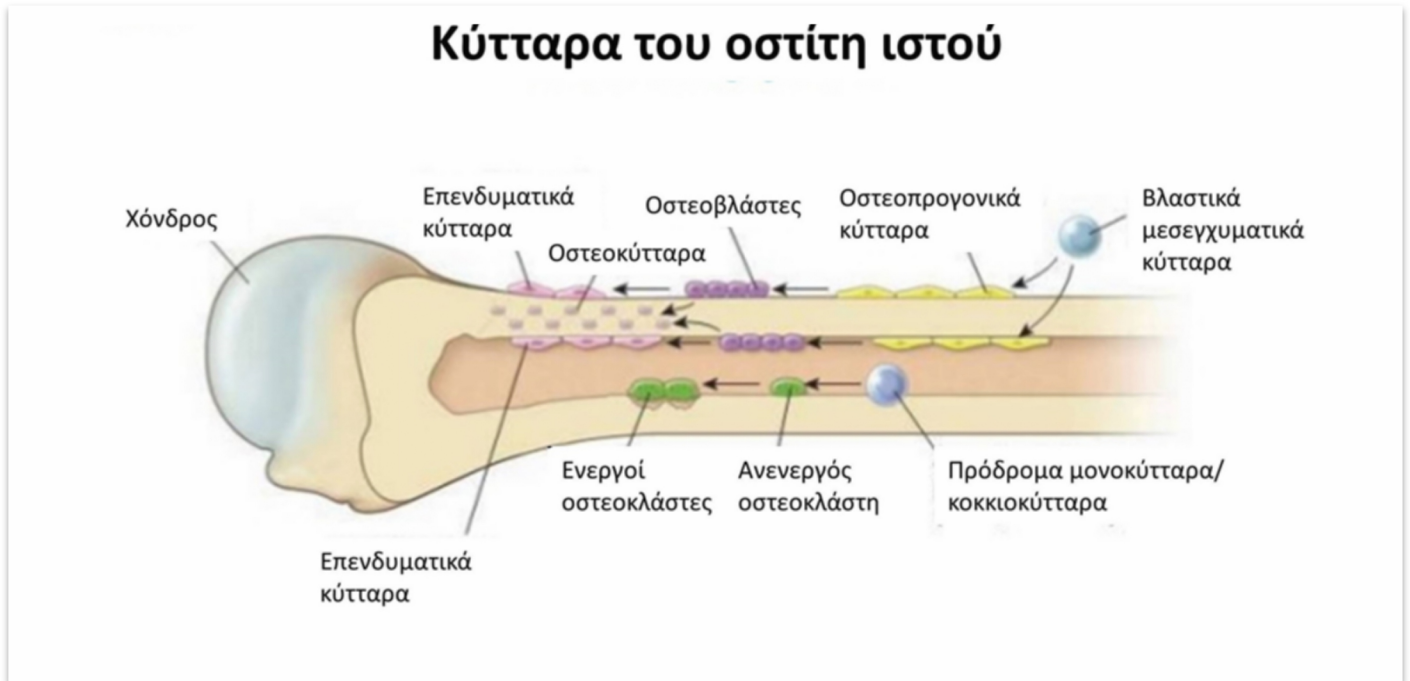
Η κατάσταση των επενδυματικών κυττάρων εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, οπότε ενδέχεται να επανακτήσουν την εκκριτική τους δράση, αποκτώντας κυβοειδές σχήμα. Οι λειτουργίες των κυττάρων αυτών δεν είναι πλήρως κατανοητές, αλλά έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ οστεοκλαστών και οργανικής μήτρας των οστών, σε περιόδους όπου ο οργανισμός ανασταλεί την οστική απορρόφηση και επίσης συμμετέχουν στη οστεοκλαστική διαφοροποίηση παράγοντας μόρια όπως OPG και RANKL [32].

#### **Ε. Οστεοπρογονικά κύτταρα**

Τα οστεοπρογονικά κύτταρα προέρχονται από βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα, σχηματίζοντας έναν πληθυσμό με ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα του οστίτη ιστού (οστεοβλάστη, οστεοκύτταρο).

Στο ώριμο οστό όπου έχουν ανασταλεί διεργασίες όπως ο σχηματισμός οστού ή η αναδιαμόρφωση, τα οστεοπρογονικά κύτταρα εντοπίζονται ως πεπλατυσμένα ατρακτοειδή κύτταρα στην οστική επιφάνεια, ωστόσο, σε ενεργά αναπτυσσόμενα οστά, όπως για παράδειγμα

στα εμβρυϊκά οστά ή σε περίοδο υψηλής μεταβολικής οστικής δραστηριότητας σε οστά ενηλίκων, αυτά τα κύτταρα είναι πολύ μεγαλύτερα και πολυάριθμα, περιέχουν ωοειδείς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 6) [33].



**Εικόνα 6:** Οι διάφοροι τύποι κυττάρων που στοιχειοθετούν τον οστίτη ιστό (τροποποιημένο από [www.slideshare.net/AddisuAlemu/histology-of-bone](http://www.slideshare.net/AddisuAlemu/histology-of-bone)).



## **6. Τύποι οστεοποίησης**

Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του σκελετού (οστεοποίηση) γίνεται με δύο διαφορετικές διεργασίες, την **ενδομεμβρανώδη** και την **ενδοχόνδρια** οστέωση.

### **A. Ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση**

Η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και εμπλέκεται στην διαμόρφωση των πλατέων οστών του κρανίου, οστών του προσώπου, την κάτω γνάθο και την κλείδα [33].

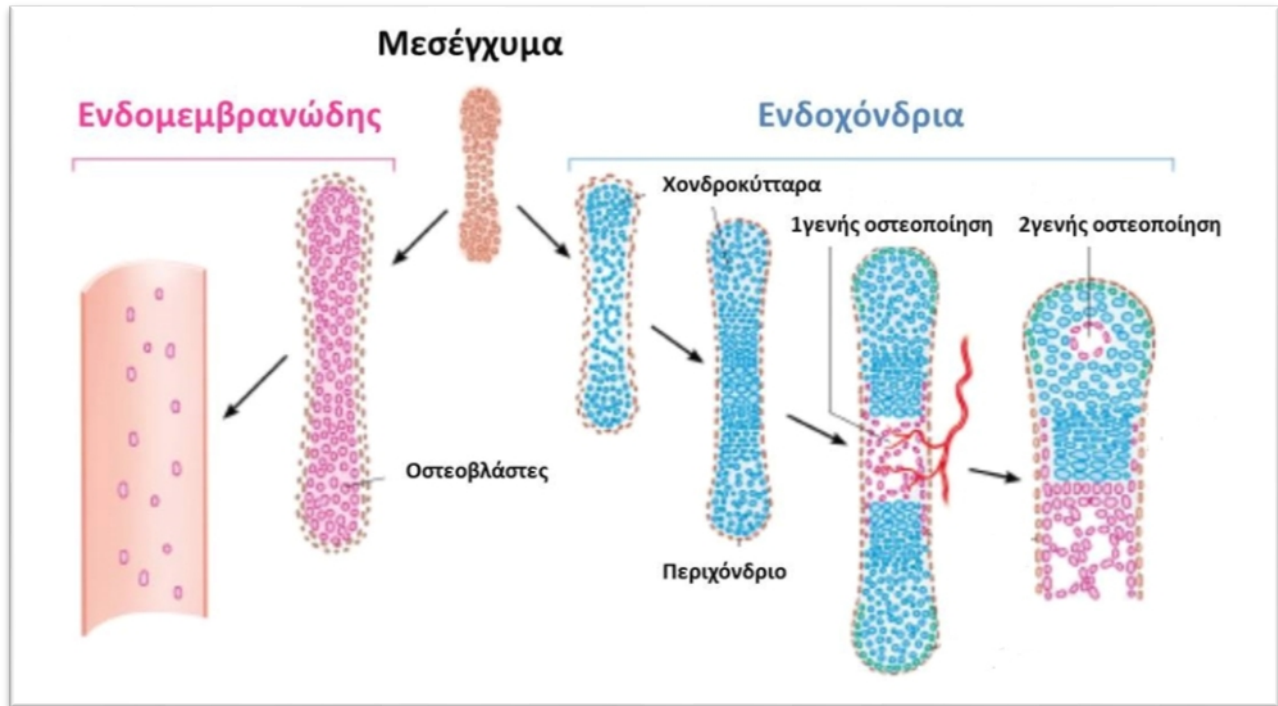
Χαρακτηρίζεται από εισβολή τριχοειδών αγγείων στο μεσέγχυμα, εντός του οποίου μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες. Οι τελευταίοι εναποθέτουν διαρκώς οργανική μήτρα οστού, οδηγώντας στο σχηματισμό δοκίδων. Καθώς οι δοκίδες αυξάνουν σε μέγεθος και αριθμό, διασυνδέονται και σχηματίζουν πρωτογενές ή δικτυωτό οστό, μια δομή χαμηλής οργάνωσης με υψηλό ποσοστό οστεοκυττάρων, η οποία τελικά αντικαθίσταται από πιο οργανωμένο, ανθεκτικότερο σε μηχανικές φορτίσεις, δευτερογενές ή δοκιδώδες οστό [34].

### **B. Ενδοχόνδρια οστεοποίηση**

Στην περίπτωση της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, κατά την εμβρυϊκή ζωή, μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από το μεσόδερμα, διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται ταχέως και εκκρίνουν μια εξωκυττάρια μήτρα για να σχηματίσουν ένα χόνδρινο μοντέλο του οστού. Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει τον υαλώδη χόνδρο που

μοιάζει με το σχήμα του μελλοντικού οστού καθώς και μια περιβάλλουσα μεμβράνη που ονομάζεται περιχόνδριο, το οποίο με σύνθετες διαδικασίες μετατρέπεται σε περίοστεο [35]. Οι οστεοβλάστες στη συνέχεια δημιουργούν μια παχιά περιοχή συμπαγούς οστού στην περιοχή της διαφύσεως, όπου διαμορφώνεται το πρωτογενές κέντρο οστεοποίησης. Ενώ το οστό αντικαθιστά τον χόνδρο στη διάφυση, ο χόνδρος συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται στα άκρα, αυξάνοντας το μήκος των οστών. Αυτές οι περιοχές ενεργού πολλαπλασιασμού ονομάζονται επιφυσιακές πλάκες, οι οποίες συντελούν στην ανάπτυξη των οστών μέχρι την πρόιμη ενηλικίωση. Μετά τη γέννηση, ολόκληρη αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται στην περιοχή της επίφυσης όπου σχηματίζεται το δευτερογενές κέντρο οστεοποίησης [36].

Η ενδοχόνδρια οστέωση λαμβάνει χώρα στα οστά που δέχονται φορτίσεις όπως στην περίπτωση των βραχέων και μακρών οστών (**Εικόνα 7**).



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση όπου διακρίνεται η ανάπτυξη οστίτη ιστού μέσω ενδομεμβρανώδους ή ενδοχόνδριας οστεοποίησης (τροποποιημένο από [37]).

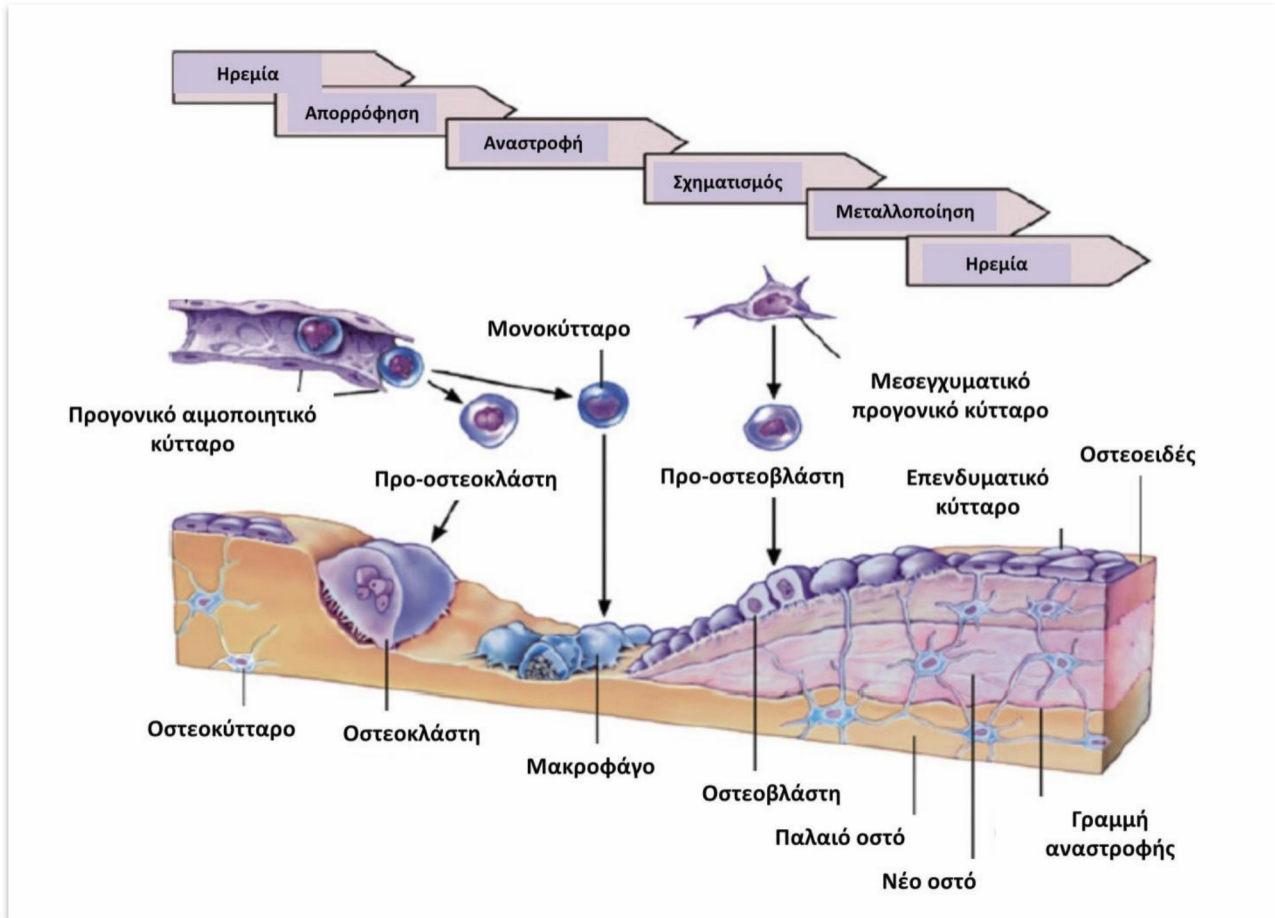
## 7. Οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση

Τα οστά υφίστανται ανάπτυξη – αύξηση του μεγέθους όσο και αλλαγή του σχήματός τους - κυρίως κατά τη διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας, γεγονότα που προσδιορίζουν την διαδικασία της **διαμόρφωσης**. Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας μπορεί να μεταβάλουν διαστάσεις ή να αλλάξουν τον αξονικό τους προσανατολισμό με αφαίρεση ή προσθήκη οστού σε κατάλληλες επιφάνειες, ενέργειες που οφείλονται στην ανεξάρτητη δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών ως απάντηση σε τοπικά / συστηματικά ερεθίσματα ή στις εμβιομηχανικές δυνάμεις [38].

Η **αναδιαμόρφωση** των οστών είναι η διεργασία με την οποία επιτυγχάνεται η ανανέωση του οστού για τη διατήρηση της αντοχής του όσο και η ομοίωση των μεταλλικών στοιχείων στον οργανισμό. Ο ρυθμός αναδιαμόρφωσης του σπογγώδους οστού είναι υψηλότερος από τον απαιτούμενο για τη διατήρηση ικανοποιητικής μηχανικής αντοχής, καταδεικνύοντας ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τις μεταβολικές ανάγκες σε μεταλλικά στοιχεία.

Η διαδικασία περιλαμβάνει συνεχή απομάκρυνση πεπαλαιωμένου οστού, αντικατάστασή του με προσφάτως συντεθειμένη πρωτεϊνική μήτρα και επακόλουθη μεταλλοποίησή της, αποσκοπώντας στην πρόληψη συσσώρευσης μικροθραύσεων [39]. Η αναδιαμόρφωση αρχίζει πριν από τη γέννηση και συνεχίζεται μέχρι το θάνατο, αποτελούμενη από τη μονάδα αναδιαμόρφωσης του οστού που περιλαμβάνει μια συζευγμένη ομάδα οστεοκλαστών και οστεοβλαστών. Τα κύτταρα αυτά διεξάγουν διαδοχικά απορρόφηση και σχηματισμό οστού σε 6 διακριτά στάδια, την φάση ηρεμίας, ενεργοποίησης, απορρόφησης, αναστροφής, σχηματισμού και ηρεμίας, τα οποία συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω [40].

Στην φάση ηρεμίας η επιφάνεια των οστών καλύπτεται από αποπλατυσμένα επενδυματικά κύτταρα τα οποία ενεργοποιούμενα απομακρύνονται από την οστική επιφάνεια και ταυτόχρονα εκκρίνονται μεταλλοπρωτεΐνες από οστεοβλάστες. Η διεργασία αυτή είναι εστιασμένη σε συγκεκριμένη οστική περιοχή, γεγονός που ενορχηστρώνεται από το δίκτυο οστεοκυττάρων – σωληναρίων μετά από κατάλληλη σηματοδότηση. Στην φάση απορρόφησης που διαρκεί 30 – 40 ημέρες, λαμβάνει χώρα στρατολόγηση και σύντηξη πρόδρομων οστεοκλαστικών κυττάρων και προετοιμασία των οστεοκλαστών οι οποίοι περαιτέρω απορροφούν το οστό, οδηγώντας στο σχηματισμό κοιλοτήτων. Στην περίοδο αναστροφής οι οστεοβλάστες προσελκύονται στις κοιλότητες απορρόφησης στις οποίες θα λάβει περαιτέρω χώρα εναπόθεση νέου οστού. Ακολουθεί η περίοδος πρώιμου και όψιμου σχηματισμού, διάρκειας 150 ημερών, όπου οστεοειδές εναποτίθεται από ενεργούς οστεοβλάστες και μεταλλοποιείται αντίστοιχα. Η όλη διεργασία ολοκληρώνεται με τη φάση ηρεμίας όπου οι οστεοβλάστες μετατρέπονται σε επενδυματικά κύτταρα ή οστεοκύτταρα (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8:** Στάδια οστικής αναδιαμόρφωσης. Παρατηρείστε την διαδοχή κυττάρων και τις ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην δομή του οστού (τροποποιημένο από [41]).

## **8. Φυσιολογία επούλωσης καταγμάτων**

Η επούλωση των οστικών καταγμάτων αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία από την έναρξη μέχρι την ολοκλήρωσή της. Η εμπέδωση των φάσεων της επούλωσης είναι απαραίτητη για τον επιστήμονα που θέλει να ασχοληθεί με το πεδίο της οστικής ανάπλασης και ενσωμάτωσης μοσχευμάτων καθότι οι δύο αυτές διεργασίες είναι συναφείς, παρουσιάζοντας μεγάλες ομοιότητες στην φυσιολογία τους. Παρακάτω περιγράφονται τα κύρια στάδια της επούλωσης ενός οστικού κατάγματος.

### **A. Οξεία φλεγμονώδης αντίδραση**

Μετά την πρόκληση ενός οστικού τραύματος παράγεται αιμάτωμα που εμπεριέχει κύτταρα από το περιφερικό αίμα και τον μυελό των οστών, επάγοντας φλεγμονώδη αντίδραση, διεργασία απαραίτητη για την πρόοδο της επούλωσης [42]. Παρότι οι φλεγμονώδεις παράγοντες έχουν αρνητική επίδραση στα οστά, τις αρθρώσεις και το μοσχευματικό υλικό, σε παρατεταμένη ή χρόνια έκφραση, η σύντομη και υψηλά ρυθμιζόμενη έκκριση κυτοκινών μετά από οξεία βλάβη είναι κρίσιμη για την αναγέννηση των ιστών. Η οξεία φλεγμονώδης απόκριση κορυφώνεται μέσα στις πρώτες 24 ώρες και ολοκληρώνεται εντός 7 ημερών, αν και ποικίλα φλεγμονώδη μόρια παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο αργότερα στην οστική αναγέννηση [43].

Η αρχική φλεγμονώδης απόκριση περιλαμβάνει την έκκριση TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-11 και IL-18, μορίων που προσελκύουν φλεγμονώδη κύτταρα και προάγουν την αγγειογένεση. Η συγκέντρωση του TNF- $\alpha$  κορυφώνεται στις 24 ώρες και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα εντός 72 ωρών μετά το τραύμα, εκφραζόμενος από μακροφάγα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, εκλύοντας δευτερογενή φλεγμονώδη χημειοτακτικά σήματα [42] [44]. Ο TNF- $\alpha$  έχει αποδειχθεί

in vitro ότι επάγει την οστεογενετική διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων με την ενεργοποίηση των υποδοχέων TNFR1 και TNFR2 [45] [44], [46]. Αναφορικά με τις ιντερλευκίνες, οι IL-1 και IL-6 εκφραζόμενες σε μακροφάγα και οστεοβλάστες, προάγουν την παραγωγή του πρωτογενούς χόνδρου, την αγγειογένεση στην περιοχή του τραύματος κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης μέσω παραγωγής VEGF και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών [47].

### **B. Συγκέντρωση μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων (MSCs)**

Ακολουθεί συγκέντρωση MSCs τα οποία πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε οστεογενετικά κύτταρα. Τα περισσότερα από τα MSCs προέρχονται κυρίως από τους μαλακούς ιστούς περιφερικά του τραύματος και το μυελό των οστών [48], [49]. Τα τρέχοντα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο παράγοντας SDF-1 και ο υποδοχέας του CXCR-4 σχηματίζουν έναν άξονα (SDF-1 / CXCR-4) ο οποίος είναι βασικός ρυθμιστής της πρόσληψης και μετακίνησης συγκεκριμένων MSCs στη θέση του τραύματος [50]. Αναφορές δείχνουν ότι ο SDF-1 αυξάνεται στη θέση του κατάγματος, ιδιαίτερα στο περίοστεο, παίζοντας ειδικό ρόλο στην πρόσληψη CXCR-4 θετικών MSCs στην περιοχή του τραύματος. Η σημασία αυτού του άξονα επαληθεύθηκε περαιτέρω χορηγώντας ανταγωνιστή του SDF-1 ο οποίος εμπόδισε την επουλωτική διαδικασία ενώ εξωγενώς χορηγούμενα MSCs μετακινούνται προς την περιοχή του κατάγματος μόνο εάν εκφράζουν τον CXCR-4 [51], [52].



## **Γ. Δημιουργία τύλου**

Ο σχηματισμός ενός χόνδρινου τύλου που αργότερα υφίσταται μεταλλοποίηση, απορρόφηση και μετέπειτα αντικατάσταση με οστό είναι το βασικό χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας. Σε συνέχεια του σχηματισμού αιματώματος, αναπτύσσεται πλούσιος σε ινώδες κοκκιώδης ιστός. Εντός αυτού σχηματίζεται χόνδρος τόσο μεταξύ των άκρων του κατάγματος όσο και εξωτερικά σε περιστικές θέσεις. Αυτές οι περιοχές είναι μηχανικά λιγότερο σταθερές και ο χόνδρος σχηματίζει έναν μαλακό τύλο που δίνει στο κάταγμα μια σχετική σταθερότητα [53].

Παράλληλα, ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση εμφανίζεται υποπεριστικά στο εγγύς και άπω άκρα του κατάγματος, δημιουργώντας έναν σκληρό τύλο, η γερφύρωση του οποίου παρέχει στο κάταγμα μια ημι-άκαμπτη δομή ανθεκτική σε μηχανικά φορτία [54]. Ακολουθεί καταρράκτης μοριακών αντιδράσεων που περιλαμβάνει την παραγωγή μήτρας κολλαγόνου-I και -II και αρκετών πεπτιδικών σηματοδοτικών μορίων. Σε αυτή τη διαδικασία τα μέλη της υπερικογένειας TGF-β κατέχουν ιδιαίτερο ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, ο TGF-β2 και -β3 εμπλέκονται στη χονδρογένεση και την ενδοχόνδρινη οστεοποίηση, ενώ οι BMP-5 και -6 επάγουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων στην ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση σε περιστικές θέσεις [43], [55].

## **Δ. Νεοαγγειογένεση και επαναγγείωση**

Η επούλωση του κατάγματος απαιτεί ικανοποιητική αιματική παροχή και επαναγγείωση των ιστών. Στην χονδρογενή επούλωση αυτό δεν περιλαμβάνει μόνο αγγειογενετικές οδούς αλλά επίσης απόπτωση χονδροκυττάρων και αποδόμηση χόνδρου καθότι η απομάκρυνση των

κυττάρων και εξωκυττάρων υλικών είναι απαραίτητα για να επιτρέψουν την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων [56].

Η διαδικασία αγγειογένεσης ρυθμίζεται κυρίως από την αγγειοποιητίνη και τον VEGF [57]. Η αγγειοποιητίνη-1 και -2 είναι μορφογενετικές πρωτεΐνες που εκφράζονται σχετικά νωρίς στην επούλωτικό καταρράκτη, προάγοντας την αγγειακή ανάπτυξη από τα υπάρχοντα αγγεία του περιόστεου [58]. Ωστόσο, η οδός VEGF θεωρείται ο πλέον βασικός ρυθμιστής της αγγειακής αναγέννησης. Έχει αποδειχθεί ότι τόσο οι οστεοβλάστες όσο και τα χονδροκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα VEGF, προωθώντας την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων και μετασχηματίζοντας την ανάγγεια χονδρογενή μήτρα σε έναν πλούσιο αγγείων οστίτη ιστό [59]. Ο VEGF προάγει την συγκέντρωση και τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών μεσεγχοματικών βλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα. Η σημασία του σε αυτές τις διεργασίες υποστηρίζεται περαιτέρω από τις παρατηρήσεις ότι η προσθήκη VEGF προωθεί την επούλωση του κατάγματος, ενώ η παρεμπόδιση των υποδοχέων του VEGF αναστέλλει την αγγειακή ανάπτυξη και καθυστερεί ή διακόπτει την αναγεννητική διαδικασία [60].

### **E. Αντικατάσταση του χόνδρινου με οστικό τύλο**

Σε αυτό το στάδιο ο πρωτογενής μαλακός χόνδρινος τύλος απορροφάται και αντικαθίσταται από ένα σκληρό οστικό τύλο, παρουσιάζοντας ομοιότητες σε κάποιο βαθμό με την εμβρυϊκή οστική ανάπτυξη [61]. Η συνάφεια ανάμεσα στην εμβρυϊκή ανάπτυξη των οστών και την επούλωση καταγμάτων ενισχύθηκε περαιτέρω από μια πρόσφατη ανακάλυψη του ρόλου της οικογένειας μορίων Wnt, η συμμετοχή της οποίας είναι εμφανής τόσο κατά την

εμβρυογένεση όσο και κατά την οστική επούλωση, ρυθμίζοντας τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων MSCs σε οστεοβλάστες [62]. Καθώς τα χονδροκύτταρα στον χόνδρινο τύλο πολλαπλασιάζονται και υπερτρέφονται, η εξωκυττάρια μήτρα μεταλλοποιείται. Ο περαιτέρω καταρράκτης που ενεργοποιείται από μόρια όπως M-CSF, RANKL, OPG και TNF- $\alpha$  συμβάλλουν στην απορρόφηση του μεταλλοποιημένου χόνδρου και στην πρόσληψη οστικών κυττάρων και οστεοκλαστών για το σχηματισμό ανώριμου δικτυωτού οστού [63].

Ο μηχανισμός ενασβεστίωσης εμπλέκει το ρόλο των μιτοχονδρίων, τα οποία συσσωρεύουν κοκκία ασβεστίου που αναπτύσσονται στο υποξικό περιβάλλον του κατάγματος. Μετά την επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα των χονδροκυττάρων, οι κόκκοι ασβεστίου μεταφέρονται στην εξωκυττάρια μήτρα όπου εμπλέκονται με φωσφορικά άλατα και σχηματίζουν μεταλλοποιημένες εναποθέσεις. Αυτές οι εναποθέσεις ασβεστίου και φωσφορικού άλατος αποτελούν τον πυρήνα για το σχηματισμό κρυσταλλων απατίτη [64]. Ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής σκληρού τύλου επιτυγχάνεται συνήθως την 14η ημέρα σε ζωικά μοντέλα. Καθώς ο ενασβεστιωμένος χόνδρος αντικαθίσταται με δικτυωτό οστό, ο τύλος γίνεται πιο στερεός και μηχανικά άκαμπος [54], [65].

### **Στ. Οστική αναδιαμόρφωση**

Αν και ο σκληρός τύλος είναι μια άκαμπτη δομή που παρέχει μηχανική σταθερότητα, δεν αποκαθιστά πλήρως την ανθεκτικότητα του φυσιολογικού οστού. Για να επιτευχθεί αυτό, ξεκινά μια δεύτερη φάση απορρόφησης, αυτή τη φορά για να αναδιαμορφώσει το σκληρό δικτυωτό τύλο σε δοκιδώδες οστό [42]. Σε αυτή τη φάση πρωτοστατούν τα μόρια IL-1, TNF- $\alpha$  και BMP-2 τα οποία εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης [55], [66].

Η διαδικασία αναδιαμόρφωσης πραγματοποιείται με εξισορρόπηση απορρόφησης του σκληρού τύλου από οστεοκλάστες και εναπόθεσης δοκιδώδους οστού από οστεοβλάστες. Παρότι η διαδικασία ξεκινάει από την 3-4<sup>η</sup> εβδομάδα σε ζωικά και ανθρώπινα μοντέλα, μπορεί να διαρκέσει χρόνια για να ολοκληρωθεί μια πλήρως αναγεννημένη οστική δομή. Η ανάπλαση των οστών έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτέλεσμα της επαγωγής ηλεκτρικής πολικότητας που δημιουργείται κατά την εφαρμογή πίεσης σε ένα κρυσταλλικό περιβάλλον [56]. Αυτό επιτυγχάνεται όταν δημιουργείται αξονική φόρτιση, δημιουργώντας μία ηλεκτροθετική κυρτή επιφάνεια και μία ηλεκτροαρνητική κοίλη επιφάνεια, ενεργοποιώντας την οστεοκλαστική και οστεοβλαστική δραστηριότητα αντίστοιχα. Με αυτές τις δράσεις ο εξωτερικός τύλος αντικαθίσταται σταδιακά από ένα δοκιδώδες οστό, ενώ η εσωτερική αναδιάρθρωση του τύλου μετατρέπεται σε μυελική κοιλότητα, χαρακτηριστικό ενός διαφυσικού οστού [67].

Για να είναι επιτυχής η αναδιαμόρφωση των οστών, θεωρούνται απαραίτητα η επαρκής παροχή αίματος και η σταδιακή αύξηση της μηχανικής σταθερότητας. Αυτό αποδεικνύεται σαφώς σε περιπτώσεις όπου τα στοιχεία αυτά δεν υφίστανται, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ινώδους, μη συνενώσεως. Επιπλέον, στις περιπτώσεις στην οποία υπάρχει καλή αγγείωση αλλά ελλιπής σταθεροποίηση, η διαδικασία επούλωσης προχωράει σχηματίζοντας έναν χόνδρινο τύλο, ο οποίος καταλήγει σε υπερτροφική, μη συνένωση ή ψευδοάρθρωση (**Εικόνα 9**) [68]–[70].



**Αιμάτωμα  
Ανάπτυξη φλεγμονής**



**Σχηματισμός  
χόνδρινου τύλου**



**Σχηματισμός  
οστέινου τύλου**



**Οστική  
αναδιαμόρφωση**

**Εικόνα 9:** Βασικά στάδια επούλωσης οστικών καταγμάτων (τροποποιημένο από [www.pshs.psd202.org/documents/bzetterg/1502917610.pdf](http://www.pshs.psd202.org/documents/bzetterg/1502917610.pdf)).

## 9. Οστικά μοσχεύματα – Σύντομη ιστορική ανασκόπηση

Η ανάγκη εφαρμογής οστικών μοσχευμάτων έχει ρίζες πολύ παλιά στην Ιατρική επιστήμη, γεγονός που αναπαριστάται γλαφυρά από το 'θαύμα' των αγίων Κοσμά και Δαμιανού που μεταμόσχευσαν το πόδι πρόσφατα νεκρού σε έναν νεωκόρο που είχε χάσει το άκρο του.

Η πρώτη αναφορά εφαρμογής οστικού μοσχεύματος εντοπίζεται το 1688, σε βιβλίο του ολλανδού Job Jansoon van Meekeren, με τίτλο 'Heel en Geneeskunstige Aanmerkkingen' (Χειρουργικές και ιατρικές παρατηρήσεις) όπου περιγράφει την εμφύτευση τμήματος κρανίου σκύλου για αποκατάσταση οστικού ελλείμματος στο κρανίο ενός ευγενούς. Η επέμβαση αυτή πραγματοποιήθηκε στη Μόσχα, στέφθηκε από επιτυχία, αλλά δεν είχε την έγκριση της εκκλησίας και το μόσχευμα έπρεπε να αφαιρεθεί [71]–[73]. Η πρώτη εφαρμογή αυτομοσχεύματος στην κλινική πράξη έγινε το 1820 στην Γερμανία από τον von Walter, ο οποίος επανατοποθέτησε με επιτυχία τμήμα κρανίου που είχε προηγουμένως αφαιρεθεί [74]. Ακολούθησαν, η πρώτη απόπειρα αυτομοσχεύματος περόνης για αποκατάσταση ελλείμματος κνήμης που έγινε το 1884 από τον Hahn, και το 1892, η χρήση περόνης για αποκατάσταση της ομόπλευρης κνήμης από τον Curtis [75][76]. Αναφορικά με τα αλλομοσχεύματα, το πρώτο χρησιμοποιήθηκε το 1880 στη Σκωτία από τον Macewen, ο οποίος εφαρμόζοντας μόσχευμα από την κνήμη παιδιού αποκατέστησε το προσβεβλημένο από οστεομυελίτιδα βραχιόνιο έλλειμμα μήκους 11 εκατοστών ενός άλλου παιδιού [77].

