Πανεπιστήμιο Πατρών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής

2005-2009

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΤΟΠΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

Αλκιβιάδης Γ. Καλλιβωκάς
Διδακτορική διατριβή

Ορθοπαιδική Κλινική
Διευθυντής: Καθηγητής Παν. Δημακόπουλος

Πανεπιστήμιο Πατρών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΤΟΠΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΝΕΥΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αλκιβιάδης Γ. Καλλιβωκάς

Βιολόγος - Ορθοπαιδικός Χειρουργός

Πάτρα 2005-2009

Ορθοπαιδική Κλινική

Διευθυντής: Καθηγητής κ. Παν. Δημακόπουλος

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ηλίας Παναγιωτόπουλος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Πατρών,
Επιβλέπων καθηγητής

Παναγιώτης Δημακόπουλος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Πατρών,
Διευθυντής Ορθοπαιδικής Κλινικής

Παναγιώτης Μέγας, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Πατρών

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Οι προαναφερόμενοι καθηγητές και

Αθανασία Μουζάκη, Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Νικόλαος Καραμάνος, Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Πατρών

Γεώργιος Γκατζούνης, Επ. Καθηγητής Νευροχειρουργικής Πανεπιστημίου
Πατρών

Σταμάτιος-Νικόλαος Λιόσης, Επ. Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
Πανεπιστημίου Πατρών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό μέρος

1. Ορισμός
2. Background
3. Επιδημιολογία
4. Ταξινόμηση
 - 4.1 Μετατραυματικής αιτιολογίας Ετερότοπη οστεοποίηση
 - 4.2 Γενετικής αιτιολογίας Ετερότοπη οστεοποίηση
 - 4.3 Ετερότοπη οστεοποίηση άνω και κάτω άκρων
 - 4.4 Ετερότοπη οστεοποίηση μετεγχειρητικής αιτιολογίας
 - 4.5 Ετερότοπη Οστεοποίηση Νευρογενούς Αιτιολογίας (κατόπιν τραυματισμού του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος)
 - 4.5.1. Μοριακή Παθοφυσιολογία πολυτραυματισμών
 - 4.5.1.1 Ενεργοποίηση του καταρράκτη αντιδράσεων του συμπληρώματος, του συστήματος καλλικρεΐνης-κινίνης και της διαδικασίας πήξεως του αίματος.
 - 4.5.1.2. Η αντίδραση οξείας φάσεως
 - 4.5.1.3. Η προσέλκυση των λευκοκυττάρων
 - 4.5.1.4. Διαταραχές στη μικροκυκλοφορία
 - 4.5.1.5. Ισχαιμία – Διαταραχές επαναιμάτωσης

4.5.1.6 Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις και
μεταβολικές διαφοροποιήσεις

4.5.2 Παθοφυσιολογία Κρανιοεγκεφαλικής Κάκωσης

5. Παθοφυσιολογία ΗΟ

6. Κλινική εικόνα ΗΟ

7. Διαφορική διάγνωση

8. Παρακλινικός έλεγχος

9. Στοιχεία Μοριακής Δομής και Φυσιολογίας του Οστού

9.1 Σύσταση ECM του οστού

9.2.1 Γλυκοζαμινογλυκάνες

9.2.1.1 Δομή γλυκοζαμινογλυκανών

9.2.2. Πρωτεογλυκάνες

9.2.2.1. Δομή πρωτεογλυκανών

9.2.2.2. Πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριου
δικτύου της περιοχής της επίφυσης του
οστού

Ειδικό μέρος

Σκοπός

A. Συγκριτική Βιοχημική Ανάλυση Γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών σε Ανθρώπινο φυσιολογικό και ετερότοπο οστό

A1. Ασθενείς και Πειραματικές μέθοδοι

A1.1. Επεξεργασία οστικών δειγμάτων και δομικός χαρακτηρισμός γλυκοζαμινογλυκανών

A1.2. Χαρακτηρισμός πρωτεογλυκανών

A1.3. Εκχύλιση PGs από οστά

A1.4. Ανάλυση ουρονικού οξέος

A1.5. Μέτρηση πρωτεΐνης

A1.6. Ενζυμική κατεργασία με χονδροϊτινάση ABC

A1.7. Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο παρουσία SDS (SDS-PAGE)

A1.8. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

A1.9. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση υψηλής επίδοσης (Capillary electrophoresis, CE)

A.2. Αποτελέσματα

A.3 Συζήτηση

B. Μελέτη κυτταρικών πληθυσμών σε περιφερικό αίμα ασθενών κατόπιν τραυματικής κρανιοεγκεφαλικής βλάβης κατά τη διάρκεια νοσηλείας τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.

B.1 Ασθενείς και Μέθοδοι

B.1.1 Τεχνική της Κυτταρομετρίας Ροής

B.2 Αποτελέσματα

C. Μελέτη της Κρανιοεγκεφαλικής Κάκωσης σε Πειραματικό μοντέλο
κουνελιών

D. Συζήτηση

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Εισαγωγή

Στην Πολυετή αυτή προσπάθεια της δημιουργίας, εκτέλεσης και συγγραφής αυτής της διατριβής υπήρξαν σημαντικές επιστημονικές συνεργασίες με ανθρώπους των οποίων η συμβολή υπήρξε καθοριστική για την τελική έκβαση. Όλους αυτούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά...

Τον Καθηγητή κ. Η. Παναγιωτόπουλο, ο οποίος είχε την επίβλεψη του πονήματος και του οποίου η γνώση και η βοήθεια ήταν ανεκτίμητες...

Την Καθηγήτρια κ. Α. Μουζάκη, η οποία παρείχε απλόχερα γνώσεις και εμπειρίες σε τομείς βασικής έρευνας αλλά και επιστημονικής μεθοδολογίας...

Τον Καθηγητή κ. Ν. Καραμάνο για τη συμβολή του στη βιοχημική μελέτη του οστού με μεθόδους ακριβείας αλλά και την βοήθεια και καθοδήγηση στη συγγραφή...

Τον Επ. Καθηγητή κ. Γ. Γκατζούνη για την επιστημονική του βοήθεια η οποία ήταν απαραίτητη σε ένα θέμα που άπτεται του νευροχειρουργικού πεδίου δράσης...

Τον Επ. Καθηγητή κ. Μ. Καρανικόλα για τη συμβολή του στην εύρεση των δειγμάτων από τους νοσηλευόμενους στη Μονάδα...

Τον κ. Γ. Κληρονόμο ιατρό νευροχειρουργό για τις ατελείωτες ώρες αгаστής συνεργασίας στο πειραματικό κομμάτι...

Τις κ. Π. Σακελλαράκη και Μ. Ρόδη μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος αιματολογίας για τη βοήθειά τους στην επεξεργασία των δειγμάτων...

Τους κ. Ι. Κανάκη, διδάκτορα Χημείας, τον κ. Π. Δέδε και την κ. Β. Μανιά, Μεταπτυχιακούς του τμήματος χημείας...

Τις κ. Χ. Παπαμιχαήλ, Α. Αρέθα, Χ. Λιάρου, ιατρούς Αναισθησιολόγους, για τη συνεργασία τους στη συλλογή των δειγμάτων...

Τέλος, χρωστώ ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, στους Γονείς μου, στη σύζυγό μου Νίκη αλλά και στα δύο μου παιδιά Γιώργο και Γεράσιμο για την απέραντη υπομονή και στήριξη για την ολοκλήρωση της παρούσης διατριβής...

Σας ευχαριστώ όλους ειλικρινά

Αλκιβιάδης Γ. Καλλιβωκάς

Γενικό Μέρος

1. ΟΡΙΣΜΟΣ: ΕΚΤΟΠΗ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ, HETEROTOPIC OSSIFICATION (HO), ορίζεται ως η δημιουργία οστίτη ιστού σε ανατομικά έκτοπο σημείο οστεοποίησης. Σε σημείο δηλαδή στο οποίο κανονικά έπρεπε να υπάρχουν μαλακά μέρη.

Εικόνα 1. Ετερότοπη οστεοποίηση ισχίου κατόπιν κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

2. Background: Έκτοπη οστεοποίηση είναι η δημιουργία αληθούς οστού σε εξωσκελετικά μαλακά μέρη. Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκε επισταμένα ο όρος οστεοποιός μυϊτίδα (myositis ossificans) προκειμένου να χαρακτηρίσει καταστάσεις που οδηγούν σε δημιουργία έκτοπου οστού. Ωστόσο αυτός ο όρος παρά το ότι χρησιμοποιείται και σήμερα τείνει να περιοριστεί καθώς όπως αποδείχθηκε η οστεοποίηση δεν είναι απαραίτητο να λαμβάνει χώρα εντός μυών, ούτε ξεκινά απαραιτήτως ως φλεγμονή μυών. Απεναντίας η έκτοπη οστεοποίηση μπορεί να αφορά περιτονίες, τένοντες συνδέσμους και άλλα μαλακά μέρη μεσεγχυματικής προέλευσης.

Η έκτοπη οστεοποίηση συνήθως αφορά μεγάλες αρθρώσεις του σώματος όπως το ισχίο, το γόνατο, ο αγκώνας και ο ώμος. Ωστόσο έκτοπη οστεοποίηση έχει παρατηρηθεί και σε άλλα σημεία του σώματος όπως τα δάκτυλα του χεριού η bizarre εξόστωση, η florid υποπεριοστική αντίδραση, υπονύχιες εξοστώσεις στην τελική φάλαγγα του χεριού, ο οπίσθιος επιμήκης σύνδεσμος στη σπονδυλική στήλη, το τοίχωμα αγγείων, το δέρμα, ο υποδόριος ιστός. Αναφορές για έκτοπη οστεοποίηση υπάρχουν και για δομές όπως το μεσεντέριο.

Ιστορικά ο Guy Patin στο Παρίσι αναφέρθηκε στο φαινόμενο στα τέλη του 17^{ου} αιώνα περιγράφοντας εξοστώσεις γενετικής αιτιολογίας, ενώ οι Dejerine and Cellier το 1918 ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν το μετατραυματικό φαινόμενο κατά τη διάρκεια του πρώτου παγκοσμίου πολέμου εστιάζοντας σε ευρήματα επί τετραπληγικών ή παραπληγικών ασθενών και δίνοντας στη νόσο την ονομασία *παραοστεοαρθροπάθεια*.

Εικόνα 2. Τρισδιάστατη ανασύσταση CT αγγειογραφίας λεκάνης ισχίων σε ασθενή με ΗΟ ισχίων άμφω

3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η έκταση της νόσου στις ώριμες μορφές αυτής μπορεί να κυμαίνεται ευρύτατα: Από μικρές εστίες οστεοποίησης –τυχαία ευρήματα σε κάποιον απεικονιστικό έλεγχο χωρίς καμία ουσιαστική κλινική σημασία, μέχρι εκτεταμένες εξοστώσεις που μπορεί να περιβρογχίζουν αγγεία και νεύρα, μειώνουν το εύρος κίνησης και οδηγούν σε σημαντικότερες αναπηρίες. Η έκτοπη οστεοποίηση είναι συνηθέστερα μονοαρθρική νόσος. Ωστόσο πολυαρθρικές εντοπίσεις δεν είναι σπάνιες με εκτεταμένο περιορισμό της κινητικότητας που πολλές φορές έχουν μοιραία έκβαση.

Η επίπτωση της έκτοπης οστεοποίησης διαφέρει ανάλογα με τη μελέτη και τον τρόπο εντόπισης της νόσου (Balboni T et al 2006). Ως συνέπεια κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης η νόσος παρατηρείται σε ποσοστό περίπου 20%. (Melamed et al, 2002) Βιβλιογραφικά όμως έχουν αναφερθεί ποσοστά με εύρος που κυμαίνεται από 11%-90%. (Eggli S. et al, 2001). Σε όλες τις μελέτες η επίπτωση στον ανδρικό πληθυσμό είναι μεγαλύτερη αλλά αυτό αποδίδεται στο ότι ο ανδρικός πληθυσμός είναι πιο επιρρεπής σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση και στο τραύμα γενικότερα. (Iorio et al, 2002)

Όσον αφορά την ηλικιακή κατανομή, αυξημένη επίπτωση Έκτοπης Οστεοποίησης συσχετίζεται με ηλικία άνω των 30 ετών. Σε παιδιά, η συχνότητα της νόσου κυμαίνεται από 8-22.5%. (Speed J. Emedicine online journal, 2001)

Η σπαστικότητα ενός άκρου είναι παράγων που συσχετίζεται με την αυξημένη επίπτωση έκτοπης οστεοποίησης. (Botte MJ et al, 1997)

Σε περιπτώσεις μετατραυματικής ΗΟ, σε κάταγμα αγκώνα ή σε εξάρθρωμα αγκώνα η επίπτωση ανέρχεται στο 90% ενώ σε κάταγμα μηριαίου οστού η μετατραυματική επίπτωση της νόσου κυμαίνεται από 55% ως 83%. (Speed J. Emedicine online journal, 2001)

Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΗΟ έχουν μελετηθεί κατόπιν εγχειρητικών επεμβάσεων, ιδίως σε περιπτώσεις που αφορούν το ισχίο.

Αυτοί μπορούν να διακριθούν σε:

- Σχετιζόμενους με τον ασθενή
- Σχετιζόμενους με την κάκωση αυτή καθαυτή και
- Σχετιζόμενους με το χειρουργείο (κυρίως τον τύπο της προσπέλασης)
(Πίνακας 1)

Πίνακας 1. Παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη ΗΟ

Σχετιζόμενοι με τον ασθενή	Σχετιζόμενοι με την κάκωση	Σχετιζόμενοι με το χειρουργείο
Ιστορικό ΗΟ	T-τύπου κατάγματα κοτύλης	Πλαγία και προσθιοπλαγία προσπέλαση Ολικής ισχίου
Άρρεν φύλο	Κατάγματα-εξάρθρηματα	Οστεοτομία τροχαντήρα ή μηριαίου
Υπερτροφική οστεοαρθρίτις	Πολλαπλές κακώσεις	Εκτεταμένη λαγονομηριαία προσπέλαση
Αγκυλοποιητική σπονδυλίτις		
Διάχυτη ιδιοπαθής Σκελετική Υπερόστωση		
Προηγηθέν χειρουργείο ισχίου		

Πηγή: Balboni T et al, 2006

Σε γενετικής αιτιολογίας νόσο, η επίπτωση ευτυχώς είναι ιδιαιτέρως μικρή. Μόνο περί τις 400 περιπτώσεις είναι γνωστές στις ΗΠΑ όπου τηρούνται λεπτομερή δημογραφικά στοιχεία.

Συγκεντρωτικά, το 20% των πασχόντων από έκτοπη οστεοποίηση έχουν κλινικά σημαντικό περιορισμό της κινητικότητάς τους και είναι οι ασθενείς που συνήθως απαιτούν χειρουργική αντιμετώπιση. (Iorio R. et al, 2002)

4. Ταξινόμηση:

Σύμφωνα με την κλασική ταξινόμηση από Stover και συνεργάτες (1976), η ετερότοπη οστεοποίηση κατατάσσεται ως ακολούθως:

- A. Myositis ossificans progressiva που αφορά γενετικώς καθορισμένη νόσο
- B. Μετατραυματική ΗΟ όπου κατόπιν τοπικού τραύματος επάγεται η δημιουργία ετερότοπης οστεοποίησης στο ίδιο σημείο και
- C. Νευρογενούς προέλευσης ΗΟ κατόπιν κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης ή τραύματος Νωτιαίου μυελού

Σε μια πιο πρόσφατη και εκτεταμένη ταξινόμηση, η έκτοπη οστεοποίηση σύμφωνα με McCarthy and Sundaram (2005), ανάλογα με την αιτία που την προκαλεί, διακρίνεται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- Γενετικής αιτιολογίας, που χαρακτηρίζεται ως Fibrodysplasia Ossificans Progressiva ή Νόσος του Munchmyer.
- Νευρογενούς αιτιολογίας, δηλ κατόπιν Κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης (Traumatic brain Injury, TBI), ή κάκωσης Νωτιαίου Μυελού (Spinal Cord Injury, SCI).
- Μετεγχειρητικής αιτιολογίας έκτοπη οστεοποίηση, κατόπιν επεμβάσεων, ιδίως ολικής αρθροπλαστικής, στην περιοχή του ισχίου αλλά και σε άλλες περιοχές του ανθρωπίνου σώματος (ώμος).
- Μετατραυματικής αιτιολογίας ΗΟ. Σ'αυτήν την κατηγορία εμπίπτουν οι περιπτώσεις έκτοπης οστεοποίησης κατόπιν τραύματος, στην ίδια περιοχή του τραύματος. Ο όρος *Περιγεγραμμένη Οστεοποιός Μυοσίτιδα (Myositis Ossificans Circumscripta)* είναι αυτός που περιγράφει καλύτερα τη νόσο αυτή.

- Αντιδραστικού τύπου έκτοπη οστεοποίηση που αφορά κυρίως τα άνω και κάτω άκρα.

4.1 Μετατραυματικής αιτιολογίας Ετερότοπη οστεοποίηση

Όσον αφορά την μετατραυματικής αιτιολογίας ΗΟ, αυτή κατατάσσεται υπό τον όρο Περιγεγραμμένη Οστεοποιός Μυοσίτις. Παρά το γεγονός ότι περιγεγραμμένη Οστεοποιός μυοσίτιδα μπορεί να εμφανιστεί και αυτόματα, η μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων (60-75%) χαρακτηρίζεται από προηγθέν τραύμα στην περιοχή της έκτοπης οστεοποίησης.

Είναι μία αντιδραστική διαδικασία επαγωγής ετερότοπης οστεοποίησης, αυτοπεριοριζόμενης. Η παραγωγή του ετερότοπου οστού γίνεται παρααρθρικά ή περιοστικά.

Κατόπιν του τοπικού μυοσκελετικού τραυματισμού αναπτύσσεται επώδυνο μόρφωμα χαρακτηριστικό φλεγμονώδους εξεργασίας. Ο τραυματισμός μπορεί να είναι επαναλαμβανόμενος ενώ σε μερικές περιπτώσεις επαγωγής ΗΟ δεν έχει καταγραφεί.

Η επώδυνη μάζα συνεχίζει να μεγαλώνει για κάποιο χρονικό διάστημα συνήθως μηνών, ενώ στη συνέχεια η φλεγμονώδης εξεργασία υποχωρεί και δίνει τη θέση της σε ένα σαφές, ραδιολογικά, κλινικά και ιστολογικά, μη επώδυνο μόρφωμα.

Αυτό που χαρακτηρίζει το φαινόμενο της ΗΟ είναι η διαδικασία της ωρίμανσης. Οι πρώτες μορφολογικές αλλαγές συνίστανται στη

Εικόνα 3. Μετατραυματική ΗΟ

δημιουργία φλεγμονώδους ιστού εντός αιματώματος, κατόπιν τραύματος ακολουθούμενες από μία σειρά γεγονότων.

Αρχικά δημιουργείται κοκκιωματώδης ιστός με πληθώρα νεοαγγείων που μερικές φορές παράγει χόνδρινα στοιχεία. Στη συνέχεια παράγεται νέο οστό είτε κατόπιν ενδομεμβρανώδους είτε κατόπιν ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Το οστό που παράγεται ωριμάζει. Στην τελική κατάσταση ο ετερότοπος οστίτης ιστός μπορεί να έχει μυελική κοιλότητα που περιέχει λιπώδη ή και ερυθρό (αιμοποιητικό) μυελό. Σ' αυτή τη φάση, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του ετερότοπου ιστού δεν διαφέρουν σε τίποτα από τον κοινό οστίτη ιστό του φυσιολογικού σκελετού.

4.2 Γενετικής αιτιολογίας Ετερότοπη οστεοποίηση

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τρεις κλινικές οντότητες ετερότοπης οστεοποίησης, η Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP), η Paraosteoarthropathy Ossificans Progressiva και η Albright's Hereditary Osteodystrophy (AHO). Οι οντότητες αυτές περιγράφονται εδώ, εξαιτίας της πιθανής παθοφυσιολογικής ομοιότητας τους με την μετατραυματικής-νευρογενούς αιτιολογίας νόσο.

Εικόνα 4. FOP. Εικόνα ασθενούς 4 ετών. (από Kaplan FS et al, 2004)

Η FOP ή νόσος Mynchmyer είναι προοδευτικά αναπτυσσόμενη νόσος που ξεκινά από την παιδική ηλικία, κατά μέσο όρο τα 3-5 έτη. (range: 0-25) Κύριο συνοδό εύρημα στους ασθενείς είναι το βλαισό και ελαττωμένου μήκους μεγάλο δάκτυλο των άκρων ποδών. (εικόνα 5)

Εικόνα 5.

Συνήθως, η νόσος ξεκινά από τη ράχη και τον αυχένα. Επίσης, από τον αξονικό σκελετό και καταλήγει στην περιφέρεια. Κάθε τραυματισμός επάγει τη δημιουργία νέου ετερότοπου οστού.

Οι παθοφυσιολογικές φάσεις δημιουργίας ετερότοπου οστού είναι 3 όπως και στη νευρογενούς τύπου ΗΟ.

- Η φάση της φλεγμονής
- Η ενδιάμεση φάση με υποχώρηση της φλεγμονώδους εξεργασίας και
- Η τελική φάση (12 εβδομάδες) με την ανάπτυξη ψηλαφητού, μη επώδυνου ετερότοπου οστού

Οι πάσχοντες εμφανίζουν όλο και περισσότερες αγκυλωμένες αρθρώσεις, αναπτύσσουν σκολίωση και τελικά καταλήγουν από παθολογία του αναπνευστικού τους συστήματος στην Τρίτη ή τέταρτη δεκαετία της ζωής τους. (Υπάρχει μία αναφορά για ασθενή με FOP ο οποίος έζησε ως τα 70).

Αυτόματες μεταλλάξεις που αφορούν σε αυτοσωματικά γονίδια, που εμπλέκονται στη νόσο, έχουν ταυτοποιηθεί. Τέτοιες είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του ανταγωνιστή της BMP 4, noggin. Το υπολειπόμενης λειτουργικότητας παράγωγο της πρωτεΐνης noggin θεωρείται ότι είναι εκείνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανεμπόδιστη δράση της BMP 4 που οδηγεί

στο σχηματισμό ετερότοπων οστικών εναποθέσεων (Semonin et al, 2001) καθώς, συνήθως το γονίδιο της noggin υπερπαράγει την πρωτεΐνη σε περιπτώσεις αυξημένης κυκλοφορίας BMP 4 (Gazzerro et al, 1998 και Ahn J et al, 2003).

Δεν έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στο ίδιο το γονίδιο της BMP 4. Παρόλα αυτά μεταλλάξεις που αφορούν το μεταβολικό μονοπάτι της BMP 4 και των άλλων BMP έχουν περιγραφεί και συσχετισθεί με την FOP. Τέτοιες είναι οι μεταλλάξεις που αφορούν στο γονίδιο του χρωμοσώματος 4 (Feldman et al, 2000). Πρόσφατα ανιχνεύθηκε μετάλλαξη που φέρουν όλα τα άτομα-πάσχοντες από «κλασσικού τύπου» FOP. Αυτή αφορά ετερόζυγη μετάλλαξη (c.617G>A; p.R206H) στα αμινοξέα γλυκίνης-σερίνης (GS) της περιοχής ενεργοποίησης του activin A type I receptor/activin-like kinase 2 (ACVR1/ALK2), ενός υποδοχέα τύπου I, οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης (BMP) (Kaplan FS et al, 2008 and 2009).

Αντίστοιχη οντότητα της FOP είναι η παραοστεοαρθροπάθεια (POH) που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1994 κατόπιν παρατηρήσεων ασθενών οι οποίοι ενώ εθεωρείτο ότι έπασχαν από FOP ανέπτυσαν διαφορετικό τύπο έκτοπων εναποθέσεων (Kaplan FS, 1994). Η ετερότοπη οστεοποίηση ξεκινά εδώ από το δέρμα και τον υποδόριο ιστό. Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου ξεκινούν από την παιδική ηλικία ενώ δεν παρατηρούνται οι μικροδακτυλίες και η βλαιοσότητα του μεγάλου δακτύλου των άκρων ποδών όπως στην FOP.

Οι ασθενείς με POH χαρακτηρίζονται από μία μετάλλαξη στο γονίδιο της GNAS1 (που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20) το οποίο κωδικοποιεί την α υπομονάδα από την πρωτεΐνη G, που αποτελεί ενδιάμεσο μεσολαβητή μεταξύ κυτταροπλασματικής μεμβράνης και πυρήνα του κυττάρου. Όμοια μετάλλαξη φέρουν και τα άτομα που πάσχουν από Albright Hereditary Osteodystrophy (AHO). Η διαφορά στην έκφραση του συνδρόμου σχετίζεται με την προέλευση της μετάλλαξης. Αν προέρχεται από τον πατέρα τότε έχουμε POH. Μητρικής προέλευσης μετάλλαξη οδηγεί σε AHO.

Η ΑΗΟ χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα στην παραθορμόνη και ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα κυκλοφορούσης παραθορμόνης. Κλινικά οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από χαμηλό ύψος και διανοητική καθυστέρηση, ενώ είναι υπεργλυκαιμικοί και υπερφωσφαταιμικοί. Κάποιοι εμφανίζουν μικρού βαθμού ιστικές οστεοποιήσεις.

Στον αντίποδα, υπερέκφραση του γονιδίου *GNAS1* οδηγεί στο σύνδρομο McCune-Albright.

