



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΛΟΓΩΝ  
ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ  
(PLATELET RICH PLASMA) ΣΕ ΜΕΣΟΣΠΟΝΔΥΛΙΟ ΔΙΣΚΟ:  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ν. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΥ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Ημερομηνία αίτησης του κ. Χριστοφόρου Γεωργίου: 18-12-2009**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 677<sup>α</sup>/9-2-2010**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ξενάκης Θεόδωρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής

Μέλη

Σάπκας Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Παν/μίου Αθηνών

Γελαλής Ιωάννης Λέκτορας Ορθοπαιδικής

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-3-2010**

*«Μελέτη της αναγεννητικής δράσης των αυτόλογων αυξητικών παραγόντων (platenet rich plasma) σε μεσοσπονδύλιο δίσκο: πειραματικό μοντέλο σε κονίκλους».*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 786<sup>α</sup>/29-3-2016**

1. Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κορομπίλιας Αναστάσιος Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ξενάκης Θεόδωρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Σάπκας Γεώργιος Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών
5. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γελαλής Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Χειρουργική Σπονδυλικής Στήλης και Επανορθωτική Χειρουργική Ενηλίκων του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χαρχαντή Αντωνία Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας με έμφαση στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-6-2016**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Πασχόπουλος Μηνάς**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



**Προϊσταμένης του Τμήματος**

**ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΔΟΥ ΜΑΡΙΑ**

Η παρούσα διατριβή αποτελεί το αποτέλεσμα μιας μακρόχρονης προσπάθειας. Στο εγχείρημα αυτό συμμετείχε μια ομάδα ανθρώπων, που με τη γνώση και την εμπειρία τους βοήθησαν ο καθένας στον τομέα του. Η όλη προσπάθεια εστιάστηκε στη διερεύνηση της εκφύλισης του δίσκου ως μια πολυπαραγοντική διαδικασία και στις σημερινές δυνατότητες θεραπευτικής προσέγγισης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Θεόδωρο Ξενάκη, κ. Σάπκα Γεώργιο και κ. Γελαλή Ιωάννη για τη βοήθεια τους. Τον κ. Ξενάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό και ιδιαίτερος τον κ. Γελαλή καθώς ο ρόλος του ήταν καταλυτικός. Χωρίς τις συμβουλές και την επιμονή του, η προσπάθεια αυτή δε θα είχε ολοκληρωθεί.

Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους Ορθοπαιδικούς κα. Αρναούτογλου Χριστίνα, κ. Πάκο Αιμίλιο και κ. Μήτσιου Διαμαντή για τη βοήθεια τους στη φάση του πειράματος καθώς και τον κτηνίατρο κ. Κοσμά Παναγιώτη.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή της παθολογοανατόμου κα. Χαρχαντή Αντωνίας για την ολοκλήρωση της διαδικασίας και της κα Άννας Γούσια στα αρχικά στάδια.

Αφιερώνω στη γυναίκα μου Αντωνία για την αγάπη και την υπομονή της.

## Πίνακας περιεχομένων

|   |   |
|---|---|
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....   | 3                                       |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 4                                       |
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....   | 5                                       |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ανατομία και Φυσιολογία του μεσοσπονδύλιου δίσκου</b> .....            | 6                                       |
| 1.1 Ανατομία.....   | 6                                       |
| 1.2. Φυσιολογία.....  | 15                                      |
| 1.2.1 Χόνδρινες τελικές πλάκες .....  | 17                                      |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου</b> .....                           | 18                                      |
| 2.1 Συνοπτικά οι αυξητικοί παράγοντες και η δράση τους στο δίσκο .....                | 25                                      |
| 2.2 Κήλη μεσοσπονδύλιου δίσκου.....   | 27                                      |
| 2.3 Κοινωνικοδημογραφικοί παράγοντες στην εκφύλιση του δίσκου .....                   | 28                                      |
| 2.4 Ζωικά μοντέλα εκφύλισης δίσκου .....  | 30                                      |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην εκφύλιση του δίσκου</b> ..... | 32                                      |
| 3.1.Αιμοπετάλια .....   | 32                                      |
| 3.1.1 Η λειτουργία των αιμοπεταλίων.....  | 35                                      |
| 3.2.Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma-PRP).....                     | 38                                      |
| 3.2.1 Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων των αιμοπεταλίων στην επούλωση των ιστών ..... | 40                                      |
| 3.2.2 Εφαρμογές και περιορισμοί.....  | 41                                      |
| 3.3 Γονιδιακές θεραπείες.....   | 46                                      |
| 3.4 Χρήση βλαστικών κυττάρων.....   | 47                                      |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....  | 49                                      |
| 4.1 Σκοπός.....   | 49                                      |
| 4.2 Δείγμα και διαδικασία.....  | 49                                      |
| 4.3 Πειραματικό χειρουργείο.....  | 50                                      |
| 4.4 Ιστολογική αξιολόγηση .....   | 51                                      |
| 4.5 Προετοιμασία του PRP (platelet-rich plasma).....                                  | 53                                      |
| 4.6 Ηθική και δεοντολογία.....  | Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. |
| 4.7 Στατιστική ανάλυση.....   | 55                                      |
| 4.8 Πειραματικό μοντέλο .....   | 56                                      |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....   | 60                                      |
| 5.1 Ιστολογική διαβάθμιση (H&E) .....   | 67                                      |
| 5.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση Collagen Type II.....                                     | 70                                      |

|  |    |
|--|----|
| <b>5.3</b> Ανοσοϊστοχημική έκφραση TNF- $\alpha$ ..... | 73 |
| <b>5.4</b> Ανοσοϊστοχημική έκφραση TGF- $\beta$ .....  | 76 |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....         | 79 |
| <b>Περιορισμοί</b> .....                               | 83 |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....                              | 84 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι από τις πιο συχνές παθήσεις της σπονδυλικής στήλης, που μπορεί δυνητικά να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές και αναπηρίες. Πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει για την ανεύρεση μιας θεραπείας που να ενισχύει το δίσκο και να αποτρέπει περαιτέρω εκφυλισμό. Η θεραπεία με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια-PRP, για την αποκατάσταση του δίσκου και της εμβιομηχανικής των ιστών έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας με ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση μιας μόνο ενδοδισκικής έγχυσης του PRP σε εκφυλισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους κονίκλων και να αξιολογηθεί η διαδικασία αποκατάστασης σε μια περίοδο παρακολούθησης 6 εβδομάδων. Σύμφωνα με ένα καθορισμένο πρωτόκολλο πρόκλησης εκφυλιστικών αλλοιώσεων, οι O3- O4 και O4-O5 δίσκοι 18 ενήλικων θηλυκών κονίκλων Νέας Ζηλανδίας τραυματίστηκαν, με μια βελόνα 18-gauge και τα παρασκευάσματα ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες. Στους δίσκους της ομάδας A, μετά τον νυγμό δια βελόνης, έγινε μια ενδοδισκική έγχυση αυτόλογου πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP), χρησιμοποιώντας μια βελόνα 27-gauge. Στους δίσκους των κονίκλων της ομάδας B (ομάδα ελέγχου), ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με ενδοδισκική έγχυση φυσιολογικού ορού. Το PRP παρασκευάστηκε άσηπτα, μετά τη συλλογή του αίματος από τον ίδιο κόνικλο. Κατά τη διάρκεια των 6 εβδομάδων υπήρξε σημαντική επιδείνωση των εκφυλιστικών διεργασιών στην ομάδα B, ενώ ο βαθμός του εκφυλισμού ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα A, τόσο για τον ινώδη δακτύλιο όσο και για τον πηκτοειδή πυρήνα. Οι αναγεννητικές διεργασίες και η αναστροφή των βλαβών ήταν έκδηλες 45 ημέρες μετά τον τραυματισμό στην ομάδα A. Η χρονοεξαρτώμενη επιδείνωση στον εκφυλισμό ήταν εμφανής και στατιστικά σημαντική. Στην περίπτωση της αξιολόγησης των μορφολογικών εκφυλιστικών αλλοιώσεων (H&E), οι δύο ομάδες διέφεραν στατιστικά σημαντικά στις 30 ημέρες και 45 ημέρες ( $p < 0,002$ ). Η αναγέννηση ήταν πιο εμφανής όσον αφορά την διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του πηκτοειδούς πυρήνα, της κυτταροβριθείας και των ινών κολλαγόνου τύπου II, με τη βελτίωση να είναι ανιχνεύσιμη από την ημέρα 30. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι δίσκοι που δέχονται άμεση θεραπεία με PRP διατηρούν τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, με την αποκατάσταση να είναι εμφανής 6 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό σε ένα ζωικό μοντέλο εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

**Λέξεις κλειδιά:** μεσοσπονδύλιος δίσκος, εκφύλιση, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, ζωικό μοντέλο, αναγέννηση

## ABSTRACT

Intervertebral discs (IVD) degeneration is common spine disorder resulting in potential serious complications and disabilities. Research efforts have been made to find a disc healing enhancer and prevent further degeneration. PRP treatment for IVD repair and tissue engineering technologies have been the target of intense research with promising results. The purpose of this study was to investigate the effect of one only intradiscal injection of PRP in the degenerated rabbit IVD and to assess the restoration process over a 6 week follow-up period. The L3- L4 and L4-L5 discs of 18 adult female New Zealand rabbits were injured, according to an established degenerative model, with a 18-gauge needle and classified in two groups. In the discs of group A rabbits, after needle puncture, an intradiscal injection of autologous platelet-rich plasma (PRP) growth factors was performed, using a 27-gauge needle. In the discs of group B rabbits (control group), the same procedure was followed by intradiscal injection of normal saline. The PRP preparation was done aseptically, after blood collection from the same rabbit. During 6 weeks, there was a noteworthy progression of degeneration process in group B, whereas the grade of degeneration was significantly lower in group A, both for annulus fibrosus and nucleus pulposus. The intervertebral disc regeneration and reversal process of the lesions were obvious 45 days after the injury, in group A. The time-dependent deterioration in degenerating discs was prominent and statistically evidenced. In the case of HE summary score the two groups differed statistically significant on 30 day and 45day ( $p < 0,002$ ). The regeneration was most evident in terms of NP integrity, cellularity collagen II fibers, the improvement being evident even from day 30. The present study supports that immediate PRP treated discs maintain their basic morphological characteristics with restoration being evident 6 weeks after injury in an animal model.

**Key words:** intervertebral disc, regeneration, degeneration, PRP, animal model



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι παθήσεις της σπονδυλικής στήλης (ΣΣ) είναι κοινά προβλήματα υγείας που μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές επιπλοκές και αναπηρίες. Ειδικά οι παθήσεις του μεσοσπονδυλίου δίσκου είναι από τις συχνότερες παθήσεις της ΣΣ και πολλές ερευνητικές προσπάθειες καταβάλλονται ώστε να βρεθεί μια θεραπεία ενίσχυσης του δίσκου, που θα αποτρέπει τον περαιτέρω εκφυλισμό του. Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η έγχυση του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) στον εκφυλισμένο δίσκο. Η μέθοδος, αν και ακόμα σε πειραματικό στάδιο έχει επιτυχώς εφαρμοστεί σε άλλες μορφές συνδετικού ιστού και τις συναφείς με αυτές παθήσεις: ρήξη στροφικού πετάλου ώμου, επικονδυλίτιδα του αγκώνα, τενοντίτιδα αχίλλειου τένοντα, κοσμητική ιατρική και αλλού.

Στο μεσοσπονδύλιο δίσκο αναγνωρίζονται τρεις περιοχές ιστού: οι σπονδυλικές τελικές πλάκες, ο ινώδης δακτύλιος (Annulus Fibrosus-AF) και ο πηκτοειδή πυρήνας (Nucleus Pulposus-NP). Ο NP είναι η κεντρική ζελατινώδης περιοχή που αποτελείται από ένα αραιό πληθυσμό κυττάρων εντός ενυδατωμένης εξοκυττάριας ουσίας, που περιέχει ίνες κολλαγόνου και υδρόφιλες πρωτεογλυκάνες. Η εκφύλιση συνοδεύεται από ανατομικές αλλαγές που θέτουν σε κίνδυνο την εμβιομηχανική του. Οι βιολογικές θεραπείες για την αποκατάσταση του δίσκου και της μηχανικής των ιστών του, έχουν γίνει στόχος έντονης έρευνας και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Τα τελευταία χρόνια το PRP (Platelet Rich Plasma) θεωρείται μια πλεονεκτική τεχνική, κυρίως λόγω της δυνατότητας αυτόλογης παρασκευής του. Το PRP περιέχει βιολογικούς παράγοντες ικανούς να διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό στο δίσκο. Ζωικά μοντέλα έχουν προταθεί προκειμένου να εκτελεστούν πειράματα με τεχνητά εκφυλισμένα δίσκους. Ειδικά στους κόνικλους το μοντέλο παρακέντησης με βελόνα θεωρείται ως ικανοποιητικό πρότυπο εκφύλισης για να καταδειχθούν οι θεραπευτικές επιδράσεις του PRP. Υπάρχουν ελπιδοφόρα μηνύματα αλλά και προβληματισμοί σχετικά με την εξέλιξη της αποκατάστασης μέσα στο χρόνο, το ρόλο των κυτοκινών του PRP αλλά και την οδό και τον τρόπο τραυματισμού και έγχυσης. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης μιας μόνο ενδοδισκικής έγχυσης του PRP σε εκφυλισμένους δίσκους κόνικλου και η αξιολόγηση της διαδικασίας αποκατάστασης σε μια περίοδο παρακολούθησης 6 εβδομάδων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ανατομία και Φυσιολογία του μεσοσπονδύλιου δίσκου

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος είναι από τα πιο σημαντικά λειτουργικά τμήματα της σπονδυλικής στήλης (Σ.Σ.). Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι είναι δομές συνδετικού ιστού, οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα στα σπονδυλικά σώματα και συμμετέχουν στη σύνδεση των σπονδύλων μεταξύ τους. Πρόκειται για λειτουργικά ανατομικά μέρη που προσφέρουν στη Σ.Σ. μοναδική ευκαμψία, αντοχή στην πίεση, σταθερότητα και κινητικότητα.

### 1.1 Ανατομία

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι της ανθρώπινης ΣΣ αυξάνουν σε ύψος και διάμετρο με κατεύθυνση από την ΑΜΣΣ προς την ΟΜΣΣ. Ωστόσο, όλοι εμφανίζουν την ίδια βασική δομή και εμβιομηχανική σύνθεση. Όπως και κάθε είδος συνδετικού ιστού αποτελούνται από ένα διάσπαρτο πληθυσμό κυττάρων και άφθονη μεσοκυττάρια ουσία, που οργανώνονται σε ένα περίπλοκο σκελετό από μακρομόρια γεμάτα νερό. Η δομική ακεραιότητα και οι μηχανικές ιδιότητες του δίσκου βασίζονται στα μακρομόρια και την αλληλεπίδρασή τους με το νερό. Τρία ομόκεντρα τοποθετημένα ιστικά στοιχεία σχηματίζουν τον φυσιολογικό ανθρώπινο μεσοσπονδύλιο δίσκο: 1) ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος, 2) ο εσωτερικός ινώδης δακτύλιος, 3) ο πηκτοειδής πυρήνας [1].

Μακροσκοπικά, ο υγιής μεσοσπονδύλιος δίσκος ενός ενηλίκου αποτελείται από δύο περιοχές, ένα ζελατινώδες κεντρικό τμήμα, τον **πηκτοειδή πυρήνα** και από έναν παχύ και ισχυρό **ινώδη δακτύλιο**, που τον περιβάλλει. Ανάμεσα στα σπονδυλικά σώματα και το δίσκο παρεμβάλλονται οι χόνδρινες τελικές πλάκες που έχουν αυξητικό και διατροφικό ρόλο. Όταν τομές του δίσκου παρατηρούνται υπό πολωμένο φως, ο προσανατολισμός των δεσμίδων κολλαγόνου παρουσιάζεται πολύ καθαρά. Οι δίσκοι από την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης του ανθρώπου έχει δείχθει ότι έχουν δεκαπέντε έως εικοσιπέντε ελάσματα στον ινώδη δακτύλιο. Αυτά τα ελάσματα αρχίζουν τη ζωή τους ως μεμονωμένες διακριτές δέσμες ινών κολλαγόνου. Στους ανθρώπους ωστόσο, η ελασματοειδής οργάνωση γίνεται όλο και πιο πολύπλοκη, με περισσότερο διχασμό (ή διαχωρισμό σε δύο κλάδους) και διεμπλοκή. Ανάλογα με την αυξανόμενη ηλικία του ατόμου, αυξάνεται και το πάχος

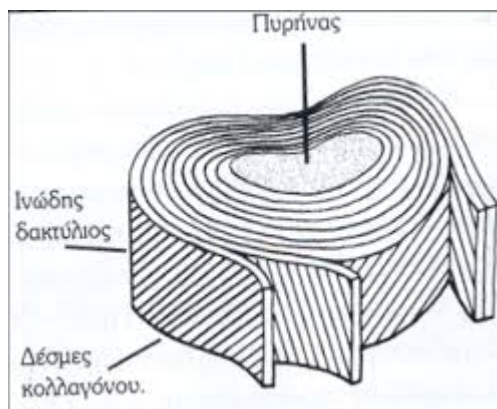
των ελασμάτων [1,2].

Ο διαχωρισμός μεταξύ δακτυλίου και πυρήνα είναι περισσότερο διακριτός στη νεαρή ηλικία, καθώς η σύσταση του δίσκου εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιογένεια στα ηλικιωμένα άτομα. Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι έχουν διαφορετικό πάχος (ύψος) στις διάφορες μοίρες της Σ.Σ. Στην οσφυϊκή μοίρα είναι παχύτεροι με αναλογία δίσκου-σπόνδυλου 33%, στη θωρακική 20% και στην αυχενική 40%. Το πάχος τους κοιλιακά είναι μεγαλύτερο από ό,τι ραχιαία, διαμορφώνοντας τα λορδωτικά κυρτώματα στην οσφυϊκή και αυχενική μοίρα. Όλοι οι δίσκοι μαζί αποτελούν το 25% του συνολικού ύψους της σπονδυλικής στήλης το οποίο μεταβάλλεται με την ηλικία αλλά και κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η περιεκτικότητά του σε νερό μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του 24ωρου. Λόγω του σωματικού βάρους και των κινήσεων, οι δίσκοι αποβάλλουν υγρά και προϊόντα καταβολισμού στην όρθια θέση, ενώ κατά τη βραδινή κατάκλιση, εισροφούν υγρά και θρεπτικές ουσίες. Έτσι διογκώνεται ο δίσκος κατά τις πρωινές ώρες και το άτομο κερδίζει ύψος περίπου 1,5-2cm, το οποίο χάνει έως το βράδυ. Με την πάροδο της ηλικίας χάνει ένα ποσοστό από αυτές τις υδροδυναμικές ιδιότητες μαζί με την περιεκτικότητά του σε νερό. Στην ηλικία των 70 ετών η περιεκτικότητά του σε νερό γίνεται 70% από 90% που είχε σε νεαρή ηλικία. Μετά την ήβη οι δίσκοι καθίστανται ανάγγειοι και τρέφονται με διάχυση από τα παρακείμενα σπονδυλικά αγγεία μέσω των χόνδρινων τελικών πλακών [2,3].

Ο πηκτοειδής πυρήνας αποτελείται από βλενοπολυσακχαρητιδική γέλη. Η επιφάνεια του πυρήνα αντιστοιχεί περίπου στο 40% (30-60%) της συνολικής διατομής του δίσκου. Είναι συμπαγής και ελαστικός και το χρώμα του είναι λευκωπό. Διαθέτει την ικανότητα να αλλάζει σχήμα και να μεταδίδει ομοιόμορφα τις εφαρμοζόμενες δυνάμεις σε οποιοδήποτε σημείο. Διατηρεί οβάλ σχήμα, γιατί έχει μεγάλη εσωτερική τάση, στην οποία και οφείλεται η ελαστικότητα και η δυνατότητα προσαρμογής σε όλες τις κινήσεις των σπονδύλων και του κορμού. Ο πυρήνας αποτελείται από πρωτεογλυκάνες μέσα σε ένα χαλαρό δίκτυο ινών κολλαγόνου κυρίως τύπου II. Τα όρια του με τον ινώδη δακτύλιο δεν είναι ιδιαίτερα σαφή. Σε συνθήκες ηρεμίας όμως, διατηρεί τη θέση και το σχήμα του υπό πίεση, γεγονός που εξηγεί την τάση διαφυγής του μέσα από ρήξεις του δακτυλίου. Αυτό αποδεικνύεται από την εμφάνιση κήλης του δίσκου εάν διαταμεί τεχνητά ο δακτύλιος με μαχαίριδιο. Αυτή η ενδοδισκική τάση διαχωρίζει τα σπονδυλικά σώματα, ενώ παράλληλα, διατείνει τόσο τις ίνες, του ινώδους δακτυλίου όσο και τις ίνες των συνδέσμων [2,3].

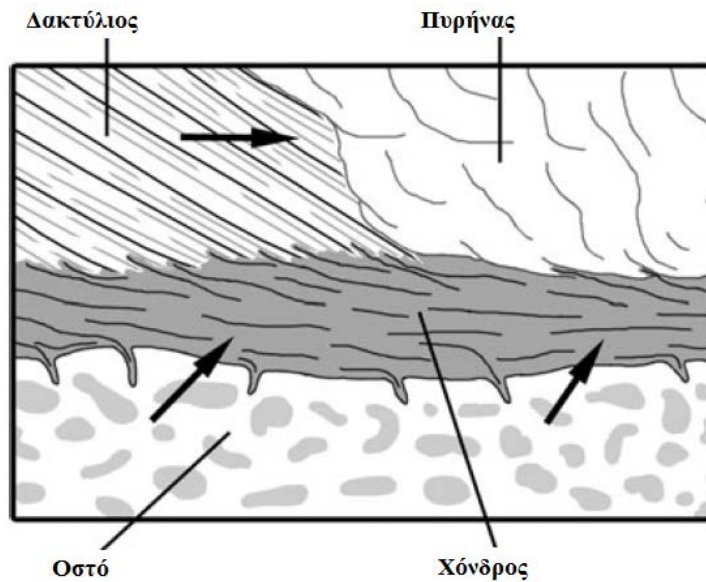
Ο ινώδης δακτύλιος είναι το περιφερικό τμήμα του δίσκου και αποτελείται από 15-20 αλληπάλλληλα ομόκεντρα ινοχόνδρινα πέταλα ή στρώματα. Το καθένα σχηματίζεται από παράλληλες κολλαγόνες ίνες με πλάγιο προσανατολισμό δημιουργώντας γωνίες περίπου  $30^\circ$  με τα των σπονδυλικά σώματα. Οι ίνες των παρακείμενων στοιβάδων έχουν εναλλασσόμενη κατεύθυνση και διασταυρώνονται μεταξύ τους σε γωνία περίπου  $120^\circ$ . Αυτή η διάταξη των ινών του δακτυλίου προσδίδει στο φυσιολογικό δίσκο αντοχή στις στροφικές καταπονήσεις, ενώ παραμένουν δυνατές οι πλάγιες κινήσεις. Οι ίνες των εξωτερικών στοιβάδων ενώνονται με το άνω και κάτω χείλος του σπονδυλικού σώματος, καθώς συνεχονται με τις περιοστικές ίνες του Sharpey. Οι έσω ίνες του ινώδους δακτυλίου συνεχίζουν στενά συνδεδεμένες με τις ίνες στις χονδρικές τελικές πλάκες. Ο ινώδης δακτύλιος είναι πιο ογκώδης και ανθεκτικός στο πρόσθιο τμήμα του, πιο λεπτός και λιγότερο ανθεκτικός στο πίσω. Ωστόσο, ενισχύεται σημαντικά από τον οπίσθιο επιμήκη σύνδεσμο ο οποίος εφάπτεται στην πίσω επιφάνεια των σπονδυλικών σωμάτων και των δίσκων, μέσα στο σπονδυλικό σωλήνα. Ο οπίσθιος επιμήκης σύνδεσμος είναι ιδιαίτερα ισχυρός στη μέση γραμμή του ενώ στα πλάγια χείλη του είναι πιο λεπτός και λιγότερο ανθεκτικός. Σ' αυτά ακριβώς τα πλάγια χείλη του συνδέσμου ο ινώδης δακτύλιος στερείται εξωτερικής στήριξης και είναι μηχανικά πιο ευπαθής [2-4].

Το κολλαγόνο προσδίδει δύναμη και αντοχή στο δίσκο. Αντιπροσωπεύει το 25% του καθαρού βάρους του πυρήνα και το 50% του ινώδους δακτυλίου. Οι ποσότητες αυτές ελάχιστα μεταβάλλονται με την ηλικία. Στον ινώδη δακτύλιο υπάρχει κυρίως κολλαγόνο τύπου I και στον πηκτοειδή πυρήνα κολλαγόνο τύπου II.



**Εικ 1. Οι δέσμες κολλαγόνου στο δίσκο**

Η θρέψη στο εσωτερικό του μεσοσπονδύλιου δίσκου γίνεται με αναερόβιο τρόπο. Η μερική τάση του οξυγόνου είναι χαμηλή και το pH 6,8 (όξινο). Δεν υπάρχουν ρυθμιστικά διαλύματα για να ρυθμίσουν την οξεοβασική ισορροπία. Στον εκφυλισμένο δίσκο η κατάσταση επιδεινώνεται. Το pH είναι δυνατόν να μειωθεί στο 6,2, επίπεδο στο οποίο σταματά η σύνθεση των πρωτεογλυκανών, καθώς και η αντικατάσταση των ινών του κολλαγόνου[1].



Εικ 2. Η διασύνδεση ινών, χόνδρου και οστού στο δίσκο



Εικ 3. Ανατομική θέση και αδρή δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου

### 1.1.2. Σύσταση του δίσκου

Ο φυσιολογικός μεσοσπονδύλιος δίσκος του ανθρώπου, στην ενήλικη ζωή αποτελείται από μικρό αριθμό κυττάρων που συνθέτουν περίπου το 1% του συνολικού όγκου και μεγάλη ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

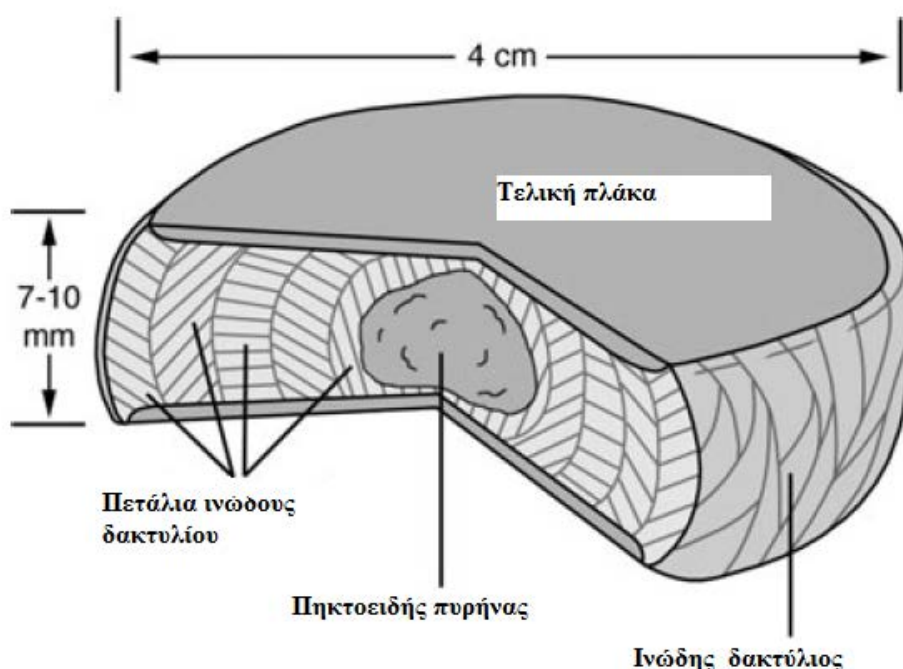
#### Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

Η βιοχημική ανάλυση των δίσκων έχει εντοπίσει ποια είναι τα μοριακά συστατικά και οι ποσότητές τους. Ωστόσο, υφίσταται τεράστια διακύμανση στην κατανομή πολλών από αυτά τα συστατικά, σε σχέση με τον εντοπισμό στο δίσκο, η έκταση της οποίας γίνεται εμφανής με ιστοχημικές, ανοσοϊστοχημικές ή τεχνικές ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι ίνες κολλαγόνου των τύπων I και II, έχειδειχθεί ότι κατανέμονται σε όλη τη θεμέλια ουσία: το τύπου I κολλαγόνο ανευρίσκεται πιο συχνά προς τον ινώδη δακτύλιο, σε σύγκριση με το τύπου II κολλαγόνο που υπερτερεί προς την κατεύθυνση του πηκτοειδούς πυρήνα και επίσης σε όλη την τελική πλάκα του χόνδρου. Ομοίως, η αγγρεκάνη κατανέμεται σε όλη την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ορισμένα συστατικά φαίνεται να έχουν πιο διακριτή κατανομή. Κάποιες γλυκοζαμινογλυκάνες και τύποι κολλαγόνου έχειδειχθεί ότι εντοπίζονται κατά προτίμηση σε ορισμένες θέσεις. Για παράδειγμα, το τύπου III και τύπου VI κολλαγόνο (αυτά συνιστούν ένα μικρό ποσοστό βιοχημικά) βρίσκεται κατά κύριο λόγο περικυτταρικά. Αυτό είναι πιθανό να αποτελεί μια αντανάκλαση της λειτουργίας τους εντός του δίσκου. Άλλα συστατικά όπως οι ελαστικές ίνες, έχουν συγκεκριμένο εντοπισμό, ευρισκόμενες μεταξύ των ελασμάτων και διασχίζουν σε ορισμένα «σημεία διέλευσης» τον ινώδη δακτύλιο. Η κατανομή αυτών των συστατικών σε διακριτές εντοπισμένες περιοχές, είναι πιθανό να επηρεάσει τις φυσικές ιδιότητες του ιστού, με τη δημιουργία μιας ανισότροπης απόκρισης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στα φορτία. Η ελαστίνη, συνιστά μόνο το 2% του ξηρού βάρους του ινώδους δακτυλίου, υποδηλώνοντας ότι δεν αποτελεί ένα μείζον συστατικό. Ενδέχεται ωστόσο, να συμβάλλει σημαντικά στη λειτουργία του δίσκου, επειδή έχει έναν πολύ διακριτό και ειδικό εντοπισμό στον φυσιολογικό δίσκο. Βρίσκεται κυρίως μεταξύ των ελασμάτων και με λίγες ίνες να διασχίζουν κάθετα. Νεύρα και αιμοφόρα αγγεία είναι παρόντα σε μικρό βαθμό στον υγιή δίσκο ενηλίκου, περιορισμένα στα λίγα εξωτερικά χιλιοστά του ινώδους δακτυλίου. Ένας μικρός αριθμός μηχανοϋποδοχέων είναι επίσης παρών, έχοντας συνήθως τη μορφολογία των τένοντιων οργάνων του Golgi, λίγους υποδοχείς Ruffini, και ακόμη λιγότερα σωματίδια

Pacini.