Σε πειραματικό επίπεδο, η πρώτη εργασία δημοσιεύτηκε το 1684 από τον de Heyde, ο οποίος αναφέρει ότι η δημιουργία του πόρου μετά από κατάγματα ήταν συνέπεια της μεταλλοποίησης του αιματικού θρόμβου στην εστία του κατάγματος, ενώ ο Duhamel θεωρείται ο πρώτος που ασχολήθηκε με την οστεογένεση, αποδίδοντας την παραγωγή νέου οστού στην

οστεογενετική ικανότητα του περιostίου [78], [79]. Αντίθετα, το 1763 ο Von Haller θεωρεί ότι η οστεογένεση ήταν συνέπεια του εξιδρώματος που προερχόταν από τις αρτηρίες [80]. Πάνω στις δύο αυτές διαφορετικές απόψεις στηρίχθηκαν δύο αντιμαχόμενες σχολές μέχρι το 1842, μέχρις ότου ο Flourens απέδειξε ότι το περίostιο έχει οστεογενετική δράση και είναι ο κύριος παράγοντας στην επούλωση των οστικών ελλειμμάτων [81]. Ο Ollier δημοσίευσε το 1867 τις παρατηρήσεις του σχετικά με την βιολογική συμπεριφορά των αυτομοσχευμάτων σε πειραματόζωα, σύμφωνα με τις οποίες, τα αυτομοσχεύματα διατηρώντας το περίostιο τους είναι δυνατόν να παραμείνουν βιώσιμα αλλά και να αυξηθούν ευρισκόμενα σε κατάλληλο περιβάλλον ενώ η παρουσία των Αβερσίων σωλήνων και του ενδοostίου ήταν επίσης πολύ σημαντικοί παράγοντες στην οστική αναγέννηση [82]. Ο Barth σύμφωνα με μια άλλη θεώρηση υποστήριξε την άποψη ότι το οστικό μόσχευμα νεκρώνεται και δημιούργησε τον όρο έρπουσα υποκατάσταση, για να περιγράψει την απορρόφηση των νεκρωμένων ιστών του οστικού μοσχεύματος και τον σχηματισμό νέου οστού, το οποίο σταδιακά εισέρχεται εντός του μοσχεύματος, προερχόμενο από το γειτονικό ζωντανό οστόν [82]. Μετέπειτα, ο Axhausen ανέδειξε την αναγεννητική ικανότητα του περιostίου, θεωρώντας ότι όλα τα οστικά μοσχεύματα νεκρώνονται αλλά το περίostιο επιβιώνει και δρα ως πηγή οστεογένεσης, προτείνοντας την διατήρησή του κατά τη μεταμόσχευση για εξασφάλιση του αποτελέσματος, θεωρία που αργότερα επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές και είναι ευρέως αποδεκτή μέχρι σήμερα. Επίσης συμπέρανε ότι τα αλλομοσχεύματα είχαν περισσότερο αβέβαιη έκβαση σε σχέση με τα αυτομοσχεύματα και ότι τα ξеноμοσχεύματα δεν παρουσίαζαν δυνατότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κατέληγαν σε απορρόφηση [83].

Το πρώτο βιβλίο με θέμα το οστικά μοσχεύματα ήταν έργο του Αμερικανού Albee, εκδόθηκε το 1915 και ασχολήθηκε με θέματα όπως η αιμάτωση, θρέψη και πόρωση του μοσχεύματος και η προσαρμογή του στις μηχανικές απαιτήσεις της δέκτριας περιοχής [84].

Έκτοτε, η αλματώδης εξέλιξη των τελευταίων δεκαετιών είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών προϊόντων οστικών υποκαταστάτων με διαφορετικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά για να φθάσουμε σήμερα πλέον στην αναζήτηση αυξητικών παραγόντων και την εφαρμογή προγονικών βλαστικών κυττάρων, πεδία στα οποία υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα και από τα οποία αναμένεται να προκύψουν νέες δυνατότητες στο πεδίο των οστικών μοσχευμάτων στο εγγύς μέλλον.



## 10. Οστικά μοσχεύματα

Τα οστικά ελλείμματα των γνάθων συχνά αποδίδονται σε ατυχήματα (τροχαία, εργασία, αθλητισμός, πυροβολισμοί), χειρουργική εξαίρεση καλοηθών βλαβών (κύστεις, οδοντογενείς όγκοι), κακοήθη νεοπλάσματα, συγγενείς ανωμαλίες (σχιστίες ή υποπλασία οστών του σπλαγγχνικού κρανίου), φλεγμονή του περιοδοντίου, οδοντικά αποστήματα ή εξαγωγές όσο και ατροφία των γνάθων εξαιτίας προχωρημένης ηλικίας ή συστηματικής ασθένειας [85].

Σήμερα, με τις προόδους στον τομέα της οδοντοφατνιακής χειρουργικής, αυτά τα ελλείμματα γίνεται προσπάθεια να αποκαθίστανται για ποικίλους λόγους όπως διατήρηση του φυσιολογικού ανατομικού περιγράμματος των οστών, εξάλειψη κενού χώρου, αισθητική αποκατάσταση και τοποθέτηση οδοντικών εμφυτευμάτων, με ικανοποιητική πλέον επιτυχία [86]. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι συμπεριλαμβανομένων των μοσχευματικών υλικών, της κατευθυνόμενης οστικής ανάπτυξης, της διατακτικής οστεογένεσης, της εφαρμογής αυξητικών παραγόντων όσο και βλαστικών κυττάρων [87].

Αναφορικά με τα οστικά μοσχεύματα, αυτά περιλαμβάνουν μια ποικιλία υλικών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης, με αποδεδειγμένη πλέον ικανότητα στην οστική επούλωση τα οποία διαθέτουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, βάσει των οποίων ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες (**Πίνακας 1**). Ειδικότερα, όσον αφορά την προέλευση τους, τα οστικά μοσχεύματα διακρίνονται σε (**βλέπε Παράρτημα – Πίνακας 1**) : 1. **Αυτομοσχεύματα** που λαμβάνονται από τον ίδιο τον ασθενή και δεν διαθέτουν αντιγονικές ιδιότητες καθότι δότης και λήπτης αποτελεί το ίδιο πρόσωπο. 2. **Ισομοσχεύματα** που προέρχονται από το ίδιο είδος με την ιδιαιτερότητα ότι δότης και λήπτης μοιράζονται τις ίδιες αντιγονικές ιδιότητες (δίδυμα). 3. **Αλλομοσχεύματα** που υποβάλλονται σε ειδική επεξεργασία προκειμένου να εξαλειφθούν οι αντιγονικές ιδιότητες,

δεδομένου ότι δότης και λήπτης είναι διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους. 4. **Ξενομοσχεύματα** που λαμβάνονται από ποικιλία ειδών και εφαρμόζονται στον άνθρωπο, και τέλος 5. **Συνθετικά - αλλοπλαστικά** υποκατάστατα οστού που αναπτύχθηκαν με στόχο να μιμηθούν τον φυσικό οστίτη ιστό [88].

Προέλευση	Ιστολογική αρχιτεκτονική	Εμβρυολογική προέλευση	Αιματική παροχή	Μορφή μοσχεύματος
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αυτόλογο</li> <li>• Αλλομόσχευμα</li> <li>• Ξενομόσχευμα</li> <li>• Αλλοπλαστικό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φλοιώδες</li> <li>• Σπογγώδες</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Χονδρογενές</li> <li>• Μεμβρανώδες</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ελεύθερο μόσχευμα</li> <li>• Αιματούμενο περιοχικό μόσχευμα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οστικό μπλοκ</li> <li>• Κόκκοι</li> <li>• Πάστα οστού</li> </ul>

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση των οστικών μοσχευμάτων σε κατηγορίες με κριτήριο διάφορα χαρακτηριστικά.

Οι βασικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα μοσχευματικά υλικά ανεξάρτητα από την προέλευσή τους συνοψίζονται στα εξής: 1. **Οστεογένεση:** ζώντες οστεοβλάστες που εμπεριέχονται στο μόσχευμα συμβάλλουν στην παραγωγή νέου οστού, 2. **Οστεοεπαγωγή:** διέγερση οστεοπρογονικών κυττάρων του οστού που διαφοροποιούνται περαιτέρω σε οστεοβλάστες, λαμβάνοντας κατάλληλα σήματα από αυξητικούς παράγοντες που εμπεριέχονται στο μόσχευμα [89], 3. **Οστεοκαθοδήγηση:** η τρισδιάστατη μηχανική δομή του μοσχευματικού υλικού αποτελεί σκελετό - ικρίωμα, για την ανάπτυξη τριχοειδών αγγείων και πρόδρομων κυττάρων των οστών εντός αυτού, οδηγώντας περαιτέρω στη δημιουργία νεόπλαστου οστού ανάμεσα και γύρω από το μόσχευμα [90], [91].

Το 'ιδανικό' υλικό για οστική αποκατάσταση πρέπει να διαθέτει μια πλειάδα χαρακτηριστικών, που περιλαμβάνουν: 1. Οστεογενετικές, οστεοεπαγωγικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, 2. Διέγερση της αγγειογένεσης, 3. Έλλειψη αντιγονικών, τερατογόνων ή καρκινογόνων αντιδράσεων, 4. Διαθεσιμότητα σε επαρκείς ποσότητες, 5. Ικανοποιητική στήριξη και σταθερότητα κατά την τοποθέτηση, 6. Ελάχιστη έως μηδενική νοσηρότητα - επιπλοκές. 7. Υδρόφιλη φύση, 8. Εύκολος χειρισμός, 9. Χαμηλό κόστος [92]. Παρά τις μακροχρόνιες ερευνητικές προσπάθειες, το «τέλειο» υλικό αναδόμησης των οστών δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί, απαιτώντας περαιτέρω προσπάθεια για να καταστεί εφικτός αυτός ο στόχος.

Μια σύντομη περιγραφή των διαθέσιμων σήμερα μοσχευματικών υλικών ακολουθεί παρακάτω.

## 11. Είδη οστικών μοσχευμάτων

### A. Αυτομοσχεύματα

Τα αυτομοσχεύματα θεωρούνται το «gold standard» μεταξύ των ποικίλων διαθέσιμων υλικών οστικής ανάπλασης λόγω της μοναδικής οστεογενετικής ικανότητάς τους, εμπεριέχοντας ζώντα κύτταρα, καθώς επίσης και των οστεοεπαγωγικών χαρακτηριστικών δεδομένου ότι μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων συμβάλλει στη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε οστεοβλάστες [93]. Το γεγονός ότι δότης και δέκτης αποτελεί το ίδιο άτομο μηδενίζει τον κίνδυνο ανοσοαντίδρασης, επιτυγχάνοντας ποσοστό επιτυχίας αναφορικά με την οστική ανάπλαση > 95% [94], [95]. Η δημιουργία ενός δεύτερου τραύματος με ενδεχόμενη περιορισμένη προσφορά οστού, ειδικά όταν επιλέγονται ενδο-στοματικές θέσεις λήψης μοσχεύματος, όσο και η αυξημένη νοσηρότητα με πιθανή επιβάρυνση της συστηματικής υγείας του ασθενούς ή εκδήλωση χρόνιου μετεγχειρητικού πόνου και υπερευαισθησίας της δότριας περιοχής. ειδικά σε περιπτώσεις συλλογής μεγάλης ποσότητας μοσχεύματος περιλαμβάνονται στα μειονεκτήματά τους [96].

Η ενδο-στοματική συλλογή οστού σε περιπτώσεις γναθοπροσωπικών επεμβάσεων παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα έναντι των εξω-στοματικών περιοχών: ευκολία χειρουργικής πρόσβασης, σχετική εγγύτητα δότριας και δέκτης περιοχής, έλλειψη μόνιμης ουλής του δέρματος και ελάχιστη μετεγχειρητική νοσηρότητα [97]. Επιπλέον, η μεμβρανώδης οστεοποίηση της άνω όσο και της κάτω γνάθου φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό οστικής απορρόφησης, που είναι χαμηλότερος σε σύγκριση με οστά χονδρογενούς οστεοποίησης, καθώς και στην καλύτερη ενσωμάτωση του ενθέματος, επειδή τα οστά αυτά περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων και πλούσιο αγγειογενετικό

δυναμικό [98]. Ωστόσο, σύμφωνα με άλλους συγγραφείς, αυτές οι παρατηρήσεις αποδίδονται κυρίως στη μικρο-αρχιτεκτονική του μοσχεύματος, ιδιαίτερα στην αναλογία μεταξύ φλοιώδους και σπογγώδους οστού όσο και στην εμβρυολογική του προέλευση [99], [100].

Όσον αφορά τα μοσχεύματα που προέρχονται από εξω-στοματικές περιοχές, αυτές γενικά παρέχουν μεγαλύτερους όγκους μοσχεύματος, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την τελική απόφαση του κλινικού ιατρού, ειδικά σε αποκαταστάσεις μεγάλων οστικών ελλειμμάτων. Βεβαίως, σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη νοσηρότητα, επιβάλλεται γενική αναισθησία, νοσηλεία σε νοσοκομειακό χώρο και κατάλληλη εκπαίδευση του ιατρού [94].

Η τελική απόφαση για την επιλογή της δότριας θέσης καθορίζεται από τις ιδιαιτερότητες του προς αποκατάσταση οστικού ελλείμματος, την προσωπική εμπειρία και τις προτιμήσεις του ιατρού καθώς και την αποδοχή του θεραπευτικού σχεδίου από τον ασθενή [101]. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολυάριθμες θέσεις για λήψη αυτομοσχεύματος αλλά δεδομένου ότι η λεπτομερής ανάλυσή τους υπερβαίνει τα όρια αυτής της εργασίας, παρατίθεται μόνο συνοπτική ανασκόπηση των διαθέσιμων ενδο- και εξω-στοματικών περιοχών (**βλέπε Παράρτημα-Πίνακας 2**).

## **B. Αλλομοσχεύματα**

Τα αλλομοσχεύματα λαμβάνονται από άτομα ίδιου είδους αλλά διαφορετικού γένους, τα οποία επιλέγονται, επεξεργάζονται και συντηρούνται σε οστικές τράπεζες όπου διεξάγεται ενδελεχής έλεγχος των δοτών, συμπεριλαμβανομένου λεπτομερούς κοινωνικο - ιατρικού ιστορικού καθώς και κατάλληλων ορολογικών εξετάσεων. Προέρχονται από ζώντες δότες (συνήθως από επεμβάσεις αντικατάστασης κεφαλής μηριαίου οστού) ή πτωματικό υλικό,

κατάλληλα επεξεργασμένα για να εξουδετερωθεί η ανοσολογική απόκριση όσο και η μετάδοση μολυσματικών ασθενειών [102]. Είναι διαθέσιμα ως φλοιώδη, σπογγώδη ή φλοιο - σπογγώδη μοσχεύματα σε διάφορα σχήματα και μεγέθη. Οι κύριοι τύποι αυτών των υλικών περιλαμβάνουν:

**1. Νωπό κατεψυγμένο οστό (FFB – Fresh Frozen Bone):** καταψύχεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για να αποφευχθεί η ενζυματική αποικοδόμηση, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία με ακτινοβολία, λυοφίλιοποίηση ή αφαλάτωση. Είναι άνευ κυττάρων, με τις υψηλότερες οστεοεπαγωγικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας BMPs. Δεν χρησιμοποιείται πλέον λόγω της πιθανότητας μετάδοσης νόσου και υψηλής ανοσοαπόκρισης του δέκτη [103], **2. Κατεψυγμένο - αφυδατωμένο αλλομόσχευμα οστού (FDBA - Freeze Dried Bone Allograft):** υποβάλλεται σε αφυδάτωση και κατάψυξη χωρίς αφαλάτωση, οδηγώντας σε μειωμένη αντιγονικότητα, διαθέτοντας μόνο οστεοκαθοδηγητικό δυναμικό, **3. Απομεταλλοποιημένο κατεψυγμένο - αφυδατωμένο αλλομόσχευμα οστού (DFDBA - Demineralized Freeze Dried Bone Allograft):** εκτός από την αφυδάτωση, το ανόργανο τμήμα του οστού απομακρύνεται, αφήνοντας μόνο το οργανικό μέρος που περιέχει BMPs. Αυτά τα υλικά παρουσιάζουν οστεοεπαγωγικά και καθοδηγητικά χαρακτηριστικά [104], **4. Αφαλατωμένη οστική θεμέλια ουσία (DBM – Demineralized Bone Matrix):** στην κατηγορία αυτή έχει αφαιρεθεί η ανόργανη φάση του οστού, καταλείποντας κολλαγόνο, αυξητικούς παράγοντες και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, συστατικά που προσδίδουν οστεοεπαγωγικές και οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες [105].

Στα πλεονεκτήματα των αλλομοσχευμάτων περιλαμβάνονται η διαθεσιμότητα σε επαρκείς ποσότητες, μεγέθη και σχήματα, προβλέψιμα αποτελέσματα και η εξάλειψη διενέργειας μιας επιπλέον χειρουργικής επέμβασης [106]. Από την άλλη πλευρά, η μετάδοση της νόσου από τον δότη στον λήπτη, παρότι εξαιρετικά μικρή, δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως, εξαρτώμενη από τα μέτρα ελέγχου που λαμβάνονται και για τον λόγο αυτό πρέπει να

καταγράφεται λεπτομερές κοινωνικό και ιατρικό ιστορικό όσο και επιπρόσθετες ορολογικές εξετάσεις (HIV, ηπατίτιδας Β και C, τρεπόννημα κ.ά.) [107]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η μεταβίβαση νέων άγνωστων παθογόνων παραγόντων, αν και σχετικά σπάνια παραμένει, καθώς δεν μπορούν να εξαλειφθούν με τις υπάρχουσες διαδικασίες επεξεργασίας ενώ έχει αναφερθεί υψηλότερο ποσοστό απορρόφησης, ανοσολογική απόκριση και μικρότερη επαναγγείωση σε σχέση με αυτόλογα οστικά μοσχεύματα [108]. Τέλος, λόγω του γεγονότος ότι ένα αλλομόσχευμα οστού δεν αποτελεί τυποποιημένο ιστό, δεδομένου ότι η ηλικία, το φύλο και η ιατρική κατάσταση του δότη μπορεί να ποικίλουν σε συνδυασμό με την εκάστοτε διαδικασία επεξεργασίας που ενδέχεται να ποικίλει στις οστικές τράπεζες, ερμηνεύει τους λόγους για τους οποίους οι ιδιότητές τους μπορούν να διαφέρουν ευρέως. Όλες οι μέθοδοι επεξεργασίας, συντήρησης και αποθήκευσης πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά όσον αφορά τη μετάδοση των ασθενειών, αλλά και την επίδρασή τους στις βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες του υλικού. Για παράδειγμα, μολονότι μια πιο έντονη διαδικασία αποστείρωσης μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες μετάδοσης της νόσου και μόλυνσης, μπορεί επίσης να εξαλείψει την οστεογενετική και οστεοεπαγωγική ιδιότητα του οστού μέσω της καταστροφής κυττάρων και τη μετουσίωση πρωτεϊνών. Επίσης ενώ η κατάψυξη επιφέρει ελάχιστες επιπτώσεις στις μηχανικές ιδιότητες, η κατάψυξη με αφυδάτωση ενδέχεται να τις τροποποιήσει σημαντικά [102].

### **Γ. Ξενομοσχεύματα**

Αυτά τα μοσχεύματα προέρχονται από δότες διαφορετικού είδους σε σχέση με τον δέκτη, συνήθως διαθέτουν οστεοκαθοδηγητικά χαρακτηριστικά με περιορισμένο δυναμικό απορρόφησης και συχνά συνδυάζονται με αυξητικούς παράγοντες ή μοσχεύματα οστών άλλης

προέλευσης. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται πολλά υποκατάστατα οστού, ικανά προς ευρεία παραγωγή με σχετικά προσιτό κόστος. Ανάμεσα στα μειονεκτήματά τους είναι το γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά των οστών διαφέρουν λιγότερο ή περισσότερο σε σύγκριση με τον άνθρωπο, η διαδικασία επεξεργασίας τους μπορεί να επηρεάσει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως στην περίπτωση των αλλομοσχευμάτων ενώ η πιθανότητα μετάδοσης νόσου και ανοσιακής απόκρισης είναι υπαρκτή [108].

### **Γ1. Μοσχεύματα βόειας προέλευσης**

Τα υποκατάστατα οστών από βοοειδή ήταν τα πρώτα ξενομοσχεύματα που εφαρμόστηκαν σε ασθενείς, κυκλοφορούν στο εμπόριο σε ευρύ φάσμα προϊόντων και θεωρούνται από τα πλέον τεκμηριωμένα οστικά εμφυτευματικά υλικά αυτής της κατηγορίας. Χαρακτηρίζονται από οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, έχοντας υποστεί αποπρωτεΐνωση και λυοφιλοποίηση, χωρίς δυναμικό ανοσοαπόκρισης [109]. Ωστόσο, οι κόκκοι αυτών των υλικών θεωρούνται ότι υποβάλλονται σε βραδεία απορρόφηση, περιβαλλόμενοι περιφερικά από νεόπλαστο οστίτη ιστό και όχι από την πλήρη αντικατάστασή τους από οστό όπως συμβαίνει στη φυσιολογική διαδικασία οστικής ανάπλασης [110]. Η ακριβής αιτία αυτού του φαινομένου αποτελεί η επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες για την αποφυγή ανοσολογικών αντιδράσεων, αλλεργιών και μολυσματικών ασθενειών όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια, που θεωρείται υπεύθυνη για την τροποποίηση της δομής του υδροξυαπατίτη, οδηγώντας περαιτέρω σε μειωμένο δυναμικό απορρόφησης [111], [112].

### **Γ2. Μοσχεύματα ίππειας προέλευσης**



Τα υποκατάστατα οστών που προέρχονται από ιπποειδή έχουν περιγραφεί ως έχοντα την ικανότητα να επάγουν οστεοβλαστική διαφοροποίηση, αγγειογένεση και ικανοποιητική απορρόφηση από οστεοκλάστες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η παρουσία νεόπλαστου οστού που σχετίζεται με επιδράσεις αναδιαμόρφωσης γύρω από το μοσχευματικό υλικό, 6 μήνες μετεγχειρητικά, ενώ έχουν εφαρμοσθεί επιτυχώς σε περιπτώσεις ανύψωσης του γναθιαίου κόλπου [113], [114].

### **Γ3. Μοσχεύματα χοίρειας προέλευσης**

Τα σχετικώς πρόσφατα αναπτυχθέντα υποκατάστατα που προέρχονται από χοίρους, θεωρούνται ότι παρουσιάζουν ομοιότητες όσον αφορά τη δομή τους σε σύγκριση με το ανθρώπινο οστό, λαμβάνοντας ως δεδομένο την γονιδιακή ομοιότητα ανθρώπου και χοίρου. Παρουσιάζουν χαρακτηριστικά οστεοκαθοδήγησης και χαμηλό κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών [115]. Ωστόσο, έχει περιγραφεί μειωμένη ικανότητα απορρόφησης αυτών των υλικών με την πάροδο του χρόνου και ελάχιστη αγγειακή ανάπτυξη [116]. Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς, τα υλικά αυτά θεωρούνται εξίσου αποτελεσματικά με εμφυτεύματα οστών βόειας προέλευσης ενώ σε σχετικές δημοσιεύσεις που αναφέρουν την χρήση τους σε επεμβάσεις ανύψωσης του ιγμορείου άντρου, περιγράφονται ικανοποιητικά αποτελέσματα και υψηλό ποσοστό απορρόφησης 6 μήνες μετεγχειρητικά [117] [118].

### **Γ4. Μοσχεύματα άλγης**

Τα υποκατάστατα από άλγη δεν προκαλούν αντιγονική και φλεγμονώδη αντίδραση στον ξενιστή. Αυτό το βιολογικό υλικό είναι απορροφήσιμο, βαθμιαία υποκαθίσταται από νεοσχηματισμένο οστό και έχει συνδυασθεί με αυξητικούς παράγοντες όπως οι BMPs και ο TGFβ1 [119], [120] [121]. Έχουν επίσης τεκμηριωμένη εφαρμογή στην ανύψωση του ιγμορείου άντρου μέσω ανάπτυξης σπογγώδους οστού γύρω από σωματίδια του βιοϋλικού [122].

### **Γ5. Μοσχεύματα κοραλλιογενούς προέλευσης**

Τα μαντοπορικά κοράλλια, συμπεριλαμβανομένων των ειδών Porites, Acropora, Lobophyllia, Goniopora, Polyphyllia και Pocillopora έχουν αξιοσημείωτες ομοιότητες με το σπογγώδες οστό. Τα υλικά αυτά έχουν εφαρμοσθεί σε ελλείμματα των γνάθων, παρουσιάζοντας οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί ως οχήματα μεταφοράς αυξητικών παραγόντων, συμβάλλοντας στην οστική αποκατάσταση [123]. Παρουσιάζουν πτωχή μηχανική αντοχή στα αρχικά στάδια της εμφύτευσης, αποτελεσματικότητα σχετιζόμενη με την αιματική παροχή στην δέκτρια θέση και ικανοποιητική απορρόφηση. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει την δυνατότητα εφαρμογής αυτού του υλικού σε ανακατασκευή του φατνιακού οστού με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [103], [124].

### **Δ. Αλλοπλαστικά υλικά**

Η τεράστια πρόοδος στον τομέα της βιοτεχνολογίας, η προσπάθεια αποκλεισμού μετάδοσης λοιμωδών ασθενειών και μείωσης του κόστους παραγωγής οδήγησαν στην ανάπτυξη ποικιλίας μοσχευμάτων συνθετικής προέλευσης ως εναλλακτική λύση. Τα υλικά αυτά

διαθέτουν ποικίλες ενδείξεις εφαρμογής ως οστικά υποκατάστατα διατιθέμενα σε πολλά μεγέθη, σχήματα και σύσταση [125]. Με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να βελτιωθούν πολλά χαρακτηριστικά των υλικών αυτών όπως η επιφανειακή υφή και ο σχηματισμός μεταλλοποιημένων στρωμάτων, επιτεύχθηκε η ανάπτυξη ενός τελικού συνθετικού προϊόντος το οποίο μιμείται σε ικανοποιητικό επίπεδο το *in vivo* περιβάλλον του φυσιολογικού οστίτη ιστού. Αυτά τα βιομημητικά υλικά που χαρακτηρίζονται από οστεοκαθοδηγητικό δυναμικό, ενεργούν ως τρισδιάστατα υποστρώματα για να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων [126]. Η χημική τους σύνθεση, η γεωμετρία, η μικροσκοπική δομή και οι μηχανικές ιδιότητες είναι παράγοντες κλειδιά για την επιτυχή αναγέννηση του οστού, ενώ η ικανότητα απορρόφησης *in vivo* επιτρέπει την αντικατάστασή τους από νεόπλαστο οστό [104]. Μια ετερογενής ομάδα προϊόντων, που περιλαμβάνουν το φωσφορικό, θειϊκό και ανθρακικό ασβέστιο, τη βιοδραστική ύαλο και τα πολυμερή υλικά αντιπροσωπεύονται στην κατηγορία αυτή.

### **Δ1. Φωσφορικό ασβέστιο**

Αυτά τα υλικά έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της σχετικής ομοιότητας ως προς τη σύνθεσή τους με τον φυσιολογικό οστίτη ιστό. Ο υδροξυαπατίτης (HA) και το φωσφορικό τριασβέστιο (TCP) είναι τα πλέον σημαντικά υλικά αυτής της κατηγορίας, που ταξινομούνται περαιτέρω σε κεραμικά και τσιμέντα. Τα κεραμικά υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία που ονομάζεται "συσσωμάτωση", οδηγώντας περαιτέρω σε ένα πορώδες και στερεό υλικό. Τα τσιμέντα παράγονται υπό μορφή πάστας, τα οποία στερεοποιούνται μετά από την τοποθέτησή τους εντός της θέσης του οστικού ελλείμματος [127].

Το TCP παρουσιάζει καλή βιοσυμβατότητα και οστεοκαθοδήγηση, έλλειψη οστεογενετικών ή οστεοεπαγωγικών ιδιοτήτων ενώ η πορώδης σύνθεση επιτρέπει την φαγοκυττάρωση - απορρόφησή του και ευοδώνει την αγγειογένεση, οδηγώντας τελικά σε ικανοποιητική οστική ανάπλαση [128]. Το υλικό αυτό είναι εύθραυστο και αδύναμο υπό τάση και διάτμηση, αλλά ανθεκτικό στα συμπιεστικά φορτία και συγκριτικά με τον HA, είναι πιο γρήγορα απορροφήσιμο και παρουσιάζει μικρότερη μηχανική σταθερότητα [129].

Ο HA, που αντιπροσωπεύει το κύριο δομικό ανόργανο συστατικό των οστών και των δοντιών, έχει εξαιρετική βιοσυμβατότητα με το ανθρώπινο σώμα και μπορεί συνεπώς να χρησιμοποιηθεί ως οστικό μόσχευμα [130]. Οι κρύσταλλοι του HA παρουσιάζουν κυρίως οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες και χαμηλή ταχύτητα απορρόφησης, ενώ είναι εύθραυστος και εμφανίζει αποσπάσεις κατά την φόρτιση. Έχει καθιερωθεί ως ένας εξαιρετικός μεταφορέας οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων και οστεογενετικών κυττάρων [131]. Το διφασικό φωσφορικό ασβέστιο προκύπτει από την ανάμιξη του TCP και του HA σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες και ο κατάλληλος βαθμός απορρόφησης.

## **Δ2. Θεϊκό ασβέστιο**

Το θεϊκό ασβέστιο, κοινώς γνωστό ως γύψος των Παρισίων, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως υποκατάστατο οστού το 1892 για την πλήρωση κοιλοτήτων σε μακρά οστά [128]. Είναι διαθέσιμο υπό τη μορφή τσιμέντου ή κόκκων, εμφανίζοντας βιοσυμβατότητα, βιοδραστικότητα, ικανότητα μεταφοράς αυξητικών παραγόντων, οστεοκαθοδήγηση, εύκολο χειρισμό κατά την τοποθέτηση και χαμηλό κόστος. Έχει παρατηρηθεί ταχεία απορρόφηση του

υλικού σε σχέση με τον σχηματισμό νέου οστού και για το σκοπό αυτό έχουν γίνει προσπάθειες συνδυασμού θειϊκού ασβεστίου με άλλα υλικά προς την κατεύθυνση της μείωσης του ρυθμού απορρόφησης. Επίσης, αυτό το εμφυτευματικό υλικό παρέχει ελάχιστη δομική στήριξη, που δεν ενδείκνυται στις περιπτώσεις όπου αναμένεται αυξημένο μηχανικό φορτίο [132]. Στον τομέα της οδοντιατρικής, έχει εφαρμοστεί εκτεταμένα σε ελλείμματα του περιοδοντίου όσο και του φατνιακού οστού [133].

### **Δ3. Πολυμερή υποκατάστατα**

Το πιο σημαντικό από τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην αναγέννηση των οστών είναι ο μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας, ένα πορώδες βιολογικό υλικό που εμφανίζει οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, αντοχή στη θλίψη και ελαστικότητα παρόμοια με το φλοιώδες οστό, αλλά δεν είναι απορροφήσιμο. Η υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού κυμαινόμενη ανάλογα με την ακριβή σύνθεση του υλικού, μπορεί να προκαλέσει θερμική νέκρωση των οστών, καταστροφή της αγγείωσης και σχηματισμό ινώδους μεμβράνης μεταξύ της οστικής επιφάνειας και του τσιμέντου [127].

### **Δ4. Βιοενεργός ύαλος**

Αποτελούμενο από γυαλί με ενεργό πυριτικό άλας, το εμφύτευμα αυτό παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη αντοχή σε σύγκριση με το φωσφορικό ασβέστιο. Είναι ικανό να σχηματίζει έναν ισχυρό δεσμό ανάμεσα στο γυαλί και το οστό υποδοχής μέσω κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, φαινόμενο που ονομάζεται βιοδραστικότητα. Η απορρόφηση της βιοδραστικής

υάλου ποικίλει, βασισμένη στις σχετικές ποσότητες των συστατικών όπως του οξειδίου του νατρίου, του οξειδίου του ασβεστίου, του διοξειδίου του πυριτίου και του φωσφόρου [130].

## **12. Αυξητικοί παράγοντες**

Οι αυξητικοί παράγοντες συνιστούν εξειδικευμένα για κάθε ιστό πολυπεπτίδια μοριακού βάρους 6–45 kD που εμπλέκονται σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μορφογένεση ιστών και οργάνων κατά την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη και την ενηλικίωση [134].