4.3 Ετερότοπη οστεοποίηση άνω και κάτω άκρων

Η Myositis Ossificans Circumscripta σπανίως εμφανίζεται στους μύες των άνω και κάτω άκρων. Παρόλα αυτά μορφές ετερότοπης οστεοποίησης εμφανίζονται και στις περιοχές αυτές. Συχνότερα αυτές οι εκδηλώσεις ετερότοπης οστεοποίησης συσχετίζονται με το περίοστεο και με τον περιarthρικό ινώδη συνδετικό ιστό. Τέτοιου αντιδραστικού τύπου ετερότοπη οστεοποίηση εμφανίζεται με τρεις διακριτές οντότητες:

- Nora's lesion
- Αντιδραστική περιοστίτις
- Υπονύχιες εξοστώσεις

Εικόνα 6. Nora's lesion

Η *πρώτη περίπτωση* αναφέρεται σε μία λοβώδη επέκταση του οστού και του χόνδρου που δημιουργούν μία μάζα πλησίον του οστού. Η εξεργασία δεν είναι επώδυνη και αφορά οποιαδήποτε ηλικία. Ακτινολογικά υπάρχει η εικόνα μιας καλώς περιγεγραμμένης οντότητας σε επαφή με το οστό. Ιστολογικά, πρόκειται για συσσωματώματα υαλώδους χόνδρου, μικροκυττάρων χωρίς εμφανή στοιχεία ατυπίας και νέου οστού. Η θεραπεία είναι η χειρουργική εξαίρεση. Ωστόσο το 50% των περιπτώσεων υποτροπιάζει εντός 2 ετών, ενώ 20% των ασθενών αυτών εμφανίζει και δεύτερη υποτροπή. (McCarthy et al, 2005)

Η *αντιδραστική περιοστίτιδα* επηρεάζει επίσης ασθενείς οποιασδήποτε ηλικίας αν και οι πιο συχνή ζώνη ηλικιών είναι 20-40. Η εξεργασία είναι επώδυνη και στο 40% των ασθενών υπάρχει ιστορικό τραύματος. Η πλέον συχνή θέση εντόπισης είναι οι εγγύς φάλαγγες, τα μετακάρπια και τα

μετατάρσια. Ιστολογικά, πρόκειται για εξεργασίες δημιουργίας νέου οστού σε σημεία ινοβλαστικής δραστηριότητας, με το πλέον ώριμο οστό να βρίσκεται στο κέντρο της εξεργασίας. Και αυτή η οντότητα θεραπεύεται με χειρουργική εξαίρεση. Σπανίως δε υποτροπιάζει. (McCarthy et al 2005)

Εικ. 7. Αντιδραστική Περιοστίτις

Οι *υπονύχιες εξοστώσεις* εμφανίζονται στη ραχιαία επιφάνεια της ονυχοφόρου φάλαγγας. Το μέγεθος της εξόστωσης ποικίλλει από 2 mm έως 2 cm. Μεγαλύτερες εξοστώσεις υπεγείρουν το νύχι και δημιουργούν εξελκώσεις στην κοίτη του. Κλινικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι το άλγος. Περίπου 75% των περιπτώσεων εμφανίζει υπονύχιες εξοστώσεις στο μεγάλο δάκτυλο του άκρου ποδός. Το υπόλοιπο 25% εμφανίζεται στα άλλα δάκτυλα τόσο του χεριού όσο και του ποδιού με όμοια συχνότητα. (Landon GC et al). Η οντότητα αυτή είναι κατά πάσα πιθανότητα δευτεροπαθής, αντιδραστικού τύπου σχηματισμός συνεπεία τραύματος. Παρόλα αυτά πρόσφατες μελέτες

υποστηρίζουν ότι οι υπονύχιες εξοστώσεις συσχετίζονται με μία χρωμοσωμική μετατόπιση, υπαρκτή σε ιστό εξόστωσης. (Zambrano E et al, 2004) Το εύρημα αυτό καθιστά την προέλευση των υπονύχιων

Εικόνα 8. Υπονύχια Εξόστωση

εξοστώσεων πιθανώς νεοπλασματικής αιτιολογίας.

Η θεραπεία των υπονύχιων εξοστώσεων είναι η χειρουργική εξαίρεσή τους, με παράλληλη διατήρηση του νυχιού και της ονυχοφόρου φάλαγγας.

4.4 Ετερότοπη οστεοποίηση μετεγχειρητικής αιτιολογίας

Μετεγχειρητικά, ετερότοπη οστεοποίηση έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσεται γύρω από μεγάλες αρθρώσεις όπως το ισχίο και το γόνατο στα κάτω άκρα αλλά και ο ώμος και ο αγκώνας στα άνω άκρα. Κυρίως έχει μελετηθεί η δημιουργία ΗΟ κατόπιν ολικής αρθροπλαστικής ισχίου και γόνατος. Το ποσοστό ανάπτυξης ετερότοπης οστεοποίησης κατόπιν ολικής αρθροπλαστικής ισχίου κυμαίνεται από 11-90% (Iorio R. et al, 2002) και στους άνδρες η επίπτωση είναι διπλάσια από τις γυναίκες. Οι παράγοντες κινδύνου παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 1. Η οπισθία προσπέλαση καθώς και η χρήση τσιμέντου θεωρούνται παράγοντες που δεν ευνοούν την ανάπτυξη ΗΟ (Kjaersgaard-Andersen P. et al, 1991, Maloney WJ et al, 1991).

Στην ΗΟ κατόπιν ολικής αρθροπλαστικής γόνατος έχουν παρατηρηθεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου. Η υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια είναι ο πρώτος σχετιζόμενος με τον ασθενή παράγοντας κινδύνου. Άλλος είναι η αυξημένη οστική πυκνότητα των οσφυϊκών σπονδύλων. Αναφορικά με την προσπέλαση, το notching του μηριαίου οστού αλλά και τεχνικές με εκτεταμένη αποκάλυψη του περιφερικού μηριαίου οστού με τραυματισμό του περιοστέου αλλά και βλάβες στον εκτατικό μηχανισμό του γόνατος έχουν ενοχοποιηθεί για τη δημιουργία ΗΟ. Τέλος, μετεγχειρητικές καταστάσεις οι οποίες θεωρούνται ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό ΗΟ είναι η ύπαρξη υγρού στην άρθρωση και η περιορισμένη δυνατότητα κάμψης του γόνατος. Πάντως, η κλινικώς σημαντική δημιουργία ΗΟ κατόπιν επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής γόνατος δεν θεωρείται ότι έχει υψηλή επίπτωση. (Πίνακας 2).

Για την κλινική αξιολόγηση της ανάπτυξης μετεγχειρητικής ΗΟ για το ισχίο έχουν χρησιμοποιηθεί δύο μέθοδοι ταξινόμησης. Βασίζονται κυρίως στην

προσθιοπίσθια ακτινογραφία λεκάνης-ισχίων και δεν λαμβάνουν υπόψιν τους ογκομετρικά στοιχεία:

Η πρώτη εξ αυτών είναι η μέθοδος Hamblen. Ταξινομεί τις μετεγχειρητικές ΗΟ ισχίου ανάλογα με το μέγεθος και τον εντοπισμό της έκτοπης οστεοποίησης αλλά και τη λειτουργικότητα της άρθρωσης. Η μέθοδος αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στις κλινικές μελέτες.

Πίνακας 2. Παράγοντες κινδύνου σε ολική αρθροπλαστική γόνατος

Σχετιζόμενοι με τον ασθενή	Σχετιζόμενοι με την εγχειρητική τεχνική	Σχετιζόμενοι με μετεγχειρητικές καταστάσεις
Υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια	Notching μηριαίου	Υγρό στην άρθρωση
Αυξημένη οστική πυκνότητα Οσφυϊκών σπονδύλων	Εκτεταμένη προσπέλαση με αποκόλληση περισστέου περιφερικού μηριαίου	Περιορισμένο εύρος κίνησης άρθρωσης
	Καταστροφή εκτατικού μηχανισμού	

Η δεύτερη μέθοδος ταξινόμησης είναι η μέθοδος Brooker. Είναι μια μέθοδος ταξινόμησης 4 σταδίων που βασίζεται στην προσθιοπίσθια ακτινογραφία λεκάνης-ισχίων. Η μέθοδος αυτή έχει και κλινική σημασία καθώς

τα δύο τελευταία στάδια χαρακτηρίζονται από κλινικά σημαντικό περιορισμό της κινητικότητας των ασθενών.

Το στάδιο 1 (εικόνα 9Α) χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ετερότοπων οστικών νησιδίων εντός των μαλακών μορίων της άρθρωσης του ισχίου.

Στο στάδιο 2 (εικόνα 9Β) αναπτύσσονται οστικές προβολές από το μηριαίο προς τη λεκάνη και αντιστρόφως, οι οποίες περιορίζουν το μεσοδιάστημα αλλά το εναπομένον μεσοδιάστημα είναι μεγαλύτερο του 1 cm.

Εικόνα 9. Στάδια της κατά Brooker ταξινόμησης ΗΟ ισχίων.

Στο στάδιο 3 (εικόνα 9C) το εναπομένον μεσοδιάστημα είναι μικρότερο του 1 εκατοστού.

Τέλος στο στάδιο 4 (εικόνα 9D) υπάρχει πλήρης αγκύλωση της κατ' ισχίον άρθρωσης.

Αργότερα προστέθηκε και ένα επιπλέον στάδιο 0 χωρίς εμφανή στοιχεία HO.

Ο Maloney και συνεργάτες (1991) τροποποίησαν την κατάταξη Brooker διακρίνοντας υποπεριπτώσεις A και B στα στάδια 3 και 4 ανάλογα με τη λειτουργικότητα της άρθρωσης.

Αναφορικά με την μετεγχειρητική ετερότοπη οστεοποίηση του γόνατος υπάρχουν διάφορες ταξινομήσεις. Ο Harwin και συνεργάτες το 1993, βασιζόμενοι σε ακτινολογικά δεδομένα, διέκριναν 4 στάδια ταξινόμησης. Ο Figgie και συνεργάτες διέκριναν 4 στάδια βασιζόμενοι μόνο στην πλαγία ακτινογραφία γόνατος, χωρίς να συμπεριλαμβάνουν τη λειτουργικότητα της άρθρωσης.

Ο Rader και συνεργάτες το 1997, βασιζόμενοι στην προσθιοπίσθια αλλά και πλαγία ακτινογραφία του γόνατος, διακρίνουν 3 στάδια ετερότοπης οστεοποίησης γόνατος εκ των οποίων το στάδιο III χαρακτηρίζεται από ελαττωμένα score λειτουργικότητας της άρθρωσης και ουσιαστικά επιβάλλει τη χειρουργική αποκατάσταση της λειτουργικότητας.

Τέλος οι Furia και Pellegrini το 1995, διακρίνουν δύο κατηγορίες ταξινόμησης της μετεγχειρητικής HO γόνατος και κάθε κατηγορία χωρίζεται σε δύο βαθμούς. Βαθμός B σχετίζεται με μειωμένο εύρος κίνησης κατά περίπου 14°.

Πόνος αλλά και περιορισμός του εύρους κίνησης της άρθρωσης παρουσιάζονται σε ποσοστό της τάξεως του 9-11% επί της επίπτωσης HO. Γενικά η ανάπτυξη ετερότοπης οστεοποίησης δεν συσχετίζεται με σημείο Trendelenbourg ή με απώλεια μυϊκής ισχύος. Μπορεί όμως να δημιουργήσει ερεθιστικά συμπτώματα από τένοντες ή και από το θύλακο του τροχαντήρα, τα οποία αν δεν υποχωρήσουν με συντηρητική αγωγή, απαιτούν χειρουργική αντιμετώπιση. Ερεθισμός του ισχιακού νεύρου δεν συμβαίνει συχνά, εκτός αν πρόκειται για επανεπέμβαση ισχίου, ιδίως επί εδάφους προηγούμενου ιστορικού HO.

Περιπτώσεις αστάθειας της πρόθεσης δεν είναι συχνές αν και θεωρητικά, περιπτώσεις impingement λόγω της ΗΟ είναι πιθανές. Ωστόσο, κλινικά αυτές είναι σπάνιες λόγω της μειωμένης κινητικότητας αρθρώσεων με ΗΟ.

4.5 Ετερότοπη Οστεοποίηση Νευρογενούς Αιτιολογίας (κατόπιν τραυματισμού του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος)

Η ετερότοπη οστεοποίηση νευρογενούς αιτιολογίας παρατηρείται κατόπιν τραυματισμού του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Υπάρχουν ωστόσο αρκετές νευρολογικής παθολογίας οντότητες που έχουν συσχετιστεί με ετερότοπη οστεοποίηση και μερικές απ'αυτές είναι:

Η εγκεφαλίτιδα, η μηνιγγίτιδα, η μυελίτιδα, ο τέτανος, εγκεφαλικοί όγκοι, επισκληρίδια αποστήματα, η υπαραχνοειδής αιμορραγία. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι προαναφερθείσες οντότητες δημιουργούν κοινές παθοφυσιολογικές εξεργασίες στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα σε σχέση με το Τραύμα. (Balboni T et al, 2005)

4.5.1. Μοριακή Παθοφυσιολογία Πολυτραυματισμών

Παρά τη σημαντική βελτίωση των επιπέδων ασφαλείας στα ταξίδια αλλά και στον εργασιακό τομέα, παρά τη σημαντική πρόοδο στον τομέα της υγείας, το τραύμα παραμένει μακράν η συχνότερη αιτία θανάτου σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών. Θάνατος στην περιτραυματική περίοδο μπορεί να προκληθεί είτε εξαιτίας βαρειών κακώσεων Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, είτε εξαιτίας μεγάλης αιμορραγίας.

Στην μετατραυματική περίοδο ο θάνατος μπορεί να προέλθει από δευτεροπαθείς βαρείες εγκεφαλικές βλάβες ή από ανοσοποιητική ανεπάρκεια. Οι αρχικές βλάβες (βλάβες οστών αλλά και κυρίως μαλακών μορίων και σπλάχνων) επάγουν επανορθωτικούς μηχανισμούς με τη μορφή συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης. (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS). Για να τεθεί η διάγνωση του SIRS, απαιτείται η ύπαρξη 2 τουλάχιστον

από τις παραμέτρους του πίνακα 3. SIRS με ταυτόχρονη παρουσία βακτηριαιμίας υποδηλώνει σήψη.

Πίνακας 3. Κλινικές παράμετροι SIRS

Καρδιακή Συχνότητα ≥ 90 /λεπτό
Αναπνευστική Συχνότητα ≥ 20 /λεπτό δηλ. υπεραερισμός με $\text{PaCO}_2 \leq 32\text{mmHg}$
Θερμοκρασία $\geq 38^\circ\text{C}$ ή $\leq 36^\circ\text{C}$
$\text{WBC} \geq 12000/\text{mm}^3$ ή $\leq 4000/\text{mm}^3$

Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από τοπική και συστηματική παραγωγή μεσολαβητών όπως κυτταροκινών, συστατικών του συμπληρώματος, πρωτεΐνες του συστήματος πήξης, πρωτεΐνες οξείας φάσεως, νευροενδοκρινικούς μεσολαβητές και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή του τραύματος.

Η πολύπλοκη αντίδραση της ανοσοαπόκρισης καθορίζεται από πρωτογενή και δευτερογενή στοιχεία βάσει της θεωρίας των δύο βλαβών (two hit theory).

Το συσσωρευμένο τραυματικό φορτίο με τις κακώσεις μαλακών μορίων συμπαγών και κοίλων οργάνων αλλά και οστών αποτελούν την *πρωτογενή βλάβη*.

Η *δευτεροπαθής βλάβη* αναφέρεται σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς παράγοντες κατατάσσονται η αναπνευστική δυσχέρεια με την επακόλουθη υποξία, η επαναλαμβανόμενη καρδιαγγειακή αστάθεια, πιθανή μεταβολική οξέωση, οι ισχαιμικές αλλοιώσεις και οι διαταραχές επαναιμάτωσης, ο νεκρός ιστός, μολυσμένοι καθετήρες ή σωλήνες και οι λοιμώξεις. Τυπικοί εξωγενείς παράγοντες είναι οι χειρουργικές επεμβάσεις με δημιουργία δευτεροπαθών βλαβών στα μαλακά μόρια, η πιθανή εκτεταμένη απώλεια αίματος, ανεπαρκής ή καθυστερημένη χειρουργική

αντιμετώπιση κατόπιν παραμελημένων κακώσεων και τέλος οι μαζικές μεταγγίσεις αίματος.

Όπως είναι αναμενόμενο το εύρος των οργανικών κακώσεων επηρεάζει το εύρος της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης και έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης SIRS υπάρχει κατόπιν αμιγούς ή συνδυασμένης ΚΕΚ (Ertel W et al, 1998, Rangel-Frausto M et al, 1995)

Πρωτογενής εστιακή ή διάχυτη βλάβη του εγκεφάλου και δευτερογενείς βλάβες όπως οι ισχαιμικές αλλοιώσεις και οι διαταραχές επαναιμάτωσης, το εγκεφαλικό οίδημα και η ενδοκράνιος υπέρταση καθορίζουν την έκβαση αλλά και τη συχνότητα και βαρύτητα των μετατραυματικών επιπλοκών (Siegel J.H et al 1991, Sosin D.M et al, 1989).

Παρά το γεγονός ότι ο εγκέφαλος και εν γένει το ΚΝΣ θεωρούνται ανοσολογικά απρόσβλητα λόγω της ύπαρξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, διαφορετικές μελέτες αποδεικνύουν ότι πρόκειται για όργανο στόχο όσο και για όργανο που συμμετέχει στην ανοσολογική αντίδραση αυτή καθαυτή. (Kossmann T. et al 1997, Schmidt O. et al 2005).

Τα κύτταρα γλοίας, τα αστροκύτταρα και οι νευρόνες δύνανται να παράγουν φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές καθώς και υποδοχείς τους. (Kossmann T et al 1997, Lenzlinger PM et al 2001, Schmidt O. et al 2005). Από την άλλη πλευρά, συστηματικοί μεσολαβητές από την περιφέρεια επηρεάζουν την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού οδηγώντας στην αμφίδρομη κυκλοφορία μεσολαβητών φλεγμονής.

Επισκληρίδιο αιμάτωμα, εγκεφαλικό οίδημα, αλλά και δευτεροπαθές μετατραυματικό οίδημα από συστηματικές φλεγμονώδεις διαδικασίες μπορούν να αποβούν μοιραία για τον ασθενή.

Θωρακικές κακώσεις που περιλαμβάνουν κατάγματα πλευρών, θλάσεις πνευμονικού παρεγχύματος συχνά επιπλέκονται με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, με κλινικές εκδηλώσεις πνευμονίας, με ARDS (Martin TR 1997, Neff MJ et al 2003).

Κακώσεις μαλακών μορίων των άκρων ειδικά σε ασθενείς με αιμορραγικό shock, επιπλέκονται συχνά με ελαττωμένη αιμάτωση (υποξία χαμηλής ροής). Έτσι εμφανίζεται μεγαλύτερος κίνδυνος διαταραχών επαναιμάτωσης και δευτεροπαθών λοιμώξεων. Επιπλέον, συνθλιπτικές κακώσεις μυών μπορούν να οδηγήσουν σε σύνδρομο διαμερίσματος και ακολούθως σε ραβδομυόλυση και τελικά σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια (Rensing H et al 2001).

Κατάγματα των μακρών οστών όπως και του πυελικού δακτυλίου χαρακτηρίζονται από μεγάλες απώλειες αίματος και συμβάλλουν στη φλεγμονώδη αντίδραση.

Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις, το σύνδρομο της λιπώδους εμβολής είναι μια κλινική συνέπεια 24-48 ώρες μετατραυματικά. Τα χαρακτηριστικά σημεία του συνδρόμου είναι πετέχειες, νοητικές διαταραχές και αναπνευστική δυσχέρεια (Parisi D et al 2002).

Η συχνότητα σηπτικών επεισοδίων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (Martin GS et al, 2003). Κλειστές κακώσεις με καταστροφές στα μαλακά μόρια ή ανοικτές παραμελημένες κακώσεις αποτελούν πύλη εισόδου μικροοργανισμών (Wichmann MW et al 1998, Yada-Langui M. et al 2000). Οι πλέον συχνές εστίες σήψης είναι το αναπνευστικό, οι καθετήρες, οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και τα τραύματα.

Η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση SIRS, συσχετίζεται με το τραυματικό φορτίο, με γενετικούς παράγοντες, με τη γενική φυσική κατάσταση του ασθενούς, το αντιγονικό φορτίο αλλά και την τοπική και συστηματική απελευθέρωση κυτταροκινών και φωσφολιπιδίων (Dinarello CA et al 2000, Hensler T et al 2002, Oberholzer A et al 2000, Schroder T et al 2004, Texereau J et al 2004).

Οι κυτταρικές σειρές που συμμετέχουν στην ανοσολογική αντίδραση είναι τα Πολυμορφοπύρηνα, τα natural killer cells, τα Ιστικά μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη χυμική ανοσία.

Οι κυτταροκίνες είναι πολυπεπίδια που δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Υπάρχουν κυτταροκίνες *υπεροξείας φάσεως* TNF-α (Tumour Necrosis Factor-α) ή ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), *υποξείας φάσεως* όπως IL-6, IL-8 ο μεταναστευτικός παράγων μακροφάγων (MMF), η High Motility Group protein 1 (HMG-1), όπως επίσης και οι IL-12, IL-18. Μερικές από αυτές συσχετίζονται με το ISS (injury severity score), την πιθανότητα εμφάνισης ARDS, σήψης, αλλά και με το τελικό αποτέλεσμα (Bhatia M et al 2004, Martin C et al 1997).

Τα T-helper λεμφοκύτταρα, υπό την επίδραση των αντιγόνων, διαφοροποιούνται σε δύο διακριτούς φαινότυπους: T_H1 και T_H2. Τα πρώτα από αυτά επάγουν την φλεγμονώδη αντίδραση ενώ τα δεύτερα έχουν αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα.

Η φλεγμονώδης δράση (SIRS) και οι αυξητικοί παράγοντες G-CSF και GM-CSF, κινητοποιούν τα πολυμορφοπύρρηνα να απελευθερώσουν πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ενώ παράλληλα ελαττώνουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) των πολυμορφοπυρήνων κυττάρων (Brach MA et al 1992, Colotta F et al 1992, Ertel W et al 1999).

Η ιστική βλάβη επιπλέον οδηγεί σε αύξηση του εξωκυττάριου Ca²⁺ κατόπιν αύξησης της φωσφολιπάσης A₂ και της φωσφολιπάσης C. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέως από τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Με την ενεργοποίηση της κυκλοοξυγενάσης και της 5-λιποοξυγενάσης, παράγονται προσταγλανδίνη E₂, B₄ λευκοτριένια και θρομβοξάνη A₂. Τα μόρια αυτά ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση, αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και τη συσσώρευση και θρόμβωση των αιμοπεταλίων (Zimmerman GA et al, 2002).

Στον αντίποδα, κατόπιν τραύματος παράγονται και αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές. Σ' αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι IL-4, IL-10, IL-13 (Collighan N et al 2004, Cox G. 1996, Ertel W et al 1996), οι οποίοι παράγονται από τα κύτταρα T_H-2 και από τα μονοκύτταρα-μακροφάγα.

Επιπλέον, η δυνατότητα των μονοκυττάρων να παράγουν τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, μειώνεται κατόπιν δράσεως βακτηριδιακών στοιχείων (ενδοτοξινών) είτε από gram+ είτε από gram- βακτήρια. Φαίνεται ότι μεσολαβητές όπως ο IL-10 μειώνουν τη δραστηριότητα ενδοκυτταρίων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κβ ο οποίος είναι απαραίτητος για την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών (Cassatella MA et al 1993, Geng Y et al 1994, Heagy W et al 2000 and 2003, Keel M et al 1996, Lyons A et al 1997, Wahlstrom K et al 1999, Wang P et al 1995, West MA et al 2002).

Κατά την πρώιμη μετατραυματική φάση, έχει παρατηρηθεί λεμφοκυτταροπενία (Buzdon MM et al 1999, Hotchkiss RS et al 1999, Lenardo MJ 1996). Αυτή έχει συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση κατόπιν τραύματος και πιθανόν σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση λεμφοκυττάρων (Dhein J et al 1995, Lenardo MJ 1996, Mahidhara R et al 2000, Power C et al 2003).

Μία υπερβολική αντιφλεγμονώδης αντίδραση, έχει συσχετισθεί με την μετατραυματική ανοσοκαταστολή και με τις συνακόλουθες λοιμώξεις αλλά και σηπτικές επιπλοκές. Αυτή η κατάσταση καλείται «αντιρροπιστικό αντιφλεγμονώδες δράσης σύνδρομο» (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome, CARS). Ο όρος «αντιρροπιστικό» αμφισβητείται, καθώς θεωρείται ότι εξελίσσεται ταυτόχρονα και παράλληλα με το SIRS (Neidhardt R et al, 1997). Το αμυντικό σύστημα του οργανισμού προσπαθεί να βρει τη χρυσή τομή μεταξύ των δύο καταστάσεων ώστε να επάγει τους επανορθωτικούς μηχανισμούς χωρίς να εκτρέπει την ισορροπία προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση.

4.5.1.1 Ενεργοποίηση του καταρράκτη αντιδράσεων του συμπληρώματος, του συστήματος καλλικρεΐνης-κινίνης και της διαδικασίας πήξεως του αίματος.

Από τη δράση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταβολιτών ενεργοποιεί τα προαναφερθέντα συστήματα αντιδράσεων. Αναφορικά με το συμπλήρωμα, το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποιείται από τα συμπλέγματα

αντιγόνου-αντισώματος (ανοσοσφαιρίνες G, M), ή από τον παράγοντα XIIa. Βακτηριδιακά προϊόντα όπως λιποπολυσακχαρίτες ενεργοποιούν το εναλλακτικό μονοπάτι. Από την ενζυμική επεξεργασία των προϊόντων του συμπληρώματος από τις αντίστοιχες κονβερτάσες, παράγονται οψονίνες (C3b, C5b), αναφυλατοξίνες (C3a, C5a) και επίσης το σύμπλοκο καταστροφής μεμβρανών ξένων κυττάρων (C5b, C6, C7, C8, C9).

Οι οψονίνες συμμετέχουν (επάγουν) τη φαγοκυττάρωση καθώς προσκολλώνται στην επιφάνεια των προς φαγοκυττάρωση βακτηρίων.

Οι αναφυλατοξίνες επάγουν χημειοτακτικούς μηχανισμούς και την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων. Τέλος, το σύμπλοκο καταστροφής μεμβρανών ξένων κυττάρων οδηγεί στη λύση των κυττάρων.

Αναφορικά με το σύστημα καλλικρεΐνης – κινίνης, οι παράγοντες XII και XI μαζί με την προκαλλικρεΐνη, κινινογόνο αποτελούν το σύστημα ενεργοποίησης εξ επαφής. Το σύστημα αυτών των παραγόντων ενεργοποιείται κατόπιν επαφής με αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές επιφάνειες.

Ο παράγων XII ενεργοποιεί το κλασσικό μονοπάτι του συμπληρώματος. Η καλλικρεΐνη επάγει την ινοδόλυση και τη δημιουργία βραδυκινίνης από το κινινογόνο. Οι κινίνες είναι αγγειοδιασταλτικές ουσίες που αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και εμποδίζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων (Sugimoto K et al 1998).

Το ενδογενές μονοπάτι θρόμβωσης ενεργοποιείται “εξ επαφής” μέσω των παραγόντων XIa και IXa. Παρόλα αυτά το εξωγενές μονοπάτι είναι αυτό που ενεργοποιείται.

Εικόνα 10.
Σχηματική
αναπαράσταση
Διάχ. Ενδαγγειακής
Πήξης

Η κατανάλωση των παραγόντων θρόμβωσης και η δυσλειτουργία των θρομβοκυττάρων οδηγούν στη διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (εικ. 10) με αιμορραγική διάθεση και σχηματισμό ενδαγγειακού θρόμβου ινώδους. Άμεσες συνέπειες είναι οι μικροαγγειακές διαταραχές και η κυτταρική βλάβη εξαιτίας της υποξίας.

