



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Β. Κορομπίλιας

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΚΑΙ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΟΜΟΛΟΓΩΝ
ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΜΕΣΟΣΠΟΝΔΥΛΙΟ ΔΙΣΚΟ ΚΟΝΙΚΛΩΝ**

ΚΟΡΟΜΠΙΛΙΑ ΑΓΟΡΗ-ΜΑΡΙΑ

Ιατρός, Ορθοπαιδικός Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

«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 της κ. Κορομπιλια Αγορής-Μαρίας: 17-02-2022

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1009α/08-06-2022

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γελαλής Ιωάννης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Χειρουργική Σπονδυλικής Στήλης και Επανορθωτική Χειρουργική Ενηλίκων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Δημήτριος Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Πάκος Αιμίλιος, Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής-Βιολογικής Μηχανικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: Γ.Σ. 1009α/08-06-2022

«Η επίδραση γηρασμένων και νέων ομόλογων κυττάρων στο μεσοσπονδύλιο δίσκο κονίκλων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1210α/26-01-2026

1. Γελαλής Ιωάννης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Χειρουργική Σπονδυλικής Στήλης και Επανορθωτική Χειρουργική Ενηλίκων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Κλέτσας Δημήτριος, Διευθυντής του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
3. Πάκος Αιμίλιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Βιολογική Μηχανική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βεκρής Μάριος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Γκιάτας Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Χειρουργική Άνω Άκρου και την Επανορθωτική Χειρουργική Ενηλίκων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 05-02-2026

Ιωάννινα 09-06-2026

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής υπήρξε μια απαιτητική, αλλά ιδιαίτερα δημιουργική διαδικασία, κατά τη διάρκεια της οποίας πολλοί άνθρωποι στάθηκαν πολύτιμοι αρωγοί.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γελαλή Ιωάννη, Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιβλέποντα της συγκεκριμένης διατριβής, για την επιστημονική του καθοδήγηση, τη συνεχή υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, συμβάλλοντας καθοριστικά τόσο στην ολοκλήρωση της, όσο και στην προσωπική μου επιστημονική ανέλιξη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» κ. Κλέτσα Δημήτριο καθώς και την κ. Μαυρογονάτου Ελένη, κύρια ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», για την πολύτιμη και καθοριστική συμβολή τους. Η συνεργασία μαζί τους αποτέλεσε ένα από τα πλέον σημαντικά τμήματα της παρούσας διατριβής και υπήρξε ανεκτίμητη για την ολοκλήρωσή της. Με ιδιαίτερη υπομονή και προθυμία μου παρείχαν καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, με εξοικείωσαν με τις εργαστηριακές τεχνικές και ήταν πάντοτε διαθέσιμοι να απαντήσουν σε κάθε απορία μου.

Την κ. Λάμπρη Ευαγγελή, επίκουρη καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, του ΠΓΝΙ ευχαριστώ θερμά για την ουσιαστική συμβολή της στην παθολογοανατομική ανάλυση των δειγμάτων καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση, τη συνεργασία και την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Κοσμά Δημήτριο, Επικουρικός Επιμελητής της Ορθοπαιδικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) ο οποίος συμμετείχε ενεργά όλη τη διαδικασία του πειραματικού χειρουργείου και συνέβαλε ουσιαστικά στην ομαλή διεξαγωγή του.

Τον Αναπληρωτή καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κο Πάκο Αιμίλιο μέλος της τριμελούς επιτροπής ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές μου ευχαριστίες προς τον κ. Κορομπίλια Β. Αναστάσιο, Καθηγητή Ορθοπαιδικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Διευθυντή της Ορθοπαιδικής Κλινικής του ΠΓΝΙ και υπεύθυνο του Εργαστηρίου Μικροχειρουργικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη διάθεση του χώρου και των σύγχρονων εγκαταστάσεων του Εργαστηρίου, οι οποίες υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την απρόσκοπτη, ασφαλή και επιτυχή διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Επιπλέον, η βαθιά του γνώση, η κριτική του σκέψη και η διαθεσιμότητά του για εποικοδομητικές συζητήσεις αποτέλεσαν πολύτιμο οδηγό καθ' όλη τη διάρκεια της ειδικότητάς μου, ενισχύοντας ουσιαστικά την εκπαίδευσή μου και τη συνολική μου επιστημονική εξέλιξη.

Την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το επιστημονικό της δυναμικό ευχαριστώ θερμά. Η εμπιστοσύνη που μου επέδειξε και το υποστηρικτικό ακαδημαϊκό περιβάλλον που καλλιέργησε υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας και για τη διαμόρφωση των επαγγελματικών και επιστημονικών μου βάσεων.

Τέλος, εκφράζω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Κυριακή και Αναστάσιο και τον σύζυγό μου Κουρτίνο Αλέξανδρο, οι οποίοι καθ' όλη αυτή την απαιτητική αλλά ενδιαφέρουσα και διαδρομή, στάθηκαν δίπλα μου, προσφέροντας αδιάκοπη στήριξη, ενθάρρυνση και αγάπη.

Συντομογραφίες

AAV- Adeno-Associated Virus

ADAMTS- A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin motif

ADSCs- Adipose Derived Stem Cells

AF- Annulus Fibrosus

AFSCs- Amniotic Fluid Stem Cells

ASCs- Adipose Stem Cells

ASPN- Asporin

AT-MSCs- Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Adipose Tissue

bFGF- Basic Fibroblast GF

BMI- Body Mass Index

BMP- Bone morphogenetic protein

BMSCs- Bone Marrow Stem Cells

BrdU- 5-bromo-2'-deoxyuridine

Cas9- CRISPR-associated protein 9

CILP- Cartilage Intermediate Layer Protein

Co- Cobalt

CO₂- Carbon dioxide

COL- Collagen

COX-2- Cyclooxygenase-2

CRISPR- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Ctnnb1- β -Catenin

DAB- 3,3'-Diaminobenzidine

DDD- Degenerative Disc Disease

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO- Dimethyl sulfoxide

DNA- Deoxyribonucleic acid

ECM- Extracellular Matrix

ECM- Extracellular Matrix

EDTA- ethylenediaminetetraacetic acid

EGF- Epidermal GF

EGF- Epidermal GF

ESCs- Embryonic Stem Cells

FBS- Fetal Bovine Serum

FN- Fibronectin

G- Gauge

GAGs- Glycosaminoglycans

G-CSF- Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GF- Growth Factor

Gy- Gray

HE- hematoxylin and eosin

hESCs- Human embryonic stem cells

HSCs- Hematopoietic Stem Cells

ICM- Inner Cell Mass

IDD- Intervertebral Disc Degeneration

IGF-1- Insulin- like GF 1

IGF-1- Insulin-like GF-1

IL- Interleukin

IL-1Ra- IL-1 receptor antagonist

IVD- Intervertebral Disc

MMPs- Matrix metalloproteinases

MP-1- Mineralization Protein-1

mRNA- Messenger ribonucleic acid

MSC- Mesenchymal stem cell

MSCs- Mesenchymal Stem Cells

MTT- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

NO- Nitric Oxide

NP- Nucleus Pulposus

OP-1- Osteogenic Protein-1

PBS- Phosphate-Buffered Saline

PDGF- Platelet- derived GF

PLA₂- Phospholipase A₂

PRP- Platelet Rich Plasma

rADCs- rabbit adipose- derived stem cells

SA-β-Gal- Senescence-Associated β-Galactosidase

SCs- Stem Cells

TE- trophoectoderm

TGF-β- Transforming GF beta

TIMPs - Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TNF-α - Tumor Necrosis Factor-alpha

Tregs- Regulatory T cells

UCSCs- Umbilical Cord Stem Cells

UV- Ultraviolet

v/v- volume/volume

VEGF- Vascular Endothelial GF

ΙΔ- Ινώδης Δακτύλιος

ΜΣΔ- Μεσοσπονδύλιος Δίσκος

ΠΠ- Πηκτοειδής Πυρήνας

ΣΣ- Σπονδυλική Στήλη

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Μεσοσπονδύλιος δίσκος	16
1.1 Ανατομία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	16
1.1.1 Αγγείωση και Νεύρωση του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	19
1.2 Σύσταση και Βιολογία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	21
1.3 Εμβιομηχανική λειτουργία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	26
1.4 Χόνδρινες Τελικές Πλάκες	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Εκφύλιση του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	32
2.1 Διαδικασία εκφύλισης	32
2.1.1 Παθοφυσιολογία της εκφύλισης	33
2.1.2 Διαταραχή θρέψης κατά την εκφύλιση	35
2.2 Ταξινόμηση της εκφύλισης	36
2.3 Εμβιομηχανικές αλλαγές στον εκφυλισμένο	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Σύγχρονες Βιολογικές Θεραπείες στην Εκφυλιστική Νόσο του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου	39
3.1. Βιομοριακή Θεραπεία	40
3.1.1 Έγχυση πρωτεϊνικών διαλυμάτων	40
3.1.2 Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet- Rich Plasma)	41
3.1.3 Γονιδιακή θεραπεία	41