Η δράση τους επιτυγχάνεται με τη σύνδεσή τους σε κυτταρικούς μεμβρανικούς υποδοχείς όπου μέσω ενδοκυττάρων κινασών ενεργοποιείται μεταγραφή και τελικά μετάφραση συγκεκριμένων γονιδίων – στόχων με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή δεδομένων πρωτεϊνών με εξειδικευμένη λειτουργία.

Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί σύνθεσης και απορρόφησης του οστού που ελέγχουν τη δράση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών επιτυγχάνεται με τη δράση ορμονών (αυξητική ορμόνη, παραθορμόνη, καλσιτονίνη, ινσουλίνη, θυροξίνη, οιστρογόνα, τεστοστερόνη - ενδοκρινής δράση ) όσο και τοπικών αυξητικών παραγόντων (αυτοκρινής, παρακρινής δράση) [135].

Η ρύθμιση με την δράση των αυξητικών παραγόντων επιτυγχάνεται τόσο στα πλαίσια φυσιολογικών διεργασιών – οστική αναδιαμόρφωση, σκελετική ανάπτυξη - όπως, επίσης, και κατά την παρουσία παθολογικών καταστάσεων, όπως η οστεοπόρωση, η οστική επούλωση κ.ά..

Μεταξύ του συνόλου των αυξητικών παραγόντων, μόρια συμπεριλαμβανομένων των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β), του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα I και II (IGF-I και IGF-II), του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), του όξινου και βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (aFGF και bFGF), του πλάσματος και ινικής πλούσιου σε

αιμοπετάλια (PRP και PRF αντίστοιχα) έχουν λιγότερο ή περισσότερο συσχετισθεί με την οστική αναγέννηση [136].

Ακολουθεί συνοπτική περιγραφή των πλέον σημαντικών αυξητικών παραγόντων στις διεργασίες οστικής ανάπλασης.

#### **A. Μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMPs)**

Οι BMPs, ειδικά η BMP-2 και η BMP-7 αποτελούν μέλη της υπερικογενείας του TGF- $\beta$  με ανώτερες οστεοεπαγωγικές ιδιότητες και είναι πιθανώς οι διεξοδικότερα διερευνημένοι αυξητικοί παράγοντες για τη θεραπεία σκελετικών ελλειμμάτων [137]. Η BMP-2 διαθέτει ικανότητα οστεοβλαστικής διαφοροποίησης από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και η BMP-7 προάγει άμεσα την αγγειογένεση. Η μεγαλύτερη δοκιμή στη χρήση της BMP-2 στην θεραπεία του ανοιχτού κνημιαίου κατάγματος, η οποία περιελάμβανε πολλαπλά κλινικά κέντρα κατέδειξε την αποτελεσματικότητα της σε ικανοποιητικό επίπεδο [138]. Οι εν λόγω μορφογενετικές πρωτεΐνες έχουν πλέον έγκριση για χρήση σε οστικά ελλείμματα αλλά συνήθως συνδυάζονται με έναν οστεοκαθοδηγητικό μεταφορέα όπως κολλαγόνο ή κάποιο άλλο μοσχευματικό υλικό. Είναι πάντως σημαντικό το γεγονός ότι οι BMPs είναι ιδιαίτερα διαλυτές πρωτεΐνες και έχουν την τάση να διαχέονται από τις θέσεις εμφύτευσής τους, οδηγώντας σε επιπλοκές. Η διάχυση των πρωτεϊνών αμβλύνει την τοπική τους συγκέντρωση και φυσικά την αποτελεσματικότητά τους [139]. Επιπλέον, οι BMPs μπορούν να επηρεάσουν διάφορους τύπους κυττάρων και οργάνων, οι οποίοι στη συνέχεια προκαλούν ετεροτοπικό σχηματισμό οστού με ανάγκη σε ορισμένες περιπτώσεις επιπλέον χειρουργικής εκτομής [140]. Σε άλλες περιπτώσεις η χρήση της BMP-2 είναι πιθανό να επάγει φλεγμονώδη απόκριση και τελικά οστεόλυση [141]. Τέλος, ο



λόγος αποτελεσματικότητας κόστους είναι ένα άλλο σημαντικό ζήτημα κατά τη χρήση των BMPs.

## **B. Αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs)**

Υπάρχουν 22 μέλη στην οικογένεια των FGFs και 4 υποδοχείς (FGFRs) που αναγνωρίζονται σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα, συμβάλλοντας από τα πρώιμα στάδια και καθόλη τη διάρκεια της επουλωτικής διαδικασίας [53].

Οι FGFs έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αγγειογένεση, αλλά έχουν επίσης και ισχυρά μιτογόνα αποτελέσματα στα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα [53][142], [143]. Μεταξύ όλων αυτών των FGFs και FGFRs, οι FGF1, FGF2 και FGFR1, FGFR-3 βρέθηκαν στενά σχετιζόμενα με την αναγέννηση των οστών από πολυάριθμες μελέτες, στις οποίες οι FGFR1 και FGFR2 έχουν ισχυρή έκφραση σε οστεοπρογονικά κύτταρα και οστεοβλάστες ενώ ο FGFR3 σχετίζεται περισσότερο με τη χονδρογένεση [144], [145].

Η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία οστικών ελλειμμάτων διερευνήθηκε από πολυάριθμες *in vivo* μελέτες σε ζώα καταλήγοντας ότι συμμετέχουν στην προαγωγή επούλωσης καταγμάτων, ενώ το κλινικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τη δόση και το χρόνο [146], [147].

## **Γ. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)**

Η παρουσία αγγείων στην περιοχή του κατάγματος έχει αναγνωριστεί ως μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την αναγέννηση των οστών και ο VEGF είναι

πρωταγωνιστικό μόριο στον έλεγχο της αγγειογένεσης και οστεογένεσης [57],[59]. Στη διαδικασία επούλωσης κατεαγότεων οστών, ο VEGF απελευθερώνεται αρχικά από το αιμάτωμα και προάγει την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων στο περιβάλλον της υποξίας [148]. Πολλές μελέτες σε ζώα έδειξαν την αποτελεσματικότητα της χρήσης VEGF για την προαγωγή της επούλωσης των οστικών καταγμάτων, υποστηρίζοντας τη σημασία της συνεργασίας της αγγειογένεσης και των οστεοεπαγωγικών παραγόντων στην οστική αναγέννηση [149], [150]. Παρότι ο ακρογωνιαίος ρόλος του VEGF στην αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της επούλωσης καταγμάτων έχει επιβεβαιωθεί, ο VEGF είναι στην πραγματικότητα πολύ ασταθής και βραχύβιος in vivo. Επιπλέον, επειδή έχει παρατηρηθεί πιθανότητα εμφάνισης αιμαγγειωμάτων ή όγκων που διεγείρονται από τον VEGF, ειδικά για ασθενείς μετά από ακτινοθεραπεία ή εκτομή όγκου, η εφαρμογή του VEGF σε κλινικές δοκιμές είναι αυστηρά περιορισμένη με ιδιαίτερη προσοχή στην ακριβή δοσολογία [151].

#### **Δ. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP)**

Η έρευνα για το PRP στην αναγέννηση των οστών αντιπροσωπεύει προσπάθειες να αξιοποιηθεί η ισχύς του καταρράκτη των αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται από τη συσσώρευση και την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων στο αιμάτωμα του κατάγματος [152]. Το PRP παράγεται κυρίως με απομόνωση και συμπύκνωση αιμοπεταλίων από περιφερικό αίμα με την χρήση εμπορικά διαθέσιμων kit. Το κλάσμα πλάσματος του αυτόλογου αίματος έχει αυξημένη συγκέντρωση αιμοπεταλίων τα οποία είναι πλούσια σε διάφορους βασικούς μιτογόνους και χημειοτακτικούς αυξητικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν τον PDGF, τον IGF, τους FGFs, τον TGF-β και τον VEGF [153], [154]. Ωστόσο, όταν διερευνάται η επίδραση του

PRP στην επούλωση των οστών στον άνθρωπο τα κλινικά αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και δεν υπάρχουν ισχυρά υποστηρικτικά στοιχεία. Στον περιορισμένο αριθμό κλινικών δοκιμών στον άνθρωπο που περιελάμβαναν τη χρήση PRP για τη θεραπεία ορθοπεδικών ελλειμμάτων, επιδείχθηκε ταχύτερη επούλωση των οστών, ωστόσο η αποτελεσματικότητά του ήταν κατώτερη από τις BMPs. Εξακολουθούν να υπάρχουν ανεπαρκή στοιχεία για να τεκμηριωθεί η συνήθης χρήση του σε ορθοπεδικά τραύματα και απαιτούνται καλά σχεδιασμένες τυχαιοποιημένες δοκιμές ελέγχου [155]. Εν τω μεταξύ, πρέπει να παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με το άτομο του οποίου το αίμα συλλέγεται και συνεπώς η τυποποιημένη συγκέντρωση και η βιολογική ποσοτικοποίηση του PRP στην αντιμετώπιση της επούλωσης των οστών απαιτούν περαιτέρω μελέτες [156].

#### **E. Ινική πλούσια σε αιμοπετάλια (PRF)**

Το PRF είναι μια μήτρα που περιέχει όλα τα μοριακά και κυτταρικά στοιχεία που επιτρέπουν τη βέλτιστη επούλωση [157]. Είναι φυσιολογικό συμπύκνωμα που λαμβάνεται χωρίς καμία προσθήκη ή χειρισμό και περιέχει κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσοποιητικού και αντιγονικά μόρια, αποτελώντας τελείως ειδικό για τον δότη δίχως δυνατότητα εφαρμογής ως αλλομόσχευμα [158]. Το πλούσιο σε αιμοπετάλια ινώδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απορροφήσιμη μεμβράνη για την αναγεννητική καθοδήγηση των ιστών, αποτρέποντας τη μετανάστευση μη ευνοϊκών κυττάρων (επιθηλιακά κύτταρα) στο οστικό έλλειμμα, παρέχοντας χώρο για εισροή οστεοπρογονικών και αγγειογενετικών κυττάρων [159]. Αυτές οι ιδιότητες αποδίδονται στις κυτοκίνες και τους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της παραγωγής του PRF. Κατά τη φυγοκέντρωση, ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια και

η μαζική αποκοκκίωσή τους προκαλεί σημαντική απελευθέρωση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων όπως IL-1, IL-4, TNF- $\alpha$ , PDGF- $\alpha$  και  $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, IGF-1 και VEGF στις υψηλότερες δυνατές ποσότητες [160], [161]. Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες ενισχύουν την επούλωση των μαλακών και των σκληρών ιστών διεγείροντας την παραγωγή κολλαγόνου, αυξάνοντας την ισχύ του τραύματος και τον σχηματισμό τύλου. Το PRF αποτελείται από μια μήτρα ινώδους που πολυμερίζεται σε τετραμοριακή δομή με ενσωματωμένα αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα και κυτοκίνες όσο και κυκλοφορούντα βλαστικά κύτταρα. Σύμφωνα με μελετητές ενώ το PRP εμφανίζει αποτελεσματικότητα μόνο στα πρώιμα στάδια της επουλωτικής διεργασίας, το PRF παρουσιάζει βαθμιαία απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων οδηγώντας σε πιο ισχυρό τελικό κλινικό αποτέλεσμα [162]–[164].

### **13. Παράγοντες που επηρεάζουν την οστική ανάπλαση με τη χρήση μοσχευματικών υλικών**

Η επιτυχής οστική ανάπλαση είναι συνάρτηση ποικίλων παραμέτρων που συνοπτικά σχετίζονται με τα ακόλουθα στοιχεία: **1. Ιδιότητες του μοσχευματικού υλικού, 2. Συνθήκες που επικρατούν τοπικά στην περιοχή του οστού όπου γίνεται η τοποθέτηση του εμφυτευματικού υλικού, και 3. Γενικότερους παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο ή μικρό βαθμό την επιτυχή οστική ανάπλαση.**

Αναφορικά με τα οστικά μοσχεύματα, αυτά θα πρέπει να διαθέτουν όσο το δυνατόν περισσότερες από τις εξής θεμελιώδεις ιδιότητες:

Να έχουν οστεογενετικό, οστεοεπαγωγικό ή/και οστεοκαθοδηγητικό δυναμικό, όπως αυτά προσδιορίστηκαν σε προηγούμενη παράγραφο του παρόντος συγγράμματος [99].

Η αναλογία σπογγώδους και φλοιώδους οστού στα αυτομοσχεύματα όσο και στα αλλομοσχεύματα παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογική τους συμπεριφορά και μπορεί να συνοψιστεί στα ακόλουθα: 1. Τα σπογγώδη μοσχεύματα διεγείρουν την οστεογένεση, δεδομένης της παρουσίας οστεοβλαστών, οστεοκυττάρων και μεσεγχευματικών βλαστοκυττάρων εντός της δομής τους, 2. Η αρχική μηχανική σταθερότητα παρέχεται κυρίως από φλοιώδη μοσχεύματα τα οποία όμως ανεπαρκούν ως προς την οστεογενετική τους ικανότητα, παρουσιάζουν εκτεταμένη απορρόφηση, ενώ η παραγωγή νέου οστού είναι πολύ αργή, 3. Ο συνδυασμός φλοιώδους και σπογγώδους μοσχεύματος μπορεί να εξασφαλίσει σταθερότητα και οστεογένεση, 4. Υπάρχουν επίσης διαφορές στην τελική μηχανική αντοχή που εμφανίζεται αυξημένη στα σπογγώδη οστά λόγω της ταχύτερης απόθεσης νέου οστίτη ιστού, ενώ στα φλοιώδη μοσχεύματα η μηχανική αντοχή μειώνεται κατά 40% από τις πρώτες 6 εβδομάδες μέχρι 6 μήνες μετά την επέμβαση [165].

Τα φλοιώδη οστικά υποκατάστατα συνήθως εφαρμόζονται ως επένθετα μοσχεύματα, με σκοπό την επέκταση του περιγράμματος του οστού εκτός των ανατομικών ορίων του σκελετού. Γενικά, τα επένθετα μοσχεύματα εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό απορρόφησης δεδομένου ότι εκτίθενται λιγότερο στο αγγειακό δίκτυο της δέκτριας οστικής περιοχής και δέχονται δυνάμεις από τους περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς σε σύγκριση με τα ένθετα μοσχεύματα. Τα σπογγώδη μοσχεύματα που χρησιμοποιούνται συνήθως δεν έχουν ικανοποιητική αρχική μηχανική αντοχή αλλά παρουσιάζουν ευκολία χειρισμών κατά τη διάρκεια των χειρουργικών επεμβάσεων [109]. Τα αγγειούμενα οστικά μοσχεύματα φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστα σε περιπτώσεις προηγούμενης ακτινοθεραπείας του οστού και ανεπάρκειας μαλακών και / ή οστικών δομών. Μεταξύ των μειονεκτημάτων τους περιλαμβάνονται το υψηλό κόστος, η ανάγκη εξειδικευμένης κατάρτισης και εξοπλισμού, καθώς και η σχετικά αυξημένη νοσηρότητα της δότριας θέσης [166].

Τα οστικά μοσχεύματα παρουσιάζουν διαφορετική απορρόφηση κατά τη διάρκεια του χρόνου εξαρτώμενη της σύνθεσης του υλικού, του μεγέθους των σωματιδίων, της κρυσταλλικότητας, της παρουσίας πόρων και της επεξεργασίας κατά την παρασκευή τους. Ο ρυθμός απορρόφησης του υλικού θα πρέπει ιδανικά να είναι ανάλογος με το σχηματισμό του νέου οστού.

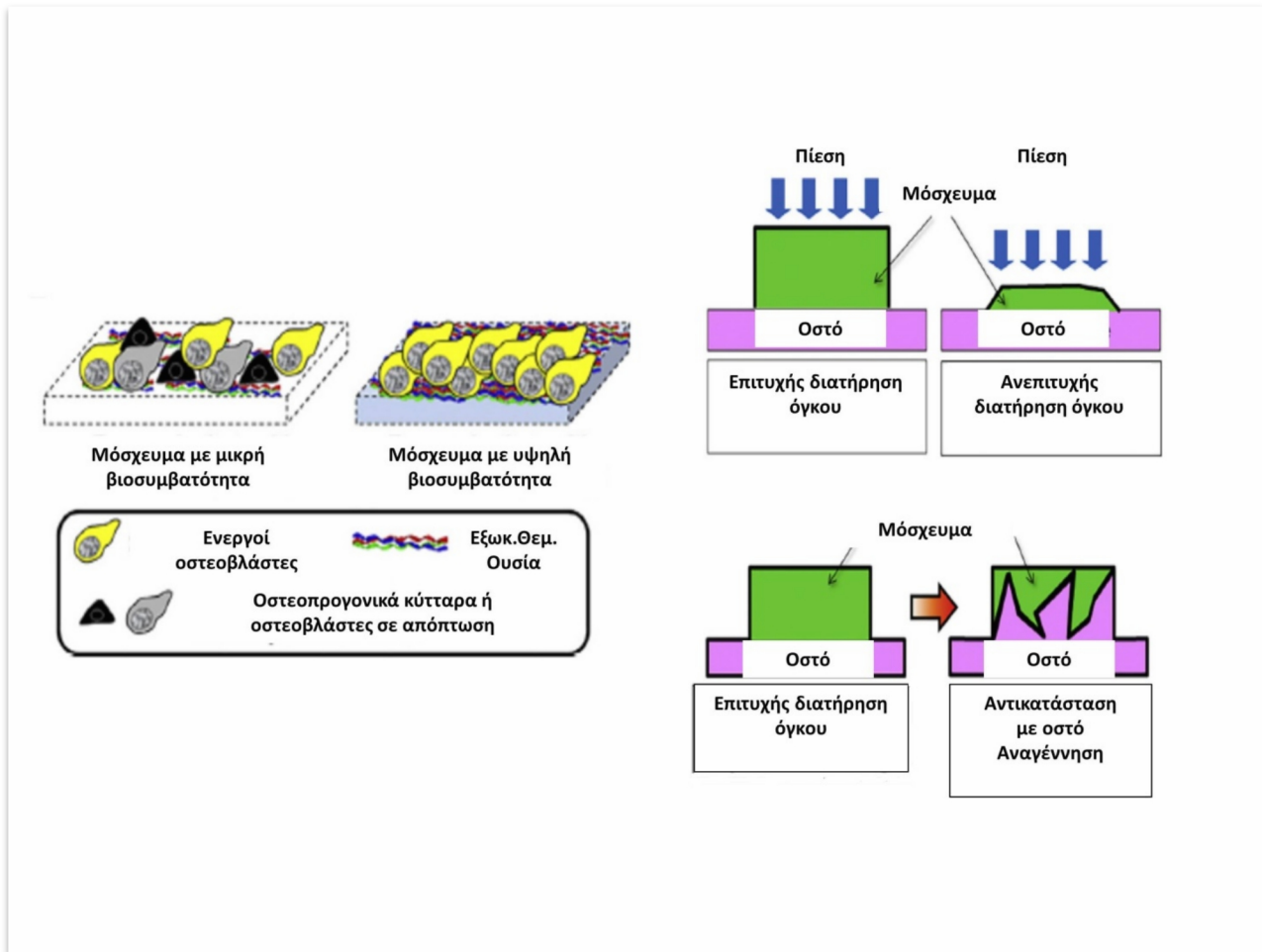
Η παρουσία πόρων στα μοσχευματικά υλικά θεωρείται απαραίτητη για το σχηματισμό οστού επειδή επιτρέπει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και των μεσεγχυματικών κυττάρων, την αγγειογένεση όσο και την ευνοϊκότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του βιοϋλικού και του οστού, παρέχοντας μεγαλύτερη μηχανική σταθερότητα σε αυτή την κρίσιμη διεπαφή [167]. Το ελάχιστο συνιστώμενο μέγεθος πόρου για ένα υποκατάστατο οστού προσδιορίζεται στα 100  $\mu\text{m}$ . Μικρότεροι πόροι (75-100  $\mu\text{m}$ ) έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη οστεοειδούς ιστού χωρίς μεταλλοποίηση ή διείδυση μόνο από ινώδη ιστό [168]. Ιδιαίτερα

ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι σχετικά μεγαλύτεροι πόροι ευνοούν την άμεση οστεογένεση, δεδομένου ότι επιτρέπουν αγγείωση και υψηλή οξυγόνωση, ενώ οι μικρότεροι πόροι οδηγούν σε ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Ωστόσο σύμφωνα με άλλες μελέτες τα 100 μm δεν θεωρούνται κρίσιμο μέγεθος σε συνθήκες όπου τα μοσχεύματα δεν φορτίζονται μηχανικά [169]. Οι πόροι μπορούν είτε να αλληλοσυνδέονται είτε να περιέχουν τυφλά άκρα. Γενικά, υλικά με διασυνδεδετικούς πόρους πλεονεκτούν καθότι επιτρέπουν την ανάπτυξη νέου οστού. Το γεγονός αυτό δεν είναι απρόσμενο αν αναλογισθούμε ότι το οστό είναι ένας μεταλλοποιημένος ιστός που βασίζεται σε ένα εσωτερικό αγγειακό δίκτυο για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου καθότι αυτά τα στοιχεία δεν μπορούν να διαχυθούν μέσα από τον οστίτη ιστό [170]. Υπάρχει μια γενική ομοφωνία ότι το ανεκτό όριο πορότητας κυμαίνεται στο 60%, κάτω από το οποίο η ανάπτυξη οστίτη ιστού στον πυρήνα του εμφυτευματικού υλικού δεν είναι εφικτή. Υψηλότερο ποσοστό πορότητας αναμένεται να ενισχύσει την οστεογένεση, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της μεγαλύτερης επιφάνειας που συμβάλλει στην υψηλότερη ανταλλαγή ιόντων και παραγόντων επαγωγής της οστικής ανάπλασης. Μεταξύ άλλων η πορότητα συμβάλλει στην βιοαποδόμηση του υλικού και τις μηχανικές του ιδιότητες. Φυσικά η διασύνδεση των πόρων και η πορότητα παύουν να αποτελούν τόσο κρίσιμους παράγοντες σε απορροφήσιμα υλικά έναντι μη απορροφήσιμων μοσχευμάτων. Ωστόσο παρότι το αυξημένο πορώδες και το μέγεθος των πόρων διευκολύνουν τα οστά, συμβάλλουν στη μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων, δεδομένου ότι αυτό υπονομεύει τη δομική ακεραιότητα του ικριώματος. Για παράδειγμα, αύξηση του ποσοστού πορότητας από 10 σε 20% οδηγεί σε μείωση της μηχανικής αντοχής 4 φορές. Εξάλλου, ικριώματα κατασκευασμένα από κεραμικά με υψηλή ταχύτητα αποικοδόμησης δεν θα πρέπει να έχουν υψηλή πορότητα (> 90%), δεδομένου ότι η ταχεία απορρόφηση του υλικού θέτει σε κίνδυνο τη μηχανική και δομική ακεραιότητα πριν από την αντικατάσταση από

νεοσχηματισμένο οστό [171]. Ο βαθμός στον οποίο το μέγεθος των πόρων μπορεί να αυξηθεί διατηρώντας τις μηχανικές απαιτήσεις εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της φύσης του υλικού και των συνθηκών επεξεργασίας κατά την κατασκευή του. Η επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων δεν μπορεί να προβλεφθεί ως προς την ανάπτυξη οστίτη ιστού. Φαίνεται πάντως ότι ο συνδυασμός του μεγέθους των πόρων, του ποσοστού πορότητας, της διασύνδεσης και του σχήματος των πόρων αλληλεπιδρούν, αποτελώντας συνισταμένες οι οποίες θεωρούνται το κλειδί για την ανάπτυξη του οστού [172].

Ιδανικά, τα χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά πρέπει να υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των προγονικών μεσεγγυματικών κυττάρων και να ευοδώνουν την εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όσο και τη μεταλλοποίηση της (οστεοκαθοδήγηση). Επιπρόσθετα το υλικό πρέπει να εμφανίζει ελάχιστες ανεπιθύμητες παρενέργειες – υψηλή βιοσυμβατότητα, να αποτρέπει την μείωση του όγκου του για το σχηματισμό οστού και να αντικαθίσταται πλήρως από νεόπλαστο οστό μέσω παθητικής διάλυσης των σωματιδίων του **(Εικόνα 10)**.





**Εικόνα 10:** Τα μοσχευματικά υλικά πρέπει να διαθέτουν υψηλή βιοσυμβατότητα, να διατηρούν ικανοποιητικά τον όγκο τους και να αντικαθίστανται βαθμιαία από νεόπλαστο οστό (τροποποιημένο από [173]).

Ένας σημαντικός παράγοντας που επιδρά στη μείωση του όγκου του μοσχευματικού υλικού σε μια οστική κοιλότητα είναι η πίεση που δέχεται από τον υπερκείμενο βλεννογόνο την οποία ιδανικά τα υλικά αυτά πρέπει να αντιπαρέρχονται μέσω ικανοποιητικής μηχανικής αντοχής [174]. Ποικίλα κύτταρα όπως μακροφάγα, οστεοβλάστες και ινοβλάστες παράγουν

κολλαγενάσες που διασπών το πλέγμα κολλαγόνου ενώ τα ιστικά υγρά συμμετέχουν στην αποδόμηση υλικών μέσω υδρόλυσης. Η ευαισθησία των υλικών σε ενζυματική ή χημική διάλυση όσο και η μηχανική αντοχή του υλικού επιδρά στην ικανότητα διατήρησης χώρου η οποία είναι σημαντική για την υποστήριξη της οστεοβλαστικής δραστηριότητας [175].

Αναφορικά με την βιοσυμβατότητα των υλικών αυτά ταξινομούνται ως εξής: 1. Βιοανεκτά, τα οποία παραμένουν στο σώμα περιχαρακωμένα από ινώδη κάψα, 2. Βιοαδρανή, που παρουσιάζουν άμεση επαφή με τον παρακείμενο οστίτη ιστό χωρίς οποιαδήποτε χημική αντίδραση και, 3. Βιοενεργά, τα οποία εγκαθιδρύουν χημικούς δεσμούς με το παρακείμενο οστό, επιτρέποντας την άμεση επαφή της μήτρας οστού με την επιφάνεια του εμφυτεύματος [176]. Στο πλαίσιο της συμβατότητας υπάρχει και η έννοια της κυτταρικής συμβατότητας η οποία σχετίζεται με την ικανότητα κυτταρικής βιωσιμότητας και λειτουργίας. Έτσι ενώ το πολυμεθακρυλικό μεθύλιο είναι βιοανεκτό, εμφανίζοντας ζώνη ινώδους κάψας και έντονη κυτταροτοξικότητα, το b-TCP χαρακτηρίζεται βιοενεργό, ωστόσο εμφανίζει μείωση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας σε κυτταροκαλλιέργειες [177], [178].

Τα μέγεθος των θραυσμάτων σωματιδίων που απαρτίζουν το μόσχευμα ενδέχεται επίσης να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, μικροσωματίδια με διάμετρο <10 μm προκαλούν φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε φαγοκύτταρα ενώ τα νανοσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα σε διάφορους τύπους κυττάρων ενεργοποιώντας το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες [179], [180].

Καθαρά υδατοδιαλυτά υλικά φωσφορικά ασβεστίου όπως b-TCP απελευθερώνουν ιόντα ασβεστίου στους τοπικούς ιστούς. Τα ιόντα ασβεστίου ελέγχουν την οστεοβλαστική βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση μέσω ενδοκυτταρικής

σηματοδότησης ασβεστίου μετά από εισροή στα κύτταρα από αντίστοιχους διαύλους αφού αυξάνοντας τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου μπορεί να προκληθεί οστεοβλαστική απόπτωση [181], [182]. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι η βιοαπορρόφηση συνδέεται θετικά με τον αρχικό σχηματισμό οστού *in vivo* και την προώθηση της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης οστεοπρογονικών κυττάρων *in vitro* [183]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από υποκατάστατα οστών συμβάλλει θετικά και αρνητικά στον σχηματισμό οστού ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους τοπικά στους ιστούς [184].

Η ακεραιότητα και η υψηλή κρυστάλλικότητα της δομής του απατίτη στα υποκατάστατα των οστών επηρεάζει επίσης την οστεοκλαστική δραστηριότητα όσο και την αντοχή τους στα οξέα.

Παράγοντες που αφορούν στην παραγωγική αλυσίδα των μοσχευματικών προϊόντων ενδέχεται να επιδράσουν στις ιδιότητες τους όσο και στην αλληλεπίδρασή τους με τον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα η επεξεργασία σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από περίπου 1200 ° C) αποσυνθέτει τον υδροξυαπατίτη και παράγει παραπροϊόντα ενώ σε μελέτες παρατηρείται μειωμένη ικανότητα παραγωγής οστεορηκτικών βοθρίων από τους οστεοκλάστες [185], [186]. Η εμφάνιση σε ισχυρό οξύ ή βάση ή θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται γενικά για την αποπρωτεΐωση ξενομοσχευμάτων καταστρέφουν τη διάταξη των ινιδίων του κολλαγόνου καθώς και τη διασταυρούμενη σύνδεσή τους [187]. Αντίθετα η αποπρωτεΐωση με ηπιότερα αντιδραστήρια διατηρεί σχετικά ανέπαφο το ικρίωμα κολλαγόνου. Τα αλλομοσχεύματα δεν υποβάλλονται σε πυροσυσσωμάτωση κατά τη διαδικασία παραγωγής, συνεπώς δεν υφίσταται μεταβολές στη σύνθεση του εγγενούς απατίτη. Ωστόσο, τέτοιου είδους αλλομοσχεύματα πρέπει να αποστειρώνονται κατά τη διάρκεια της παρασκευής για την

πρόληψη της μετάδοσης μικροβίων μέσω εμφύτευσης, παρά την αυστηρή εξέταση του δότη. Τυπικά, η λυοφιλοποίηση χρησιμοποιείται για εκτεταμένη απενεργοποίηση των μικροβίων, καθώς μπορεί να διατηρήσει τις βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες του επεξεργασμένου ιστού καλύτερα από τις τεχνικές αποστείρωσης όπως η αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η ακτινοβολία γάμμα και η επεξεργασία με αιθυλενοξειδίο. Ωστόσο, η λυοφιλοποίηση μεταβάλλει τις μηχανικές ιδιότητες του επεξεργασμένου ιστού οδηγώντας σε υψηλότερα ποσοστά απορρόφησης [188], [189].

Η επιτυχής ενσωμάτωση του μοσχευματικού υλικού είναι αποτέλεσμα παραγόντων όπως η επαρκής επαναγγείωση και η κατάλληλη διαμόρφωση της επιφάνειας των μοσχευμάτων για να επιτευχθεί σχετική επαφή με τη λήπτρια θέση, η ικανοποιητική σταθερότητα - ακινητοποίηση του μοσχεύματος στη λήπτρια θέση, όσο και η κάλυψη – προστασία με μαλακά μόρια. Το μόσχευμα δεν μπορεί να ασκήσει τη βιολογική του δράση απομονωμένο, εξαρτάται επιπρόσθετα από παράγοντες που αφορούν στον περιβάλλοντα χώρο, με την έννοια της απόκρισης άλλων κυττάρων όσο και με την έννοια της παρουσίας πλούσιου αγγειακού δικτύου. Οι μηχανικές φορτίσεις της περιοχής τοποθέτησης του μοσχεύματος είναι επίσης σημαντικό στοιχείο αφού τα οστικά μοσχεύματα υφίστανται, όπως προαναφέρθηκε, αναδιαμόρφωση ως απάντηση στο μηχανικό φορτίο. Έτσι, το περιβάλλον στο οποίο τοποθετείται το μόσχευμα, αποτελεί εξαιρετικά καθοριστικό παράγοντα για την τελική επιτυχία ή αποτυχία της ενσωμάτωσης του μοσχεύματος.

Συνοψίζοντας, τόσο το μόσχευμα, όσο και το μικροπεριβάλλον, έχουν το καθένα διαφορετική συνεισφορά στη διαδικασία της οστικής ανάπλασης, όπου η συνισταμένη των αλληλεπιδράσεών τους καθορίζει την επιτυχή ή μη ενσωμάτωση του μοσχεύματος.

Τέλος, πρόσθετοι παράγοντες ενδέχεται να επηρεάσουν την επιτυχία ενσωμάτωσης των μοσχευμάτων συμπεριλαμβανομένων: άσηπτη - ενδεδειγμένη και ποιοτικώς εκτελεσθείσα χειρουργική τεχνική, ικανοποιητική στοματική υγιεινή, κάπνισμα, επισταμένη μετεγχειρητική φροντίδα. Επίσης σημαντικό ρόλο ενδέχεται να παίζουν στοιχεία από το ιατρικό ιστορικό, όπως η προηγούμενη ακτινοβόληση της περιοχής, η χρήση φαρμάκων που ενδέχεται να προκαλέσουν οστεονέκρωση των γνάθων όσο και η γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς [127].

#### 14. Οστικά ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους

Ένα οστικό έλλειμμα που προκαλείται σε πειραματικές συνθήκες προκειμένου να μελετηθούν οι μηχανισμοί οστικής επούλωσης με τη χρήση υλικών αποκατάστασης θα πρέπει να έχει διαστάσεις τέτοιες ώστε να είναι ανέφικτη η αυθόρμητη επούλωση. Ως έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους ορίσθηκε από τους Schmitz και Hollinger το μικρότερο μέγεθος ενδοοστικού τραύματος σε ένα συγκεκριμένο οστό και είδος ζώου που δεν επουλώνεται αυθόρμητα κατά τη διάρκεια ζωής του ζώου ή ως το έλλειμμα εκείνο που δείχνει λιγότερο από 10% αναγεννητική ικανότητα κατά την διάρκεια ζωής του ζώου [190].