4.5.1.2. Η αντίδραση οξείας φάσεως

Η τοπική (από τα κύτταρα Kurpffer) και η συστηματική απελευθέρωση κυτταροκινών (TNFα, IL-1 and IL-6) επάγουν την αντίδραση οξείας φάσεως στο ήπαρ. Ο στόχος είναι η επαγωγή προστατευτικών και αντιμικροβιακών μηχανισμών. Η βιοσύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσεως αυξάνει. Τέτοιες είναι: C-reactive Proteins, α1 αντιθρυψίνη, α2 μακροσφαιρίνη, σερουλοπλασμίνη, δεσμευόμενη πρωτεΐνη λιποπολυσακχαριτών, ινοδογόνο, προθρομβίνη (Du Clos TW 2000, el Hassan BS et al 1990).

Το CRP αυξάνει την έκφραση του ιστικού παράγοντα στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και ως εκ τούτου επάγει το εξωγενές μονοπάτι θρόμβωσης (Du Clos TW 2000). Το CRP δεν συσχετίζεται ποσοτικά και δεν αποτελεί προγνωστικό σημείο μετατραυματικών επιπλοκών όπως των λοιμώξεων (Gosling P et al 1992, Roumen RM et al 1995). Συστηματική διαδοχική καταγραφή των επιπέδων του CRP είναι χρήσιμη διότι, ιδίως τις πρώτες δύο εβδομάδες, ενώ σε συστηματικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις τα

επίπεδα μειώνονται, σε ύπαρξη βακτηριακής λοίμωξης, υπάρχει συνεχής αύξηση.

Η α1 αντιθρυψίνη απενεργοποιεί τις πρωτεάσες που εκκρίνονται από τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Η α2-μακροσφαιρίνη και η σερουλοπλασμίνη εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου καθώς και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η πρωτεΐνη δέσμησης των πολυσακχαριτών αυξάνει σημαντικά κατόπιν τραύματος και θεωρείται προγνωστική για σηπτικές επιπλοκές.

4.5.1.3. Η προσέλκυση των λευκοκυττάρων (Εικ. 11)

Εικόνα 11

Προφλεγμονώδεις μεσολαβητές και τοξίνες επάγουν την προσκόλληση των πολυμορφοπυρήνων λευκών αιμοσφαιρίων στα κύτταρα του ενδοθηλίου με “up-regulation” μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Το πρώτο στάδιο (rolling) τα πολυμορφοπύρρηνα «κυλούν» επί των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη βοήθεια μορίων όπως η L-selectin και η E-selectin.

Στο δεύτερο στάδιο (της προσκόλλησης) επάγεται η αυξημένη παραγωγή ιντεγκρινών τόσο στα πολυμορφοπύρρηνα όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, δημιουργείται σταθερή προσκόλληση πολυμορφοπυρήνων-ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τέλος, η εξωαγγειακή μετανάστευση και ενεργοποίηση των πολυμορφοπυρήνων εντός του ιστού, γίνεται κατόπιν επίδρασης χημειοτακτικών παραγόντων όπως οι χημοκίνες και οι αναφυλατοξίνες του συμπληρώματος.

Πέραν της φαγοκυττάρωσης μικροοργανισμών και κυτταρικών απολυμάτων, τα πολυμορφοπύρρηνα έχουν και άλλες δράσεις όπως της αποκοκκίωσης εξωκυττάρων πρωτεασών (ελαστάσες) και μεταλλοπρωτεϊνών και της δημιουργίας οξειδωτικών παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (οξειδωτικό stress). Οι ελαστάσες έχουν τη δυνατότητα διάσπασης των περισσοτέρων εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Η πρωτεολυτική τους δράση ρυθμίζεται από ενδογενείς αναστολείς της πρωτεάσης όπως η α1-αντιθρυψίνη, η α2-μακροσφαιρίνη (Keel M et al 2005).

Η ελαστάση των ουδετεροφίλων επάγει και την παραγωγή φλεγμονοδών κυτταροκινών. Κατά αντίστοιχο τρόπο, μεταλλοπρωτεάσες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση σημαντικών δομικών πρωτεϊνών στη μετατραυματική περίοδο (Keel M et al 2005).

Κατά το οξειδωτικό stress, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προϊόντα ενεργών ριζών αζώτου συνεπικουρούμενα και από άλλους μεταβολίτες από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση οδηγούν στην κυτταροτοξικότητα ιστών. Στα αγγεία, αυτή η διαδικασία γίνεται εμφανής ως γενικευμένο οίδημα, γνωστό ως σύνδρομο τριχοειδικής διαρροής.

4.5.1.4. Διαταραχές στη μικροκυκλοφορία

Η μικροκυκλοφορία ως δομική-λειτουργική οντότητα αποτελείται από τα τελικά αρτηριόλια, τα τριχοειδή και τα φλεβίδια και ρυθμίζει τη θρέψη και την ανταλλαγή των προϊόντων του μεταβολισμού στους ιστούς. Διαταραχές

στη μικροκυκλοφορία κατά τη διάρκεια αιμορραγικού σοκ και συστηματικής φλεγμονής παρατηρούνται εξαιτίας λόγω της αρχικής λειτουργίας του συμπαθητικού συστήματος, όπου η υπερπαραγωγή κατεχολαμινών οδηγεί στην αγγειοσύσπαση των αρτηριολίων και φλεβιδίων. Όμως λόγω της μειωμένης επίδρασης των κατεχολαμινών στα αρτηρίδια παρατηρείται μειωμένη τριχοειδική ροή με αυξημένη υδροστατική πίεση (Bateman RM et al 2003). Αυτή η μικροκυκλοφορική διαταραχή σε συνδυασμό με την προαναφερθείσα τριχοειδική διαρροή, είναι υπεύθυνες για τη δευτερογενή υποογκαιμία και αιμοσυμπύκνωση με την επακόλουθη συγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και αιμοπεταλίων. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε κώλυμα της μικροκυκλοφορίας και ανεπάρκεια της ανταλλαγής ουσιών και ακολούθως στην ιστική βλάβη.

4.5.1.5. Ισχαιμία – Διαταραχές επαναιμάτωσης

Η συστηματική υποξαιμία και υπόταση κατόπιν τραύματος, καθώς και η συνοδός ελαττωμένη αιμάτωση οδηγούν στην έλλειψη οξυγόνου σε όλα τα κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής. Αυτή η κατάσταση αντισταθμίζεται μερικά από την κατανάλωση του υπάρχοντος ενδοκυτταρίου ATP προς ADP ή AMP. Η ενεργειακή έλλειψη οδηγεί στην υπολειτουργία της K^+/Na^+ ATPase αντλίας και στην ενδοκυττάρια αυξημένη συγκέντρωση Na^+ . Το φαινόμενο αυτό έχει συνέπεια το κυτταρικό οίδημα. Η έλλειψη ενεργειακών αποθεμάτων οδηγεί επίσης και στην κυτταροπλασματική αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και στις μεταβολικές διαταραχές όσον αφορά τη γλυκόζη, τις πρωτεΐνες, την ενεργοποίηση των φωσφολιπασών, πρωτεασών και ενδονουκλεασών.

Παρόλα αυτά, μη αντιστρεπτή βλάβη εμφανίζεται κατόπιν παρατεταμένου αιμορραγικού σοκ (Arundine M et al 2003, Power C et al 2003).

Πιο επικίνδυνη για δευτερογενή ιστική βλάβη, είναι η περίοδος επαναιμάτωσης κατά την οποία, η υποξανθίνη που παράγεται από την αποδόμηση του ATP, αποικοδομείται σε ξανθίνη και τέλος σε ουρικό οξύ από

την οξειδάση της ξανθίνης με ταυτόχρονη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αυτές παραβλάπτουν τη δομή των μεμβρανών και του DNA με συνακόλουθη απόπτωση και νέκρωση των ενδοθηλιακών, παρεγχυματικών και ανοσοποιητικών κυττάρων.

Σχήμα 1. Ισχαιμία και διαταραχές επαναιμάτωσης

4.5.1.6 Νευροενδοκρινικές αντιδράσεις και μεταβολικές διαφοροποιήσεις

Το στρες του τραύματος καθώς και αντιδράσεις όπως φόβος, αγωνία σε συνδυασμό με φλεγμονώδεις μεσολαβητές δημιουργούν ενεργοποιητικές καταστάσεις για τον υποθάλαμο δεδομένου και του συχνά κατεστραμμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Hill AJ et al 1998).

Από την άλλη πλευρά η υποογκαιμία αναγνωρίζεται από τους αορτικούς και καρωτιδικούς τασεοϋποδοχείς και από τους σπειραματικούς τασεοϋποδοχείς, ώστε να διατηρηθεί η αιμάτωση στα ζωτικά όργανα του ασθενούς.

Οσμωτικοί υποδοχείς στον υποθάλαμο είναι υπεύθυνοι για την έκκριση αντιδιουρητικής ορμόνης από τη νευροϋπόφυση.

Έτσι μέσω του συμπαθητικού συστήματος παράγονται κατεχολαμίνες οι οποίες επιδρούν:

- Στο κυκλοφορικό σύστημα θετική ινότροπο δράση στην καρδιά και αύξηση των περιφερικών αντιστάσεων με περιφερική αγγειοσύσπαση με στόχο τη βέλτιστη αιμάτωση των ευγενών ζωτικών οργάνων με υποαιμάτωση των σπλάχων, μυών και δέρματος
- Στη μεταβολική αντίδραση του οργανισμού στο τραύμα. Αρχικά παρατηρείται ηπατική γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση με κυκλοφορία αυξημένης ποσότητας λιπαρών οξέων. Η πρώιμη υπεργλυκαιμική αντίδραση Γλυκόζη $\geq 200\text{mg\%}$, σχετίζεται με σημαντικά αυξημένα ποσοστά μεγάλης νοσηρότητας και πτωχής πρόγνωσης (Laird AM et al 2004). Η αυξημένη ενδοκυτταρική γλυκόζη σε συνδυασμό με την ιστική υποξυγοναιμία οδηγούν στη γαλακτική οξέωση (η γλυκόλυση καταλήγει σε συσσώρευση γαλακτικού οξέως κατόπιν αναγωγής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ). Διαφορετικές μελέτες δείχνουν ότι αυξημένα επίπεδα ορού γαλακτικού οξέως συσχετίζονται με πτωχή πρόγνωση σε βαρείς τραυματισμούς (Abramson D et al 1993, Davis JW et al 1996).
- Η επίδραση του stress, ο πόνος και ο φόβος του ασθενούς επάγουν την ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (CRH-ACTH-κορτιζόλης-αλδοστερόνης) που συνεπάγονται αύξηση γλυκονεογένεσης, αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης, αύξηση του καταβολισμού των πρωτεϊνών και των μυών και κινητοποίηση ελευθέρων λιπαρών οξέων μέσω λιπόλυσης. Ταυτόχρονα ελαττώνεται η βιοσύνθεση αντισωμάτων

και η προγραμματισμένη απόπτωση των πολυμορφοπυρήνων. Η αλδοστερόνη μειώνει την αποβολή Na^+ και συνεπώς και ύδατος.

Γενικά ο μετατραυματικός μεταβολισμός είναι μειωμένος για 24 ώρες από τον τραυματισμό, ακολουθεί μια φάση έντονου καταβολισμού για 2 εβδομάδες που τη διαδέχεται η αναβολική φάση (επιδιόρθωση). Στη φάση του έντονου καταβολισμού, όλη η ενέργεια χρησιμοποιείται για την ανοσολογική αντίδραση και τη σύνθεση των πρωτεϊνών οξείας φάσεως.

4.5.2 Παθοφυσιολογία Κρανιοεγκεφαλικής Κάκωσης

Κατόπιν της μελέτης της μοριακής παθοφυσιολογίας του τραύματος είναι απαραίτητο να διερευνήσουμε τι ακριβώς συμβαίνει στην Κρανιοεγκεφαλική Κάκωση.

Στη βόρειο Αμερική σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία που υπάρχουν θεωρείται ότι τουλάχιστον 1500000 άτομα ανά έτος υφίστανται ΚΕΚ (Beauchamp K et al 2008). Από αυτούς τουλάχιστον 320000 άτομα που έχουν εξαιτίας του ατυχήματός τους πάψει να εργάζονται θεωρείται ότι έχουν υποστεί σημαντικού βαθμού αλλά διαφορετικής έκτασης Κρανιοεγκεφαλική Κάκωση. Είναι αυταπόδεικτο το μεγάλο κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα που προκαλείται από την εν λόγω κατάσταση.

Παρά το γεγονός ότι ακολουθούνται τα πρωτόκολλα και οι οδηγίες για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ΚΕΚ, μόνο το 40% των πασχόντων από σοβαρή ΚΕΚ έχει καλό αποτέλεσμα θεραπείας (Perel P et al 2008), ενώ το 11% των ατόμων με μετρίου βαρύτητας ΚΕΚ υποφέρει από Μετατραυματική διαταραχή στρες (Post-Traumatic Stress Disorder) με σημαντική φυσική αδυναμία (Hoge CW et al 2008, Schneiderman AI et al 2008).

Αντίστοιχα με το τραύμα, η κρανιοεγκεφαλική κάκωση χαρακτηρίζεται κι αυτή από τη θεωρία της διπλής κάκωσης (two hits theory). Η πρώτη κάκωση περιλαμβάνει τις μηχανικές επιδράσεις που συμβαίνουν περιτραυματικά στο ΚΝΣ. Αν ο ασθενής επιβιώσει τότε ακολουθεί η δευτερογενής κάκωση. Αυτή περιλαμβάνει μια σειρά μετατραυματικών

αλληλουχιών γεγονότων όπως, ανατομικά, η διαταραχή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση (SIRS), ο καταγισμός αντιδράσεων στο πλάσμα (plasmatic cascade activation), η διαταραχή της μικροκυκλοφορίας, οι ισχαιμικές αλλοιώσεις και οι διαταραχές επαναιμάτωσης, οι νευροενδοκρινικές αντιδράσεις με τη μεγάλη ροή κατεχολαμινών, πρωτεϊνών οξείας φάσεως και τέλος με την πιθανή έκπτωση πολλαπλών οργάνων που μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο. Όλα αυτά βέβαια σε συνάρτηση με το τραυματικό φορτίο αλλά και τη φυσική κατάσταση του οργανισμού.

Ο σκοπός της θεραπείας στην ΚΕΚ είναι να αμβλύνουμε τις επιδράσεις της δευτερογενούς βλάβης. Ωστόσο λόγω του ετερογενούς χαρακτήρα κάθε κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης, όλες οι σύγχρονες μελέτες για εύρεση και χρήση νευροπροστατευτικών παραγόντων δεν έχουν δώσει το αναμενόμενο αποτέλεσμα (Xiong Y et al 2009, Vink R et al 2009, Stoica B et al 2009). Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι να παρεμποδιστεί ένα ενδεχόμενο πρώιμο δευτερογενές συμβάν που θα μπορούσε να πυροδοτήσει μηχανισμούς δευτερογενούς βλάβης οι οποίοι θα μπορούσαν να εξελιχθούν αργότερα.

Έτσι, ελέγχοντας μία πρώιμη δευτερογενή αιμορραγία μπορεί να παρεμποδίσει την εκδήλωση συστηματικών αντιδράσεων δευτερογενούς βλάβης που προκαλούνται από το εξαγγειωμένο αίμα, όπως το οξειδωτικό στρές, η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση, το οίδημα, ο κυτταρικός θάνατος, και η αυξημένη ενδοκράνιος πίεση (Simard JM et al 2009).

Τα τελευταία χρόνια η προσπάθεια θεραπευτικής αντιμετώπισης είναι νευροκεντρική. Σ' αυτό οδήγησε η παρατήρηση ότι τα υποστηρικτικά κύτταρα του ΚΝΣ είναι ζωτικά για την απόκριση στην τραυματική βλάβη, καθώς και στην διατήρηση της ύπαρξης υγείων νευρώνων. Δεν θα ήταν λάθος αν υποστηρίξει κάποιος ότι η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ζωτικά στοιχεία για τους νευρόνες. Επιπλέον, χωρίς τα ολιγοδενδροκύτταρα, η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων είναι μάλλον αδύνατη, ανεξάρτητα από την κατάσταση του

νευράξονα. Η δομική αλλά και λειτουργική ακεραιότητα της μικροκυκλοφορίας είναι σημαντικότερη διότι χωρίς αυτήν, η ιστική ισχαιμία με τις συνακόλουθες της κάκωσης διαταραχές επαναιμάτωσης καθίστανται απειλητικές για όλα τα άλλα κύτταρα.

Συμπερασματικά, η οποιαδήποτε αλλοίωση της δομής και λειτουργίας των κυττάρων του ΚΝΣ αλλά και του περιβάλλοντός τους μπορεί να πυροδοτήσει τη δευτερογενή βλάβη του ΚΝΣ.

Φαρμακευτικοί παράγοντες που μπορεί να δράσουν ως προφύλαξη του ΚΝΣ είναι (Aarabi B. et al 2009):

- Το τρανεξαμικό οξύ. Ως αντιπινωδολυτικός παράγων προφυλάσσει από την πιθανή κλινική ή υποκλινική θρόμβωση και παρεμποδίζει τη δευτερογενή αιμορραγία.
- Η Βασοπρεσίνη. Διατηρεί την λειτουργική ακεραιότητα της μικροκυκλοφορίας και βοηθά στην ιστική άρδευση των νευρικών κυττάρων.
- Η προποφόλη. Σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και παράλληλα βαθειά αναισθησία.
- Παράγωγα χολίνης (CDP-choline). Η δυνατότητα τους να δράσουν προστατευτικά ή και επιδιορθωτικά επί των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και αποτελέσματα μετααναλύσεων δείχνουν ότι σε οξεία βλάβη του ΚΝΣ η χρήση των παραγώγων χολίνης ευνοεί ένα καλύτερο αποτέλεσμα αναφορικά με τη θνησιμότητα αλλά και την τελική αναπηρία (Poole NA et al 2008, Saver JL 2008).
- Προγεστερόνη. Μειώνει το εγκεφαλικό οίδημα, προστατεύει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μειώνει τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Επίσης περιορίζει την κυτταρική απόπτωση (Hu Z. et al 2009, Stein DG et al 2008).
- Ερυθροποιητίνη μακράς διάρκειας. Διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και κινητοποιεί την παραγωγή και διαφοροποίηση των

νευρικών κυττάρων. Επίσης έχει δράση αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη (Siren AL et al 2009).

- Κυκλοσπορίνη. Μειώνοντας την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ελαττώνει τη μιτοχονδριακή βλάβη και την ενδοαξονική μιτοχονδριακή καταστροφή.
- Γλυβουρίδη (γλιβενκλαμίδα). Η δευτερογενής βλάβη πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση των SUR1-regulated NC_{Ca-ATP} διαύλων. Μπλοκάροντας τους με τον ανταγωνιστή τους, τη γλιβενκλαμίδα, ελαττώνεται το οίδημα, η δευτερογενής αιμορραγία, η συστηματική φλεγμονή, η απόπτωση και γενικά η θνησιμότητα (Simard JM et al 2009).

Πρόσφατα στατιστικά δεδομένα από πολεμικές επιχειρήσεις δείχνουν ότι η μηχανική προστασία του σώματος (κράνος, αλεξίσφαιρη θωράκιση), η εισαγωγή της εντατικής θεραπείας, η ενδοκράνιος υπερηχογραφία και η επεμβατική ακτινολογία μείωσαν τη θνητότητα κατόπιν τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης συνεπεία εκρήξεως (λόγος νεκρών προς τραυματίες 1:10) (Ling G et al 2009, Ling GS et al 2008).

Ποσό της ενέργειας από την έκρηξη διαχέεται ως μηχανική, ηλεκτρομαγνητική ή θερμική ενέργεια στον εγκέφαλο απευθείας διαμέσου του κρανίου ή εμμέσως ως κυματοειδής μεταβολή πιέσεως διαμέσου των μεγάλων αγγειακών δομών (Cernak I et al 1999, Charters AC III et al 1976).

Σε μοντέλα ζώων κύματα υψηλής συχνότητας 0,5-1,5 kHz και χαμηλού εύρους δημιουργούν βλάβη στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Χαμηλής συχνότητας κύματα $\leq 0,5$ kHz παραβιάζουν τη συμβολή φαιάς – λευκής ουσίας (Ling G et al 2009). Το αποτέλεσμα είναι εγκεφαλικό οίδημα κυτταρική νέκρωση και απόπτωση, κυτταροσκελετική βλάβη, διάχυτη αξονική βλάβη, νευρονική εκφύλιση.

Στη σοβαρότερη μορφή της, η βλάβη από την έκρηξη μπορεί να οδηγήσει σε υπαραχνοειδή αιμορραγία, κυτταροτοξικό εγκεφαλικό οίδημα ή

σημαντική υπεραϊμία εντός μίας ώρας η οποία αντιμετωπίζεται μόνο με κρανιοτομία αποσυμπίεσης (Bell RS et al 2009).

Από αυτούς που έχουν υποστεί ηπιότερες κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις μετατραυματικές κακώσεις στρες εντοπίζονται σε ένα ποσοστό της τάξης του 10 % (Cernak I et al 1999, Hoge CW et al 2008). Αυτό ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό απωλειών ωρών εργασίας, και γενικότερα κακής κλινικής κατάστασης των ασθενών κατόπιν ΚΕΚ.

Πολλές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη τα τελευταία χρόνια και αφορούν τη μελέτη παραγόντων που δυνητικά θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πορεία ασθενών κατόπιν ΚΕΚ. Αποτυχία αυτών των προσπαθειών αποδίδεται στο γεγονός ότι αδυνατούμε να κατανοήσουμε πλήρως την πορεία της δευτερογενούς βλάβης και τους μηχανισμούς της, ο ετερογενής πληθυσμός μελετών, η πληθώρα κακώσεων, η διαφορετική ηλικιακή αλλά και φυλετική κατανομή, η αδυναμία κατανόησης της φαρμακοκινητικής των προς μελέτη παραγόντων (Margulis S et al 2009).

Με στόχο τη βελτίωση του αποτελέσματος, προτείνεται η συνδυασμένη θεραπεία, η μελέτη βιοχημικών στοιχείων που λειτουργούν ως monitor της κλινικής εικόνας και ως προγνωστικοί παράγοντες του τελικού αποτελέσματος

Σημαντικός παράγων Νοσηρότητας αλλά και Θνητότητας σε ασθενείς με Βαρεία ΚΕΚ είναι και η δημιουργία ετερότοπης οστεοποίησης. Όπως ήδη έχει αναφερθεί 20-40% αυτών που μετατραυματικά νοσηλεύονται σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας είναι η ανάπτυξη ΗΟ.

5. Παθοφυσιολογία ΗΟ

Η ετερότοπη οστεοποίηση πιστεύεται ότι προκύπτει από μη προβλεπόμενη διαφοροποίηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών προδρόμων κυττάρων (mesenchymal stem cells). Εκτός των μεσεγχυματικών πολυδύναμων κυττάρων απαραίτητα θεωρούνται το κατάλληλο οστεοεπαγωγικό περιβάλλον αλλά και ο εκλυτικός παράγων (πχ ΚΕΚ), οποίος θα δώσει το έναυσμα για την έναρξη της οστεοποίησης αλλά και για την

απορύθμιση του ισοζυγίου οστικής παραγωγής – οστικής απορρόφησης (Balboni T et al 2005, Kaplan FS et al 2004). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δημιουργίας HO παραμένει άγνωστος. Τα δεδομένα που έχουμε ως σήμερα είναι:

Από τα πειράματα του Urist και συνεργατών (1965) αναδείχθηκε ο ρόλος της «Απομεταλλωμένης Θεμέλιας Ουσίας» (Demineralized Bone Matrix, DBM) στην επαγωγή της HO. Από το DBM, αναδείχθηκε μία σειρά μακρομορίων με οστεοεπαγωγική ιδιότητα που ονομάστηκαν Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins, BMP). Μέχρι σήμερα τουλάχιστον 40 BMP έχουν ανακαλυφθεί (Dimitriou R et al, 2005). Τα BMP ανήκουν στην οικογένεια TGF- β και εμπλέκονται στην πώρωση των καταγμάτων και στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Επιπλέον τα BMP θεωρούνται ότι κατέχουν ρόλους κλειδιά σε τρεις τουλάχιστον διαδικασίες της οστεοεπαγωγής: Τη χημειοταξία, τη μίτωση και τη διαφοροποίηση (Reddi AH et al 1995).

Σε αρκετές εργασίες έχει δειχθεί ο σημαντικός ρόλος του BMP-4 σε γενετικής αιτιολογίας HO (Shafritz AB et al 1996, Hannallah D et al 2004).

Η συμμετοχή συστηματικών παραγόντων στην επαγωγή ετερότοπης οστεοποίησης πρέπει να θεωρείται δεδομένη από τη στιγμή που ένα γεγονός όπως η ΚΕΚ μπορεί να δημιουργήσει παραγωγή ετερότοπου οστού σε απομακρυσμένες αρθρώσεις. Άλλωστε ασθενείς με ΚΕΚ χαρακτηρίζονται από αυξημένη ταχύτητα καταγματικής πώρωσης (Reddi AH et al 1995).

Πρόδρομα οστεοπαραγωγά κύτταρα τοπικά ή από τη συστηματική κυκλοφορία, θεωρείται ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της οστεοποίησης υπό την επίδραση του επαγωγικού παράγοντα ενώ το τοπικό ή συστηματικό τραύμα πιθανότατα απορυθμίζουν το ισοζύγιο οστικής παραγωγής και αποδόμησης, ίσως υπό τη δράση των φλεγμονωδών μεσολαβητών που έχουν προαναφερθεί (Balboni et al 2005).

6. Κλινική εικόνα ΗΟ

Αρχική εικόνα φλεγμαίνουσας άρθρωσης με ερυθρότητα, αυξημένη θερμοκρασία τοπικά, πόνο επιτευνόμενο στην κίνηση και οίδημα είναι τα χαρακτηριστικά στοιχεία της δημιουργούμενης ΗΟ. Τυπικά αυτά ακολουθούν τις πρώτες εβδομάδες μετά τον εκλυτικό παράγοντα (κάκωση, ΚΕΚ, ΤΗΑ, κλπ).

Εικ. 12. Εικόνα φλεγμαίνουσας άρθρωσης (ΑΡ γόνατο, Βέλος) που παριστά το αρχικό στάδιο δημιουργίας ΗΟ κατόπιν ΚΕΚ.