3.2 Κυτταρική Θεραπεία	42
3.2.1 Μεταμόσχευση χονδροκυττάρων	42
3.2.2 Βλαστοκύτταρα (Stem Cells, SCs)	43
3.2.3 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)	44
3.3 Μεσεγχυματικά κύτταρα απομονωμένα από λιπώδη ιστό (Adipose- Derived Stem Cells, ADMSCs ή Adipose Stem Cells, ASCs).....	46
3.3.1 Η εφαρμογή των ADMSCs ως βιολογική θεραπεία στην εκφυλιστική νόσο του ΜΣΔ	46
3.3.2 Κλινικές και πειραματικές μελέτες σε ζώα	48
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	51
4.1 Σκοπός	51
4.2 Διαδικασία της μελέτης	51
4.3 Προετοιμασία Κυττάρων	54
4.4 Πειραματικό Χειρουργείο.....	66
4.5 Ιστολογική Μελέτη	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
5.1 Αποτελέσματα	77
5.2 Ιστολογική Ανάλυση	82
5.3 Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκφυλιστική νόσος του μεσοσπονδύλιου δίσκου (ΜΣΔ) αποτελεί μία από τις κυριότερες χρόνιες, ηλικιακά εξαρτώμενες παθήσεις. Η εκφύλιση του ΜΣΔ οφείλεται σε αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η κυτταρική έγχυση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, ως βιολογική θεραπεία, έχει ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό την αντιμετώπιση της νόσου, στοχεύοντας στην παθοφυσιολογία αυτής και όχι στην συμπτωματολογία. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση των δομικών, μακρό- και μικροσκοπικών αλλαγών του πηκτοειδούς πυρήνα και του ινώδους δακτυλίου σε δίσκους κονίκλων μετά από έγχυση δύο κυτταρικών ομάδων, νεαρών και γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχειαίων απομονωμένων από το λιπώδη ιστό κονίκλου. Με βάση ένα καθορισμένο πρωτόκολλο πρόκλησης εκφυλιστικών αλλοιώσεων, μέσω της εισαγωγής βελόνης 25Gauge (G), πραγματοποιήθηκε πειραματική μελέτη σε τρία επίπεδα ΜΣΔ (Ο1-Ο2, Ο2-Ο3, Ο3-Ο4) δεκαέξι (16) ενήλικων κονίκλων. Από το πείραμα προέκυψαν τρεις πειραματικές ομάδες δίσκων. Στην πρώτη δισκική ομάδα πραγματοποιήθηκε εκφύλιση του δίσκου, η οποία διενεργήθηκε με την εισαγωγή βελόνης 25G στο δίσκο και έγχυση θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας (Ομάδα Α). Στη δεύτερη δισκική ομάδα με την ίδια διαδικασία ακολούθησε έγχυση νεαρών μεσεγχυματικών στελεχειαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό κονίκλου (Ομάδα Β) και στην τρίτη (Ομάδα Γ) δισκική ομάδα μετά την εκφύλιση εισήχθησαν γηρασμένα μεσεγχυματικά στελεχειαία κύτταρα από λιπώδη ιστό κονίκλου (Ομάδα Γ). Η διαδικασία καλλιέργειας των μεσεγχυματικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε υπό αυστηρά στείρες συνθήκες με απομόνωση αυτών από τον λιπώδη ιστό του ίδιου κονίκλου. Η ευθανασία των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκε κατά την 6η και 8η μετεγχειρητική εβδομάδα. Τα εξαιρεθέντα δισκικά δείγματα υποβλήθηκαν σε ιστολογική αξιολόγηση με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης (hematoxylin and eosin - HE) και Alcian Blue, καθώς και σε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τους δείκτες Κολλαγόνο τύπου II, Αγгреκάνης, Ki67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και του p16 (δείκτης κυτταρικής γήρανσης). Ήδη από την 6^η μετεγχειρητική εβδομάδα (1η πειραματική φάση), η Ομάδα Β παρουσίασε ενισχυμένη αναγεννητική ικανότητα, με αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου II, αγγρεκάνης και Ki67 ($p < 0,001$). Αντίθετα, η Ομάδα Γ εμφάνισε έντονες εκφυλιστικές μεταβολές, με αυξημένη έκφραση του δείκτη p16, γεγονός που υποδηλώνει προχωρημένη κυτταρική

γήρανση. Την 8η εβδομάδα (2^η πειραματική φάση), όπως και στην 1η φάση η ομάδα των νεαρών κυττάρων διατήρησε και ενίσχυσε την αναπλαστική της ικανότητα, με περαιτέρω αύξηση της έκφρασης κολλαγόνου II, αγγρεκάνης και Ki67 ($p < 0,01$), ενώ η έκφραση του p16 παρέμεινε περιορισμένη. Αντίθετα η ομάδα Γ παρουσίασε περαιτέρω επιδείνωση του μοριακού της προφίλ, με αυξημένη έκφραση του δείκτη p16 ($p < 0,01$) και διατήρηση των υπολοίπων δεικτών σε χαμηλά επίπεδα. Η παρούσα μελέτη παραθέτει τα θετικά αποτελέσματα της έγχυσης των μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από το λιπώδη ιστό κονίκλου σε ένα ζωικό μοντέλο εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου, καθώς ενισχύεται η αναγεννησιακή ικανότητα από την 6η κιόλας εβδομάδα.

ABSTRACT

Degenerative disc disease (DDD) represents one of the most prevalent chronic, age-related spinal conditions, attributed to a complex interaction between genetic predisposition and environmental factors. Mesenchymal stem cell (MSC) therapy has emerged as a promising biological approach that targets the underlying pathophysiology of disc degeneration rather than merely alleviating symptoms. The purpose of this study was to evaluate the structural, macro- and microscopic changes in the nucleus pulposus and annulus fibrosus of the intervertebral disc (IVD) in rabbits following intradiscal injection of two different cell types: mesenchymal stem cells and senescent cells. A standardized degeneration protocol, using a 25G needle, was employed to induce disc degeneration at three lumbar levels (L1–L2, L2–L3, L3–L4) in sixteen (16) adult rabbits. Three (3) experimental disc groups were generated. In the first (A) discal group, following needle puncture, an intradiscal injection of culture medium was performed. In groups B and C, the same procedure was followed by injection of autologous mesenchymal stem cells and senescent cells, respectively. Mesenchymal stem cells were isolated from each rabbit's adipose tissue and cultured under strictly sterile conditions prior to transplantation. Euthanasia was performed at the sixth (6th) and eighth (8th) postoperative weeks. The extracted disc samples were subjected to histological evaluation using hematoxylin–eosin (H&E) and Alcian Blue staining, as well as immunohistochemical analysis for the markers Collagen type II, Aggrecan (extracellular matrix component), Ki67 (cell proliferation marker), and p16 (cellular senescence marker). At the 6th week (first experimental phase), Group B exhibited enhanced regenerative activity, with increased expression of Collagen type II, Aggrecan, and Ki67 ($p < 0.001$). In contrast, Group C demonstrated pronounced degenerative alterations, with elevated expression of p16, indicating advanced cellular senescence. At day 57 (8th week, second phase), similar to the first phase, the group treated with young mesenchymal cells maintained and further enhanced its biological activity, showing a continued increase in the expression of Collagen type II, Aggrecan, and Ki67 ($p < 0.01$), while p16 expression remained low. Conversely, Group C showed further deterioration of its molecular profile, with increased p16 expression ($p < 0.01$) and persistently low levels of the other markers. The present study highlights the beneficial effects of mesenchymal stem cell injection in a rabbit model of intervertebral

disc degeneration, demonstrating enhanced regenerative activity as early as the sixth postoperative week.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι διαταραχές της σπονδυλικής στήλης (ΣΣ), σε συνδυασμό με την οσφυαλγία, αποτελούν μία από τις κυριότερες χρόνιες ηλικιακά εξαρτώμενες παθήσεις με σημαντικό βαθμό αναπηρίας, σοβαρή έκπτωση της ποιότητας ζωής αλλά και σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στο σύστημα υγείας. Η εκφυλιστική νόσος της ΣΣ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της χρόνιας οσφυαλγίας. Συγκεκριμένα, περίπου το 90% του γενικού πληθυσμού θα παρουσιάσει κατά τη διάρκεια της ζωής του τουλάχιστον ένα επεισόδιο οσφυαλγίας, ενώ τα άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών είναι πιο πιθανό να υποφέρουν από οσφυαλγία λόγω εκφυλιστικής νόσου του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Πιο αναλυτικά, ο ΜΣΔ αναγνωρίζεται ως μία ανάγεια, ελαστική δομή εντοπιζόμενη ανάμεσα σε δύο γειτονικούς σπονδύλους, που αποτελείται από μία σκληρή, εξωτερική χόνδρινη περιοχή, τον ινώδη δακτύλιο (ΙΔ, Annulus Fibrosus- AF) η οποία περικλείει τη δεύτερη δομή του ΜΣΔ, τον κεντρικό ζελατινώδη πηκτοειδή πυρήνα (ΠΠ, Nucleus Pulposus- NP). Ο πρωταρχικός ρόλος του δίσκου είναι κυρίως μηχανικός επιτρέποντας στη ΣΣ να δρα ως μία σταθερή και ευλύγιστη δομή, προστατεύει τη ΣΣ καθώς απορροφά κραδασμούς κατανέμοντας και εξουδετερώνοντας διατμητικές και ελκτικές δυνάμεις που δρουν στη ΣΣ μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο κατάγματος και εκφυλιστικών αλλαγών. Επίσης, διαχωρίζουν επαρκώς τους σπονδύλους για να επιτρέψουν στα νωτιαία νεύρα να εξέλθουν από τα μεσοσπονδύλια τρήματα. Ωστόσο οποιοσδήποτε περιορισμός θρεπτικών ουσιών ή αλλαγή στη σύσταση του δίσκου ενεργοποιεί μια αλληλουχία γεγονότων με καταστροφικές συνέπειες στη δομική ακεραιότητα και τις βιοχημικές ιδιότητες του ΜΣΔ, οδηγώντας σε εκφύλιση.

Δεδομένου ότι η διαδικασία της εκφύλισης του ΜΣΔ πρόκειται για αποτέλεσμα συνδυαστικής δράσης γενετικών θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, οι έως τώρα θεραπευτικές επιλογές, συντηρητική (χορήγηση φαρμάκων και η φυσικοθεραπεία) καθώς και η χειρουργική αποτυγχάνουν να αντιμετωπίσουν την υποκείμενη παθολογία της εκφύλισης. Αντιθέτως, αποτελούν παροδικές λύσεις κυρίως επικεντρωμένες στην ανακούφιση των συμπτωμάτων ενώ μπορούν να οδηγήσουν πιθανά νέα μελλοντικά προβλήματα όπως υψηλά ποσοστά επανεπεμβάσεων, νόσος παρακείμενου επιπέδου και ψευδάρθρωση.