Αυτά τα ελλείμματα όταν αφεθούν να επουλωθούν πληρώνονται με ινώδη συνδετικό ιστό, αν και μπορεί να παρατηρηθεί περιορισμένη οστική αναγέννηση στην περιφέρειά τους. Σε οστικό επίπεδο στα ελλείμματα κρίσιμου μεγέθους έχει παρατηρηθεί ότι η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων από την περιφέρεια του τραύματος προκαλεί διαφοροποίηση των κυττάρων σε οστεοβλάστες [191]. Αυτά τα κύτταρα αναπτύσσουν και μεταλλοποιούν την εξωκυττάρια μήτρα, συμβάλλοντας ενεργά στην οστική ανάπτυξη. Αντίθετα, στο κέντρο των ελλειμμάτων οι παράγοντες αυτοί εντοπίζονται σε σχετικά μικρές ή και μηδενικές συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη συγκριτικά συχνότητα οστεοβλαστικής διαφοροποίησης. Ως συνέπεια αυτού, στην κεντρική περιοχή αναπτύσσεται σε μεγάλο βαθμό ινώδης συνδετικός ιστός [192].

Συνολικά ένα κρίσιμο έλλειμμα που χαρακτηρίζεται από αδυναμία πλήρους οστικής αναγέννησης καθορίζεται από μια πλειάδα παραγόντων όπως το μέγεθός του, το συγκεκριμένο φυλογενετικό είδος, την ανατομική θέση του ελλείμματος, τις εμβιομηχανικές συνθήκες και φόρτιση στο συγκεκριμένο οστό, την ηλικιακή, μεταβολική όσο και συστηματική κατάσταση

του οργανισμού. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται στην έρευνα αναφορικά με την οστική ανάπτυξη πρέπει να είναι ενήλικα λόγω του υψηλού δυναμικού οστικής αναγέννησης σε νεαρά άτομα του είδους ενώ το μέγεθος των ζώων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη αναφορικά με τον ικανότητα πρόκλησης δεδομένου αριθμού και μεγέθους ελλειμμάτων [193].

Αν και στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιείται ένα δι-φλοιώδες (πλήρους πάχους) έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους, τα μειονεκτήματα ιδιαίτερα όσον αφορά την διεκπεραίωσή του στα οστά του κρανίου περιλαμβάνουν την καταστροφή της σκληρής μήνιγγας, την παρεκτόπιση του μοσχεύματος και την ινώδη επούλωση σε αμφότερες τις πλευρές του ελλείμματος που εμποδίζουν την οστική αναγέννηση [194]. Από την άλλη μεριά, τα μονο-φλοιώδη ελείμματα στο κρανίο χοίρων ικανοποιούν τις απαιτήσεις για να χαρακτηρισθούν ως κρίσιμου μεγέθους και αντιπροσωπεύουν μια λιγότερο επιλεγμένη διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της οστικής αναγέννησης [195].

## 15. Ζωικά πρότυπα πειραματικής έρευνας – Χοίρος

Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την ενσωμάτωση των οστικών μοσχευματικών υλικών είναι εγγενώς πολύπλοκες, καθιστώντας δύσκολη την σύγκριση μελετών αναφορικά με τα ποσοστά επιτυχίας μεταξύ των διαθέσιμων βιοϋλικών. Συγχυτικοί παράγοντες μπορούν να περιλαμβάνουν μεταβλητές που αφορούν στον ασθενή (κάπνισμα, ηλικία, γενική υγεία), τον τύπο, την προέλευση, τις ιδιότητες και την επεξεργασία του μοσχεύματος και φυσικά την εφαρμοζόμενη χειρουργική τεχνική και εμπειρία του ιατρού [196].

Για τους λόγους αυτούς, τα ζωικά μοντέλα είναι απαραίτητα για την ασφαλή και αποτελεσματική αποκρυπτογράφηση του τρόπου με τον οποίο διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στη χειρουργική επιτυχία ή αποτυχία των υλικών. Κατάλληλα ζωικά μοντέλα βοηθούν στη σύγκριση υλικών μεταξύ διαφορετικών μελετών και εργαστηρίων. Επιπλέον, τα *in vivo* μοντέλα παρέχουν μεγαλύτερη κατανόηση της κυτταρικής δραστηριότητας και απόκρισης των ιστών στα εμφυτευμένα βιοϋλικά. Το μικροπεριβάλλον σε μια χειρουργική περιοχή αποτελείται από ένα πλήθος διαφορετικών ειδών κυττάρων με μια ποικιλία φυσικών και χημικών διεργασιών σηματοδότησης ενώ οι δοκιμασίες *in vitro* περιορίζονται συχνά σε έναν ή σε λίγους τύπους κυττάρων. Προκειμένου να διασφαλισθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια ενός οστικού υποκατάστατου θα πρέπει να δοκιμάζεται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* πριν την εφαρμογή του στους ανθρώπους. Η καθιέρωση ενός κατάλληλου ζωικού μοντέλου αποτελεί απαραίτητο βήμα κατά την αξιολόγηση των ιδιοτήτων όσο και της βιοσυμβατότητας των βιοϋλικών αυτών. Ένας ικανός αριθμός πειραματικών μοντέλων πειραματόζωων όπως αρουραίος / ποντίκι, κουνέλι, σκύλος, πρόβατο, κασίκα και χοίρος έχουν αναπτυχθεί στην πορεία του χρόνου, παρουσιάζοντας άλλοτε άλλου βαθμού ομοιότητες σε σύγκριση με τον άνθρωπο [196]. Μεταξύ των κριτηρίων επιλογής περιλαμβάνονται στοιχεία όπως το κόστος



απόκτησης και φροντίδας, η διαθεσιμότητα των ζώων, η κοινωνική αποδοχή για τη χρήση τους ως πειραματόζωα, η ανεκτικότητα τους σε αιχμαλωσία όσο και η ευκολία στέγασης. Σύμφωνα με διεθνή πρότυπα, πρέπει επίσης να λάβουμε υπόψη το μέγεθος των δειγμάτων δοκιμής, τον αριθμό των εμφυτευμάτων ανά ζώο, την προβλεπόμενη διάρκεια της δοκιμής και τις διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά τις βιολογικές απαντήσεις [197].

Είναι γεγονός ότι κανένα ζωικό είδος δεν εκπληρώνει πλήρως όλες τις απαιτήσεις ενός ιδανικού πειραματικού πρωτοτύπου, προσεγγίζοντας σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό τη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού.

Οι **αρουραίοι και τα ποντίκια** χρησιμοποιούνται λόγω του χαμηλότερου κόστους και του σχετικά γρήγορου μεταβολισμού που συνεπάγεται μείωση του χρόνου εφαρμογής του πειράματος [198]. Το κρανίο αρουραίου είναι μια δημοφιλής επιλογή ορθοτοπικού οστικού ελλείμματος για τη δοκιμή βιοϋλικών σε εφαρμογές γναθοπροσωπικής χειρουργικής [199]. Το έλλειμμα στο μηριαίο οστό αρουραίου είναι ένα άλλο καθιερωμένο μοντέλο στην ορθοπεδική έρευνα, το οποίο αναπαράγει μερικές από τις συνθήκες θεραπείας σε ανθρώπινα οστικά ελλείμματα [200]. Αυτά τα μοντέλα έχουν μια αναπαραγώγιμη, καθορισμένη γεωμετρία που καθιστά ευκολότερη την ανάλυση με ιστολογία και μCT. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος των ελλειμμάτων ποντικού και αρουραίου μπορεί να αποτελέσει πρόκληση για την μελέτη των βιοϋλικών. Επιπλέον, τα μοντέλα τρωκτικών είναι λιγότερο σημαντικά καθώς ένα προϊόν κατευθύνεται προς κλινική χρήση. Τα οστικά ελλείμματα στα μοντέλα των τρωκτικών είναι πολύ μικρά για να θεωρηθούν ανάλογα σε κλινικό μέγεθος με εκείνα του ανθρώπου, τα οποία έχουν συχνά πάχος 6-10mm ενώ οι ρυθμοί κυτταρικοί ανάπτυξης δεν ταιριάζουν με εκείνους που παρατηρούνται σε ανθρώπινα οστικά κενά [201].

Τα μοντέλα **κουνελίων** χρησιμοποιούνται σε πάνω από το ένα τρίτο των μελετών με ζώα λόγω του μεγέθους, της ευκολίας χειρισμού και της γρήγορης ωρίμανσης. Τα οστά των κουνελιών διαφέρουν τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς το σχήμα τους σε σύγκριση με τα ανθρώπινα οστά και οι μηχανικές φορτίσεις που δέχονται είναι ανόμοιες λόγω της τετράποδης στάσης και του υψηλού βαθμού κάμψεως του γόνατος [198]. Όπως τα μοντέλα των τρωκτικών, τα οστά κουνελιού εμφανίζουν ταχύτερη αναδιαμόρφωση έναντι των ανθρώπων, καθιστώντας δύσκολη την μεταφορά των δεδομένων στο ανθρώπινο μοντέλο [196]. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία προκλητών οστικών κοιλοτήτων στο μηρό και την κνήμη των κουνελιών συχνά για την εξέταση και τη δοκιμή βιοϋλικών πριν από πειράματα σε μεγαλύτερα προκλινικά μοντέλα ζώων. Για τα βιοϋλικά που προορίζονται για κρανιοπροσωπική αποκατάσταση, έχει προταθεί η μετάβαση από μοντέλα αρουραίων σε κουνέλια πριν από τη χρήση σε σκύλους και πρότυπα γνάθων άλλων πρωτευόντων [202].

Τα μοντέλα **σκύλων** χρησιμοποιούνται συχνά σε πειράματα οστικών μοσχευμάτων λόγω του κατάλληλου μεγέθους και ομοιότητας στη δομή των οστών με τον άνθρωπο. Ωστόσο, η χρήση τους είναι περιορισμένη εξαιτίας ηθικών παραμέτρων που σχετίζονται με τη χρήση του είδους και την μη αποδοχή από τον γενικό πληθυσμό. Το μέγεθος και το σχήμα του οστού μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και τη φυλή του ζώου, αλλά υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο χειρουργικά εργαλεία ειδικά για τα σκυλιά που καθιστούν τη δημιουργία οστικών κενών και την τοποθέτηση των μοσχευμάτων εύκολη διαδικασία. Παρόμοια με τα κουνέλια, η τετράποδη στάση του σκύλου μπορεί να επηρεάσει την τοποθέτηση μοσχεύματος και την επούλωση σε σύγκριση με τους ανθρώπους. Όσον αφορά τη δομή των οστών, τα οστά σκύλου έχουν υψηλότερη οστική πυκνότητα από το ανθρώπινο οστό και μπορούν να αντέξουν σε υψηλότερη θλιπτική καταπόνηση [198].

Τα σκελετικά ώριμα **αιγοπρόβατα** έχουν παρόμοιες διαστάσεις μάζας σώματος και μακρών οστών με ενήλικες ανθρώπους, καθιστώντας τα ιδιαίτερα χρήσιμα στην ορθοπεδική. Η σύνθεση και ο ρυθμός ανακύκλωσης του οστού είναι παρόμοια μεταξύ των οστών ανθρώπου και προβάτου. Ωστόσο, το ώριμο οστό προβάτου έχει υψηλότερη πυκνότητα δοκίδων και αντοχή οστού από εκείνη των ενήλικων ανθρώπων. Πρότυπα προβάτων επιλέγονται συχνά σε έρευνες μοσχευματικών υλικών λόγω παρόμοιων ποσοστών κυτταρικής σύστασης και οστικής ανάπτυξης με τους ανθρώπους. Επιπρόσθετα, τα πρότυπα προβάτων μπορεί να είναι πιο επιθυμητά από τα μοντέλα σκύλων λόγω των ηθικών θεωρήσεων σχετικά με τα ζώα συντροφιάς [203].

Τα μοντέλα **χοίρων** χρησιμοποιούνται σε ποικίλα πειράματα αναγέννησης οστού. Ωστόσο, το μεγάλο μέγεθος των εμπορικών χοίρων συχνά αποκλείει τη χρήση τους. Η ανάπτυξη μίνι χοίρων παρότι σχετικά πιο μικρών σε μέγεθος εξακολουθούν να παρουσιάζουν δυσκολίες στον χειρισμό ενώ έχουν αυξημένο κόστος. Η γνώθος του χοίρου προσομοιάζει περισσότερο με την ανθρώπινη γνώθο ως προς τη γενική ανατομία και φυσιολογία, σε σχέση με οποιοδήποτε από τα είδη που συζητήθηκαν προηγουμένως [201]. Η ανατολή των δοντιών και το μέγεθος της οδοντοστοιχίας του μίνι χοίρου είναι συγκρίσιμα με αυτά των ανθρώπων και οι χοίροι αυτοί εμφανίζουν περιοδοντική νόσο (ουλίτιδα) με εξέλιξη που προσεγγίζει την κατάσταση της νόσου στον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, έχει τεκμηριωθεί η ανάπτυξη ελλειμμάτων κρίσιμου μεγέθους σε γνώθους χοίρων, καθιστώντας το εν λόγω οστό αποδεκτό μοντέλο για την γναθοπροσωπική έρευνα [204]. Ο χοίρος ως ζωικό μοντέλο εμφανίζει ρυθμό σχηματισμού νέου οστού 1,2-1,5 μm / ημέρα, παρόμοιο με το ρυθμό σχηματισμού στον άνθρωπο [205]. Άλλα χαρακτηριστικά που ευνοούν τον χοίρο ως ένα κατάλληλο είδος επιλογής για τη δοκιμή οστικών μοσχευμάτων είναι η ομοιότητα με τον ανθρώπινο οργανισμό όσον αφορά ανατομικά και μορφολογικά

χαρακτηριστικά, η αναδιαμόρφωση των οστών, η περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα συστατικά, με λίγα μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων, σχετικά μεγάλο τελικό σωματικό βάρος, δυσκολία χειρισμού, θορυβώδη και επιθετική διάθεση (**Πίνακας 2**).

	Σκύλος	ΑιγοΠρόβατο	Χοίρος	Κουνέλι
Μακροδομή	++	+++	++	+
Μικροδομή	++	+	++	+
Συστατικά οστού	+++	++	+++	++
Αναδιαμόρφωση	++	++	+++	+

**Πίνακας 2:** Σύγκριση των ιδιοτήτων του οστίτη ιστού διαφόρων πειραματόζωων έναντι του ανθρώπου (+ μικρή ομοιότητα, ++ μέτρια ομοιότητα, +++ έντονη ομοιότητα).

## 16. Τεχνικές αξιολόγησης των αποτελεσμάτων σε μελέτες με οστικά μοσχεύματα

Μετά την επιλογή ενός ικανοποιητικού ζωικού μοντέλου, είναι εξίσου σημαντικό να χρησιμοποιηθούν μία ή περισσότερες κατάλληλες τεχνικές αξιολόγησης των δεδομένων του πειράματος. Υπάρχει μια ποικιλία μεθόδων που εφαρμόζονται στο ερευνητικό πεδίο των οστικών μοσχευματικών υλικών για την διερεύνηση της ανάπτυξης νέου οστίτη ιστού όσο και της αποικοδόμησης του χρησιμοποιηθέντος ικριώματος βιοϋλικών. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν την ακτινογραφία, την υπολογιστική τομογραφία (CT), την μικρο CT (μCT), την ιστολογία και την ιστομορφομετρία. Η χρήση μίας ή περισσότερων από αυτές τις μεθόδους, σε ποιοτικό και ποσοτικό επίπεδο, συμβάλει στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μιας μελέτης.

Η **ακτινογραφία** συνιστά μια μη επεμβατική τεχνική που χρησιμοποιεί ακτίνες X με τις οποίες λαμβάνονται απεικονίσεις για την παρακολούθηση της οστικής επούλωσης κατά τη διάρκεια μιας μελέτης. Ωστόσο, οι εν λόγω λήψεις αποτελούν δυσδιάστατες απεικονίσεις τρισδιάστατων δομών, στερούμενες σημαντικών πληροφοριών αναφορικά με τη δομή των ιστών. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση εφαρμογής κεραμικών μοσχευμάτων, είναι αδύνατον να προσδιοριστεί ο σχηματισμός νέου οστού λόγω της δεδομένης σύστασής τους η οποία επισκιάζει την οστική ανάπτυξη στην ακτινογραφία [206].

Η **CT** όσο και η **μCT** είναι επίσης μη επεμβατικές τεχνικές ανάλυσης που επιτρέπουν ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των βιοϋλικών και της *in vivo* οστικής απόκρισης. Η CT χρησιμοποιείται για την τρισδιάστατη αξιολόγηση ανατομικών δομών, κάτι που δεν είναι εφικτό με συμβατικές ακτινογραφικές τεχνικές. Στην έρευνα με πειραματόζωα, η ανάλυση CT εφαρμόζεται για να απεικονίσει με ακρίβεια το μέγεθος και την ποιότητα των δημιουργηθέντων οστικών ελλειμμάτων [207]. Μάλιστα, με την ανάπτυξη μCT η συμβατική ανάλυση CT δεν είναι

πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος καθότι η πρώτη έχει πολύ μεγαλύτερη ανάλυση και μπορεί να δώσει μια πλήρη τρισδιάστατη απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του οστού με διακριτική ικανότητα σε επίπεδο οστικών δοκίδων [208]. Πλέον, η μCT είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην αξιολόγηση της τρισδιάστατης ανάπτυξης νέου οστού και στην ανάλυση χωρικά και χρονικά αλλαγών στην ποσότητα και την ποιότητα των οστών. Μεταξύ των συχνότερα μετρούμενων παραμέτρων με μCT είναι ο όγκος οστεοποιημένου ιστού εντός μίας περιοχής ενδιαφέροντος, που αναφέρεται ως όγκος οστού / σύνολο όγκου (BV / TV). Ενώ η μCT παρέχει πληροφορίες για την ποσότητα του οστού, παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα των μεταλλοποιημένων ιστών. Ωστόσο, ένας από τους περιορισμούς της μCT ανάλυσης είναι η δυσκολία διαχωρισμού υπολειμματικών ικριωμάτων ή ανόργανων φάσεων μοσχευματικών υλικών έναντι πρόσφατα οστεοποιημένου ιστού [209]. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάποια από τα χρησιμοποιούμενα ως εμφυτεύματα βιοενεργά γυαλιά ή κεραμικά εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη ως προς την πυκνότητα μεταλλικών στοιχείων με τον οστίτη ιστό.

Η **ιστολογική** ανάλυση περιλαμβάνει δυσδιάστατες απεικονίσεις που λαμβάνονται μετά από κατάλληλη προπαρασκευή τμημάτων ιστού και την χρήση κατάλληλων χρωστικών, οι οποίες επιτρέπουν την απεικόνιση διάφορων κυτταρικών πληθυσμών, του ώριμου – ανώριμου οστίτη ιστού, του ινώδους ιστού, του μυελού και των μαλθακών μορίων. Οι συνήθως χρησιμοποιούμενες χρωστικές περιλαμβάνουν αιματοξυλίνη-ηωσίνη, τρίχρωμη Masson, Movat, Alcian blue κ.ά.. Κάθε χρώση παρέχει διαφορετικές οπτικές δυνατότητες στον εξετάζοντα σχετικά με την αξιολόγηση του οστίτη ιστού και την ταυτοποίηση δεδομένων κυτταρικών πληθυσμών. Όταν υποβληθεί σε χρώση δεδομένο ιστοτεμάχιο, ο ερευνητής μπορεί να διακρίνει οστεοποιημένο από μαλακό ιστό και υπολειμματικό βιολογικό υλικό. Η χρώση μπορεί επίσης να εντοπίζει τη φλεγμονώδη απόκριση (και πληθυσμούς κυττάρων), εναπόθεση οστού,

αποικοδόμηση βιοϋλικών, απορρόφηση από μακροφάγα και οστεοκλάστες και σχηματισμό εξωκυττάριας μήτρας [210].

Η **ιστομορφομετρία** είναι η ποσοτικοποίηση των ιστολογικών εικόνων σε σχέση με την παραγωγή οστού, μαλθακών μορίων και του υπολειμματικού εμφυτευματικού υλικού εντός συγκεκριμένης περιοχής ενδιαφέροντος, προσδιορίζοντας και μετρώντας αυτές τις φάσεις. Η χρήση τυποποιημένων διαδικασιών ιστομορφομετρίας ελαχιστοποιεί υποκειμενικά σφάλματα που μπορεί να εισαχθούν με την ποιοτική αξιολόγηση ιστολογικών τμημάτων και μπορεί να συμβάλει στην αντικειμενική αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων μέσω αυτοματοποιημένων πλέον αναλύσεων των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η ιστομορφομετρία επιτρέπει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ της ίδιας όσο και διαφορετικών μελετών. Θεωρείται πολύτιμο και καθιερωμένο κλινικό και ερευνητικό εργαλείο για τη μελέτη της παθογένειας μεταβολικών όσο και άλλων γενετικών ασθενειών των οστών, τον καθορισμό μηχανισμών με τους οποίους τα φάρμακα επηρεάζουν την δομή τους όσο και για την αξιολόγηση της οστικής ανάπλασης όπως στην περίπτωση των οστικών μοσχευμάτων [211].

Μέσω της μεθόδου αυτής είναι εφικτό να μελετηθούν μια ευρεία ποικιλία παραμέτρων που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: εκείνες που σχετίζονται με τη δομή του οστού και εκείνες που αξιολογούν την οστική αναδιαμόρφωση, με τις τελευταίες να υποδιαιρούνται περαιτέρω σε στατικές και δυναμικές.

Οι δομικές παράμετροι παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την οστική μάζα, τη δομή, και την τρισδιάστατη γεωμετρία του οστού μέσω μετρήσεων της ολικής επιφάνειας και της ολικής περιμέτρου του οστού. Η αξιολόγηση της οστικής δομής είναι σημαντική λόγω της σχέσης της με την αντοχή του οστού [212].

Οι στατικές παράμετροι παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα του μη μεταλλοποιημένου οστού (οστεοειδούς) και την έκταση των οστικών κοιλοτήτων απορρόφησης (κενά του Howships).

Τέλος, οι δυναμικές παράμετροι παρέχουν πληροφορίες για το ρυθμό οστικής σύνθεσης και μπορούν να ληφθούν μόνο όταν τα οστά έχουν σημανθεί με τετρακυκλίνη πριν από τη λήψη του ιστοτεμαχίου [213].

Χρησιμοποιώντας μερικές ή όλες από τις προαναφερθείσες τεχνικές ανάλυσης, οι ερευνητές μπορούν να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων. Αυτές οι μέθοδοι έχουν τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές για την εφαρμογή τους από τη βιβλιογραφία, που συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση των διαφορών στις μελέτες που προκύπτουν από σφάλματα αναφορικά με την τεχνική συλλογής οστού, την ικανότητα των ερευνητών, τις τεχνικές επεξεργασίας και άλλους παράγοντες.



## 17. Επίλογος γενικού μέρους

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχει πραγματοποιηθεί εκτεταμένη έρευνα στον τομέα των οστικών αναγεννητικών υλικών για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους, όπως μηχανική αντοχή, μοριακή σύνθεση, βιοσυμβατότητα και ικανότητα αποδόμησης - απορρόφησης, προκειμένου αυτά να προσομοιάζουν με τα χαρακτηριστικά του φυσιολογικού οστού. Με την πάροδο του χρόνου, τα συνθετικά εμφυτεύματα και άλλες σύγχρονες οστικές αναγεννητικές μέθοδοι φαίνεται να χρησιμοποιούνται περισσότερο έναντι μοσχευματικών υλικών φυσικής προέλευσης. Ο κλινικός γιατρός πρέπει να έχει επίγνωση του συνόλου των διαθέσιμων υλικών και των ιδιοτήτων τους προκειμένου να επιλέξει το πλέον κατάλληλο και να επιτύχει το καλύτερο δυνατό κλινικό αποτέλεσμα για κάθε συγκεκριμένο ασθενή. Δεδομένου ότι το ιδανικό υλικό αποκατάστασης οστού δεν έχει ακόμη καθιερωθεί, απαιτείται περαιτέρω προσπάθεια για να καταστεί αυτό αντικειμενικά εφικτό. Η ανάπτυξη προϊόντων οστικών αναγεννητικών υλικών σε μορφή υβριδικών προϊόντων που περιλαμβάνουν κύτταρα, αυξητικούς παράγοντες ή / και φάρμακα τροποποίησης γονιδίων σε συνδυασμό με τη βοήθεια κλάδων της επιστήμης όπως η βιοχημεία, η μηχανική και η νανοτεχνολογία θα ανοίξει περαιτέρω έναν νέο ορίζοντα στον τομέα της οστικής ανάπλασης [214].

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Σκοπός μελέτης

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση in vivo της ανάπτυξης νεόπλαστου οστού όσο και η παρατήρηση σε ιστολογικό επίπεδο των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την ενσωμάτωση των υλικών, χρησιμοποιώντας 3 εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα οστικής ανάπλασης σε μονο-φλοιώδη κρανιακά ελλείμματα χοίρων.

Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά: **α. ένα συνθετικό οστικό υποκατάστατο (Calc-i-oss classic, Sunstar Guidor, Switzerland), β. ένα ανθρώπινο οστικό παράγωγο (Demokritos, National Centre for Scientific Research tissue bank, Athens, Greece), γ. ένα ξενομόσχευμα βόειας προέλευσης (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland),** καθώς και **δ. ένα οστικό έλλειμμα άνευ μοσχεύματος (Πίνακας 3),** σε χειρουργικά προετοιμασμένες οστικές κοιλότητες μέσω ιστολογικής και ιστομορφομετρικής ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα της μελέτης στοχεύουν να συμβάλουν στην προώθηση της επιστημονικής έρευνας που ασχολείται με το πεδίο των οστικών μοσχευμάτων.

Μοσχεύματα που εφαρμόστηκαν στη μελέτη		
Εμπορική ονομασία	Σύνθεση	Μέγεθος κόκκων (mm)
Bio-Oss	Αποπρωτεϊνομένο, μεταλλοποιημένο, σπογγώδες, βόειας προέλευσης	1-2
Calc-i-oss	β φωσφορικό τριασβέστιο, συνθετικής προέλευσης	1-1.6
Demokritos	Μεταλλοποιημένο, λυοφιλιωμένο, σπογγώδες, ανθρώπινης προέλευσης	1-2

**Πίνακας 3:** Τα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων οστικών μοσχευμάτων.

## **2. Υλικό - Μέθοδοι**

### **A. Πειραματόζωα**

Το παρόν πρωτόκολλο ήταν σύμφωνο με τις κατευθυντήριες γραμμές και τους κανόνες για την έρευνα με πειραματόζωα, όπως έχουν θεσπισθεί από την Διεύθυνση Κτηνιατρικής, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (αριθμός έγκρισης 1265/11-05-2015).

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν **16 ενήλικοι αρσενικοί χοίροι (Landrace / Large White)**, όπου λάμβαναν ισορροπημένη διατροφή και φυλάσσονταν σε μεμονωμένους κλωβούς στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα ζώα εγκλιματίστηκαν για μια περίοδο 7 ημερών στο περιβάλλον του Εργαστηρίου πριν από την έναρξη του πειράματος.

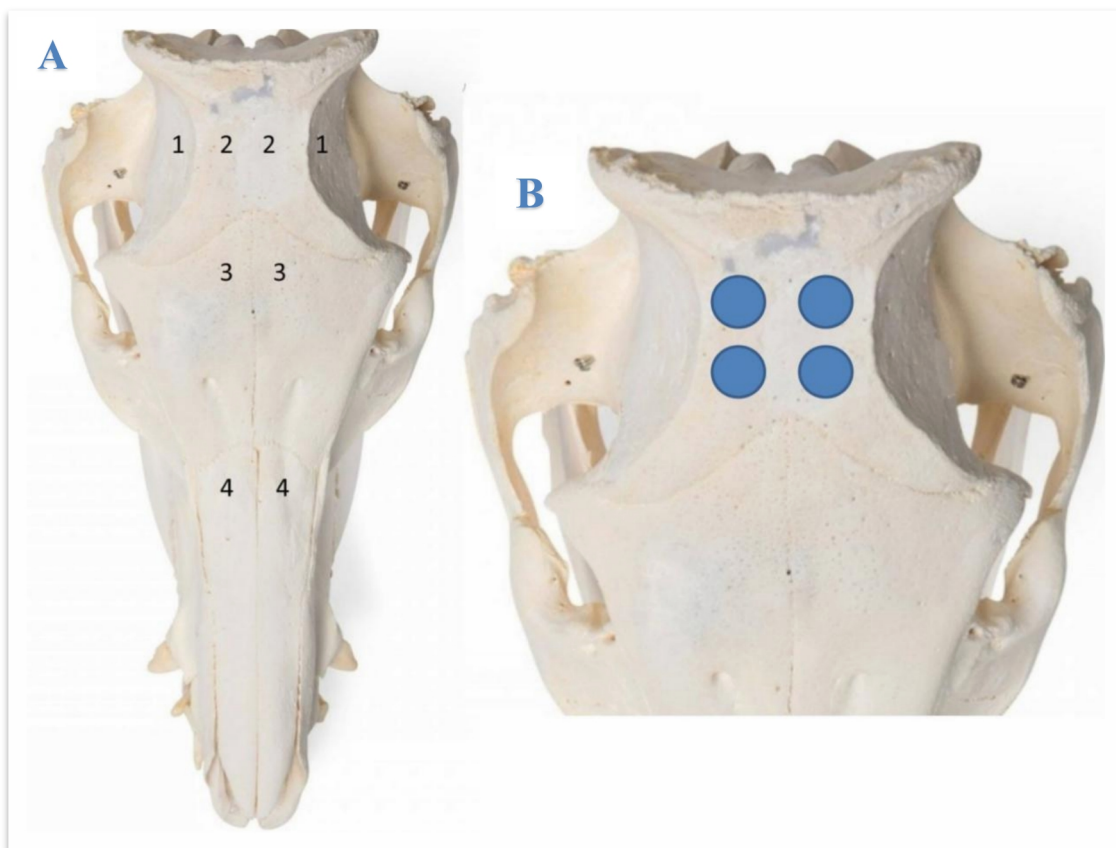
### **B. Δημιουργία οστικών ελλειμμάτων**

Για την εισαγωγή στην αναισθησία εφαρμόστηκε υδροχλωρική κεταμίνη (Imalgene, Merial, Lyon, France) σε δόση 25 mg / kg σωματικού βάρους σε συνδυασμό με ενδομυϊκή ένεση 2 mg / kg σωματικού βάρους ξυλαζίνης 20 mg / ml (Rompun, Bayer Hellas AG, Athens, Greece). Η γενική αναισθησία με στοματο - τραχειακή διασωλήνωση διατηρούνταν με προποφόλη 2 mg / ml (Diprivan, AstraZeneca, London, UK) ενδοφλεβίως.

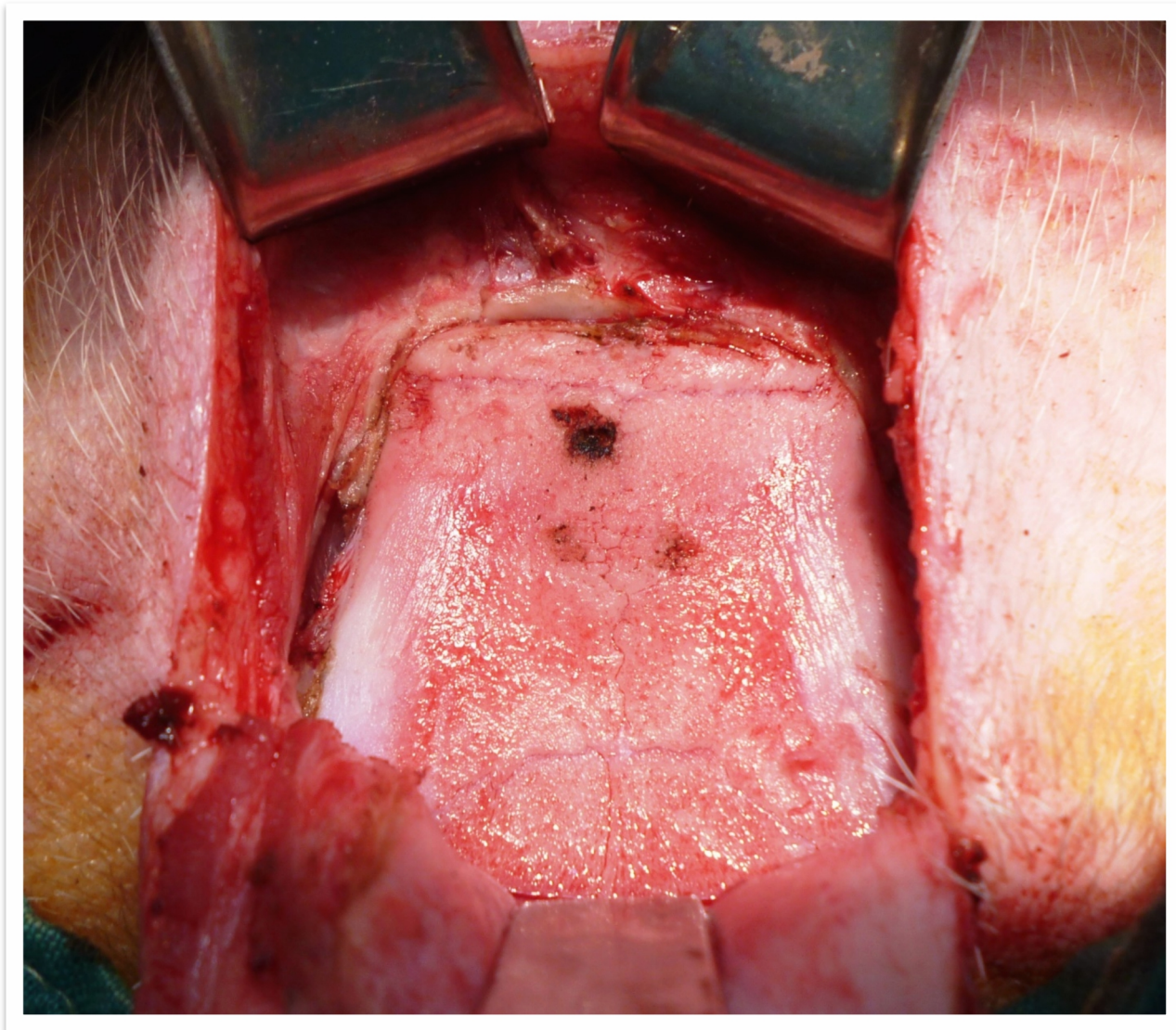
Στη χειρουργική περιοχή ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε απολύμανση του δέρματος χρησιμοποιώντας διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης (Betadine, Lavipharm, Athens, Greece). Ακολούθησε εμπότιση με διάλυμα τοπικής αναισθησίας 4% υδροχλωρικής αρτικαΐνης με 1:100.000 επινεφρίνη (Ubistesin Forte, 3M ESPE, Athens, Greece) προκειμένου να επιτευχθεί

ικανοποιητική αιμόσταση. Κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης στα ζώα παρέχονταν 100% οξυγόνο ενώ τα ζωτικά σημεία παρακολουθούνταν μέσω κατάλληλης συσκευής.