Ακολουθεί περίοδος ύφεσης των αρχικών συμπτωμάτων με υποχώρηση των σημείων φλεγμονής και εμφάνισης περιχαρακωμένης, ανώδυνης οστικής μάζας σε σημεία όπου υπήρχαν μαλακά μόρια. Εμφανίζονται μόνιμες συγκάμψεις, μείωση του εύρους κίνησης της προσβεβλημένης άρθρωσης αλλά και ενίοτε απόλυτη αγκύλωση αυτής με συνακόλουθη αδυναμία αυτοεξυπηρέτησης.

Επιπλοκές της εμφάνισης ΗΟ πέραν της αγκύλωσης, είναι η αστάθεια ΤΗΑ, ο περιβρογχισμός αγγείων αλλά και περιφερικών νεύρων άκρου. Σε περιπτώσεις Γενετικής Αιτιολογίας Νόσου (FOP), πέρα από τα προαναφερθέντα, ο ασθενής οδηγείται σε περιοριστικού τύπου αναπνευστική

Εικ. 13. Ετερότοπη οστεοποίηση Ποδοκνημικής άρθρωσης σε πολυτραυματία
κατόπιν πολυήμερης νοσηλείας σε ΜΕΘ

Εικ. 14. Ετερότοπη οστεοποίηση ώμου AP (Βέλος) σε ασθενή
κατόπιν ΚΕΚ και πολυήμερης νοσηλείας σε ΜΕΘ

Εικ. 15. ΗΟ έσω διαμερίσματος δε γόνατος σε άρρεν 45 ετών κατόπιν διαβητικού κώματος. Ο συγκεκριμένος ασθενής ανέπτυξε ΗΟ ισχίων και γονάτων άμφω. Αρχείο Ορθοπαιδικής Κλινικής Παν. Πατρών

Εικ. 16. Πολυτραυματίας με ΗΟ γονάτων άμφω κατόπιν ΚΕΚ και πολυήμερης νοσηλείας στη ΜΕΘ. Αρχείο Ορθοπαιδικής κλινικής Παν. Πατρών

Εικ. 17. Ο ασθενής της εικόνας 15
όπως ήταν κλινικά προ
χειρουργείου αφαίρεσης των
ετεροτόπων οστεοποιήσεων.
Παρατηρείται η εκτεταμένη
σύγκαμψη των ισχίων άμφω (περί
τις 70 μοίρες) καθώς και των
γονάτων άμφω. Το ελάχιστο εύρος
κίνησής του ωστόσο του δίνει τη
δυσατότητα να ορθοστατεί και να
βαδίζει με αρκετή δυσκολία

Εικ. 18. CT αγγειογραφία λεκάνης-ισχίων με τρισδιάστατη ανασύσταση,
του ιδίου ασθενούς

ανεπάρκεια που προδιαθέτει σε λοιμώξεις αναπνευστικού και μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο.

Εικ. 19. Εικόνα ΗΟ ΔΕ ισχίου σε ασθενή ηλικίας 23 ετών κατόπιν ΚΕΚ. Παρατηρείται η απόλυτη αγκύλωση της άρθρωσης σε θέση πλήρους απαγωγής του δε κάτω άκρου. Από Αρχείο Ορθοπαιδικής Κλινικής Παν. Πατρών

Εικ. 20. Αγκώνας με ετερότοπη οστεοποίηση άρρενος 27 ετών κατόπιν ΚΕΚ. (βέλος) Από αρχείο Ορθοπ. Κλινικής Παν. Πατρών

7. Διαφορική διάγνωση

Οι νόσοι-καταστάσεις από τις οποίες πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί η ΗΟ είναι:

- Θρομβοφλεβίτιδα
- Κυτταρίτιδα
- Αρθρική σήψη
- Κάταγμα
- Αιμάτωμα
- Πιεστικό έλκος (αρχόμενο)
- Τραύμα
- Οστεομυελίτιδα
- Οστεοσάρκωμα (περιοστικό-παροστικό)

8. Παρακλινικός έλεγχος

Στη φαρέτρα των εργαστηριακών μέσων που έχουμε για τη διάγνωση της ετερότοπης οστεοποίησης πρέπει να αναφέρουμε:

Από πλευράς απεικονιστικού ελέγχου:

- US της προς διερεύνηση περιοχής
- Απλή ακτινογραφία
- CT έλεγχος με ή χωρίς αγγειογραφία (εικ.18)
- Σπινθηρογράφημα οστών 3 φάσεων

Από τις ανωτέρω εξετάσεις, η σημαντικότερη προκειμένου να εξασφαλίσουμε την πιο πρώιμη διάγνωση της ΗΟ είναι το Σπινθηρογράφημα Οστών 3 φάσεων, με το οποίο μπορούμε να διαγνώσουμε τη νόσο ήδη από τη δεύτερη εβδομάδα εμφάνισής της και πολύ προτού υπάρξει επιμεταλλωμένο οστό, το οποίο θα είναι εμφανές τόσο στην απλή ακτινογραφία όσο και στην υπολογιστική τομογραφία.

Στη σειρά των απεικονίσεων που ακολουθεί (Εικ. 21) έχουμε ένα σπινθηρογράφημα 3 φάσεων (Α, Β, C). Όπως φαίνεται από τις εικόνες Β, C,

υπάρχει οστική παθολογία που εντοπίζεται στον αυχένα και στην εγγύς υποτροχαντήρια περιοχή. Τα ευρήματα επιβεβαιώνονται με τη διενέργεια απλών ακτινογραφιών (D, E). Ωστόσο η έκτοπη της περιοχής του τροχαντήρα, η οποία είναι νεοσχηματιζόμενη, φαίνεται μονάχα στην profile ακτινογραφία του ισχίου (E) γιατί διαφορετικά καλύπτεται από το μηραίο.

Εικόνα 21. Πρώτη φάση σπινθηρογραφικής μελέτης οστών

Εικ. 21. Φάση αιματικής δεξαμενής. Δύο βλάβες ορατές

Εικόνα 21. C. Τρίτη φάση σπινθηρογράφηματος, D. Α/Α ισχίου

Εικόνα 21 Ε. Πλαγία Α/Α ισχίου (2 βλάβες ορατές)

Πέρα από τον απεικονιστικό έλεγχο, εργαστηριακά η δημιουργία ΗΟ, (κλινική φάση φλεγμαίνουσας άρθρωσης), χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αυξημένης Αλκαλικής Φωσφατάσης καθώς επίσης και αυξημένων δεικτών φλεγμονής. Σε περιπτώσεις μετεγχειρητικής επαγωγής ΗΟ, οι Kjaersgaard-Andersen και συνεργάτες το 1989, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι $ΤΚΕ \geq 35$, 12 εβδομάδες μετά την επέμβαση ισοδυναμεί με ανάπτυξη ΗΟ υπό την προϋπόθεση ότι δεν συνυπάρχει ενεργός φλεγμονή (προγνωστική αξία=1,00). Επίσης αυξημένη αλκαλική φωσφατάση ≥ 250 IU/ml, 12 εβδομάδες μετά την επέμβαση ισοδυναμεί με ισχυρή πιθανότητα ανάπτυξης εκτεταμένης ΗΟ (προγνωστική αξία=0,76) (Kjaersgaard-Andersen et al, 1989).

9. Στοιχεία Μοριακής Δομής και Φυσιολογίας του Οστού

Το εξωκυττάριο δίκτυο (**Extra-Cellular Matrix, ECM**) αποτελεί ένα ετερογενές μίγμα πρωτεϊνών, υδατανθράκων, και μικρών μορίων που περιστοιχίζουν τα κύτταρα, παρέχοντας φυσική υποστήριξη για τη

μακρομοριακή οργάνωση των ιστών και των οργάνων ενώ παράλληλα έχει αποδειχτεί ότι παίζει ενεργό ρόλο στην ενορχήστρωση των κυτταρικών αποκρίσεων σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις. Το ECM συμμετέχει και ρυθμίζει την ανάπτυξη και λειτουργία σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων αφού τα κύτταρα είναι συνδεδεμένα με άλλα κύτταρα, καθώς και με μόρια της εξωκυττάριας ύλης.

Η εικόνα που προκύπτει είναι μια ενεργή αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας δικτύου, όπου τα κύτταρα συνθέτουν τα εξωκυττάρια συστατικά, που στη συνέχεια ρυθμίζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εξωκυττάρια περιβάλλοντος, το οποίο είναι κρίσιμο για την κυτταρική λειτουργία.

Η ανάπτυξη και η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις τους με μόρια του μικροπεριβάλλοντός τους. Οι κύριοι τύποι μορίων που συμμετέχουν και ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία περιλαμβάνουν τους αυξητικούς παράγοντες, τους παράγοντες διαφοροποίησης, τα κυτταρικά μόρια προσκόλλησης και τα μόρια της εξωκυττάριας ύλης. Το ECM λειτουργεί έτσι ώστε να εξασφαλίζει ένα καλό οργανωμένο εξωκυττάρια δίκτυο, το οποίο είναι πολυλειτουργικό για την εγκαθίδρυση, το διαχωρισμό και τη διατήρηση νέων διαφοροποιημένων ιστών και οργάνων. Επιπρόσθετα, τα μόριά του είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων. *Ανάμεσα στα σύγχρονα ερευνητικά αντικείμενα συγκαταλέγεται η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την εξωκυττάρια ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας δημιουργώντας νέες φαρμακευτικές προσεγγίσεις που προσαρμόζονται στην κυτταρική λειτουργία για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Karamanos N et al, 1999).*

9.1 Σύσταση ECM του οστού

Από όλα τα είδη εξωκυττάριας δικτύου συνδετικού ιστού, το λιγότερο γνωστό και ελάχιστα κατανοητό είναι αυτό του οστού των θηλαστικών. Οι

περισσότερες μελέτες πάνω στο οργανικό μέρος του ECM του οστού έχουν επικεντρωθεί στα κολλαγονούχα συστατικά του, τα οποία κατέχουν περίπου το 90% της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης της οργανικής εξωκυττάριας ύλης του ασβεστοποιημένου οστού. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το ποσοστό αυτό καταλαμβάνει το κολλαγόνο τύπου I (Termine J *et al.*, 1981). Στο εξωκυττάριο δίκτυο του οστού αποτίθενται κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη. Ο προσανατολισμός και η απόθεση σε αυτό το περιβάλλον των κρυστάλλων εξαρτάται από το κολλαγόνο τύπου I, του οποίου οι ίνες είναι πολύ διαλυτές, εξαιτίας των ενδο- και δια-μοριακών διαστραυρώσεων (Wendel M *et al.*, 1998).

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών ένας αριθμός μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από οστική ιστό. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η οστεοκαλσίνη, η GLA πρωτεΐνη, η οστεονεκτίνη, η οστεοποντίνη, η σιαλοπρωτεΐνες του οστού (BSP) και οι μικρές πρωτεογλυκάνες του οστού διακοσμητίνη και διγλυκάνη. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις πολύ λίγα είναι γνωστά για τη λειτουργία αυτών των μορίων στον ιστό αυτού του είδους, μολονότι, όπως φαίνεται ύστερα από πειραματικές μελέτες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη μεταλλοαπόθεση του οστού και συντελούν στην οστική ανάπτυξη (Wendel M *et al.*, 1998).

9.2.1 Γλυκοζαμινογλυκάνες

Οι **γλυκοζαμινογλυκάνες** [glycosaminoglycans, **(GAGs)**] είναι οι ετεροπολυσακχαρίτες, που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο σώμα. Έχουν εντελώς διαφορετικές δομές από εκείνες των *N*- και *O*-γλυκοζιτικά συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών που εντοπίζονται στις περισσότερες μεμβρανικές, αλλά και εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι υψηλά αρνητικά φορτισμένα μόρια, με εκτεταμένη διαμόρφωση, που είναι υπεύθυνη για την υψηλή τιμή ιξώδους στα διαλύματα, που τις περιέχουν. Οι

GAGs εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων ή στο εξωκυττάριο δίκτυο [extracellular matrix (ECM)]. Παράλληλα με το υψηλό ιξώδες, χαρακτηριστική είναι και η χαμηλή συμπιεστότητα, η οποία κάνει αυτά τα μόρια ιδανικά για υγρό λίπανσης στην περιοχή των αρθρώσεων. Την ίδια στιγμή, η ακαμψία αυτών των μορίων εξασφαλίζει τη δομική ακεραιότητα στα κύτταρα και τις διόδους επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, επιτρέποντας την κυτταρική μετανάστευση. Τέλος, οι GAGs επηρεάζουν ισχυρά τόσο τη δομή όσο και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών πάνω στις οποίες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες (Mania V. et al, 2007).

9.2.1.1 Δομή γλυκοζαμινογλυκανών

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι μόρια ετεροπολυσακχαριτών με επιμήκεις και μη διακλαδισμένες αλυσίδες, αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενες δισακχαρικές μονάδες. Δηλαδή, κάθε GAG συντίθεται μόνο από δύο μονοσακχαρίτες οι οποίοι μένουν συνδεδεμένοι μαζί και εναλλάσσονται στην αλυσίδα της γλυκο-ζαμινογλυκάνης. Οι δισακχαρικές αυτές μονάδες περιλαμβάνουν έναν από τους δύο τροποποιημένους μονοσακχαρίτες **N-ακετυλογαλακτοζαμίνη (GalNAc)** ή **N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc)** και ένα ουρονικό οξύ, όπως το **D-γλυκουρονικό** ή το **L-ιδουρονικό**. Οι δισακχαρικές μονάδες των GAGs δίνονται στο σχήμα 2

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες με βιολογική σπουδαιότητα είναι το **υαλουρονικό οξύ** (hyaluronic acid, **HA**), η **θειική δερματάνη** (dermatan sulfate, **DS**), η **θειική χονδροϊτίνη** (chondroitin sulfate, **CS**), η **ηπαρίνη** (heparin, **Hep**), η **θειική ηπαράνη** (heparan sulfate, **HS**) και η **θειική κερατάνη** (keratan sulphate, **KS**). Παρόλο που καθεμία από αυτές τις GAGs περιέχει ένα κυρίαρχο δισακχαρικό συστατικό, εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τα σάκχαρα που περιέχει η κάθε κατηγορία.

HA

Hyaluronic acid
(D-glucuronate + GlcNAc)

CS

Chondroitin sulfate
(D-glucuronate + GalNAc sulfate)

DS

Dermatan sulfate
(D-glucuronate/ L-iduronate + GalNAc sulfate)

KS

Keratan sulfate
(Gal + GlcNAc sulfate)

Hep

HS

Heparin and heparan sulfate
(D-glucuronate/ L-iduronate + GlcNAc sulfate)

Σχήμα 2. Δομές δισακχαριτικών μονάδων των GAGs: υαλουρονικό οξύ (HA),θειική δερματάνη (DS), θειική χονδροϊτίνη (CS), θειική κερατάνη, ηπαρίνη (Hep) και θειική ηπαράνη (HS) (Μανιά Β. 2006 MS)

9.2.2. Πρωτεογλυκάνες

Οι **πρωτεογλυκάνες** [proteoglycans (**PGs**)] είναι μια κατηγορία μεγαλομοριακών πρωτεϊνικών συμπλοκών που εντοπίζονται στις κυτταρικές επιφάνειες, εντός των ενδοκυττάρων οργανιδίων, καθώς και στον εξωκυττάριο χώρο όπου και κυριαρχούν. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια οικογένεια γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται ομοιοπολικά με σουλφονυλιωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (π.χ. θειική χονδροϊτίνη, θειική δερματάνη, θειική ηπαράνη, ηπαρίνη, θειική κερατάνη). Δηλαδή, τα μακρομόρια αυτά καθορίζονται από έναν κοινό τύπο μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της πρωτεΐνης τους, την παρουσία γλυκοζαμινογλυκανικής αλυσίδας. Η πρωτεΐνη αποτελεί τον κορμό της πρωτεογλυκάνης, ο οποίος κατευθύνει τη βιοσύνθεση των PGs προς το σχηματισμό διαφορετικών τύπων με διαφορετικές λειτουργίες. Μέχρι στιγμής, περισσότερα από 20 γενετικώς διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών κορμών έχουν ταυτοποιηθεί. Εκτός από τις γλυκοζαμινογλυκάνες, οι πρωτεογλυκάνες φυσιολογικά περιέχουν άλλες υδρογονανθρακικές μονάδες συμπεριλαμβανομένων των ολιγοσακχαριτών που συνδέονται στον πρωτεϊνικό κορμό με *O*- και *N*- γλυκοζιτικό δεσμό, όπως συμβαίνει και σε άλλες γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες (Yanagishita M *et al.*, 1997; Karamanos NK., 1999).

Σχήμα 3. Τυπική απεικόνιση PG (Με άσπρο οι GAGs)

Ο πρωτεϊνικός κορμός των PGs μπορεί να είναι μια μικρή πολυπεπτιδική αλυσίδα 10 kDa ή μια μεγάλη μεγέθους πρωτεΐνη (μέχρι και 400000 kDa), μπορεί να είναι υδατοδιαλυτός ή μη-υδατοδιαλυτός, μπορεί να εκτείνεται από την κυτταρική μεμβράνη, να είναι ενωμένος με λιπίδια ή και πλήρως εκκρινόμενος από το κύτταρο. Μπορεί να φέρει μόνο μια αλυσίδα GAG ή επίσης και πάνω από μια εκατοντάδα. Οι λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνικών κορμών των PGs περιλαμβάνουν περιοχές δέσμευσης του υαλουρονικού οξέος, Ca^{2+} -εξαρτώμενες λεκτίνες (δέσμευση σακχάρων), περιοχές πλούσιες σε Leu, αλληλουχίες αμινοξέων που προσομοιάζουν με αυτές του EGF και περιοχές που προσομοιάζουν με IgG. Συχνά αρκετές από τις περιοχές αυτές εμφανίζονται εντός του ίδιου πρωτεϊνικού κορμού.

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη των PGs γνωρίζει όλο και μεγαλύτερη άνθηση γιατί έχει γίνει πλέον εμφανές ότι συγκεκριμένες PGs έχουν υψηλής σημαντικότητας βιολογικές λειτουργίες. Ορισμένες PGs έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν και να τροποποιούν τη δραστηριότητα των αυξητικών παραγόντων και των παραγόντων διαφοροποίησης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαμεσολαβούνται και από τις αλυσίδες GAGs και από τους πρωτεϊνικούς κορμούς των PGs. Επίσης παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην οργάνωση της δομής των ιστών, επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων και την ωρίμανση των ιστών, δρουν ως βιολογικά φίλτρα, ελέγχουν το σχηματισμό των ινών του κολλαγόνου και ρυθμίζουν τα ιξωδοελαστικά χαρακτηριστικά των ιστών (Kjellen L. *et al.*, 1991; Iozzo RV. *et al.*, 1998; Karamanos NK. *et al.*, 1999).

Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της δομής ενός πρωτεογλυκανικού μορίου

(α) Δομές των επαναλαμβανόμενων δισακχαριτικών μονάδων τριών τύπων GAGs που βρίσκονται στον ECM των ζωικών κυττάρων. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα της θειικής χονδροϊτίνης (πάνω) αποτελείται από την ιοντισμένη μορφή του γλυκουρονικού οξέος και την GalNAc. Η θειική κερατάνη (μέση) έχει ως επαναλαμβανόμενη μονάδα γαλακτόζη (Gal) και GlcNAc. Το υαλουρονικό (κάτω) έχει μια επαναλαμβανόμενη μονάδα από GlcA και GalNAc. Οι θειικές ομάδες μπορεί να εστεροποιηθούν με τις υδροξυλομάδες των δισακχαριτικών μονάδων προσδίδοντας ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών θειωμένων μονάδων που στην περίπτωση της CS/DS ανέρχεται στις 23 μονάδες και στην Her/HS στις 12 μονάδες.

(β) Ένα μόριο πρωτεογλυκάνης αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό κορμό με πολυάριθμες μικρές αλυσίδες GAGs προσδεδωμένες κατά μήκος και διατεταγμένες προς τα έξω. Οι γκριζοί κύκλοι αναπαριστούν τα αμινοξέα του πρωτεϊνικού κορμού και τα χρωματισμένα εξάγωνα αναπαριστούν τα σάκχαρα των αλυσίδων GAG (Μανιά Β, MSc 2006).

9.2.2.1. Δομή πρωτεογλυκανών

Η πλειοψηφία των GAGs είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με έναν πολυπεπτιδικό σκελετό, τον πρωτεϊνικό κορμό, σχηματίζοντας έτσι τις πρωτεογλυκάνες. Οι GAGs απλώνονται ακτινικά σε σχέση με τον πρωτεϊνικό κορμό (brush-like structure). Μοιάζουν με δέντρα, όπου οι GAGs είναι τα κλαδιά και ο κορμός είναι η πρωτεΐνη. Στη σύνδεση των GAGs με τον πρωτεϊνικό κορμό εμπλέκεται ένας ειδικός τετρασακχαρίτης που αποτελείται από ένα κατάλοιπο γλυκουρονικού οξέος, δύο γαλακτόζης και μία ξυλόζη (GAG-GlcA-Gal-Gal-Xyl-O-CH₂-πρωτεΐνη). Αυτός ο τετρασακχαρίτης ενώνεται με τον πρωτεϊνικό κορμό μέσω *O*-γλυκοζιτικού δεσμού σε κατάλοιπα Ser της πρωτεΐνης. Μερικές μορφές θειικής κερατάνης συνδέονται στον πρωτεϊνικό κορμό μέσω *N*-γλυκοζιτικού δεσμού με κατάλοιπο ασπαραγίνης. Ο πρωτεϊνικός κορμός των πρωτεογλυκανών είναι συνήθως πλούσιος σε Ser/Thr γεγονός που επιτρέπει τη δημιουργία πολλαπλών συνδέσεων GAGs σε αυτόν (Μανιά Β. 2006 MSc ; Karamanos N.K., 1999).

Σχήμα 5. Απεικόνιση της ομοιοπολικής πρόσδεσης γλυκοζαμινογλυκάνης στον πρωτεϊνικό κορμό πρωτεογλυκάνης μέσω του καταλοίπου σερίνης

9.2.2.2. Πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριου δικτύου της περιοχής της επίφυσης του οστού

Η αγγρικάνη είναι η μεγαλύτερη πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης (CS-PG) σε μέγεθος και η πιο άφθονη. Πρόκειται για ένα εξωκυττάριο δομικό

μακρομόριο που εντοπίζεται στο χόνδρο ως ένα σταθερό τριμερές σύμπλοκο με το υαλουρονικό οξύ και τη συνδετική πρωτεΐνη, το οποίο αποτελείται από περίπου 85% CS, 6% KS και 7% πρωτεΐνη και εκτιμάται ότι καταλαμβάνει το 10% του ξηρού βάρους του ιστού, εξασφαλίζοντάς του έτσι την ανθεκτικότητα σε δυνάμεις συμπίεσης.

Επιπλέον, λόγω του μεγάλου αριθμού των πολυανιοντικών γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με τον πρωτεϊνικό κορμό της, η αγγρική παρέχει ένα ισχυρά ένυδρο και χωροπληρωτικό πήκτωμα, που μπορεί να παραμορφώνεται αντιστρεπτά, ώστε να επιδέχεται επιβαρυντική συμπεριφορά (Yanagishita M *et al.*, 1997 ; Francisco Forriol *et al.*, 2005).

Σχήμα 6. Απεικόνιση της δομής της αγγρικής (Yanagishita M *et al.*, 1997).

Οι πρωτεογλυκάνες, οι οποίες δεν σχηματίζουν σύμπλοκα ειδικά με το υαλουρονικό οξύ, αλλά αλληλεπιδρούν με μόρια κολλαγόνου περιλαμβάνουν τη διγλυκάνη, τη διακοσμητίνη και την ινομοντουλίνη (Forriol F *et al.*, 2005). Η διγλυκάνη ανήκει στην οικογένεια των μικρών πρωτεογλυκανών πλούσιες σε λευκίνη (SLRPs). Πρόκειται για μια μικρή μεγέθους PG που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο ή και την κυτταρική επιφάνεια σε ελάχιστες περιπτώσεις. Όπως υποδεικνύεται από το όνομά της φέρει δύο γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες CS (οστά) ή DS (πιο μαλακοί ιστοί) ή μίγμα αυτών στο N-τελικό άκρο. Ενώ οι λειτουργίες της διγλυκάνης δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί, πολλές δημοσιευμένες μελέτες προτείνουν διάφορες πιθανές λειτουργίες, αλλά η πιο ξεκάθαρη αναφέρεται στην ικανότητα της PG να προσδένει μέλη της υπερικογένειας του TGF-β. Η διγλυκάνη έχει δείχθει ότι προσδένεται σε

κολλαγόνο τύπου I και V, στον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού TGF-β και το συστατικό C1q του συμπληρώματος.

Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση του μορίου της διγλυκάνης. Με κόκκινο οι δύο αλυσίδες CS /DS.

Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι η διγλυκάνη επιταχύνει αποτελεσματικά και συμμετέχει στην οργάνωση του κολλαγόνου τύπου VI σε δομημένα δίκτυα (Wiberg C *et al.* 2003 and 2002; N. Καραμάνος, 2005).

Η διακοσμητίνη είναι ένα μέλος της οικογένειας των μικρών πρωτεογλυκανών θειικής χονδροϊτίνης και θειικής δερματάνης, επίσης ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών πλούσιες σε επαναλήψεις λευκίνης [leucine-rich repeat (LRR)]. Η πρωτεογλυκάνη αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους τύπους συνδετικού ιστού, δεσμευμένη ή «διακοσμώντας» τα ινίδια κολλαγόνου τύπου I, καθορίζοντας έτσι τις ιδιότητες των ολοκληρωμένων ινών και κυρίως ρυθμίζοντας την ινοδογένεση του κολλαγόνου. Πιο πρόσφατα η διακοσμητίνη βρέθηκε να δεσμεύει αυξητικούς παράγοντες, να ρυθμίζει τη δραστηριότητά τους και να συντονίζει τις κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πρωτεογλυκάνη αυτή αλληλεπιδρά και με τα κολλαγόνα τύπου VI, XII και XIV, όπως και με την ινονεκτίνη, τη θρομβοσπονδίνη, το συστατικό του συμπληρώματος C1q και τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Τέλος, δεσμεύει τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού TGF-β και πιθανόν να συντελεί στην απομόνωση αυτού του παράγοντα στο εξωκυττάριο δίκτυο του οστού

και την περαιτέρω ελευθέρωσή του κατά την οστική ανάπλαση (Huttenlocher A *et al.*, 1996; N. Καραμάνος, 2005; Wendel M *et al.*, 1998).

Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση του μορίου της διακοσμητίνης. Με κόκκινο η αλυσίδα CS /DS (Μανιά Β. 2006 MSc)

Η ινομοντουλίνη είναι μια πρωτεογλυκάνη θειικής κερατάνης (KSPG) παρούσα σε πολλούς τύπους συνδετικού ιστού, όπως οστά, χόνδρος, τένοντας και δέρμα. Η ινομοντουλίνη ανήκει στην οικογένεια των δομικά συγγενών PGs και γλυκοπρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου που είναι πλούσιες σε λευκίνη, όπως και οι δύο προηγούμενες. Η ινομοντουλίνη είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο τύπου I και II και επηρεάζει την ινοδογένεση *in vitro*, καθυστερώντας τη σύνθεση των ινών κολλαγόνου και οδηγώντας στο σχηματισμό λεπτότερων ινών. Οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεογλυκάνης αυτής με τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β είναι επίσης γνωστές. Μια ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση πιθανώς σχετική για φλεγμονώδη αντίδραση σε ασθένειες, που επηρεάζει πολλούς συνδετικούς ιστούς είναι αυτής της ινομοντουλίνης με το συστατικό του συμπληρώματος C1q (N. Καραμάνος, 2005).

Σχήμα 9 Σχηματική απεικόνιση του μορίου της ινομοντουλίνης Με κόκκινο η αλυσίδα KS, κοντά στο N-τελικό άκρο τα σουλφονυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης (Heathfield T *et al.* 2004).

Τέλος, το κολλαγόνο τύπου IX υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές ότι ανήκει σε αυτήν την οικογένεια μακρομορίων του ECM, εξαιτίας της ιδιότητάς του να δεσμεύει μέσω της α2(IX) αλυσίδας του, αλυσίδες CS/DS (Forriol F *et al.*, 2005). Πρόκειται για ένα ετεροτριμερές μόριο, που αποτελείται από τρεις γενετικά διαφορετικές αλυσίδες α1, α2 και α3. Η κάθε αλυσίδα αποτελείται από τέσσερις μη κολλαγονούχες [non-collagenous (NC)] και τρεις κολλαγονούχες [collagenous (COL)] περιοχές, που ονομάζονται NC1-NC4 και COL1-COL3 αντίστοιχα. Ο ρόλος του κολλαγόνου τύπου IX στο εξωκυττάριο δίκτυο προφανώς απαιτεί τα μόρια να είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά στην επιφάνεια των ινών κολλαγόνου τύπου IX, γεγονός που υποδηλώνει κατά κάποιο τρόπο, μηχανικό περιορισμό. Είναι δελεαστικό να υποθέσουμε από τις βιοχημικές αποδείξεις ότι το κολλαγόνο αυτού του τύπου διαμορφώνει επίσης μια ομοιοπολική γέφυρα μεταξύ των ινών, αυξάνοντας τη μηχανική ακεραιότητα του δικτύου σε περίπτωση που υπάρχει περιορισμός λόγω της ωσμωτικής πίεσης που οφείλεται σε 'παγιδευμένες' πρωτεογλυκάνες (Eyre D, 2002).

Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση των τριών αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IX. Οι NC και COL περιοχές είναι σημειωμένες, καθώς και η θέση πρόσδεσης της GAG αλυσίδας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. Σκοπός της μελέτης

Η μελέτη μας επικεντρώθηκε σε τρεις άξονες:

- A. Ο πρώτος αφορούσε τη βιοχημική μελέτη και την ανεύρεση ποιοτικών αλλά και ποσοτικών διαφορών στη σύσταση του φυσιολογικού και του έκτοπου οστού.
- B. Ο δεύτερος αφορούσε τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών σε περιφερικό αίμα ασθενών οι οποίοι νοσηλεύονταν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας κατόπιν τραυματικής κρανιοεγκεφαλικής βλάβης.
- C. Ο τρίτος άξονας αφορούσε τη μελέτη της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης σε πειραματικό, πλήρως ελεγχόμενο, μοντέλο κουνελιών.

Σκοπός μας ήταν η έναρξη μίας προοπτικής έρευνας για την παθοφυσιολογική μελέτη του φαινομένου της ετερότοπης οστεοποίησης. Με δεδομένο ότι το Τραύμα (ΚΕΚ και κακώσεις Νωτιαίου μυελού) ακολουθεί αύξουσα πορεία λόγω της αυξανόμενης τάσης των τροχαίων ατυχημάτων και με δεδομένη τη μεγάλη επίπτωση στους νέους ηλικιακά ανθρώπους, έχει τεράστια σημασία η μελέτη του φαινομένου της έκτοπης οστεοποίησης, διότι οι επιπτώσεις της σε ατομικό επίπεδο με τις αναπηρίες που προκαλεί, όσο και σε κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο είναι αυταπόδεικτες.

Η προοπτική μας έρευνα είχε ως στόχο την ανεύρεση ειδοποιών διαφορών στη δομή του ετερότοπου οστού σε αντιδιαστολή με το φυσιολογικό αλλά και την ανεύρεση διαφοροποιήσεων στο περιφερικό αίμα ασθενών κατόπιν τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης τόσο σε κυτταρικούς πληθυσμούς όσο και αναφορικά με διαλυτούς παράγοντες. Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν ενδεχομένως να θέσουν τα θεμέλια για τη μελλοντική διαλεύκανση του μηχανισμού επαγωγής και δημιουργίας της Ετερότοπης Οστεοποίησης.

A. Συγκριτική Βιοχημική Ανάλυση Γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών σε Ανθρώπινο φυσιολογικό και ετερότοπο οστό

Κατά τη διάρκεια του οστικού σχηματισμού, οι ώριμοι οστεοβλάστες παράγουν και εκκρίνουν Πρωτεογλυκάνες (PG). Τα μόρια αυτά, σε συνδυασμό με τα μόρια κολλαγόνου και μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, αποτελούν τις τρεις κύριες μακρομοριακές ομάδες της θεμέλιας ουσίας.

Η θειική χονδροϊτίνη, θειωμένη στη θέση 4' της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, συνιστά το 90% του συνόλου των GAG στο ανθρώπινο σπογγώδες οστό (Waddington RJ et al, 1989). Εκτός από την 4' θειωμένη θειική χονδροϊτίνη, μικρά ποσά υαλουρονικού οξέως (HA), έχουν ανιχνευθεί στο ανθρώπινο οστό σε διάφορα στάδια επιμετάλλωσης. Το οστό όπως προαναφέρθηκε περιέχει τρία τουλάχιστον διακριτά είδη πρωτεογλυκανών: Ντεκορίνη, Διγλυκάνη και Αγγρικάνη (Smith AJ et al 1997). Οι δύο πρώτες συμμετέχουν στη δομική οργάνωση της θεμέλιας ουσίας, και δεσμεύονται στο κολλαγόνο τύπου 1. Έχουν κολλαγονοεπαγωγικές ιδιότητες και αλληλεπιδρούν με κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως TGF-β, BMP-2, BMP-4. Η αγγρικάνη συμμετέχει κυρίως στο εμβρυικό οστό (Lamoureaux F et al 2007).

A1. Ασθενείς και Πειραματικές μέθοδοι

Συνολικά εξετάστηκαν 4 δείγματα από οστά. Δύο εξ αυτών ήταν ετερότοπης προέλευσης και δύο ανήκαν σε ασθενείς control. Μία ετερότοπη οστεοποίηση ανήκε σε ασθενή με ΗΟ στην περιοχή του ισχίου. Ο ασθενής αυτός είχε υποστεί ΚΕΚ και οπίσθιο εξάρθρημα του ισχίου κατόπιν τραυματισμού. Το δεύτερο δείγμα ελήφθη από την περιοχή του ισχίου σε άτομο 21 ετών, άρρεν, κατόπιν πολυτραυματισμού σε τροχαίο ατύχημα. Ο ασθενής αυτός ήταν παραπληγικός από το επίπεδο Α5. Ο ασθενής αυτός ανέπτυξε ετερότοπη οστεοποίηση στα ισχία, στα γόνατα, στον αριστερό ώμο και αγκώνα. Το πρώτο δείγμα από τα controls ελήφθη από την περιοχή της κεφαλής του ισχίου αφού αφαιρέθηκε κάθε ίχνος χόνδρινης επικάλυψης. Το

δεύτερο δείγμα από τα controls ήταν ένα οστεοαρθρικό κομμάτι οστού από την περιοχή του γόνατος, ασθενούς ηλικίας 70 ετών.

Για την ενζυμική κατεργασία του ιστού χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο παπαΐνη δις-ανακρυσταλλωμένη από paraya latex, 14 units/ mg στερεής πρωτεΐνης της εταιρείας Sigma Chemical Co (St. Luis MO USA). Οι μεμβράνες οξικής κυτταρίνης Sepharose® III, διαστάσεων 5.7 cm x 12.7 cm, που χρησιμοποιήθηκαν για τα αντίστοιχα πειράματα ηλεκτροφόρησης προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Gelman Sciences, Inc. (Michigan).

Η ιοντοανταλλακτική πηκτή χρωματογραφίας DEAE-Sephacel προμηθεύτηκε από τη Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Για την εκχύλιση των πρωτεογλυκανών από τα οστά χρησιμοποιήθηκαν υδροχλωρική γουανιδίνη (GdnHCl) για το διάλυμα εκχύλισης και υδροχλωρική βενζαμιδίνη, φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF) και N-αιθυλο-μλεϊνιμίδιο (NEM) για το διάλυμα αναστολέων πρωτεασών, τα οποία προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Chemical Co (St. Luis MO USA).

Τα ένζυμα χονδροϊτινάση ABC (*Proteus vulgaris*) και χονδροϊτινάση AC II (*A. aurescens*), που προστέθηκαν κατά την επεξεργασία των δειγμάτων για την ανάλυση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και κατά τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ήταν της εταιρείας Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan).

Τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγιναν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Immobilon-P. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το πολυκλωνικό A₁D₁ (anti-Aggregan) ύστερα από ανοσοποίηση σε άσπρο κουνέλι και το μονοκλωνικό anti-Human Dermatan Sulfate PG, (Mouse IgG1), clone 6-B-6 της εταιρείας Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan). Επίσης, τα δεύτερα αντισώματα, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το AP132P [Goat anti-rabbit IgG (H&L)-HRP] και το AP124P [Goat anti-mouse IgG (H&L)-HRP] της εταιρείας Chemicon International. Η αντίδραση ενισχυόμενης χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια ECL West Pico της εταιρείας Pierce (Rockford, IL) και η εμφάνιση έγινε σε

φωτογραφικό φιλμ Biomax Light Film της KODAC που προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma Chemical Co (St. Luis MO USA).

A1.1. Επεξεργασία οστικών δειγμάτων και δομικός χαρακτηρισμός γλυκοζαμινογλυκανών

Το οστικό υλικό ελεύθερο από προσμείξεις μαλακών μορίων, κόπηκε σε μικρά τεμάχια και αυτά με τη σειρά τους υποβλήθηκαν σε λειοτρίβηση με προσθήκη υγρού αζώτου μέχρι ο ιστός να γίνει σκόνη σε γουδί από πορσελάνη. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση προς απομάκρυνση της υγρασίας και το τελικό ξηρό προϊόν, αφού πρώτα ζυγίστηκε, φυλάχθηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Το θρυμματισμένο οστό υπεβλήθη σε ενζυμική κατεργασία με παπαΐνη τρεις φορές, ακολούθησε φυγοκέντρηση, διαχωρισμός υπερκείμενου-ιζήματος και διαλυτοποίηση του τελευταίου στο μικρότερο δυνατό όγκο ddH₂O. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση DEAE-Sephacel (ιοντοανταλλακτική ρητίνη) των υπάρχουσών γλυκοζαμινογλυκανών, απελευθέρωση αυτών, κατόπιν έκλουσης της ρητίνης με χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης διαλυμάτων NaCl. Σε κάθε έκλουμα, κατεργασία με 4 όγκους αιθανόλης οδήγησε σε καθίζηση των απελευθερωμένων οστικών γλυκοζαμινογλυκανών. Υπολογίστηκε το ουρονικό οξύ.

Η ταυτοποίηση των Γλυκοζαμινογλυκανών έγινε κατόπιν ηλεκτροφόρησης οξικής κυτταρίνης και High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE)

Χαρακτηρισμός GAGs

Διάγραμμα ροής πειραμάτων για το
χαρακτηρισμό των GAGs στα δείγματα
οστών

A.1.2. Χαρακτηρισμός πρωτεογλυκανών

A.1.2.1. Εκχύλιση PGs από οστά

Τα πιο αποτελεσματικά διαλύματα για την εκχύλιση των PGs είναι εκείνα που περιέχουν χαστροπικά αντιδραστήρια (για αποσύζευξη των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και αποδιάταξη των πρωτεϊνών), απορρυπαντικά (για αποσύζευξη υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων) και τέλος αναστολείς για την απενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Για την απενεργοποίηση των ενζύμων, όλες οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C). Συγκεκριμένα οι PGs εκχυλίσθηκαν από τα οστά με ρυθμιστικό διάλυμα 4M GdnHCl, 50 mM CH₃COONa και 10 mM Na₂EDTA, pH 6.0, που περιείχε αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων (1 mM PMSF, 10 mM NEM, 5mM Benzamidine HCl).

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε 5g ξηρού ιστού από το κάθε δείγμα οστού στα οποία προστέθηκαν 5 όγκοι εκχυλιστικού μέσου (buffer εκχύλισης που περιείχε διάλυμα αναστολέων πρωτεασών) αρχικά για ~72 h στους 4°C με ήπια και σταθερή ανάδευση. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ακολούθησε φυγοκέντρηση, διαχωρισμός υπερκείμενου από ίζημα και προσθήκη στο εναπομείναν στερεό άλλα 25 mL εκχυλιστικού μέσου, το οποίο περιείχε ό,τι και το εκχυλιστικό μέσο του πρώτου σταδίου και επιπλέον 0.5 M Na₂EDTA. Έτσι, η εκχύλιση συνεχίστηκε για ~72 h ακόμη υπό τις ίδιες συνθήκες και όταν ολοκληρώθηκε τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα. Τόσο τα υπερκείμενα του 1^{ου} σταδίου εκχύλισης (1^α εκχυλίσματα), όσο και αυτά του 2^{ου} (2^α εκχυλίσματα) αποθηκεύονται στους - 20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν, περαιτέρω.

Η εκχύλιση των πρωτεογλυκανών από οστό πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, έτσι ώστε οι PGs των περιοχών του μη ασβεστοποιημένου ιστού να απομονωθούν και να παραληφθούν κατά το πρώτο μέρος της εκχύλισης και τα πρωτεογλυκανικά μόρια του εξωκυττάριου δικτύου του οστού, τα οποία έχουν

υποστεί μεταλλοαπόθεση να διαλυθούν και να απομακρυνθούν κατά το δεύτερο μέρος αυτής της διαδικασίας απομόνωσης (Fisher LW et al., 1982).

A.1.2.2. Ανάλυση ουρονικού οξέος

Προκειμένου να γίνει μέτρηση της περιεκτικότητας των οστών, ύστερα από την εκχύλιση των πρωτεογλυκανών, σε ουρονικό οξύ (UA) εφαρμόστηκε η μέθοδος των Bitter και Muit, κατά την οποία αρχικά, προσδιορίζεται ποσοτικά η γλυκουρολακτόνη, αφού αυτή η χρωμοφόρος ουσία είναι που απορροφά στο μήκος κύματος των 530 nm, όπου πραγματοποιείται η φωτομέτρηση και στη συνέχεια μέσω αναλογικής σχέσης επιτυγχάνεται τελικά ο ποσοτικός προσδιορισμός του ουρονικού οξέος στα εκχυλίσματα των οστών.

Για τον προσδιορισμό UA χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα παρασκευασμένα πρότυπα διαλύματα γλυκουρολακτόνης συγκεντρώσεων 0.02, 0.05, 0.07 και 0.10 mg/mL, τα οποία παρασκευάστηκαν από αραιώση αρχικού πυκνού διαλύματος αυτής της ουσίας με buffer εκχύλισης των PGs. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε το buffer εκχύλισης των PGs. Οι μετρήσεις για όλα τα δείγματα πραγματοποιούνται δύο φορές υπό τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης.

A.1.2.3. Μέτρηση πρωτεΐνης

Η μέτρηση πρωτεΐνης των πρωτεογλυκανών που περιέχονται στα οστά έγινε με τη μέθοδο Brandford. Με βάση τη μέθοδο αυτή, τα πρωτεϊνικά μόρια σε όξινο περιβάλλον σχηματίζουν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 έγχρωμα σύμπλοκα με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα βόειας αλβουμίνης. Η ευαισθησία και γραμμικότητα της μεθόδου περιλαμβάνει ποσά πρωτεΐνης εύρους 5-100 µg/ mL.

Βάσει της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη του εκχυλίσματος PGs κάθε δείγματος οστού (1^{ης} και 2^{ης} εκχύλισης), λαμβάνονται οι κατάλληλοι όγκοι, που αντιστοιχούν σε ~100 µg πρωτεΐνης, στους οποίους προστίθενται 4 V EtOH 95%, προς κατακρήμνιση των πρωτεογλυκανών overnight στους 4°C.

Ακολουθεί φυγοκέντρωση, παραλαβή του ιζήματος, το οποίο αφού στεγνώσει καλά χρησιμοποιείται για περαιτέρω ανάλυση.

A.1.6. Ενζυμική κατεργασία με χονδροϊτινάση ABC

Η χονδροϊτινάση ABC είναι μία λύαση, η οποία καταλύει τη διάσπαση της CS και της DS στις GlcA-και IdoA- περιέχουσες δισακχαριτικές μονάδες. Βρίσκεται στη μορφή λυοφιλοποιημένης σκόνης και έχει MB 120.000-145.000. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 37 °C. Το ένζυμο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη θερμοκρασία και γι' αυτό φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι τη στιγμή που θα χρησιμοποιηθεί. Η ενζυμική κατεργασία στο ίζημα, που κατακρημνίστηκε ύστερα από προσθήκη αιθανόλης στον αντίστοιχο όγκο για το κάθε δείγμα εκχυλίσματος PGs, πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.5, στους 37°C overnight, χρησιμοποιώντας 0.01 units/ 20 µL ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής τα δείγματα αφού επεξεργάστηκαν καταλλήλως χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

A.1.7. Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Η τεχνική SDS-PAGE είναι η πιο δημοφιλής τεχνική που εφαρμόζεται για την ανάλυση των πρωτεϊνών. Έχει υψηλή ικανότητα διαχωρισμού με τις πρωτεΐνες να μεταναστεύουν ανάλογα με το μέγεθος τους, δίνοντας μια εκτίμηση για τα μοριακά τους βάρη. Στην εργασία αυτή ακολουθήθηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης κατά Laemmli. Οι ηλεκτροφορήσεις έγιναν σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαστάσεων 8x5x0.1 cm παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS. Τα πηκτώματα που παρασκευάστηκαν αποτελούνταν από το κύριο πήκτωμα διαχωρισμού, η συγκέντρωση του οποίου σε ακρυλαμίδιο ήταν 10% (w/v) και το πήκτωμα επιστοίβαξης του δείγματος συγκεντρώσεως ακρυλαμιδίου 4% (w/v). Για τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνικών κορμών των PGs τα δείγματα περιείχαν 20 µl διαλύματος που περιελάμβανε σε τελικές συγκεντρώσεις 0.675 M Tris-HCl (pH

6.8), 2% SDS, 10% γλυκερόλη και 0.001 % (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης ως δείκτη (sample buffer). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή BioRad όπου στην άνοδο και την κάθοδο υπήρχε διάλυμα 0.192 M γλυκίνης, 0.025 M Tris-HCl, 0.1% SDS (w/v). Η τάση ρυθμίστηκε στα 100 V μέχρι τη στιγμή που τα δείγματα έφτασαν στο πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια ρυθμίστηκε στα 150 V μέχρι το τέλος της διαδικασίας.

A.1.8. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αμέσως μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε επάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Immobilon P), η οποία είχε ενεργοποιηθεί αρχικά με μεθανόλη και στη συνέχεια είχε διαβραχεί με «ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς» (0.05 M Tris-HCl). Η διαδικασία έλαβε χώρα μετά την πλήρωση του δοχείου με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, διαβιβάστηκε ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης 80 mA και το δοχείο ηλεκτροφόρησης παρέμεινε overnight υπό συνεχή ανάδευση στους 4 °C.

Χαρακτηρισμός Πρωτεογλυκανών

Χαρακτηρισμός PGs

A.1.9. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση υψηλής επίδοσης (Capillary electrophoresis, CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση υψηλής επίδοσης (HPCE ή CE) είναι μία σύγχρονη μέθοδος διαχωρισμού που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της παραδοσιακής ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης (HPLC). Αποτελεί μια ραγδαίως αναπτυσσόμενη τεχνική μικροδιαχωρισμού κυρίως εξαιτίας της υψηλής αποτελεσματικότητάς της (θεωρητικές πλάκες $> 10^5$ - 10^6) καθώς και του χαμηλού όγκου δείγματος. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε τριχοειδείς στήλες εσωτερικής διαμέτρου 20-75 μm (i.d.), οι οποίες περιέχουν μόνο το buffer λειτουργίας.

Το ολικό μήκος του τριχοειδούς, που χρησιμοποιεί η CE είναι περίπου 25 με 70cm αν και το αποτελεσματικό μήκος του τριχοειδούς - δηλαδή το μήκος του τριχοειδούς από το σημείο της ένεσης ως το σημείο της ανίχνευσης - είναι 5-10 cm μικρότερο. Το τριχοειδές αυτό είναι κατασκευασμένο από τετηγμένη σίλικα και είναι συνήθως επιστρωμένο εξωτερικά με πολυϊμίδιο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την εφαρμογή υψηλού δυναμικού (10-30kV) και ηλεκτρικού πεδίου μεγάλης ισχύος (100-500 V/cm) κατά μήκος του τριχοειδούς με αποτέλεσμα να δημιουργείται εντός του τριχοειδούς ηλεκτροσμωτική ροή (EOF) των κατιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος λειτουργίας και ηλεκτροφορητική κινητικότητα (EM) των αναλυόμενων φορτισμένων ειδών (Karamanos and Hjerpe, 1998).

A.2. Αποτελέσματα

Από το αποτέλεσμα της αρχικής ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης διαπιστώθηκε η παρουσία τριών μόνο γλυκοζαμινογλυκανών τόσο στο φυσιολογικό οστό (στήλη 1 όσο και στις παθολογικές περιπτώσεις της έκτοπης οστεοποίησης (στήλες 3 και 4) και της οστεοαρθρίτιδας (στήλη 2). (πρότυπα: 5)

Πιο συγκεκριμένα, και τα τέσσερα δείγματα οστού περιέχουν μόνο υαλουρονικό οξύ, θειική χονδροϊτίνη τύπου A και/ ή τύπου B (θειική δερματάνη), ενώ η απουσία ζωνών στις αντίστοιχες με τα πρότυπα θέσεις θειικής κερατάνης και θειικής ηπαράνης σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα οστού συνεπάγει ότι αυτοί οι δύο τύποι GAGs δεν αποτελούν συστατικά του ECM αυτών των ιστών. Η παρουσία του HA διαπιστώνεται με την ευδιάκριτη ζώνη που δίνουν όλα τα δείγματα. Το κατά πόσο η διάχυτη ζώνη που αντιστοιχεί στις δύο θειωμένες GAGs για όλα τα οστά ανήκει στο έναν και/ ή στον άλλο τύπο θειικής χονδροϊτίνης διαπιστώνεται ποιοτικώς και ποσοτικώς με μεγάλη ακρίβεια με την αναλυτική τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης υψηλής επίδοσης. Αναφορικά με την ανάλυση των δειγμάτων μας, οι GAGs που εκλούσθηκαν σε διάλυμα 0,2M NaCl, στην ηλεκτροφόρηση δίνει την εικόνα του υαλουρονικού οξέως ενώ το έκλουμα των 0,6M NaCl δίνει όμοιο προφίλ με την εικόνα της CS (θειικής χονδροϊτίνης). Η ποσοτική ανάλυση έδειξε ότι η θειική χονδροϊτίνη απαντάται στο μεγαλύτερο ποσοστό σε όλους τους οστίτες ιστούς από τα δείγματά μας (87-99%) από το σύνολο των GAGs. Βεβαίως, οι συγκεντρώσεις των GAGs διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα. Υπάρχει σημαντική μείωση της CS σε δείγματα έκτοπου οστού (279 και 242 $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους), συγκρινόμενη με την συγκέντρωσή της σε ένα κανονικό οστό (960 $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους). Το οστεοαρθρικό δείγμα οστού περιείχε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα θειικής χονδροϊτίνης.

Μικρές ποσότητες υαλουρονικού οξέως εντοπίστηκαν στα οστικά δείγματα που αναλύθηκαν (0,8-12,9%). Τα δείγματα από έκτοπη οστεοποίηση

περιείχαν συγκριτικά χαμηλότερα ποσά ΗΑ, (8 και 36 $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους) σε σχέση με τα φυσιολογικά οστά (61 $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους).

Εικόνα 23
Ανάλυση ακέραιων GAGs με CE

Ηλεκτροφερογράμματα που παρουσιάζουν ποιοτικά και ποσοτικά τις γλυγοζαμινογλυκάνες που απομονώνονται με χρήση 0,6 M NaCl (A) και 0,2 M NaCl (B) από ετερότοπο οστόν με βάση τα πρότυπα δείγματα CS (C) και HA (D)

Το πρότυπο θείωσης των απομονωθέντων GAGs μελετήθηκε επίσης, κατόπιν επεξεργασίας των δειγμάτων που εκλούσθηκαν με χονδροϊτινάσες (ACII και μείγματος χονδροϊτινών ABC και ACII). Τα ενζυμικά επεξεργασμένα δείγματα υποβλήθηκαν σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση HPCE.

Η CS σε αυτά τα δείγματα αποτελείτο κυρίως από 6-θειωμένους δισακχαρίτες (range 79,9-46,5%). Σημαντικά ποσοστά 4-θειωμένων δισακχαριτών (39-17%) όπως και μη θειωμένων παραγώγων (12,5-1,8%) ευρέθηκαν σε όλα τα δείγματα.

Πίνακας 4.		
<i>Δείγμα οστίτη ιστού</i>	<i>HA</i>	<i>CS</i>
Φυσιολογικό οστό	61 (6,0)	960 (94,0)
Οστεοαρθρικό δείγμα	141 (0,8)	16783 (99,2)
Έκτοπο οστό	8 (2,8)	279 (97,2)
Έκτοπο οστό	36 (12,9)	242 (87,1)
Οι συγκεντρώσεις HA και CS δίδονται σε µg/g ξηρού βάρους. Οι παρενθέσεις δίνουν το επί τοις εκατό ποσοστό.		

Μικρότερα ποσοστά διπλά θειωμένων δισακχαριτών εντοπίστηκαν σε όλα τα οστικά δείγματα, όπως φαίνεται στον πίνακα 5, που ακολουθεί.