Τα τελευταία έτη έχουν αναπτυχθεί βιολογικές θεραπείες που επικεντρώνονται στην αντιμετώπιση της νόσου ανάλογα με το στάδιο της εκφύλισης. Οι βιομοριακές θεραπείες (πρωτεΐνες και γονίδια) αποτελούν λύση για το πρώιμο στάδιο της εκφύλισης, η κυτταρική εμφύτευση για το μεσαίο στάδιο ενώ στο τελικό στάδιο θέση έχουν τα δισκικά υποκατάστατα ιστοτεχνολογίας (tissue engineered disc-like constructs). Διάφορες in-vivo πειραματικές μελέτες σε επίμυες και κόνικλους με την εφαρμογή βιομοριακών θεραπειών οδήγησαν στη μείωση της εκφύλισης ΜΣΔ σε αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό και του ύψους του ΜΣΔ. Σημαντικές θετικές αλλαγές του δίσκου εμφανίστηκαν και σε κλινικές μελέτες. Η μεταμόσχευση μεσεγχυματικών κυττάρων και χονδροκυττάρων οδηγεί στην αύξηση σύνθεσης πρωτεογλυκανών του πηκτοειδή πυρήνα, διατήρηση του ύψους του ΜΣΔ, βελτίωση της κινητικότητας και μείωση του άλγους σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο.

Σκοπός της μελέτης μας είναι να εκτιμήσουμε τις δομικές, μακροσκοπικές και μικροσκοπικές αλλαγές του πηκτοειδή πυρήνα και ινώδους δακτυλίου σε δίσκους κόνικλων μετά από έγχυση δύο κυτταρικών ομάδων, νεαρών και γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένα από το λιπώδη ιστό κόνικλου.

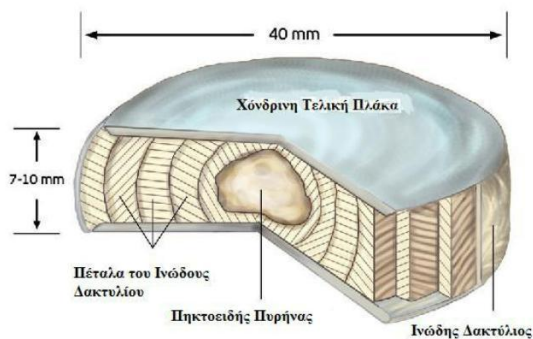
Κεφάλαιο 1. Ανατομία και Φυσιολογία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος αποτελεί μία εξειδικευμένη συνδετική κατασκευή, λειτουργώντας ως η βασική άρθρωση της σπονδυλικής στήλης. Πρόκειται για πολυαξονική ινοχόνδρινη δομή που βρίσκεται μεταξύ των σπονδυλικών σωμάτων, καταλαμβάνει περίπου το 1/3 της ΣΣ και είναι σχεδιασμένη να εξασφαλίζει σταθερότητα και ευκινησία [1].

1.1 Ανατομία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι που απαρτίζουν τη σπονδυλική στήλη είναι συνολικά 23. Έχουν ύψος περίπου 7-10 mm και διάμετρο 4 cm σε διάμετρο. Το ύψος, το μέγεθος και η διάμετρός τους αυξάνονται κατά την διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης, με κατεύθυνση από την αυχενική προς την οσφυϊκή μοίρα. Ο μεγαλύτερος μεσοσπονδύλιος δίσκος σε μέγεθος είναι ο Ο4-Ο5. Ο κυρίαρχος ρόλος του δίσκου είναι μηχανικός, καθώς επιτρέπει μεγάλη πολύπλοκη και τρισδιάστατη κίνηση της ΣΣ [2-4].

Μακροσκοπικά, η περίπλοκη αυτή δομή αποτελείται από τρία ομόκεντρα τοποθετημένα ιστικά στοιχεία: έναν ισχυρό ινοχόνδρινο δακτύλιο (τον εξωτερικό ινώδη δακτύλιο), τον εσωτερικό ινώδη δακτύλιο, και έναν ζελατινώδη κεντρικό πυρήνα, τον πηκτοειδή πυρήνα. Ο ΜΣΔ συνδέεται και συγκρατείται άνω και κάτω από δύο χόνδρινες τελικές πλάκες (Εικόνα 1) [1,3]



Εικόνα 1. Η αρχιτεκτονική δομή του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015;74(2):157-68.

Ο φυσιολογικός ΜΣΔ ενός ενήλικα περιέχει σχετικά μικρό αριθμό κυττάρων, περίπου 1% του συνολικού όγκου της εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Κύρια δομικά συστατικά του δίσκου είναι το νερό, οι πρωτεογλυκάνες, το κολλαγόνο και οι μη κολλαγόνες πρωτεΐνες. Ο ΜΣΔ περιέχει πολλούς τύπους κολλαγόνου (I-II-III-V-VI-IX-XI), και η περιεκτικότητά του σε κολλαγόνο κυμαίνεται από περίπου 95% στον ινώδη δακτύλιο έως 5% στον πηκτοειδή πυρήνα. Το μεγαλύτερο ποσοστό κολλαγόνου (80%) αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και II. Οι πρωτεογλυκάνες εντοπίζονται κυρίως στον πηκτοειδή πυρήνα και σε μικρότερη ποσότητα στον ινώδη δακτύλιο [5,6].

Ο ινώδης δακτύλιος αποτελείται από 15-20 σειρές στρωμάτων ομόκεντρων δακτυλίων (πέταλα). Τα πέταλα αυτά σχηματίζονται από παράλληλες ίνες κολλαγόνου, οι οποίες προσανατολίζονται κατά προσέγγιση 60° ως προς τον κατακόρυφο άξονα, δημιουργώντας γωνία περίπου 30° με τα σπονδυλικά σώματα. Η παραπάνω διάταξη των ινών επιτρέπει στο φυσιολογικό δίσκο μηχανική αντοχή στις στροφικές κινήσεις. Οι δακτύλιοι συνδέονται μεταξύ τους σε ακτινική διάταξη μέσω των ινών ελαστίνης (elastin fibers), οι οποίες βοηθούν το δίσκο να επανέλθει στην αρχική του μορφή έπειτα από έκταση ή κάμψη της ΣΣ [7,8]. Συνολικά ο ινώδης δακτύλιος περιέχει 65% νερό. Η περιφερική ή εξωτερική μοίρα του ινώδους δακτυλίου είναι μικρότερη σε μέγεθος και απαρτίζεται από κύτταρα που προσομοιάζουν με ινοβλάστες, αποτελούνται από

κολλαγόνο τύπου I και τείνουν να είναι πιο μακρόστενα, λεπτά, πυκνά καθώς και πιο προσανατολισμένα. Αντιθέτως, η σύσταση του εσωτερικού δακτυλίου περιλαμβάνει κυρίως κολλαγόνο τύπου II, με κύτταρα πιο οβάλ, λιγότερο πυκνά και χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό των ινών. Δομικά, ο ινώδης δακτύλιος αναγνωρίζεται πιο ογκώδης και ανθεκτικός στο πρόσθιο τμήμα και πιο λεπτός και ευάλωτος στο οπίσθιο τμήμα του. Οι έσω ίνες βρίσκονται σε στενή επαφή με τις χόνδρινες τελικές πλάκες. Οι ισχυρότερες ίνες του ινώδους δακτυλίου είναι ίνες του Sharpey, που προσφύονται στα σπονδυλικά σώματα δια της τελικής πλάκας. Πέριξ των ινών του Sharpey εντοπίζονται ο πρόσθιος και οπίσθιος επιμήκης σύνδεσμος. Οι ίνες του εξωτερικού ινώδους δακτυλίου έρχονται σε επαφή με τον οπίσθιο επιμήκη σύνδεσμο, ο οποίος εφάπτεται των σπονδυλικών σωμάτων. Ο σύνδεσμος είναι ισχυρός στη μέση γραμμή και λεπτότερος στα πλάγια τμήματα, όπου ο δακτύλιος στερείται εξωτερικής στήριξης και είναι πιο ευάλωτος [9,10].

Ο πηκτοειδής πυρήνας είναι μία ζελατινώδης, ημιστερεά δομή που καταλαμβάνει το 40%-60% του όγκου του δίσκου. Αποτελείται από πρωτεϊνικό πολυσακχαρίτη (υδρόφιλη βλενοπολυσακχαριδική γέλη), ίνες κολλαγόνου τύπου II, χονδροκύτταρα σε χαμηλή πυκνότητα και νερό σε ποσοστό περίπου 88%. Οι ίνες κολλαγόνου είναι προσανατολισμένες σε τυχαία διάταξη μέσα σε ένα χαλαρό δίκτυο πλούσιο σε πρωτεογλυκάνες, παρέχοντας στον ΜΣΔ ελαστικότητα και τη δυνατότητα προσαρμογής και απορρόφησης συμπιεστικών δυνάμεων. Στο κέντρο του πυρήνα εμπεριέχεται η υδροσκοπική ουσία, το υαλουρονικό οξύ. Τα στρώματα των πρωτεογλυκανών προσκολλώνται στο υαλουρονικό οξύ, με αποτέλεσμα ανάμεσα στις ανελαστικές ίνες κολλαγόνου να παρεμβάλλονται στρώματα ελαστικής γέλης. Η περιεκτικότητα του δίσκου σε νερό μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Καθημερινά η πίεση στο δίσκο αλλάζει άρα και το ύψος του ΜΣΔ. Συγκεκριμένα, στην ύπτια θέση η πίεση στο δίσκο μειώνεται και το νερό εισέρχεται στο δίσκο ενώ στην ορθοστασία η πίεση αυξάνεται και το νερό αποβάλλεται. Έτσι, ο όγκος του πυρήνα μεταβάλλεται έως 20%, με αποτέλεσμα αύξηση του ύψους του ΜΣΔ κατά 1-1,5mm [8,10,11].