Οι ίνες του κολλαγόνου και η πολύπλοκη δομή τους εξασφαλίζουν στον δίσκο την αναγκαία ελαστικότητα και λειτουργικότητα. Παραμορφώνονται σημαντικά, παρά το γεγονός ότι το κολλαγόνο είναι σχετικά δύσκαμπτο. Ο δίσκος μπορεί να αυξάνει αρκετά κατά μήκος, στην κάμψη ή την έκταση.

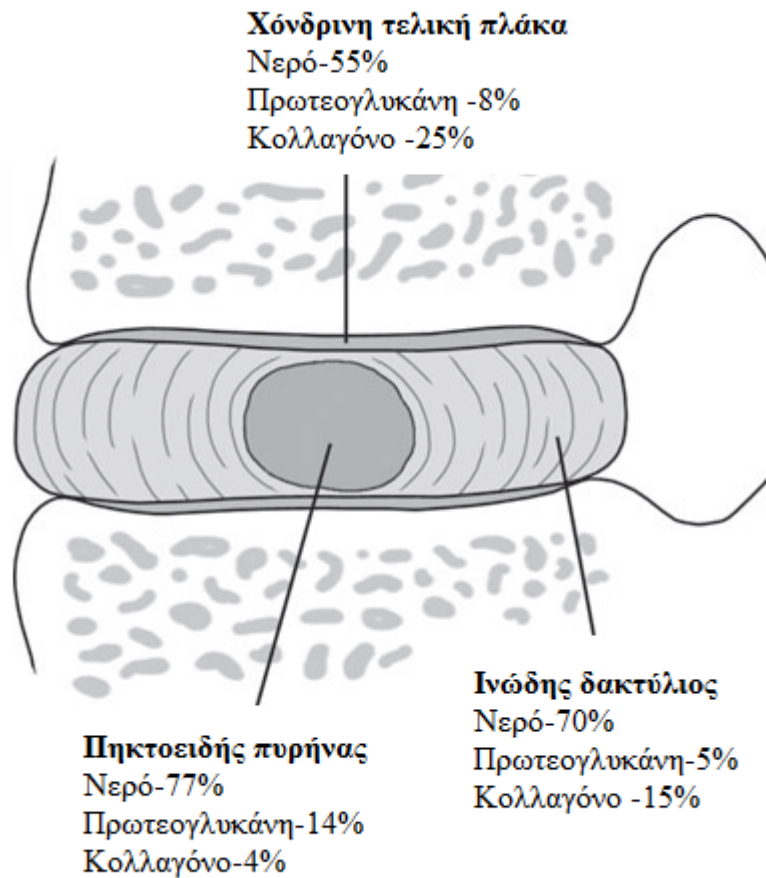
Στον ινώδη δακτύλιο το κολλαγόνο, διατάσσεται δικτυωτά με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να απορροφά τις πιέσεις τις οποίες υφίσταται ο δίσκος και να επανέρχεται αυτόματα στο φυσιολογικό, όταν οι πιέσεις αυτές αρθούν [2,5-7].



**Εικ 4. Η αρχιτεκτονική του δίσκου**

Η εκφύλιση του δίσκου συνεπάγεται μείωση του ύψους, σκλήρυνση του δικτύου του κολλαγόνου και απώλεια μέρους της ελαστικότητας του.

Οι **πρωτεογλυκάνες** αντιπροσωπεύουν το 50% του καθαρού βάρους του πυρήνα και το 15% του ινώδους δακτυλίου. Τα κυριότερα συστατικά των πρωτεογλυκανών είναι η θειική χονδροϊτίνη και η θειική κερατάνη. Οι πρωτεογλυκάνες μαζί με το κολλαγόνο πρωταγωνιστούν στη διατήρηση της ενυδάτωσης και την πρόληψη της απώλειας νερού υπό την επήρεια μεγάλων αξονικών φορτιών και πιέσεων του δίσκου [5-7]. Αναλυτικά, οι περιεκτικότητες σε νερό, ίνες και πρωτεογλυκάνες των τμημάτων του δίσκου περιγράφονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικ 5.Η σύσταση των δομών του δίσκου**

Τα κύτταρα του δίσκου παράγουν τη θεμέλια ουσία, δηλαδή τις πρωτεογλυκάνες και τις ίνες κολλαγόνου. Συνεπώς η υγεία του και η λειτουργικότητα του δίσκου εξαρτώνται από τη βιωσιμότητα των κυττάρων του. Τα κύτταρα αποτελούν το 2-5% του όγκου της θεμέλιας ουσίας και ο αριθμός τους είναι μικρότερος απ' ό,τι σε άλλους συνδετικούς ιστούς. Ο απόλυτος τους αριθμός αυξάνεται με την ηλικία, ενώ η αναλογία των ζώντων κυττάρων μειώνεται. Τα κύτταρα πιστεύεται ότι αποτελούνται από τουλάχιστον δύο φαινοτυπικά διακριτούς πληθυσμούς. Εκείνα του ινώδους δακτυλίου και της τελικής πλάκας του χόνδρου είναι πιο επιμήκη και μοιάζουν με ινοβλάστη, σε σύγκριση με εκείνα του πηκτοειδούς πυρήνα, που είναι πιο στρογγυλεμένα ή ωσειδή και μοιάζουν με χονδροκύτταρα, ορισμένες φορές με μία κάψα γύρω τους. Αυτά τα φαινομενικώς απλοϊκά σχήματα δεν αντιστοιχούν στην πολυπλοκότητα που ενδέχεται να υπάρχει, με τα κύτταρα να έχουν συχνά εκτεταμένες, μακρές και λεπτές κυτταρικές προεκβολές, οι οποίες ενδεχομένως ενέχονται στην ανίχνευση της μηχανικής καταπόνησης. Επιπλέον, αυτοί



οι δύο πληθυσμοί συμπεριφέρονται διαφορετικά κατά την επίδραση εφαρμοζόμενων φορτίων ή στη σύνθεση διαφορετικών μορίων θεμέλιας ουσίας, όταν αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα γενικά, συνθέτουν μόνον τύπου II κολλαγόνο, ενώ κύτταρα του ινώδους δακτυλίου παράγουν τόσο τύπου I, όσο και τύπου II κολλαγόνο. Αυτό αντανακλάται στα μόρια εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας, που ανευρίσκονται στον πηκτοειδή πυρήνα και τον ινώδη δακτύλιο του δίσκου *in vivo* [8,9].

Ο πυρήνας του εμβρυϊκού δίσκου του ανθρώπου κατοικείται από κύτταρα της νωτιαίας χορδής. Αυτά τα κύτταρα έχουν πυκνές εναποθέσεις γλυκογόνου και σχηματίζουν σε στενή μεταξύ τους συνάφεια συστάδες κυττάρων, με μικρή ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Έχουν περιγραφεί ως «φυσαλιδοφόρα» κύτταρα με μεγάλα κενοτόπια. Ωστόσο, η εμφάνιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε μια εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που περιβάλλεται από κύτταρα ή κυτταρικές προεκβολές. Μετά τη γέννηση, ο αριθμός των κυττάρων της νωτιαίας χορδής μειώνεται γρήγορα, από περ. 2000/mm<sup>2</sup> σε ηλικία 6 εβδομάδων, σε 100/mm<sup>2</sup> στο 1 έτος, μέχρι να παραμείνουν πολύ λίγα, ίσως και καθόλου, στην ηλικία των 4 ετών. Σε πολλά είδη ζώων ωστόσο, σε αντίθεση με τον άνθρωπο, τα κύτταρα της νωτιαίας χορδής παραμένουν στην ενήλικη ζωή.

Όπως αναφέρθηκε στην ενήλικη ζωή, ο πηκτοειδής πυρήνας του ανθρώπου περιέχει κύτταρα που μορφολογικά μοιάζουν με χονδροκύτταρα. Η προέλευση των κυττάρων αυτών είναι ασαφής, ενώ μια πιθανότητα είναι ότι προέρχονται και μεταναστεύουν από τον εσωτερικό δακτύλιο. Είναι γενικά ωοειδούς σχήματος, με ένα μεγάλο πυρήνα και περιβάλλονται συχνά από μία ινώδη κάψα.

Σε αντίθεση, **τα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου** είναι λεπτότερα και πιο επιμήκη, ενώ βρίσκονται κυρίως παράλληλα προς τις ίνες κολλαγόνου των ελασμάτων και συχνά μεταξύ των ελασμάτων σε νεαρά άτομα. Είναι πιθανό ότι αυτή η μορφολογία επιβάλλεται στα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου από την περιβάλλουσα θεμέλια ουσία, καθώς λαμβάνουν ένα πιο στρογγυλεμένο ή οβάλ (ωοειδές) σχήμα, αν απελευθερωθούν από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Υπάρχει μια κάψα γύρω από τα κύτταρα του ινώδους δακτυλίου στον επίμυ, αλλά αυτή δεν είναι ορατή στους ανθρώπους, τουλάχιστον σε επίπεδο μικροσκοπίου φωτός [8-10].

Τα κύτταρα του δίσκου μπορούν να υποστούν απόπτωση, πιθανώς μετά την επίδραση ορισμένων φορτίων. Επιπλέον, τα κύτταρα του δίσκου έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται, τουλάχιστον σε ορισμένα στάδια της ζωής τους. Συστάδες

κυττάρων, οι οποίες ορισμένες φορές περιέχουν ακόμη και 40-50 κύτταρα, αποτελούν ένα χαρακτηριστικό των εκφυλισμένων δίσκων. Σχηματίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως δεικνύεται από την ανοσοθετικότητα των συσχετιζόμενων με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεικτών (σημειωτών, ιχνηθετών) Ki67<sup>1</sup> και PCNA<sup>2</sup> (πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου)[11].

### **Άλλοι τύποι κυττάρων στο δίσκο**

Στον υγιή, ενήλικο δίσκο, υπάρχουν ακόμη ορισμένα είδη κυττάρων. Οι νευρικές ίνες εμφανίζονται στα εξωτερικά ελάσματα, με ένα πολύ μικρό αριθμό των ινών να καταλήγει σε μηχανοϋποδοχείς. Κύτταρα του Schwann συχνά συνοδεύουν αυτά τα νεύρα, ρυθμίζοντας ίσως την νευρωνική ανάπτυξη ή ακόμη και δρώντας ως προπορευόμενα κύτταρα προσανατολισμού. Αιμοφόρα αγγεία, με τους πολλούς κυτταρικούς τύπους που διαθέτουν, είναι επίσης παρόντα σε αυτή την περιοχή των νέων, αναπτυσσόμενων δίσκων, αλλά λίγα ή και κανένα, παραμένουν ως την ενηλικίωση. Ωστόσο, σε εκφυλιζόμενους δίσκους, η εμφάνιση τόσο των νεύρων όσο και των αιμοφόρων αγγείων, αυξάνει σε συχνότητα και είναι αμφότερα παρόντα περισσότερο κεντρικά από ότι στους φυσιολογικούς δίσκους. Η αγγείωση του μεσοσπονδύλιου δίσκου σταματά περίπου μετά την εφηβική ηλικία. Ο δίσκος είναι ο μεγαλύτερος ανάγγειος ιστός του σώματος που τρέφεται με μηχανισμούς διάχυσης από τα εγγύς αιμοφόρα τριχοειδή των σπονδύλων [2,8,12].

---

<sup>1</sup> Το Ki-67 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο ταυτοποιεί πολυπεπίδια μοριακού βάρους 395 και 345 KDa.

<sup>2</sup> Το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (proliferating cell nuclear antigen ή PCNA) ανακαλύφθηκε από τον Miyacki το 1978, όταν απομόνωσε από ορό ασθενών πασχόντων από ερυθματώδη λύκο ένα αντίσωμα το οποίο σε ιστικές καλλιέργειες αντιδρούσε με πυρηνικά αντιγόνα ανθρώπινων T και B λεμφοκυττάρων

## 1.2. Φυσιολογία

Από μορφολογική και λειτουργική άποψη ο δίσκος θεωρείται μια ολοκληρωμένη μονάδα, που η λειτουργία της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακεραιότητα των συστατικών του αλλά και την αυτόνομη οσμωτική του δράση. Πρόκειται για ένα ανατομικό σύστημα, που η αλλοίωση κάποιου συστατικού του αναμένεται να επηρεάσει και τα υπόλοιπα. Νευρικές απολήξεις που μπορούν να μεταφέρουν τον πόνο υπάρχουν μόνο στις εξωτερικές στοιβάδες του ινώδους δακτυλίου [1].

Ο ινώδης δακτύλιος και ο πηκτοειδής πυρήνας έχουν διαφορετικό ρόλο στην εμβιομηχανική λειτουργία του δίσκου. Ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος ανθίσταται στις δυνάμεις διατάσεως και δημιουργεί έναν υδροστατικό φραγμό που περιορίζει την παραμόρφωση των εσωτερικών στοιχείων. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό (70-80%) του εσωτερικού ινώδη δακτυλίου και του πηκτοειδή πυρήνα, τα δομικά αυτά στοιχεία συμμετέχουν στην γλοιοελαστική συμπεριφορά του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Αυτή η γλοιοελαστική συμπεριφορά είναι διφασική στη φύση της και οφείλεται στη αλληλοδιαδοχή της αφυδάτωσης και της ενυδάτωσης του διάμεσου υγρού. Ουσιαστικά, ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος, ο πηκτοειδής πυρήνας και η λιγότερο πυκνή κολλαγονώδης ουσία επιτρέπουν μεγαλύτερες παραμορφώσεις κι ογκομετρικές μεταβολές. Οι περιστροφικές τμηματικές κινήσεις παραμορφώνουν το σχήμα του ινώδους δακτυλίου (χωρίς ογκομετρική αλλαγή του δίσκου), ενώ η κάμψη και η συμπίεση προκαλεί προβολή του δίσκου, ογκομετρικές αλλαγές και παραμόρφωση των αποφυσιακών πλακών [2].

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος μετατρέπει τις κάθετες (αξονικές) φορτίσεις σε οριζόντιες ομοιόμορφες πιέσεις που εξουδετερώνονται από τον ισχυρό ινώδη δακτύλιο, ώστε να μην προκαλείται βλάβη στα σπονδυλικά σώματα. Από εμβιομηχανική άποψη ο δίσκος δρα ως σημαντικό μέσο απόσβεσης, κραδασμών και μεταφοράς φορτίων από σπόνδυλο σε σπόνδυλο, ενώ διευκολύνει με την ελαστικότητα του, την εκτέλεση των φυσιολογικών κινήσεων της σπονδυλικής στήλης. Επίσης, έχει σταθεροποιητικό ρόλο, παρεμποδίζοντας τις υπερβολικές και ανεπιθύμητες κινήσεις και φορτίσεις και ενώνει τους σπονδύλους μεταξύ τους.

Ο πηκτοειδής πυρήνας δέχεται δυο ειδή πιέσεων:

- α) Κάθετη, από το βάρος που βρίσκεται πάνω σ' αυτόν.
- β) Οριζόντιες, κατά τη διάρκεια των κινήσεων.

Ο πηκτοειδής πυρήνας χρησιμεύει σαν υπομόχλιο κατά τις κινήσεις των σπονδύλων. Κατανέμει ομοιόμορφα τις ασκούμενες πιέσεις προς τον ινώδη δακτύλιο και τις χόνδρινες πλάκες των σπονδυλικών σωμάτων και έτσι αποφεύγεται η πίεση σε ένα μόνο μικρό τμήμα του σπονδύλου ή του ινώδους δακτυλίου, πράγμα το οποίο θα είχε σαν αποτέλεσμα, την βλάβη αυτού. Επίσης, παίζει σπουδαίο ρόλο στο μηχανισμό απορρόφησης του shock, δηλαδή όταν πιέζεται, αποπλατύνεται και διαμοιράζει την πίεση στον ινώδη δακτύλιο, οι ίνες του οποίου επιμηκύνονται αργά. Με την κίνηση των στρωμάτων του δακτυλίου, μεταβάλλεται η γωνία από το ένα στρώμα στο άλλο ώστε να μεταβιβάζεται η πίεση ομοιόμορφα σε όλα τα σημεία του ινώδη δακτυλίου και να αμβλύνονται οι πιέσεις στην Σ.Σ. Στην καθημερινή πράξη ο δίσκος φορτίζεται από ένα σύμπλεγμα δυνάμεων συμπίεσης, στροφής και κάμψης. Κατά τη διάρκεια της κάμψης-έκτασης κατά το οβελιαίο επίπεδο καθώς και πλάγιων κάμψεων της σπονδυλικής στήλης παράγονται κυρίως συμπιεστικές τάσεις και τάσεις εφελκυσμού στον δίσκο, ενώ η στροφή δημιουργεί τάσεις διάτμησης [2,3].

Ο ινώδης δακτύλιος είναι μια κατασκευή με μεγάλη στερεότητα και αντοχή. Ακολουθεί το σχήμα και στις διαστάσεις του σπονδυλικού σώματος προσδίδοντας στην Σ.Σ. κινητικότητα και σταθερότητα. Δηλαδή, δυο αντίθετες μηχανικές ιδιότητες που δύσκολα συνδυάζονται σε άλλες κατασκευές στη φύση. Οι ίνες του δακτυλίου επιμηκύνονται περισσότερο από τη στρέψη παρά από την απλή συμπίεση, την κάμψη-έκταση ή το συνδυασμό τους.

Η γωνίωση των ινών του δακτυλίου ποικίλλει και εξαρτάται από την απόσταση τους από τον πυρήνα. Η επιμήκυνση της ίνας διαφέρει ανάλογα με την απόσταση της από το κέντρο του πυρήνα. Υπάρχει διαφορετικός βαθμός από τις έξω (μακρύτερες) ίνες προς τις έσω (βραχύτερες) ίνες. Ο ινώδης δακτύλιος συμμετέχει στη σταθερή σύνδεση των σπονδυλικών σωμάτων και αποτρέπει την εξάρθρωση τους, ενώ επιτρέπει λόγω της ελαστικότητας των ινών του και της ειδικής τοποθετήσεώς τους, κινήσεις μικρού εύρους μεταξύ τους. Επίσης, αποτελεί το ελατήριο του μηχανισμού απορρόφησης των πλήξεων επί του μεσοσπονδύλιου δίσκου [2,3].

Από την ανάλυση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων του ινώδους δακτυλίου διαφαίνεται ότι η αντίσταση στις αναπτυσσόμενες μεγάλες τάσεις οφείλεται στον

υψηλό συντελεστή τάσης και στην ακαμψία του. Ιδιαίτερα ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος, έχοντας τον υψηλότερο συντελεστή τάσης, είναι ιδανικός για την αντίσταση στις παραμορφώσεις του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις δυνάμεις που δημιουργούνται κατά τις κινήσεις της ΣΣ. Αντίθετα ο χαμηλός συντελεστής τάσης του εσωτερικού ινώδους δακτυλίου επιτρέπει τη γλοιοελαστική απορρόφηση των δυνάμεων όπως αυτή ερμηνεύεται με τη διαφασική θεωρία και αποτελεί ακόμα ένα πρωταρχικό μηχανισμό απορρόφησης των συμπιεστικών δυνάμεων.

### 1.2.1 Χόνδρινες τελικές πλάκες

Οι χόνδρινες τελικές πλάκες καλύπτουν την πάνω και την κάτω επιφάνεια του δίσκου, πρόκειται για λεπτές πλάκες από υαλώδη χόνδρο που θεωρούνται υπολείμματα του αυξητικού χόνδρου. Κατέχουν τη ζώνη επαφής μεταξύ δίσκου και σπονδυλικών επιφανειών. Εξασφαλίζουν τη διατροφή τους με διάχυση από τα σπονδυλικά αγγεία, δεδομένου ότι ο δίσκος καθίσταται ανάγγειος περίπου πριν από την εφηβεία. Βλάβη της διαπερατότητας του χόνδρου από σκλήρυνση ή κατάγματα είναι συχνό αίτιο εκφύλισης του δίσκου. Η τελική πλάκα του χόνδρου στους ανθρώπους είναι μια διαφορετική δομή από ό,τι σε άλλα είδη. Εμβρυολογικά και στην πρώιμη παιδική ηλικία, καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του μεσοσπονδύλιου χώρου, όπου διαπερνάται από μεγάλους αγγειακούς διαύλους σε όλη την έκταση της. Μετά τη γέννηση, αυτοί οι διαύλοι μειώνονται, έως ότου να μην παραμένει κανείς, στην ηλικία των 4-6 ετών περίπου. Από εκεί και έπειτα, επί του ιστού δεν υπάρχουν καθόλου αγγεία και όλες οι θρεπτικές ουσίες και οι μεταβολίτες πρέπει να περάσουν μέσα από αυτόν για να φτάσουν στα κύτταρα της τελικής πλάκας και το κέντρο του δίσκου. Το πάχος της τελικής σπονδυλικής πλάκας συνεχίζει να ελαττώνεται, μέχρι να φτάσει στις διαστάσεις που έχει στους ενήλικους, περ. στα 0,6mm πάχους. Οι τελικές σπονδυλικές πλάκες παρεμποδίζουν μηχανικά κατά ένα βαθμό την έμπαρση του πηκτοειδούς πυρήνα στο σπογγώδες σπονδυλικό σώμα [3,13-15].

Η εμβιομηχανική συμπεριφορά του δίσκου εξαρτάται από την αρμονική λειτουργία των χόνδρινων τελικών πλακών. Από διάφορες μελέτες έχει φανεί ότι οι τελικές πλάκες με την εφαρμογή του φορτίου υφίστανται σημαντική και άμεση παραμόρφωση επιτρέποντας την ομαλή κατανομή των φορτίων στον πηκτοειδή

πυρήνα και στον ινώδη δακτύλιο. Η εξομάλυνση των πιέσεων καθ' όλη την έκταση του μεσοσπονδυλίου δίσκου είναι απότοκη της αυξημένης διαβατότητας του ύδατος δια των τελικών πλακών, η οποία επιπλέον διευκολύνει την ανταλλαγή των θρεπτικών ουσιών και των προϊόντων αποδόμησης του μεταβολισμού.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου**

Η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου χαρακτηρίζεται ιστολογικά από αλλαγές σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Για παράδειγμα, προκύπτει αυξημένος πολλαπλασιασμός κυττάρων του δίσκου και σχηματισμός συστάδων κυττάρων, καθώς και αυξημένος κυτταρικός θάνατος (πιθανώς τόσο από απόπτωση όσο και νέκρωση). Επίσης παρατηρήθηκαν μοριακές μεταβολές, όπως η αυξημένη παραγωγή κυτοκινών και ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (π.χ., μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [MMPs]). Διαφορετικοί τύποι δομικών μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μπορούν να παραχθούν, όπως τύπου I, III, VI και X κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη, και αμυλοειδές ή μπορεί να μεταβληθεί η κατανομή τους. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες ελαττώνονται σε εκφύλιση του δίσκου (καθώς επίσης και με τη γήρανση), έτσι ώστε η χρώση με οποιαδήποτε μεταχρωματική χρώση (π.χ. τολουϊδίνη ή alcian blue) να μειώνεται [16-18].

Βιολογικά, τα κύτταρα του δίσκου ρυθμίζουν ενεργά την ομοιόσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού. Η διαμόρφωση του κυτταρικού μεταβολισμού του δίσκου περιλαμβάνει μια ποικιλία μορίων (π.χ., κυτοκίνες, ένζυμα, αναστολείς ενζύμων, και αυξητικούς παράγοντες) που δρουν με παρακρινή ή/και αυτοκρινή τρόπο. Η εκφύλιση μπορεί να προκύψει από την απώλεια της σταθερής κατάστασης του μεταβολισμού, που διατηρείται σε κανονικούς δίσκους, λόγω μιας ανισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και καταβολικών διαδικασιών. Στην πρώιμη εκφύλιση του δίσκου, υπάρχουν αλλαγές στη θεμέλια ουσία του πηκτοειδούς πυρήνα και του εσωτερικού ινώδους δακτυλίου. Αυτό θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα μιας αλλαγής

της ισορροπίας των αναβολικών και καταβολικών δραστηριοτήτων και μετάβασης προς μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι φλεγμονώδεις διεργασίες αποδομούν τη θεμέλια ουσία.

Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα του δίσκου είναι ικανά να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ιντελευκίνη II-1, II-4, II-6, II-8, II-12, II-17, ιντερφερόνη-  $\gamma$ , και παράγοντα νέκρωσης όγκου- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [1,16,17]. Αυτές σε συνδυασμό με τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων του δίσκου, όπως το γαλακτικό οξύ, μπορεί να έχουν βλαπτική επίδραση. Πιθανόν ο δισκικός πόνος να οφείλεται στη διέγερση υποδοχέων του εξωτερικού ινώδους δακτυλίου και των τελικών πλακών από τέτοιες ουσίες. Αυτές οι διαλυμένες ουσίες κυμαίνονται σε μέγεθος από πολύ μικρές (π.χ. NO) μέχρι της τάξης των μερικών εκατοντάδων (π.χ. προσταγλανδίνες) και δεκάδων χιλιάδων Dalton όπως στις κυτοκίνες. Μπορούν να μεταφερθούν από το κέντρο του πηκτοειδούς πυρήνα στις τελικές κινητικές πλάκες μόνο με διάχυση [58]. Επομένως, αυτού του είδους οι ουσίες θα μπορούσαν να διαχέονται ελεύθερα από την πηγή παραγωγής τους εντός του δίσκου, σε υποδοχείς στον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο και στις τελικές κινητικές πλάκες. Επιπλέον, τα εσωτερικά και σε μικρότερο βαθμό τα εξωτερικά κύτταρα του ινώδους δακτυλίου, μπορούν επίσης να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες II-1 και TNF- $\alpha$ , από τις οποίες ειδικά η τελευταία έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται άμεσα στη σηματοδότηση του πόνου λόγω ευαισθητοποίησης [16-20].