Όπως γίνεται προφανές παρά το γεγονός ότι όλα τα δείγματα οστών περιείχαν μεγάλα ποσοστά 6-θειωμένων δισακχαριτών, τα ποσοστά 4-θειωμένων και μη θειωμένων δισακχαριτών ήταν υψηλότερα στο έκτοπο οστό συγκριτικά με τα φυσιολογικά αλλά και το οστεοαρθρικό δείγμα.

Δισακχαρίτης	Φυσιολογικό οστό	Οστεοαρθρίτις γόνατος	Ετερότοπο οστό	Ετερότοπο οστό
Δdi-nonS	6,4	1,8	10,4	12,5
Δdi-mono4S	23,8	17,0	35,0	39,0
Δdi-mono6S	67,9	79,9	52,3	46,5
Δdi-diSD	1,2	0,8	2,3	2,0
Δdi-diSE	0,7	0,3	ND	ND
Δdi-diSB	ND	0,2	ND	ND

Πίνακας 5. Ποσοστά μη θειωμένων, μονοθειωμένων, διθειωμένων
δισακχαριτών.

Τα δείγματα που λήφθηκαν αναλύθηκαν περαιτέρω με Western Blotting κατόπιν επεξεργασίας τους με χονδροϊτινάση ABC. Η ποσότητα του υαλουρονικού οξέως μετρήθηκε επακριβώς.

Αγγρικήνη και Διακοσμητίνη ανιχνεύθηκαν σε όλα τα οστά. Η αγγρικήνη ανιχνεύθηκε μόνο στο αρχικό διάλυμα γουανιδίνης και όχι στο δεύτερο διάλυμα και φαίνεται να υπάρχει μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες. Αντίθετα η διακοσμητίνη με μοριακά βάρη από 47-38 kDa και η διγλυκάνη με μοριακά βάρη της τάξεως των 45 kDa ανιχνεύθηκαν σε συγκρίσιμες ποσότητες και στα δύο διαλύματα και προφανώς αποτελούν τις μείζονες πρωτεογλυκάνες στα φυσιολογικά αλλά και στα ετερότοπα οστά.

Εικόνα 24.

Ανοσοταυτοποίηση
Αγγκρικάνης (A), Διακοσμητίνης
(B) και Διγλυκάνης (C) σε
φυσιολογικό οστό (στήλη 1), σε
οστεοαρθριτικό οστό (2), στα
δύο προς μελέτη ετερότοπα
οστά (3 και 4)

A.3. Συζήτηση

Η θειική χονδροϊτίνη και το Υαλουρονικό οξύ είναι οι μοναδικοί τύποι GAGs που συναντούμε στο ανθρώπινο οστό. Ωστόσο στο έκτοπο οστό η ποσότητα των μορίων αυτών βρέθηκε να είναι 70% μικρότερη από ότι στο φυσιολογικό οστό. Η θειική χονδροϊτίνη αντιπροσωπεύει την κυρίαρχη μορφή γλυκοζαμινογλυκανών σε όλους τους τύπους οστών που αναλύθηκαν στη μελέτη μας. Μικρές ποσότητες Υαλουρονικού οξέως ανιχνεύθηκαν.

Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, σχετικά με τη Θειική χονδροϊτίνη, η 6-θειωμένη μορφή του δισακχαρίτη ήταν αυτή που επικρατούσε. Αντίθετα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες στις οποίες η 4-θειωμένη μορφή ήταν η επικρατούσα (Waddington RJ et al 1989, Smith AJ et al 1997).

Είναι καλά θεμελιωμένο ότι οι Γλυκοζαμινογλυκάνες είναι υπεύθυνες για την ικανότητά τους να αποθηκεύουν νερό, κάτι που καθιστά τον αρθρικό χόνδρο ελαστικό. Σε ηλικιωμένα άτομα, αυτή η αποθηκευτική ικανότητα μειώνεται λόγω της μείωσης της ποσότητας Γλυκοζαμινογλυκανών, το οποίο μπορεί να οφείλεται με τη σειρά του, στην ηλικία, σε ορμονική δυσλειτουργία ή σε κάποιας μορφής επέμβαση (Claassen H et al, 2007).

Από την άλλη πλευρά, υψηλά επίπεδα γλυκοζαμινογλυκανών έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στη χειροτέρευση της κατάστασης ασθενών που πάσχουν από αυτοάνοσες νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (Simonaro CM et al 2008).

Περισσότερες μελέτες θα χρειαστούν προκειμένου να χαρακτηριστεί η βιολογική σημαντικότητα της διαφοροποίησης που παρατηρήθηκε στην έκφραση των Γλυκοζαμινογλυκανών στο φαινόμενο της Ετερότοπης οστεοποίησης. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε 4-θειωμένα δισακχαρίτικά παράγωγα προερχόμενα από την επεξεργασία της CS από έκτοπο οστό θα μπορούσε να αποδοθεί σε τροποποιήσεις της δράσης των σουλφοτρανφερασών κατά τη βιοσύνθεση του ετερότοπου οστού, συγκριτικά

με το φυσιολογικό οστίτη ιστό. Αυτή η τροποποίηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε δομικές διαφοροποιήσεις στο ετερότοπο οστό.

Η ανάλυση των πρωτεογλυκανών από την άλλη πλευρά οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεογλυκάνες αγγρική και διακοσμητίνη υπάρχουν σε όλα τα οστά που εξετάσαμε. Κατατμημένες, μερικώς απογλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες κορμού της αγγρικής με μοριακά μεγέθη που κυμαίνονται από 250 ως 40 kDa, ανιχνεύθηκαν με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος. Από τα δεδομένα αυτά εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αγγρική υφίσταται πρωτεολυτική αποικοδόμηση και επιπλέον ότι συγκρατείται σε μη επιμεταλλωμένο τμήμα της εξωκυτάριας θεμέλιας ουσίας. Και αυτό διότι όλη ουσιαστικά η ποσότητά της εκλούεται χωρίς τη χρησιμοποίηση διαλύματος που οδηγεί σε απομετάλλωση του προς μελέτη ιστού.

Πρωτεΐνες κορμού της διακοσμητίνης και της διγλυκάνης, με μοριακά βάρη από 38 ως 47 kDa και 45 kDa, αντιστοίχως, ανιχνεύθηκαν και στα δύο διαλύματα έκλουσης (τόσο στο διάλυμα μη απομετάλλωσης όσο και στο διάλυμα απομετάλλωσης).

Είναι γνωστό πως η διακοσμητίνη καθώς και το ανάλογό της, η διγλυκάνη, συνδέονται με τον υδροξυαπατίτη και το κολλαγόνο (Lamoureux F et al, 2007).

Τα περισσότερα μόρια που δεν ανήκουν στις κατηγορίες του κολλαγόνου, και τα οποία είναι παγιδευμένα στο επιμεταλλωμένο οστό, αποικοδομούνται με το χρόνο (Prince CW et al, 1983). Η διακοσμητίνη κατόπιν της εκκρίσεώς της διαχέεται στο οστεοειδές και συνδέεται απευθείας στην επιμεταλλωμένη θεμέλια ουσία. Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι υπεύθυνο για την εύρεση κατά την ποιοτική ανάλυση, πρωτεϊνών κορμού διαφορετικών μοριακών μεγεθών (Lamoureux F et al 2007).

Επιπλέον η διακοσμητίνη φαίνεται ότι αποικοδομείται με πιο αργούς ρυθμούς από ότι η διγλυκάνη. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε από τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του μορίου της στις πρωτεάσες είτε από την

πιθανότητα να εντοπίζεται σε μία πιο προστατευμένη περιοχή της θεμέλιας ουσίας.

Η διακοσμητίνη και η διγλυκάνη εκτός από τη συμμετοχή τους ως δομικά στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, παίζουν και ρυθμιστικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των αυξητικών παραγόντων του οστίτη ιστού (Lamoureaux F et al, 2007). Για παράδειγμα, είναι δυνατό να συνδέονται με τον TGF-β και για το επιμεταλλωμένο οστό, θεωρείται ότι ο παράγων αυτός δεσμεύεται αποκλειστικά στην διακοσμητίνη (Takeuchi Y et al, 1994). Η δέσμευση αυτή συνεπάγεται αύξηση της δέσμευσης του TGF-β στους υποδοχείς του και αυτό οδηγεί στη αύξηση της βιοδραστικότητάς του (Takeuchi Y et al, 1994).

Η αυξημένη βιοδραστικότητα του TGF-β σε περιβάλλον έλλειψης διακοσμητίνης-διγλυκάνης στα κύτταρα στρώματος, οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση, μικρότερο αριθμό προγονικών μορφών οστεοπαραγωγών κυττάρων. Κατά συνέπεια, υπάρχει μειωμένη οστική παραγωγή (Bi Y et al, 2005).

Επομένως οι πρωτεογλυκάνες διακοσμητίνη και διγλυκάνη φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διατήρηση ενός ικανού αριθμού οστεοβλαστών ρυθμίζοντας την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων στρώματος οστικού μυελού.

Άρα οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ πρωτεογλυκανών στην ανάλυση δειγμάτων από ετερότοπο οστό συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου μπορεί να συνεπάγονται μια διαφορετική παθοφυσιολογία όπως και ένα διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης του οστού στην ετερότοπη οστεοποίηση.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν την παρουσία θειικής χονδροϊτίνης, ως επικρατούσα Γλυκοζαμινογλυκάνη στο ανθρώπινο οστό (67-97% των συνολικών GAGs). Επίσης υπάρχουν μικρές ποσότητες υαλουρονικού οξέως. Από τις Γλυκοπρωτεΐνες, η ποιοτική ανάλυση οδήγησε στην εύρεση αγγρικών, διακοσμητίνης και διγλυκάνης. Δηλαδή το profile

των μακρομορίων τόσο στο ετερότοπο όσο και στο φυσιολογικό οστό είναι το ίδιο.

Τα παραπάνω δεδομένα σε επίπεδο βασικής έρευνας είναι σημαντικά γιατί μπορούν να μας δείξουν μέσω του ρόλου των μακρομορίων GAG/ PG's μέρος του παθοφυσιολογικού μηχανισμού σχηματισμού Ετερότοπου οστού, της πρόγνωσης καθώς και της πρώιμης διάγνωσης αλλά και θεραπείας του φαινομένου.

Πίνακας 6. Συνοπτικός Πίνακας Αποτελεσμάτων Ποιοτικής και Ποσοτικής Ανάλυσης Μακρομορίων (GAGs και PG) ετερότοπου και φυσιολογικού οστού

1. Η CS και το HA είναι οι κύριοι τύποι γλυκοζαμινογλυκανών στο εξωκυττάριο δίκτυο έκτοπου οστού ανθρώπου, με την πρώτη μάλιστα να αποτελεί και την κυρίαρχουσα μορφή αυτών των μορίων με ποσοστό ~ 87-99 %.
2. Παρατηρείται μείωση κατά ~ 72,3 % (κατά μέσο όρο) του ολικού ποσού των γλυκοζαμινογλυκανών που είναι παρούσες στο ECM των έκτοπων οστών ως προς το ποσό του φυσιολογικού.
3. Η επικρατούσα μορφή δισακχαρίτη θειϊκής χονδροϊτίνης-όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της ανάλυσης τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ύστερα από την εκλεκτική ενζυμική αποικοδόμηση-είναι η Δdi-mono6S, η περιεκτικότητα της οποίας και στα δύο έκτοπα οστά είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του μηριαίου.
5. Τα επίπεδα έκφρασης του πρωτεϊνικού κορμού της αγγρικάνης για τα οστά ΗΟ είναι χαμηλότερα από αυτά του φυσιολογικού κρίνοντας από την ένταση της ζώνης στα ~ 250 kDa. Ενώ, παρατηρείται το αντίστροφο για τη διακοσμητίνη, όπου τόσο τα 1 ^α , όσο και τα 2 ^α εκχυλίσματα περιέχουν την PG αυτή σε μεγαλύτερα ποσοστά.

Β. Μελέτη κυτταρικών πληθυσμών σε περιφερικό αίμα ασθενών κατόπιν τραυματικής κρανιοεγκεφαλικής βλάβης κατά τη διάρκεια νοσηλείας τους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.

Όπως προαναφέρθηκε, τόσο κατόπιν τραύματος όσο και κατόπιν ΚΕΚ επάγεται μία αλληλουχία γεγονότων. Η βλάβη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η επαγωγή φλεγμονοδών μεσολαβητών, η σειρά αντιδράσεων καταρράκτη στο αίμα των ασθενών είναι μερικές από τις μεταβολές που συμβαίνουν εξαιτίας της πρωτογενούς αλλά και δευτερογενούς βλάβης.

Η ετερότοπη οστεοποίηση παρά το γεγονός ότι το state of art της γνώσης σήμερα δεν έχει διαλευκάνει τον παθοφυσιολογικό της μηχανισμό, θεωρείται πολύ πιθανό να είναι συνέπεια των παραπάνω μεταβολών.

Για τους λόγους αυτούς μελετήσαμε κυτταρικούς πληθυσμούς και βιοχημικούς δείκτες στο περιφερικό αίμα ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ και νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ εξαιτίας της ΚΕΚ.

Β.1. Ασθενείς και Μέθοδοι

Από την 1/1/2008 ως και την 31/12/2008, 26 άτομα εισήχθησαν και νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ κατόπιν ΚΕΚ. Τα κριτήρια βάσει των οποίων κάποιος συμπεριλαμβάνεται στη μελέτη ήταν:

- ΚΕΚ με ή χωρίς συνυπάρχουσες κακώσεις σώματος
- Ηλικία από 18 ως 60 ετών, ανεξαρτήτως φύλου
- Μη χρήση φαρμακευτικών εθιστικών ουσιών
- Μη ύπαρξη από το ιστορικό συστηματικής, αυτοάνοσης παθολογίας ή χρόνιας νόσου

Σε συγκεκριμένες, καταγεγραμμένες χρονικές περιόδους από την εισαγωγή των ασθενών στη ΜΕΘ λαμβάνονταν δείγματα από περιφερική φλέβα. Τα δείγματα ολικού αίματος από τους ασθενείς αυτούς υπεβλήθησαν αμέσως σε κυτταρομετρία ροής με φθορίζοντα αντισώματα στις κατάλληλες

συγκεντρώσεις, ώστε να μετρηθούν πληθυσμοί κυττάρων περιφερικού αίματος οι οποίοι εκφράζουν διαφορετικούς οστεοβλαστικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

- CD63. Αυτή είναι μία πρωτεΐνη που χαρακτηρίζει τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών. Αυτά τα κύτταρα κατά την ίδια χρονική στιγμή εκφράζουν αλκαλική φωσφατάση, οστεοκαλσίνη και Runx-2 mRNA (Ziros P et al, 2008). Κύτταρα που εκφράζουν το CD63 έχουν ανιχνευθεί σε εκφυλισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους ανθρώπων.
- Osteocalcin. Η οστεοκαλσίνη είναι μία μη κολλαγονική πρωτεΐνη μεγέθους 5,8 KDa. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 49 αμινοξέα και χαρακτηρίζεται από συντηρητικές αλληλουχίες μεταξύ των ειδών. Παράγεται στους οστεοβλάστες και είναι δείκτης οστικής παραγωγής. Σε μεταγραφικό επίπεδο ρυθμίζεται από την βιταμίνη D.

Επίσης από τους ορούς των ληφθέντων δειγμάτων μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA διαλυτοί παράγοντες του ορού όπως οι κυτταροκίνες IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α (pg/ml)

B.1.1 Τεχνική της Κυτταρομετρίας Ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και εξέταση μικροσκοπικών σωματιδίων όπως κύτταρα ή χρωμοσώματα με την τοποθέτησή τους μέσα σε ρέον υγρό και το πέρασμά τους από μία συσκευή ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Η τεχνική επιτρέπει την ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών ωε χιλίων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται ως μέθοδος ρουτίνας στη διάγνωση νόσων όπως αιματολογικές κακοήθειες αλλά χρησιμοποιείται και σε άλλες εφαρμογές στην ερευνητική και κλινική πρακτική. Μια κοινή πρακτική χρήσης είναι η διάκριση των σωματιδίων με βάση τις ιδιότητές τους ώστε να διαχωρίσουμε πληθυσμούς ενδιαφέροντος.

Μία δέσμη μονοχρωματικού φωτός (Laser) συγκεκριμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

2D Scatter Plot of Blood

Multiparametric analysis
is the real power of flow
cytometry.

Εικόνα 25. Στην πιο πάνω εικόνα απεικονίζεται η κυτταρομετρική ανάλυση των εμπυρήνων κυττάρων του φυσιολογικού αίματος. Πρόκειται για διάγραμμα Forward Scatter προς Side Scatter

Σχήμα 11. Κυτταρομερία ροής (Σχηματική αναπαράσταση)

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής είναι:

- PE-conjugated mouse mAb to CD63 (Abcam #ab18236),
- PE-conjugated mouse anti-human osteocalcin for intracellular staining and isotype control (R&D Systems #IC1419P, #IC002P)

B.2 Αποτελέσματα

Ο Μέσος Όρος Ηλικίας των προς μελέτη ασθενών ήταν 33,27 έτη. Η ηλικία κυμαινόταν από 18 ως 59 έτη. Από το σύνολο των 26 ασθενών, 6 ήταν γυναίκες και 20 άνδρες. Από τους 26 ασθενείς, που εισήχθησαν στη ΜΕΘ, 9 απεβίωσαν (ποσοστό 34,62%). Η διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ ήταν κατά μέσο όρο 16,27 μέρες (από 1 ως 60 ημέρες). Από όλους τους ασθενείς ένας ανέπτυξε ΗΟ ισχίου ΔΕ. (ασθενής 21), ενώ ένας άλλος είχε προηγηθέν ιστορικό ανάπτυξης ΗΟ (ασθενής 1).

Από τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών οι 21 είχαν αμιγώς κρανιοεγκεφαλική κάκωση ενώ από τους υπόλοιπους 4 είχαν από 1 ως 3 κατάγματα πλευρών και αντιστοίχως θλάσεις πνευμονικών παρεγχυμάτων και 1 είχε κάταγμα μακρού οστού.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7, που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

A/A ασθενούς (κατάληξη)	Age (years)	Duration of hospitalization (days)	% Osteocalcin ⁺ cells	% CD63 ⁺ cells	OPG(pmol/l) (pg/ml)	sRANKL(pmol/l) (pg/ml)	Ημερομηνία αιμοληψίας
Ασθενής 1 ♂ (Εξιτήριο)	22	19	0.55	17.5	2.30 (45.92)	0 (0)	23/1/2008
			0.88	8.22	1.62 (32.35)	0 (0)	23/1/2008
			12.2	81.1	1.74 (34.82)	0 (0)	30/1/2008
			28.7	41.3	2.19 (43.87)	0 (0)	10/2/2008
Ασθενής 2 ♀ (Εξιτήριο)	27	3	0.81	78.1	4.15 (83.04)	0 (0)	1/2/2008
Ασθενής 3 ♀ (Εξιτήριο)	34	15	0.17	56.4	2.78 (55.59)	0 (0)	3/5/2008
			2.62	58.1	3.63 (72.56)	0 (0)	15/5/2008
Ασθενής 4 ♂ (Εξιτήριο)	18	20	2.96	44.8	5.01 (100.12)	0 (0)	3/5/2008
			12.9	10.8	7.51 (150.19)	0 (0)	15/5/2008
Ασθενής 5 ♂	51	21	0.02	11.24	11.27	0	1/8/2008

(απεβίωσε)					(225.36)	(0)	
			0.05	13.3	3.03 (60.52)	0 (0)	5/8/2008
			0.04	3.15	3.48 (69.57)	0 (0)	11/8/2008
			0.07	3.52	>30 (>600)	0 (0)	26/8/2008
Ασθενής 6 ♂ (εξιτήριο)	31	4	0.03	25.3	11.85 (236.98)	0.95 (19.02)	1/8/2008
Ασθενής 7 ♀ (απεβίωσε)	42	6	0.02	26.4	1.82 (36.46)	0 (0)	1/8/2008
			0.07	77.1	4.69 (93.74)	0 (0)	5/8/2008
Ασθενής 8 ♂ (Εξιτήριο)	40	49	0.05	22.9	6.53 (130.65)	4.12 (82.40)	1/8/2008
Ασθενής 9 ♂ (εξιτήριο)	23		0.01	55.7	1.96 (39.14)	0 (0)	5/8/2008
Ασθενής 10 ♂ (Εξιτήριο)	37	13	0.04	8.2	2.13 (42.53)	0.58 (11.68)	11/8/2008
	37		0.01	0.12	2.70 (54.05)	0.85 (16.96)	20/8/2008

Ασθενής 11 ♂ (Εξιτήριο)	42	3	0.04	2.43	6.25 (124.90)	0.03 (0.65)	11/8/2008
Ασθενής 12 ♂ (απεβίωσε)	33	3	0.1	3.69	>30 (>600)	0 (0)	26/8/2008
Ασθενής 13 ♂ (εξιτήριο)	28	32	0.02	1.18	2.75 (55.08)	0 (0)	26/8/2008
			0.13	22.89	5.66 (113.17)	0.27 (5.36)	5/9/2008
			0.14	1.94	3.72 (74.41)	0 (0)	12/9/2008
			0.87	1.7	4.42 (88.39)	0.21 (4.10)	18/9/2008
			1.56	1.3	2.69 (53.84)	0 (0)	23/9/2008
Ασθενής 14 ♂ (εξιτήριο)	44	60	0.02	8.66	5.53 (110.60)	0 (0)	5/9/2008
			0.06	1.48	7.23 (144.64)	0 (0)	12/9/2008
			0.9	12.7	7.05 (141.04)	0 (0)	18/9/2008
			1.1	11.34	13.92 (278.42)	0 (0)	23/9/2008
			1.49	13.42	5.66 (113.28)	0 (0)	30/9/2008

			1.56	7.3	4.67 (93.43)	0 (0)	14/10/2008
			-	-	5.17 (103.40)	0 (0)	30/10/2008
Ασθενής 15 ♂ (Απεβίωσε)	59	35	0.05	10.87	4.41 (88.29)	0 (0)	5/9/2008
			0.03	4.26	5.06 (101.24)	0 (0)	12/9/2008
			0.12	5.7	2.75 (54.97)	0 (0)	18/9/2008
			0.32	4.8	6.08 (121.50)	0 (0)	23/9/2008
			0.46	4.36	6.65 (132.92)	0 (0)	30/9/2008
			1.38	13.28	6.51 (130.14)	0.182 (3.64)	7/10/2008
Ασθενής 16 ♂ (εξιτήριο)	33	12	0.05	9.8	3.80 (75.95)	0 (0)	23/9/2008
			0.67	14.14	2.92 (58.37)	0 (0)	30/9/2008
Ασθενής 17 ♂ (απεβίωσε)	28	1	1.3	11.13	5.99 (119.86)	0 (0)	30/9/2008
Ασθενής 18 ♀	22	16	0.93	6.76	3.08	0.57	30/9/2008

(εξιτήριο)					(61.55)	(11.33)	
			2.3	6.4	6.11 (122.22)	1.365 (27.29)	14/10/2008
Ασθενής 19 ♂ (απεβίωσε)	29	8	2.69	9.76	4.64 (92.71)	0 (0)	2/10/2008
			12.39	33.23	6.56 (131.27)	0.21 (4.10)	7/10/2008
Ασθενής 20 ♀	25	40	0.58	13.68	6.05 (121.09)	0 (0)	7/10/2008
Ασθενής 21 ♀ (Εξιτήριο)	34	26	0.76	47.68	10.34 (206.75)	0.14 (2.72)	7/10/2008
			1.2	24.6	2.82 (56.31)	0 (0)	14/10/2008
			-	-	2.69 (53.74)	0 (0)	17/10/2008
			-	-	2.85 (57.03)	0 (0)	30/10/2008
Ασθενής 22 ♂ (απεβίωσε)	20	2	0.6	42.3	1.57 (31.32)	0 (0)	14/10/2008
Ασθενής 23 ♂ (Εξιτήριο)	45	16	-	-	4.20 (84.07)	0.21 (4.21)	30/10/2008
			-	-	2.08	0	07/11/2008

					(41.50)	(0)	
Ασθενής 24 ♂ (Εξιτήριο)	34	2	-	-	7.72 (154.41)	0 (0)	30/10/2008
Ασθενής 25 ♂ (απεβίωσε)	30	2	-	-	2.27 (45.31)	0.40 (8.00)	10/12/2008
Ασθενής 26 ♂ (Απεβίωσε)	34	15	-	-	3.40 (67.93)	0 (0)	28/11/2008
			-	-	2.17 (43.46)	0 (0)	10/12/2008

Από τα δείγματα ολικού αίματος κατόπιν κυτταρομετρίας ροής πήραμε τα πιο κάτω αποτελέσματα:

Αναφορικά με το CD63:

Στις παράπλευρες εικόνες διακρίνουμε το dot plot της ανάλυσης κατόπιν κυτταρομετρίας ροής των λευκών αιμοσφαιρίων Forward scatter to logarithmic side scatter.

Το gating γίνεται στην περιοχή του μονοκυτταρικού κλάσματος

Εικόνα 26.

Από το μονοκυτταρικό κλάσμα με νέο gating απομονώνουμε τα dot plot συγκεκριμένου λόγω φθορισμού χρώματος (μήκους κύματος ακτινοβολίας) που αφορούν τον πληθυσμό CD63+ κυττάρων

Ο πληθυσμός των κυττάρων όπως απεικονίζεται σε ιστόγραμμα

Εικόνα 27.

Αναφορικά με τους κυτταρικούς πληθυσμούς που ήταν θετικοί σε οστεοκαλσίνη:

Gating στα αντίστοιχα Dot plots και ιστογράμματα για απομόνωση του προς μελέτη πληθυσμού θετικών σε οστεοκαλσίνη κυττάρων. Να σημειωθεί ότι το gating στο συγκεκριμένο πληθυσμό γίνεται στο πολυμορφοπυρηνικό κλάσμα των εμπύρηνων κυττάρων αίματος. Από όπου και στη συνέχεια απομονώνονται τα θετικά σε οστεοκαλσίνη κύτταρα (εικ. 29).

Εικόνα 28.

Εικόνα 29. Τελικό gating και ιστόγραμμα θετικών σε οστεοκαλσίνη κυττάρων.

Εικ. 30. Κυτταρικός πληθυσμός CD-63 (+) σε συνάρτηση με το χρόνο

Εικόνα 31. Κυτταρικός πληθυσμός θετικός σε οστεοκαλσίνη σε συνάρτηση με το χρόνο

OPG (pmol/l)

median

Εικόνα 32. Οστεοπροτεγερίνη σε συνάρτηση με το χρόνο στα δείγματα περιφερικού αίματος

D. Μελέτη της Κρανιοεγκεφαλικής Κάκωσης σε Πειραματικό μοντέλο κουνελιών

Οι περισσότερες περιπτώσεις κλινικώς σημαντικής Ετερότοπης Οστεοποίησης εμφανίζονται μετά Κρανιοεγκεφαλική κάκωση.