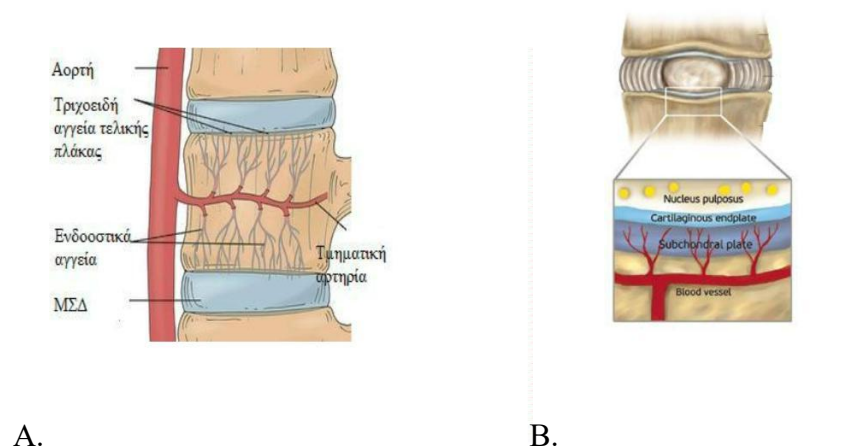
1.1.1 Αγγείωση και Νεύρωση του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, τα αιμοφόρα αγγεία που εισέρχονται στον ινώδη δακτύλιο και τις χόνδρινες τελικές πλάκες (από την 35^η εβδομάδα κύησης) αρχίζουν να υποχωρούν, οδηγώντας τελικά σε έναν πλήρως ανάγγειο ΜΣΔ [12]. Η αιμάτωση του ινώδους δακτυλίου είναι πλουσιότερη στην παιδική ηλικία σε σχέση με έναν ενήλικα. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται στη μειωμένη ανάγκη για θρεπτικά συστατικά μετά την περίοδο ταχείας ανάπτυξης ή στην αδυναμία της κυκλοφορικής πίεσης να ανταποκριθεί στις μεγάλες απαιτήσεις της εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix- ECM). Στα έμβρυα και στα βρέφη, η υποχόνδρινη πλάκα διαπερνάται από τροφοφόρα κανάλια (όπως στους επιφυσιακούς χόνδρους). Στην παιδική ηλικία τα κανάλια αυτά εξαφανίζονται, αφήνοντας “αδύναμα σημεία” που αργότερα μπορεί να εξελιχθούν σε οζίδια Schmorl και να οδηγήσουν σε σκλήρυνση της υποχόνδρινης πλάκας [13,14]. Ο ΜΣΔ του ενήλικα σχεδόν πλήρως ανάγγειος, με ορισμένα κύτταρα να βρίσκονται σε απόσταση έως και 8mm από την πλησιέστερη αγγειακή τροφοδοσία [15]. Η αιμάτωση προέρχεται από κλάδους της σπονδυλικής αρτηρίας, που εκφύονται από τους επιμήκεις συνδέσμους και εισέρχονται στην περιφέρεια του ινώδους δακτυλίου.

Η αιματική παροχή στα έξι εξωτερικά στρώματα είναι περιορισμένη αλλά αυξάνεται πλησιάζοντας στο εσωτερικό. Στο κέντρο του ινώδους δακτυλίου δεν ανευρίσκονται αγγεία. Πριν τη γέννηση, αγγεία και λεμφαγγεία υπάρχουν επίσης στον πυρήνα, όμως εξαφανίζονται κατά τον τρίτο μήνα της κύησης. Μέχρι τον πέμπτο μήνα μετά τη γέννηση, λόγω της έναρξης της φόρτισης της ΣΣ, η αγγείωση του δίσκου υποχωρεί εκτός των έξι περιφερικών στρωμάτων. Στον υγιή νεαρό ενήλικα, το O1-O4 οσφυϊκό σπονδυλικό σώμα τροφοδοτείται από ζεύγη αρτηριών που εκφύονται από το οπίσθιο τοίχωμα της κοιλιακής αορτής ενώ το O5 οσφυϊκό σπονδυλικό σώμα αγγειώνεται από κλάδους του διχασμού της αορτής. Τα αγγεία αυτά σχηματίζουν ένα δίκτυο μικρότερων αγγείων και τριχοειδών, υπεύθυνων για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στο δίσκο μέσω της υποχόνδρινης πλάκας και έπειτα στη συμβολή του σπονδυλικού σώματος και της χόνδρινης τελικής πλάκας [16,17] (Εικόνα 2).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο ΜΣΔ διαθέτει πτωχή νεύρωση. Η νεύρωση προέρχεται από αισθητικές και περιαγγειακές ίνες του συμπαθητικού, κυρίως στο εξωτερικό τμήμα

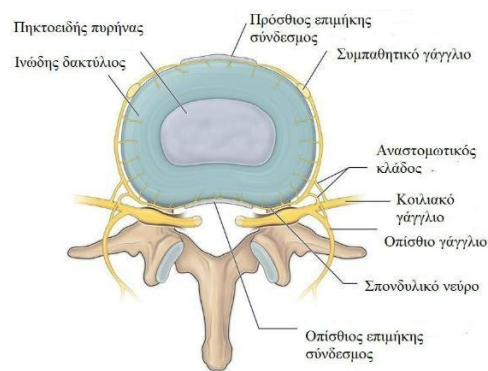
του ινώδους δακτυλίου. Συγκεκριμένα, η νεύρωση του δίσκου προέρχεται από κλάδους του παλίνδρομου μηνιγγικού νεύρου, από νεύρα προερχόμενα από το κοιλιακό γάγγλιο των σπονδυλικών νεύρων ή από νεύρα του αναστομωτικού κλάδου. Επιπλέον, ο δίσκος νευρώνεται τμηματικά από δύο πυκνά συνδεδεμένα πλέγματα στον πρόσθιο και οπίσθιο επιμήκη σύνδεσμο [18] (Εικόνα 3).



Εικόνα 2. Η αγγείωση του μεσοσπονδύλιου δίσκου ενήλικα (Α, Β)

Redrawn and modified from Raj PP: Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. Pain Pract 8:18, 2008.

Huang, YC., Urban, J. & Luk, K. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? Nat Rev Rheumatol 10, 561–566 (2014).



Εικόνα 3. Η νεύρωση του μεσοσπονδύλιου δίσκου

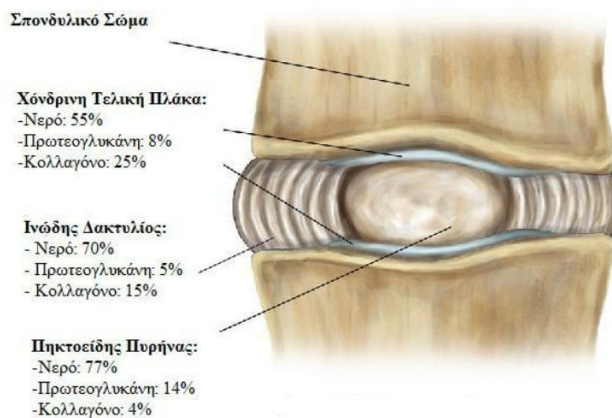
Pope JE, Mekhail N. Intradiscal Electrothermal Therapy. Anesthesia Key. 2017

1.2 Σύσταση και Βιολογία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Ο μεσοσπονδύλιος δίσκος αποτελεί μια ανάγγεια και ελάχιστα νευρούμενη δομή, αποτελούμενη κυρίως από εξωκυττάρια μήτρα, με αραιή διάταξη ινοχόνδρινων κυττάρων στον ινώδη δακτύλιο και κυττάρων νωτιαίας χορδής καθώς και χονδροκυττάρων στον πηκτοειδή πυρήνα.

Η οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας είναι ζωτικής σημασίας για τη μηχανική λειτουργία του δίσκου και μεταβάλλεται σημαντικά με την ηλικία. Η σύσταση του δίσκου μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνθετο πλέγμα κολλαγόνου, πρωτεογλυκανών, νερού, γλυκοπρωτεϊνών, ελαστίνης και πρωτεϊνών ορού, τα οποία συμβάλλουν από κοινού στη θρέψη και στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητάς του έναντι των υψηλών συμπιεστικών φορτίων.

Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζεται ενδεικτικά η σύσταση κάθε τμήματος του δίσκου.



Εικόνα 4. Η σύσταση του μεσοσπονδύλιου δίσκου

Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015;74(2):157-68.

Το κολλαγόνο, ως κύριο δομικό συστατικό του ΜΣΔ, προσδίδει στα διάφορα ιστικά του στοιχεία τη μορφολογική σταθερότητα και την απαιτούμενη ελαστική αντοχή. Σε μοριακό επίπεδο, παρουσιάζεται ως μία άκαμπτη τριπλή έλικα. Σε περίπτωση βλάβης τμήματος αυτής της ελικοειδούς δομής, το ρήγμα αποκαθίσταται μέσω αναγέννησης με νέο κολλαγόνο του ίδιου τύπου. Όταν όμως η βλάβη είναι εκτεταμένη και συνοδεύεται από πλήρη ρήξη ινών, το χάσμα αποκαθίσταται με ίνες ακανόνιστης διάταξης, οδηγώντας στη δημιουργία ινώδους ιστού. Στον ινώδη δακτύλιο, το κολλαγόνο εμφανίζει δικτυωτή γεωμετρία, επιτρέποντας την απορρόφηση των πιέσεων που ασκούνται κατά τη φόρτιση και την επαναφορά του δίσκου στην πρωταρχική του μορφή μόλις αυτές υποχωρήσουν. Η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο ποικίλει ανάλογα με την ανατομική περιοχή του δίσκου, την ηλικία και τη βαρύτητα της τυχόν εκφύλισης. Σε φθίνουσα σειρά, οι κύριοι τύποι κολλαγόνου είναι: I, II, VII, IX, X, XI και XII. Οι τύποι I και II αποτελούν περίπου το 80% του συνολικού κολλαγόνου, με τον τύπο II να αυξάνεται καθώς πλησιάζουμε προς τον πηκτοειδή πυρήνα, ενώ ο τύπος I επικρατεί περισσότερο περιφερικά, σε αναλογία 60:40% στο σύνολο του δίσκου. Επιπλέον, ο ΜΣΔ περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις κολλαγόνου τύπου VI (10% στον ινώδη δακτύλιο και 15% στον πυρήνα), καθώς και μικρότερα ποσοστά των τύπων V

και XI (περίπου 3%) . Η περιεκτικότητα του κολλαγόνου στο δίσκο συνοψίζεται στον Πίνακα 1 [3].