Οι αναβολικοί ρυθμιστές περιλαμβάνουν παράγοντες ανάπτυξης πολυπεπτιδίων, όπως τον παράγοντα ανάπτυξης που μοιάζει με ινσουλίνη (IGF-1), τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), καθώς και τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs). Οι καταβολικοί ρυθμιστές περιλαμβάνουν πολλές κυτοκίνες, ιδίως ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- $\alpha$ ), οι οποίες επηρεάζουν τη σύνθεση των ενζύμων που διασπούν τη θεμέλια ουσία, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) [20-23].

Αρκετοί αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες μπορούν να αλλάξουν την ομοιόσταση του δίσκου και να διεγείρουν την σύνθεση ECM μετατοπίζοντας τον κυτταρικό μεταβολισμό σε μια πιο αναβολική κατάσταση. Οι επιπτώσεις του TGF- $\beta$  στη σύνθεση PG, και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων επισημάνθηκαν νωρίς στη βιβλιογραφία. Έχουν σημειωθεί, επίσης, παρόμοιες επιπτώσεις της IGF-1. Η IGF-1 και ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) έχουν αποδειχθεί ότι

μειώνουν το ποσοστό της απόπτωσης κυττάρων του ινώδους δακτυλίου, που προκαλούνται από μείωση του ορού στην καλλιέργεια [24-26].

Οι διαταραχές τόσο στις αναβολικές όσο και στις καταβολικές διεργασίες πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της εκφύλισης. Οι βιοχημικές διεργασίες που ρυθμίζουν αυτές τις αλλαγές παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην κατανόηση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών για την εκφύλιση δίσκου. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η εκφύλιση από παρακέντηση, μαχαιριά ή ανώμαλη μηχανική φόρτιση, στο δίσκο εκφράζονται κυτοκίνες και πρωτεΐνες. Ενώ τα μακροφάγα που διηθούν τον ιστό του δίσκου ή τον κοκκιώδη ιστό φαίνεται να είναι η κύρια πηγή αυτών των κυτοκινών, μελέτες δείχνουν σαφώς ότι τα κύτταρα του δίσκου μπορούν επίσης να συνθέσουν αυτά τα μόρια με αυτοκρινή τρόπο. Ειδικότερα, οι αυξήσεις σε επίπεδα πρωτεϊνών και mRNA, στα επίπεδα IL-1 αλλά και TNF- $\alpha$ , έχουν παρατηρηθεί σε εκφυλισμένους δίσκους και αμφότερα εκφράζονται αυθόρμητα από αυτούς τους ιστούς σε καλλιέργεια [27-29].

Οι καταβολικές διαδικασίες που επάγονται από κυτοκίνες προκαλούνται από διάφορα ένζυμα, όπως τα MMP ή οι αγκρεκανάσες. Η IL-1 έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει την εκφύλιση της θεμέλιας ουσίας αλλά και αναστέλλει τη σύνθεση των μακρομορίων της εξωκυττάριας ουσίας, με ελάχιστη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η IL-1 προκάλει την παραγωγή κολλαγενάσης, κυκλοοξυγενάσης-2, προσταγλανδίνης E2, οξειδίου του αζώτου, MMP-1, ολικών και ενεργών MMPs, αγκρεκανάσης και άλλων ουσιών. Πρόσφατα, η IL-1 $\beta$  αποδείχθηκε ότι αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων του εκφυλισμένου δίσκου στη διάτμηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η κυτοκίνη εμπλέκεται στην επιτάχυνση των διαδικασιών εκφύλισης στους δίσκους που υπόκεινται σε βιο-μηχανική καταπόνηση. Αν και η IL-1 επηρεάζει τόσο συνθετικές διαδικασίες όσο και διαδικασίες εκφύλισης, αξίζει να σημειωθεί ότι, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η IL-1 είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην αναστολή της σύνθεσης αγκρεκάνης, από ότι στη διέγερση της εκφύλισης της στον αρθρικό χόνδρο. Μια επιδημιολογική μελέτη έχει δείξει ότι η πολυμορφισμοί γονιδίων IL-1 αύξησαν σημαντικά τον κίνδυνο εκφύλισης δίσκου. Αυτό διαφώτισε περισσότερο την ενδεχόμενη εμπλοκή της IL-1 στην εκφύλιση [22,23,30,31].

Τα αποτελέσματα της αναστολής των καταβολικών κυτοκινών έχουν αξιολογηθεί σε μια σειρά μελετών. Ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra), που εφαρμόστηκε *in vitro* σε εκφυλισμένους ανθρώπινους δίσκους μείωσε την



έκφραση MMP. Η προεπεξεργασία των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα με IL-1ra από μετρία εκφυλισμένους ανθρώπινους δίσκους μείωσε την έκφραση των MMP-3 όταν ακολούθησε έκθεσή τους σε IL-1 [32]. Σε μια άλλη μελέτη καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων, η προσθήκη της IL-1ra και του διαλυτού υποδοχέα του TNF αυξορρύθμισε σημαντικά την σύνθεση πρωτεογλυκάνων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η IL-1 και η TNF καταστέλλουν την *de novo* σύνθεση PG[33]. Η IL-1ra και άλλοι παράγοντες μπορεί να έχουν ισχυρότερη δράση εάν χορηγηθούν μαζί με παράγοντες βραδείας αποδέσμευσης, όπως η IL-1ra μαζί με φωτοπλεγματοποιήσιμη υδρογέλη απόκρισης στη θερμότητα (ELP) ή με ζελατινική υδρογέλη.

Εκτός από την IL-1, αντικείμενο έρευνας υπήρξε και ο TNF-α σε σχέση με την κήλη μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η αναστολή του TNF-α, με τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος σε εμφυτεύματα ανθρώπινης δισκοκήλης, έδειξε καταστολή των επιπέδων MMP-3. Άλλοι αντι-TNF παράγοντες έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται για τη μείωση του πόνου σε ασθενείς με ισχιαλγία και δισκογενή πόνο. Θεραπευτικές αντι-κυτοκίνες περιλαμβάνουν τον αναστολέα της p38 πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνα (MAPK), που παρεμποδίζει τις καταβολικές επιδράσεις της IL-1, καθώς και το ομοίωμα του πυρηνικού παράγοντα kappaB (NF-κB) που μείωσε τον πόνο σε μοντέλο οσφυϊκής δισκοκήλης αρουραίου [31].

Ο TNF-α είναι από τους γνωστότερους διαμεσολαβητές στη διαδικασία της φλεγμονής και ανήκει στην κατηγορία των κυτοκινών. Συμβάλλει κατά πολύ στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών ιστολογικών μεταβολών που προκαλεί η παρουσία του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου στο γάγγλιο της νωτιαίας ρίζας και στις περιφερικές νευρικές ίνες. Ο TNF-α παράγεται κυρίως από λευκοκύτταρα αλλά και από άλλους τύπους κυττάρων ακόμη και από τα κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα. Η παρουσία του προκαλεί βλάβη του νευράξονα και του ελύτρου της μυελίνης, ενδαγειακή πήξη και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Ο TNF-α έχει επίσης νευροτοξική δράση και προκαλεί έκτοπη νευρική δραστηριότητα και πόνο όταν έρχεται σε άμεση επαφή με τις νευρικές ίνες [1].

Ο TNF-α είναι παρών στο υλικό των εκφυλισμένων δίσκων και κατέχει κεντρικό ρόλο στην αλυσίδα των παθοφυσιολογικών μεταβολών που προκαλεί η παρουσία υλικού του πηκτοειδούς πυρήνα εγγύς των νευρικών στοιχείων. Οι εκλεκτικοί αναστολείς του TNF-α, όπως τα στεροειδή και η κυκλοσπορίνη A, είναι ικανοί να βελτιώσουν τη βλαπτική δράση του υλικού του εκφυλισμένου δίσκου στα

νευρικά στοιχεία, πράγμα που ελάχιστα επιτυγχάνουν τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Στον TNF-α είναι δυνατό να αποδοθεί ένας ρόλος – κλειδί στην αλυσίδα των παθοφυσιολογικών μεταβολών που προκαλεί η παρουσία υλικού του πηκτοειδούς πυρήνα εγγύς των νευρικών στοιχείων [1].

Κεντρικό ρόλο στη μείωση της περιεκτικότητας του πηκτοειδούς πυρήνα σε πρωτεογλυκάνες, η οποία συνδέεται με την εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου, έχει ο αυξημένος καταβολισμός των μορίων αυτών στον πηκτοειδή πυρήνα. Για την αποδόμηση των πρωτεογλυκανών ευθύνεται ομάδα ενζύμων, που ονομάζονται μεταλλοπρωτεϊνάσεις του στρώματος (MMPs). Είναι πρωτεΐνες εξαρτώμενες από τον ψευδάργυρο και διασπών διάφορα συστατικά του στρώματος. Οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) είναι ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες αναστέλλουν το μηχανισμό αποδόμησης του στρώματος από τις μεταλλοπρωτεϊνάσεις. Έχει δειχθεί ότι η ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο ομάδων πρωτεϊνών ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογική σύσταση του στρώματος σε πρωτεογλυκάνες. Η αυξημένη έκφραση των TIMPs στον πηκτοειδή πυρήνα μαζί με την μειωμένη δραστηριότητα των MMPs έχει αποτέλεσμα την αυξημένη περιεκτικότητα του πηκτοειδούς πυρήνα σε πρωτεογλυκάνες. Αυξημένη έκφραση των MMPs και μείωση των TIMPs επιταχύνει τον καταβολισμό των πρωτεογλυκανών. Η αναλογία των δύο αυτών ομάδων πρωτεϊνών στον μεσοσπονδύλιο δίσκο ρυθμίζεται από φυσικούς παράγοντες (όπως το επίπεδο της υδροστατικής πίεσης) και από κυτοκίνες. Σε εκφυλιστικές καταστάσεις του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει δειχθεί η αυξημένη έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος 1,2,3 και 9 και λιγότερο των MMP-7 και 8. Η έκφραση των TIMP1 και TIMP2 είναι μειωμένη στους εκφυλισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους [1,34,35].

Η οστεογενετική πρωτεΐνη-1 (OP-1), μέλος της οικογένειας BMP, αυξορρυθμίζει τον μεταβολισμό των πρωτεογλυκανών των κυττάρων του δίσκου. Η OP-1 διέγερει έντονα την παραγωγή και τον σχηματισμό της εξωκυτταρίου ουσίας σε κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου από κουνέλι. Έχουν σημειωθεί παρόμοιες δράσεις χρησιμοποιώντας κύτταρα ανθρώπινου δίσκου. Η OP-1 επίσης αναπλήρωσε τα επίπεδα πρωτεογλυκάνης και κολλαγόνου μετά τη μείωση της ECM ύστερα από έκθεση των κυττάρων του δίσκου στην IL-1 ή στην χονδροϊτινάση ABC (C-ABC) [36].

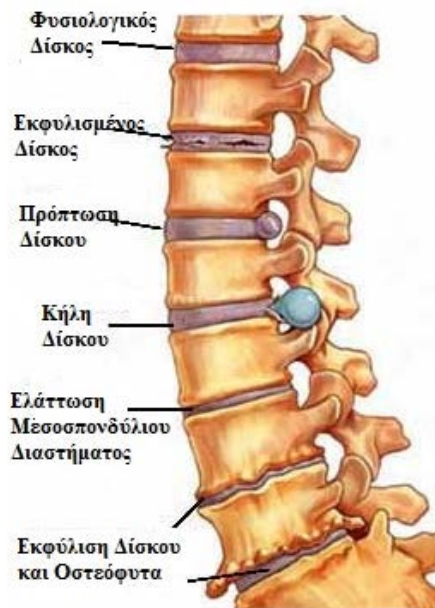
Με την πάροδο της ηλικίας επέρχονται έντονες αλλαγές στη σύνθεση της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας του δίσκου. Η μείωση του περιεχομένου σε αγκρεκάνη

(ή συσσωρευτική) στον NP οδηγεί σε μειωμένη ενυδάτωση, με αποτέλεσμα την εξασθενημένη μηχανική λειτουργία. Ένας αφυδατωμένος και περισσότερο ινώδης πηκτοειδής πυρήνας δεν είναι ικανός να κατανείμει ομοιόμορφα τις συμπιεστικές δυνάμεις ανάμεσα στα σπονδυλικά σώματα. Αντί γι' αυτό, οι δυνάμεις μεταφέρονται ανομοιόμορφα στον περιβάλλοντα ινώδη δακτύλιο, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιωμένες μηχανικές ιδιότητες του δακτυλίου και προοδευτική δομική επιδείνωση, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού περιφερειακών και ακτινωτών ρήξεων των ινών του. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι ακτινωτές ρήξεις μπορεί να εξελιχθούν σε μια οπίσθια κυκλοτερή προβολή του υλικού του πυρήνα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επώδυνων συμπτωμάτων. Το μειωμένο ύψος του δίσκου συνδέεται συνήθως και με την προχωρημένη εκφύλιση του δίσκου και οδηγεί σε επώδυνη συμπίεση των πέριξ δομών.

Αν και η μηχανική διέγερση είναι σε κάποιο βαθμό απαραίτητη για να επαγάγει τη διάχυση θρεπτικών ουσιών και να προαγάγει τη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η υπερβολική φόρτιση μπορεί να οδηγήσει σε εντοπισμένη ιστική βλάβη της οποίας η επισκευή γίνεται με αργό ρυθμό και μεταβάλλει τη κατανομή των πιέσεων σε όλη την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ολόκληρου του δίσκου [37-40].

Κατά την εκφύλιση του δίσκου επέρχονται διάφορες ανατομικές αλλαγές που αποτυπώνονται με απεικονιστικές μεθόδους. Η στένωση του μεσοσπονδύλιου διαστήματος και η εμφάνιση οστεοφύτων στην περιφέρεια, στα σημεία πρόσφυσης του δίσκου με τα σπονδυλικά σώματα, αποτελούν ακτινολογικά ευρήματα της εκφύλισης του δίσκου. Συχνό επίσης εύρημα σε αξονική τομογραφία είναι το φαινόμενο κενού στο μεσοσπονδύλιο διάστημα που οφείλεται σε μικρή συλλογή αερίου [1].

Τέλος, κληρονομικοί παράγοντες παίζουν επίσης ρόλο στην ευαισθησία ενός ατόμου ως προς την εκφύλιση του δίσκου. Μελέτες σε διδύμους δείχνουν ότι γενετικοί παράγοντες προδιαθέτουν τα άτομα για εκφύλιση δίσκου. Πληθυσμιακές μελέτες για υποψήφια γονίδια και αναλύσεις του γονιδιώματος προωθούν αυτή την ιδέα, αλλά το γεγονός ότι η εκφύλιση του δίσκου είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία και η απαίτηση για μεγάλα μεγέθη δείγματος σε τέτοιου είδους μελέτες, κάνουν τις γενετικές αναλύσεις μια πρόκληση. Επιπλέον, το κόστος της ανάληψης έργου γονιδιακής ανάλυσης (με PCR ή μικροσυστοιχίες) για χιλιάδες άτομα, γίνεται απαγορευτικά υψηλό [41-43].



**Εικ 6. Παραδείγματα προβλημάτων του μεσοσπονδύλιου δίσκου**

***Σύστημα αξιολόγησης τη εκφύλισης του δίσκου με τη βοήθεια της μαγνητικής τομογραφίας [44]***

Η σύγχρονη απεικονιστική τεχνολογία προσφέρει εξαιρετικής ποιότητας ανατομικές εικόνες, οι οποίες στην περίπτωση της εκφύλισης του δίσκου, μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για την ταξινόμηση του βαθμού εκφύλισής του :

σταδιο I: Η δομή του δίσκου είναι ομοιογενής, με υψηλής έντασης σήμα (έντονα λευκή απεικόνιση σε ακολουθία T2) και φυσιολογικό ύψος δίσκου

σταδιο II: Η δομή του δίσκου είναι ανομοιογενής, με υψηλής έντασης σήμα (λευκό). Η διάκριση μεταξύ πυρήνα και δακτυλίου είναι σαφής και το ύψος του δίσκου είναι φυσιολογικό, με ή χωρίς οριζόντιες γκρι ζώνες.

σταδιο III: Η δομή του δίσκου είναι ανομοιογενής, με ενδιάμεσης έντασης σήμα (γκρι χρώμα). Η διάκριση μεταξύ πυρήνα και δακτυλίου είναι *ασαφής* και το ύψος του δίσκου είναι φυσιολογικό ή ελαφρώς ελαττωμένο.

σταδιο IV: Η δομή του δίσκου είναι ανομοιογενής, με χαμηλής έντασης σήμα (σκούρο γκρι χρώμα). Η διάκριση μεταξύ πυρήνα και δακτυλίου είναι *δεν υπάρχει* και το ύψος του δίσκου είναι φυσιολογικό ή μέτρια ελαττωμένο.

σταδιο V: Η δομή του δίσκου είναι ανομοιογενής, με χαμηλής έντασης σήμα (μαύρο χρώμα). Η διάκριση μεταξύ πυρήνα και δακτυλίου δεν υπάρχει και το μεσοσπονδύλιο διάστημα έχει ελαττωθεί.

## 2.1 Συνοπτικά οι αυξητικοί παράγοντες και η δράση τους στο δίσκο

Συγκεντρωτικά, οι αυξητικοί παράγοντες που έχουν δράση στα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου είναι οι εξής:

- IGF-1 (Insulin like growth factor)
- b FGF, FGF-2 (basic Fibroblast growth factor)
- BMP-2, BMP-4 (bone morphogenetic protein 2, 4)
- OP-1( osteogenetic protein)
- TGF-B, TGF1, TGF 2(transforming growth factor)
- GDF-5( growth differentiation factor 5)
- PDGF (platelet derived growth factor)
- EGF(epidermal growth factor)

### **IGF-1** (Insulin like growth factor)

Ο IGF-1 αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανων στον αρθρικό χόνδρο. Μεταφέρεται στο μεσοσπονδύλιο δίσκο μέ αυτοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμούς. Με την αύξηση της ηλικίας παρατηρείται ελάττωση των υποδοχέων και μειωμένη απάντηση στη δράση του. In vitro μελέτες έδειξαν ότι ο IGF-1 αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανων στα κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου και μειώνει το ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων. In vivo έρευνες σε κουνέλια έδειξαν αποκατάσταση του ύψους του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου με τη δράση του IGF-1 [45].

### **b FGF**, FGF-2 (basic Fibroblast growth factor)

Ο b FGF είναι ρυθμιστής του μεταβολισμού των πρωτεογλυκανων στον αρθρικό χόνδρο, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και διεγείρει την παραγωγή ενζύμων διάσπασης του χόνδρου(κολλαγενασες). Φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διαδικασία αποκατάστασης μετά από τραυματισμό. Στο μεσοσπονδύλιο δίσκο παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού και έχει αποδειχθεί in vitro

ότι αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανων του δίσκου. Επίσης διατηρεί τη δυνατότητα των κυττάρων του ηκτηοειδούς πυρήνα να απαντούν στα ερεθίσματα από την επίδραση άλλων αυξητικών παραγόντων [46,47].

#### **BMP-2, BMP-4** (bone morphogenetic protein 2, 4)

Η BMP-2, BMP-4 επηρεάζουν τον μεταβολισμό των κύτταρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Σε *in vitro* έρευνες βρέθηκε ότι η δράση τους αυξάνει τη σύνθεση κολλαγόνου και πρωτεογλυκανων. Επίσης προκαλούν αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του δίσκου. *In vivo* έρευνες έδειξαν ότι η ενδοδισκική έγχυση BMP-2 σε τραυματισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους κουνελιών αυξάνει την αγγειογεννεση και τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών [48-50]

#### **OP-1** (osteogenetic protein)

Η OP-1 έχει δράση στο μεταβολισμό των πρωτεογλυκανων και του κολλαγόνου του δίσκου. Έχει αποδειχθεί η *in vitro* αύξηση της περιεκτικότητας του δίσκου σε πρωτεογλυκανες μετά την επίδραση της OP-1 καθώς και η ανακατασκευή του δικτύου [51,52]. Σε *in vivo* έρευνες σε κονίκλους, βρέθηκε αύξηση της περιεκτικότητας του δίσκου σε πρωτεογλυκανες μετά την ενδοδισκική έγχυση OP-1 και αποκατάσταση του ύψους του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου, καθώς και αποκατάσταση των βιομηχανικών χαρακτηριστικών του δίσκου [53,54].

#### **TGF-B, TGF1, TGF 2**(transforming growth factor)

Ο TGF-B συμμετέχει στον μεταβολισμό των πρωτεογλυκανων του αρθρικού χόνδρου και επηρεάζει των κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην διαδικασία αποκατάστασης μετά από τραυματισμούς. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι ο TGF-B αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανων σε κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. *In vivo* έρευνες σε κουνέλια έδειξαν αποκατάσταση του ύψους του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου με τη δράση του TGF-β [55].

#### **GDF-5** (growth differentiation factor 5)

*In vivo* έρευνες σε κουνέλια έδειξαν αποκατάσταση του ύψους του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου με τη δράση του GDF-5 καθώς και πολλαπλασιασμό των κυττάρων του δίσκου [55,56].

**PDGF** (platelet derived growth factor)

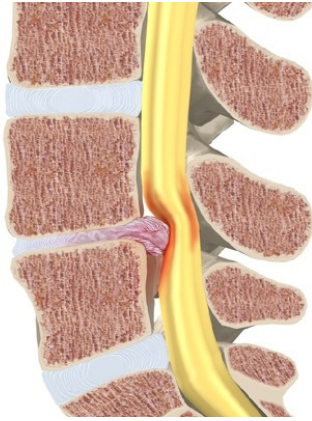
Ο PDGF συμμετέχει στην επούλωση των τραυμάτων. Αυξάνει τις μιτώσεις στα κύτταρα του συνδετικού ιστού (ινοβλαστες και ενδοθηλιακά κύτταρα). Στο χόνδρο διεγείρει τη σύνθεση πρωτεογλυκανων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε in vitro έρευνες προκαλεί ελάττωση του ρυθμού απόπτωσης των κυττάρων του δίσκου [47,54,57].

**EGF**(epidermal growth factor)

Ο EGF διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο χόνδρο και συμμετέχει στην επούλωση των τραυμάτων. In vitro μελέτες έδειξαν ότι ο EGF αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανων σε κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου και διεγείρει των πολλαπλασιασμό των κυττάρων [58].

**2.2 Κήλη μεσοσπονδυλίου δίσκου**

Η ιστολογία της κήλης των μεσοσπονδύλιων δίσκων είναι αρκετά μεταβλητή, όπως είναι και ο βαθμός δομικής βλάβης, που κυμαίνεται από προπτώσεις (όταν τα εξωτερικά δακτυλιοειδή ελάσματα παραμείνουν ανέπαφα) και εκβολές (όταν διαρρηγνύονται), έως αποσπασθείσες δισκοκήλες (στην οποία η κήλη αποσπάται εντελώς από το σώμα του δίσκου). Η μορφολογία όλων αυτών των κηλών μπορεί να είναι πολύ ετερογενής και ενδέχεται να περιλαμβάνει ιστό που φαίνεται να προέρχεται από τον πηκτοειδή πυρήνα, τον ινώδη δακτύλιο ή και την τελική πλάκα του χόνδρου. Έχει βρεθεί ότι το ένα τρίτο περίπου των δειγμάτων έχουν την μορφολογία του ινώδους δακτυλίου· άλλο ένα τρίτο αυτή του πηκτοειδούς πυρήνα και ακόμα ένα τρίτο και των δύο. Επιπλέον, το 20% των δειγμάτων περιείχαν τμήματα της τελικής πλάκας του χόνδρου. Οι δίσκοι με κήλη είναι στην πλειονότητά τους συχνά πιο αγγειοβριθείς, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς. Έχουν επίσης υψηλότερη συχνότητα ανοσοθετικότητας για MMPs, ιδιαίτερα για τις MMP8 και MMP7 (τέσσερις και δύο φορές μεγαλύτερη από τους δίσκους της αυτοψίας, αντίστοιχα)[1,15,59].



**Εικ 7. Δισκοκήλη**

### **2.3 Κοινωνικοδημογραφικοί παράγοντες στην εκφύλιση του δίσκου**

Αναφορικά με τους κοινωνικούς και δημογραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την εκφύλιση του δίσκου, η ηλικία, το είδος της επαγγελματικής απασχόλησης και το κάπνισμα παίζουν σημαντικό ρόλο. Κατά τον Battie [60] το κάπνισμα έχει άμεση και συστηματική αρνητική επίδραση στους μεσοσπονδύλιους δίσκους. Ο αγγειόσπασμος και οι αρτηριοσκληρωτικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από αυτό επηρεάζουν την αιμάτωση των σπονδυλικών σωμάτων και των δομών που περιβάλλουν το δίσκο και συνεπώς το μεταβολισμό του δίσκου, επιταχύνοντας έτσι τη διαδικασία εκφύλισής του και αυξάνοντας τελικά τον κίνδυνο εμφάνισης δισκοκήλης.

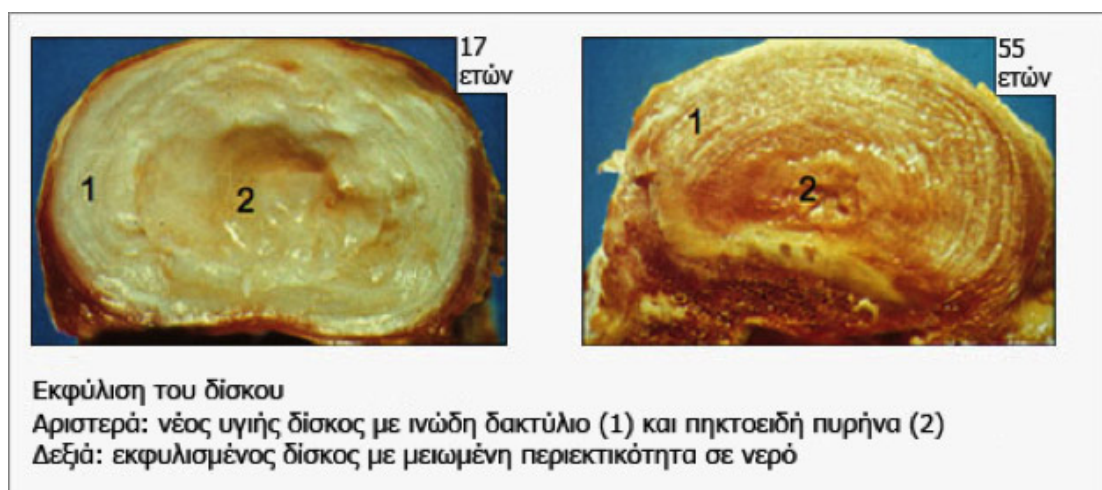
Άλλοι κοινωνικοδημογραφικοί (φύλο, ηλικία) και σωματομετρικοί (ύψος, βάρος, BMI) παράγοντες έχουν επίσης συσχετιστεί με την εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Μια έστω και μικρού βαθμού εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου παρατηρείται και στα δυο φύλα, ενώ σαφής συσχέτιση έχει αποδειχτεί μεταξύ της αύξησης της ηλικίας και της εκφύλισης του δίσκου. Οι Miller et al. [61] διερευνώντας τη συχνότητα εκφύλισης του δίσκου σε 600 πτωματικά παρασκευάσματα διαπίστωσαν ότι μετά την ηλικία των 49 ετών, το 79% των οσφυϊκών μεσοσπονδύλιων δίσκων παρουσίαζαν έστω μικρού βαθμού εκφύλιση, ενώ εκφυλιστικές αλλοιώσεις βρέθηκαν και σε δείγματα ηλικίας ατόμων 20-30 ετών. Πλέον θεωρείται βέβαιο ότι ο μεσοσπονδύλιος δίσκος υφίσταται εκφύλιση με την πάροδο του χρόνου. Η εκφύλιση αυτή φαίνεται ότι είναι ευθέως ανάλογη με την



ηλικία του ατόμου. Σε άτομα της ίδιας ηλικίας ο βαθμός της εκφύλισης υπερτερεί στον ανδρικό πληθυσμό. Το ίδιο ποσοστό εκφύλισης εμφανίζεται στις γυναίκες 10 χρόνια αργότερα σε σχέση με τους άνδρες.