Έλαβε χώρα μια ημικυκλική τομή στο δέρμα του κρανίου, σχήματος U με το κυρτό στραμμένο προς το ινιακό οστό, εκτεινόμενη από το άκρο της ζυγωματικής απόφυσης του μετωπιαίου οστού μέχρι το αντίπλευρο αντίστοιχο σημείο. Ακολούθησε ανύψωση δερματικού κρημνού ολικού πάχους, εκθέτοντας το μετωπιαίο και βρεγματικά οστά (**Εικόνα 11, 12**).



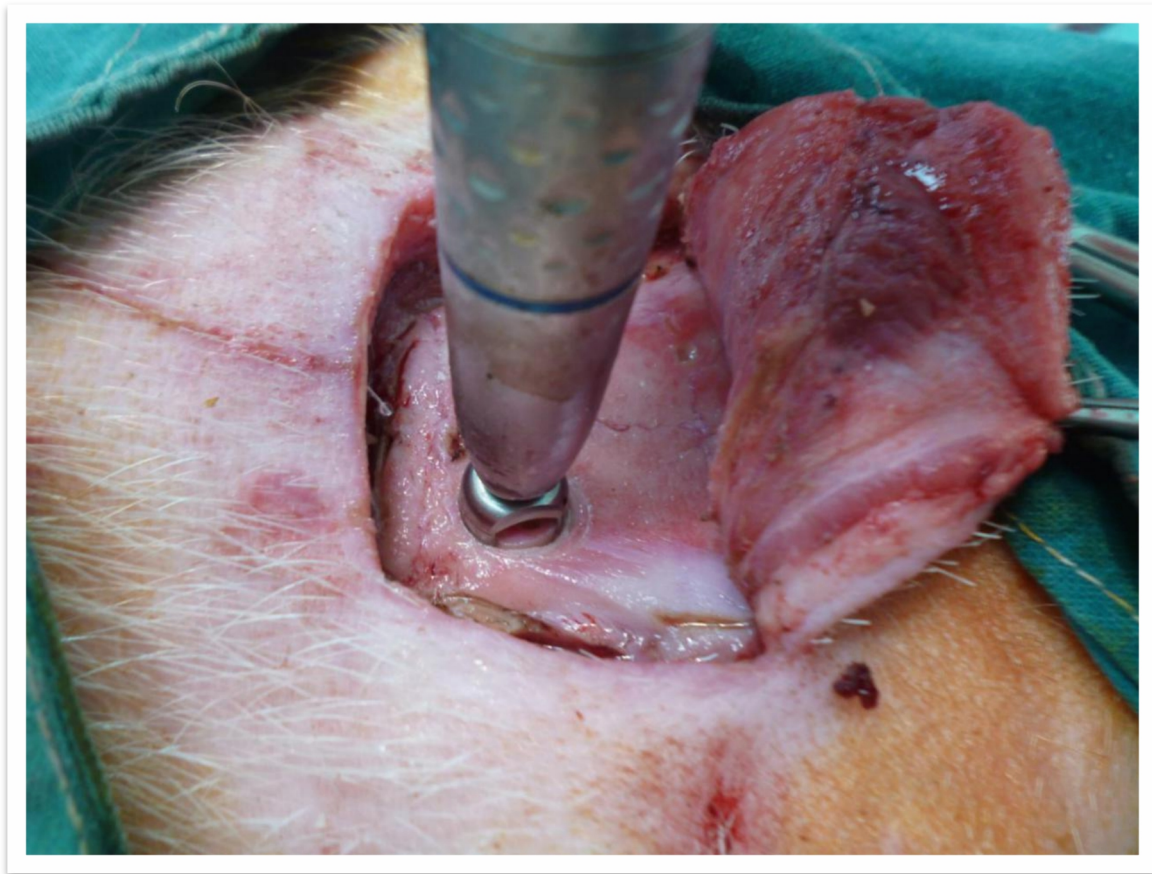
**Εικόνα 11:** **A.** Ανατομία των οστών του κρανίου – χοίρος. Διακρίνονται: 1. Κροταφικά, 2. Βρεγματικά, 3.Μετωπιαία και 4. Ρινικά οστά. **B.** Στην μεγέθυνση σημειώνονται με μπλε κύκλους τα σημεία όπου διενεργήθηκαν τα χειρουργικά ελλείμματα (τροποποιημένο από [www.anatomywarehouse.com/pig-skull-anatomy-model-a-100294](http://www.anatomywarehouse.com/pig-skull-anatomy-model-a-100294))



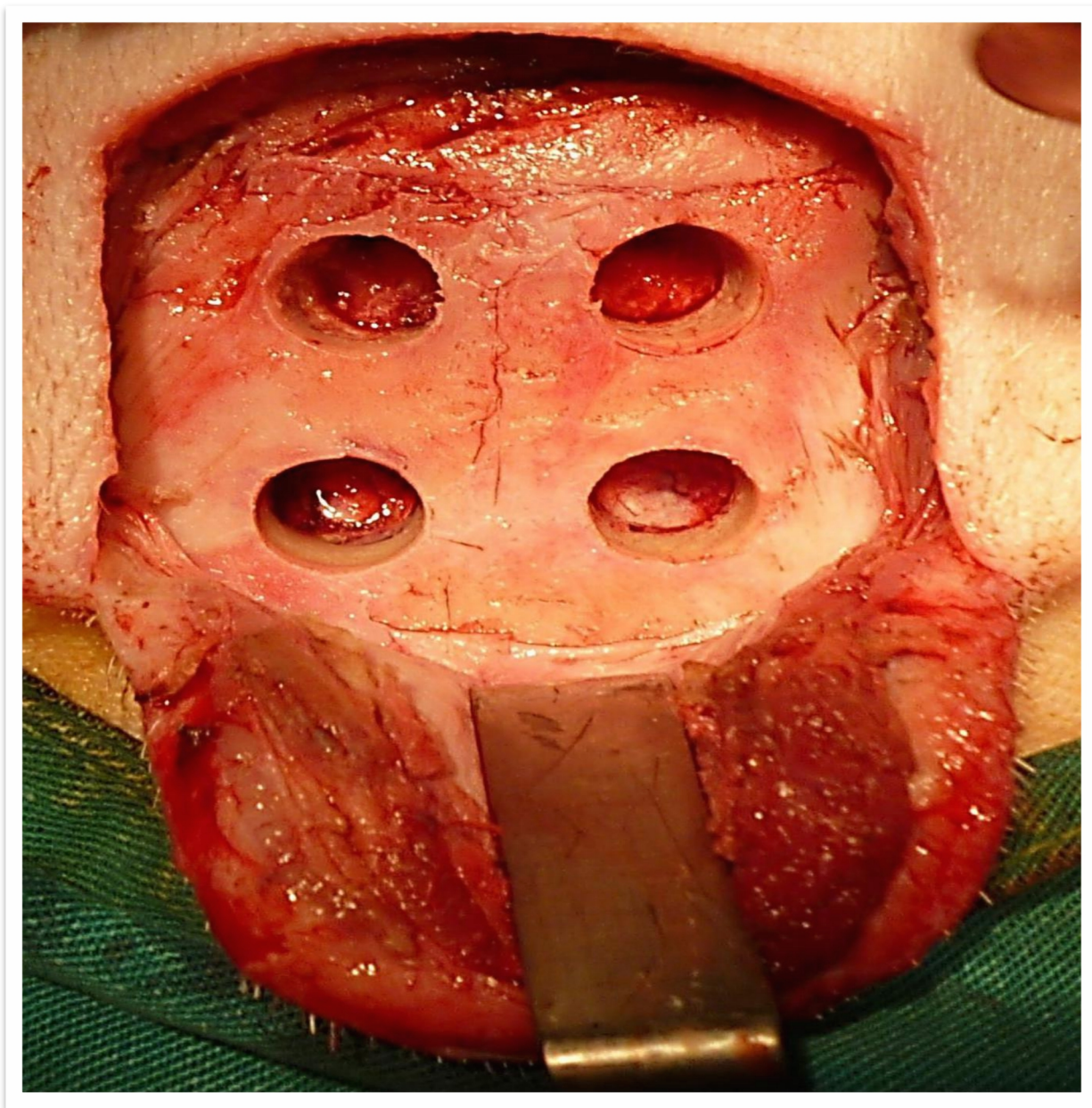
**Εικόνα 12:** Αναπέταση του δερματικού κρημονού ολικού πάχους. Διακρίνεται ο θόλος του κρανίου.

Στη συνέχεια έγιναν 4 μονο-φλοιώδη οστικά ελλείμματα (βάθος 10 mm / διάμετρος 10 mm), κυλινδρικού σχήματος - όπως έχουν περιγραφεί σε προηγούμενα μελέτη των Schlegel και

συν.- χρησιμοποιώντας χειρουργικό οστεοτρύπανο (Meisinger, Neuss, Germany) με ταχύτητα περιστροφής 250 στροφών / λεπτό και συνεχή καταιονισμό φυσιολογικού ορού, με διαστήματα των 10 mm μεταξύ τους προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 13, 14) (Schlegel et al., 2006). Τα κυλινδρικού σχήματος οστικά τεμάχια βαθμιαία κινητοποιήθηκαν και αποσπάστηκαν με τη χρήση λεπτής σμίλης (Εικόνα 15). Κατά τη διάρκεια αυτής της επεμβατικής διαδικασίας δεν παρατηρήθηκε διάτρηση του εσωτερικού φλοιώδους πετάλου του κρανίου των πειραματόζωων. Όλα τα ελλείμματα καθαρίστηκαν σχολαστικά από υπολείμματα μαλακών και σκληρών ιστών και εκπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό.

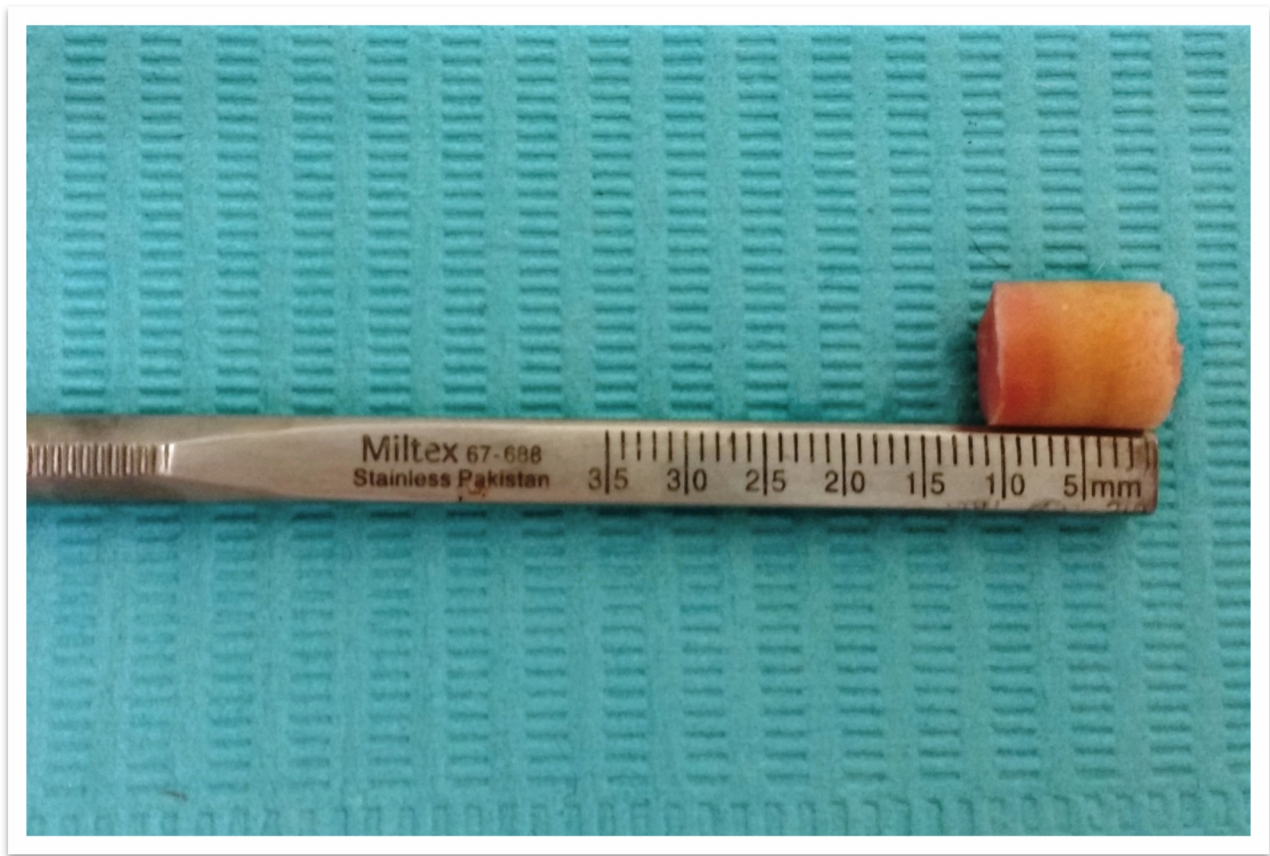


**Εικόνα 13:** Χειρουργική διάνοιξη οπών – ελλειμμάτων στο κρανιακό οστό με τη χρήση οστεοτρύπανου.



**Εικόνα 14:** Προκληθέντα οστικά ελείμματα στο θόλο του κρανίου των πειραματόζωων.





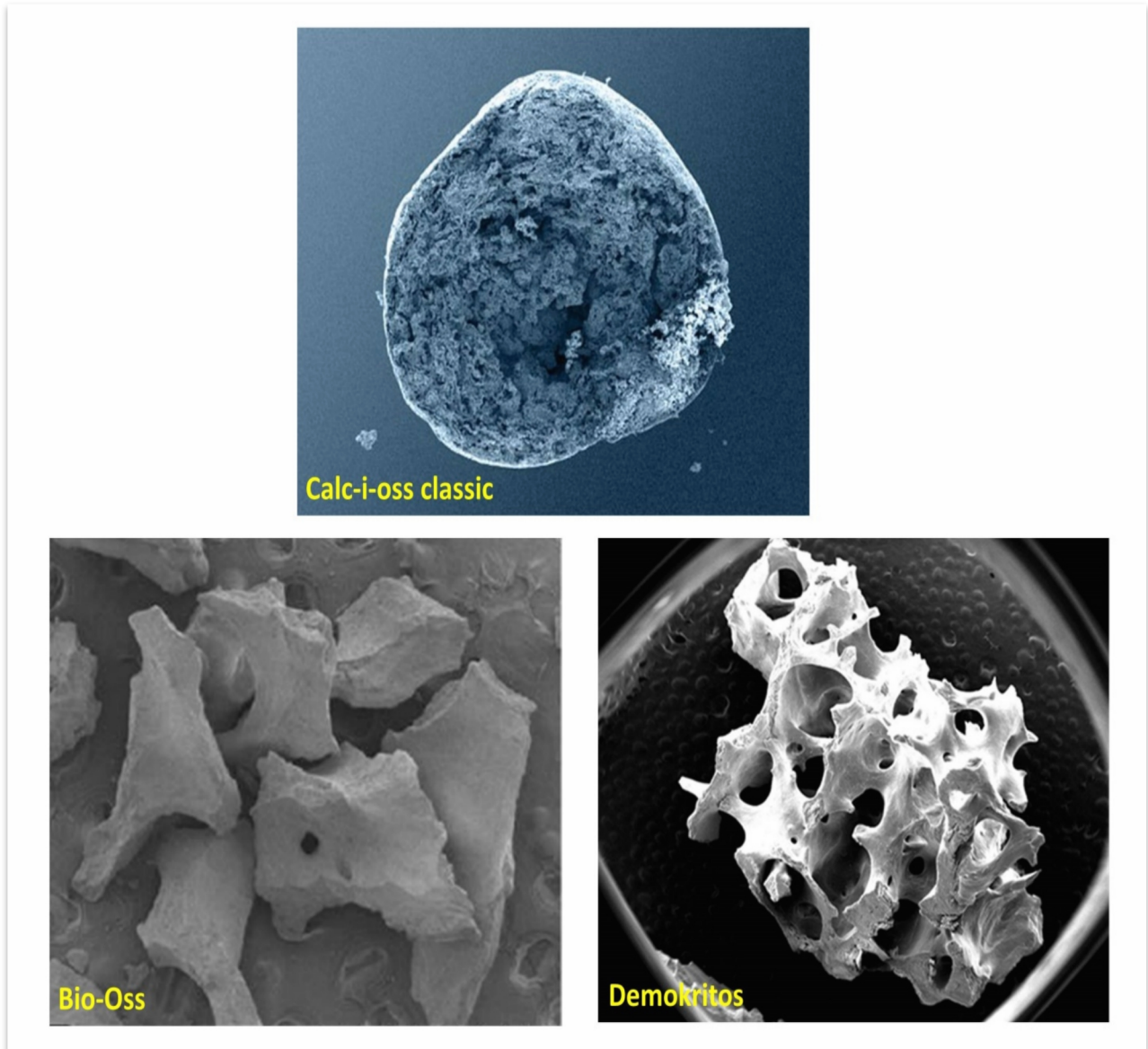
**Εικόνα 15:** Διακρίνεται ένα εκ των αποσπασθέντων οστικών τεμαχίων με βάθος εκτομής 10 mm.

### **Γ. Τοποθέτηση οστικών μοσχευμάτων**

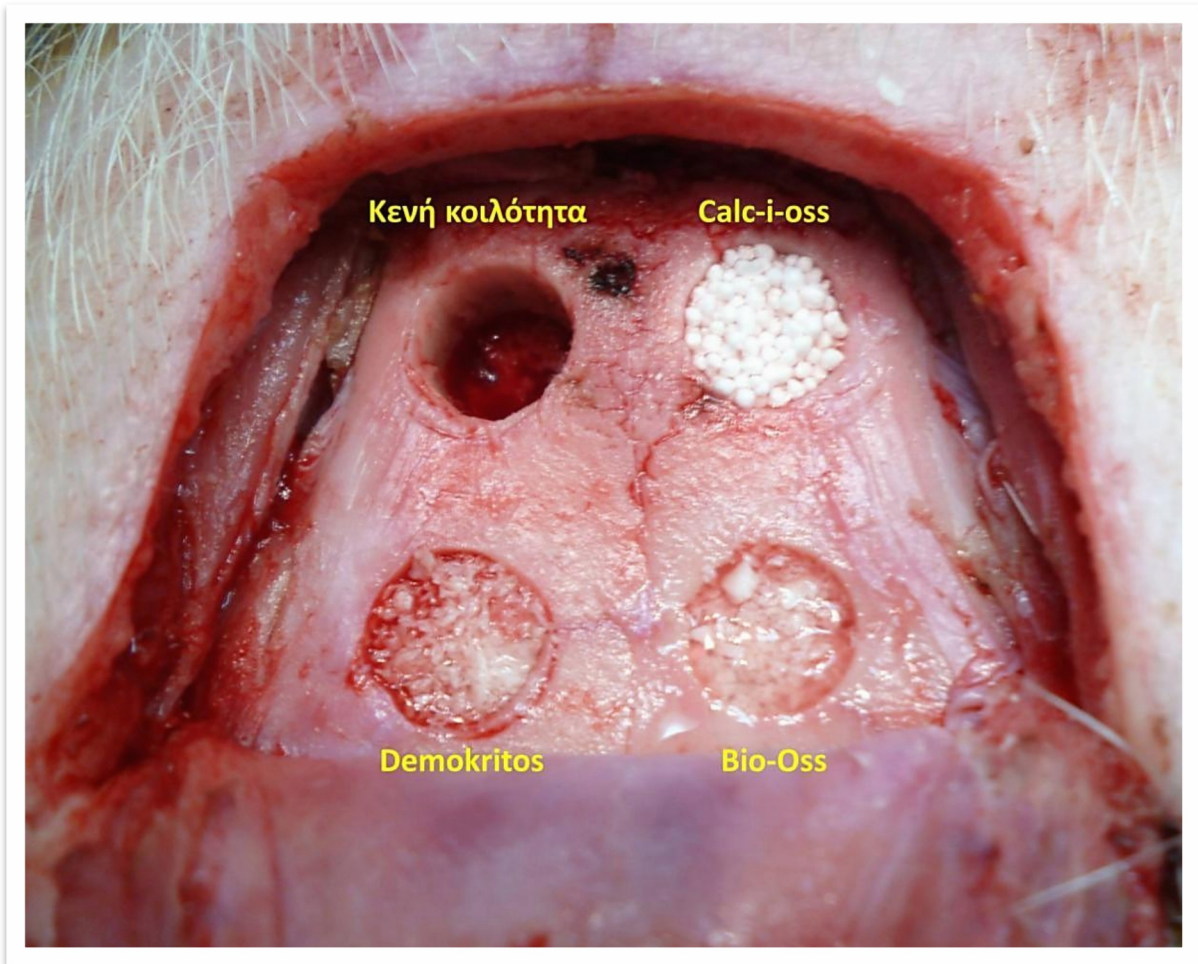
Τα οστικά μοσχεύματα **συνθετικής (Calc-i-oss classic, Sunstar Guidor, Switzerland), ανθρώπινης (Demokritos, National Centre for Scientific Research tissue bank, Athens, Greece) και βόειας (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)** προέλευσης τοποθετήθηκαν σε 3 από τα 4 ελλείμματα, ενώ 1 εξ'αυτών αφέθηκε να επουλωθεί χωρίς εμφύτευση υλικού, χρησιμεύοντας ως μάρτυρας (**Εικόνα 16, 17, 18**).



**Εικόνα 16:** Τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα των μοσχευματικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας.



**Εικόνα 17:** Η τρισδιάστατη μορφολογία των εφαρμοζόμενων μοσχευματικών υλικών σε μεγέθυνση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

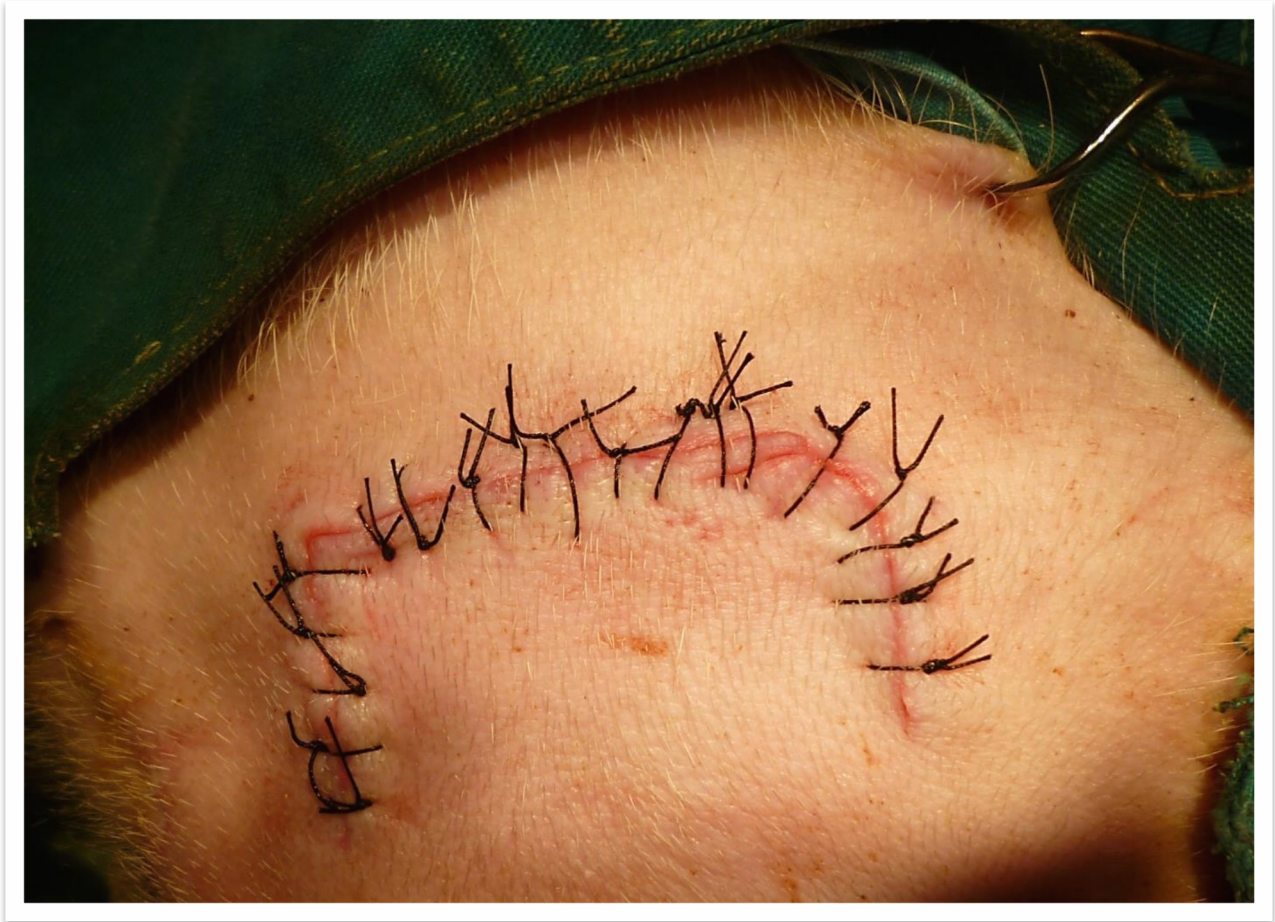


**Εικόνα 18:** Τα χειρουργικά ελλείμματα μετά την πλήρωση με τα οστικά μοσχεύματα.

Η χειρουργική επέμβαση ολοκληρώθηκε με κατάλληλη συρραφή του τραύματος με ράμματα 3/0 μεταξιού (Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, USA) και επακόλουθη εφαρμογή διαλύματος ιωδιούχου ποβιδόνης (Betadine, Lavipharm, Athens, Greece) στο δέρμα περιφερικά της τομής (**Εικόνα 19**).

Τα ζώα παρακολούθηθηκαν για 2 ώρες στο δωμάτιο ανάνηψης, ενώ χορηγήθηκε κατάλληλη αντιβιοτική προφύλαξη μακράς δράσης κεφουροξίμης 750 mgr (Zinacef,

Glaxosmithkline, Athens, Greece) ενδομυϊκά καθώς και αναλγητικό υπόθετο παρακεταμόλης 15 mg / kg (Depon, Bristol-Myers Squibb, Athens, Greece).



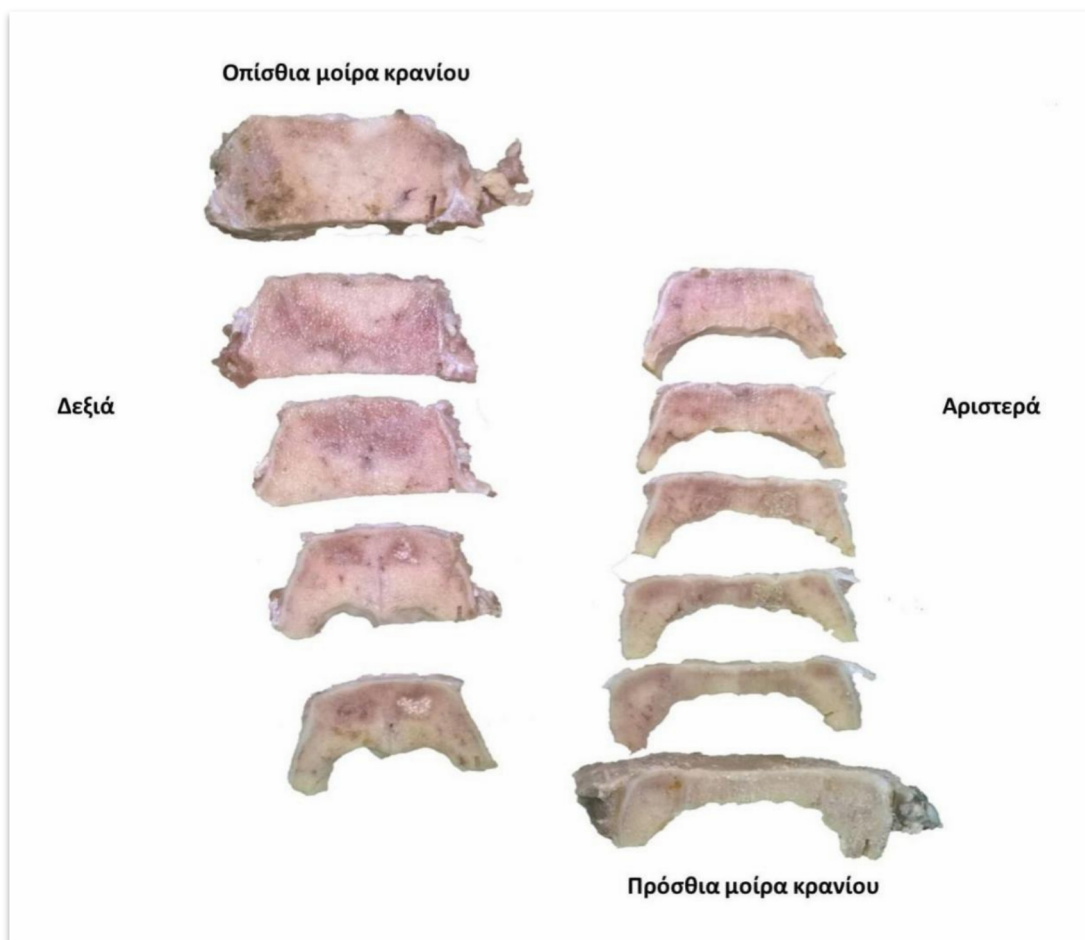
**Εικόνα 19:** Σύγκλειση της τομής με τη χρήση μεμονωμένων ραμμάτων μεταξιού 3 / 0.

#### **Δ. Ευθανασία πειραματόζωων**

Τα ζώα διαιρέθηκαν τυχαία σε 2 ομάδες και θανατώθηκαν με ενδοφλέβια ένεση νατριούχου θειοπεντάλης (Pentothal, Abbott Hellas, Athens, Greece) την 8η και 12η

μετεγχειρητική εβδομάδα αντίστοιχα για να εκτιμηθεί η συμβολή των μοσχευμάτων στην οστική ανάπλαση.

Ακολούθησε με τη χρήση μηχανικού πριονιού απόσπαση των κρανιακών οστών που εμπεριείχαν τα οστικά ελλείμματα και περαιτέρω τεμαχισμός τους σε μετωπιαίες διατομές πάχους 4 χιλιοστών (**Εικόνα 20**). Επιλέχθηκαν οι 2 αντιπροσωπευτικότερες τομές από το κεντρικό τμήμα για καθένα από τα οστικά ελλείμματα και εγκλείσθηκαν σε ιστοκασσέτες ενώ τα δείγματα υποβλήθηκαν περαιτέρω σε κατάλληλη επεξεργασία.



**Εικόνα 20:** Μετωπιαίες τομές κατά την προετοιμασία του κρανιακού οστού προτού υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία.

## **Ε. Ιστολογική αξιολόγηση**

Τα οστικά τεμάχια εμβαπτίστηκαν σε 10% φορμόλη για 2 ημέρες και στη συνέχεια αφυδατώθηκαν με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος (Diapath S.p.a., Martinengo, Italy) για 21 ημέρες με αλλαγή των υγρών κάθε 7 ημέρες. Έπειτα, τα δείγματα σκηνώθηκαν σε παραφίνη, τεμαχίστηκαν σε τομές πάχους 3  $\mu\text{m}$ , χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάστηκαν κατάλληλα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Nikon Eclipse 80, Nikon, Tokyo, Japan) σε ελάχιστη μεγέθυνση X 40. Στις ιστολογικές τομές αξιολογήθηκαν ποιοτικά παράμετροι της επουλωτικής διεργασίας όπως η παρουσία οστεοβλαστών, οστεοκλαστών, ινοβλαστών, κόκκων μοσχεύματος, συνδετικού ιστού, οστεοειδούς, δικτυωτού και δοκιδώδους οστού.