Πίνακας 1. Η περιεκτικότητα κολλαγόνου στις δομές του ΜΣΔ

Ζερβάκης Ν. Δομή, κατασκευή και μηχανική λειτουργία του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Στο: Σάπκας Γ (επιμ.). Εμβιομηχανική – Παθοφυσιολογία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου και του Νευρικού Ιστού. Αθήνα: Εκδόσεις Καυκάς; 2006.

Τύπος κολλαγόνου	Επικρατούσα περιοχή	Ποσοστό κολλαγόνου (%)
I	ΙΔ	0-80
II	ΙΔ+ ΙΙΙ	0-80
III	ΙΔ	<5
V	ΙΔ+ ΙΙΙ	1-2
VI	ΙΔ+ ΙΙΙ	5-20
IX	ΙΔ+ ΙΙΙ	1-2
XI	ΙΔ+ ΙΙΙ	1-2
XII	ΙΔ	<1

Ως δεύτερο κυρίαρχο συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας αναγνωρίζονται οι πρωτεογλυκάνες, αρνητικά φορτισμένα μόρια πολυσακχαριτών αποτελούμενα από πυρηνικές πρωτεΐνες και αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (Glycosaminoglycans, GAGs). Η ιδιαίτερα υδρόφιλη φύση τους επιτρέπει την παραγωγή πίεσης διόγκωσης, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσληψη νερού εντός του δίσκου και την αντίσταση του στις συμπιεστικές δυνάμεις της σπονδυλικής στήλης. Οι πρωτεογλυκάνες καταλαμβάνουν περίπου 50% του πηκτοειδούς πυρήνα και 20% του ινώδους δακτυλίου.

Οι πρωτεογλυκάνες συνδέονται με το υαλουρονικό οξύ σχηματίζοντας μεγάλες συσσωματώσεις (aggregates), ικανές να παράγουν μεγαλύτερες πιέσεις διόγκωσης. Οι ομάδες αυτές προσδένονται στο κολλαγόνο τύπου II και διασταυρώνονται με ίνες κολλαγόνο τύπου IX. Η αγγρεκάνη (Aggrecan) ή αλλιώς συσσωρευτίνη αποτελεί την

κυριότερη πρωτεογλυκάνη του δίσκου, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 70% του καθαρού βάρους του πυρήνα και για το 25% του δακτυλίου. Συμβάλλει ουσιαστικά στη διατήρηση της ενυδάτωσης του δίσκου μέσω της οσμωτικής πίεσης, λόγω των GAGs πλευρικών της αλυσίδων — θειικής χονδροϊτίνης και θειικής κερατάνης.

Άλλες πρωτεογλυκάνες που ανευρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα είναι η βερσικάνη, περλεκάνη, διγλυκάνη, δεκορίνη, ινωδομοντουλίνη, λουμικάνη. Μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με το νερό, οι πρωτεογλυκάνες προσδίδουν στον δίσκο βασικές μηχανικές ιδιότητες, όπως σκληρότητα, αντοχή στη συμπίεση και αυξημένη γλοιοελαστικότητα. Πέραν των ανωτέρω, στον δίσκο απαντούν σε μικρότερη συγκέντρωση μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, λιπίδια, λαμινίνες, ελαστίνη (περίπου 2%) και ινονεκτίνη, οι οποίες συμβάλλουν στη λειτουργική ακεραιότητα του ιστού σε συνεργασία με τη (ECM) [19,20].

Θρέψη και ομοιοσύσταση του δίσκου

Η διατροφική υποστήριξη των κυττάρων, η παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας και η ομοιοσύσταση του δίσκου επιτυγχάνονται κυρίως μέσω διάχυσης θρεπτικών συστατικών διαμέσου των τελικών πλακών. Βασικά θρεπτικά συστατικά είναι το οξυγόνο, η γλυκόζη, τα αμινοξέα και το θείο, τα οποία μεταφέρονται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας [21]. Υπάρχουν δύο κύριες οδοί θρέψης: η 1^η οδός είναι από τα αιμοφόρα αγγεία στην περιφέρεια του ινώδους δακτυλίου και η 2^η είναι από τις αγγειακές απολήξεις στη συμβολή της επιφυσιακής πλάκας με το δίσκο- η πλέον σημαντική οδός. Σε νεαρές ηλικίες, τα κανάλια στον επιφυσιακό χόνδρο ενισχύουν περαιτέρω τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ωστόσο κατά την εφηβεία αυτά εξαφανίζονται και η θρέψη πλέον εξαρτάται αποκλειστικά από τη δεύτερη οδό. Στους ενήλικες, τα θρεπτικά συστατικά πρέπει να διανύσουν μεγάλη απόσταση (5–8cm) από τα τριχοειδή της τελικής πλάκας έως το κέντρο του δίσκου, γεγονός που περιορίζει την παροχή οξυγόνου και οδηγεί σε όξινο pH (~6,8) και αναερόβια μεταβολική δραστηριότητα [22]. Η απουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων επιτρέπει τη συσσώρευση γαλακτικού οξέος, το οποίο μειώνει τη δυνατότητα των κυττάρων να συνθέσουν και να διατηρήσουν την εξωκυττάρια μήτρα. Η κίνηση των διαλυτών εντός της εξωκυττάριας μήτρας περιορίζεται από τη δομή των πρωτεογλυκανών, οι οποίες ρυθμίζουν το μέγεθος των διαθέσιμων μικρο-πόρων. Ως αποτέλεσμα, μόνο μικρό κλάσμα των διαλυτών μπορεί να προσπελάσει τον ιστό του δίσκου. Τα μόρια οξυγόνου διαπερνούν

όλους τους διαθέσιμους πόρους, ωστόσο η συνολική διάχυση εξαρτάται από το δίκτυο των πρωτεογλυκανών, το ποσοστό νερού και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μορίων [23].

Η ECM του ΜΣΔ βρίσκεται σε συνεχή δυναμική ανανέωση, μέσω ισορροπίας αναβολικών και καταβολικών διεργασιών. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (Matrix metalloproteinases, MMPs) αποδομούν γερασμένες πρωτεογλυκάνες, ενώ η σύνθεση νέας εξωκυττάριας μήτρας διεγείρεται από αναβολικούς αυξητικούς παράγοντες (Growth Factors, GFs) [24].

Κύριοι αναβολικοί παράγοντες είναι:

1. Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (Insulin-like GF-1, **IGF-1**), διεγείρει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και μειώνει την απόπτωση των κυττάρων στο δίσκο.
2. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal GF, **EGF**), ενισχύει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και τη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας.
3. Βασικός Ινώδης αυξητικός παράγοντας (Basic Fibroblast GF, **bFGF**), προωθεί τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό.
4. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal GF, **EGF**), αυξάνει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και τη σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας.
5. Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (Platelet-derived GF, **PDGF**), ελαττώνει το ρυθμό απόπτωσης των κυττάρων
6. Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας (Transforming GF beta, **TGF-β**), αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό.
7. Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες 2-4 (Bone morphogenetic protein, **BMP-2**, **BPM-4**), αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό, το αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ (Messenger ribonucleic acid, mRNA) για κολλαγόνο τύπου II και αγγρεκάνη και ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση της BMP-6, BMP-7, TGF-β). Έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση BMP-2 σε ΜΣΔ με βλάβη αυξάνει την αγγειογένεση.
8. **BMP-7**, αλλιώς οστεογενετική πρωτεΐνη- 1 (Osteogenic Protein-1, **OP-1**), αυξάνει τη σύνθεση του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών καθώς και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό.

Η καταβολική δραστηριότητα καθορίζεται από MMPs και κυτοκίνες που αποδομούν τα μακρομόρια της εξωκυττάριας μήτρας. Οι MMPs -1, -2, -3, -8, -9, -13 μαζί με την αγρεκανάση- 1 (A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin motif, ADAMTS-4) και την αγρεκανάση-2 (ADAMTS-5), αποδομούν το κολλαγόνο, την aggrecan και τη βερσικάνη, οδηγώντας σε απώλεια πρωτεογλυκανών και ύδατος. Η υπερέκφρασή τους μειώνει την ικανότητα του δίσκου να αναπτύσσει πιέσεις διόγκωσης, συμβάλλοντας στην εκφύλιση.

Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ιντερλευκίνες (Interleukin, IL-1 και IL-8) TNF- α αυξάνονται μετά από τραυματισμό του δίσκου και ενισχύουν την παραγωγή MMPs, Νιτρικό Οξείδιο (Nitric Oxide, NO) και κυκλοοξυγενάση-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2). Το NO παράγει ελεύθερες ρίζες και καταστέλλει τους ιστικούς αναστολείς των MMPs (TIMPs), ενώ IL-6 και IL-9 ενισχύουν τη διάσπαση πρωτεογλυκανών και υαλουρονικού οξέος. Η φλεγμονώδης αυτή διεργασία οδηγεί σε απώλεια δομικής ακεραιότητας και συμβάλλει στα επώδυνα συμπτώματα της δισκοπάθειας [24,25].