Είναι επίσης γνωστό ότι δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση των κλινικών συμπτωμάτων με τα ακτινολογικά ευρήματα. Η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να εκδηλώνεται με χαμηλή οσφυαλγία ή/και ισχιαλγία,. Έτσι είναι δυνατόν να εμφανίζεται οσφυαλγία χωρίς ακτινολογικά σημεία εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου ή και το αντίθετο δηλαδή σημεία εκφύλισης του δίσκου χωρίς συμπτώματα οσφυαλγίας. Πιθανολογείται ότι τα συμπτωματικά άτομα έχουν μεσοσπονδύλιο δίσκο ο οποίος υφίσταται ταχύτερα εκφύλιση από την επίδραση ποικίλων παραγόντων.

Οι πιέσεις οι οποίες ασκούνται στο μεσοσπονδύλιο δίσκο ποικίλλουν ανάλογα με τη θέση του σώματος κατά την εφαρμογή τους, το είδος του εκτελούμενου έργου και τη συγκεκριμένη φάση εκτέλεσης αυτού. Επιβαρυντικοί παράγοντες στην εκφύλιση του δίσκου θεωρούνται κάποιες μορφές άθλησης (π.χ. άρση βαρών), οι κραδασμοί (χρήση αεροσυμπιεστών), η οδήγηση βαρέων οχημάτων και τα βαρέα επαγγέλματα όπως οι αγθοφόροι, οι λιγνιτωρύχοι κ.λπ. [1]



**Εικ 8. Οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο δίσκο με την πάροδο της ηλικίας**

## 2.4 Ζωικά μοντέλα εκφύλισης δίσκου

Πολλά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ποντικών, κονίκλων αρουραίων, προβάτων, σκυλιών και άλλων, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της εκφύλισης δίσκου. Σε γενικές γραμμές, τα πειραματικά μοντέλα μπορούν να χωριστούν σε 2 γενικές κατηγορίες: πειραματικά επαγόμενα και αυθόρμητα.

### Πειραματικά επαγόμενα μοντέλα

Αυτός ο τύπος μπορεί να διαχωριστεί σε μηχανικά και δομικά μοντέλα στα οποία η εκφύλιση προκαλείται από πειραματικές μεθόδους. Η αρχή είναι να προκληθεί εκφύλιση δίσκου προκαλώντας άμεση βλάβη στη δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Αν και αυτά τα μοντέλα είναι δημοφιλή, έχουν τους περιορισμούς τους, καθώς η εκφύλιση ανθρώπινου δίσκου είναι μια περίπλοκη νόσος που προκαλείται από διάφορους παράγοντες και δεν έχει αναπαραχθεί πλήρως στα χρησιμοποιούμενα μοντέλα σε πειραματόζωα [62-65].

### Μηχανικός τύπος

Σε αυτό το είδος μοντέλου, η εκφύλιση δίσκου προκαλείται από μηχανικές παρεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης/μείωσης φορτίου, της άσκησης ή της βλάβης του σώματος του σπονδύλου. Το 1957 ο Lindblom [62] κατασκεύασε ένα μοντέλο αρουραίου με σταθερή ουρά σε θέση σχήματος U, και παρατήρησε την εκφύλιση της κοίλης πλευράς του ινώδους δακτυλίου. Οι Maclean et al [63] παρατήρησαν συνολική μείωση του κολλαγόνου τύπου I και II και αύξηση της αγκρεκάνης, της ζελιτανάσης και της στρωμελυσίνης στον δακτύλιο τόσο στην ομάδα μελέτης όσο και στις ομάδες ελέγχου σε αρουραίους. Ο Phillips και οι συνεργάτες του [64] καθιέρωσαν ένα μοντέλο εκφύλισης δίσκου κουνελιού χρησιμοποιώντας σπονδυλοδεσία στα επίπεδα (L4-L5) και (L5-S1), για να μιμηθούν αυτό που παρατηρήθηκε στους ανθρώπους. Τα πειραματόζωα μελετήθηκαν έως και 9 μήνες μετά τη σπονδυλοδεσία. Τον τρίτο μήνα, παρατήρησαν απώλεια της φυσιολογικής παράλληλης διάταξης των ινών. Υπήρξε περαιτέρω αποδιοργάνωση κατά τον έκτο μήνα, ενώ κατά τον ένατο μήνα, η δομή του δίσκου είχε αντικατασταθεί από αποδιοργανωμένο ινώδη ιστό. Αυτός ο τύπος μοντέλου ζώου βασίζεται σε εμβιομηχανικούς παράγοντες. Η πίεση προκαλεί άμεση βλάβη στη δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου και οδηγεί σε εκφύλιση.

### **Δομικός τύπος**

Σε δομικά μοντέλα, η εκφύλιση προκαλείται από τον τραυματισμό της δομής του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Οι Osti et al [66] καθιέρωσαν ένα μοντέλο εκφύλισης δίσκου τραυματίζοντας χειρουργικά το πρόσθιο άκρο του ινώδους δακτυλίου σε πρόβατα. Παρατήρησαν μετεγχειρητικές αλλαγές σε μεσοσπονδύλιους δίσκους: Ο ινώδης δακτύλιος σχημάτισε κοκκιώδη ιστό στο εξωτερικό και ο έσω δακτύλιος έσπασε. Οι Fazzalari et al [67] τρύπησαν τον ινώδη δακτύλιο προβάτου και παρατήρησαν μηχανικές αλλαγές στο πάχος του, ενώ οι Anderson et al [68] ενέχυσαν θραύσματα φιμπρονεκτίνης και φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) σε μεσοσπονδύλιους δίσκους κουνελιού. Τα ζώα θανατώθηκαν 2, 4, 8, ή 12 εβδομάδες μετά την επέμβαση και η ιστολογική εξέταση αποκάλυψε μια προοδευτική απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του πηκτοειδούς πυρήνα και του ινώδους δακτυλίου κατά την περίοδο μελέτης των 16 εβδομάδων. Τα δομικού τύπου μοντέλα προκαλούν άμεσα βλάβη στη δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου, για την επίτευξη της εκφύλισης. Είναι σχετικά χαμηλού κόστους και είναι εύκολα αναπαραγώγιμα. Ωστόσο, οι περιορισμοί τους περιλαμβάνουν τη χρήση ενός μόνο παθογόνου παράγοντα για να μιμηθεί μια πολύπλοκη παθολογική διαδικασία και την ανάγκη για χειρουργική επέμβαση.

### **Αυθόρμητος τύπος**

Σε αυτό το είδος ζωικού μοντέλου, η εκφύλιση δίσκου είναι μια αυθόρμητη φυσική διαδικασία και ως εκ τούτου είναι πιο κοντά στην εκφύλιση ανθρώπινου μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ο αρουραίος άμμου χρησιμοποιείται πιο συχνά ως αυθόρμητο μοντέλο εκφύλισης. Οι Silberberg et al [69] περιέγραψαν για πρώτη φορά τις αλλαγές σε μεσοσπονδύλιους δίσκους αρουραίων άμμου το 1979. Παρατήρησαν κυτταρική απόπτωση της νωτιαίας χορδής, σκλήρυνση τελικής κινητικής πλάκας, δακτυλιοειδή διάσπαση και σχηματισμό περιφερειακών οστεόφυτων στην πλειονότητα των αρουραίων άμμου ηλικίας 18 - 30 μηνών. Οι Gruber et al [70] παρατήρησαν διογκωμένους δίσκους κατά τη διάρκεια παρακολούθησης 6 - 12 εβδομάδων και οσφυϊκή ασβεστοποίηση τελικής κινητικής πλάκας σε ζώα ηλικίας 12 μηνών. Βρήκαν στένωση και διόγκωση των μεσοσπονδύλιων δίσκων στην πλειονότητα των αρουραίων. Αν και αυτό το μοντέλο μοιάζει περισσότερο με ότι συμβαίνει στους ανθρώπους στο ότι είναι αυθόρμητο, έχει τους δικούς του

περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της περιορισμένης επιλογής ειδών ζώων, ασαφές μηχανισμό εκφύλισης, και δυσκολίες πρόβλεψης εκφυλιστικής συχνότητας. Για τους λόγους αυτούς, η δυνατότητα εφαρμογής αυτών των μοντέλων ζώων είναι περιορισμένη.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην εκφύλιση του δίσκου**

#### **3.1. Αιμοπετάλια**

Τα αιμοπετάλια του αίματος (θρομβοκύτταρα) είναι απύρρηνα δισκοειδή σωματίδια με διάμετρο 2-5  $\mu\text{m}$ . Πρόκειται για κυτταρικά θραύσματα που προέρχονται από τον κατακερματισμό του κυτταροπλάσματος ενός γιγαντιαίου πολυπλοειδικού κυττάρου, του μεγακαρυοκυττάρου. Τα μεγακαρυοκύτταρα εδράζονται στο μυελό των οστών. Σε χρωματισμένα επιχρίσματα αίματος τα αιμοπετάλια συχνά εμφανίζονται κατά σωρούς. Εξαιτίας της τάσης τους για συγκόλληση, η ακριβής αρίθμηση των αιμοπεταλίων είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί. Κατά συνέπεια, η αναφερόμενη φυσιολογική συγκέντρωση στο αίμα του ανθρώπου έχει μεγάλες διακυμάνσεις. Οι φυσιολογικές τιμές ποικίλλουν από 200.000 - 400.000 κατά κυβ. χιλ. αίματος. Μετά την είσοδό τους στην κυκλοφορία τα αιμοπετάλια έχουν διάρκεια ζωής 10 περίπου ημερών. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από την ορμόνη θρομβοποιητίνη.. Κάθε αιμοπετάλιο έχει δύο ομόκεντρες ζώνες, μια περιφερική αραιοχρωματική, κυανίζουσα διαφανή ζώνη που ονομάζεται υαλομερές και μια κεντρική πυκνότερη ζώνη που ονομάζεται κοκκιομερές και που περιέχει πορφυρά κοκκία. Σε φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τα αδρανή αιμοπετάλια έχουν λείο δισκοειδές σχήμα, ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αναπτύσσουν άφθονες λεπτές μακριές κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Πρόκειται για φυλλοειδείς αποφυάδες που εκτείνονται από το υαλομερές και δίνουν ανώμαλη όψη στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου [71-73].

Η υπερδομή του αιμοπεταλίου εικονίζεται σχηματικά στην εικ 8. Τα αιμοπετάλια περιέχουν ένα σύστημα αγωγών, που ονομάζεται ανοικτό σύστημα αγωγών και ενώνεται με εκκολπώσεις της πλασματικής μεμβράνης του αιμοπεταλίου. Αυτή η διάταξη έχει πιθανόν λειτουργική σημασία ευκολύνοντας την απελευθέρωση δραστικών μορίων που αποθηκεύονται στα αιμοπετάλια. Οι φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης σε οριζόντια τομή αποκαλύπτουν μια περιφερική ζώνη 10-15 μικροσωληνίσκων στο υαλομερές, αμέσως κάτω από τη μεμβράνη (εικ. 9). Οι μικροσωληνίσκοι βοηθούν στη διατήρηση του ωοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων και αποπολυμερίζονται σε στοιχεία νηματίων, κατά την έναρξη της συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Βαθύτερα της περιφερικής ζώνης των μικροσωληνίσκων υπάρχει ένα πυκνό σωληναριακό σύστημα, εκτεινόμενο σ' όλο το υαλομερές, που αποτελείται από στενά μεμβρανικά σωληνάκια και περιέχει μια ομοιογενή, ηλεκτρονικά αδιαφανή ουσία. Ιστοχημικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα ειδικό αιμοπεταλιακό ισοένζυμο υπεροξειδάσης που πιθανόν να σχετίζεται με τη σύνθεση προσταγλανδινών [71-73].

Μικρονημάτια που περιέχουν ακτίνη στο υαλομερές λειτουργούν για τον σχηματισμό φυλλοποδίων και επιφανειακών προσεκβολών κατά την κίνηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων. Η ακτίνη φυσιολογικά βρίσκεται υπό τη μορφή μονομερών, αλλά μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη διεργασία της πήξης του αίματος, η ακτίνη πολυμερίζεται σε νημάτια και αλληλεπιδρά με τη μυοσίνη για το σχηματισμό ενός συσταλτού συστήματος. Το σύστημα αυτό, στο οποίο συμμετέχουν κι άλλα ινιδικά στοιχεία, εμπλέκεται στην κίνηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και στη λειτουργία της συστολής του θρόμβου και εξώθησης του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Το σύνολο των συσταλών πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων αναφέρεται και ως θρομβοσθενίνη [71-73].

Το κεντρικό κοκκιομερές περιέχει μια ποικιλία από κοκκία που περιβάλλονται από μεμβράνη και μικρό αριθμό μιτοχονδρίων και κοκκίων γλυκογόνου. Πυκνά σωμάτια ( $\delta$ - κοκκία) με διάμετρο 250-300nm περιέχουν ιόντα ασβεστίου, πυροφωσφορικό, ADP και ATP. Αυτά τα κοκκία προσλαμβάνουν επίσης και αποταμιεύουν σεροτονίνη (5 υδροξυτρυπταμίνη) από το πλάσμα. Τα  $\alpha$ - κοκκία είναι λίγο μεγαλύτερα (300-500 nm διάμετρος) και περιέχουν ινωδογόνο, αυξητικούς παράγοντες και αρκετές άλλες ειδικές πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων. Πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν τα  $\lambda$ - κοκκία, μικρά κυστίδια με διάμετρο 175-250 nm που φάνηκε

πως περιέχουν μόνο ένζυμα λυσοσωματίων. Τα περισσότερα από τα αζουρόφιλα κοκκία που φαίνονται με το φωτοmikροσκόπιο σαν κοκκιομερές των αιμοπεταλίων είναι α- κοκκία.

Αναλυτικά, τα χαρακτηριστικότερα τέσσερα είδη των κοκκίων των αιμοπεταλίων και το περιεχόμενό τους έχουν ως εξής :

- Τα **α κοκκία** που ποικίλλουν σε μέγεθος και σχήμα με διάμετρο 300-500 nm . Τα περισσότερα από τα αζουρόφιλα κοκκία που διακρίνονται με το φωτοmikροσκόπιο στο κοκκιομερές είναι α κοκκία. Τα κοκκία αυτά περιέχουν αρκετές ουσίες σημαντικές για την πήξη του αίματος, όπως:

Τον *αιμοπεταλιακό παράγοντα 4*, που εξουδετερώνει την αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης, ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα, την κινητοποίηση του ασβεστίου από τα οστά και τη χημειοταξία μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων.

Τον *παράγοντα VIII / παράγοντα von Willebrand* , μια γλυκοπρωτεΐνη που επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις θέσεις βλάβης του τοιχώματος των αγγείων.

Τον *αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλιακής προέλευσης* , που εμπλέκεται στην έναρξη της διεργασίας για την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων αγγείων.

Άλλους παράγοντες πήξης (*ινωδογόνο, παράγοντα V*).

Άλλες πρωτεΐνες, όπως *ινονεκτίνη* και *θρομβοσπονδίνη* . Η τελευταία αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για τη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων στη διεργασία της πήξης.

*Θρομβοσφαιρίνη B* , η δράση της οποίας είναι άγνωστη, αλλά τα επίπεδά της στο ορό χρησιμεύουν στην παρακολούθηση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

*Αυξητικοί παράγοντες*: Οι αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται επίσης από τα α – κοκκία. Πρόκειται για παράγοντες όπως ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (IGF-1), ο τροποποιητικός (TGF), ο αιμοπεταλιακός (PDGF), ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας των αγγείων, ο επιδερμοειδής (EGF) και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (b-FGF). Είναι μικρά πεπτίδια τα οποία συνδέονται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και διεγείρουν μια σειρά βιολογικών μηχανισμών, συμβάλλοντας στην αγγειογένεση, την επιθηλιοποίηση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών, την παραγωγή κολλαγόνου και γενικά στην ανακατασκευή των ιστών.

- **Πυκνά κοκκία (  $\delta$  κοκκία**, διάμετρος 250-300nm), που είναι ηλεκτρονιοπυκνωτικά και περιέχουν σεροτονίνη, ιόντα ασβεστίου, πυροφωσφορικό, ADP και ATP . Η σεροτονίνη δεν παράγεται στα αιμοπετάλια, αλλά απορροφάται από το πλάσμα. Οι παραπάνω ουσίες αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.
- **Λυσοσώματα (  $\lambda$  κοκκία**, διάμετρος 175-250nm), που είναι κυστίδια με λυσοσωματικά ένζυμα.
- **Υπεροξειδιοσώματα**, με ενζυμική δραστηριότητα υπεροξειδάσης

Έξω από την πλασματική μεμβράνη βρίσκεται ένα κυτταρικό περικάλυμμα πλούσιο σε γλυκοσαμινογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες (πάχους 15-20nm) που σχετίζεται με την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα για την κυτταρική προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια περιέχουν ένα σύστημα διασυνδεδεμένων μεμβρανικών αγωγών (**ανοικτό σύστημα αγωγών**) που επικοινωνούν με το εξωτερικό περιβάλλον διαμέσου εξωτερικών στομιών. Η κυτταροπλασματική επιφάνεια των μεμβρανικών αγωγών συνδέεται με το φλοιό της ακτίνης. Το ανοικτό σύστημα αγωγών διευκολύνει την απελευθέρωση του περιεχομένου των  $\alpha$  κοκκίων[72-74].

### 3.1.1 Η λειτουργία των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια προάγουν την πήξη του αίματος και βοηθούν στην αποκατάσταση της βλάβης στα τοιχώματα των αγγείων μετά από τραυματισμό τους, εμποδίζοντας έτσι την απώλεια του αίματος. Συνεπώς, τα αιμοπετάλια εκτός του πρωταγωνιστικού ρόλου που έχουν στην πήξη του αίματος, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επούλωση των ιστών. Τα αιμοπετάλια περιέχουν σε μεγάλη συγκέντρωση αυξητικούς παράγοντες (δηλαδή βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες), οι οποίοι προάγουν την επούλωση των τραυματισμένων ιστών. Οι παράγοντες αυτοί απελευθερώνονται μέσω φυσιολογικής διαδικασίας από τα αιμοπετάλια στην περιοχή της ιστικής κάκωσης και ενεργοποιούν μια σειρά αντιδράσεων, οι οποίες μέσω του πολλαπλασιασμού των κατάλληλων κυττάρων και της παραγωγής κολλαγόνου συντελούν στην επούλωση των τενόντων, συνδέσμων, χόνδρων, μυών και οστών από

οποιαδήποτε βλάβη. Κατά το σχηματισμό του πύργου (θρόμβου) λαμβάνουν χώρα τα εξής φαινόμενα:

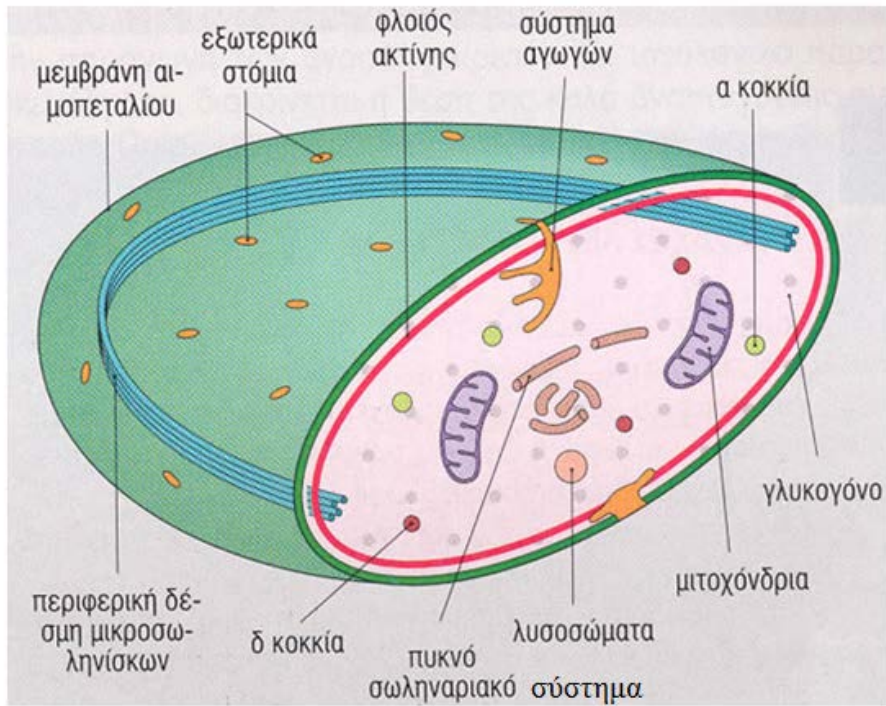
#### **A. Πρωταρχική συσσώρευση**

Η διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου, που εμφανίζεται σε βλάβες των αιμοφόρων αγγείων, ακολουθείται από προσρόφηση πρωτεϊνών του πλάσματος πάνω στο υποκείμενο κολλαγόνο. Αμέσως τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται σ' αυτό τον ιστό με τη βλάβη της ενδοθηλιακής στιβάδας - πάνω στο εκτεθειμένο κολλαγόνο-διαμέσου της γλυκοπρωτεΐνης τους von Willebrand, σχηματίζοντας έτσι το αιμοπεταλιακό πώμα (λευκός αιμοπεταλιακός θρόμβος).

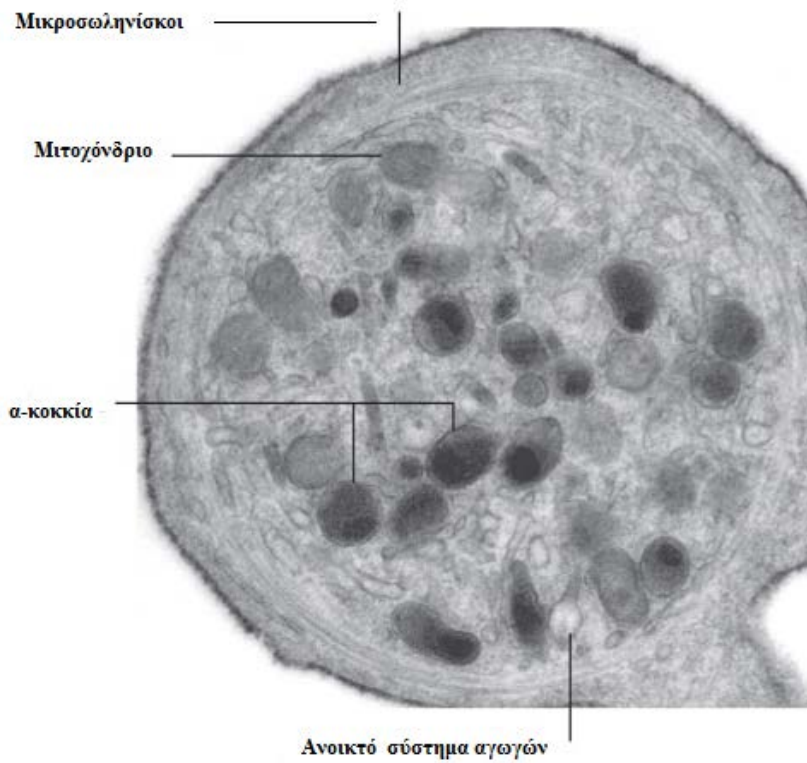
#### **B. Δευτερογενής συσσώρευση**

Η ακτίνη, η μυοσίνη και οι μικροσωληνίσκοι των αιμοπεταλίων προκαλούν την προσκόλλησή τους. Διαμέσου του σωληναριακού συστήματος, τα αιμοπετάλια εκκρίνουν το περιεχόμενο των  $\alpha$  και  $\delta$  κοκκίων τους, ενώ παράλληλα συνθέτουν θρομβοξάνη. Η θρομβοξάνη, το ADP και τα ιόντα ασβεστίου επάγουν την προσκόλληση περισσότερων αιμοπεταλίων. Τα φωσfolιπίδια των αιμοπεταλίων (μαζί με τα ιόντα ασβεστίου) ενεργοποιούν έναν καταρράκτη αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγεί στη δημιουργία του ινώδους. Το ινώδες σχηματίζει ένα τρισδιάστατο δίκτυο ιών, εντός του οποίου παγιδεύονται ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται το πύγμα αίματος (ερυθρός θρόμβος). Το πύγμα που αρχικά διογκώνεται μέσα στον αυλό του αγγείου συστέλλεται εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της ακτίνης, της μυοσίνης και του ATP. Το πύγμα προστατεύει το τοίχωμα του αγγείου, το οποίο και αποκαθίσταται με το σχηματισμό νέου ιστού. Κατόπιν το πύγμα απομακρύνεται κυρίως μέσω της δράσης του πρωτεολυτικού ενζύμου της πλασμίνης. Τα ένζυμα που εκλύονται από τα  $\lambda$  κοκκία των αιμοπεταλίων συμμετέχουν επίσης στην αφαίρεση του πύργου [73,74].





**Εικ 8. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του αιμοπεταλίου**



**Εικ 9. Εικόνα αιμοπεταλίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης**

### 3.2. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma-PRP)

Το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) είναι πλάσμα, το οποίο μετά από κατάλληλη επεξεργασία εμφανίζει πολύ μεγάλη συγκέντρωση αιμοπεταλίων. Πρόκειται για βιολογικό υλικό που λαμβάνεται από τον ίδιο τον ασθενή (αυτόλογο βιολογικό υλικό). Για το λόγο αυτό ο όρος πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια κρίνεται προτιμητέος, σε σχέση με άλλους, όπως είναι η «αυτόλογη γέλη αιμοπεταλίων», το «πλάσμα πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες» ή το «συμπύκνωμα αυτόλογων αιμοπεταλίων». Επειδή αποτελεί συμπύκνωμα αιμοπεταλίων, είναι επίσης συμπύκνωμα και των βασικών πρωτεϊνικών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι αποδεδειγμένα εκκρίνονται ενεργητικά από τα αιμοπετάλια και ευθύνονται για την έναρξη της επουλωτικής διεργασίας στους τραυματισμένους ιστούς.

Το PRP παράγεται μετά από αιμοληψία από τον ασθενή και βραχεία επεξεργασία του αίματος με φυγοκέντρηση και ειδικά φίλτρα. Η μέθοδος συνίσταται στη λήψη μικρής ποσότητας αίματος (20-30 ml) από μια περιφερική φλέβα του ασθενούς, το οποίο κατόπιν φυγοκεντρείται. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του πλάσματος που είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια από τα άλλα συστατικά του αίματος. Το προϊόν της επεξεργασίας αυτής δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, έχει ελάχιστα λευκά αιμοσφαίρια, ενώ εμφανίζει περίπου πενταπλάσια πυκνότητα αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα και μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως TGF, IGF-1, IGF-2, ιντερλευκίνη κ.λ.π. Η ακριβής περιεκτικότητα σε ουσίες διαφέρει ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική, αλλά σε γενικές γραμμές ο στόχος είναι ο ίδιος : ανακατασκευή ή αναγέννηση των ιστών, επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας, καταστολή της φλεγμονής και γενικότερα αλλαγή του τοπικού περιβάλλοντος προς όφελος των ιστών.

Η φυγοκέντρηση πρέπει να διενεργείται σε περιβάλλον στείρο μικροβίων και το συμπύκνωμα των αιμοπεταλίων να εξάγεται χωρίς λύση ή βλάβη τους, οπότε και δε θα μπορούσαν πλέον να εκκρίνουν ενεργητικά τους αυξητικούς τους παράγοντες. Σε πολλές περιπτώσεις πειραματικής αποτυχίας της μεθόδου είτε έχουν χρησιμοποιηθεί αιμοπετάλια ομόλογης (όχι αυτόλογης προέλευσης), είτε οι χρησιμοποιούμενες συσκευές δεν πέτυχαν την επιθυμητή συγκέντρωση, ή ακόμα περισσότερο μπορεί να προκάλεσαν βλάβη των αιμοπεταλίων.

Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η διαθεσιμότητα κι η απόλυτη συμβατότητα του υλικού, αφού αυτό λαμβάνεται από τον ίδιο τον ασθενή, η

γρήγορη κι εύκολη διαδικασία λήψης και έγχυσής του, οι ελάχιστες παρενέργειες και το χαμηλό σχετικά κόστος.