Ωστόσο, παρά το γεγονός αυτό η έρευνα για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της δημιουργίας ΗΟ όπως και η μελέτη της μοριακής φυσιολογίας του φαινομένου, έχουν εγγενείς περιορισμούς:

- Σημαντικό ποσοστό από τους ασθενείς με ΚΕΚ πεθαίνει από την αρχική τραυματική βλάβη, είτε ως συνέπεια της σοβαρότητας της κάκωσης είτε εξαιτίας της συνακόλουθης αιμορραγίας. (ATLS)
- Οι περισσότερες από τις περιπτώσεις με βαρεία ΚΕΚ, οι οποίες έχουν και τη μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν έκτοπη οστεοποίηση, απαιτούν νοσηλεία σε μονάδες εντατικής θεραπείας και αναλόγως της διαθεσιμότητας να βρεθούν σε διαφορετικά νοσοκομειακά κέντρα. Αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη πολυκεντρικών μελετών, αναφορικά με το θέμα της ΚΕΚ και της έκτοπης οστεοποίησης.
- Σημαντικό ποσοστό ασθενών με ετερότοπη οστεοποίηση διαφεύγει της διάγνωσης της νόσου, διότι η εκδήλωση της νόσου στη συγκεκριμένη ομάδα τυγχάνει να είναι υποκλινική, χωρίς να υπάρχουν περιορισμοί του εύρους κίνησης μεγάλων αρθρώσεων.
- Πειραματικό μοντέλο αναπαραγωγής του φαινομένου της ΚΕΚ, δεν μπορεί να περιλαμβάνει ανθρώπους, όπως είναι αυτονόητο
- Τέλος, τα πρότυπα της βλάβης μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά από ασθενή σε ασθενή, αναφορικά με τα ανατομικά στοιχεία που εμπλέκονται αλλά και την κλινική βαρύτητα της κάκωσης.

Για όλους τους λόγους που προαναφέρθηκαν, είναι προφανής η ανάγκη για δημιουργία και μελέτη ενός πλήρως αναπαραγόμενου μοντέλου ΚΕΚ σε ζώα. Χρησιμοποιήσαμε κουνέλια λευκής ράτσας, αρσενικά.

Αρχικά, εφαρμόστηκε μοντέλο τραυματικής κάκωσης που βασίστηκε σε κάκωση κατόπιν πτώσης βάρους επί του κρανίου κουνελιού (impact

acceleration model). Το πειραματόζωο είχε αρχικά αναισθητοποιηθεί με κεταμίνη 0,5 ml (100 mg/ml) και υδροχλωρική ξυλαζίνη 1 mg/kg (rompun). Στη συνέχεια υπό άσηπτες συνθήκες, αποκαλύπτεται το κρανίο με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων. Κατόπιν, συγκεκριμένο βάρος πέφτει από συγκεκριμένο ύψος εν μέσω οδηγού επί του κρανίου προκαλώντας τεχνητή ΚΕΚ.

Μετά την κάκωση το δέρμα πάνω από το κρανίο συρράπτεται με μη απορροφήσιμο ράμμα και το πειραματόζωο λαμβάνει μία δόση αντιβίωσης (κεφαλοσπορίνη β-γενιάς, cefuroxime 0,75g IM)

Εικ. 34. Πειραματικό μοντέλλο δημιουργίας ΚΕΚ σε κουνέλια υπό την επίδραση Κεταμίνης και Ξυλαζίνης. Τα πειραματόζωα υφίστανται την επίδραση κατευθυνόμενου βάρους από διάφορα ύψη σύμφωνα με το impact acceleration model του Michelson.

Εικόνα της συσκευής επαγωγής ΚΕΚ από το πειραματικό χειρουργείο του Περιφερικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών

Εικ. 35. Αναισθητοποιημένο πειραματόζωο πριν την επαγωγή ΚΕΚ

Εικ. 36. Θέση πειραματοζώου για την επαγωγή ΚΕΚ. Το βέλος δείχνει το βάρος που προκαλεί το τραύμα.

Το μοντέλο αυτό κρίθηκε ανεφάρμοστο από το γεγονός ότι η ΚΕΚ που προκαλούσε ήταν ανομοιόμορφη από πειραματοζώο σε πειραματοζώο και γενικά η βλάβη ήταν ανεπαρκής, διότι παρά τη χρησιμοποίηση διαφορετικών βαρών και διαφορετικών υψών το κρανίο έμενε ανέπαφο οστικά.

Το νέο μοντέλο που τελικά χρησιμοποιήθηκε προέβλεπε τη χειρουργική διάνοιξη του οστού του κρανίου (κρανιοανάτρηση) σε συγκεκριμένο σημείο, εμπρός από τη λαμδοειδή ραφή και πρόκληση τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης με κρουπηξία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο το οποίο αφέθηκε σε έμμεση επαφή με τη σκληρά μήνιγγα του εγκεφάλου του πειραματοζώου επί 3 λεπτά. Στη συνέχεια το τραύμα συγκλείονταν με μη απορροφήσιμο ράμμα και το πειραματοζώο ελάμβανε 1 δόση αντιβίωσης ως άνω.

Τα πειραματοζώα παρέμειναν υπό παρακολούθηση επί 60 ημέρες και στη συνέχεια αφού υποβλήθηκαν σε απεικονιστικό έλεγχο με απλή ακτινογραφία, υπολογιστική τομογραφία και μαγνητική τομογραφία στις περιπτώσεις που υπήρχε υποψία για ΗΟ, θυσιάστηκαν.

Κατά τη διάρκεια των 60 ημερών ελήφθησαν δείγματα αίματος από περιφερική φλέβα του πειραματοζώου ως εξής:

1. Προ κάκωσης
2. Μετά κάκωση (αμέσως)
3. Την 7^η ημέρα μετά την κάκωση
4. Τη 15^η ημέρα μετά την κάκωση

Τα δείγματα αυτά υπεβλήθησαν σε κυτταρομετρία ροής με φθορίζοντα αντισώματα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε να μετρηθούν πληθυσμοί κυττάρων περιφερικού αίματος οι οποίοι εκφράζουν διαφορετικούς οστεοβλαστικούς παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες είναι:

- Η πρωτεΐνη Cysteine rich 61 (CYR61). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια CCN (CYR61/CTGF/NOV) η οποία ερευνάται την τελευταία δεκαετία ως παράγοντες άμεσης πρώιμης έκφρασης κι ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης στους

ανθρώπινους οστεοβλάστες. Η εν λόγω πρωτεΐνη βρίσκεται και ενδοκυττάρια στους πρώιμους οστεοβλάστες αλλά και εκκρίνεται από αυτούς. Η έκκρισή της έχει αποδειχθεί σε μελέτες με western blotting. Η ρύθμισή της γίνεται από την 1α, 25-διυδροξυβιταμίνη D₃. Θεωρείται δε ως ρυθμιστικό μόριο στην ανάπτυξη των οστών μέσα στο οστικό μικροπεριβάλλον (Lechner A et al, 2000). Σε κυτταρικές σειρές ποντικού, οστεοβλάστες εκκρίνουν μία πρωτεΐνη που επίσης χαρακτηρίζεται από cystein-rich domain και δρα ως μόριο οστικής προσκόλλησης. Ονομάζεται δε Osteoblast Specific Factor-2 (OSF-2) (Takeshita S et al, 1993).

- CD63. Αυτή είναι μία πρωτεΐνη που χαρακτηρίζει τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών. Αυτά τα κύτταρα κατά την ίδια χρονική στιγμή εκφράζουν αλκαλική φωσφατάση, οστεοκαλσίνη και Runx-2 mRNA (Ziros P et al, 2008). Κύτταρα που εκφράζουν το CD63 έχουν ανιχνευθεί σε εκφυλισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους ανθρώπων.
- Osteocalcin.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής είναι:

- PE-conjugated mouse mAb to CD63 (Abcam #ab18236),
- Chicken polyclonal to osteoblast-specific cysteine-rich protein with FITC-conjugated goat polyclonal to chicken IgY (Abcam #ab37176, #ab46969),
- PE-conjugated mouse anti-human osteocalcin for intracellular staining and isotype control (R&D Systems #IC1419P, #IC002P)

Τα αποτελέσματα που είχαμε για τα κουνέλια-πειραματόζωα παρουσιάζονται στον πίνακα 7 που ακολουθεί ενώ οι μέσες τιμές συναρτήσεως της αιμοληψίας εμφανίζονται στο γράφημα που επίσης ακολουθεί. (πίνακας 8)

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΤΟΠΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΟΥΣ
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 8. Τιμές των %CD63, %cystein-rich protein και %osteocalcin στα δείγματα από τις αιμοληψίες πειραματόζων σε 4 διαφορετικές, διαδοχικές αιμοληψίες

Στήλη1	% CD63	% CYSTEIN-RICH PROTEIN	% OSTEOCALCIN
ΚΟΥΝΕΛΙ 1 ΔΕΙΓΜΑ 1	56,7	0,19	22,6
ΚΟΥΝΕΛΙ 1 ΔΕΙΓΜΑ 2	48,5	2,27	45,3
ΚΟΥΝΕΛΙ 1 ΔΕΙΓΜΑ 3	53,3	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	52,9
ΚΟΥΝΕΛΙ 1 ΔΕΙΓΜΑ 4	1,4	2,37	25,7
ΚΟΥΝΕΛΙ 2 ΔΕΙΓΜΑ 1	37,8	0,19	0,67
ΚΟΥΝΕΛΙ 2 ΔΕΙΓΜΑ 2	72,8	1,18	2,92
ΚΟΥΝΕΛΙ 2 ΔΕΙΓΜΑ 3	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 2 ΔΕΙΓΜΑ 4	0,4	0,4	30,4
ΚΟΥΝΕΛΙ 3 ΔΕΙΓΜΑ 1	50,5	7,8	11,4
ΚΟΥΝΕΛΙ 3 ΔΕΙΓΜΑ 2	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 3 ΔΕΙΓΜΑ 3	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 3 ΔΕΙΓΜΑ 4	2,1	0,1	20,8
ΚΟΥΝΕΛΙ 4 ΔΕΙΓΜΑ 1	55,3	10,6	0,86
ΚΟΥΝΕΛΙ 4 ΔΕΙΓΜΑ 2	56,3	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 4 ΔΕΙΓΜΑ 3	ΠΗΓΜΑ	ΠΗΓΜΑ	ΠΗΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 4 ΔΕΙΓΜΑ 4	3,7	0,8	18,4
ΚΟΥΝΕΛΙ 5 ΔΕΙΓΜΑ 1	30,8	0,67	1,47
ΚΟΥΝΕΛΙ 5 ΔΕΙΓΜΑ 2	43,6	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 5 ΔΕΙΓΜΑ 3	ΑΠΕΒΙΩΣΕ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
ΚΟΥΝΕΛΙ 5 ΔΕΙΓΜΑ 4			
ΚΟΥΝΕΛΙ 6 ΔΕΙΓΜΑ 1	50,2	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑ
ΚΟΥΝΕΛΙ 6 ΔΕΙΓΜΑ 2	52,7	0,69	34,2
ΚΟΥΝΕΛΙ 6 ΔΕΙΓΜΑ 3	54,5	0,1	75,2
ΚΟΥΝΕΛΙ 6 ΔΕΙΓΜΑ 4	3,2	0,1	26,5

Πίνακας 9. Μέση τιμή % κυττάρων θετικών για οστεοκαλσίνη, cystein-rich protein και CD63 στο περιφερικό αίμα κουνελιών

D. Συζήτηση

Όπως προκύπτει από τα γραφήματα ποσοτικού προσδιορισμού των προδρόμων κυττάρων που είναι θετικά στην οστεοκαλσίνη αλλά και στο CD63, στους κυτταρικούς πληθυσμούς περιφερικού αίματος εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Τα κύτταρα που είναι θετικά στο CD63, δημιουργούν μία κορυφή την περίοδο μεταξύ 6 και 10 ημερών κατόπιν της κάκωσης. Στη συνέχεια ο κυτταρικός αυτός πληθυσμός ακολουθεί φθίνουσα πορεία.

Αναφορικά με τον πληθυσμό κυττάρων που είναι θετικός στην οστεοκαλσίνη: Ακολουθεί αυξανόμενη πορεία αρχής γενομένης από το διάστημα 11 ως 15 ημερών και για όσο χρονικό διάστημα συνεχίζονται οι μετρήσεις.

Αναφορικά με τους διαλυτούς παράγοντες που μετρήσαμε. Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι αρχικά στάσιμη σε επίπεδα της τάξης των 4 pmol/l, ενώ από τις 20 ημέρες κατόπιν της κάκωσης και μετά αυξάνει. Το sRANKL ουσιαστικά δεν ανευρίσκεται στους ορούς των ασθενών κατόπιν ΚΕΚ.

Τέλος, αναφορικά με το πειραματικό μας μοντέλο, τόσο ο κυτταρικός πληθυσμός θετικός σε οστεοκαλσίνη όσο και ο κυτταρικός πληθυσμός θετικός σε CD63 εμφανίζουν κοινό πρότυπο ανάπτυξης τόσο στα πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο.

Αρχικές μας μελέτες και με άλλους διαλυτούς παράγοντες όπως οι ενδιαμέσου χρόνου φλεγμονώδεις μεσολαβητές IL-6, IL-4, εμφανίζουν κορυφή στους ορούς κατά το διάστημα 6^{ης} ως 10^{ης} μέρας μετά την κάκωση.

Παρά το γεγονός ότι από τον ανθρώπινο πληθυσμό που ερευνήσαμε μόνο ένας ασθενής ανέπτυξε ετερότοπη οστεοποίηση και ως εκ τούτου δεν μπορούμε να εξάγουμε σαφή συμπεράσματα για τους κυτταρικούς και μοριακούς πληθυσμούς που οδηγούν στην ετερότοπη οστεοποίηση, μπορούμε ωστόσο να καταλήξουμε:

1. Μετά την κρανιοεγκεφαλική κάκωση επάγονται μηχανισμοί φλεγμονής. Αυτοί, όπως εμφανίζονται μέσα από τις κυτταροκίνες IL-6, IL-4

δημιουργούν το υπόστρωμα δευτερογενούς βλάβης του ΚΝΣ αλλά και όλου του οργανισμού (second hit).

2. Κυτταρικοί πληθυσμοί με σαφή οστεοβλαστική δραστηριότητα, οι οποίοι ανήκουν στο μονοκυτταρικό αλλά και στο πολυμορφοπυρηνικό κλάσμα από τον πληθυσμό των εμπυρήνων κυττάρων του περιφερικού αίματος επάγονται συνεπεία της τραυματικής αυτής βλάβης (ΚΕΚ).
3. Το σύστημα OPG/sRANKL συμμετέχει κατά τη χρονική περίοδο αμέσως μετά την κρανιοεγκεφαλική περίοδο και πιθανότατα συμμετέχει και στη δημιουργία ΗΟ κατόπιν ΚΕΚ.

Όπως έχει αναφερθεί από το γενικό μέρος της παρούσης εργασίας, η δημιουργία ετερότοπης οστεοποίησης ξεκινά από μία κατάσταση τοπικής φλεγμονώδους εξεργασίας γύρω από μία ή περισσότερες αρθρώσεις. Η φλεγμονή διαρκεί αρκετές εβδομάδες ενώ συνυπάρχει ετερότοπη οστική ανάπτυξη που γίνεται εμφανής μετά το πέρας της φλεγμονώδους εξεργασίας. Το γεγονός ότι βρίσκουμε φλεγμονώδεις μεσολαβητές οι οποίοι είναι αυξημένοι σε κάποια χρονική περίοδο μετά την βλάβη είναι συμβατό με τα προαναφερθέντα. Επιπλέον παρατηρείται σε όλους τους ασθενείς κατόπιν ΚΕΚ.

Συμβατή με τις μέχρι σήμερα θεωρίες για την ανάπτυξη ΗΟ κατόπιν ΚΕΚ είναι και η ανεύρεση αυξημένης οστεοβλαστικής ενεργότητας κυτταρικών πληθυσμών κατόπιν ΚΕΚ. Ο ένας από τους κυτταρικούς πληθυσμούς (CD63) εμφανίζει κορυφή στις 6-10 ημέρες μετά την ΚΕΚ και βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την κορυφή που κάνουν οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που μελετήσαμε.

Ο άλλος κυτταρικός πληθυσμός (κύτταρα θετικά σε οστεοκαλσίνη) από την περίοδο των 6-10 ημερών και για όσο διαρκούν οι μετρήσεις αυξάνεται δείχνοντας ότι η οστεοβλαστική δραστηριότητα συνεχίζεται επί μακρόν.

Οι δε μελέτες στο πειραματικό μοντέλο με τα κουνέλια αποδεικνύουν ότι η οστεοβλαστική δραστηριότητα υπάρχει και εδώ κατόπιν ΚΕΚ, ακολουθεί το ίδιο πρότυπο αύξησης και αποδεικνύει ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στην

ΚΕΚ μια και τα κουνέλια είχαν υποστεί συγκεκριμένο τύπο ΚΕΚ και καμία άλλη βλάβη.

Η οστεοβλαστική δραστηριότητα σε κυτταρικούς πληθυσμούς περιφερικού αίματος είναι κάτι που φυσιολογικά αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εφηβικής περιόδου, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονο οστικό αναβολισμό, όπως έχει δείχθει σε πρόσφατες κλινικές μελέτες (Engbali-Faturechi, et al 2005).

Άρα η ΚΕΚ με την επακόλουθη αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα στο περιφερικό αίμα είναι σίγουρα ένας σημαντικός, αν όχι απαραίτητος, προδιαθεσικός παράγων για δημιουργία ΗΟ. Τι είναι όμως αυτό που καθιστά την ΚΕΚ ικανή συνθήκη για την ΗΟ;

Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να είναι η ανάπτυξη του οστεοβλαστικού πληθυσμού πάνω από ένα κριτικό όριο. Ωστόσο μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν σε αυτή τη βάση, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα.

Γιατί η ΗΟ αναπτύσσεται σε κάποια ή κάποιες αρθρώσεις και όχι σε κάποιες άλλες; Ποιος είναι ο τοπικός παράγων που ευοδώνει τη δημιουργία ΗΟ;

Αυτά είναι δύο καίρια ερωτήματα που η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να απαντήσει.

Προς αυτή την κατεύθυνση θα μπορούσαν να βοηθήσουν:

- Η μελέτη γενετικής αιτιολογίας νόσων που οδηγούν σε ετερότοπη οστεοποίηση, όπως η FOP, τόσο σε ανθρώπους πάσχοντες όσο και σε πειραματικό μοντέλο. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 6 περιπτώσεις FOP σε γάτες. (O'Connor JP et al 1998, Kaplan FS et al 2004, 2005, 2008)
- Η μελέτη ενός εγγύς πεδίου έρευνας που αφορά την ενδαγγειακή ασβεστοποίηση η οποία οδηγεί σε αθηρωματικές αλλοιώσεις αγγείων. Η έρευνα αυτή απασχολεί νεφρολόγους και καρδιολόγους μια και έχει βρεθεί αυξημένη επίπτωση σε χρόνιους νεφροπαθείς. (seminars in dialysis vol 20, 2, 2007 110-112&113-121). Αυτό που δείχνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι διαλυτοί παράγοντες που έχουν

ανιχνευθεί ότι συμμετέχουν στην ενδαγγειακή ασβεστοποίηση όπως οι ιντερλευκίνες, η matrix GLA protein (MPG) το σύστημα OPG/sRANKL και τα διφωσφονικά επηρεάζουν και τη δημιουργία ετερότοπης οστεοποίησης. Αυτό ίσως αναδεικνύει κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς μεταξύ των δύο φαινομένων.

- Επιπλέον έρευνα σε γονίδια που ελέγχουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο RUNX2, ο οποίος φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ρόλο στην ωρίμανση των οστεοβλαστών. Ο παράγων αυτός φαίνεται να είναι μεσολαβητής σε πολλές οστεοβλαστικές δραστηριότητες που επηρεάζονται από τις BMP's, τον FGF-2, την παραθορμόνη και την αυξητική ορμόνη. Αυτός ο μεταγραφικός παράγων, ο οποίος ανακαλύφθηκε κατά την έρευνα για ανεύρεση ειδικών για τους οστεοβλάστες μεταγραφικούς παράγοντες, θεωρείται ότι ρυθμίζει το σχηματισμό οστών και τη διαφοροποίηση προδρόμων μεσεγχυματικών πολυδύναμων κυττάρων σε οστεοβλάστες. Επομένως, πιθανή δυσλειτουργία του θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία HO. (Ziros PG et al 2008, Ziros PG et al 2002)
- Αναμφισβήτητα η Ετερότοπη Οστεοποίηση είναι μία μεταβολικά απαιτητική διαδικασία και η νεοαγγείωση της προς οστεοποίηση περιοχής είναι απαραίτητη για την δημιουργία νέου οστίτη ιστού. Από την άλλη πλευρά τοπική ή γενικευμένη υποξία σαν αποτέλεσμα αιμοδυναμικής αστάθειας έχουν θεωρηθεί προδιαθεσικός παράγων ανάπτυξης HO. Σε αυτήν την περίπτωση άλλος ένας μεταγραφικός παράγων μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο. Αυτός είναι ο Hypoxia Induced Factor (HIF), ο οποίος είτε σαν διμερές HIF2α, είτε σαν ετεροδιμερές HIF1α-HIF2α, έχει αποδειχθεί ότι προάγει τη νεοαγγείωση σε ειδικούς όγκους (Χονδροσαρκώματα) (Kubo T et al 2008)
- Τα πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε προς οστεοπαραγωγά κύτταρα είτε προς λιποκύτταρα είτε προς χονδροκύτταρα. Στο πρώιμο στάδιο της

οστεογένεσης έχουν παρατηρηθεί σαφείς διαφοροποιήσεις κάποιων MSC προς τη νευρική σειρά κυττάρων (Wenisch S et al 2006). Επίσης έχει πρόσφατα αναδειχθεί η αισθητική απονεύρωση ως παράγων καθυστερημένης οστικής πώρωσης (Apel P et al 2009). Το γεγονός αυτό θα πρέπει να μας κατευθύνει και προς τη μελέτη παραγόντων νευρικής διαφοροποίησης όπως ο NGF.

Συμπερασματικά, Σκοπός της έρευνάς μας ήταν η μελέτη της μοριακής παθοφυσιολογίας της δημιουργίας ΗΟ. Αναδείχθηκαν βιοχημικές τροποποιήσεις της ετερότοπης οστικής δομής και αναδείχθηκαν μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που επάγονται κατόπιν ΚΕΚ.

Για πρώτη φορά αναδείχθηκαν συγκεκριμένες βιοχημικές τροποποιήσεις του ετερότοπου οστού, οι οποίες αφορούσαν ποσοτικές διαφοροποιήσεις τόσο των γλυκοζαμινογλυκανών όσο και των πρωτεογλυκανών και πιθανότατα σχετίζονται με διαφορετική ενζυμική δραστηριότητα ή διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια δημιουργίας ετερότοπου οστού. Αναδείχθηκε ότι η επικρατούσα μορφή Γλυκοπρωτεΐνης στο ετερότοπο οστό είναι η θειική χονδροϊτίνη. Η επικρατούσα μορφή δισακχαρίτη ακολουθεί το 6-πρότυπο θείωσης και όχι το 4-πρότυπο θείωσης όπως μέχρι σήμερα πιστευόταν. Τα επίπεδα έκφρασης της αγγρικάνης είναι χαμηλότερα σε σχέση με το φυσιολογικό οστό ενώ αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης της διακοσμητίνης είναι υψηλότερα στο ετερότοπο οστό σε αντιδιαστολή με το φυσιολογικό.

Στο επίπεδο των κυτταρικών πληθυσμών, αμέσως μετά την ΚΕΚ παρατηρείται αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα, όπως αυτή απεικονίζεται μέσω των πληθυσμών CD-63 (+) και osteocalcin (+). Αναδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο η συστηματική και όχι μόνο η τοπική (δηλ. στις περιοχές δημιουργίας ΗΟ), οστεοεπαγωγή. Αυτό αναδεικνύεται και μέσω του συστήματος osteoprotegerin-sRANKL.

Μελλοντικά πειράματα θα πρέπει να εστιάσουν στην απομόνωση και μελέτη οστεοβλαστικής σειράς κυττάρων κατόπιν επιδράσεως διαλυτών

παραγόντων όπως προαναφέρθηκε, σε κυτταροκαλλιέργειες, ώστε να διερευνηθούν η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση ως απόρροια της διαφορετικής γονιδιακής έκφρασής τους.

Περίληψη

Η ετερότοπη οστεοποίηση είναι ένα όχι σπάνιο φαινόμενο που οδηγεί σε δημιουργία οστικών δομών σε σημεία που φυσιολογικά υπάρχουν μαλακά μόρια. Ετερότοπη οστεοποίηση μπορεί να προκληθεί κατόπιν τοπικού τραύματος, κατόπιν νευρολογικού τραύματος, ύστερα από χειρουργική επέμβαση σε περιοχές όπως τα ισχία και οι αγκώνες, λόγω γενετικού υποστρώματος σε ασθενείς πολύ μικρών ηλικιών και τέλος αντιδραστικές ετερότοπες οστεοοποιήσεις άνω ή κάτω άκρων.

Στην παρούσα διατριβή προσεγγίστηκε η νευρογενούς αιτιολογίας ετερότοπη οστεοποίηση, κυρίως κατόπιν ΚΕΚ. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός του φαινομένου είναι εν πολλοίς άγνωστος και αυτό που θεωρείται δεδομένο είναι η διαταραχή του ισοζυγίου οστεοβλαστικής – οστεοκλαστικής δραστηριότητας κατόπιν της δράσης του επαγωγικού παράγοντα.

Ύστερα από τη δράση του επαγωγικού παράγοντα –στη συγκεκριμένη περίπτωση της ΚΕΚ – αυξάνεται η οστεοβλαστική δραστηριότητα τοπικά. Κατά το σχηματισμό του οστού λοιπόν, παράγονται και εκκρίνονται πρωτεογλυκάνες στις αλυσίδες των οποίων προσκολλώνται οι γλυκοζαμινογλυκάνες. Πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες συναποτελούν μαζί με τις κολλαγονικές και μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, τα τρία κύρια είδη μακρομορίων του εξωκυττάριου δικτύου του οστού.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν αφενός η μελέτη των πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών στο ετερότοπο οστό σε αντιδιαστολή με φυσιολογικό-ορθότοπο οστό προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην δημιουργία του φαινομένου της ετρότοπης οστεοποίησης. Αφετέρου για να διερευνηθεί καλύτερα ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός του φαινομένου, μελετήθηκαν κυτταρικοί πληθυσμοί με οστεοβλαστική δραστηριότητα στο περιφερικό αίμα ασθενών που είχαν υποστεί ΚΕΚ και νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ, καθώς και πειραματοζώων κατόπιν τεχνητής επαγωγής Κρανιοεγκεφαλικής Βλάβης.