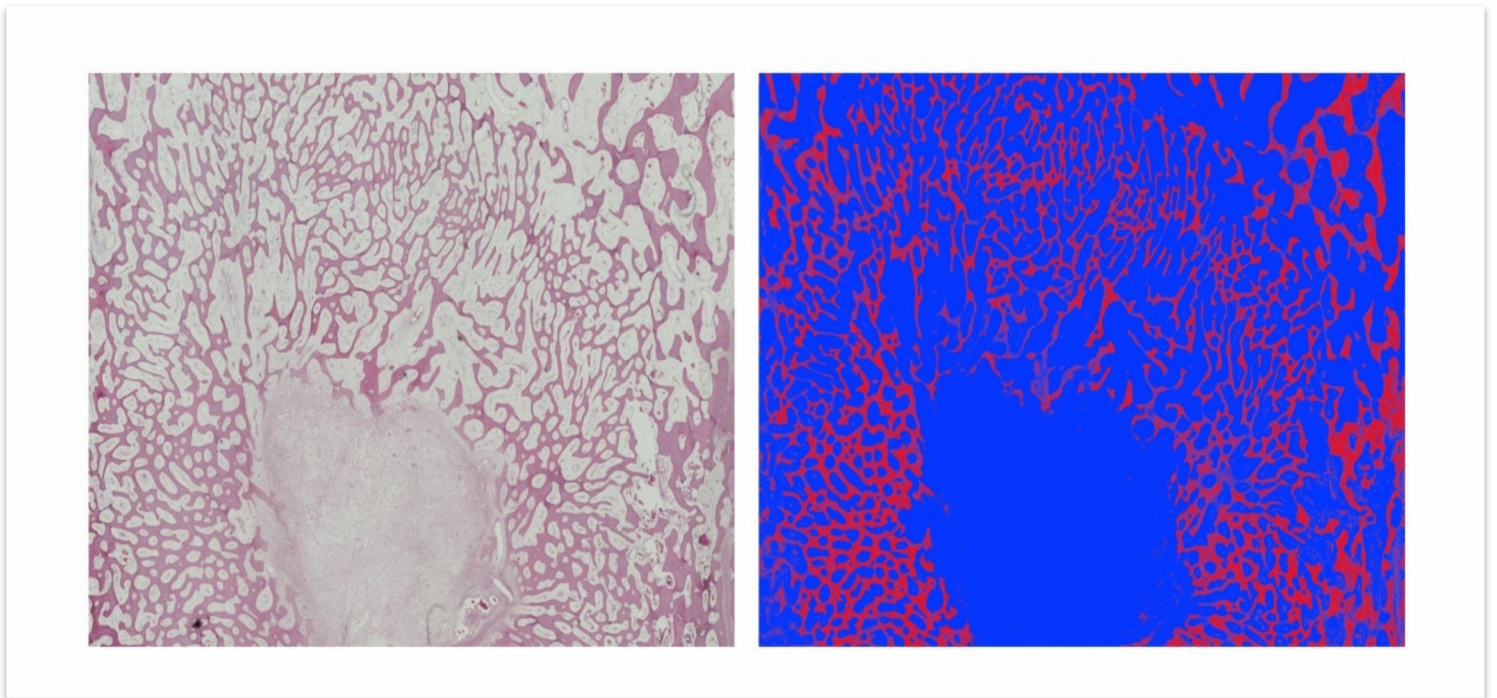
## **Στ. Ιστομορφομετρική αξιολόγηση**

Προκειμένου τα αποτελέσματα των επουλωτικών διεργασιών στις ομάδες μελέτης που προαναφέρθηκαν να εκφραστούν σε μετρήσιμα μεγέθη εφαρμόστηκε η ιστομορφομετρική ανάλυση, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των ευρημάτων, γεγονός που προσδίδει πιο αντικειμενικό χαρακτήρα στα ευρήματα της μελέτης.

Οι αναλύσεις έγιναν με τη βοήθεια μικροσκοπίου φωτός (Nikon Eclipse 80, Nikon, Tokyo, Japan) και οι εικόνες λήφθηκαν με ψηφιακή κάμερα (Nikon DS-2MW, Nikon, Tokyo, Japan). Από το επιλεγμένο ανά έλλειμμα ζεύγος τομών προσδιορίστηκε η καταλληλότερη εξ'αυτών, η οποία ψηφιοποιήθηκε τμήμα προς τμήμα. Τα τμήματα συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με κατάλληλο λογισμικό (Image-Pro Plus v. 5.1, Media

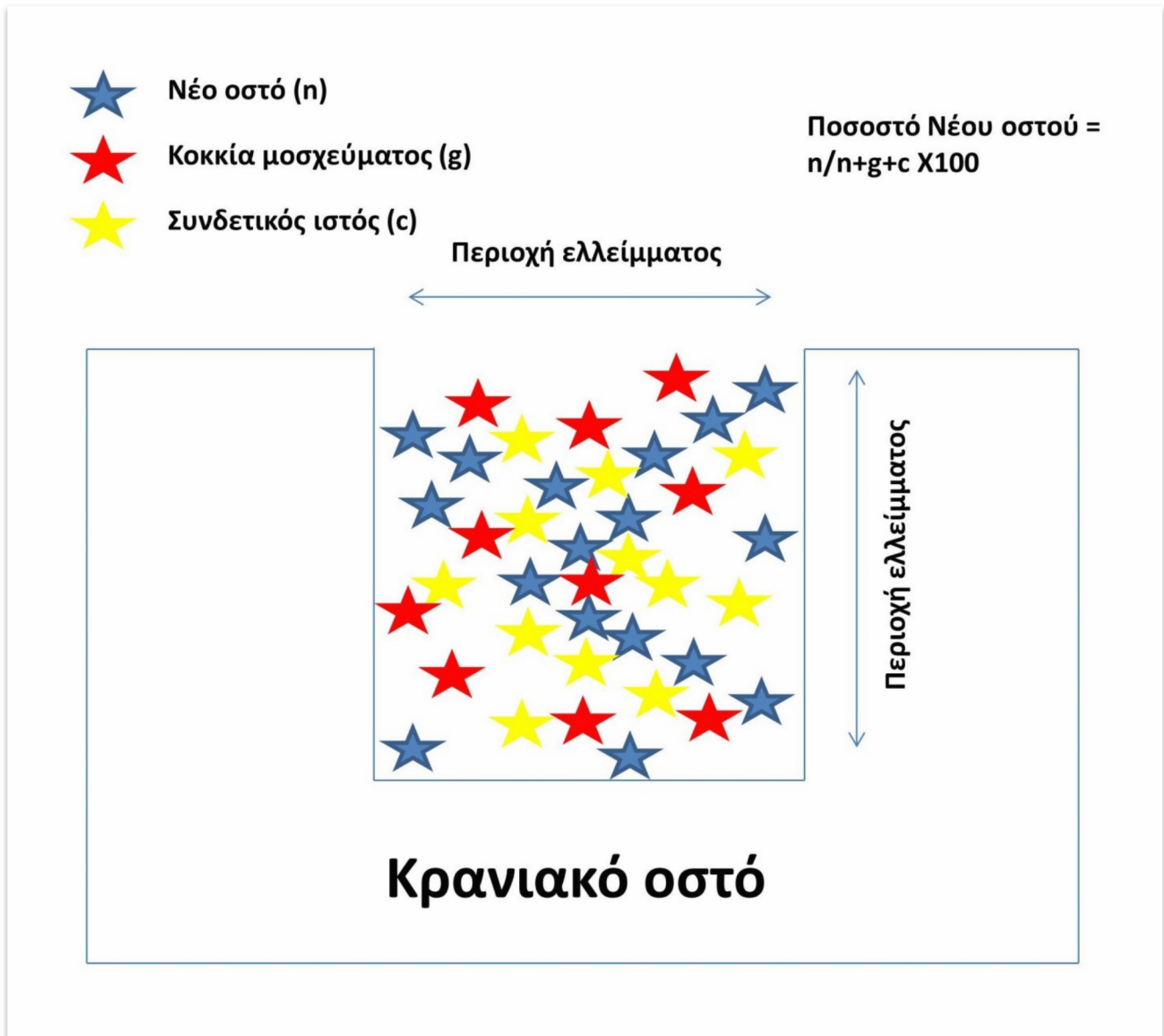
Cybernetics, Rockville, MD, USA) ενώ δημιουργήθηκε η κατάλληλη μάσκα – κόκκινη απόχρωση - για την περιοχή που αφορά το νεόπλαστο οστό (**Εικόνα 21**).

Οι ιστομορφομετρικές αξιολογήσεις αφορούσαν σε μετρήσεις σχετικά με το ποσοστό νεοσχηματισμένου οστού στο συνολικό όγκο της περιοχής ενδιαφέροντος (**BV / TV - bone volume / tissue volume**) (**Εικόνα 22**).



**Εικόνα 21** : Η ιστολογική εικόνα και η ψηφιακή επεξεργασία της με την χρήση του λογισμικού ιστομορφομετρικής ανάλυσης.





**Εικόνα 22:** Σχηματικό διάγραμμα όπου αναπαριστά την περιοχή του οστικού ελλείμματος εντός της οποίας παρατηρούνται κόκκοι του μοσχευματικού υλικού, συνδετικός ιστός και νεόπλαστο οστό.

## **Z. Στατιστική ανάλυση**

Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά ζεύγη χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Bonferroni. Σε περίπτωση μη κανονικότητας διανομής των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Mann-Whitney. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέση τιμή +/- τυπική απόκλιση, ενώ προσδιορίστηκε επίσης η διάμεση όσο και οι ακραίες – ανώτατη, κατώτατη - τιμές.

Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκαν τιμές  $p < 0.05$ .

### **3. Αποτελέσματα**

#### **A. Μακροσκοπικές παρατηρήσεις - ευρήματα**

Οι χειρουργικές επεμβάσεις ολοκληρώθηκαν ανεπίπλεκτα και η επούλωση των τραυμάτων ήταν ομαλή καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής πορείας, με εξαίρεση 1 ζώο το οποίο πέθανε πριν την ολοκλήρωση 12 εβδομάδων επούλωσης. Επίσης, στα χρονικά σημεία της θυσίας των ζώων, δεν εντοπίστηκαν σημάδια τοπικής φλεγμονής γύρω από το δέρμα του κρανίου, περιφερικά των προηγηθέντων τομών. Συνοψίζοντας, μετά την ολοκλήρωση 8 και 12 μετεγχειρητικών εβδομάδων ήταν διαθέσιμα προς περαιτέρω αξιολόγηση 8 και 7 πειραματόζωα αντίστοιχα.

Μετά την απομάκρυνση των μαλακών ιστών, οι περιοχές των προκληθέντων χειρουργικών ελλειμμάτων δεν εμφάνιζαν μακροσκοπικά αξιοσημείωτες διαφορές, πληρούμενες με οστό, παρουσιάζοντας μόνο ορισμένα εστιακά ελλείμματα (**Εικόνα 23**). Εν τούτοις, μετά τις μετωπιαίες διατομές του κρανιακού οστού παρατηρήθηκε ότι στις περιοχές που είχαν πληρωθεί με αλλοπλαστικό συνθετικό βιοϋλικό, ανθρώπινο αλλομόσχευμα και ξενομόσχευμα βοοειδών, υπήρχαν διακριτά υπολειπόμενα σωματίδια μοσχεύματος σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό. Όσον αφορά τις κενές κοιλότητες, παρατηρήθηκε ότι είχαν καλυφθεί με ικανοποιητική ποσότητα οστίτη ιστού χωρίς να εντοπίζονται ιδιαίτερα κενά με μη ενασβεστωμένο, μαλακό ιστό (**Εικόνα 24**).

**Εικόνα 23:** Τα οστικά ελλείμματα μετά την ευθανασία των ζώων και την απομάκρυνση των μαλακών μορίων της περιοχής.

**Εικόνα 24 :** Στις μετωπιαίες τομές διακρίνονται οι κοιλότητες με εμφανή παρουσία κόκκων μοσχευματικού υλικού όσο και ικανοποιητική κάλυψη του κενού βοθρίου με οστίτη ιστό.

## **B. Ιστολογική αξιολόγηση**

Η εξέταση των ιστοτεμαχίων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη επέτρεψε την ποιοτική ανάλυση της οστικής επούλωσης των ελλειμμάτων σε ιστολογικό επίπεδο. Παρακάτω παρατίθενται παρατηρήσεις:

### **B1. 8 εβδομάδες**

Στις 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, η ιστολογική ανάλυση ανέδειξε σε όλες τις κοιλότητες που πληρώθηκαν με μοσχεύματα άλλοτε άλλου βαθμού οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα, παραγωγή οστεοειδούς και νεόπλαστου οστού, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημεία φλεγμονώδους απόκρισης, νέκρωσης ή αντίδρασης ξένου σώματος. Τα σωματίδια του μοσχεύματος περιβάλλονταν ή έρχονταν σε επαφή με τον οστίτη ιστό, επιδεικνύοντας στοιχεία ικανοποιητικής οστεοκαθοδήγησης και βιοσυμβατότητας. Τα διαστήματα μεταξύ των σωματιδίων του μοσχεύματος και του νεοσύστατου οστού χαρακτηρίζονταν από άφθονα μεσεγχυματικά κύτταρα και αγγεία, ενώ οστεοβλάστες και πολυπύρηντοι οστεοκλάστες αναγνωρίζονταν στην περιφέρεια των μοσχευμάτων.

Παρουσία κόκκων μοσχεύματος παρατηρήθηκε στα χειρουργικά ελλείμματα που πληρώθηκαν με αλλοπλαστικό υλικό όσο και σε εκείνα όπου τοποθετήθηκε βόειας και ανθρώπινης προέλευσης υποκατάστατο. Ειδικά στο μόσχευμα βόειας προέλευσης οι κόκκοι του υλικού διακρίνονταν σχεδόν άθικτοι, χωρίς να εντοπίζονται στοιχεία διεργασιών απορρόφησης ή διάλυσης (Εικόνα 25, 26, 27). Στα κενά ελλείμματα, ικανοποιητικές ποσότητες νέου οστίτη ιστού είχαν σχηματιστεί στην περιφέρεια του προκληθέντος κενού, με τάση επέκτασης προς το

κεντρικό τμήμα, όπου παρατηρούνταν βαθμιαία αύξηση πλήρωσης με στρώμα ινώδους συνδετικού ιστού (**Εικόνα 28**).

## **B2. 12 εβδομάδες**

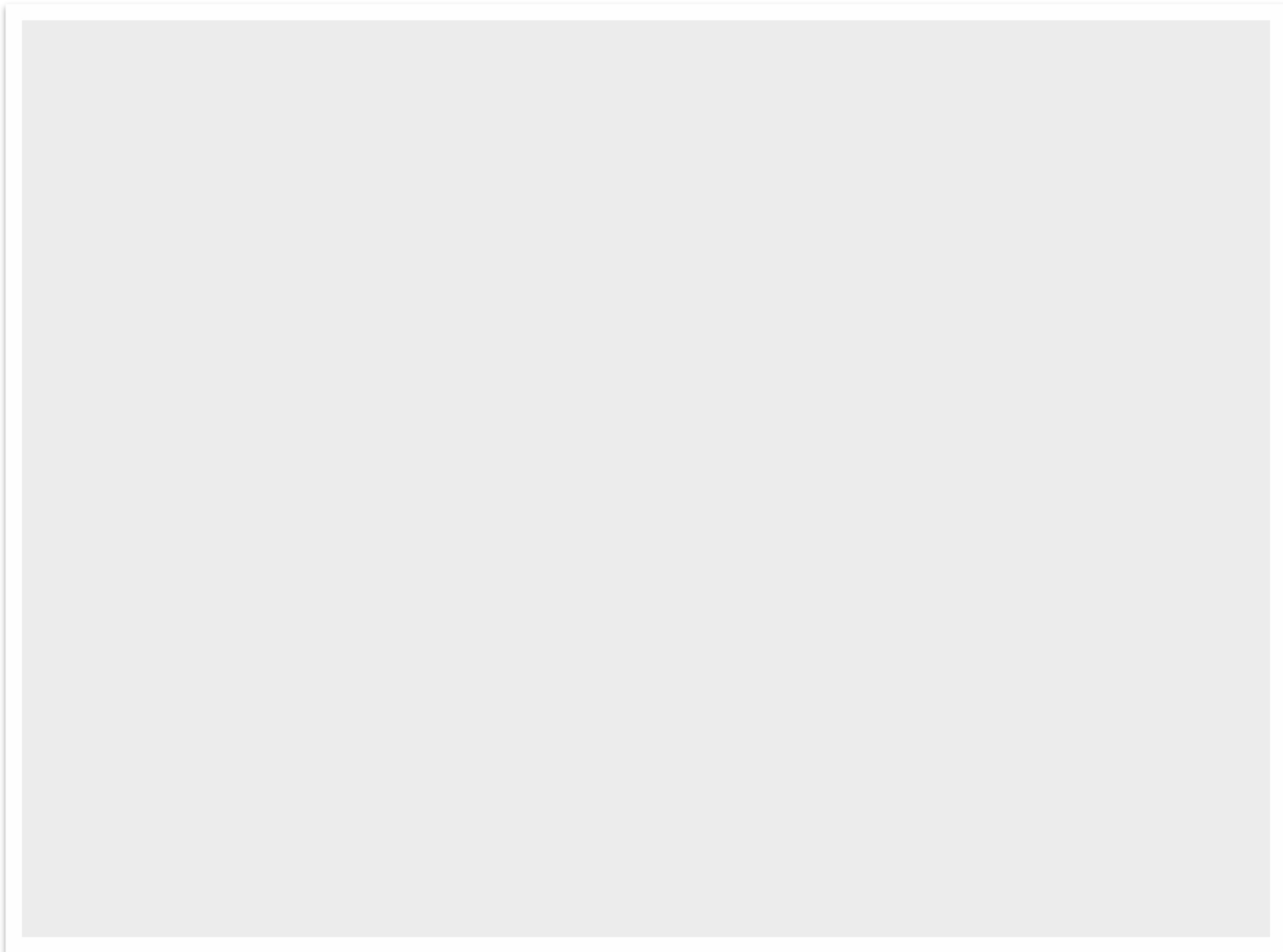
Στις 12 εβδομάδες παρατηρήθηκε πιο έντονος σχηματισμός δοκιδώδους οστού, περιβάλλοντας όλα τα είδη των μοσχευμάτων, ενώ ο ινώδης συνδετικός ιστός βρέθηκε σε γενικά πλαίσια να είναι σχετικά λιγότερος έναντι αυτού που παρατηρήθηκε στις 8 εβδομάδες.

Ήταν εμφανές ότι οι κόκκοι b-TCP μειώθηκαν σε αριθμό και εμφάνιζαν στοιχεία επαρκούς αποδόμησης, ως αποτέλεσμα τόσο διάλυσης όσο και άμεσης οστεοκλαστικής απορρόφησης. Οι κόκκοι του υλικού ήταν ενσωματωμένοι με νεοσχηματισθέν οστό, σε μεγαλύτερη αλληλοσύνδεση μεταξύ τους συγκριτικά με τις 8 εβδομάδες, ενώ υπήρχαν διακριτά στοιχεία οστικής αναδιαμόρφωσης. Επιπρόσθετα, τα σωματίδια του βόειου και του ανθρώπινου αλλομοσχεύματος παρουσίασαν υψηλότερο βαθμό ενσωμάτωσης με ώριμο οστό συγκριτικά με τα παρατηρηθέντα ευρήματα στις 8 εβδομάδες. Ειδικά στην περίπτωση του βόειου και σε μικρότερο βαθμό του ανθρώπινου υποκατάστατου τα σωματίδια των υλικών φαίνονταν σχετικά ανέπαφα, σχεδόν χωρίς ενδείξεις απορρόφησης (**Εικόνα 25, 26, 27**). Στις κοιλότητες που δεν πληρώθηκαν με μόσχευμα η οστική ανάπλαση είχε επίσης αυξηθεί σε εμφανή πλέον βαθμό στην περιφέρεια όσο και στο πυρήνα των ελλειμμάτων (**Εικόνα 28**).

**Εικόνα 25:** Στο συνθετικό υλικό b-TCP είναι εμφανής η τάση απορρόφησης – διάλυσης των κόκκων του μοσχεύματος στις 8 και κυρίως στις 12 εβδομάδες. Μάλιστα, στις 12 εβδομάδες παρατηρείστε την ανάπτυξη οστίτη ιστού μεταξύ των κόκκων του μοσχεύματος (Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη, Μεγέθυνση X40).



**Εικόνα 26:** Στο μοσχευματικό υλικό βόειας προέλευσης διακρίνεται η παρουσία σχετικά άθικτων κόκκων τόσο στις 8 όσο και στις 12 εβδομάδες. Στις εικόνες παρατηρείται πιο έντονη ανάπτυξη οστίτη ιστού στις 12 εβδομάδες και απουσία φλεγμονώδους διηθήματος (Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη, Μεγέθυνση X40).



**Εικόνα 27:** Στο ανθρώπινο οστικό μόσχευμα διακρίνεται η παρουσία κόκκων με ελαφρά τάση μείωσης στις 12 εβδομάδες, χωρίς έντονη οστεοκλαστική δραστηριότητα όπως στην περίπτωση του b-TCP. Όπως στην περίπτωση και των υπόλοιπων μοσχευμάτων παρατηρείται καλή βιοσυμβατότητα – απουσία φλεγμονής όσο και ικανοποιητική ανάπτυξη οστού (Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη, Μεγέθυνση X40).

**Εικόνα 28:** Στην κενή κοιλότητα εντοπίζονται κατά τόπους περιοχές έντονης οστικής ανάπλασης και παρουσία συνδετικού ιστού, κυρίως προς το κέντρο του ελλείμματος, στις 8 εβδομάδες. Ωστόσο στις 12 εβδομάδες είναι ακόμα πιο έντονη η πλήρωση με οστίτη ιστό, γεγονός που καταδεικνύει ότι τα προκαλούμενα οστικά ελλείμματα δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως κρίσιμου μεγέθους (Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη, Μεγέθυνση X40).

## Γ. Ιστομορφομετρική αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα της ιστομορφομετρικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4 και 5**. Αρχικά να σημειώσουμε ότι ενώ οι διαφορές μεταξύ των ομάδων σύγκρισης εμφανίζονταν μη σημαντικές στις 8 εβδομάδες, αποκτούν στατιστική σημαντικότητα στις 12 εβδομάδες. Βάσει των μετρήσεων, παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό σχηματισμός νέου οστού σε ελλείμματα πληρωθέντα με b-TCP έναντι των άλλων μοσχευματικών υλικών τόσο στις 8 όσο και στις 12 εβδομάδες. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι παρότι στις 8 εβδομάδες το b-TCP παρουσίασε μικρότερη παραγωγή νέου οστού σε σύγκριση με την κενή κοιλότητα, το υλικό αυτό ξεπέρασε, αναφορικά με την αναγέννηση οστού, το κενό βοθρίο στις 12 εβδομάδες, και μάλιστα, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι λιγότερος όγκος νεοσχηματισθέντος οστού παρατηρήθηκε σε μοσχεύματα βόειας και ανθρώπινης προέλευσης σε σύγκριση με την κενή κοιλότητα και στις 2 χρονικές φάσεις παρατήρησης, διαφορά που αποκτά στατιστική σημαντικότητα στις 12 εβδομάδες. Τέλος, να αναφερθεί ότι η παραγωγή νέου οστού στην κενή κοιλότητα θεωρείται ιδιαίτερα έντονη, καταλαμβάνοντας την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> θέση στις 8 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα.

Ως γενικό συμπέρασμα, βάσει των ανωτέρω αναφερθέντων ευρημάτων, μπορεί να ειπωθεί ότι το υλικό που περιείχε b-TCP παρουσίασε την μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής οστού σε σύγκριση με τα άλλα μοσχεύματα.

	8 εβδομάδες				12 εβδομάδες			
	Μέση	SD	Διάμεση	Μέγιστο Ελάχιστο	Μέση	SD	Διάμεση	Μέγιστο Ελάχιστο
Κενό	34.81	7.98	33.99	25.29 49.18	44.80	0.60	44.88	43.91 45.75
Συνθετικό	34.11	20.21	31.40	11.63 67.73	47.25	1.12	47.52	44.95 48.37
Βόειο	32.08	11.95	27.97	17.12 54.86	39.14	1.10	39.03	37.79 41.13
Ανθρώπινο	29.20	9.55	31.47	12.30 42.12	35.05	0.93	34.93	33.97 36.54

**Πίνακας 4:** Τα αποτελέσματα της ιστομορφομετρικής ανάλυσης. Παρέχονται μετρήσεις για τη μέση και διάμεση τιμή, την σταθερή απόκλιση (SD) και την μέγιστη – ελάχιστη τιμή αναφορικά με το ποσοστό νεοσχηματισμένου οστού στο συνολικό όγκο της περιοχής ενδιαφέροντος (BV / TV - bone volume / tissue volume) .

	p - value	
	8 εβδομάδες	12 εβδομάδες
Κενό Συνθετικό	0.858	0.005
Κενό Ανθρώπινο	0.179	0.001
Κενό Βόειο	0.541	0.001
Συνθετικό Βόειο	0.693	0.002
Συνθετικό Ανθρώπινο	0.315	0.001
Βόειο Ανθρώπινο	0.583	0.001

**Πίνακας 5:** Συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το  $p < 0.05$ .

#### 4. Συζήτηση

Αναζητώντας το ιδανικό οστικό μόσχευμα, εκδηλώνεται η ανάγκη εύρεσης υλικών με ιδιότητες τέτοιες που θα μεγιστοποιούν το σχηματισμό νέου οστού, δεδομένου ότι διαφορετικά μοσχεύματα έχουν ετερογενή χαρακτηριστικά.

Η παρούσα μελέτη σε ζώα που αφορούσε σε διαφορετικά μοσχεύματα που τοποθετήθηκαν σε κρανιακά οστικά ελλείμματα χοίρων, επισήμανε παρατηρήσεις κατά τη φάση ενσωμάτωσης των υλικών σε ιστολογικό επίπεδο και διερεύνησε την ικανότητα αναγέννησης του οστού μέσω ιστομορφομετρικής ανάλυσης.

Σε αυτή την εργασία προέκυψε σύμφωνα με την ιστομορφομετρική αξιολόγηση ότι τα ελλείμματα των οστών που πληρώθηκαν με b-TCP χαρακτηρίστηκαν από πιο έντονο σχηματισμό οστού σε σύγκριση με τα άλλα μοσχεύματα στις 8 και 12 εβδομάδες μετεγχειρητικά. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με άλλα ερευνητικά πρωτόκολλα της διεθνούς αρθρογραφίας που περιγράφουν βέλτιστη αναγέννηση οστού σε αλλοπλαστικά υποκατάστατα οστών που περιέχουν b-TCP. Μια πρόσφατη μελέτη σε ακέραια μετεξακτικά φατνία που πληρώθηκαν με απορροφούμενο αλλοπλαστικό υλικό αποτελούμενο από b-TCP και πολυλακτίδιο-συν-γλυκολίδιο - PLGA - καταγράφει πιο έντονη παραγωγή νεόπλαστου οστού σε σύγκριση με κενά φατνία όπου έλαβε χώρα η φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης. Ωστόσο, αυτό το εύρημα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, πιθανότατα σύμφωνα με τους συγγραφείς, εξαιτίας του ελάχιστου αριθμού ζώων που χρησιμοποιήθηκαν και της παρουσίας παραγόντων που ευνόησαν τον σχηματισμό οστού στο κενό φατνίο, όπως η διατήρηση της ακεραιότητας του παρειικού οστού μετά την εξαγωγή και η χωρίς αναπέταση κρημονού χειρουργική επέμβαση [215]. Επίσης, σε ένα άλλο πείραμα που εφαρμόστηκε μCT σε κρανία

κουνελιών παρατηρήθηκε υψηλότερη περιεκτικότητα οστού σε ελείμματα στα οποία εμφυτεύθηκε b-TCP συνδυασμένο με θειικό ασβέστιο (b-TCP/CS) (33,70%), ακολουθούμενο από οστικά ελείμματα άνευ μοσχευμάτων (27,36%) και τελευταίο στη σειρά ταξινομήθηκε το ξενομόσχευμα βοοειδών (24,07%), 8 εβδομάδες μετά την εμφύτευση [216]. Ο σκοπός ενός άλλου πρόσφατου άρθρου ήταν να αξιολογήσει ένα υποκατάστατο οστικού μοσχεύματος (HA/b-TCP) για τη συντήρηση της φατνιακής ακρολοφίας μετά από εξαγωγή δοντιού, χωρίς συρραφή του τραύματος κατά πρώτο σκοπό ή εφαρμογή μεμβράνης. Η ιστομορφομετρική ανάλυση των δειγμάτων περιγράφει κατά μέσον όρο  $21,34 \pm 9,14\%$  νέο οστό, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η χρήση αυτού του υποκατάστατου οδηγεί σε αποτελεσματική διατήρηση του περιγράμματος της φατνιακής ακρολοφίας και παραγωγή επαρκούς νεόπλαστου οστού στις περιοχές τοποθέτησης του μοσχεύματος [217]. Μια συστηματική ανασκόπηση ανέλυσε τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένων δοκιμών αναφορικά με τοποθέτηση μοσχεύματος σε μετεξακτικά φατνία χωρίς αναπέταση κρημνού μετά από μια ελάχιστη περίοδο επούλωσης 12 εβδομάδων. Οι μέσες τιμές που προέκυψαν αποκάλυψαν την υψηλότερη περιεκτικότητα οστού στα φατνία που εφαρμόστηκαν αλλοπλαστικά υλικά (45,53%), ακολουθούμενες από φατνία χωρίς εμφύτευση μοσχεύματος (41,07%), ξενομοσχεύματα (35,72%) και αλλομοσχεύματα (29,93%) [218]. Σύμφωνα με μια άλλη επιστημονική μελέτη του Λεβέντη και συν. το b-TCP/CS που εισήχθη σε κраниακά οστικά ελείμματα κουνελιών απέδωσε 26,28% και 38,47% διάμεσες τιμές για νέο όγκο οστού στις 3 και 6 εβδομάδες αντίστοιχα μετά την εμφύτευση, χαρακτηριζόμενο από τους συγγραφείς ως βιοσυμβατό και οστεοκαθοδηγητικό υλικό [219]. Ο Yang και συν. χρησιμοποιώντας μCT ανάλυση για να μελετήσουν την απόδοση ενός οστικού μοσχεύματος b-TCP/CS σε σύγκριση με το διαθέσιμο τσιμέντο πολυμεθυλομεθακρυλικού όσο και με κενό οστικό έλλειμμα σε σπόνδυλικά οστά προβάτου, ανέφεραν υψηλότερη παραγωγή νέου οστού με



τη χρήση b-TCP/CS στις 8, 16 και 36 εβδομάδες παρατήρησης [220]. In vivo ιστολογική μελέτη που αξιολόγησε το οστεογενετικό δυναμικό του b-TCP/CS και ανθρώπινου απομεταλλομένου οστικού υποκατάστατου σε μη κρίσιμου μεγέθους οστικά ελλείμματα στην γνάθο κουνελιών επιβεβαίωσε ότι αμφότερα τα μοσχεύματα έχουν ικανότητα παραγωγής νέου οστού, παρότι με βραδύτερο ρυθμό από την αυθόρμητη επουλωτική διεργασία [221]. Ο Ποδαρόπουλος και συν. αξιολογώντας με ιστομορφομετρική ανάλυση το εμφυτευματικό υλικό b-TCP/CS σε σύγκριση με καθαρό b-TCP σε χειρουργικά προκλητά οστικά ελλείμματα στην λαγόνια ακρολοφία σκύλων Beagle ανέφεραν ότι η χρήση b-TCP/CS παρήγαγε 49.38 % νέο οστό έναντι 40.31 % με την εφαρμογή b-TCP και 17.77 % στην κενή κοιλότητα, 4 μήνες μετά την εμφύτευση [222]. Ο Jensen και συν. ανέφεραν ότι περισσότερο νεόπλαστο οστό σχηματίστηκε σε ελλείμματα όπου τοποθετήθηκε αυτομόσχευμα και b-TCP σε σχέση με εκείνα που ενταφιάστηκε ανόργανο βόειο οστό, ενώ δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ b-TCP και αυτομοσχεύματος, 8 εβδομάδες μετά την εμφύτευση σε ενήλικες μίνι χοίρους [112]. Τα ιστολογικά μας ευρήματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες σε ζώα που τεκμηριώνουν ταχύ ρυθμό απορρόφησης του b-TCP, πιθανότατα ως αποτέλεσμα συνδυασμού διεργασιών διάλυσης και άμεσης απορρόφησης με τη μεσολάβηση γιγαντοκυττάρων [223]. Μία πιθανή υπόθεση για τη σχετικά γρήγορη απορρόφηση αυτού του οστικού υποκατάστατου είναι η διαδικασία παραγωγής του υλικού, η χημική του σύνθεση με λόγο Ca / P 1.5, καθώς και η πορώδης κεραμική δομή του [127].

Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας 2 περίοδοι παρατήρησης επέτρεψε να προσδιοριστεί η δυναμική μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων αναφορικά με την παραγωγή οστού κατά την επουλωτική διαδικασία. Πράγματι, ένα ενδιαφέρον εύρημα της εργασίας μας ήταν ότι ενώ στις 8 εβδομάδες το b-TCP παρήγαγε λιγότερο νέο οστό συγκριτικά με την κενή

κοιλότητα, στις 12 εβδομάδες αυτό το υλικό βρέθηκε να ξεπερνά τα κενά βοθρία ως προς τον σχηματισμό οστίτη ιστού. Σε συμφωνία με τα δεδομένα αυτά, ο Hong και συν. περιγράφει ότι η παραγωγή νέου οστού σε μετεξακτικά φατνία σκύλων όπου εισήχθη b-TCP ήταν πιο έντονη στην σχετικά προχωρημένη φάση ωρίμανσης της οστικής επούλωσης στις 8 εβδομάδες, ενώ το ίδιο υλικό εμφάνιζε χαμηλότερο βαθμό παραγωγής οστού στις 2 και 4 εβδομάδες [223]. Σχετικά παρεμφερή είναι τα αποτελέσματα σε μια άλλη μελέτη όπου το b-TCP επέδειξε καθυστέρηση συγκριτικά με αυτομόσχευμα στα αρχικά στάδια, αλλά στις 8 εβδομάδες καταγράφηκε μεγαλύτερη παραγωγή οστού [112]. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και αρχικά θέτουν ερωτήματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα του εμφυτεύσιμων οστικών υλικών, μπορεί να ερμηνευθούν εξετάζοντας τις πιθανές αλλαγές και αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον του ξενιστή που μπορεί να υφίστανται κατά την επουλωτική διαδικασία. Όπως αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες, in vivo διεργασίες σε ιστολογικό επίπεδο με την προσθήκη μοσχευματικών υλικών ενδέχεται να περιπλέξουν, αναστείλουν ή να επιβραδύνουν την οστική επούλωση [224], [225]. Σε αυτό το σημείο σημειώνεται ότι σε μοριακό επίπεδο, φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1b και το TNF $\alpha$  μπορεί να επηρεάσουν την αναγέννηση των οστών παρεμποδίζοντας την διαφοροποίηση και ωρίμανση των οστεοβλαστών και επάγοντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα [226],[227]. Προσπαθώντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα στην ανάλυσή μας, φαίνεται ότι αυτά τα φαινόμενα αναφορικά με το b-TCP είναι πιο έντονα στις 8 εβδομάδες, αναστέλλοντας μέχρι ενός σημείου το δυναμικό ανάπλασης του οστού, και βαθμιαία υποστρέφουν κατά την φάση ωρίμανσης της οστικής επούλωσης στις 12 εβδομάδες, ευοδώνοντας πλέον την παραγωγή νέου οστού.

Όσον αφορά το βόειο ξενομόσχευμα και το ανθρώπινο αλλομόσχευμα που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι ο σχηματισμός νέου οστού είναι μικρότερος

συγκριτικά με το b-TCP, πιθανώς λόγω του σχετικά πιο αργού ρυθμού απορρόφησής τους όσο και των ενδεχόμενων ανασταλτικών διεργασιών με τη μεσολάβηση κυτοκινών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η μακροπρόθεσμη παρουσία μη απορροφήσιμων ή βραδέως απορροφήσιμων σωματιδίων του μόσχευματος ενδέχεται να παρεμποδίζει τον μηχανισμό επούλωσης του οστού, επηρεάζοντας αρνητικά την συνολική ποιότητα, ποσότητα και αρχιτεκτονική του ανακατασκευασμένου οστού [228].

Αυτές οι απόψεις εγείρουν διλήμματα αναφορικά με το μόσχευμα βοοειδών και αν είναι πραγματικά απορροφήσιμο, ένα ζήτημα που απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, στις αντίστοιχες ιστολογικές τομές της μελέτης μας, ταυτοποιήθηκαν πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα του τύπου των οστεοκλαστών σε εγγύτητα με τους κόκκους του εν λόγω υλικού, εντούτοις χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους, με απουσία κοιλοτήτων απορρόφησης. Πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα παρατηρήθηκαν επίσης σε σχέση με το b-TCP, αλλά, σε αντίθεση με το μόσχευμα βοοειδών, ενεργώς φαγοκυττάρωναν τεμαχίδια του υλικού, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες [229]. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, ο Artzi και συν. βρήκε ολική απορρόφηση σωματιδίων b-TCP σε σύγκριση με παραμένον ανόργανο βόειο μόσχευμα, 24 μήνες μετά τη χειρουργική επέμβαση σε πειραματικό μοντέλο σκύλου [230]. Επίσης, οι Mordenfeld και συν. πραγματοποιώντας ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση σε συλλεχθέν οστό, 11 χρόνια μετά την ανύψωση εδάφους ιγμορείου άντρου με αποπρωτεϊνωμένο βόειο και αυτόλογο μόσχευμα περιγράφουν ότι τα σωματίδια του ξενομοσχεύματος δεν απορροφήθηκαν, χωρίς σημαντικές μεταβολές στο μέγεθος των σωματιδίων, ωστόσο ήταν καλά ενσωματωμένα με ώριμο οστό [231]. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, όπου αξιολογήθηκε η απορρόφηση μόσχευματος βοοειδών μετά από ανύψωση εδάφους ιγμορείου άντρου σε κουνέλια 8 εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση, φάνηκε ότι το υλικό αυτό απορροφάται πολύ αργά,

οδηγώντας σε χαμηλό ρυθμό νέο-σχηματισμένου οστού καθότι η βιοαποδόμηση είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την αναγέννηση των οστών [232]. Ένα σχετικά αντικρουόμενο αποτέλεσμα σε μελέτες που εφαρμόζουν μοσχεύματα βοοειδών είναι το γεγονός ότι παρότι ο σχηματισμός νέου οστού είναι υποδεέστερος σε αυτόν τον τύπο συγκριτικά με άλλα μοσχεύματα, το συνολικό κλάσμα σκληρού ιστού (μόσχευμα και οστό) συχνά διαπιστώνεται ότι είναι υψηλότερο σε σχέση με άλλα υλικά. Μία εξήγηση μπορεί να είναι ότι η πλήρης ενσωμάτωση των σωματιδίων μοσχεύματος βοοειδών στο νέο οστό οδηγεί σε ένα πυκνό δίκτυο σκληρού ιστού συνολικά. Αυτό το μείγμα υλικού και νέου οστού που αποτελεί μια μορφή πυκνού, μεταλλοποιημένου ιστού αναγνωρίστηκε επίσης στα ιστολογικά μας δείγματα, με απουσία φλεγμονής ή ανάπτυξης συνδετικού ιστού.

Όσον αφορά το ανθρώπινο αλλομόσχευμα, όπως αναφέρθηκε ήδη, στην ανάλυση μας παρατηρήθηκε μειωμένη οστική αναγέννηση όσο και ρυθμός απορρόφησης των κοκκίων του υλικού. Ένας πιθανός μηχανισμός για αυτά τα φαινόμενα είναι η αυξημένη ανοσολογική απόκριση που θα μπορούσε να αναστείλει την αναγέννηση των οστών παρότι δεν υπήρχαν αξιόλογα φλεγμονώδη στοιχεία σε ιστολογικό επίπεδο [233]. Σύμφωνα με μια άλλη πιθανή εξήγηση, τα λυοφιλοποιημένα μεταλλοποιημένα αλλομοσχεύματα, όπως αυτό που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας, εμφανίζουν σχετικά αργό ρυθμό βιοαποδόμησης, φαινόμενο που αντιτάσσεται στην παραγωγή οστού, παραμένοντα παγιδευμένα στο περιβάλλον νεόπλαστο οστό, ενώ μετά την μεταλλοποίηση – ωρίμανση του οστού δεν απορροφώνται [234], [235].

Με βάση τις ιστολογικές παρατηρήσεις μας, είναι δυνατόν να υποστηρίξουμε ότι η βαθμιαία απορρόφηση – διάλυση των κόκκων του μοσχεύματος και η οστική αναγέννηση ακολουθούν διαφορετικό πρότυπο σε κάθε εμφυτευματικό υλικό πιθανότατα ως απότοκο

επαγωγής διαφορετικών μηχανισμών σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, όπως έχει αντίστοιχα σχολιασθεί και από προηγούμενες μελέτες [224][236].

Όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας ως έλλειμμα κρίσιμου μεγέθους ορίσθηκε από τους Schmitz και Hollinger το μικρότερο μέγεθος ενδοοστικού τραύματος σε ένα συγκεκριμένο οστό και είδος ζώου που δεν επουλώνεται αυθόρμητα κατά τη διάρκεια ζωής του ζώου ή ως το έλλειμμα εκείνο που δείχνει λιγότερο από 10% αναγεννητική ικανότητα κατά την διάρκεια ζωής του ζώου [190]. Μάλιστα σε ένα περαιτέρω βήμα έχει τεκμηριωθεί ότι η χρήση μονο-φλοιώδους ελλείμματος στο κρανιακό οστό χοίρων ικανοποιεί τις απαιτήσεις για να χαρακτηριστεί ως κρίσιμου μεγέθους, αντιπροσωπεύοντας μάλιστα μια λιγότερο επιπλεγμένη διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της οστικής αναγέννησης, πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε και στη δική μας μελέτη [195]. Το γεγονός εντούτοις ότι στην κενή κοιλότητα παρατηρήθηκε έντονη παραγωγή οστού τόσο στις 8 όσο και στις 12 εβδομάδες, καταλαμβάνοντας μάλιστα την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> θέση αντίστοιχα, σύμφωνα με την ιστομορφομετρική ανάλυση, μας επιτρέπει να εικάσουμε ότι το δεδομένο οστικό έλλειμμα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί κρίσιμου μεγέθους. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι στο συγκεκριμένο είδος χοίρου δεν πληρεί αυτές τις προϋποθέσεις καθότι κατά τα άλλα τα ζώα ήταν ενήλικα και οι διαστάσεις των ελλειμμάτων όπως είχαν προσδιορισθεί από τον Schlegel και συν.

Τέλος, αναφέρουμε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή οστού, όπως παρατηρήθηκε στη μελέτη μας, εντοπίσθηκε στην κενή κοιλότητα, σε σύγκριση με όλα τα οστικά μοσχεύματα στις 8 εβδομάδες και έναντι του βόειου και ανθρώπινου υποκατάστατου στις 12 εβδομάδες. Το δεδομένο αυτό παρότι φαίνεται αρχικά αινιγματικό, μπορεί να εξηγηθεί από τη θεωρία ότι η σχετικά μειωμένη απορροφητική διαδικασία των υλικών καθυστερεί την παραγωγή νέου οστού. Φυσικά, μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένης της αδυναμίας μηχανικής υποστήριξης της

δομικής ακεραιότητας του κενού ελλείμματος από τη διείδυση των μαλακών μορίων καθώς και η σχετικά ελλιπής πλήρωσή της κενής κοιλότητας με νέο οστό κυρίως στο κέντρο έναντι της περιφέρειας του ελλείμματος, δεδομένου ότι οι αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση, ενισχύουν τη χρήση εμφυτευματικών υλικών, ειδικά σε κοιλότητες κρίσιμου μεγέθους, ακόμη και αν παρουσιάζουν κάποια καθυστέρηση όσον αφορά την οστική αναγέννηση.

Είναι προφανές ότι η μελέτη της βιολογίας των οστικών μοσχευμάτων σε ζωικά μοντέλα παρουσιάζει μειονεκτήματα, αφού μπορούμε να έχουμε μόνο ενδείξεις σχετικά με την πιθανή ανταπόκριση τους στην ανθρώπινη φυσιολογία. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών είναι αρκετά δύσκολη, δεδομένου ότι μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στην επουλωτική διαδικασία, λόγω των ποικίλων ειδών χρησιμοποιούμενων ζώων και επίσης στον διαφορετικό τύπο οστών όπου αποφασίζεται η εφαρμογή του πειράματος. Επιπλέον πανομοιότυπα παρασκευασθέντα χειρουργικά ελλείμματα μπορεί να κρίνονται άλλοτε ως κρίσιμου και άλλοτε ως μη κρίσιμου μεγέθους, γεγονός που εξαρτάται όπως προαναφέρθηκε από ένα πληθος παραγόντων, ενώ η χημική όσο και θερμική επεξεργασία μπορεί να επηρεάσει τη μηχανική και βιολογική συμπεριφορά του υλικού, αποτελώντας συνήθη συγχυτικό παράγοντα. Το τελευταίο ενδέχεται να συμβαίνει σε μελέτες που συγκρίνουν μοσχεύματα που περιέχουν την ίδια πρώτη ύλη παρασκευασμένη ωστόσο από διαφορετικές εταιρείες, πιθανότατα εμφανίζοντας ποικιλία στην πορότητα ή την γεωμετρία των κόκκων όσο και σε ποικίλες άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Για τους λόγους αυτούς θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων από διάφορες μελέτες πρέπει να είναι πολύ φειδωλή και προσεκτική, καθώς διάφορα υλικά από διαφορετικούς εμπορικούς κατασκευαστές δοκιμάζονται σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα όσο και σε διαφορετικό ανατομικά τύπο οστών και μέγεθος ελλειμμάτων.

Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι το ιδανικό οστικό μόσχευμα είναι ένας υποκειμενικός χαρακτηρισμός, ανάλογα με τις συνθήκες και τις απαιτήσεις για την εκάστοτε περίπτωση δεδομένου ασθενή. Διαφορετικές ιδιότητες είναι απαραίτητες για ένα οστικό μόσχευμα που εφαρμόζεται για την ανύψωση του ιγμορείου άντρου σε σύγκριση με άλλες περιπτώσεις. Στην περίπτωση ανύψωσης των ιγμορείων άντρων ή σε χρήση τους ως επένθετα μόσχευματα, τα εμφυτεύματα βοοειδών φαίνεται να είναι πιο ενδεικτικά λόγω του χαμηλού ποσοστού απορρόφησης καθότι η διατήρηση του όγκου αποτελεί το πρωταρχικό ζητούμενο. Από την άλλη πλευρά, σε ελλείμματα με σχετικά ανένδοτα και επαρκή οστικά τοιχώματα όπως σε άθικτα μετεξλεκτικά φατνία όπου η πιθανότητα διατήρησης του όγκου του κενού είναι ιδιαίτερα μεγάλη και προβλέψιμη, υλικά με υψηλό ρυθμό απορρόφησης όπως το b-TCP που αντικαθίστανται πλήρως με νέο οστό φαίνονται πιο ενδεικτικά.

## 5. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη συνέκρινε ποιοτικά και ποσοτικά το οστεογενετικό δυναμικό οστικών μοσχευμάτων συνθετικής, βόειας και ανθρώπινης προέλευσης καθώς και σε σχέση με τη φυσική επούλωση των οστών σε κενή κοιλότητα, σε ένα προτυποποιημένο ζωικό μοντέλο χοίρου, χρησιμοποιώντας κατάλληλη ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας παρατίθενται συνοπτικά παρακάτω: 1. Το μόσχευμα b-TCP επέδειξε πιο έντονη παραγωγή νέου οστού συγκριτικά με το βόειο και το ανθρώπινο μόσχευμα στις 8 και 12 εβδομάδες, 2. Ενώ το b-TCP εμφάνισε μικρότερη παραγωγή νέου οστού συγκριτικά με την κενή οστική κοιλότητα στις 8 εβδομάδες, στην σχετικά πιο ώριμη φάση της επουλωτικής διεργασίας των 12 εβδομάδων παρουσίασε μεγαλύτερη ανάπτυξη οστίτη ιστού, 3. Το βόειο και το ανθρώπινο μοσχευματικό υλικό επέδειξαν μικρότερη παραγωγή οστού έναντι της κενής κοιλότητας στις 8 και 12 εβδομάδες, 4. Σύμφωνα με την ιστολογική αξιολόγηση το b-TCP εμφάνισε τον πιο έντονο ρυθμό απορρόφησης - διάλυσης στο διάστημα μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων έναντι του βόειου και του ανθρώπινο μοσχεύματος όπου τα σωματίδιά τους, ιδιαίτερα του βόειου υποκατάστατου, εμφανίζονταν σχετικά άθικτα, χωρίς αξιόλογη ικανότητα αποδόμησης, 5. Η κενή κοιλότητα παρουσίασε έντονη παραγωγή οστού τόσο στις 8 όσο και στις 12 εβδομάδες, καταλαμβάνοντας μάλιστα την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> θέση αντίστοιχα, σύμφωνα με την ιστομορφομετρική ανάλυση, γεγονός που μας επιτρέπει να εικάσουμε ότι το δεδομένο οστικό έλλειμμα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί κρίσιμου μεγέθους στο συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο χοίρου, 6. Είναι ιδιαίτερα εμφανές ότι τα προαναφερθέντα υλικά οστικής ανάπλασης διαθέτουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, γεγονός που επηρεάζει το πρότυπο αποδόμησης τους όσο και την οστική αναγέννηση, και 7. Όλα τα υλικά εμφάνισαν οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, με απύουσα



την επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης και αντίδρασης ξένου σώματος από τον οργανισμό, επιβεβαιώνοντας την ικανοποιητική βιοσυμβατότητά τους.

## **6. Παράρτημα**

Κατηγορία	Είδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εμπορική ονομασία
<b>Αυτομοσχεύματα</b> + <b>Ισομοσχεύματα</b>	<b>Εξωστοματικά</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Κρανίο</li> <li>• Κνήμη</li> <li>• Περώνη</li> <li>• Λαγόνια ακρολοφία</li> <li>• Πλευρά</li> <li>• Ζυγωματικό οστό</li> </ul> <b>Ενδοστοματικά</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Τοίχωμα ιγμορείου άντρου</li> <li>• Πρόσθια ρινική άκανθα</li> <li>• Κλάδος - κορωνοειδής απόφυση κάτω γνάθου</li> <li>• Γενειακή σύμφυση</li> <li>• Υπερώα</li> <li>• Τομικό τρήμα</li> <li>• Εξοστώσεις</li> <li>• Γναθιαίο όγκωμα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οστεογενετικό</li> <li>• Οστεοεπαγωγικό</li> <li>• Οστεοκαθοδηγητικό</li> <li>• Αποκλεισμός μετάδοσης ασθενειών ή ανοσογονικότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Νοσηρότητα δότριας θέσης</li> <li>• Περιορισμένη ποσότητα</li> <li>• Πιθανή νοσηλεία σε νοσοκομείο – για εξωστοματικές θέσεις</li> </ul>	

<b>Αλλομοσχεύματα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Νωπό κατεψυγμένο</li> <li>• Κατεψυγμένο, αφυδατωμένο</li> <li>• Απομεταλλοποιημένο, κατεψυγμένο, αφυδατωμένο</li> <li>• Αφαλατωμένη οστική θεμέλια ουσία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οστεοκαθοδηγητικό</li> <li>• Οστεοεπαγωγικό</li> <li>• Σχετική διαθεσιμότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μετάδοση ασθενειών και ανοσογονικότητα</li> <li>• Διακύμανση ιδιοτήτων εξαρτώμενων από μέθοδο παρασκευής</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allogro</li> <li>• DBX</li> <li>• Demokritos</li> <li>• DynaBlast</li> <li>• Dynagraft</li> <li>• Grafton</li> <li>• MTF</li> <li>• Opteform</li> <li>• OsteoSponge</li> <li>• Puros</li> <li>• Raptos</li> </ul>
<b>Ξενομοσχεύματα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βόειο</li> <li>• Χοίρειο</li> <li>• Ίππειο</li> <li>• Κοραλιογενές</li> <li>• Άλγη</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οστεοκαθοδηγητικό</li> <li>• Υψηλή διαθεσιμότητα</li> <li>• Χαμηλό κόστος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μετάδοση ασθενειών και ανοσογονικότητα</li> <li>• Διακύμανση ιδιοτήτων εξαρτώμενων από μέθοδο παρασκευής</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aligpore</li> <li>• Biocoral</li> <li>• Bio-Oss</li> <li>• Cerabone</li> <li>• Endobon</li> <li>• Gen-OS</li> <li>• Interporo 200</li> <li>• LubboC</li> <li>• Osteograf/N</li> </ul>

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Osteobiol</li> <li>• Pro Osteon</li> <li>• The graft</li> </ul>
<b>Αλλοπλαστικά</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Υδροξυαπατίτης</li> <li>• Φωσφορικό ασβέστιο</li> <li>• Ανθρακικό ασβέστιο</li> <li>• Θεϊκό ασβέστιο</li> <li>• HTR polymer</li> <li>• Βιοενεργός ύαλος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οστεοκαθοδηγητικό</li> <li>• Ευρέως διαθέσιμο</li> <li>• Χαμηλό κόστος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διακύμανση ιδιοτήτων εξαρτώμενων από μέθοδο παρασκευής</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biogran</li> <li>• BonePlast</li> <li>• Calcibone</li> <li>• Calc-i-oss</li> <li>• Cortoss</li> <li>• Eurobone</li> <li>• Guidor easy-graft</li> <li>• Hydroset</li> <li>• IngeniOs</li> <li>• Macrobone</li> <li>• Ostim</li> <li>• Perioglass</li> <li>• Rhakoss</li> <li>• Vitoss</li> </ul>

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση των μοσχευματικών υλικών σε κατηγορίες βάσει της προέλευσής τους, πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα καθεμιάς εξ αυτών και διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα.

Α. Εξωστοματικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Επιπλοκές
<b>Κρανίο</b> [237]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικρή απορρόφηση</li> <li>• Υψηλή σταθερότητα</li> <li>• Μικρή νοσηρότητα δέκτηριας θέσης</li> <li>• Επαρκής ποσότητα</li> <li>• Ουλή καλυμμένη από τριχωτό κεφαλής</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως φλοιώδες οστό</li> <li>• Ανάγκη γενικής αναισθησίας</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τραυματισμός μηνίγγων</li> <li>• Επισκληρίδιο αιμάτωμα</li> <li>• Αλωπεκία</li> </ul>
<b>Περώνη</b> [238]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επαρκής ποσότητα</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μεγάλη τομή</li> <li>• Ανάγκη γενικής αναισθησίας</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μερικώς περιορισμός κινήσεων άρθρωσης</li> <li>• Αστάθεια αστράγαλου</li> <li>• Μυϊκή αδυναμία</li> <li>• Μεγάλη ουλή</li> </ul>
<b>Λαγόνια ακρολοφία</b> [239]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επαρκής ποσότητα</li> <li>• Ιδανικό για επένθετο μόσχευμα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 12-60 % απορρόφηση</li> <li>• Ανάγκη γενικής αναισθησίας</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πυελική αστάθεια</li> <li>• Κάταγματα κόπωσης</li> <li>• Κήλη</li> <li>• Συρίγγιο</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κάκωση ουρητήρα</li> <li>• Έκτοπος σχηματισμός οστού</li> </ul>
<b>Κερκίδα</b> [240]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> <li>• Δεν απαιτείται γενική αναισθησία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περιορισμένη ποσότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τενοντοελυτρίτιδα de Quervain</li> <li>• Τοπική λοίμωξη μαλακών μορίων</li> <li>• Κάταγμα</li> <li>• Επιπολής νεύρωμα</li> </ul>
<b>Πλευρά</b> [241]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μπορούν να διαιρεθούν για διπλασιασμό της επιφάνειας του μοσχεύματος</li> <li>• Αναγέννηση δότριας θέσης</li> <li>• Επαρκές μήκος μοσχεύματος που μπορεί να γεφυρώσει μεγάλα ελείμματα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φλοιώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πνευμοθώρακας</li> <li>• Συμπύεση θωρακικού τοιχώματος</li> <li>• Πλευριτικός πόνος</li> </ul>
<b>Κνήμη</b> [242]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επαρκής ποσότητα σπογγώδους οστού</li> <li>• Πιθανή λήψη με τοπική αναισθησία</li> <li>• Ελάχιστη ουλή</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Λαμβανόμενο σπογγώδες οστό κατώτερης ποιότητας συγκριτικά με λαγόνια ακρολοφία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διαταραχή βαδίσματος</li> <li>• Είσοδος στον αρθρικό χώρο</li> <li>• Οίδημα</li> <li>• Παραίσθησία</li> <li>• Κάταγμα κνήμης</li> </ul>
<b>Β. Ενδοστοματικά</b>			

<b>Πρόσθιο τοίχωμα ιγμορείου άντρου [243]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Δέκτρια θέση σε εγγύτητα</li> <li>• Μικρή απορρόφηση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως φλοιώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάσχιση μεμβράνης ιγμορείου άντρου</li> </ul>
<b>Πρόσθια ρινική άκανθα [244]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Μικρή νοσηρότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περιορισμένη ποσότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Διάσχιση μεμβράνης</li> <li>• Αισθητική μεταβολή</li> </ul>
<b>Κλάδος κάτω γνάθου [245]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Προτιμητέα θέση από ασθενείς έναντι γενειακής σύμφυσης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως φλοιώδες οστό</li> <li>• Περιορισμένο σχήμα και μέγεθος μοσχεύματος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τρώση κάτω φατνιακού ή/και γλωσσικού νεύρου</li> <li>• Τρισμός</li> <li>• Αιμάτωμα</li> <li>• Κάταγμα</li> </ul>
<b>Κορωνοειδής απόφυση [246]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Απουσία ουλής</li> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Μικρή νοσηρότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Απαιτεί νοσηλεία σε νοσοκομείο</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τρισμός</li> <li>• Τραυματισμός παρειακού κλάδου τριδύμου νεύρου</li> </ul>
<b>Τομικό τρήμα [247]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> <li>• Οστεοπρογονικά κύτταρα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Σπογγώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τραυματισμός δοντιού</li> </ul>
<b>Γενειακή σύμφυση [248]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> <li>• Μικρότερη νοσηρότητα έναντι κλάδου</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ποικίλες μετεγχειρητικές επιπλοκές</li> <li>• Μικρού – μετρίου μεγέθους ελείμματα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τρώση υπογλώσσιας και υπογενειδίας αρτηρίας</li> <li>• Τρώση οδοντικών ριζών</li> <li>• Παραίσθησία γενειακού</li> </ul>



			νεύρου – μεταβολή αισθητικότητας κάτω χείλους <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μεταβολή περιγράμματος προσώπου</li> </ul>
<b>Γναθιαίο όγκωμα [249]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικρή νοσηρότητα</li> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> <li>• Οστεοπρογονικά κύτταρα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πτωχή ποιότητα και ποσότητα οστού</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Στοματοκολπικό συρίγγιο</li> <li>• Αιμάτωμα</li> </ul>
<b>Υπερώα [250]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικρή νοσηρότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περιορισμένη ποσότητα</li> <li>• Δυσκολία πρόσβασης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τραυματισμός δοντιού</li> <li>• Τρώση εδάφους ρινός</li> </ul>
<b>Εξόστωση [251]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Μικρή νοσηρότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως φλοιώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τραυματισμός γλωσσικού νεύρου</li> <li>• Τραυματισμός αγγείων εδάφους στόματος</li> </ul>
<b>Ζυγωματικό οστό [252]</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ευκολία συλλογής οστού</li> <li>• Φλοιο-σπογγώδες οστό</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περιορισμένη ποσότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οφθαλμικές επιπλοκές</li> </ul>

**Πίνακας 2:** Ενδοστοματικές και εξωστοματικές θέσεις λήψης αυτομοσχευμάτων, πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα και πιθανές επιπλοκές.

## 7. Περίληψη

Η αναγέννηση μεγάλων οστικών ελλειμμάτων παραμένει μια κλινική πρόκληση. Για να αποφευχθεί η πλημμελής οστική αποκατάσταση των οστών, εφαρμόζονται οστικά μοσχεύματα για να υποστηρίξουν την επουλωτική διαδικασία.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση *in vivo* της ανάπτυξης νεόπλαστου οστού όσο και η παρατήρηση σε ιστολογικό επίπεδο των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την ενσωμάτωση των υλικών, χρησιμοποιώντας 3 εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα οστικής ανάπλασης σε μονο-φλοιώδη κρανιακά ελλείμματα χοίρων. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν: α. ένα συνθετικό οστικό υποκατάστατο (Calc-i-oss classic, Sunstar Guidor, Switzerland), β. ένα ανθρώπινο οστικό παράγωγο (Demokritos, National Centre for Scientific Research tissue bank, Athens, Greece), γ. ένα ξενομόσχευμα βόειας προέλευσης (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), καθώς και δ. ένα οστικό έλλειμμα άνευ μοσχεύματος, σε χειρουργικά προετοιμασμένες οστικές κοιλότητες.

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα σε 2 ομάδες, θυσιαστήκαν στις 8 και 12 εβδομάδες και τα συλλεχθέντα ιστοτεμάχια αξιολογήθηκαν ποιοτικά με ιστολογική εξέταση και ποσοτικά ως προς την παραγωγή νέου οστού μέσω ιστομορφομετρίας.

Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας παρατίθενται συνοπτικά παρακάτω: 1. Το μόσχευμα b-TCP επέδειξε πιο έντονη παραγωγή νέου οστού συγκριτικά με το βόειο και το ανθρώπινο μόσχευμα στις 8 και 12 εβδομάδες, 2. Ενώ το b-TCP εμφάνισε μικρότερη παραγωγή νέου οστού συγκριτικά με την κενή οστική κοιλότητα στις 8 εβδομάδες, στην σχετικά πιο ώριμη φάση της επουλωτικής διεργασίας των 12 εβδομάδων παρουσίασε μεγαλύτερη ανάπτυξη οστίτη ιστού, 3. Το βόειο και το ανθρώπινο μοσχευματικό υλικό επέδειξαν μικρότερη παραγωγή οστού έναντι

της κενής κοιλότητας στις 8 και 12 εβδομάδες, 4. Σύμφωνα με την ιστολογική αξιολόγηση το b-TCP εμφάνισε τον πιο έντονο ρυθμό απορρόφησης - διάλυσης στο διάστημα μεταξύ 8 και 12 εβδομάδων έναντι του βόειου και του ανθρώπινο μόσχευματος όπου τα σωματίδιά τους, ιδιαίτερα του βόειου υποκατάστατου, εμφανίζονταν σχετικά άθικτα, χωρίς αξιόλογη ικανότητα αποδόμησης, 5. Η κενή κοιλότητα παρουσίασε έντονη παραγωγή οστού τόσο στις 8 όσο και στις 12 εβδομάδες, καταλαμβάνοντας μάλιστα την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> θέση αντίστοιχα, σύμφωνα με την ιστομορφομετρική ανάλυση, γεγονός που μας επιτρέπει να εικάσουμε ότι το δεδομένο οστικό έλλειμμα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί κρίσιμου μεγέθους στο συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο χοίρου, 6. Είναι ιδιαίτερα εμφανές ότι τα προαναφερθέντα υλικά οστικής ανάπλασης διαθέτουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, γεγονός που επηρεάζει το πρότυπο αποδόμησης τους όσο και την οστική αναγέννηση, και 7. Όλα τα υλικά εμφάνισαν οστεοκαθοδηγητικές ιδιότητες, με απύουσα την επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης και αντίδρασης ξένου σώματος από τον οργανισμό, επιβεβαιώνοντας την ικανοποιητική βιοσυμβατότητά τους.

**Λέξεις κλειδιά:** μόσχευμα φατνιακής ακρολοφίας; οστικά υποκατάστατα; οστική αναγέννηση; υλικό αντικατάστασης του οστού

## **8. Abstract**

Regeneration of large jaw bone defects still remains a clinical challenge. To avoid incomplete bone repair, bone grafts have been advocated to support healing process.

The aim of this study was to evaluate *in vivo* the development of newly formed bone as well as to observe at histologic level the processes that take place during the incorporation of materials, using 3 commercially available bone grafting products in mono-cortical calvaria porcine defects. In details, we evaluated: a. a synthetic bone substitute (Calc-i-oss classic, Sunstar Guidor, Switzerland), b. a human bone derivative (Demokritos, National Center for Scientific Research tissue bank, Athens, Greece), c. a bovine derived xenograft (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), as well as d. an empty bone deficit, in surgically prepared bone cavities.

Animals were randomized in 2 groups, sacrificed at 8 and 12 weeks, and the tissues collected were evaluated qualitatively by histologic examination and quantitatively regarding the production of new bone through histomorphometry.

The results of our research are summarized below: 1. The b-TCP graft exhibited more intense production of new bone compared to the bovine and the human graft at 8 and 12 weeks, 2. While b-TCP was found to produce less bone production compared to the empty bone cavity at 8 weeks, in the relatively more mature phase of the healing process at 12 weeks showed greater bone tissue growth, 3. Bovine and human transplant material showed less bone production compared to the empty cavity at 8 and 12 weeks, 4. According to histologic evaluation, b-TCP showed the most intense rate of absorption - dissolution in the period between 8 and 12 weeks compared to bovine and human graft, where their particles, especially those of the bovine

substitute, appeared relatively intact, without remarkable decomposition ability, 5. The empty cavity exhibited intense bone production at both 8 and 12 weeks, occupying the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> place respectively, according to the histomorphometric analysis, which allows us to suggest that the given bone defect cannot be classified as critical in this particular porcine animal model, 6. It is particularly evident that the aforementioned bone regeneration materials have different characteristics, which affects their degradation pattern as well as bone regeneration, and 7. All materials exhibited osteoconductive properties, with the absence of inflammatory response and foreign body reaction, confirming their satisfactory biocompatibility.