Μελέτες δείχνουν ότι η ποιότητα του εξαγόμενου συμπυκνώματος έχει μεγάλη σημασία για τη δραστηριότητά του, με την προϋπόθεση ότι γίνεται λόγος μόνο για αυτόλογα αιμοπετάλια, και όχι ομόλογη έγχυση. Στην τελευταία περίπτωση ανακύπτουν ζητήματα αντιγονικότητας, αλλά και αδυναμίας έκκρισης των βιολογικά δραστικών αυξητικών παραγόντων. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του PRP θα πρέπει να είναι πιστοποιημένες από αναγνωρισμένους διεθνείς οργανισμούς, όπως ο FDA, καθώς μπορεί να μειονεκτεί η περιεκτικότητά του συμπυκνώματος σε αιμοπετάλια και κατ'επέκταση η ποσότητα των απελευθερωμένων δραστικών παραγόντων. Το PRP δρα μέσω της αποκοκκιοποίησης των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων, τα οποία και περιέχουν τους αυξητικούς παράγοντες και έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη θεραπεία διαφόρων ειδών κακώσεων [75-78].

Τα αιμοπετάλια εκκρίνουν το 70% των αποθηκευμένων αυξητικών τους παραγόντων μέσα στα 10 πρώτα λεπτά από την ενεργοποίησή τους, ποσοστό που φθάνει το 100% μέσα στην πρώτη ώρα. Στη συνέχεια συνεχίζουν να συνθέτουν επιπλέον ποσότητες αυξητικών παραγόντων για περίπου 8 ημέρες, μέχρι να εξαντληθούν τελείως και να καταστραφούν. Για αυτό και η ενεργοποίηση του PRP θα πρέπει να γίνεται τη στιγμή της χρήσης του και όχι προκαταβολικά. Πράγματι, η ενεργός έκκριση αυτών των παραγόντων αρχίζει με το σχηματισμό του θρόμβου του αίματος, αλλά ουσιαστικά λαμβάνει χώρα 10 λεπτά μετά την ολοκλήρωση του θρόμβου. Ποσοστό μεγαλύτερο του 95% των παραγόντων που έχουν ήδη συντεθεί και αποθηκευτεί στα κοκκία εκκρίνονται στη διάρκεια της επόμενης ώρας. Το PRP θα πρέπει να δημιουργηθεί σε περιβάλλον αντιπηκτικού και να χρησιμοποιηθεί (σε μόσχευμα, τραύμα ή κρημνό) εντός δεκαλέπτου μετά την έναρξη σχηματισμού του θρόμβου. Αφότου το αιμοπετάλιο «εξαντληθεί» και τερματίσει το βίο του, τα μακροφάγα, τα οποία εν τω μεταξύ έχουν φτάσει στην περιοχή μέσω νεοαγγείων, που η δημιουργία τους έχει διεγερθεί από τα αιμοπετάλια, «αντιλαμβάνονται» την όλη διεργασία ως επούλωση και εκκρίνουν τους ίδιους, αλλά και άλλους αυξητικούς παράγοντες, ενισχύοντας περαιτέρω το φαινόμενο [78].

### 3.2.1 Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων των αιμοπεταλίων στην επούλωση των ιστών

Τα α κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν παράγοντες αναγέννησης μορίων-συνδέσμων, όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων μετασχηματισμού ομάδας (PDGF), ο παράγοντας ανάπτυξης TGF, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, κ.ά. Αυτοί ρυθμίζουν την επούλωση καθώς και τη φλεγμονή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την νεο-επιθηλίωση, την νεο-αγγειογένεση και τις διεργασίες αναδιαμόρφωσης των ιστών.

Ο PDGF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 30-kDa που δρα ως διμερές με δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β. Προάγει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ παράλληλα ενεργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τους ινοβλάστες. Ρυθμίζει επίσης τη σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matrix). Έχει δειχτεί ότι η ελεγχόμενη απελευθέρωση του παράγοντα έχει θετική επίδραση στο σχηματισμό οστού. Αντίθετα, υψηλές δόσεις φαίνεται ότι αναστέλλουν την επούλωση του οστίτη ιστού, επειδή ευνοούν μια φλεγμονώδη αντίδραση διάρκειας στα μαλακά μόρια. Αυτή η χρόνια φλεγμονή είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μάζας μαλακών μορίων από τους ινοβλάστες, αντί για οστό [79-82].

Ο TGF ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση και τη διαφοροποίηση, όπως και την απόπτωση των κυττάρων. Ο TGF-β1 ελευθερώνεται μετά την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων και διαθέτει παρακρινική δράση στα μεσεγχυματικά πολυδύναμα κύτταρα, όπως και στα οστεοπρογονικά, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους.

Ο EGF παίζει επίσης ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, προσδένοντας μια τυροσινική κινάση. Αναφορικά με την επίδρασή του στα οστά, σε δόσεις ικανές να αυξήσουν τη συγκέντρωσή του στο πλάσμα, μπορεί να διεγείρει τον περιοστικό σχηματισμό οστού και την απορρόφηση στο ενδόστεο. Ο bFGF/FGF-2 αλληλεπιδρά με τέσσερεις διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και έχει ρόλο στην επούλωση των τραυμάτων και στο σχηματισμό του οστού. Επάγει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων και είναι δυνητικά μιτογόνος για τους ινοβλάστες και τους προ-οστεοβλάστες. Επιπλέον διεγείρει την έκκριση

επιπρόσθετων παραγόντων από αυτά τα κύτταρα, ενώ συμμετέχει σε μοριακές οδούς πώρωσης του κατάγματος.

Ο IGF-I προάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και αυξάνει την παραγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης και της οστεοκαλσίνης από τα μεσεγχυματικά κύτταρα.

Οι VEGF προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και παίζουν ρόλο στο σχηματισμό του οστού, λόγω του αγγειογενετικού τους δυναμικού. Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχή οστική επούλωση. Άλλοι παράγοντες όπως η φιβρονεκτίνη επίσης συμμετέχουν στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, καθώς και στην εφάλατωση του οστού. Ακόμα και παράγοντες του πηκτικού μηχανισμού (XI, V, XIII, von Willebrand) διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο στην παραγωγή οστού, επειδή η πήξη και ο σχηματισμός θρόμβου, είναι απαραίτητα βήματα για την αναγέννησης του οστού [82-84].

### 3.2.2 Εφαρμογές και περιορισμοί

Στη διάρκεια των τελευταίων 15 ετών, το PRP έχει βρεθεί στο επίκεντρο της ερευνητικής δραστηριότητας στο επιστημονικό πεδίο της αναγέννησης των οστών και των μαλακών μορίων. Το PRP μπορεί να εγχυθεί μέσα στο οστικό μόσχευμα, να το επιστρώσει καθώς αυτό τοποθετείται ή να ψεκαστεί στην επιφάνεια μαλακών μορίων. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί στην επιφάνεια ενός μοσχεύματος ή να χρησιμοποιηθεί ως βιολογική μεμβράνη. Ωστόσο, ο σχηματισμός του θρόμβου θα πρέπει να πραγματοποιείται μόνον κατά τη στιγμή της χρήσης του. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη χρήση του PRP σε σπονδυλοδεσίες. Η χρήση του PRP μπορεί να αποτελέσει μια συνετή και ασφαλή εναλλακτική λύση στη μεταμόσχευση αυτόλογου οστικού μοσχεύματος. Ο ρυθμός σπονδυλοδεσίας είναι παρόμοιος, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν οι επιπλοκές που συνοδεύουν την οστική μεταμόσχευση [75-78].

Λόγω μεθοδολογικών σφαλμάτων στην προετοιμασία του PRP πολλές μελέτες στην πραγματικότητα εξετάζουν θρόμβους που στερούνται αυξητικών παραγόντων ή και υπερδιηθήματα χωρίς δραστηριότητα. Το PRP πρέπει να λαμβάνεται μόνο από πλάσμα με αντιπηκτικό, διότι διαφορετικά τα αιμοπετάλια

ενσωματώνονται στο θρόμβο και αυτό που απομένει είναι ορός του αίματος και όχι πλάσμα, με μικρή περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια. Συνεπώς διαχωριστές ορού ή λήψη από θρομβωμένο αίμα δεν έχουν θέση στην προετοιμασία του PRP [78].

Μελέτες στις οποίες δεν έχει χρησιμοποιηθεί ολικό αίμα με αντιπηκτικό θα πρέπει να θεωρηθούν παραπλανητικές, καθώς δεν ακολουθείται η «φυσική» διεργασία που εγγυάται την άρτια ολοκλήρωση της σύνθεσης και απελευθέρωση των παραγόντων. Επίσης το αίμα θα πρέπει να διατηρείται σε στείρο περιβάλλον. Οι αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στα  $\alpha$  κοκκία δεν έχουν πάρει την τελική τους μορφή, γιατί πρέπει να παραμένουν υδατοδιαλυτοί. Καθώς ο σχηματισμός του θρόμβου ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, οι αυξητικοί παράγοντες εκκρίνονται από το κύτταρο διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη διεργασία αυτή, τα  $\alpha$  κοκκία συντήκονται με τη μεμβράνη, όπου οι αυξητικοί παράγοντες ολοκληρώνουν τη σύνθεσή τους αποκτώντας τη βιοδραστική τους μορφή, με την προσθήκη ιστονών και πλευρικών αλυσίδων υδατανθράκων. Για το λόγο αυτό, αιμοπετάλια που δεν είναι «ενεργά» ή έχουν υποστεί βλάβη κατά τη διεργασία συμπύκνωσής τους δεν προσφέρονται για την παραγωγή PRP και τυχόν χρησιμοποίησή τους θα οδηγήσει σε φτωχά αποτελέσματα. Οι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται άμεσα στην εξωτερική επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων –στόχων, μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων που εκφράζονται από βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα, οστεοβλάστες και ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και επιδερμικά κύτταρα. Αυτοί οι διαμβρανικοί υποδοχείς επάγουν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου, οι οποίες προκαλούν μια αλληλουχία γεγονότων: πολλαπλασιασμός κυττάρου, σχηματισμός θεμελίου ουσίας, παραγωγή οστεοειδούς, σύνθεση κολλαγόνου κ.α. Οι ίδιοι οι αυξητικοί παράγοντες ποτέ δεν εισδύουν στο κύτταρο ή τον πυρήνα του και δεν είναι μιτογόνοι. Συνεπώς επιταχύνουν τη φυσική διεργασία της επούλωσης χωρίς να είναι καρκινογόνοι [75-78].

Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων σχετίζεται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους. Γι αυτό ο αριθμός των αιμοπεταλίων στον θρόμβο εντός του μοσχεύματος, του τραύματος, ή σε επαφή με τον κρημνό καθορίζει τελικά και το ρυθμό επούλωσης. Υφίσταται καμπύλη δόσης – απόκρισης, η οποία δείχνει ότι επαρκής κυτταρική απόκριση υπάρχει σε συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων 4 ή 5 φορές υψηλότερες του συνήθους. Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών και η παραγωγή

κολλαγόνου τύπου I αυξάνεται σε όξινο pH. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη επαρκούς συμπύκνωσης των αιμοπεταλίων, αλλά και δημιουργίας του κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος. Επειδή τα περισσότερα άτομα έχουν αριθμούς αιμοπεταλίων μεταξύ 150000/μl και 250000/μl, απαιτείται αριθμός περίπου 1000000 στο συμπύκνωμα, προκειμένου να επιτευχθούν θεραπευτικά επίπεδα.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν τη χρήση αυτόλογου PRP, καθώς υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου σε οστικά μοσχεύματα και στην κοσμητική χειρουργική (δερματικά μοσχεύματα, face lift). Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι επιτυγχάνεται η αναγέννηση του οστού, επιταχύνεται η πόρωση, αλλά και η διαδικασία της επούλωσης του δέρματος. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν μάλλον μικρό ή αμελητέο όφελος από την εφαρμογή της θεραπείας. Η ιστολογική μελέτη όμως της προόδου της επούλωσης των ιστών δείχνει ότι ακόμα και σε περιπτώσεις με αμφισβητούμενο κλινικό όφελος, το PRP επιταχύνει τις επουλωτικές διεργασίες.

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε οστικά ελλείμματα, σε καθυστερημένη πόρωση καταγμάτων, σε οστεονεκρώσεις, σε οστεοπορωτικά οστά μετά από ακτινοθεραπεία και σε μοσχεύματα βλεννογόνων και δέρματος. Εφαρμόζεται ιδιαίτερα στην περιοδοντολογία και τη γναθοχειρουργική. Πρόκειται για ασφαλή μέθοδο, με μόνη ίσως εξαίρεση την πρόκληση σπάνιων επιπλοκών λόγω χρήσης βόειου θρομβίνης για την εκκίνηση σχηματισμού του θρόμβου. Παρόλο που το παρασκεύασμα της θρομβίνης είναι άσηπτο και ελεύθερου prions<sup>3</sup>, τα οποία εντοπίζονται μόνο σε ιστό νευρικής προέλευσης και όχι στο βόειο αίμα από το οποίο παρασκευάζεται η θρομβίνη, υπάρχει περίπτωση να αναπτυχθούν αντισώματα όχι εναντίον της ίδιας της θρομβίνης, αλλά του (βόειου) παράγοντα Va, ο οποίος μπορεί συνυπάρχει [85,86].

Ωστόσο, ερευνητές σε μετανάλυση από τυχαιοποιημένες και προοπτικές μελέτες εκφράζουν επιφυλάξεις για το κλινικό όφελος της μεθόδου. Αναφέρουν ότι δεν υπάρχουν ακόμα επαρκείς ενδείξεις, ώστε να συμπεράνει κανείς αδιαφιλονίκητα ότι το PRP προάγει την επούλωση του κατάγματος ή βοηθά στη σπονδυλοδεσία. Σε κάθε περίπτωση επισημαίνονται μεθοδολογικά σφάλματα στις μελέτες και η ανάγκη

<sup>3</sup> Πρόκειται για πρωτεΐνες αποτελούμενες από αλυσίδα 253 αμινοξέων που χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ανθεκτικότητα κατά την έκθεση τους σε ιονίζουσα ακτινοβολία και την επεξεργασία τους με αλκοολούχα διαλύματα. Τα Prion διατηρούν τη μοριακή τους δομή και δεν διασπώνται από ένζυμα, όπως οι διάφορες πρωτεάσες και νουκλεάσες. Αντίθετα αδρανοποιούνται κατά την έκθεση τους σε θερμοκρασίες άνω των 130° C για διάστημα άνω των 20 λεπτών, την επεξεργασία τους με φενόλες και με διαλύματα με ακραίες τιμές pH (Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 1982; 216: 136-144).

για περαιτέρω έρευνα. Έχουν διαπιστωθεί σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις βασικών αυξητικών παραγόντων, ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες συσκευές συμπίκνωσης των αιμοπεταλίων. Επίσης τα ενθαρρυντικά δεδομένα από πειραματόζωα, στα οποία το PRP χρησιμοποιείται σε βλάβες που προκαλούνται οξέως, δε σημαίνει ότι μεταφράζονται και σε κλινικό όφελος στα χρόνια νοσήματα φθοράς των ανθρώπων. Παρόλα αυτά επιβάλλεται πολύ προσεκτική αξιολόγηση των μελετών λόγω των προαναφερθέντων μεθοδολογικών σφαλμάτων, αλλά και επίσης πολύ προσεκτική προετοιμασία του PRP, προκειμένου να επιτευχθεί το μέγιστο κλινικό όφελος [87,88].

Οι Walsh et al ανέφεραν τις in vivo επιπτώσεις μίας μόνο έγχυσης πολλαπλών αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF), του GDF-5, του IGF-1 ή του TGF- $\beta$ , σε δίσκο ποντικού με εκφύλιση που προκλήθηκε από στατική συμπίεση [55]. Οι συγγραφείς αυτοί διαπίστωσαν ότι μια έγχυση GDF-5 προκάλεσε την επέκταση του εσωτερικού ινοχόνδρινου πληθυσμού στον πηκτοειδή πυρήνα, ενώ ο IGF-1 έδειξε μόνο μια παροδική πολλαπλασιαστική επίδραση. Ανέφεραν, επίσης, ότι πολλαπλές εγχύσεις TGF- $\beta$  προκάλεσαν ινοχόνδρινη συσσώρευση στον πηκτοειδή πυρήνα και ότι το ύψος του δίσκου ήταν αυξημένο σε δίσκους που έλαβαν GDF-5.

Σε άλλη μελέτη με κόνικλους οι Takegami et al κατέληξαν ότι μια ενδοδισκική έγχυση OP-1, οδήγησε σε αύξηση του ύψους του δίσκου και αύξηση της περιεκτικότητας του πηκτοειδή πυρήνα σε πρωτεογλυκάνες σε φυσιολογικό μεσοσπονδύλιο δίσκο. Ενώ κανένα από τα παραπάνω δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου με ενδοδισκική έγχυση φυσιολογικού ορού [89].

Ο Masuda et al μελέτησαν την επίδραση OP-1 σε εκφυλισμένο δίσκο κουνελιού. Το μοντέλο εκφύλισης δίσκου νεαρού κόνικλου βασίστηκε στην παρακέντηση με βελόνη. Μια έγχυση ανασυνδυασμένου ανθρώπινου OP-1 (rhOP-1, 100 Ig/disc) αποκατέστησε τη μείωση στο ύψος του δίσκου και τις εκφυλιστικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από το νυγμό δια βελόνης [90]. Αυτή η αποκατάσταση διατηρήθηκε καθ' όλη την πειραματική περίοδο έως και 24 εβδομάδες μετά την έγχυση. Τα αποτελέσματα της μαγνητικής τομογραφίας έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων με έγχυση OP-1 και αυτών με λακτόζη σε διαστήματα 8-, 12- και 24- εβδομάδων. Αυτό υποδηλώνει αυξημένη περιεκτικότητα σε νερό στον πηκτοειδή πυρήνα στην ομάδα OP-1. Τα αποτελέσματα δείχνουν με σαφήνεια ότι είναι εφικτή η



αποκατάσταση εκφυλισμένου δίσκου κουνελιού με μια έγχυση OP-1 στον πηκτοειδή πυρήνα.

Οι δίσκοι από έφηβους κόνικλους (5–6 μηνών) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες εξακολουθούν να έχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων νωτιαίας χορδής [91,92]. Αν και τα περισσότερα κύτταρα νωτιαίας χορδής στον πηκτοειδή πυρήνα αντικαταστάθηκαν από ινοχονδροκύτταρα μετά την παρακέντηση με βελόνη, η διαφορά στους πληθυσμούς κυττάρων πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν χρησιμοποιείται για προκλινικές πληροφορίες σε κλινικές δοκιμές με ανθρώπους.

Οι Yoon et al έδειξαν μια μείωση στο περιεχόμενο πρωτεογλυκανών και νερού που σχετίζεται με την ηλικία και αυξημένες εκφυλιστικές ενδείξεις, σε οβελιαίες λήψεις μαγνητικής τομογραφίας, χρησιμοποιώντας κόνικλους 1–4-ετών [93]. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ώριμοι κόνικλοι ή κόνικλοι μεγαλύτερης ηλικίας έχουν μικρότερη δυνατότητα διάχυσης μέσω της τελικής κινητικής πλάκας, λόγω της μειωμένης αγγειοβρίθειας, σε σύγκριση με τα έφηβα - νεαρά ζώα. Επομένως, υπάρχει η πιθανότητα η αποκατάσταση του εκφυλισμένου δίσκου να εξαρτάται από την ηλικία και ότι τα ώριμα κουνέλια δεν θα αποκαταστήσουν τη δομή του δίσκου με έγχυση αυξητικού παράγοντα όπως αποδείχθηκε στα νεαρά ζώα που εξετάστηκαν παραπάνω.

Σε μια μελέτη των Chujo et al, που χρησιμοποιήθηκαν κόνικλοι ηλικίας δυο ετών και μοντέλο εκφύλισης με παρακέντηση του δίσκου, φάνηκε ότι η ενδοδισκική έγχυση με rhGDF-5 προκάλεσε σημαντική αποκατάσταση του ύψους του δίσκου, κατά τη διάρκεια μιας περιόδου παρατήρησης 12 εβδομάδων. Η απόκριση μάλιστα στην έγχυση GDF-5 ήταν ταχύτερη από αυτή σε έφηβους κόνικλους [94]. Δύο εβδομάδες μετά την έγχυση, ο δείκτης ύψους δίσκου επί τοις εκατό σε δίσκους με έγχυση rhGDF-5 ήταν σημαντικά υψηλότερος από αυτόν στους δίσκους με έγχυση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (Phosphate buffered saline-PBS). Σε διάστημα 8 εβδομάδων μετά την έγχυση, οι δίσκοι με έγχυση rhGDF-5 έφτασαν το επίπεδο των δίσκων στην ομάδα ελέγχου χωρίς παρακέντηση. Στις 12 εβδομάδες μετά την έγχυση, η ανάλυση MRI έδειξε ότι η ένταση σήματος στο NP των δίσκων με έγχυση rhGDF-5 ήταν σημαντικά πιο υψηλή από αυτή στους δίσκους με έγχυση PBS. Εμβιομηχανικές αναλύσεις έδειξαν ότι το ιξώδες και η ελαστικότητα στους δίσκους με έγχυση rhGDF-5 ήταν σημαντικά υψηλότερα απ' ότι στους δίσκους με έγχυση PBS. Αυτή η μελέτη έδειξε την αποτελεσματικότητα της έγχυσης rhGDF-5 σε εκφυλισμένους δίσκους σε κουνέλια ηλικίας 2 ετών, παρά την ανησυχία ότι οι

αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία στη δράση των κυττάρων μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Η ημιζωή μιας πρωτεΐνης που εγχέεται σε δίσκους θεωρείται σύντομη, της τάξης των λεπτών [95]. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η ημιζωή μιας ραδιοσημασμένης OP-1 που εγχέεται είναι πολύ μεγαλύτερη (μεγαλύτερη του μήνα). Μια πιθανή εξήγηση για αυτό περιλαμβάνει το γεγονός ότι ο πηκτοειδής πυρήνας είναι ένας περιορισμένος χώρος λόγω του περιβάλλοντος δακτυλίου. Σε αυτούς τους ασθενείς των οποίων η απεικόνιση δεν δείχνει σαφή διαρροή, ο αυξητικός παράγοντας που εγχέεται μπορεί να συγκρατείται στον χώρο του δίσκου μετά την έγχυση. Επιπλέον, η rhOP-1 δεσμεύεται με τα μόρια κολλαγόνου στον πηκτοειδή πυρήνα και τον δακτύλιο. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι μια εξήγηση για τις επιπτώσεις μακράς δράσης [96]. Τέλος, οι μεταβολικές αλλαγές που βρέθηκαν στα κύτταρα μετά από έγχυση με αυξητικό παράγοντα μπορεί να διατηρηθούν και έτσι να προκαλέσουν μακροχρόνιες αλλαγές στη δομή του δίσκου.

### 3.3 Γονιδιακές θεραπείες

Με τη συνεχή βελτίωση των μεθόδων που αφορούν τη γονιδιακή θεραπεία, η αντιστροφή της εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει τύχει ιδιαίτερης έρευνας. Μέχρι στιγμής, έχουν επιτευχθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Οι Wehling et al. [97] πραγματοποίησαν με επιτυχία επιμόλυνση ενός γονιδίου-στόχου σε *in vitro* καλλιεργημένα κύτταρα χόνδρου τελικής κινητικής πλάκας από βόειο μεσοσπονδύλιο δίσκο. Οι Sai et al [98] χρησιμοποίησαν αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης (TGF)-β1, ως γονίδιο-στόχο και αδενοϊό ως φορέα για την επιμόλυνση κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα μεσοσπονδύλιου δίσκου, και παρατήρησαν αυξημένο κολλαγόνο τύπου II και σύνθεση πρωτεογλυκανών. Οι Wallach et al. [99] μετέφεραν με επιτυχία μέσω αδενοϊού γονίδιο αναστολέα μεταλλοπρωτεασών (TIMP) επιμόλυνοντάς ανθρώπινα κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου, που έδειξαν στη συνέχεια αυξημένη σύνθεση πρωτεογλυκανών.

Αν και η γονιδιακή επιμόλυνση κυττάρων μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει δείξει καλά αποτελέσματα, μια μεγάλη ποσότητα ιικών φορέων είναι απαραίτητη, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο της κυτταροτοξικότητας και την επαγωγή μιας

ανοσολογικής απόκρισης [100]. Η συνεπιμόλυνση 2 ή περισσότερων παραγόντων σε κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει εξεταστεί για να μειωθεί η δοσολογία των ιικών φορέων που απαιτούνται προκειμένου να υπάρξουν βελτιωμένες βιολογικές επιδράσεις. Οι Xi et al. [101] εισήγαγαν γονίδια παραγωγής του κολλαγόνου τύπου II και TGF- $\beta$ 1 με ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ενώ οι Wallach et al.[99] συνδύασαν γονίδια TGF- $\beta$ 1, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστού (BMP)-2 και ινσουλινοειδή αυξητικό παράγοντα 1 για την επιμόλυνση κυττάρων μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ο συνδυασμός αυτών των 3 παραγόντων κατέδειξε σαφή βιολογικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τη χρήση 1 ή 2 παραγόντων.

Προτείνεται ο εντοπισμός σημαντικών γονιδίων που ευθύνονται για την εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου και η χρήση αυτών για τη δημιουργία νέων διαγονιδιακών μοντέλων ζώων. Επί του παρόντος, ορισμένοι ερευνητές έχουν ήδη προσανατολιστεί προς αυτή την κατεύθυνση. Οι Sahlman et al [102] διεξήγαγαν μελέτη σχετικά με το γονίδιο COL2a1 στην ανάπτυξη, εξέλιξη και εκφύλιση του δίσκου σε αρουραίους και διαπίστωσαν βράχυνση άκρων, κρανίου και σπονδυλικής στήλης, αλλαγές στον ινώδη δακτύλιο, πάχυνση της σπονδυλικής τελικής κινητικής πλάκας και μείωση γλυκοζαμινογλυκάνης που σχετίζεται με την αδρανοποίηση του γονιδίου COL2a1. Ο Hamrick et al [103] μελέτησε αρουραίους με έλλειψη γονιδίου GD8 και ανέφερε παρόμοια ευρήματα. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια εγγενή προβλήματα σε αυτόν τον τύπο ζωικού μοντέλου: κάποια διαγονιδιακά ζώα έχουν σύντομους χρόνους επιβίωσης, ενώ είναι δύσκολα προβλέψιμη η συχνότητα εκφύλισης του δίσκου. Πιστεύεται ότι η αποτελεσματική διαλογή μειζόνων γονιδίων σε οικογένειες με κληρονομική εκφύλιση δίσκου, θα μπορούσε να αυξήσει τη συχνότητα εμφάνισης εκφύλισης και να μειώσει τον χρόνο έναρξης της σχετικής διαδικασίας.

### 3.4 Χρήση βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα (εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, ESC και μεσεγχαυματικά βλαστικά κύτταρα, MSC). Έχουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης καθώς και διαφοροποίησης σε ειδικές κυτταρικές γενεές. Τα ESC προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα του βλαστοκύστεων και έχουν πλεονέκτημα έναντι των MSC καθώς μπορούν να παράγουν κύτταρα και από τις τρεις βλαστικές στιβάδες

(ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) και εμφανίζουν εκτεταμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού *in vitro*. Παρόλα αυτά, η χρήση τους σε κλινικό περιβάλλον εμποδίζεται από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η δυσκολία στην απόκτηση λόγω ηθικών προβληματισμών, η ανοσιακή απόρριψη μετά από αλλογενή μεταμόσχευση, ο κίνδυνος μετάδοσης νόσου και η πιθανότητα σχηματισμού τερατώματος [104].