1.3 Εμβιομηχανική λειτουργία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Ο πρωταρχικός ρόλος του ΜΣΔ είναι μηχανικός, καθώς συμμετέχει στη μεταφορά δυνάμεων, στη διάχυση της ενέργειας και επιτρέπει ελεύθερη κίνηση της σπονδυλικής στήλης [26]. Η κατανόηση και η μελέτη της λειτουργικότητας κάθε ανατομικού στοιχείου του δίσκου είναι σημαντική, διότι κάθε τμήμα διαδραματίζει διαφορετικό εμβιομηχανικό ρόλο, ενώ όλα μαζί συμβάλλουν στην αρμονική σταθερότητα και κινητικότητα της ΣΣ.

Ο εξωτερικός ινώδης δακτύλιος περικλείει τον εσωτερικό ινώδη δακτύλιο και τον πηκτοειδή πυρήνα. Τμήματα των κολλαγόνων ινών διαπερνούν τα σπονδυλικά σώματα, συνδέοντας τον δακτύλιο με τα σώματα των σπονδύλων και συμβάλλοντας στη σταθερότητα της ΣΣ. Το εξωτερικό τμήμα του ινώδους δακτυλίου παρουσιάζει υψηλό συντελεστή τάσης και ακαμψίας, γεγονός που του επιτρέπει να αντιστέκεται σε σημαντικές διατακτικές δυνάμεις, αποτρέποντας την παραμόρφωση και προστατεύοντας τις εσωτερικές δομές. Οι δομές αυτές του δίσκου χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ενυδάτωσης, που αποδίδεται στη συνεχόμενη διαδικασία ενυδάτωσης και αφυδάτωσης του διάμεσου υγρού μέσω της εξωκυττάριας μήτρας. Η ιδιότητα αυτή

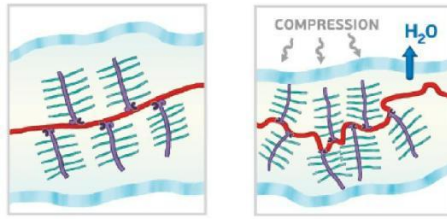
παρέχει γλοιοελαστικότητα, επιτρέποντας στον δίσκο να υποστεί σημαντικές παραμορφώσεις και ογκομετρικές μεταβολές υπό την επίδραση συμπιεστικών δυνάμεων. Σε γενικό πλαίσιο, οι στροφικές δυνάμεις μεταβάλλουν το σχήμα του ινώδους δακτυλίου χωρίς να επηρεάζουν τον όγκο του δίσκου, ενώ οι δυνάμεις κάμψης και συμπίεσης διαταράσσουν και τις δύο παραμέτρους (όγκο και προβολή του δίσκου, bulging και μορφολογικές μεταβολές).

Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής τους δίσκου στις μηχανικές καταπονήσεις είναι οι εξής:

- 1) Η **υδροστατική πίεση** του διάμεσου υγρού.
- 2) Η **ωσμωτική πίεση**.
- 3) Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ **κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών** στη ECM.

Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση υψηλών φορτίων, κυρίως συμπιεστικών όπως το βάρος του σώματος, οι τρεις αυτοί μηχανισμοί πρέπει να λειτουργούν σε αρμονία [27].

Στην καθημερινή ζωή, κατά την ορθοστασία ή κατά τη διάρκεια άσκησης, ο δίσκος υφίσταται παρατεταμένη συμπίεση, με αύξηση της υδροστατικής πίεσης που επεκτείνεται προς τον ινώδη δακτύλιο, ενώ ποσότητα του διάμεσου υγρού εξέρχεται από τους ιστούς οδηγώντας σε μείωση του ύψους του δίσκου. Αντίθετα, σε ύπτια θέση, όπως κατά τη διάρκεια του ύπνου, παρατηρείται αποσυμπίεση του δίσκου και επαναπρόσληψη νερού από τον πυρήνα, επαναφέροντας το ύψος στα φυσιολογικά πλαίσια. Ο μηχανισμός αυτός, γνωστός ως “compression- coping”, οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του πυρήνα σε νερό και στην άφθονη εξωκυττάρια μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, που επιτρέπουν την ανάπτυξη υψηλών υδροστατικών πιέσεων, και διαφορών ωσμωτικής πίεσης μεταξύ του διάμεσου υγρού εντός και εκτός του δίσκου [28, 29].



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός “compression- coping” (Μηχανισμός συμπιεστικής προσαρμογής του δίσκου) του δίσκου.

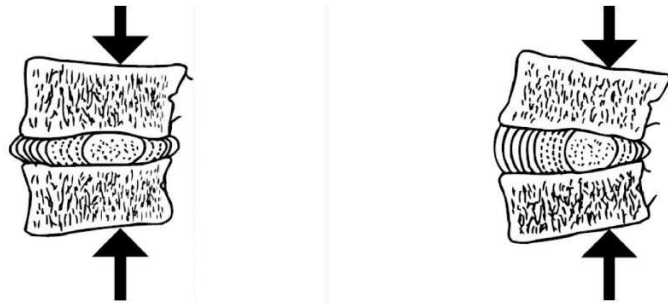
Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015;74(2):157-68.

Ο πηκτοειδής πυρήνας απεικονίζεται ως μία δομή η οποία αποτελείται από συσσωματώματα πρωτεογλυκανών, παγιδευμένα μέσα σε ένα δίκτυο ινών κολλαγόνου. Τα συσσωματώματα των πρωτεογλυκανών αποτελούνται από ένα κεντρικό μόριο υαλουρονικού οξέος (κόκκινο), στο οποίο προσδένονται μόρια αγγρεκάνης. Η αγγρεκάνη διαθέτει μία κεντρική πρωτεϊνική ραχοκοκαλιά (μωβ) και πλευρικές αλυσίδες θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών (ανοιχτό πράσινο).

Στην 1^η εικόνα, ο ΠΠ παρουσιάζεται σε κατάσταση μηχανικής και οσμωτικής ισορροπίας, πλούσιος σε νερό λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ανιονικών γλυκοζαμινογλυκανών. Η ενδογενής υδροστατική πίεση που δημιουργείται εξισορροπείται από τις εφελκυστικές δυνάμεις του δικτύου κολλαγόνου.

Στη 2^η εικόνα, ο ΠΠ βρίσκεται υπό την επίδραση συμπιεστικών δυνάμεων. Η εφαρμογή συμπίεσης μέσω της ΣΣ οδηγεί σε αποβολή μέρους του νερού από τον δίσκο, γεγονός που αυξάνει τη συγκέντρωση της αγγρεκάνης και, κατά συνέπεια, το οσμωτικό δυναμικό διόγκωσης. Η αύξηση αυτή επιτρέπει στον δίσκο να αντισταθεί πιο αποτελεσματικά στην περαιτέρω συμπίεση.

Με την άρση του συμπιεστικού φορτίου, το ύψος του δίσκου αποκαθίσταται καθώς το νερό επανέρχεται στον ιστό, επαναφέροντας την αρχική κατάσταση οσμωτικής και μηχανικής ισορροπίας.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση μιας σπονδυλικής μονάδας.

Κατά την εφαρμογή αξονικής συμπίεσης, αναπτύσσονται συμπιεστικές δυνάμεις στον ΠΠ, ενώ αντίστοιχες δυνάμεις τάσης αναπτύσσονται επί του ΙΔ. Οι υψηλές πιέσεις του διάμεσου υγρού αποτελούν τη συνισταμένη της υδροστατικής πίεσης και της οσμωτικής πίεσης. Η έκκεντρη φόρτιση του ΜΣΔ οδηγεί σε παραμόρφωση, προκαλώντας την ανάπτυξη πρόσθετων δυνάμεων διάτμησης οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν αποκόλληση των στιβάδων του ΙΔ καθώς και ρήξη του.

Μπάμπης Γ.Χ., Παπαδόπουλος Η.Χ., Σαπκας Γ. Εμβιομηχανική του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου (Εμβιομηχανική ΜΣΔ). Ορθοπαιδική Εμβιομηχανική. Πανεπιστημιακή έκδοση, Ελλάδα, 2024.

1.4 Χόνδρινες Τελικές Πλάκες

Το τρίτο ξεχωριστό ανατομικό τμήμα, αλλά και αναπόσπαστο στοιχείο για την εύρυθμη λειτουργία του μεσοσπονδύλιου δίσκου, είναι η χόνδρινη τελική πλάκα, η οποία καλύπτει την άνω και κάτω επιφάνειά του. Σύμφωνα με εμβιομηχανικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι οι τελικές πλάκες, όταν υπόκεινται σε μηχανικά φορτία, υφίστανται άμεση και σημαντική παραμόρφωση συμβάλλοντας στην ομαλή κατανομή των δυνάμεων προς τον πηκτοειδή πυρήνα και τον ινώδη δακτύλιο. Επιπλέον, η αυξημένη διαπερατότητά τους στο νερό και στα θρεπτικά συστατικά παίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης του δίσκου, εξομαλύνοντας την επίδραση των φορτίων σε όλη την έκταση της σπονδυλικής στήλης [27].

Οι τελικές πλάκες αναγνωρίζονται ήδη από την εμβρυϊκή περίοδο και κατά την πρώιμη παιδική ηλικία καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του μεσοσπονδύλιου χώρου, διαθέτοντας εκτεταμένους αγγειακούς διαύλους [30].