**Keywords:** alveolar bone grafting; bone substitutes; bone regeneration; bone replacement material

## **9. Βιβλιογραφία**

1. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4):267-276.
2. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(Suppl 3):131-139. doi: 10.2215/CJN.04151206.
3. Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1314-1320. doi: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94.
4. Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, Popoff SN. Bone Structure, Development and Bone Biology: Bone Pathology. *Bone Pathology.* 2009. doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9
5. Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford).* 2015;33(1):1–6. doi:10.1016/J.MPSUR.2014.10.010.
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.
7. Camozzi V, Vescini F, Luisetto G, Moro L. Bone organic matrix components: their roles in skeletal physiology. *J Endocrinol Invest.* 2010;33(7 Suppl):13-15.
8. Miller A. Collagen: the organic matrix of bone. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1984;304(1121):455-477. doi: 10.1098/rstb.1984.0040.

9. Almeida Paz ICL, Bruno LDG. Bone mineral density: review. *Rev Bras Cienc Avic.* 2006; 8(2):69-73. doi:10.1590/S1516-635X2006000200001.
10. Green J. The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(1-2):7-15.
11. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:3-12. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.003.
12. Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene.* 2005;357(1):1-8. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.017.
13. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005;8(5):739-750. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.
14. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8(5):751-764. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.017.
15. Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(2):109-124. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i2.20.
16. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone

resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005;434(7032):514-520. doi: 10.1038/nature03398.

**17.** Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.

**18.** Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(Suppl 3):131-139. doi: 10.2215/CJN.04151206.

**19.** Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7260-7264.

**20.** Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1566-1571. doi.org/10.1073/pnas.97.4.1566.

**21.** Teitelbaum SL, Abu-Amer Y, Ross FP. Molecular mechanisms of bone resorption. *J Cell Biochem*.(1995);59(1):1–10. doi:10.1002/jcb.240590102.

**22.** Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-145. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203.



- 23.** Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today*. 2008;13(21-22):932-943. doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.010.
- 24.** Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):522-536. doi: 10.1038/nrendo.2013.137.
- 25.** Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229-238. doi: 10.1002/jbmr.320.
- 26.** Civitelli R, Lecanda F, Jørgensen NR, Steinberg TH. Intercellular Junctions and Cell-Cell Communication in Bone. 2002;287–302. doi:10.1016/B978-012098652-1.50120-7.
- 27.** Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:281-290.
- 28.** Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone*. 1997;20(3):273-282.
- 29.** Väänänen HK, Härkönen PL. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas*, 1996;23 Suppl:S65-69.
- 30.** Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*. 1989;3(3):953-960.
- 31.** Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*. 1994;55(3):287–299. doi:10.1002/jcb.240550304.

- 32.** Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):77-90. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.1.77.
- 33.** Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015;80:14-18. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.035.
- 34.** Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13 Suppl 1:S3-6.
- 35.** Hinton RJ, Jing Y, Jing J, Feng JQ. Roles of chondrocytes in endochondral bone formation and fracture repair. *J Dent Res.* 2017;96(1):23-30. doi: 10.1177/0022034516668321.
- 36.** Aghajanian P, Mohan S. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Research.* 2018;6(1):19. doi:10.1038/s41413-018-0021-z.
- 37.** Houschyar KS, Tapking C, Borrelli MR, Popp D, Duscher D, Maan ZN, Chelliah MP, Li J, Harati K, Wallner C, Rein S, Pfürringer D, Reumuth G, Grieb G, Mouraret S, Dadras M, Wagner JM, Cha JY, Siemers F, Lehnhardt M, Behr B. Wnt pathway in bone repair and regeneration – What do we know so far. *Front Cell Dev Biol.* 2019;6:170. doi:10.3389/fcell.2018.00170.
- 38.** Mosekilde L. The effect of modelling and remodelling on human vertebral body architecture. *Technol Health Care.* 1998;6(5-6):287-297.
- 39.** Dahlin C, Obrecht M, Dard M, Donos N. Bone tissue modelling and remodelling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate

materials presenting different microporosity. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(7):814-822. doi: 10.1111/clr.12361.

**40.** Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(5):701-722. doi: 10.1016/j.beem.2008.07.006.

**41.** Bartl R, Bartl C. Modelling and Remodelling of Bone. *Bone Disorders*, Springer International Publishing, 2017;21–30.

**42.** 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. doi: 10.1002/jcb.10435.

**43.** Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):513-520. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513.

**44.** Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1004-1014. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.6.1004.

**45.** Cho HH, Kyoung KM, Seo MJ, Kim YJ, Bae YC, Jung JS. Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2006;15(6):853-864. doi: 10.1089/scd.2006.15.853.

- 46.** Balga R, Wetterwald A, Portenier J, Dolder S, Mueller C, Hofstetter W. Tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro. *Bone*. 2006;39(2):325-335. doi: 10.1016/j.bone.2006.02.056.
- 47.** Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*. 2007;41(6):928-936. doi: 10.1016/j.bone.2007.07.022.
- 48.** Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. *Bone*. 2009;45(2):254-266. doi: 10.1016/j.bone.2009.04.239.
- 49.** Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*. 2006;38(12):1424-1429. doi: 10.1038/ng1916.
- 50.** Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, Wang K, Zou Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(3):217-223. doi: 10.1007/s00395-005-0521-z.
- 51.** Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*. 2009;27(8):1887-1898. doi: 10.1002/stem.103.

- 52.** Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):813-823. doi: 10.1002/art.24330.
- 53.** Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392-1404. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.019.
- 54.** Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1215-1228. doi: 10.1369/jhc.6A6959.2006.
- 55.** Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury.* 2009;40 Suppl 3:S4-7. doi: 10.1016/S0020-1383(09)70003-8.
- 56.** Ai-Aql 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. doi: 10.1177/154405910808700215.
- 57.** Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?. *Injury.* 2007;38 Suppl 1:S11-25. doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006.
- 58.** Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, Graves DT, Rueger JM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately

regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*. 2005;36(2):300-310. doi: 10.1016/j.bone.2004.10.010.

**59.** Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S45-57. doi: 10.1016/S0020-1383(08)70015-9.

**60.** Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-114. doi: 10.22203/ecm.v015a08.

**61.** Breur GJ, VanEnkevort BA, Farnum CE, Wilsman NJ. Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*. 1991;9(3):348-359. doi: 10.1002/jor.1100090306.

**62.** Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem*. 2009;106(3):353-362. doi: 10.1002/jcb.22020.

**63.** Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*. 1999;14(11):1805-1815. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.11.1805.

**64.** Ketenjian AY, Arsenis C. Morphological and biochemical studies during differentiation and calcification of fracture callus cartilage. *Clin Orthop Relat Res*. 1975;(107):266-273. doi: 10.1097/00003086-197503000-00031.

**65.** Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S7-21. doi: 10.1097/00003086-199810001-00003.

- 66.** Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179-186. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0038.
- 67.** Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(10 Suppl):S4-6. doi: 10.1097/00005131-200511101-00002.
- 68.** Green E, Lubahn JD, Evans J. Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *J Surg Orthop Adv.* 2005;14(2):64-72.
- 69.** Rutgers M, Ring D. Treatment of diaphyseal fractures of the humerus using a functional brace. *J Orthop Trauma.* 2006;20(9):597-601. doi:10.1097/01.bot.0000249423.48074.82.
- 70.** Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003;8(21):980-989. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02866-6.
- 71.** van Meekeren J. Heel en Geneeskunstige Aanmerkkingen. C.Commelijn, Amsterdam, 1668.
- 72.** Haeseker B. Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and surgery of the hand. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 82:539-46.
- 73.** de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop.* 1988; 226:292-8.
- 74.** von Walter P. Wiedereinheilung der bei der Trapanation ausgebohrten knochenscheibe. *Journal der Chirurgie und Augen-Heilkunde .* 1821; 2:571.

- 75.** Hahn E. Eine méthode pseudarthrosen der tibia mit knochendefect zur heilung zu bringen. Zentralblatt fur Chirurgie 1884; 11:337.
- 76.** Orr HW. The history of bone transplantation in general and orthopedic surgery. Am J Surg. 1939; 43:547.
- 77.** Macewen W. Observations concerning transplantation on bone. Proc R Soc Lond 1881; 32:232.
- 78.** Duhamel HL. Sur le développement et la crue des os des animaux. Mem Acad R Sci. 1742;55: 354-370.
- 79.** de Hayde A. Anatomia Mytuli, Subjecta centuria Observatorium. Janssonio Waesbergios, Amsterdam. 1684.
- 80.** Von Haller A. Experimentorum de ossium formatione. Opera minora. 1763;2.
- 81.** Flourens P. Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés. Ballière. 1842.
- 82.** Barth A. Über histologische befunde nach knochenimplantationen am menschen. DtschZ Chir. 1893; 91:388.
- 83.** Axhausen G. Histologische Studien über die Ursachen und den blauf des Knochenumbaus im osteoplastischen Karzinom. Virchows Archiv. 1909;195(2):358-368.
- 84.** Albee FH. Bone graft surgery. Saunders, Philadelphia. 1915.
- 85.** Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. J Pharm Bioallied Sci. 2013;5(Suppl 1):S125-127. doi: 10.4103/0975-7406.113312.



- 86.** Liu XL, Shi B, Zheng Q, Li CH. Alveolar Bone Grafting and Cleft Lip and Palate: A Review. *Plast Reconstr Surg.* 2017;140(2):359e-360e. doi: 10.1097/PRS.00000000000003550.
- 87.** Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000. 1999;19:151-163. doi: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00153.x.
- 88.** Malinin TI, Temple HT, Garg AK. Bone Allografts in Dentistry: A Review. *Dentistry* 2014;4:199. doi:10.4172/2161-1122.1000199.
- 89.** Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88(6):701-705. doi: 10.1302/0301-620X.88B6.17524.
- 90.** Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;(371):10-27.
- 91.** Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016;98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
- 92.** Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014.
- 93.** Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):235-239.

- 94.** Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* 1991;2(3):187-208.
- 95.** Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4.
- 96.** Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24 Suppl:237-259.
- 97.** Singh J, Takhar RK, Bhatia A, Goel A. Bone Graft Materials : Dental Aspects. *J Nov Res Health Nurs.* 2016;3(1): 99–103.
- 98.** Barone A, Covani U. Maxillary alveolar ridge reconstruction with nonvascularized autogenous block bone: clinical results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(10):2039-2046.
- 99.** Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent.* 1992;1(1):11-21.
- 100.** Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(4):392-402. doi: 10.1016/j.oooo.2016.04.010.
- 101.** Moran CG, Wood MB. Vascularized bone autografts. *Orthop Rev.* 1993;22(2):187-197.

- 102.** Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(5):574-579.
- 103.** Piattelli A, Podda G, Scarano A. Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials.* 1997;18(8):623-627.
- 104.** Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynepas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res.* 2017;21:9. doi: 10.1186/s40824-017-0095-5.
- 105.** Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1063-1077. doi: 10.1016/j.addr.2012.06.008.
- 106.** Aro HT, Aho AJ. Clinical use of bone allografts. *Ann Med.* 1993;25(4):403-412.
- 107.** Shibuya N, Jupiter DC. Bone graft substitute: allograft and xenograft. *Clin Podiatr Med Surg.* 2015;32(1):21-34. doi: 10.1016/j.cpm.2014.09.011.
- 108.** Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, Lorenzoni F, Witek L, Coelho PG. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(2):251-260. doi: 10.1016/j.ijom.2013.07.005.
- 109.** Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014;9(1):18. doi: 10.1186/1749-799X-9-18.

- 110.** Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 1996;35(5):413-417.
- 111.** Tauro JC, Parsons JR, Ricci J, Alexander H. Comparison of bovine collagen xenografts to autografts in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;(266):271-84.
- 112.** Jensen SS, Broggin N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(3):237-243. doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01257.x.
- 113.** McDuffee LA, Anderson GI. In vitro comparison of equine cancellous bone graft donor sites and tibial periosteum as sources of viable osteoprogenitors. *Vet Surg.* 2003;32(5):455-463.
- 114.** Rivara F, Negri M, Lumetti S, Parisi L, Toffoli A, Calciolari E, Manfredi E, Macaluso GM. Maxillary Sinus Floor Augmentation Using an Equine-Derived Graft Material: Preliminary Results in 17 Patients. *BioMed Research International.* 2017; 1–6. doi:10.1155/2017/9164156.
- 115.** Salamanca E, Lee WF, Lin CY, Huang HM, Lin CT, Feng SW, Chang WJ. A Novel Porcine Graft for Regeneration of Bone Defects. *Materials (Basel).* 2015;8(5):2523–2536. doi: 10.3390/ma8052523.
- 116.** Salamanca E, Hsu CC, Huang HM, Teng NC, Lin CT, Pan YH, Chang WJ. Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Scientific Reports.* 2015;8(1):984. doi.org/10.1038/s41598-018-19629-y.

- 117.** Barone A, Ricci M, Covani U, Nannmark U, Azarmehr I, Calvo-Guirado JL. Maxillary sinus augmentation using prehydrated corticocancellous porcine bone: histomorphometric evaluation after 6 months. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(3):373-379. doi: 10.1111/j.1708-8208.2010.00274.x.
- 118.** Lee JH, Yi GS, Lee JW, Kim DJ. Physicochemical characterization of porcine bone-derived grafting material and comparison with bovine xenografts for dental applications. *J Periodontal Implant Sci.* 2017;47(6):388-401. doi: 10.5051/jpis.2017.47.6.388.
- 119.** Gille J, Dorn B, Kekow J, Bruns J, Behrens P. Bone substitutes as carriers for transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)). *Int Orthop.* 2002;26(4):203-206. doi.org/10.1007/s00264-002-0353-5.
- 120.** Turhani D, Cvikl B, Watzinger E, Weissenböck M, Yerit K, Thurnher D, Lauer G, Ewers R. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(6):793-799.
- 121.** Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G. Sinus augmentation with phyco-gene hydroxyapatite: histological and histomorphometrical results after 6 months in humans. A case series. *Oral Maxillofac Surg.* 2012;16(1):41-45. doi: 10.1007/s10006-011-0296-3.
- 122.** Schopper C, Moser D, Sabbas A, Lagogiannis G, Spassova E, König F, Donath K, Ewers R. The fluorohydroxyapatite (FHA) FRIOS Alqipore is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(6):743-749. doi: 10.1046/j..2003.00959.x.

- 123.** Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng.* 2002;12(1):15-35.
- 124.** Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent.* 2006;15(2):197-207.
- 125.** Bissada NF, Hangorsky U. Alveolar bone induction: alloplasts. *Dent Clin North Am.* 1980;24(4):739-749.
- 126.** AlGhamdi AS, Shibly O, Ciancio SG. Osseous grafting part II: xenografts and alloplasts for periodontal regeneration--a literature review. *J Int Acad Periodontol.* 2010;12(2):39-44.
- 127.** Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- 128.** Pecora G, Andreana S, Margarone JE 3rd, Covani U, Sottosanti JS. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;84(4):424-429.
- 129.** Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(9):1268-1285. doi: 10.1002/adhm.201400760.
- 130.** Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20-27. doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.029.

- 131.** Meffert RM, Thomas JR, Hamilton KM, Brownstein CN. Hydroxylapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 1985;56(2):63-73. doi.org/10.1902/jop.1985.56.11s.63.
- 132.** Pförringer D, Harrasser N, Mühlhofer H, Kiokekli M, Stemberger A, van Griensven M, Lucke M, Burgkart R, Obermeier A. Osteoinduction and -conduction through absorbable bone substitute materials based on calcium sulfate: in vivo biological behavior in a rabbit model. *J Mater Sci: Mater Med.* 2018;29:17. doi.org/10.1007/s10856-017-6017-1.
- 133.** Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *J Periodontol.* 2009;80(2):210-218. doi: 10.1902/jop.2009.080400.
- 134.** Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2002;31(5):469-484. doi.org/10.1054/IJOM.2002.0244.
- 135.** Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):197-208. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.004.
- 136.** Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone.* 1996;19(1 Suppl):1S-12S. doi: 10.1016/s8756-3282(96)00138-x.

**137.** Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54. doi: 10.1038/nrrheum.2014.164.

**138.** Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Börner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Rüter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T; BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(12):2123-2134. doi: 10.2106/00004623-200212000-00001.

**139.** Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012;8(4):114-124. doi: 10.4161/org.23306.

**140.** Boraiah S, Paul O, Hawkes D, Wickham M, Lorich DG. (2009). Complications of recombinant human BMP-2 for treating complex tibial plateau fractures: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(12):3257–3262. doi.org/10.1007/s11999-009-1039-8.



- 141.** Ritting AW, Weber EW, Lee MC. Exaggerated inflammatory response and bony resorption from BMP-2 use in a pediatric forearm nonunion. *J Hand Surg Am.* 2012;37(2):316-21. doi: 10.1016/j.jhssa.2011.10.007.
- 142.** Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2002;17(10):1859–1871. doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.10.1859.
- 143.** Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(19):7297-7301. doi: 10.1073/pnas.83.19.7297.
- 144.** Haque T, Amako M, Nakada S, Lauzier D, Hamdy RC. An immunohistochemical analysis of the temporal and spatial expression of growth factors FGF 1, 2 and 18, IGF 1 and 2, and TGFbeta1 during distraction osteogenesis. *Histol Histopathol.* 2007;22(2):119-128. doi: 10.14670/HH-22.119.
- 145.** Du X, Xie Y, Xian CJ, Chen L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol.* 2012;227(12):3731-3743. doi: 10.1002/jcp.24083.
- 146.** Chen WJ, Jingushi S, Aoyama I, Anzai J, Hirata G, Tamura M, Iwamoto Y. (2004). Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(4):303–309. doi.org/10.1007/s00774-003-0487-6.

- 147.** Fei Y, Gronowicz G, Hurley MM. Fibroblast growth factor-2, bone homeostasis and fracture repair. *Curr Pharm Des.* 2013;19(19):3354-3363. doi: 10.2174/1381612811319190002.
- 148.** Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, Jacobsen KA, Alaql ZS, Eberhardt AW, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Deng L, Clemens TL. (2008). Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(2):686–691. doi.org/10.1073/pnas.0708474105.
- 149.** Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone.* 2007;41(4):516-522. doi: 10.1016/j.bone.2007.06.018.
- 150.** García JR, Clark AY, García AJ. Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(4):889-900. doi: 10.1002/jbm.a.35626.
- 151.** Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials.* 2006;27(17):3249-3255. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.033.
- 152.** Nauth A, Ristevski B, Li R, Schemitsch EH. Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect? *Injury.* 2011;42(6):574-579. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.034.

- 153.** Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-228. doi: 10.1097/00008505-200110000-00002.
- 154.** Sampson, S., Gerhardt, M., & Mandelbaum, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine.*2008;1(3–4):165–174. doi.org/10.1007/s12178-008-9032-5.
- 155.** Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.* 2009; 91(8): 987–996. doi.org/10.1302/0301-620X.91B8.22546.
- 156.** Han B, Woodell-May J, Ponticiello M, Yang Z, Nimni M. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(6):1459-1470. doi: 10.2106/JBJS.H.00246.
- 157.** Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e37-44. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.008.
- 158.** Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e51-55. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.010.

- 159.** Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Aust Dent J*. 2011;56(4):365–371. doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01362.x.
- 160.** Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991;45(4):319–326. doi:10.1002/jcb.240450403.
- 161.** Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27(1):63-69. doi: 10.1080/08977190802636713.
- 162.** Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodont Rest Dent*. 2001;21(4):345–355. doi.org/10.11607/prd.00.0429.
- 163.** Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) - An immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2005;26(15), 2575–2584. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.041.
- 164.** Pradeep AR, Rao NS, Agarwal E, Bajaj P, Kumari M, Naik SB. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012;83(12):1499-507. doi: 10.1902/jop.2012.110705.

- 165.** Roden RD Jr. Principles of bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2010;22(3):295-300. doi: 10.1016/j.coms.2010.06.001.
- 166.** Ahmed W, Asim MA, Ehsan A, Abbas Q. Non-Vascularized Autogenous Bone Grafts for Reconstruction of Maxillofacial Osseous Defects. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2018;28(1):17-21. doi: 10.29271/jcpsp.2018.01.17.
- 167.** Ahn G, Park JH, Kang T, Lee JW, Kang HW, Cho DW. Effect of Pore Architecture on Oxygen Diffusion in 3D Scaffolds for Tissue Engineering. *J Biomech Eng.* 2010; 132(10):104506. doi.org/10.1115/1.4002429.
- 168.** Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-5491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- 169.** Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S22-25. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.008.
- 170.** Petrochenko P, Narayan RJ. Novel approaches to bone grafting: porosity, bone morphogenetic proteins, stem cells, and the periosteum. *J Long Term Eff Med Implants.* 2010;20(4):303-315. doi: 10.1615/jlongtermeffmedimplants.v20.i4.50.
- 171.** Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors Affecting Bone Graft Incorporation. *Clin Orthop Rel Res.* 1996;324(324):66–74. doi.org/10.1097/00003086-199603000-00009.

- 172.** O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(4):433-441. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.052.
- 173.** Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res*. 2018;62(2):152-161. doi: 10.1016/j.jpor.2017.08.010.
- 174.** Tejero-Trujeque R. Understanding the final stages of wound contraction. *J Wound Care*. 2001;10(7):259–264. doi.org/10.12968/jowc.2001.10.7.26339.
- 175.** Monteiro MM, Campos da Rocha NC, Rossi AM, de Almeida Soares G. Dissolution properties of calcium phosphate granules with different compositions in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65(2):299-305. doi: 10.1002/jbm.a.10479.
- 176.** Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. (2008, April). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*.2008. doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004.
- 177.** Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. In vitro effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast-like cells. *Biomaterials*. 1995;16(15):1187-1192. doi: 10.1016/0142-9612(95)93585-2.
- 178.** Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 2007;82(1):139–148. doi.org/10.1002/jbm.b.30715.

- 179.** Zielinska E, Tukaj C, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. (2016). Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *PloS One*. 2016;11(10), e0164137. doi.org/10.1371/journal.pone.0164137.
- 180.** Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, Su Z. Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41(5):650–657. doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.006.
- 181.** Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*. 2005;26(23):4847-4855. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.006.
- 182.** Jung GY, Park YJ, Han JS. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(5):1649-1654. doi: 10.1007/s10856-010-4011-y.
- 183.** de Bruijn JD, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone. *Biomaterials*. 1994;15(7):543–550. doi.org/10.1016/0142-9612(94)90021-3.
- 184.** Liu H, Yazici H, Ergun C, Webster TJ, Bermek H. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2008;4(5):1472-1479. doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.025.

- 185.** Chen Y, Miao X. Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents. *Biomaterials*. 2005;26(11):1205–1210. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.027.
- 186.** Konermann A, Staubwasser M, Dirk C, Keilig L, Bourauel C, Götz W, Jäger A, Reichert C. Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(4):514-521. doi: 10.1016/j.ijom.2013.10.017.
- 187.** Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. (2011, April). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- 188.** Nather A, Thambyah A, Goh JC. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2004;19(5):526-533. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2004.01.010.
- 189.** Akkus O, Rimnac CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res*. 2001;19(5):927–934. doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00004-3.
- 190.** Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.
- 191.** Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2018;28(3):351-362. doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.



- 192.** Calvo-Guirado JL, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz RA, Romanos GE, De Azamoya P, Velázquez P. Bone neo-formation and mineral degradation of 4Bone.(®) Part II: histological and histomorphometric analysis in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(12):1402-1406. doi: 10.1111/clr.12465.
- 193.** 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.
- 194.** Kahnberg KE. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. *Int J Oral Surg.* 1979;8(6):449-456. doi: 10.1016/s0300-9785(79)80084-8.
- 195.** Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(1):7-13. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.09.011.
- 196.** Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10. doi: 10.22203/ecm.v013a01.
- 197.** Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA.* 2015;1(4):FSO63. doi: 10.4155/fso.15.63.
- 198.** Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):105-115. doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0452.

- 199.** Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011;32(15):3855-3861. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.076.
- 200.** Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66(2):274-279.
- 201.** Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(1):123-145. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0658.
- 202.** An YH, Woolf SK, Friedman RJ. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. 2000;21(24):2635–2652. doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00132-0.
- 203.** Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30(12):2149-2163. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.050.
- 204.** Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Diseases*. 2007;13(6):530–537. doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01337.

- 205.** Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(2):187-193. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00980.x.
- 206.** Hedberg EL, Kroese-Deutman HC, Shih CK, Lemoine JJ, Liebschner MA, Miller MJ, Yasko AW, Crowther RS, Carney DH, Mikos AG, Jansen JA. Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2005;11(9-10):1356-1367. doi: 10.1089/ten.2005.11.1356.
- 207.** Mengel R, Kruse B, Flores-de-Jacoby L. Digital volume tomography in the diagnosis of peri-implant defects: an in vitro study on native pig mandibles. *J Periodontol.* 2006;77(7):1234-1241. doi: 10.1902/jop.2006.050424.
- 208.** Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11. doi: 10.1002/jbmr.5650040103.
- 209.** Papadimitropoulos A, Mastrogiacomo M, Peyrin F, Molinari E, Komlev VS, Rustichelli F, Cancedda R. Kinetics of in vivo bone deposition by bone marrow stromal cells within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: an X-ray computed microtomography study. *Biotechnol Bioeng.* 2007;98(1):271-281. doi: 10.1002/bit.21418.
- 210.** Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, Rentsch B, Rammelt S. Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomater.* 2014;4:e27993. doi: 10.4161/biom.27993.

- 211.** Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805.
- 212.** Kulak CA, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(2):87-98. doi: 10.1590/s0004-27302010000200002.
- 213.** Jindal M, Lakhwani O, Kapoor S, Chandoke R, Kaur O, Arora B, Garg K. Correlation between bone histomorphometry and bone strength. *Trop J Med Res.* 2017;20(1):25-30. doi.org/10.4103/1119-0388.198107.
- 214.** Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today.* 2009;4(1):66–80. doi.org/10.1016/J.NANTOD.2008.10.014.
- 215.** Leventis M, Agrogiannis G, Fairbairn P, Vasiliadis O, Papavasileiou D, Theodoropoulou E, Horowitz R, Kalyvas D. Evaluation of an In Situ Hardening  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Graft Material for Alveolar Ridge Preservation. A Histomorphometric Animal Study in Pigs. *Dent J (Basel).* 2018;6(3):27. doi: 10.3390/dj6030027.
- 216.** Leventis M, Fairbairn P, Mangham C, Galanos A, Vasiliadis O, Papavasileiou D, Horowitz R. Bone Healing in Rabbit Calvaria Defects Using a Synthetic Bone Substitute:

A Histological and Micro-CT Comparative Study. *Materials (Basel)*. 2018;11(10):2004. doi: 10.3390/ma11102004.

**217.** Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, Patney A, Mahajan H. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate ( $\beta$ -TCP/HA) bone graft substitute-a clinical, radiological, and histological study. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):25. doi: 10.1186/s40729-017-0086-2.

**218.** Jambhekar S, Kernen F, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Prosthet Dent*. 2015;113(5):371-382. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.12.009.

**219.** Leventis MD, Fairbairn P, Dontas I, Faratzis G, Valavanis KD, Khaldi L, Kostakis G, Eleftheriadis E. Biological response to  $\beta$ -tricalcium phosphate/calcium sulfate synthetic graft material: an experimental study. *Implant Dent*. 2014;23(1):37-43. doi: 10.1097/ID.0000000000000030.

**220.** Yang HL, Zhu XS, Chen L, Chen CM, Mangham DC, Coulton LA, Aiken SS. Bone healing response to a synthetic calcium sulfate/ $\beta$ -tricalcium phosphate graft material in a sheep vertebral body defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(7):1911-1921. doi: 10.1002/jbm.b.32758.

**221.** Eleftheriadis E, Leventis MD, Tosios KI, Faratzis G, Titsinidis S, Eleftheriadi I, Dontas I. Osteogenic activity of  $\beta$ -tricalcium phosphate in a hydroxyl sulphate matrix and demineralized bone matrix: a histological study in rabbit mandible. *J Oral Sci*. 2010;52(3):377-384. doi: 10.2334/josnusd.52.377.

- 222.** Podaropoulos L, Veis AA, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *J Oral Implantol.* 2009;35(1):28-36. doi: 10.1563/1548-1336-35.1.28.
- 223.** Hong JY, Lee JS, Pang EK, Jung UW, Choi SH, Kim CK. Impact of different synthetic bone fillers on healing of extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(2):e30-37. doi: 10.1111/clr.12041.
- 224.** Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol.* 2003;30(7):636-643. doi: 10.1034/j.1600-051x.2003.00093.x.
- 225.** Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(2):137-143. doi: 10.1034/j.1600-0501.2003.140201.x.
- 226.** Baker-LePain JC, Nakamura MC, Lane NE. Effects of inflammation on bone: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(4):389-395. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283474dbe.
- 227.** Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(6):735-742. doi: 10.1016/j.joca.2008.11.011.

- 228.** Chan HL, Lin GH, Fu JH, Wang HL. Alterations in bone quality after socket preservation with grafting materials: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(3):710-720. doi: 10.11607/jomi.2913.
- 229.** Zerbo IR, Zijdeveld SA, de Boer A, Bronckers AL, de Lange G, ten Bruggenkate CM, Burger EH. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(6):724-732. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01055.x.
- 230.** Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(3):357-368.
- 231.** Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(9):961-970. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01939.x.
- 232.** Xu X, Sohn DS, Kim HG, Lee SJ, Moon YS. Comparative Histomorphometric Analysis of Maxillary Sinus Augmentation With Deproteinized Bovine Bone and Demineralized Particulate Human Tooth Graft: An Experimental Study in Rabbits. *Implant Dent.* 2018;27(3):324-331. doi: 10.1097/ID.0000000000000755.
- 233.** Stevenson S, Horowitz M. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(6):939-950.

- 234.** Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13(1):77-86.
- 235.** Steiner G. After Mineralization, Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft Particles are Exfoliated but not Resorbed. Preprints, 2019.
- 236.** Laurito D, Lollobrigida M, Gianni F, Bosco S, Lamazza L, De Biase A. Alveolar Ridge Preservation with nc-HA and d-PTFE Membrane: A Clinical, Histologic, and Histomorphometric Study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017;37(2):283-290. doi: 10.11607/prd.2731.
- 237.** Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous alveolar split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(5):607-615. doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01043.x.
- 238.** Kökat AM, Erçöçen AR, Karayazgan-Saraçoğlu B. Simultaneous Implant Placement in a Mandibular Defect Reconstructed With a Free Fibula Graft and Fabrication of a Fixed Metal Porcelain Prosthesis. *J Craniofac Surg.* 2018;29(5):1307-1311. doi: 10.1097/SCS.00000000000004526.
- 239.** Osborn TM, Helal D, Mehra P. Iliac crest bone grafting for mandibular reconstruction: 10-year experience outcomes. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2018;8(1):25-29. doi: 10.1016/j.jobcr.2017.12.001.
- 240.** Jeong EC, Yoon S, Jung YH. Radial Forearm Osteocutaneous Free Flap for Reconstruction of Hard Palate With Alveolar Defect. *J Craniofac Surg.* 2017;28(5):e438-e440. doi: 10.1097/SCS.00000000000003618.



- 241.** Lee YH, Choi JH, Hwang K, Choi JH. Rib Bone Graft Adjusted to Fit the Facial Asymmetry: A Frame Structure Graft. *J Craniofac Surg.* 2015;26(7):2160-2162. doi: 10.1097/SCS.0000000000002065.
- 242.** Atil F, Kocyigit ID, Suer BT, Alp YE, Yazan M, Tekin U, Tuz HH. Clinical Evaluation of the Use of Tibial Bone Grafting in Dentoalveolar Reconstructive Surgery. *Med Princ Pract.* 2016;25(1):72-78. doi: 10.1159/000440998.
- 243.** Bande CR, Daware S, Lambade P, Patle B. Reconstruction of Orbital Floor Fractures with Autogenous Bone Graft Application from Anterior Wall of Maxillary Sinus: A Retrospective Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015;14(3):605-610. doi: 10.1007/s12663-014-0716-7.
- 244.** Cho YS, Hwang KG, Park CJ. Postoperative effects of anterior nasal spine bone harvesting on overall nasal shape. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(6):618-622. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02428.x.
- 245.** Güngörmüş M, Yavuz M. The ascending ramus of the mandible as a donor site in maxillofacial bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(11):1316-1318. doi:10.1053/joms.2002.35731.
- 246.** Sabhlok S, Waknis PP, Gadre KS. Applications of coronoid process as a bone graft in maxillofacial surgery. *J Craniofac Surg.* 2014;25(2):577-580. doi: 10.1097/SCS.0000000000000624.

- 247.** Peñarrocha M, García-Mira B, Martínez O. Localized vertical maxillary ridge preservation using bone cores and a rotated palatal flap. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(1):131-134.
- 248.** Velásquez H, Olate S, Díaz C, Navarro P, Borie E, de Moraes M. Quantitation of Mandibular Symphysis Bone as Source of Bone Grafting: Description in Class I and Class III Skeletal Conditions. *J Oral Implantol.* 2017;43(3):211-217. doi: 10.1563/aaid-joi-D-16-00150.
- 249.** Tolstunov L. Maxillary tuberosity block bone graft: innovative technique and case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(8):1723-1729. doi: 10.1016/j.joms.2009.03.043.
- 250.** Hernández-Alfaro F, Pages CM, García E, Corchero G, Arranz C. Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(5):777-783.
- 251.** Ganz SD. Mandibular tori as a source for onlay bone graft augmentation: a surgical procedure. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1997;9(9):973-982.
- 252.** Kainulainen VT, Sándor GK, Clokie CM, Keller AM, Oikarinen KS. The zygomatic bone as a potential donor site for alveolar reconstruction--a quantitative anatomic cadaver study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(8):786-791. doi.org/10.1016/j.ijom.2004.01.007.