Αντίθετα, τα MSC ξεπερνούν αρκετά από αυτά τα εμπόδια για την κλινική εφαρμογή. Αρχικά, αν και παρουσιάζουν περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού *in vitro*, μπορούν να απομονωθούν από πολλαπλές πηγές, όπως ο λιπώδης ιστός, το αίμα, ο αρθρικός υμένας, τα νεογιλά δόντια, η δερμίδα, οι μύες ή το περίοστεο [105]. Δεύτερον, μπορεί να διαφοροποιηθούν *in vitro* και να δώσουν γένεση επιλεκτικά σε χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα ή και νευρικό ιστό, σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας [106]. Τρίτον, εκφράζουν χημειοτακτικούς υποδοχείς και MMP για αναδιαμόρφωση της θεμέλιας ουσίας, γεγονός που τους παρέχει τη δυνατότητα να «εμβολιαστούν» σε περιοχές τραυματισμού ως απόκριση στις κυτοκίνες, μια ιδιότητα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά για την ανάπλαση των εκφυλισμένων ιστών [107]. Μια πρόσφατη μελέτη των Illien-Junger et al [108] έδειξε ότι τα BM-MSC είχαν μεγαλύτερη ικανότητα να ενσωματωθούν σε πηκτοειδή πυρήνα και ινώδη δακτύλιο των εκφυλισμένων δίσκων σε σύγκριση με τους υγιείς δίσκους σε πειραματικό βόειο μοντέλο. Τέταρτον, είναι υποανοσογόνα λόγω της έλλειψής τους σε έκφραση μορίων HLA τάξης II και της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των T κυττάρων [109]. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να έχει περισσότερα πλεονεκτήματα σε καταστάσεις που απαιτούν αλλογενή μεταμόσχευση MSC. Ένας περιορισμός, όμως, είναι ότι τα καλλιεργημένα MSC του μυός έδειξαν ανάπτυξη οστεοσαρκωμάτων [110]. Κατά συνέπεια, επιβάλλεται να ληφθούν επαρκή μέτρα προφύλαξης κατά τις μεταμοσχεύσεις βλαστικών κυττάρων στους ανθρώπους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 4.1 Σκοπός

Ο νυγμός του πηκτοειδή πυρήνα με βελόνη συγκεκριμένης διαμέτρου, προκαλεί σταδιακή εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί αν η ενδοσκήλη έγχυση αυτόλογων αυξητικών παραγόντων PRP (Platelet Rich Plasma), θα ανακόψει την διαδικασία εκφύλισης του δίσκου δίνοντας διαφορετικά ιστολογικά αποτελέσματα για τους κόνικλους της πειραματικής ομάδας, συγκριτικά με εκείνα της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα διατυπώθηκαν οι ακόλουθες ερευνητικές υποθέσεις: α) Η χρώση E&H αναμένεται να δώσει καλύτερα αποτελέσματα (μικρότερη εκφύλιση ή και αποκατάσταση του δίσκου) στην πειραματική ομάδα β) Το κολλαγόνο τύπου II αναμένεται αυξημένο στην ομάδα PRP γ) Οι TNF και TGF θα είναι αυξημένοι στην ομάδα ελέγχου.

### 4.2 Δείγμα και διαδικασία

Το μοντέλο εκφύλισης του δίσκου, με παρακέντηση του ινώδους δακτυλίου του μεσοσπονδύλιου δίσκου σε κόνικλους έχει επαρκώς τεκμηριωθεί [111]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δεκαοκτώ άσπροι θηλυκοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας. Τα ζώα διαβιούσαν ένα ανά κλουβί και είχαν διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες και νερό. Κάθε ζώο ζυγίζόταν κατά την άφιξη και κατά τη διάρκεια περιοδικών ελέγχων, όπου εξεταζόταν για στοιχεία επαρκούς σίτισης και δραστηριότητας. Οι κόνικλοι ταξινομήθηκαν σε δυο ομάδες των εννέα μετά από τυχαιοποιημένη κατηγοριοποίησή τους.

Στην πρώτη ομάδα (Α) ή ομάδα μελέτης, πραγματοποιήθηκε εκφύλιση του δίσκου και στη συνέχεια έγχυση του αυτόλογου πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, PRP. Στη δεύτερη ομάδα (Β) ή ομάδα έλεγχου πραγματοποιήθηκε επίσης εκφύλιση του δίσκου με την ίδια διαδικασία και έγχυση αντίστοιχης ποσότητας φυσιολογικού ορού. Δυο σπονδυλικές μονάδες από κάθε κόνικλο χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη.

Τα πειραματόζωα θυσιάζονταν μετά από 2, 4 και 6 εβδομάδες σε ομάδες των τριών. Λαμβάνονταν οι δυο σπονδυλικές μονάδες από το επίπεδο O3 έως O5 και ο

μεσοσπονδύλιος δίσκος O3-O4 και O4-O5, οι οποίες υπόκεινταν σε ειδική διαδικασία μονιμοποίησης, αφαλάτωσης, με διαδοχική αφυδάτωση σε αιθανόλες και ξυλόλες και βυθιζόταν σε παραφίνη. παρασκευαζόταν για ιστολογική εξέταση. Λαμβάνονταν 5 τομές των 5μ ανά ιστικό δείγμα. Η πρώτη και τρίτη τομή χρησιμοποιήθηκαν στην χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E) για την εκτίμηση και την διαβάθμιση των μορφολογικών αλλοιώσεων εκφύλισης του δίσκου. Οι υπόλοιπες τομές χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II και των παραγόντων TGFβ και TNF-α, για την εκτίμηση αποδόμησης ενός από τα κύρια συστατικά του ηκτοειδούς πυρήνα και την εκτίμηση της πιθανής επαγωγικής ή κατασταλτικής δράσης των παραγόντων.

Η σύγκριση έγινε μεταξύ των αποτελεσμάτων των ομάδων Α και Β για να καθοριστεί η δράση των αυξητικών παραγόντων στον εκφυλισμένο δίσκο.

### 4.3 Πειραματικό χειρουργείο

Οι κόνικλοι προετοιμάστηκαν για τη χειρουργική επέμβαση σε πλάγια πρινή θέση (lateral prone position). Προεγχειρητικά αναισθητοποιήθηκαν λαμβάνοντας ενδομυϊκή ένεση κεταμίνης 40mg/kg και ξυλαζίνης 5mg/kg. Μετά την κατάλληλη αντισηψία του δέρματος έγινε οπισθοπλάγια οπισθοπεριτοναϊκή προσπέλαση (posterolateral retroperitoneal approach) και αποκαλύφθηκαν οι τρεις οσφυϊκοί μεσοσπονδύλιοι δίσκοι των διαστημάτων O2-O3, O3-O4 και O4-O5. Μετά από τον καθορισμό του επιπέδου της Σ.Σ., οι δίσκοι που παρακεντήθηκαν παρασκευάστηκαν προσεκτικά. Για το νυγμό του δίσκου χρησιμοποιήθηκε βελόνη διαμέτρου 18 gauge. Το βάθος του νυγμού ελεγχόταν στα 5mm. Η βελόνη εισερχόταν δυο φορές για πέντε δευτερόλεπτα, δια του ινώδους δακτυλίου, στον ηκτοειδή πυρήνα του δίσκου O3-O4 και O4-O5. Η ίδια διαδικασία του νυγμού ακολουθήθηκε για τους κόνικλους των ομάδων Α και Β. Στους κόνικλους της ομάδας Α, μετά τους νυγμούς ακολούθησε μια ενδοδισκική έγχυση αυτόλογων αυξητικών παραγόντων PRP (0,1ml) (Platelet-Rich Plasma) ανά δίσκο, με βελόνη διαμέτρου 27 gauge. Η παρασκευή του PRP έγινε μετά από αιμοληψία από τον ίδιο κόνικλο, υπό άσηπτες συνθήκες. Στους κόνικλους της ομάδας Β ακολούθησε έγχυση ίδιας ποσότητας φυσιολογικού ορού (Sodium Chloride 0,9) (0,1 ml) με βελόνη διαμέτρου 27 gauge. Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος O2-O3 παρέμεινε ανέπαφος. Η συνέχεια των περιτονιών και του δέρματος

αποκαταστάθηκε με απορροφήσιμα ράμματα. Μετά από σύντομη μετεγχειρητική παρακολούθηση οι κόνικλοι επέστρεφαν στα κλουβιά τους και τους επιτρεπόταν ελεύθερη δραστηριότητα. Όλα τα πειραματικά χειρουργεία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο εμβιομηχανικής της ορθοπαιδικής κλινικής του Παν/μίου Ιωαννίνων. Προεγχειρητικά χορηγήθηκαν 80mg ανά κιλό νατριούχου κεφτριαξόνης ενδομυκικά. Τα χειρουργεία διενεργήθηκαν την ίδια ημέρα για όλους τους κόνικλους και των δυο ομάδων. Μετεγχειρητικά, οι κόνικλοι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό. Οι κόνικλοι ανέχτηκαν καλά την αναισθησία και δεν σημειώθηκαν θάνατοι λόγω επιπλοκών, ενώ δεν διαπιστώθηκαν σημεία λοίμωξης. Επίσης δεν διαπιστώθηκαν διαταραχές στη λήψη τροφής, το βάρος και τον ύπνο τους.

#### 4.4 Ιστολογική αξιολόγηση

Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης για 24 ώρες στους 4°C, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε σφραγισμένη φιάλη που περιείχε διάλυμα 70% και απασβεστοποιό παράγοντα για 30 ημέρες. Μετά την έκλουση με νερό, τα δείγματα υπέστησαν αφυδάτωση, κατατμήθηκαν κατά το μέσο οβελιαίο επίπεδο και εμβαπτίστηκαν σε παραφίνη για ιστολογική εξέταση

Ελήφθησαν συνεχείς τομές στο εγκάρσιο επίπεδο στα 5μm με μικροτόμο και κατόπιν αυτές βάφτηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E). Οι μορφολογικές αλλοιώσεις αναλύθηκαν ημιποσοτικά από παθολογοανατόμο που δε γνώριζε τους χειρισμούς που έγιναν στα πειραματόζωα, χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό σύστημα ανάλυσης, σύμφωνα με την κλίμακα διαβάθμισης που προτάθηκε από τους Masuda et al [112]. Η συνολική βαθμολογία κατά την αξιολόγηση ήταν το άθροισμα των 4 επιμέρους βαθμολογιών και κυμαινόταν από 4 έως 12, όπου το φυσιολογικό αντιστοιχούσε σε 1 μονάδα για κάθε μια από τις 4 κατηγορίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως ( πηκτοειδής πυρήνας, όριο ινώδους δακτυλίου/πηκτοειδούς πυρήνα, κυτταροβρίθεια και θεμέλια ουσία) και έφθανε μέχρι το 3. Όσο μεγαλύτερη η βαθμολογία, τόσο μεγαλύτερη η εκφύλιση. Συνεπώς η μέγιστη δυνατή βαθμολογία ήταν το 12, αντιπροσωπευτικό πολύ σοβαρής εκφύλισης. Προκειμένου για την ανοσοιστοχημική ανίχνευση, οι τομές επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για τα ακόλουθα: κολλαγόνο τύπου II (Monosan, Sanbio B.V.) TGFβ (Leica, Biosystems, Newcastle Ltd) και TNF-α (Santa Cruz Biotechnology, Inc), και επίσης εκτιμήθηκαν ημιποσοτικά.

## Definition of Histological Grading Scale - Ιστολογική διαβάθμιση

### I. Anulus fibrosus

#### Grade:

1. Normal, pattern of fibrocartilage lamellae (U-shaped in the posterior aspect and slightly convex in the anterior aspect) without ruptured fibers and without a serpentine appearance anywhere within the anulus
2. Ruptured or serpentine patterned fibers in less than 30% of the anulus
3. Ruptured or serpentine patterned fibers in more than 30% of the annulus

### II. Border between the anulus fibrosus and nucleus pulposus

#### Grade:

1. Normal
2. Minimally interrupted
3. Moderate/severe interruption

### III. Cellularity of the nucleus pulposus

#### Grade:

1. Normal cellularity with large vacuoles in the gelatinous structure of the matrix
2. Slight decrease in the number of cells and fewer vacuoles
3. Moderate/severe decrease (<50%) in the number of cells and no vacuoles

### IV. Matrix of the nucleus pulposus

#### Grade:

1. Normal gelatinous appearance
2. Slight condensation of the extracellular matrix
3. Moderate/severe condensation of the extracellular matrix

## Ιστολογική διαβάθμιση

### I. Ινώδης δακτύλιος

#### Grade:

1. Φυσιολογικό πρότυπο ανάπτυξης των ινοχόνδρινων πεταλίων (U-shaped) απουσία ρήξης ή σερπατινοειδούς εμφάνισης.
2. Ρήξη ή σερπατινοειδής εμφάνιση, σε έκταση < του 30% του δακτυλίου
3. Ρήξη ή σερπατινοειδής εμφάνιση, σε έκταση > του 30% του δακτυλίου

### II. Όριο μεταξύ ινώδους δακτυλίου και πηκτοειδούς πυρήνα

#### Grade:

1. Φυσιολογικό
2. Ελάχιστα διακεκομμένο
3. Μέτρια/σοβαρά διακεκομμένο.

### III. Κυτταροβρίθεια του πηκτοειδούς πυρήνα

#### Grade:

1. Φυσιολογική κυτταροβρίθεια με μεγάλα κενοτόπια της εξωκυττάριας ουσίας
2. Μικρή μείωση των κυττάρων και λιγότερα κενοτόπια
3. Μέτρια/σοβαρή μείωση (50%) των κυττάρων και απουσία κενοτοπίων

### IV. Εξωκυττάρια ουσία πηκτοειδούς πυρήνα

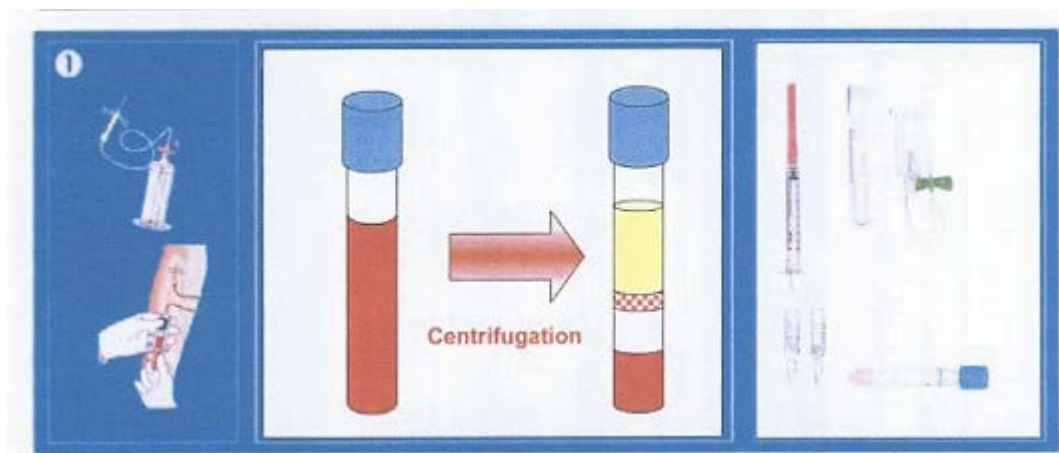
#### Grade:

1. Φυσιολογική ζελατινώδη εμφάνιση
2. Μικρή συμπίκνωση της εξωκυττάριας ουσίας
3. Μέτρια/σοβαρή συμπίκνωση της εξωκυττάριας ουσίας



#### 4.5 Προετοιμασία του PRP (platelet-rich plasma)

Ολικό αίμα ποσότητας 5ml συλλέχτηκε μετά από φλεβοκέντηση της σαφηνούς φλέβας, χρησιμοποιώντας σωληνάρια Regen<sup>TM</sup> DCT-D1. Μετά από προσεκτική ανάμειξη, 1ml αιθανόλης 95% και 0,4ml CaCl<sub>2</sub> μεταφέρθηκαν στα σωληνάρια Regen lab ET. Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στις 3000 στροφες με τη φυγόκεντρο Regen Lab. Το υπερκείμενο πλάσμα (PPP) αφαιρέθηκε προσεκτικά και το εναπομείναν PPP (περίπου 200 μL) και το ίζημα των αιμοπεταλίων αποτέλεσαν το PRP. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων και το κλάσμα PRP κάθε δείγματος ολικού αίματος μετρήθηκαν με τη χρήση ενός αιμοκυτόμετρου.



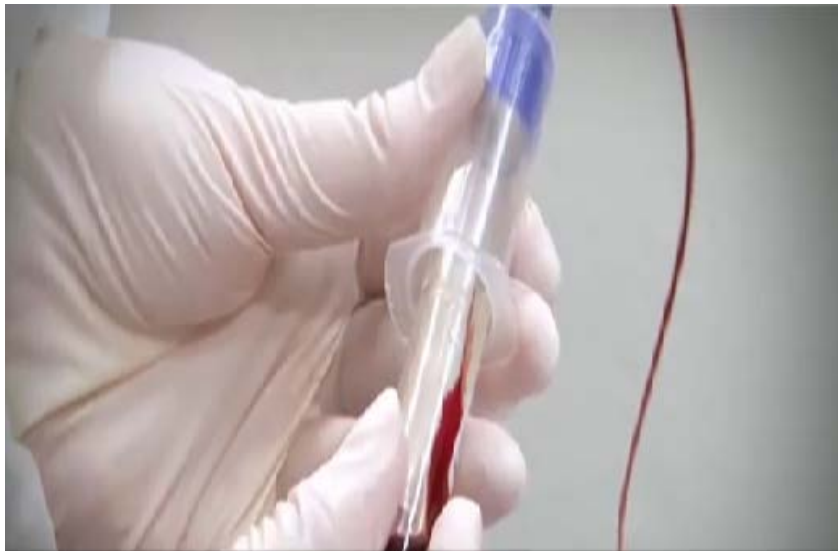
Εικ 10. Τα βήματα της διαδικασίας



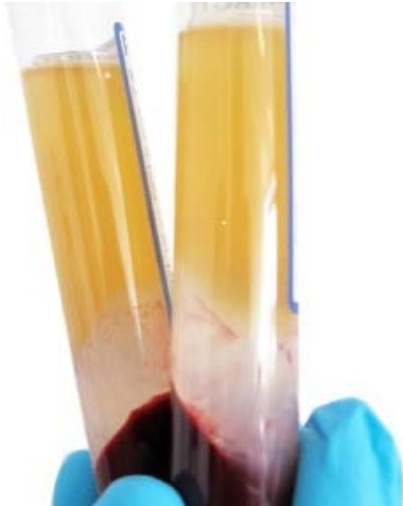
Εικ.11. Το κιτ



**Εικ. 12.** Η φυγόκεντρος



**Εικ. 13.** Το αίμα στο φιαλίδιο



**Εικ.14. Το PRP έτοιμο μετά τη φυγοκέντρηση**



**Εικ.15. Αναρρόφηση του PRP για να χρησιμοποιηθεί**

#### **4.7 Στατιστική ανάλυση**

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποκατάσταση/επιδείνωση των εκφυλιστικών αλλοιώσεων των δίσκων, εφαρμόστηκε η ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων μαζί με τη μη παραμετρική δοκιμασία Friedman, όπως αρμόζει σε μικρά δείγματα, χωρίς κανονική κατανομή. Για να ανιχνευθούν οι διαφορές μεταξύ των συγκεκριμένων διαφορετικών χρονικών στιγμών (post hoc ανάλυση) χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Student–Newman–Keuls. Οι διαφορές ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα στις διάφορες χρονικές στιγμές αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney–U test. Η κλίμακα 0-3 χρησιμοποιήθηκε επίσης για τις ημιποσοτικές μεθόδους, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια του παρόντος. Το επίπεδο στατιστική σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p=0.05$ . Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0.

#### 4.8 Πειραματικό μοντέλο

Αναπτύχθηκε ένα πειραματικό μοντέλο μελέτης της αναγεννητικής δράσης της ενδοδισκικής έγχυσης αυτόλογων αυξητικών παραγόντων (platelet rich plasma) σε εκφυλισμένο μεσοσπονδύλιο δίσκο κονίκλου.

Δημιουργήθηκαν δυο ομάδες πειραματόζωων: η ομάδα ελέγχου (Control group) ή ομάδα B και η ομάδα μελέτης – PRP ή ομάδα A. Η επιλογή των κουνελιών για την κάθε ομάδα έγινε τυχαία. Κάθε 2 εβδομάδες θυσιάζονταν 6 πειραματόζωα (3 από κάθε ομάδα) και έγινε λήψη δυο μεσοσπονδύλιων δίσκων από το κάθε ένα.

Η επιλογή των κουνελιών για την ημέρα θανάτου έγινε επίσης τυχαία. Τα κουνέλια έλαβαν νάρκωση με ενδομυϊκή ένεση κεταμίνης και ξυλαζίνης και στη συνέχεια θανατώθηκαν με ενδοκαρδιακή ένεση. Ακολούθησε προσπέλαση επί της παλαιάς σε πλάγια πρηνή θέση, ανεύρεση και παρασκευή των δίσκων O3-O4 και O4-O5.

Συνολικά προέκυψαν 36 παρασκευάσματα- 12 ανά δυο εβδομάδες. Ο αριθμός σε κάθε παρασκεύασμα αντιστοιχεί στο πειραματόζωο από το οποίο προήλθε (π.χ. No 1 = πειραματόζωο No 1). Το γράμμα σε κάθε παρασκεύασμα αντιστοιχεί σε έναν από τους δυο δίσκους του συγκεκριμένου ζώου (π.χ. 1 A= ο πρώτος δίσκος του 1<sup>ου</sup> ζώου).

Στην 1<sup>η</sup> φάση ( 2 εβδομάδες μτχ) θανατώθηκαν τα ζώα No 1, 2, 3 από την ομάδα ελέγχου και 16, 17, 18 από την ομάδα PRP. Στη δεύτερη φάση (4 εβδομάδες μτχ) θανατώθηκαν τα ζώα 4, 5, 6 απο την ομάδα ελέγχου και 13, 14, 15 από την ομάδα PRP. Στην τελευταία φάση (6 εβδομάδες μτχ) θανατώθηκαν τα ζώα 7, 8, 9 από την ομάδα ελέγχου και 10, 11, 12 από την ομάδα PRP.

**Πίνακας 1. 1<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (15 ημέρες MTX)-ομάδα ελέγχου**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                                 |
|------------------------|--------------|---|
| <b>1 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>1 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>2 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>2 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>3 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>3 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |

**Πίνακας1.1 1<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (15 ημέρες MTX)-ομάδα PRP**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                   |
|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <b>16 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>16 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>17 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>17 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>18 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>18 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |

**Πίνακας 2. 2<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (30 ημέρες MTX) ομάδα ελέγχου**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                                 |
|------------------------|--------------|---|
| <b>4 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>4 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>5 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>5 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>6 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>6B</b>              | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |

**Πίνακας 2.2 2<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (30 ημέρες MTX) ομάδα PRP**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                   |
|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <b>13 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>13 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>14 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>14 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>15 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>15 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |

**Πίνακας 3. Πίνακας 3<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (45 ημέρες MTX) ομάδα ελέγχου**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                                 |
|------------------------|--------------|---|
| <b>7A</b>              | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>7 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>8 A</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>8 B</b>             | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>9A</b>              | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |
| <b>9B</b>              | Control      | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση φυσιολογικού ορού |

**Πίνακας 3.3 3<sup>η</sup> ΦΑΣΗ (45 ημέρες MTX) ομάδα PRP**

| <b>Αριθμός/ γράμμα</b> | <b>Ομάδα</b> | <b>στοιχεία</b>                   |
|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <b>10 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>10 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>11 A</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>11 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>12A</b>             | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |
| <b>12 B</b>            | PRP          | Εκφυλισμένος δίσκος με έγχυση PRP |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε σαφείς εκφυλιστικές αλλοιώσεις, οι οποίες προοδευτικά επιδεινώθηκαν και μεγιστοποιήθηκαν κατά την 45<sup>η</sup> ημέρα, όπως φάνηκε και από την ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures analysis). Η βαθμολογία που προέκυψε με βάση τη διαβάθμιση της ιστολογικής αξιολόγησης με χρώση H&E και η έκφραση του κολλαγόνου τύπου II (πηκτοειδής πυρήνας και εσωτερικός ινώδης δακτύλιος) ήταν οι δείκτες που αποτύπωσαν καλύτερα την εκφύλιση και τη διεργασία αποκατάστασης. Παρά τη βελτίωση που παρατηρήθηκε στο δείκτη του κολλαγόνου κατά την περίοδο παρακολούθησης, οι διαφορές δεν έφθασαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, παρόλο που τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδεικτικά στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0,135$  για HE και  $p=0,104$  στην περίπτωση του κολλαγόνου τύπου II (εσωτερικός ινώδης δακτύλιος)). Γεγονός που επιτρέπει την υπόθεση ότι σε περίπτωση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, οι διαφορές θα αναδεικνύονταν ως στατιστικά σημαντικές. Από την άλλη πλευρά, η συν τω χρόνο επιδείνωση της εκφύλισης είναι έκδηλη και αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών. Ακόμα περισσότερο, στην περίπτωση της συνολικής HE- βαθμολογίας, οι δύο ομάδες διέφεραν στατιστικά σημαντικά την ημέρα 30 και την ημέρα 45. Σχετικά με την έκφραση του κολλαγόνου τύπου II, η διαφορά ήταν στατιστικά έκδηλη την 45<sup>η</sup> ημέρα στον εσωτερικό ινώδη δακτύλιο. Στην ομάδα ελέγχου το περιεχόμενο των ινών κολλαγόνου (έσω στοιβάδα του ινώδους δακτυλίου) ελαττώθηκε κατά 82%, ενώ στην πειραματική ομάδα αυξήθηκε περίπου κατά 10% συγκριτικά με τις αρχικές τιμές (διαφορά στατιστικά σημαντική  $p=0,004$ ). Η ελάττωση στο κολλαγόνο τύπου II (πηκτοειδούς πυρήνα) έφθασε το 71% στην ομάδα ελέγχου, ενώ καμιά ουσιαστική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα PRP ( $p=0,007$ ). Ο TGF- $\beta$  αυξήθηκε και στις δύο ομάδες, ωστόσο οι διαφορές δεν έφθασαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, ακόμα και στο επίπεδο  $p=0.01$ . Αναφορικά με τον TNF- $\alpha$ , ο παράγοντας αυτός βρισκόταν σταθερά σε υψηλά επίπεδα στην ομάδα PRP διαφέροντας ευρέως από την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1).