Η θειική χονδροϊτίνη και το υαλουρονικό οξύ είναι οι μοναδικοί τύποι γλυκοζαμινογλυκανών στο εξωκυττάριο δίκτυο ετερότοπου οστού όπως και

στο φυσιολογικό. Εντούτοις, το ολικό ποσό τους είναι κατά 70% μικρότερο σε σύγκριση με αυτό του φυσιολογικού οστού. Διαφορετική είναι και η εκατοστιαία αναλογία αυτών των μακρομορίων. Η επικρατούσα μορφή δισακχαρίτη θειικής χονδροϊτίνης είναι η θειωμένη στην θέση 6. Ωστόσο η ποσοτική διαφοροποίηση από το φυσιολογικό οστό τόσο στους 4 θειωμένους όσο και στους μη θειωμένους δισακχαρίτες είναι υπαρκτή σε όλα τα ετερότοπα δείγματα. Από πλευράς πρωτεογλυκανών η αγγρικάνη και η διακοσμητίνη είναι ποιοτικά παρούσες στο εξωκυττάριο δίκτυο οστίτη ιστού. Επομένως, ποσοτικές διαφοροποιήσεις στο ετερότοπο οστό σε αντιδιαστολή με το φυσιολογικό είναι υπαρκτές και αυτή η διαφοροποίηση πιθανώς αντικατοπτρίζει διαφορετικές ενζυμικές δραστηριότητες στο φαινόμενο της ετερότοπης οστεοποίησης.

Στη μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών με οστεοβλαστική δραστηριότητα στο περιφερικό αίμα διαπιστώνονται τα ακόλουθα: Αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα στους πληθυσμούς CD-63(+) η οποία εμφανίζει κορυφή στις 6-10 ημέρες μετά την ΚΕΚ. Αυξανόμενη οστεοβλαστική δραστηριότητα πληθυσμών κυττάρων osteocalcin (+) σε όλες τις μετρήσεις μετά την ΚΕΚ.

Το σύστημα οστεοπροτεγερίνης – sRANKL εμφανίζει τα εξής χαρακτηριστικά: η osteoprotegerin είναι μετρήσιμη και αυξάνει προς το τέλος των μετρήσεων. Το sRANKL απεναντίας δεν είναι μετρήσιμο σε καμία χρονική στιγμή κατόπιν της ΚΕΚ.

Τα παραπάνω συνεπάγονται ότι η ΚΕΚ είναι παράγων επαγωγής οστεοβλαστικής δραστηριότητας όχι μόνο τοπικά αλλά και συστηματικά. Η εκτροπή της οστεοβλαστικής δραστηριότητας προς δημιουργία ετερότοπης οστεοποίησης χρήζει μελέτης μεγαλύτερου δείγματος ασθενών και πιθανότατα και σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης κυτταρικών καλλιιεργειών ασθενών κατόπιν ΚΕΚ.

Abstract

Heterotopic ossification is a relatively frequent phenomenon that leads to the formation of heterotopic osseous structures at points where soft molecules normally do exist. Heterotopic ossification can be induced after local lesion, neurological lesion, after surgical intervention in regions as the hips and the elbows, due to genetic causes in patients of very small ages and, finally, the phenomenon has been observed as distinct, reactive cases in upper or lower limbs.

In this Thesis, pathophysiology and mechanisms of neurogenic heterotopic ossification were studied. Pathways of the phenomenon still unknown to date. What is thought to be the case in the formation of HO, is the disturbance of balance of osteoblastic to osteoclastic activities, after the induction-Head injury in this situation.

After Traumatic Brain Injury, osteoblastic activity is induced locally. During bone formation proteoglycans are produced and secreted. Glucosaminoglycans are attached on the side chains of Proteoglycans. Proteoglycans and Glycosaminoglycans constitute along with collagenous and non-collagenous proteins the major macromolecules of extracellular matrix.

The purpose of our study was the characterization of proteoglycans and glycosaminoglycans of the heterotopic bone versus the normotopic bone towards the elucidation of their role in the heterotopic bone formation. On the other hand, a more detailed approach to the pathophysiology of the phenomenon requires cellular populations expressing osteoblastic activities to be observed and studied. This is done in peripheral blood of patients that had sustained traumatic brain injuries and being hospitalized within IC units. Same studies on cellular populations have been conducted in a rabbit animal model of traumatic brain injury.

Chondroitin-Sulfate and Hyaluronate are the only glycosaminoglycans that have been observed in extracellular matrix of heterotopic bone as well as in normotopic one. Quantitative analyses, however, revealed that their total amount is 70% less compared to normotopic bone. The commonest form of

dissacharites of chondroitin-sulfate is the one sulfated at 6-O. However, there is a significant quantitative difference between normotopic and heterotopic bone in 4-O sulfated as well as in non sulfated dissacharites. With regards to proteoglycans, aggrecan and decorin are present in extracellular matrix. Quantitative differences between normotopic and heterotopic bone do exist and reflect a possible alternative pathway of bone formation in the HO phenomenon.

The studies on osteoblastic activities of peripheral blood after traumatic brain injury revealed that there is increased osteoblastic activity in CD-63 (+) population that peaks 6-10 days after the inciting event. Osteocalcin (+) population do exhibit increased osteoblastic activity as well which increases along with time.

The system osteoprotegerin - sRANKL presents the following characteristics: osteoprotegerin is measurable and increases towards the end of measurements. sRANKL on the contrary is not measurable at any time following traumatic brain injury.

Consequently, Traumatic Brain Injury do induce osteoblastic activity not only locally but also systemically. The deviation of osteoblastic activity towards heterotopic ossification requires studies of bigger sample of patients, probably to the level of differential gene expression of cellular cultures derived from patients having sustained neurotrauma.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- (1) Aarabi B, Simard JM. Traumatic brain injury. Curr Opin Crit Care 2009 Dec;15(6):548-53.
- (2) Abramson D, Scalea TM, Hitchcock R, Trooskin SZ, Henry SM, Greenspan J. Lactate clearance and survival following injury. J Trauma 1993 Oct;35(4):584-8.
- (3) Ahn J, Serrano dIP, Shore EM, Kaplan FS. Paresis of a bone morphogenetic protein-antagonist response in a genetic disorder of heterotopic skeletogenesis. J Bone Joint Surg Am 2003 Apr;85-A(4):667-74.
- (4) Apel PJ, Crane D, Northam CN, Callahan M, Smith TL, Teasdall RD. Effect of selective sensory denervation on fracture-healing: an experimental study of rats. J Bone Joint Surg Am 2009 Dec;91(12):2886-95.
- (5) Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Cell Calcium 2003 Oct;34(4-5):325-37.
- (6) Balboni TA, Gobeze R, Mamon HJ. Heterotopic ossification: Pathophysiology, clinical features, and the role of radiotherapy for prophylaxis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006 Aug 1;65(5):1289-99.
- (7) Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. Crit Care 2003 Oct;7(5):359-73.
- (8) Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? Mol Med 2008 Nov;14(11-12):731-40.

- (9) Bell RS, Vo AH, Neal CJ, Tigno J, Roberts R, Mossop C, et al. Military traumatic brain and spinal column injury: a 5-year study of the impact blast and other military grade weaponry on the central nervous system. J Trauma 2009 Apr;66(4 Suppl):S104-S111.
- (10) Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol 2004 Feb;202(2):145-56.
- (11) Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, et al. Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. J Biol Chem 2005 Aug 26;280(34):30481-9.
- (12) Botte MJ, Keenan MA, Abrams RA, von Schroeder HP, Gellman H, Mooney V. Heterotopic ossification in neuromuscular disorders. Orthopedics 1997 Apr;20(4):335-41.
- (13) Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. Blood 1992 Dec 1;80(11):2920-4.
- (14) Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH, Jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. J Bone Joint Surg Am 1973 Dec;55(8):1629-32.
- (15) Buzdon MM, Napolitano LM, Shi HJ, Ceresoli DM, Rauniya R, Bass BL. Femur fracture induces site-specific changes in T-cell immunity. J Surg Res 1999 Apr;82(2):201-8.
- (16) Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of

- IL-8 triggered by lipopolysaccharide. J Exp Med 1993 Dec 1;178(6):2207-11.
- (17) Cernak I, Savic J, Ignjatovic D, Jevtic M. Blast injury from explosive munitions. J Trauma 1999 Jul;47(1):96-103.
- (18) Charters AC, III, Charters AC. Wounding mechanism of very high velocity projectiles. J Trauma 1976 Jun;16(6):464-70.
- (19) Claassen H, Cellarius C, Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J, Gluer CC, Schunke M, et al. Extracellular matrix changes in knee joint cartilage following bone-active drug treatment. Cell Tissue Res 2006 May;324(2):279-89.
- (20) Collighan N, Giannoudis PV, Kourgeraki O, Perry SL, Guillou PJ, Bellamy MC. Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. Br J Surg 2004 Jun;91(6):762-8.
- (21) Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. Blood 1992 Oct 15;80(8):2012-20.
- (22) Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. Am J Physiol 1996 Oct;271(4 Pt 1):L566-L571.
- (23) Davis JW, Parks SN, Kaups KL, Gladen HE, O'Donnell-Nicol S. Admission base deficit predicts transfusion requirements and risk of complications. J Trauma 1996 Nov;41(5):769-74.
- (24) Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature 1995 Feb 2;373(6513):438-41.

- (25) Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005 Dec;36(12):1392-404.
- (26) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000 Aug;118(2):503-8.
- (27) Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000 May;32(4):274-8.
- (28) el Hassan BS, Peak JD, Whicher JT, Shepherd JP. Acute phase protein levels as an index of severity of physical injury. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1990 Dec;19(6):346-9.
- (29) Egli S, Woo A. Risk factors for heterotopic ossification in total hip arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001 Oct;121(9):531-5.
- (30) Ertel W, Keel M, Steckholzer U, Ungethum U, Trentz O. Interleukin-10 attenuates the release of proinflammatory cytokines but depresses splenocyte functions in murine endotoxemia. *Arch Surg* 1996 Jan;131(1):51-6.
- (31) Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R, et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998 Jul;101(7):520-6.
- (32) Ertel W, Keel M, Buergi U, Hartung T, Imhof HG, Trentz O. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. *J Trauma* 1999 May;46(5):784-92.
- (33) Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4(1):30-5.
- (34) Feldman G, Li M, Martin S, Urbanek M, Urtizberea JA, Fardeau M, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva, a heritable disorder of severe

heterotopic ossification, maps to human chromosome 4q27-31. *Am J Hum Genet* 2000 Jan;66(1):128-35.

- (35) Fisher LW, Schraer H. Keratan sulfate proteoglycan isolated from the estrogen-induced medullary bone in Japanese quail. *Comp Biochem Physiol B* 1982;72(2):227-32.
- (36) Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop Relat Res* 2005 Mar;(432):14-33.
- (37) Furia JP, Pellegrini VD, Jr. Heterotopic ossification following primary total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 1995 Aug;10(4):413-9.
- (38) Gaggero E, Gangji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 1998 Dec 15;102(12):2106-14.
- (39) Gosling P, Dickson GR. Serum c-reactive protein in patients with serious trauma. *Injury* 1992;23(7):483-6.
- (40) Hannallah D, Peng H, Young B, Usas A, Gearhart B, Huard J. Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am* 2004 Jan;86-A(1):80-91.
- (41) Harwin SF, Stein AJ, Stern RE, Kulick RG. Heterotopic ossification following primary total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 1993 Apr;8(2):113-6.
- (42) Heagy W, Hansen C, Nieman K, Rodriguez JL, West MA. Impaired mitogen-activated protein kinase activation and altered cytokine secretion in endotoxin-tolerant human monocytes. *J Trauma* 2000 Nov;49(5):806-14.

- (43) Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003;4(2):171-80.
- (44) Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D. Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 2004 Feb 20;279(8):6286-95.
- (45) Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 2002 May;52(5):962-70.
- (46) Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg* 1998 Jul;85(7):884-90.
- (47) Hoge CW, McGurk D, Thomas JL, Cox AL, Engel CC, Castro CA. Mild traumatic brain injury in U.S. Soldiers returning from Iraq. *N Engl J Med* 2008 Jan 31;358(5):453-63.
- (48) Hoge CW, McGurk D, Thomas JL, Cox AL, Engel CC, Castro CA. Mild traumatic brain injury in U.S. Soldiers returning from Iraq. *N Engl J Med* 2008 Jan 31;358(5):453-63.
- (49) Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999 Jul;27(7):1230-51.

- (50) Hu Z, Li Y, Fang M, Wai MS, Yew DT. Exogenous progesterone: a potential therapeutic candidate in CNS injury and neurodegeneration. *Curr Med Chem* 2009;16(11):1418-25.
- (51) Huttenlocher A, Werb Z, Tremble P, Huhtala P, Rosenberg L, Damsky CH. Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin. *Matrix Biol* 1996 Sep;15(4):239-50.
- (52) Iorio R, Healy WL. Heterotopic ossification after hip and knee arthroplasty: risk factors, prevention, and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 2002 Nov;10(6):409-16.
- (53) Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52.
- (54) Kaplan FS, Craver R, MacEwen GD, Gannon FH, Finkel G, Hahn G, et al. Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *J Bone Joint Surg Am* 1994 Mar;76(3):425-36.
- (55) Kaplan FS, Glaser DL, Hebel N, Shore EM. Heterotopic ossification. *J Am Acad Orthop Surg* 2004 Mar;12(2):116-25.
- (56) Kaplan FS, Xu M, Glaser DL, Collins F, Connor M, Kitterman J, et al. Early diagnosis of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Pediatrics* 2008 May;121(5):e1295-e1300.
- (57) Kaplan FS, Xu M, Feldman G, Brown M, Cho TJ, Choi IH, et al. Response to "Mutations of the NOGGIN and of the activin A type I receptor genes in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)" by Lucotte et al. *Genet Couns* 2008;19(3):357-9.

- (58) Kaplan FS, Shen Q, Lounev V, Seemann P, Groppe J, Katagiri T, et al. Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Metab* 2008;26(6):521-30.
- (59) Kaplan FS, Le MM, Glaser DL, Pignolo RJ, Goldsby RE, Kitterman JA, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008 Mar;22(1):191-205.
- (60) Kaplan FS, Pignolo RJ, Shore EM. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009 Oct;20(5-6):399-407.
- (61) Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, Carroll L, et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Hum Mutat* 2009 Mar;30(3):379-90.
- (62) Karamanos NK, Lamari F. State-of-the-art of capillary electrophoresis with application to the area of glycoconjugates. *Biomed Chromatogr* 1999 Dec;13(8):501-6.
- (63) Karamanos NK, Hjerpe A. Strategies for analysis and structure characterization of glycans/proteoglycans by capillary electrophoresis. Their diagnostic and biopharmaceutical importance. *Biomed Chromatogr* 1999 Dec;13(8):507-12.
- (64) Keel M, Schregenberger N, Steckholzer U, Ungethum U, Kenney J, Trentz O, et al. Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *J Trauma* 1996 Sep;41(3):430-7.
- (65) Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005 Jun;36(6):691-709.

- (66) Kjaersgaard-Andersen P, Pedersen P, Kristensen SS, Schmidt SA, Pedersen NW. Serum alkaline phosphatase as an indicator of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 1988 Sep;(234):102-9.
- (67) Kjaersgaard-Andersen P, Schmidt SA, Pedersen NW, Kristensen SS, Pedersen P. Erythrocyte sedimentation rate and heterotopic bone formation after cemented total hip arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 1989 Nov;(248):189-94.
- (68) Kjaersgaard-Andersen P, Ritter MA. Prevention of formation of heterotopic bone after total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 1991 Jul;73(6):942-7.
- (69) Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. Annu Rev Biochem 1991;60:443-75.
- (70) Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, et al. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. J Cereb Blood Flow Metab 1997 Mar;17(3):280-9.
- (71) Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, et al. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. J Cereb Blood Flow Metab 1997 Mar;17(3):280-9.
- (72) Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. J Bone Joint Surg Br 2008 Mar;90(3):364-70.

- (73) Laird AM, Miller PR, Kilgo PD, Meredith JW, Chang MC. Relationship of early hyperglycemia to mortality in trauma patients. J Trauma 2004 May;56(5):1058-62.
- (74) Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. Bioessays 2007 Aug;29(8):758-71.
- (75) Landon GC, Johnson KA, Dahlin DC. Subungual exostoses. J Bone Joint Surg Am 1979 Mar;61(2):256-9.
- (76) Lechner A, Schutze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F. The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. Bone 2000 Jul;27(1):53-60.
- (77) Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. J Exp Med 1996 Mar 1;183(3):721-4.
- (78) Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. Mol Neurobiol 2001 Aug;24(1-3):169-81.
- (79) Ling G, Bandak F, Armonda R, Grant G, Ecklund J. Explosive blast neurotrauma. J Neurotrauma 2009 Jun;26(6):815-25.
- (80) Ling GS, Marshall SA. Management of traumatic brain injury in the intensive care unit. Neurol Clin 2008 May;26(2):409-26, viii.
- (81) Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. Ann Surg 1997 Oct;226(4):450-8.
- (82) Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. Crit Care Med 2000 Apr;28(4 Suppl):N105-N113.

- (83) Maloney WJ, Krushell RJ, Jasty M, Harris WH. Incidence of heterotopic ossification after total hip replacement: effect of the type of fixation of the femoral component. J Bone Joint Surg Am 1991 Feb;73(2):191-3.
- (84) Mania VM, Kallivokas AG, Malavaki C, Asimakopoulou AP, Kanakis J, Theocharis AD, et al. A comparative biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in human orthotopic and heterotopic bone. IUBMB Life 2009 Apr;61(4):447-52.
- (85) Margulies S, Hicks R. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations. J Neurotrauma 2009 Jun;26(6):925-39.
- (86) Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma . Crit Care Med 1997 Nov;25(11):1813-9.
- (87) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003 Apr 17;348(16):1546-54.
- (88) Martin TR. Cytokines and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a question of balance. Nat Med 1997 Mar;3(3):272-3.
- (89) McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. Skeletal Radiol 2005 Oct;34(10):609-19.
- (90) Melamed E, Robinson D, Halperin N, Wallach N, Keren O, Groswasser Z. Brain injury-related heterotopic bone formation: treatment strategy and results. Am J Phys Med Rehabil 2002 Sep;81(9):670-4.
- (91) Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, et al. Production of cytokines following brain injury:

beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry* 1997 Mar;2(2):133-6.

- (92) Neff MJ. The epidemiology and definition of the acute respiratory distress syndrome. *Respir Care Clin N Am* 2003 Sep;9(3):273-82.
- (93) Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuem U, Trentz O, et al. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997 May;42(5):863-70.
- (94) Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 2000 May;48(5):932-7.
- (95) Olivier S, Karine F, Christian D, Carmen A, Gérard L. Identification of three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *American Journal of Medical Genetics* 2000 Nov 11.
- (96) Pai VS. Heterotopic ossification in total hip arthroplasty. The influence of the approach. *J Arthroplasty* 1994 Apr;9(2):199-202.
- (97) Parisi DM, Koval K, Egol K. Fat embolism syndrome. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2002 Sep;31(9):507-12.
- (98) Perel P, Arango M, Clayton T, Edwards P, Komolafe E, Poccock S, et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: practical prognostic models based on large cohort of international patients. *BMJ* 2008 Feb 23;336(7641):425-9.
- (99) Poole NA, Agrawal N. Cholinomimetic agents and neurocognitive impairment following head injury: a systematic review. *Brain Inj* 2008 Jul;22(7-8):519-34.

- (100) Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. Shock 2002 Sep;18(3):197-211.
- (101) Prince CW, Rahemtulla F, Butler WT. Metabolism of rat bone proteoglycans in vivo. Biochem J 1983 Dec 15;216(3):589-96.
- (102) Rader CP, Barthel T, Haase M, Scheidler M, Eulert J. Heterotopic ossification after total knee arthroplasty. 54/615 cases after 1-6 years' follow-up. Acta Orthop Scand 1997 Feb;68(1):46-50.
- (103) Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. JAMA 1995 Jan 11;273(2):117-23.
- (104) Reddi AH. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited. Clin Orthop Relat Res 1995 Apr;(313):115-9.
- (105) Rensing H, Bauer M. [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. Anaesthesist 2001 Nov;50(11):819-41.
- (106) Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. Spine (Phila Pa 1976) 2007 Nov 1;32(23):2537-44.
- (107) Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, et al. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. Crit Care Med 1995 Mar;23(3):474-80.
- (108) Saver JL. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. Rev Neurol Dis 2008;5(4):167-77.

- (109) Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev* 2005 Apr;48(2):388-99.
- (110) Schneiderman AI, Braver ER, Kang HK. Understanding sequelae of injury mechanisms and mild traumatic brain injury incurred during the conflicts in Iraq and Afghanistan: persistent postconcussive symptoms and posttraumatic stress disorder. *Am J Epidemiol* 2008 Jun 15;167(12):1446-52.
- (111) Schroder O, Laun RA, Held B, Ekkernkamp A, Schulte KM. Association of interleukin-10 promoter polymorphism with the incidence of multiple organ dysfunction following major trauma: results of a prospective pilot study. *Shock* 2004 Apr;21(4):306-10.
- (112) Semonin O, Fontaine K, Daviaud C, Ayuso C, Lucotte G. Identification of three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Am J Med Genet* 2001 Sep 1;102(4):314-7.
- (113) Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, Muenke M, et al. Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 1996 Aug 22;335(8):555-61.
- (114) Siegel JH, Gens DR, Mamantov T, Geisler FH, Goodarzi S, MacKenzie EJ. Effect of associated injuries and blood volume replacement on death, rehabilitation needs, and disability in blunt traumatic brain injury. *Crit Care Med* 1991 Oct;19(10):1252-65.
- (115) Simard JM, Kilbourne M, Tsymbalyuk O, Tosun C, Caridi J, Ivanova S, et al. Key role of sulfonyleurea receptor 1 in progressive secondary hemorrhage after brain contusion. *J Neurotrauma* 2009 Dec;26(12):2257-67.

- (116) Simard JM, Kilbourne M, Tsymbalyuk O, Tosun C, Caridi J, Ivanova S, et al. Key role of sulfonyleurea receptor 1 in progressive secondary hemorrhage after brain contusion. *J Neurotrauma* 2009 Dec;26(12):2257-67.
- (117) Simonaro CM, D'Angelo M, He X, Eliyahu E, Shtraizent N, Haskins ME, et al. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol* 2008 Jan;172(1):112-22.
- (118) Siren AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 2009 Jan;6(1):108-27.
- (119) Smith AJ, Singhrao SK, Newman GR, Waddington RJ, Embury G. A biochemical and immuno-electron microscopical analysis of chondroitin sulphate-rich proteoglycans in human alveolar bone. *Histochem J* 1997 Jan;29(1):1-9.
- (120) Sosin DM, Sacks JJ, Smith SM. Head injury-associated deaths in the United States from 1979 to 1986. *JAMA* 1989 Oct 27;262(16):2251-5.
- (121) Stein DG, Wright DW, Kellermann AL. Does progesterone have neuroprotective properties? *Ann Emerg Med* 2008 Feb;51(2):164-72.
- (122) Stoica B, Byrnes K, Faden AI. Multifunctional drug treatment in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 2009 Jan;6(1):14-27.
- (123) Stover SL, Niemann KM, Miller JM, III. Disodium etidronate in the prevention of postoperative recurrence of heterotopic ossification in spinal-cord injury patients. *J Bone Joint Surg Am* 1976 Jul;58(5):683-8.

- (124) Sugimoto K, Hirata M, Majima M, Katori M, Ohwada T. Evidence for a role of kallikrein-kinin system in patients with shock after blunt trauma. *Am J Physiol* 1998 Jun;274(6 Pt 2):R1556-R1560.
- (125) Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993 Aug 15;294 (Pt 1):271-8.
- (126) Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 1994 Dec 23;269(51):32634-8.
- (127) Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.
- (128) Texereau J, Pene F, Chiche JD, Rousseau C, Mira JP. Importance of hemostatic gene polymorphisms for susceptibility to and outcome of severe sepsis. *Crit Care Med* 2004 May;32(5 Suppl):S313-S319.
- (129) Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965 Nov 12;150(698):893-9.
- (130) Vink R, Nimmo AJ. Multifunctional drugs for head injury. *Neurotherapeutics* 2009 Jan;6(1):28-42.
- (131) Waddington RJ, Embery G, Last KS. Glycosaminoglycans of human alveolar bone. *Arch Oral Biol* 1989;34(7):587-9.
- (132) Wahlstrom K, Bellingham J, Rodriguez JL, West MA. Inhibitory kappaB control of nuclear factor-kappaB is dysregulated in endotoxin tolerant macrophages. *Shock* 1999 Apr;11(4):242-7.
- (133) Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human

monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. J Biol Chem 1995 Apr 21;270(16):9558-63.

- (134) Wendel M, Sommarin Y, Heinegard D. Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteoaderin) from bovine bone. J Cell Biol 1998 May 4;141(3):839-47.
- (135) Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V, et al. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. Bone 2006 Jun;38(6):911-21.
- (136) West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. Crit Care Med 2002 Jan;30(1 Suppl):S64-S73.
- (137) Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, Timpl R, Morgelin M. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. J Biol Chem 2002 Dec 20;277(51):49120-6.
- (138) Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegard D, et al. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. J Biol Chem 2003 Sep 26;278(39):37698-704.
- (139) Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. Crit Care Med 1998 Aug;26(8):1372-8.
- (140) Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. Expert Opin Emerg Drugs 2009 Mar;14(1):67-84.
- (141) Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancellotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N, Jr., et al. Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury

and bacterial translocation after hemorrhagic shock. Shock 2000 Dec;14(6):594-8.

(142) Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem 1992 May 15;267(14):9451-4.

(143) Yanagishita M. [Function of proteoglycans in the extracellular matrix]. Kokubyo Gakkai Zasshi 1997 Jun;64(2):193-204.

(144) Zambrano E, Nose V, Perez-Atayde AR, Gebhardt M, Hresko MT, Kleinman P, et al. Distinct chromosomal rearrangements in subungual (Dupuytren) exostosis and bizarre parosteal osteochondromatous proliferation (Nora lesion). Am J Surg Pathol 2004 Aug;28(8):1033-9.

(145) Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. Crit Care Med 2002 May;30(5 Suppl):S294-S301.

(146) Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. J Biol Chem 2002 Jun 28;277(26):23934-41.

(147) Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. Int J Biochem Cell Biol 2008;40(9):1659-63.

ONLINE ΠΗΓΕΣ ΑΝΑΦΟΡΩΝ

(1) EMEDICINE ONLINE JOURNAL (www.emedicine.com)