Δομικά, αποτελούνται από ένα οστικό στρώμα και από ένα τμήμα υαλώδους χόνδρου, με πάχος που κυμαίνεται από 0.1 mm έως 2.0 mm. Το εσωτερικό τους τμήμα και οι ανώτερες μοίρες της σπονδυλικής στήλης εμφανίζουν λεπτότερες πλάκες, ενώ στα κατώτερα επίπεδα και στα περιφερικά τμήματα το πάχος αυξάνεται [8]. Οι τελικές πλάκες διαθέτουν χονδροκύτταρα εντός ενός εξωκυττάριου δικτύου πλούσιου σε πρωτεογλυκάνες, νερό (50%-60%) και κολλαγόνο τύπου I και II, με τον τύπο II να επικρατεί. Οι ίνες κολλαγόνου είναι προσανατολισμένες οριζόντια και παράλληλα με τα σπονδυλικά σώματα και στη συνέχεια εισέρχονται του δίσκου. Στα πέταλα του ΙΔ οι ίνες συνεχίζουν τα διάταξής τους, κάτι που δεν είναι εξίσου εμφανές στον πηκτοειδή πυρήνα [4].

Τα μόρια πρωτεογλυκανών στις τελικές πλάκες είναι απαραίτητα τόσο για τη ρύθμιση της μεταφοράς διαλυτών ουσιών όσο και για τη διατήρηση της ποσότητας του νερού εντός και εκτός του δίσκου, με τις απώλειες τους να συνδέονται άμεσα με την έναρξη εκφυλιστικών διεργασιών [32]. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, οι τελικές πλάκες περιέχουν δίκτυο τριχοειδών αγγείων, μέσω των οποίων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά κατά την ανάπτυξη του δίσκου. Μεταβολικά προϊόντα αποβάλλονται δια των πόρων της πλάκας, οι οποίοι αριθμούν περίπου 50-100 και έχουν διάμετρο περί τα 0,5mm.

Η λειτουργία των χόνδρινων τελικών πλακών μπορεί να παρομοιαστεί με ωσμωτική “αντλία” με κύκλο 4-8 ωρών: κατά την ύπτια θέση, όπου η ενδοδιασκή πίεση μειώνεται, εισέρχονται θρεπτικά συστατικά, ενώ στην ορθοστασία, όπου η πίεση αυξάνεται, απομακρύνονται τα προϊόντα του καταβολισμού. Επομένως, η υγιής λειτουργία του ΜΣΔ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακεραιότητα και τη βιομηχανική συμπεριφορά των χόνδρινων τελικών πλακών, οι οποίες φέρουν σημαντικά φορτία σε κάθε καθημερινή δραστηριότητα [32, 33].

Κεφάλαιο 2. Εκφύλιση του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Με την ανάπτυξη του ατόμου, τόσο σκελετικά όσο και ηλικιακά, επέρχονται σημαντικές ιστολογικές, μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές στο μεσοσπονδύλιο δίσκου, οι οποίες επηρεάζουν καθοριστικά τη λειτουργία, τη σταθερότητα και τις μηχανικές ιδιότητες της σπονδυλικής στήλης. Η διαδικασία αυτή φαίνεται ότι εκδηλώνεται πρωιμότερα στο ΜΣΔ σε σχέση με άλλους ιστούς, γεγονός που αποδίδεται στην ήδη περιορισμένη και σταδιακά μηδενική αιμάτωση του. Αν και η μεταβολική αυτή δραστηριότητα του δίσκου αποτελεί φυσιολογική διαδικασία γήρανσης, η εκφύλιση συνιστά διακριτή παθολογική οντότητα η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ανεξαρτήτως ηλικίας και να οδηγήσει σε δομική αποτυχία.

2.1 Διαδικασία εκφύλισης

Η διάκριση μεταξύ εκφύλισης και γήρανσης δεν είναι πάντα ευκρινής, καθώς και οι δύο διαδικασίες επιφέρουν παρόμοιες μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία του δίσκου. Ως εκφύλιση ορίζεται η παθολογική απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του δίσκου, η οποία αποδίδεται στη συνδυαστική επίδραση θρεπτικών, περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Σε αντίθεση με τη γήρανση, η εκφυλιστική διαδικασία μπορεί να εμφανιστεί σε κάθε ηλικιακή ομάδα. Είναι επομένως δυνατόν ένας δίσκος να εμφανίζει εκφυλιστικές αλλοιώσεις ακόμη και σε κατά τα άλλα υγιές άτομο νεαρής ηλικίας [34].

Παράγοντες που συμβάλλουν στην εκφύλιση περιλαμβάνουν τις συμπιεστικές και διατμητικές δυνάμεις, τους κραδασμούς, την επαναλαμβανόμενη φόρτιση και άρση βάρους, το τραύμα, τη γήρανση, τη γενετική προδιάθεση και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η γενετική προδιάθεση έχει πλέον τεκμηριωθεί, με πολυμορφισμούς γονιδίων όπως της αγγρεκάνης, του κολλαγόνου τύπου 1 (Collagen Type I, COL1), COL9, COL11, της ινωδονεκτίνης (Fibronectin, FN, HAPLN1, της θρομβοσπονδίνης, της πρωτεΐνης ενδιάμεσου στρώματος χόνδρου (Cartilage Intermediate Layer Protein, CILP) και της ασπορίνης (Asporin, ASPN) να σχετίζονται με τη διαταραχή των στοιχείων της θεμέλιας ουσίας [35, 36]. Σε επίπεδο περιβαλλοντικών παραγόντων, η παχυσαρκία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου καθώς ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) $> 25\text{kg/m}^2$ σε νεαρή ηλικία αυξάνει σημαντικά την

πιθανότητα μελλοντικής εκφύλισης Παράλληλα, η συνύπαρξη παχυσαρκίας και καρδιαγγειακής νόσου προδιαθέτει σε αθηροσκλήρωση των σπονδυλικών αρτηριών, επιταχύνοντας τις εκφυλιστικές διεργασίες. Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα IL-6 και ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών, ενώ το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους πλέον τεκμηριωμένους χημικούς παράγοντες που ευνοούν την εκφύλιση, προκαλώντας μείωση της αιμάτωσης των τελικών πλακών και ενδεχομένως ενεργοποίηση μουσκαρινικών υποδοχέων [37,38].

2.1.1 Παθοφυσιολογία της εκφύλισης

Πρώιμο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό της εκφύλισης είναι η μείωση της συγκέντρωσης και η αύξηση της διάσπασης της αγγρεκάνης και των λοιπών πρωτεογλυκανών. Η απώλεια γλυκοζαμινογλυκανών μειώνει την ωσμωτική πίεση της εξωκυττάριας μήτρας οδηγώντας σε μείωση περιεκτικότητας του δίσκου σε νερό. Με τον τρόπο η εμβιομηχανική λειτουργία του δίσκου να μεταβάλλεται καθώς μειώνεται η ικανότητα απορρόφησης των συμπιεστικών φορτίων. Η ελάττωση αυτή μεταβάλλει την εμβιομηχανική λειτουργία του δίσκου, μειώνοντας την ικανότητα απορρόφησης των συμπιεστικών φορτίων. Με την προοδευτική αφυδάτωση του ΠΠ, ο ΙΔ αναλαμβάνει μεγαλύτερο μερίδιο στην αντίσταση στα φορτία, καθιστάμενος πιο άκαμπτος και ευάλωτος, γεγονός που επιταχύνει την εκφύλιση [39].

Παρά το ότι και οι ίνες κολλαγόνου υφίστανται μεταβολές, αυτές είναι λιγότερο έντονες σε σύγκριση με τις πρωτεογλυκάνες. Η συνολική ποσότητα του κολλαγόνου επηρεάζεται ελάχιστα, ωστόσο μεταβάλλονται ο φαινότυπος και η τοπογραφική κατανομή των τύπων κολλαγόνου. Πιο συγκεκριμένα, η αποδιάταξη της τριπλής έλικας, ιδιαίτερα του κολλαγόνου τύπου II, οφείλεται σε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα. Παράλληλα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι στα πρώιμα στάδια της εκφύλισης η βιοσύνθεση νέου κολλαγόνου μπορεί να αποτελεί ενδογενή επανορθωτική απόκριση των κυττάρων του δίσκου [40]. Η περιεκτικότητα σε φιμπρονεκτίνη αυξάνεται με την πρόοδο της εκφύλισης, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αυξημένος κατακερματισμός της. Τα θραύσματα φιμπρονεκτίνης συμβάλλουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση του εκφυλιστικού καταρράκτη, μειώνοντας τη σύνθεση αγγρεκάνης και προάγοντας την παραγωγή MMPs [41]. Η ενζυμική δραστηριότητα (καθεψίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες, αγκρεκανάσες) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη

διάσπαση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας. Οι καθεψίνες δρουν σε όξινο περιβάλλον, σε αντίθεση με τις MMPs και τις αγκρεκανάσες που παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε ουδέτερο pH [8].

Η απώλεια πρωτεογλυκανών επιδρά σημαντικά στη μηχανική συμπεριφορά του δίσκου, καθιστώντας τον λιγότερο ικανό να διατηρηθεί ενυδατωμένος υπό φόρτιση, και ικανότητα φόρτισης του δίσκου. Με τη μείωση των πρωτεογλυκανών, οι εκφυλισμένοι δίσκοι εμφανίζουν μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό, ταχύτερη απώλεια ύψους και υγρού με αποτέλεσμα να προβάλλουν (bulging) [42,43]. Η μείωση της ενυδάτωσης οδηγεί σε ανώμαλη κατανομή τάσεων στις σπονδυλικές δομές, προδιαθέτοντας τις αποφυσιακές αρθρώσεις σε οστεοαρθρικές αλλοιώσεις και τον ωχρό σύνδεσμο σε πάχυνση και προβολή εντός του σπονδυλικού σωλήνα, με αποτέλεσμα τη σπονδυλική στένωση [44, 45].