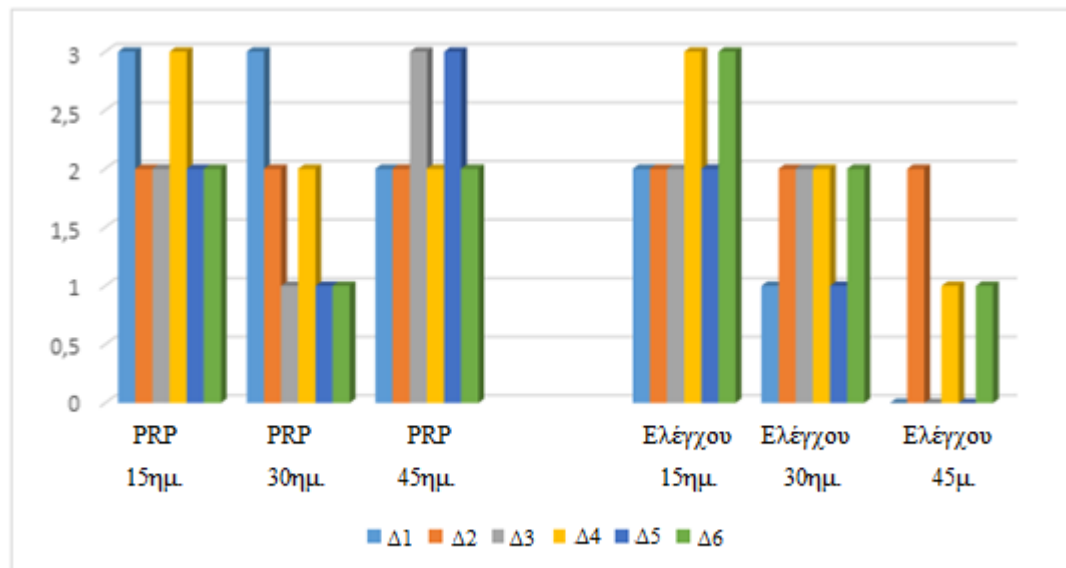
**Πίνακας 1. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των διάφορων χρονικών στιγμών και ομάδων**

| N=6  | Πειραματική ομάδα-PRP |                 | Ομάδα ελέγχου   |                 | p**          |
|--|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
|  | Μέση τιμή             | Τυπική απόκλιση | Μέση τιμή       | Τυπική απόκλιση |              |
| HE-συνολική βαθμολογία 15ημ.                 | 6,00                  | 0,00            | 6,00            | 0,00            | 1,000        |
| HE-συνολική βαθμολογία 30ημ.                 | 6,67                  | 1,03            | 8,83            | 0,98            | <b>0,015</b> |
| HE-συνολική βαθμολογία 45ημ.                 | 6,37                  | 1,01            | 12,00           | 0,00            | <b>0,002</b> |
| p*   | 0.135                 |                 | <b>0,002***</b> |                 |              |
| Κολλαγόνο τύπου II -εσωτερικά 15ημ.          | 1,67                  | 1,67            | 1,83            | 0,75            | 0,665        |
| Κολλαγόνο τύπου II -εσωτερικά 30ημ.          | 1,17                  | 1,17            | 1,33            | 0,52            | 0,523        |
| Κολλαγόνο τύπου II -εσωτερικά 45ημ.          | 1,83                  | 1,83            | 0,33            | 0,52            | <b>0,004</b> |
| p*   | 0.104                 |                 | <b>0,022***</b> |                 |              |
| Κολλαγόνο τύπου II –πηκτοειδούς πυρήνα 15ημ. | 2,33                  | 2,33            | 2,33            | 0,52            | 0,699        |
| Κολλαγόνο τύπου II –πηκτοειδούς πυρήνα 30ημ. | 2,00                  | 2,00            | 1,67            | 0,52            | 0,589        |
| Κολλαγόνο τύπου II –πηκτοειδούς πυρήνα 45ημ. | 2,17                  | 2,17            | 0,67            | 0,82            | <b>0,007</b> |
| p*   | 0,584                 |                 | <b>0,008***</b> |                 |              |
| TNFα-εσωτερικά 15ημ.                         | 0,33                  | 0,58            | 0,00            | 0,00            | 0,548        |
| TNFα-εσωτερικά 30ημ                          | 0,80                  | 0,45            | 0,00            | 0,00            | <b>0,030</b> |
| TNFα-εσωτερικά 45ημ                          | 0,67                  | 0,52            | 0,00            | 0,00            | 0,565        |
| p*   | 0,135                 |                 | n/a             |                 |              |
| TNFα- πηκτοειδούς                            | 1,75                  | 1,26            | 0,33            | 0,82            | 0,114        |

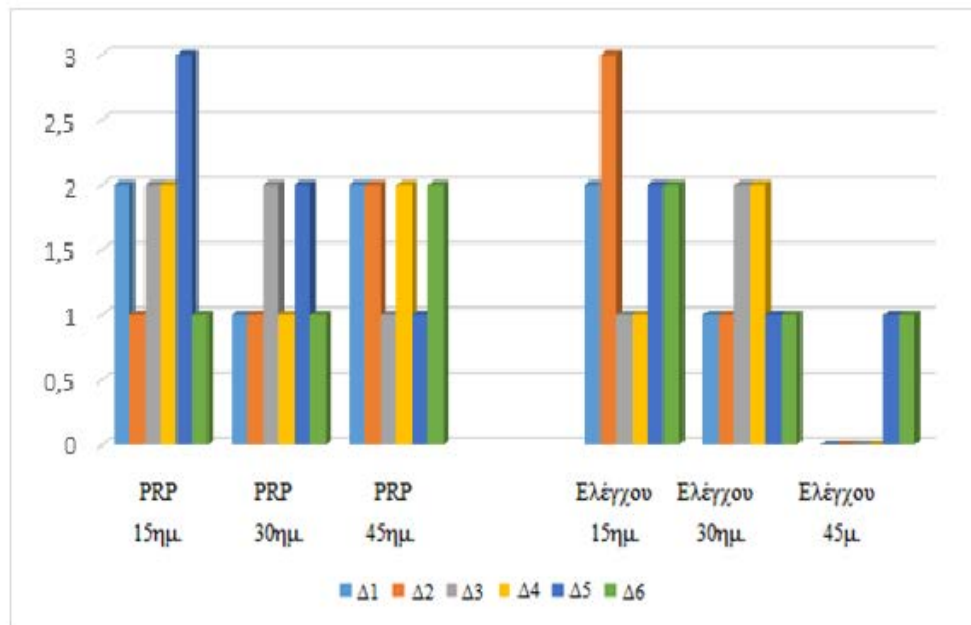
|   |       |      |  |       |      |              |
|---|-------|------|--|-------|------|--------------|
| πυρήνα 15ημ.  |       |      |  |       |      |              |
| TNFα- πηκτοειδούς<br>πυρήνα 30ημ  | 1,67  | 1,21 |  | 0,20  | 0,45 | <b>0,052</b> |
| TNFα- πηκτοειδούς<br>πυρήνα 45ημ  | 1,67  | 0,52 |  | 0,00  | 0,00 | <b>0,004</b> |
| p*  | 0,584 |      |  | 0,607 |      |              |
| TGF-β-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα 15ημ.   | 1,17  | 1,17 |  | 0,50  | 0,84 | 0,368        |
| TGF-β-<br>πηκτοειδούς πυρήνα<br>30ημ  | 1,67  | 1,67 |  | 1,75  | 0,50 | 0,879        |
| TGF-β-<br>πηκτοειδούς πυρήνα<br>45ημ  | 2,00  | 2,00 |  | 2,00  | 0,00 | 1,000        |
| p*  | 0,097 |      |  | 0,091 |      |              |
| *Friedman test, post hoc analysis(SNK): οι τιμές την 45 <sup>η</sup> ημ. διέφεραν στατιστικά σημαντικά (p<0,05) από την 30ημ. και την 15ημ.<br>**Mann-Whitney-U test<br>*** post hoc ανάλυση με SNK test (45ημ. vs 15ημ.&30ημ.) |       |      |  |       |      |              |

Η επιδείνωση των δεικτών στην ομάδα ελέγχου και αντίστοιχα η βελτίωσή τους στην ομάδα PRP (όπου υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές) φαίνονται στα γραφήματα 1-3. Όλες οι άλλες παράμετροι (TGF-β, TNF-α και κολλαγόνο εξωτερικό του ινώδη δακτυλίου) δεν παρουσίασαν καμιά σημαντική διακύμανση μεταξύ των διαφόρων χρονικών σημείων ή μεταξύ της ομάδας ελέγχου (p>0,15). Αναλυτικά οι διαφορές στις διάφορες χρονικές στιγμές και στα διαφορετικά στοιχεία του δίσκου παρουσιάζονται στους πίνακες 2-25.

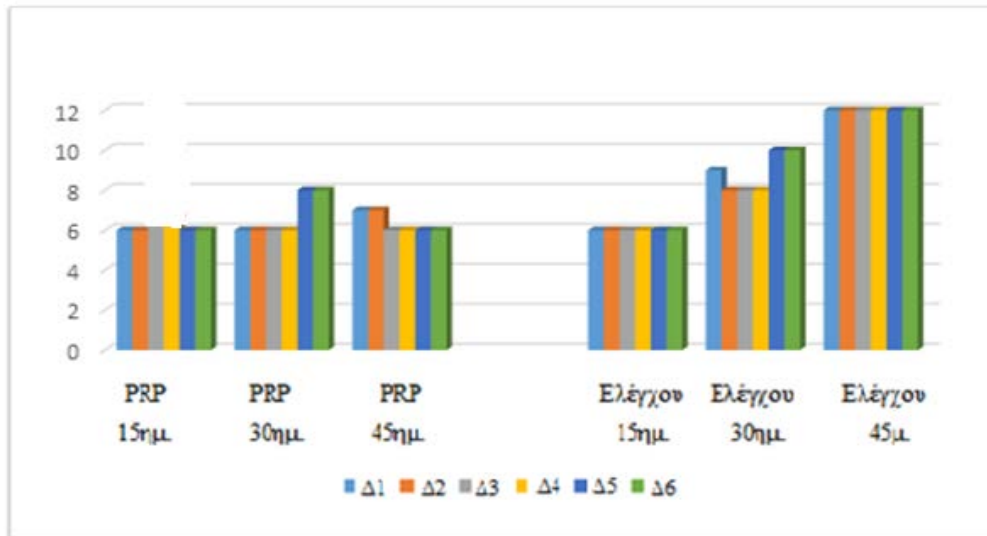
**Γράφημα 1.** Η έκφραση του κολλαγόνου στον πηκτοειδή πυρήνα στη διάρκεια του χρόνου παρακολούθησης στα δύο δείγματα

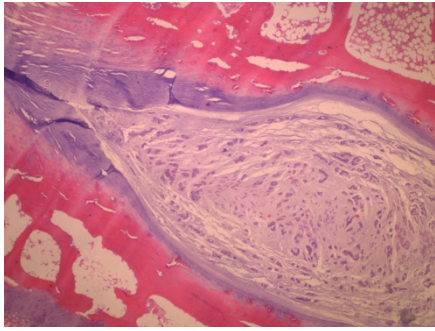


**Γράφημα 2.** Η έκφραση του κολλαγόνου (εσωτερικό δακτύλιο) στη διάρκεια του χρόνου παρακολούθησης στα δύο δείγματα

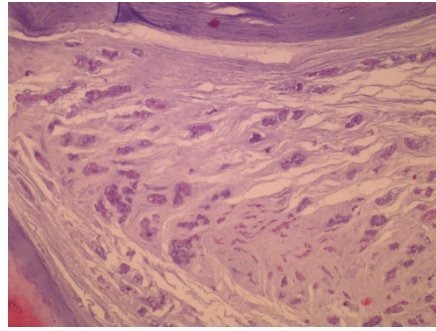


**Γράφημα 3. Ιστολογική αξιολόγηση στη διάρκεια του χρόνου παρακολούθησης στα δύο δείγματα**

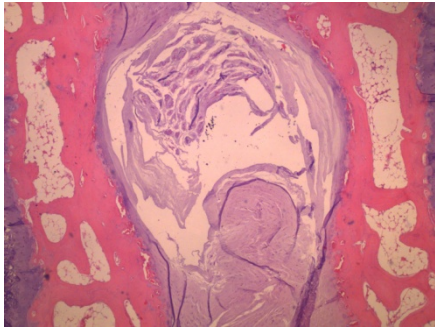




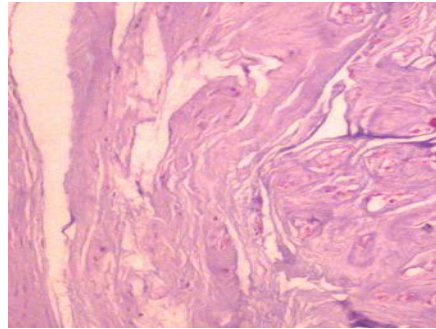
Α



Β



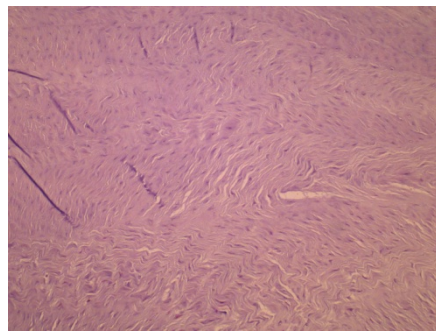
Γ



Δ



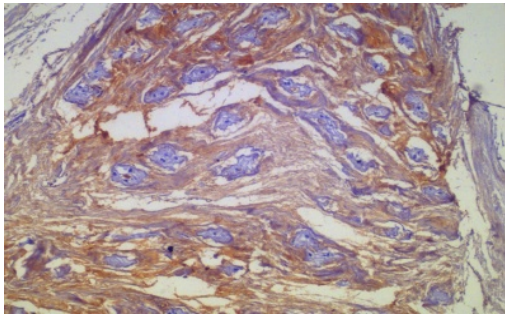
Ε



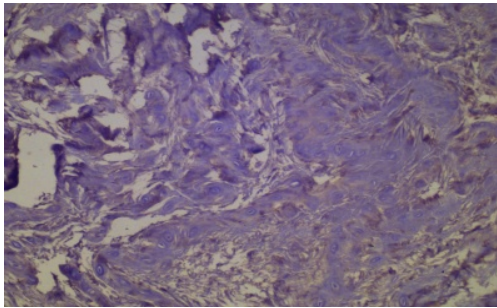
ΣΤ

**Εικόνα 16.Ομάδα ελέγχου (Β) με προοδευτικές εκφυλιστικές αλλοιώσεις, ανάλογα με τη χρονική στιγμή της θυσίας.**

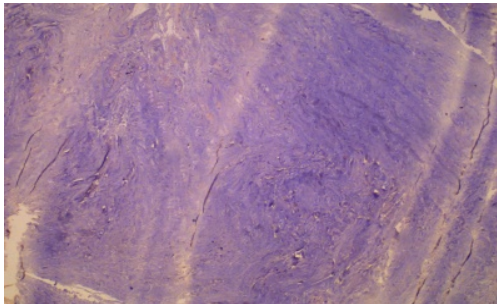
Τομές με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές 15 ημερες (Α και Β), 30 ημερες(Γ και Δ) και 45 (Ε και ΣΤ) μετά την έγχυση στην ομάδα Β (ελέγχου). Σχεδόν φυσιολογική εμφάνιση, φυσιολογικός τύπος ινοχόνδρινων πεταλίων U-σχήματος και φυσιολογική κυτταροβρίθεια, με μεγάλα κενोटόπια στη ζελατινώδη δομή της θεμέλιας ουσίας (Α Χ 20, Β Χ400). Μετρίως εκφυλισμένος δίσκος (Γ Χ40, Δ Χ400). Σοβαρά εκφυλισμένος δίσκος, απώλεια του χαρακτηριστικού ορατού ορίου ανάμεσα στον πηκτοειδή πυρήνα και τον ινώδη δακτύλιο και η αντικατάστασή τους από ινώδη ιστό (Ε Χ40, ΣΤ Χ400).



2Α. Ομάδα Μελέτης



2Β. Ομάδα ελέγχου, 30 ημέρες μετά την έγχυση



2Γ. Ομάδα ελέγχου, 45 ημέρες μετά την έγχυση

**Εικόνα 17. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του κολλαγόνου τύπου II στον ιστό του δίσκου σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την έγχυση.**

Η ομάδα μελέτης (PRP) εμφάνισε σχεδόν την ίδια ένταση έκφρασης κυρίως στον πηκτοειδή πυρήνα, και στις τρεις υποομάδες (2Α. X 100). Στην ομάδα ελέγχου, υπήρξε προοδευτική ανάπτυξη ινοχόνδρινου ιστού, με αντίστοιχη μείωση της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II (2Β X100) ή και πλήρη απουσία (2Γ X100).

### 5.1 Ιστολογική διαβάθμιση (H&E)

\*Ομάδα Β, (Φυσιολογικός ορός)

\*\*Ομάδα Α, (PRP)

**Πίνακας 2. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E) 15η μέρα Ομάδα Α**

n = 6

| A/A   | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-μεταβολή | Όριο<br>ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|-------|----------------------------------|--|---|---|----------|
| A16 α | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A16 β | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A17 α | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A17 β | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A18 α | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A18 β | 1                                | 1  | 2                                       | 2   | 6        |

**Πίνακας 3. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E)15η μέρα Ομάδα Β**

n = 6

| A/A  | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-<br>μεταβολή | Όριο<br>ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|------|--------------------------------------|--|---|---|----------|
| B1α  | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| B1 β | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| B2 α | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| B2 β | 1                                    | 1  | 2                                       | 1   | 6        |
| B3 α | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| B3 β | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |

**Πίνακας 4. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E)-30η μέρα Ομάδα Β**

n = 6

| A/A  | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-μεταβολή | Όριο<br>ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|------|----------------------------------|--|---|---|----------|
| B4 α | 2                                | 2  | 2                                       | 3   | 9        |
| B4 β | 2                                | 2  | 2                                       | 2   | 8        |
| B5 α | 2                                | 2  | 2                                       | 2   | 8        |
| B5 β | 2                                | 2  | 2                                       | 2   | 8        |
| B6 α | 2                                | 2  | 3                                       | 3   | 10       |
| B6 β | 2                                | 2  | 3                                       | 3   | 10       |

**Πίνακας 5. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E)-30η μέρα Ομάδα Α**

n = 6

| A/A   | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-<br>μεταβολή | Όριο ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|-------|--------------------------------------|---|---|---|----------|
| A13 α | 1                                    | 1   | 2                                       | 2   | 6        |
| A13 β | 1                                    | 1   | 2                                       | 2   | 6        |
| A14 α | 1                                    | 1   | 2                                       | 2   | 6        |
| A14 β | 1                                    | 1   | 2                                       | 2   | 6        |
| A15 α | 2                                    | 2   | 2                                       | 2   | 8        |
| A15 β | 2                                    | 2   | 2                                       | 2   | 8        |



**Πίνακας 6. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E)-45η μέρα Ομάδα Β**

n=6

| A/A  | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-<br>μεταβολή | Όριο<br>ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|------|--------------------------------------|--|---|---|----------|
| B7 α | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |
| B7 β | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |
| B8 α | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |
| B8 β | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |
| B9 α | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |
| B9 β | 3                                    | 3  | 3                                       | 3   | 12       |

**Πίνακας 7. Αποτελέσματα ιστολογικής διαβάθμισης (H-E)-45η μέρα Ομάδα Α**

n = 6

| A/A   | Ινώδης<br>δακτύλιος<br>-<br>μεταβολή | Όριο<br>ινώδους<br>δακτυλίου-<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Κυτταροβρίθεια<br>Πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Θεμέλια<br>ουσία<br>πηκτοειδούς<br>πυρήνα | Άθροισμα |
|-------|--------------------------------------|--|---|---|----------|
| A10 α | 1                                    | 2  | 2                                       | 2   | 7        |
| A10 β | 1                                    | 2  | 2                                       | 2   | 7        |
| A11 α | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A11 β | 1                                    | 1  | 2                                       | 2   | 6        |
| A12 α | 1                                    | 1  | 3                                       | 2   | 6        |
| A12 β | 1                                    | 1  | 3                                       | 2   | 6        |

## 5.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση Collagen Type II

Η αναλογία κεχρωσμένων κυττάρων σε μια δεδομένη περιοχή

**0**= καμία έκφραση

**1**=<25%

**2**=25-75%

**3**=>75%

**Πίνακας 8. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II-15ημέρα Ομάδα Α**

| n = 6 |                                |                               |                       |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| A16 α | 2                              | 0                             | 3                     |
| A16 β | 1                              | 0                             | 2                     |
| A17 α | 2                              | 0                             | 2                     |
| A17 β | 2                              | 0                             | 3                     |
| A18 α | 3                              | 0                             | 2                     |
| A18 β | 1                              | 0                             | 2                     |

**Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II-15ημέρα Ομάδα Β**

| n =6 |                                |                               |                       |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| B1 α | 2                              | 0                             | 2                     |
| B1 β | 3                              | 0                             | 2                     |
| B2 α | 1                              | 0                             | 2                     |
| B2 β | 1                              | 0                             | 3                     |
| B3 α | 2                              | 0                             | 2                     |
| B3 β | 2                              | 0                             | 3                     |

**Πίνακας 10. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II-30η μέρα Ομάδα Α**

| n=6   |                                |                               |                       |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| A13 α | 1                              | 0                             | 3                     |
| A13 β | 1                              | 0                             | 2                     |
| A14 α | 2                              | 0                             | 1                     |
| A14 β | 1                              | 0                             | 2                     |
| A15 α | 2                              | 0                             | 1                     |
| A15 β | 1                              | 0                             | 1                     |

**Πίνακας 11. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II 30η μέρα Ομάδα Β**

| n=6  |                                |                               |                       |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| B4 α | 1                              | 0                             | 1                     |
| B4 β | 1                              | 0                             | 2                     |
| B5 α | 2                              | 0                             | 2                     |
| B5 β | 2                              | 0                             | 2                     |
| B6 α | 1                              | 0                             | 1                     |
| B6 β | 1                              | 0                             | 2                     |

**Πίνακας 12. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II-45η μέρα Ομάδα Α**

| n = 6 |                                |                               |                       |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| A10 α | 2                              | 0                             | 2                     |
| A10 β | 2                              | 0                             | 2                     |
| A11 α | 1                              | 0                             | 3                     |
| A11 β | 2                              | 0                             | 2                     |
| A12 α | 1                              | 0                             | 3                     |
| A12 β | 2                              | 0                             | 2                     |

**Πίνακας 13. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Collagen Type II-45η μέρα Ομάδα Β**

| n =6 |                                |                               |                       |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
| B7 α | 0                              | 0                             | 0                     |
| B7 β | 0                              | 0                             | 2                     |
| B8 α | 0                              | 0                             | 0                     |
| B8 β | 0                              | 0                             | 1                     |
| B9 α | 1                              | 0                             | 0                     |
| B9 β | 1                              | 0                             | 1                     |

### 5.3 Ανοσοϊστοχημική έκφραση TNF- $\alpha$

Ημιποσοτική αξιολόγηση του ποσοστού των κεχρωσμένων κυττάρων ως εξής:

-/+ = μικρή ή καμιά χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

+ = ελάχιστη χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

++ = μέτρια χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

+++ = ισχυρή χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

\*Ομάδα Β, (Φυσιολογικός ορός)

\*\*Ομάδα Α, (+PRP)

**Πίνακας 14. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF- $\alpha$ - 15η μέρα Ομάδα Α**

| A/A          | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A16 $\alpha$ | -/+                            | +                             | ++                    |
| A16 $\beta$  | (*)                            | (*)                           | (*)                   |
| A17 $\alpha$ | -/+                            | -/+                           | -/+                   |
| A17 $\beta$  | -/+                            | +                             | ++                    |
| A18 $\alpha$ | +                              | +                             | +++                   |
| A18 $\beta$  | (*)                            | (*)                           | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 15. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF- $\alpha$ - 15η μέρα Ομάδα Β**

| A/A         | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B1 $\alpha$ | -/+                            | -/+                           | -/+                   |
| B1 $\beta$  | -/+                            | +                             | ++                    |
| B2 $\alpha$ | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B2 $\beta$  | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B3 $\alpha$ | -/+                            | -/+                           | -/+                   |
| B3 $\beta$  | -/+                            | +                             | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 16. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF-α 30η μέρα Ομάδα Α**

| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A13 α | +                              | -/+                           | +++                   |
| A13 β | +                              | ++                            | +                     |
| A14 α | -/+                            | +                             | ++                    |
| A14 β | +                              | +                             | ++                    |
| A15 α | (*)                            | (*)                           | ++                    |
| A15 β | -/+                            | +                             | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 17. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF-α 30η μέρα Ομάδα Β**

| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B4 α | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B4 β | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B5 α | (*)                            | (*)                           | (*)                   |
| B5 β | -/+                            | +                             | +                     |
| B6 α | -/+                            | ++                            | -/+                   |
| B6 β | -/+                            | +                             | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 18. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF-α- 45η μέρα Ομάδα Α**

| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A10 α | -/+                            | +                             | ++                    |
| A10 β | +                              | (*)                           | ++                    |
| A11 α | +                              | ++                            | ++                    |
| A11 β | +                              | ++                            | ++                    |
| A12 α | +                              | +                             | +                     |
| A12 β | +                              | +                             | +                     |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 19. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TNF- $\alpha$  45η μέρα Ομάδα Β**

| A/A         | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B7 $\alpha$ |                                |                               | -/+                   |
| B7 $\beta$  | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B8 $\alpha$ |                                |                               | -/+                   |
| B8 $\beta$  |                                |                               | -/+                   |
| B9 $\alpha$ | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B9 $\beta$  |                                |                               | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα  
δεδομένα

#### 5.4 Ανοσοϊστοχημική έκφραση TGF-β

Ημιποσοτική αξιολόγηση του ποσοστού των κεχρωσμένων κυττάρων ως εξής:

-/+ = μικρή ή καμιά χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

+ = ελάχιστη χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

++ = μέτρια χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

+++ = ισχυρή χρώση στην πλειονότητα των κυττάρων

\*Ομάδα Β, (Φυσιολογικός ορός)

\*\*Ομάδα Α, (+PRP)

**Πίνακας 20. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 15η μέρα Ομάδα Α**

| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A16 α | +                              | +                             | ++                    |
| A16 β | (*)                            | (*)                           | -/+                   |
| A17 α | +                              | +                             | -/+                   |
| A17 β | +                              | +                             | ++                    |
| A18 α | +                              | ++                            | +++                   |
| A18 β | (*)                            | +                             | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 21. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 15η μέρα Ομάδα Β**

| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B1 α | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B1 β | -/+                            | +                             | ++                    |
| B2 α | +                              | ++                            | +                     |
| B2 β | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B3 α | -/+                            | +                             | -/+                   |
| B3 β | +                              | ++                            | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα



**Πίνακας 22. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 30η μέρα Ομάδα Α**

| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A13 α | ++                             | +                             | ++                    |
| A13 β | +                              | (*)                           | ++                    |
| A14 α | +                              | +                             | ++                    |
| A14 β | +                              | ++                            | ++                    |
| A15 α | +                              | (*)                           | ++                    |
| A15 β | +                              | -/+                           | -/+                   |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 23. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 30η μέρα Ομάδα Β**

| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B4 α | +                              | ++                            | ++                    |
| B4 β | (*)                            | (*)                           | (*)                   |
| B5 α | ++                             | +                             | ++                    |
| B5 β | +                              | ++                            | ++                    |
| B6 α | +                              | ++                            | (*)                   |
| B6 β | +                              | ++                            | +                     |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 24. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 45η μέρα Ομάδα Α**

| A/A   | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| A10 α | +                              | ++                            | ++                    |
| A10 β | +                              | +                             | ++                    |
| A11 α | +                              | +                             | ++                    |
| A11 β | +                              | +                             | ++                    |
| A12 α | +                              | +                             | ++                    |
| A12 β | +                              | +                             | ++                    |

(\*): Μη διαθέσιμα δεδομένα

**Πίνακας 25. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης TGF-β 45η μέρα Ομάδα Β**

| A/A  | Ινώδης δακτύλιος<br>-εσωτερικά | Ινώδης δακτύλιος<br>εξωτερικά | Πηκτοειδής<br>πυρήνας |
|------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| B7 α | (*)                            | +                             | ++                    |
| B7 β | ++                             | +                             | ++                    |
| B8 α | ++                             | +                             | ++                    |
| B8 β | (*)                            | +                             | ++                    |
| B9 α | +                              | +                             | ++                    |
| B9 β | +                              | +                             | ++                    |

(\*): Μη διαθέσιμα  
δεδομένα

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε προοπτικά την διαδικασία αναγέννησης του μεσοσπονδυλίου δίσκου μετά από έγχυση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια, στα πλαίσια του καθιερωμένου μοντέλου εκφύλισης του δίσκου με παρακέντηση, σε κόνικλο. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, κατά τη διάρκεια των 6 εβδομάδων, υπήρχε μία αξιοσημείωτη προοδευτική διαδικασία της εκφύλισης στην ομάδα B- Control, ενώ ο βαθμός της εκφύλισης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα A- PRP, τόσο για τον ινώδη δακτύλιο, όσο και για τον πηκτοειδή πυρήνα. Η αναγέννηση του μεσοσπονδύλιου δίσκου και η αναστροφή των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν τεχνητά, ήταν προφανείς 45 ημέρες μετά τον τραυματισμό, αποδεικνύοντας έτσι όχι μόνο την αποτελεσματικότητα της έγχυσης του PRP, αλλά και την πορεία της αποκατάστασης μέσα στο χρόνο. Η αναγέννηση ήταν εμφανέστερη όσον αφορά τον πηκτοειδή πυρήνα και συγκεκριμένα στην ακεραιότητα, στην κυτταροβρίθεια και στις ίνες κολλαγόνου τύπου II. Στην ομάδα ελέγχου, η επίδοση ως προς την εκφύλιση είχε ήδη υπερβεί την κρίσιμη τιμή των 9 μονάδων, μετά από διάστημα ενός μήνα από τον τραυματισμό, ενώ στην ομάδα μελέτης οι τιμές παρέμεναν σταθερές σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ωστόσο, μια πιο προσεκτική ματιά στην ιστολογική διαβάθμιση και στις συνιστώσες της, αποκάλυψε μια σημαντική αποκατάσταση της θεμελίου ουσίας και της κυτταροβρίθειας, με τη βελτίωση να είναι εμφανής ακόμη και από την 30η μέρα.

Η δημιουργία ινών κολλαγόνου τύπου II (στον εσωτερικό ινώδη δακτύλιο) ακολουθεί μια σαφώς αντίστροφη πορεία στις δύο ομάδες, όντας προφανώς αυξημένη στην ομάδα μελέτης (παρά την έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας, η μέση επίδοση την 45<sup>η</sup> ημέρα υπερβαίνει την αρχική επίδοση κατά 10%, στην ομάδα μελέτης). Στην ομάδα ελέγχου, η εκφύλιση είναι προφανής σε 45 ημέρες, καθώς οι ίνες κολλαγόνου έχουν μειωθεί, με αναλογία 1:5,5 (45<sup>η</sup> βαθμολογία : αρχική βαθμολογία). Όσον αφορά το κολλαγόνο του πηκτοειδούς πυρήνα, μείωση παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου κατά 75% περίπου. Τα αποτελέσματα σχετικά με τους TNF-α και TGF-β1 αποκαλύπτουν μια πλειορυθμιζόμενη συγκέντρωση, κατά τη μελέτη της PRP ομάδας. Αυτά τα ευρήματα, διαφωτίζουν τις γνώσεις μας σχετικά με την εξέλιξη της εκφύλισης και της αποκατάστασης μέσα στο χρόνο, αποδεικνύουν την αναγέννηση με αυτόλογο PRP και επιτρέπουν την περαιτέρω διατύπωση ερωτημάτων σχετικά με το

ρόλο των κυτοκινών και τη χρήση PRP, στα πλαίσια της ανάπλασης του μεσοσπονδυλίου δίσκου.

Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης PRP, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, και δίνουν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τη διεργασία επούλωσης μέσα στο χρόνο. Οι Gullung et al. [113] αξιολόγησαν το θεραπευτικό δυναμικό του PRP χρησιμοποιώντας MRI και ιστολογικές εξετάσεις σε ένα μοντέλο διαδερμικής παρακέντησης του ινώδους δακτύλιου σε αρουραίο. Η μελέτη τους έδειξε την προστατευτική δράση του PRP σε δίσκους που είχαν υποστεί βλάβη και το αποτέλεσμα ήταν ισχυρότερο μετά από έγκαιρη παρέμβαση. Πράγματι, στην μελέτη αυτή, που συμπεριέλαβε εικονικές και PRP-ομάδες, μία που αντιμετωπίστηκε αμέσως με PRP και μια άλλη με καθυστερημένη αντιμετώπιση- δύο εβδομάδες μετά τον τραυματισμό, η PRP ομάδα παρουσίασε σαφείς ενδείξεις συντήρησης της δομής του πηκτοειδούς πυρήνα, παρά τις (περιορισμένες) αλλοιώσεις. Λιγότερα φλεγμονώδη κύτταρα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε υγρό παρατηρήθηκαν στην ομάδα που αντιμετωπίστηκε με PRP. Παραδόξως, η καθυστερημένη θεραπεία με PRP οδήγησε επίσης σε περαιτέρω πρόληψη του εκφυλισμού, αν και η αξιολόγηση με μαγνητική τομογραφία του ύψους του δίσκου ήταν λιγότερο ελπιδοφόρα. Στην παρούσα μελέτη, η PRP ένεση έλαβε χώρα αμέσως μετά τον τραυματισμό και τα τελευταία δείγματα συλλέχθηκαν στις 6 εβδομάδες, ενώ τα PRP δείγματα στη μελέτη του Gullung δεν ήταν διαθέσιμα κατά την 6<sup>η</sup> εβδομάδα, επομένως η σύγκριση δεν ήταν δυνατή.

Οι Obata et al. [114] μελέτησαν το αντίστοιχο φαινόμενο σε κονίκλους χρησιμοποιώντας έγχυση αυτόλογου PRP φυγοκεντρημένο σε υψηλή ταχύτητα. Με τη χρήση μαγνητικής τομογραφίας και ιστολογικών εξετάσεων επιβεβαιώθηκε η ευεργετική επίδραση του PRP. Ο αριθμός των κυττάρων δίκην χονδροκυττάρων στο εσωτερικό στρώμα του δακτυλίου, είτε στον πηκτοειδή πυρήνα των δίσκων που υποβλήθηκαν με αγωγή με PRP ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι στην ομάδα ελέγχου. Στη μελέτη αυτή, εκτός από την ομάδα ελέγχου, έχουν επίσης συμπεριληφθεί ομάδες των οποίων το πλάσμα περιείχε ανεπαρκή αριθμό αιμοπεταλίων, όμως τα αποτελέσματα, παρά το γεγονός ότι ήταν καλύτερα από αυτά των ομάδων ελέγχου, ήταν μάλλον απογοητευτικά. Οι διαφορές μεταξύ ομάδας ελέγχου και PRP ομάδων ήταν εμφανή τέσσερις εβδομάδες μετά την ένεση, ενώ στη μελέτη μας, τα ευρήματα αποκαλύπτουν ένα μάλλον καθυστερημένο πρότυπο

αποκατάστασης, σημειώνοντας, ωστόσο, ότι η αποκατάσταση μπορεί να είναι ιστολογικά παρούσα ακόμη πιο νωρίς.

Αναφορικά με τις συγκεντρώσεις των κυτοκινών TNF και TGF, αυτές ήταν σημαντικά πλειορυθμισμένες στην ομάδα μελέτης, ένα μάλλον απροσδόκητο εύρημα, καθώς αυτές οι κυτοκίνες θεωρούνται παραδοσιακά ως δείκτες φλεγμονής και εκφυλισμού. Ο TGF, ειδικότερα, μπορεί επίσης να ασκεί βλαπτική επίδραση στον εκφυλισμένο χονδρικό ιστό [115-117]. Το γεγονός ότι το PRP περιέχει αυτές τις κυτοκίνες, μαζί με την ποιοτική μέθοδο προσδιορισμού της παρουσίας τους στον ιστό, δημιουργεί κάποιες επιφυλάξεις σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας, δεδομένου ότι οι διαφορές με την πάροδο του χρόνου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, αν και στην περίπτωση του TGF-β, μια τάση αύξησης ανιχνεύθηκε και στις δύο ομάδες.

Το PRP περιέχει μια ποικιλία πρωτεϊνών και αυξητικούς παράγοντες που ενεργούν ως ένα «θεραπευτικό κοκτέιλ», ρυθμίζοντας το μικροπεριβάλλον του ιστού, τις κυτταρικές λειτουργίες και την αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών. Μια μελέτη των Akeda et al [118] έδειξε ότι το PRP είχε μια ήπια διεγερτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τοπική έγχυση του PRP προάγει την αποκατάσταση του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Καθώς και ότι το αυτόλογο αίμα θα πρέπει να προτιμάται ως πηγή των αυξητικών παραγόντων, που απαιτούνται για να διεγείρουν τα κύτταρα που αποκαθιστούν τη μηχανική των ιστών του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ωστόσο, το PRP εγχεόμενο στο μεσοσπονδύλιο δίσκο μπορεί να απελευθερώσει παράγοντες ανάπτυξης με ασταθή τρόπο και με διαφορετικούς ρυθμούς. Προκειμένου να επιβραδύνουν την απελευθέρωση των βιολογικών παραγόντων οι Nagae et al [119] χρησιμοποίησαν μια συνδυαστική θεραπεία με PRP εμφυτευμένο σε μικροσφαιρίδια γέλης. Η απελευθέρωση του PRP και των σχετικών αυξητικών παραγόντων γινόταν με έναν σταθερό τρόπο, καθώς αποδομούνταν τα μικροσφαιρίδια, με αποτέλεσμα τη σημαντική επιβράδυνση εκφύλισης του δίσκου.

Το PRP προάγει μέσω της απελευθέρωσης VEGF την αγγείωση του δίσκου, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην αποκατάσταση της θρεπτικής διάχυσης, κατά την διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης του τραύματος. Ωστόσο, ο εκφυλισμός των δίσκων συνδέεται με την αύξηση του αριθμού των νεύρων και των αιμοφόρων αγγείων και συνεπώς μαζί με το πλεονέκτημα της καλύτερης προσφοράς θρεπτικών

συστατικών που προκαλείται από το PRP, υπάρχει το πιθανό μειονέκτημα της πρόκλησης σημαντικού πόνου και ασβεστοποίησης μέσω της διαδικασίας της φλεγμονής. Ως εκ τούτου, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ακόμη για να διερευνηθούν τις όποιες ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούνται από το PRP [75]. Επίσης, μια μελέτη σχετικά με την επίδραση του PRP σε ανθρώπινα MSCs απέδειξε ότι το PRP ενισχύει πολλαπλασιασμό των MSC και επάγει τη χονδρογονική διαφοροποίηση των MSCs in vitro [120]. Τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τένοντα έδειξαν επίσης μια τάση να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται προς ενεργοποιημένα τενοντοκύτταρα όταν καλλιεργήθηκαν με PRP [121].

Η θεραπεία με PRP έχει θεωρηθεί ως μία πλεονεκτική τεχνική για την αποκατάσταση δίσκου, περισσότερο υποσχόμενη από άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν κεκαθαμένους αυξητικούς παράγοντες, κυρίως επειδή το PRP μπορεί να απομονωθεί από αυτόλογη πηγή, εξαλείφοντας έτσι τις ανησυχίες για αντίδραση του ανοσοποιητικού. Ο τρόπος ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και η συγκέντρωση κυττάρων ή κυτοκινών ενδέχεται να ποικίλει και τα αποτελέσματα μπορεί να είναι ασαφή, ειδικά αν το PRP είναι πλούσιο σε λευκοκύτταρα. Έχει λοιπόν προταθεί η χρήση του PRP, ως «κοκτέιλ» αυξητικών παραγόντων που θα μπορούσε να τονώσει την διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων του μεσοσπονδύλιου δίσκου προς ώριμα κύτταρα μεσοσπονδύλιου δίσκου και να αυξορρυθμίσει τη σύνθεση της θεμελίου ουσίας με αποτέλεσμα την αντιστροφή της εκφυλιστικής τάσης. Η μέχρι σήμερα έρευνα δείχνει ότι το PRP είναι αποτελεσματικό όταν χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα για την αποκατάσταση της μηχανικής των ιστών, καθώς και για την προώθηση της βιολογικής αναγέννησης των εκφυλισμένων μεσοσπονδύλιων δίσκων. Επί του παρόντος, τα περισσότερα ευρήματα δείχνουν ότι το PRP θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικό θεραπευτικό μέσο για τη βιολογική επισκευή του δίσκου.

Ωστόσο, χρειάζεται να επιλυθούν ορισμένα προβλήματα πριν από την κλινική εφαρμογή του PRP. Μέχρι σήμερα, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο παθολογικός μηχανισμός του εκφυλισμού του δίσκου και πρόσφατες μελέτες δείχνουν επίσης ότι ορισμένος αριθμός των MSC βρίσκεται στον εκφυλισμένο ηκτηοειδή πυρήνα. Έτσι, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί η επίδραση του PRP στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων που προέρχονται από τον ηκτηοειδή πυρήνα. Το PRP που παράγεται με διαφορετικές διαδικασίες μπορεί να οδηγήσει σε παρασκεύασμα με διαφορετική περιεκτικότητα

σε αυξητικούς παράγοντες. Επιπλέον, καθώς δεν έχει καθοριστεί ενιαίο πρότυπο για την παραγωγή του PRP, θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η διασφάλιση της ποιότητας του PRP. Οι βέλτιστες δόσεις των διαφόρων αυξητικών παραγόντων του PRP για την αναγέννηση των ιστών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους είναι ζήτημα που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Τα κλινικά δεδομένα από την εφαρμογή του PRP πάνω στη μηχανική των ιστών γενικά, αλλά και ειδικότερα στην αποκατάσταση του δίσκου είναι ανεπαρκή. Η αποσαφήνιση του μηχανισμού εκφύλισης των δίσκων και η κλινική χρησιμότητα του PRP είναι σημεία που θα πρέπει να εστιάσουν οι μελλοντικές έρευνες.

### **Περιορισμοί**

Το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έχει δείξει ότι ανιχνεύει αποτελεσματικά την θεραπευτική επίδραση του PRP. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, το περιεχόμενο των λευκοκυττάρων και των κυττάρων του αίματος στο PRP, δεν προσδιορίστηκε, ενώ το PRP χορηγήθηκε με ένεση αμέσως μετά τον τραυματισμό, ένα πρότυπο το οποίο σίγουρα δεν αντικατοπτρίζει την πορεία της προοδευτικής εκφύλισης του δίσκου στον άνθρωπο. Το τελευταίο ωστόσο δεν συμβαίνει, ακόμα και σε πειραματικά μοντέλα που περιλαμβάνουν εκφύλιση κατά τη διάρκεια ενός μήνα ή και χρήση οποιασδήποτε καθυστερημένης εγχυσης. Σε κάθε περίπτωση, η διαδικασία αποκατάστασης φαίνεται να είναι χρονοβόρα και τα πειραματικά μοντέλα θα πρέπει να περιλαμβάνουν, κατά πάσα πιθανότητα, μεγαλύτερη διάρκεια μετέπειτα παρακολούθησης. Ένας άλλος περιορισμός, παρόν σε όλες τις μελέτες σε ζώα, είναι η έκταση της κάθετης φόρτισης της σπονδυλικής στήλης. Σε μοντέλο όρθιας στάσης σώματος, η επίδραση του PRP μπορεί να μην είναι τόσο αισθητή, καθώς οι δυνάμεις που ασκούνται στον δίσκο αυξάνονται. Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει προγενέστερα ευρήματα που δείχνουν ότι όταν οι δίσκοι δέχονται άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση με PRP, διατηρούν τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, αυξάνουν την κυτταροβρίθειά τους και η θεμέλια ουσία διατηρεί το μεταβολισμό της. Μελλοντικές μελέτες με περισσότερα δείγματα και για μεγαλύτερο διάστημα μετέπειτα παρακολούθησης, ενδέχεται να βοηθήσουν περαιτέρω τους ερευνητές να αποκτήσουν πληροφορίες σχετικά με την προοδευτική διαδικασία αποκατάστασης του δίσκου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σάπκας Γ. Εμβιομηχανική –Παθοφυσιολογία του μεσοσπονδύλιου δίσκου και του νευρικού ιστού. Εκδ. Καύκας, Αθήνα 2006
2. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract.* 2008,8:18-44
3. Rutges J. Towards new treatment strategies for intervertebral disc degeneration-Pathophysiology, histological and biochemical changes in IVD degeneration. Thesis, Utrecht 2014
4. Frick, Leonhardt and Starck. Human Anatomy. Thieme Medical Publications, Inc, New York (1991)
5. Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography, and pathology. *Spine.* 1995;20:674-684.
6. Inoue H. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine.* 1981,6:139–146.
7. Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine.* 1990,15:402–410.
8. Bruehlmann SB, Rattner JB, Matyas JR, Duncan NA. Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. *J Anat.* 2002;201:159–171.
9. Johnson WE, Roberts S. Human intervertebral disc cell morphology and cytoskeletal composition: a preliminary study of regional variations in health and disease. *J Anat.* 2003,203:605-12.
10. Pattappa G, Li Z, Peroglio M, Wismer N, Alini M, Grad S. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function. *J Anat.* 2012, 221:480-96.
11. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res.* 2001;42(3):197-207.
12. Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, Evans EH, Ashton IK: Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. *Spine* 1995, 20:2645-2651.
13. Pouriesa M, Fouladi RF, Mesbahi S. Disproportion of end plates and the lumbar intervertebral disc herniation. *Spine J.* 2013, 13:402-7
14. Urban JP, Roberts S. *Arthritis Res Ther.* Degeneration of the intervertebral disc. 2003, 5(3):120-30
15. Roberts S, Menage J, Urban JPG. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine* 1989, 14:166-174.
16. Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol.* 2014,10(1):44-56
17. Tian Y, Yuan W, Fujita N, et al. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF-κB. *Am J Pathol.* 2013,182(6):2310-21.



18. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000, 25:3005-3013.
19. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000, 25:3005-13.
20. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. *Spine*. 2005, 30:44.
21. Igarashi T, Kikuchi S, Shubayev V, et al. 2000 Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats. *Spine*. 2000, 25:2975.
22. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2005, 7:R732.
23. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, et al. Disc in flames: Roles of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in intervertebral disc degeneration. *Eur Cell Mater*. 2015,30:104-16
24. Gruber HE, Fisher EC Jr, Desai B, et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta1. *Exp Cell Res*. 1997, 235:13.
25. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine*. 2000, 25:2153.
26. Bae WC, Masuda K. Emerging technologies for molecular therapy for intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am*. 2011,42:585-601
27. Ahn SH, Cho YW, Ahn MW, Jang SH, Sohn YK, Kim HS. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs. *Spine* 2002, 27:911–917.
28. Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. *Spine* 2005, 30:44–53.
29. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R732–R745
30. Sun Z, Yin Z, Liu C, et al. IL-1 $\beta$  promotes ADAMTS enzyme-mediated aggrecan degradation through NF- $\kappa$ B in human intervertebral disc. *J Orthop Surg Res*. 2015,10:159.
31. Gorth D, Martin J, Dodge G, et al. *In vivo* retention and bioactivity of IL-1ra microspheres in the rat intervertebral disc: a preliminary investigation. *J Exp Orthop*. 2014, 1: 15.
32. Johnson ZI, Schoepflin ZR, Choi H, et al. Disc in flames: Roles of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in intervertebral disc degeneration. *Eur Cell Mater*. 2015,30:104-16
33. Kakutani K, Kanaji A, Asanuma K, et al. Effect of IL-1 receptor antagonist and soluble TNF receptor on the anabolism of human intervertebral disc cells. 54th Annual Meeting of Orthopedic Research Society. 33:442
34. Yurube T, Takada T, Suzuki T, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2012,14:R51.

35. Pohl P, Cuperman T, Lozito t, et al. Expression of matrix factors in the process of neovascularization of intervertebral disc *Coluna/Columna* 2015, 14 : 77-81
36. Takegami K, An HS, Kumano F, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis. *Spine J.* 2005, 5:231.
37. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine* 1995, 20:1307-1314.
38. Gruber HE, Hanley EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc - Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 1998, 23:751-757.
39. Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography, and pathology. *Spine* 1995, 20:674-684.
40. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 1996, 98:996-1003.
41. Battié MC, Videman T, Kaprio J, Gibbons LE, Gill K, Manninen H, Saarela J, Peltonen L. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J.* 2009,9:47-59.
42. Kalichman L, Hunter DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes. *Joint Bone Spine.* 2008,75:388-96.
43. Kalichman L, Hunter DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration. Familial predisposition and heritability estimation. *Joint Bone Spine.* 2008,75:383-7.
44. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(17):1873-8.
45. Okuda S, Myoui A, Ariga K et al. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells. *Spine* 2001;26:2421-2426.
46. Nagano T, Yonenobu K, et al. Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral discs. *Spine* 1995,20:1972-1978.
47. Tsai T, Guttapalli A, Oguz E, et al. Fibroblast growth factor-2 maintains the differentiation potential of nucleus pulposus cells in vitro : implications for cells-based transplantation therapy. *Spine* 2007,32:495-502.
48. Huang KY, Yan JJ, Hsieh CC, et al. The in vivo biological effects of intradiscal recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the injured intervertebral disc: an animal experiment. *Spine* 2007,32:1174-80.
49. Takae R, Matsunaga S, Origuchi N et al. Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc. *Spine* 1999,24:1397-1401
50. Tim Yoon S, Su Kim K, Li J et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2003,28:1773-1780.
51. Masuda K, Takegami K, An H, et al. Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads. *J Orthop Res* 2003,21:922-930.

52. Tagemi K, Masuda K, An H, et al. A novel culture system for the intervertebral disc: an organ with endplates. *Ortop Res Soc Trans* 2001,26:73.
53. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine* 2007,32:1197-205.
54. Kei Miyamoto, Koichi Masuda, Jesse Kim, et al. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. *The Spine Journal* 2006,6:692-703
55. Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine* 2004,29:156-163.
56. An H, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Jan 1,30:25-31
57. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2000,25:2153-2157.
58. Melrose J, Smith S, et al. Spatial and temporal localization of transforming growth factor-beta, fibroblast growth factor-2, and osteonectin, and identification of cells expressing alpha-smooth muscle actin in the injured annulus fibrosus: implication for extracellular matrix repair. *Spine* 2002,27:1756-1764.
59. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006,88 Suppl 2:10-4.
60. Battie M, Videman T, Gill K. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: an MRI study of identical twins. *Spine*, 1991;16:1068-1071
61. Miller J, Schmatz C, Schultz A. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988, 13:173-8.
62. Lindblom K. Intervertebral-disc degeneration considered as a pressure atrophy. *J Bone Joint Surg Am*. 1957,39:933-945.
63. MacLean JJ, Lee CR, Grad S, et al. Effects of immobilization and dynamic compression on intervertebral disc cell gene expression in vivo. *Spine*. 2003,28:973-981.
64. Phillips FM, Reuben J, Wetzel FT. Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion: an experimental rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 2002,84:289-294
65. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004,29(23):2742-50.
66. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine*. 1990,15:762-767
67. Fazzalari NL, Costi JJ, Hearn TC, Fraser RD, Vernon-Roberts B, Hutchinson J, Manthey BA, Parkinson IH, Sinclair C. Mechanical and pathologic consequences of induced concentric annular tears in an ovine model. *Spine*. 200,26:2575-2581.
68. Anderson DG, Li X, Tannoury T, Beck G, Balian G. A fibronectin fragment stimulates intervertebral disc degeneration in vivo. *Spine*. 2003,28:2338-2345.

69. Silberberg R, Meier-Ruge W, Odermatt B. Age-related changes in fibronectin in annulus fibrosus of the sand rat. *Exp Cell Biol.*1989,57:233-237
70. Gruber HE, Johnson T, Norton HJ, Hanley EN Jr. The sand rat model for discdegeneration: radiologic characterization of age-related changes: cross-sectional and prospective analyses. *Spine*, 2002,27:230-234.
71. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets asa source of proteins for healing and tissue regeneration. *ThrombHaemost* 2004, 91:4-15.
72. Reed G: Platlet secretion. *Platelets* London: Elsevier Science; 2002, 181-213.
73. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition 13th Edition by Anthony Mescher (Author)
74. Obata S, Akeda K, Imanishi T, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Res Ther.* 2012,14:R241
75. Wang SZ, Rui YF, Tan Q, Wang C. Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy. *Arthritis Res Ther.* 2013,15(5):220.
76. Pirvu TN, Schroeder JE, Peroglio M, Verrier S, Kaplan L, Richards RG, Alini M, Grad S. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production. *Eur Spine J.* 2014, 23(4):745-53.
77. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP). what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001, 10:225–228.
78. Middleton KK, Barro V, Muller B, et al. Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *Iowa Orthop J.* 2012,32:150-63
79. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, et al.The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006,17:212–219
80. Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J*, 2008, 17(Suppl 4):441–451
81. Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept* 2012, 2012:532519.
82. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010, 2010:387–396.
83. Pratsinis H, Kletsas D. PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur Spine J* 2007, 16:1858–1866.
84. Pan L, Yong Z, Yuk KS, et al. Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. *Aesthetic Plast Surg.* 2015 (in press)
85. Xie X, Zhang C, Tuan RS.Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* 2014, 16:204
86. Sheth U, Simunovic N, Klein G, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012, 94(4):298-307.
87. Wang SZ, Chang Q, Lu J, Wang C. Growth factors and platelet-rich plasma: promising biological strategies for early intervertebral disc degeneration. *Int Orthop.* 2015,39:927-34.

88. Formica M, Cavagnaro L, Formica C, et al. What is the preclinical evidence on platelet rich plasma and intervertebral disc degeneration? *Eur Spine J.* 2015,24:2377-86.
89. Takegami K, Kamada H, Nguyen CM, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine* 2005, 30:25–31
90. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit annular puncture model. *Spine* 2006, 31:742–754
91. Kim KW, Lim TH, Kim JG, et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs. *Spine* 2003,28:982–990
92. Scott NA, Harris PF, Bagnall KM. A morphological and histological study of the postnatal development of intervertebral discs in the lumbar spine of the rabbit. *J Anat* 1980, 130:75–81
93. Yoon S, Kim K, Li J, et al. Age related intervertebral disc degeneration in the rabbit. *Trans Orthop Res Soc* 2005,888
94. Chujo T, An H, Asanuma K, et al. A single injection of recombinant human GDF-5 effectively restores mature rabbit of intervertebral discs degenerated by annular puncture. *Trans Orthop Res Soc* 2007, 32:267
95. Larson JW 3rd, Levicoff EA, Gilbertson LG, K et al. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am* 2006,88(Suppl 2):83–87
96. Imai Y, Miyamoto K, An HS, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 upregulates proteoglycan metabolism of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007,32(12):1303-9
97. Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine* 1997,22: 1092-1097
98. Sai JM, Hu YG, Wang DC. Constructing adeno-associated virus-TGFbeta3 and comparing its biological effect on proteoglycan synthesis in dedifferentiated nucleus pulposus cells with adenovirus-TGFbeta1. *Chin. Med. Sci. J.* 2007,22: 113-118.
99. Wallach CJ, Gilbertson L, Kang JD. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration. *Spine* 2003,28: 93-98.
100. Lohr F, Huang Q, Hu K, Dewhirst MW, et al. Systemic vector leakage and transgene expression by intratumorally injected recombinant adenovirus vectors. *Clin. Cancer Res.* 2001,7: 3625-3628.
101. Xi YM, Dong YF, Wang ZJ, et al. Co-transfection of adeno-associated virus-mediated human vascular endothelial growth factor 165 and transforming growth factor-b1 into annulus fibrosus cells of rabbit degenerative intervertebral discs. *Genet. Mol. Res.* 2013,12: 4895-4908.
102. Sahlman J, Inkinen R, Hirvonen T, et al. Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the Col2a1 gene for type II collagen. *Spine.* 2001,26:2558–2565.
103. Hamrick MW, Pennington C, Byron CD. Bone architecture and disc degeneration in the lumbar spine of mice lacking GDF-8 (myostatin). *J Orthop Res* 2003,21:1025–1032

104. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, et al. Mesenchymal Stem Cells: Molecular Targets for Tissue Engineering. *Stem Cells Dev.* 2007, 16:7–23.
105. Richardson SM, Hoyland JA, Mobasher R, et al. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine: Opportunities and Challenges for Articular Cartilage and Intervertebral Disc Tissue Engineering. *J Cell Physiol.* 2010,222:23–32.
106. Lin W, Chen X, Wang X, et al. Adult Rat Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Schwann Cell-Like Cells in Vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008,44:31–40.
107. Mauney J, Olsen BR, Volloch V. Matrix Remodeling as Stem Cell Recruitment Event: A Novel in Vitro Model for Homing of Human Bone Marrow Stromal Cells to the Site of Injury Shows Crucial Role of Extracellular Collagen Matrix. *Matrix Biol.* 2010,29:657–663.
108. Illien-Junger S, Pattappa G, Peroglio M, et al. Homing of Mesenchymal Stem Cells in Induced Degenerative Intervertebral Discs in a Whole Organ Culture System. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012, 37:1865–1873
109. Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Diseases of the Skeleton. *J Cell Biochem.* 2010, 111:249–257.
110. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.*2007, 25:371–379
111. Kong MH, Do DH, Miyazaki M, et al. Rabbit Model for in vivo Study of Intervertebral Disc Degeneration and Regeneration. *J Korean Neurosurg Soc.* 2008,44:327-33.
112. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine.* 2005; 30:5-14
113. Gullung GB, Woodall JW, Tucci MA, James J, Black DA, McGuire RA. Platelet-rich plasma effects on degenerative disc disease: analysis of histology and imaging in an animal model. *Evid Based Spine Care J.* 2011; 2:13-18.
114. Obata S, Akeda K, Imanishi T, Masuda K, Bae W, Morimoto R, Asanuma Y, Kasai Y, Uchida A, Sudo A. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Res Ther.* 2012, 14:R241.
115. Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, Yeo JE, Kang KT, Kang YM, Chang BS, Lee CK. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- $\alpha$  and IL-1. *J Orthop Res.* 2014, 32:551-556.
116. Phillips KL, Chiverton N, Michael AL, Cole AA, Breakwell LM, Haddock G, Bunning RA, Cross AK, Le Maitre CL. The cytokine and chemokine expression profile of nucleus pulposus cells: implications for degeneration and regeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R213.
117. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, Firestein GS. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol.* 2002;168:1405-12.
118. Akeda K, An HS, Pichika R, Attawia M, Thonar EJ, Lenz ME, Uchida A, Masuda K. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix

- metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006; 31:959-966.
119. Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kawata M, Kubo T. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 2007, 13:147–158.
  120. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng*. 2009,15:431–435.
  121. Zhang J, Wang JH. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med*. 2010,15:2477–2486.