Επιπλέον, η απώλεια πρωτεογλυκανών επηρεάζει τη διακίνηση μορίων εντός και εκτός του δίσκου. Η αγγρεκάνη, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αρνητικών φορτίων, περιορίζει τη διάχυση μεγάλων μορίων, όπως πρωτεϊνών ορού και κυτταροκινών στην εξωκυττάρια μήτρα. Η απώλειά της διευκολύνει τόσο τη διαφυγή μικρών θραυσμάτων αγγρεκάνης από τον δίσκο όσο και τη διείσδυση μεγάλων μορίων, όπως συμπλεγμάτων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, τροποποιώντας τη συμπεριφορά των κυττάρων του δίσκου και προάγοντας την εκφύλιση. Η αυξημένη αγγειακή και νευρική διήθηση που παρατηρείται στους εκφυλισμένους δίσκους έχει συσχετιστεί με χρόνια οσφυϊκό άλγος, και πιθανότατα να οφείλεται και στην απώλεια πρωτεογλυκανών, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί πως η αγγρεκάνη του δίσκου αναστέλλει τη νευρική διείσδυση [46,47].

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πιεστικά φαινόμενα που μπορεί να προκληθούν από κήλη του μεσοσπονδύλιου δίσκου δεν αρκούν από μόνα τους για την πρόκληση του άλγους. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνεται από ευρήματα της βιβλιογραφίας σύμφωνα με τα οποία, ποσοστό άνω του 70% των ατόμων παρουσιάζει προπτώσεις δίσκου χωρίς συμπτωματολογία [48]. Το άλγος στους συμπτωματικούς ασθενείς αποδίδεται στη νευρογενή φλεγμονή και ευαισθητοποίηση που προκαλούν οι βιοχημικοί μεσολαβητές του φλεγμονώδους καταρράκτη (προσταγλανδίνη E₂, θρομβοξανή, φωσφολιπάσες A₂ (phospholipase A₂, PLA₂), TNF-α, διάφορες ILs και MMPs) που απελευθερώνονται μετά την πρόπτωση [49,50].

2.1.2 Διαταραχή θρέψης κατά την εκφύλιση

Μία από τις πρωταρχικές αιτίες εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου θεωρείται η ανεπαρκής παροχή θρεπτικών ουσιών στα δισκικά κύτταρα οδηγώντας σε σημαντικές μεταβολικές διαταραχές [51]. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων του δίσκου είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στα επίπεδα του εξωκυττάριου οξυγόνου και του pH. Οι ρυθμοί σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας μειώνονται απότομα υπό όξινες συνθήκες και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ενώ τα κύτταρα δεν δύνανται να επιβιώσουν σε παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλό pH ή χαμηλά επίπεδα γλυκόζης [52].

Κατά συνέπεια, η μείωση στον εφοδιασμό θρεπτικών ουσιών οδηγεί σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, μείωση του pH και συσσώρευση του γαλακτικού οξέος. Οι συνθήκες αυτές επηρεάζουν δυσμενώς τη δυνατότητα των κυττάρων να συνθέσουν και να διατηρήσουν την εξωκυττάρια μήτρα, επιταχύνοντας την εκφύλιση. Δεδομένου ότι ο ΜΣΔ είναι μία ανάγγεια δομή, τα κύτταρά του εξαρτώνται αποκλειστικά από τα αγγεία της περιφέρειάς του για την παροχή θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των μεταβολικών προϊόντων.

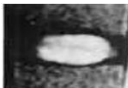
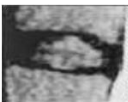
Η θρέψη του δίσκου, επομένως, μπορεί να διαταραχθεί εύκολα και σε πολλαπλά επίπεδα από ποικίλους παράγοντες που επηρεάζουν την αιμάτωση του σπονδυλικού σώματος (π.χ. αθηροσκλήρωση, δρεπανοκυτταρική αναιμία) [53], αλλά και από τη μακροχρόνια υπερβολική σωματική άσκηση ή, αντίθετα, από τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να τροποποιούν τη μικροαγγειακή αρχιτεκτονική στη διεπιφάνεια μεταξύ σπονδυλικού σώματος και δίσκου, επηρεάζοντας τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών εντός του μεσοσπονδύλιου δίσκου [54]. Επιπλέον, η παροχή θρεπτικών συστατικών μπορεί να μειωθεί σε περιπτώσεις ασβεστοποίησης της χόνδρινης τελικής πλάκας, όπως έχει περιγραφεί σε δίσκους σε σκολίωση της ΣΣ, περιορίζοντας τη διαπερατότητά της και επιταχύνοντας τη διαδικασία της εκφύλισης [55].

2.2 Ταξινόμηση της εκφύλισης

Η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου έχει περιγραφεί από διάφορα συστήματα ταξινόμησης. Στην κλινική πράξη, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ταξινομήσεις είναι:

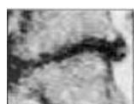
- η Pfirrmann, που αξιολογεί τις μορφολογικές αλλοιώσεις του δίσκου στη μαγνητική τομογραφία [56] (Πίνακας 1), και
- η Modic, που περιγράφει τις εκφυλιστικές αλλαγές των τελικών πλακών και του σπονδυλικού σώματος [57] (Πίνακας 2).

Πίνακας 1. Ταξινόμηση κατά Pfirrmann et al.

Βαθμός	Δομή	Όρια ΠΠ- ΙΔ	Ένταση σήματος	Ύψος ΜΣΔ	
I		Ομοιογενής Καθαρό λευκό	Σαφή	Υψηλή	Φυσιολογικό
II		Ανομοιογενής, +/- οριζόντιες μπάντες	Σαφή	Υψηλή	Φυσιολογικό
III		Ανομοιογενής, γκρι	Ασαφή	Ενδιάμεση	Ήπια μείωση
IV		Ανομοιογενής, γκρι προς μαύρο	Ανύπαρκτα	Ενδιάμεση Χαμηλή	Σημαντικά μειωμένο



V



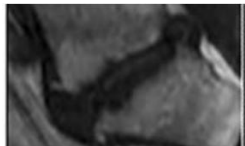
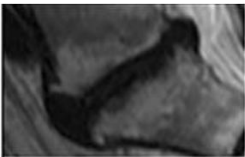
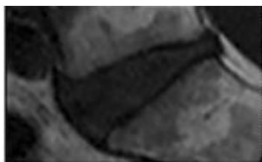
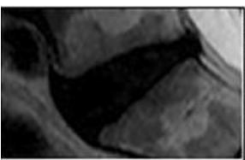
Ανομοιογενής,
μαύρο

Ανύπαρκτα

Χαμηλή

Καθίζηση ύψους

Πίνακας 2. Ταξινόμηση κατά Modic et al.

Modic Αλλαγές	T1- ακολουθία	T2- ακολουθία	Ιστοπαθολογία
Modic 1	Χαμηλό σήμα 	Υψηλό σήμα 	Οίδημα- φλεγμονή
Modic 2	Υψηλό σήμα 	Υψηλό σήμα 	Λιπώδεις αλλαγές
Modic 3	Χαμηλό σήμα 	Χαμηλό σήμα 	Ύψωση Σχισμές ΠΠ και ΙΔ Μείωση ύψους Παρουσία κήλης Οστεόφυτα

2.3 Εμβιομηχανικές αλλαγές στον εκφυλισμένο δίσκο

Η εκφύλιση του ΜΣΔ συνδέεται άμεσα με τη σταδιακή απώλεια της εμβιομηχανικής του αντοχής, οδηγώντας σε επώδυνες καταστάσεις και σημαντική έκπτωση της καθημερινής λειτουργικότητας. Οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν άμεσα τον κυτταρικό μεταβολισμό, την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα του δίσκου. Η κατανόηση της συμπεριφοράς του δίσκου υπό φορτία κατά τη διάρκεια της εκφύλισης είναι επομένως κρίσιμη για την αντιμετώπιση των παθήσεων του ΜΣΔ.

Οι εμβιομηχανικές ιδιότητες του δίσκου βασίζονται στη συνεχή βιοσυνθετική δραστηριότητα των δισκικών κυττάρων και στη ρυθμισμένη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας. Με την ενεργοποίηση της διαδικασίας εκφύλισης και τη σταδιακή αλλοίωση των δομών του δίσκου, οι ιδιότητές του στη διαχείριση των φορτίων μεταβάλλονται. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ΠΠ χάνει την περιεκτικότητά σε πρωτεογλυκάνες και, κατ' επέκταση, σε νερό, γεγονός που οδηγεί σε αφυδάτωση, μείωση της ωσμωτικής πίεσης και απώλεια του υδροστατικού μηχανισμού του έναντι των συμπιεστικών φορτίων. Παράλληλα, ο δίσκος χάνει την ελαστικότητά του, μειώνεται το ύψος του και αποκτά τάση προβολής προς το σπονδυλικό σωλήνα.

Σε πιο προχωρημένα στάδια της εκφύλισης, όταν ο ΠΠ αντικαθίσταται από ινοχόνδρινο ιστό, ο ινώδης δακτύλιος αδυνατεί πλέον να διαχειριστεί συμπιεστικές και διατμητικές δυνάμεις. Αυτές οι εκτεταμένες μεταβολές στην εμβιομηχανική συμπεριφορά του δίσκου επηρεάζουν λειτουργικά και άλλες δομές της ΣΣ, οδηγώντας σε βλάβη. Για παράδειγμα, η ταχεία απώλεια ύψους του δίσκου υπό φορτίο προκαλεί οστεοαρθρικές αλλοιώσεις στις παρακείμενες αρθρικές επιφάνειες των αρθρικών αποφύσεων (facet joints). Επιπλέον, η μείωση των δυνάμεων τάσης στον ωχρό σύνδεσμο οδηγεί σε αναδιοργάνωση και πάχυνση, ενώ η απώλεια της ελαστικότητάς του προκαλεί προπέτεια αυτού προς το σπονδυλικό σωλήνα, συμβάλλοντας στην εμφάνιση σπονδυλικής στένωσης [43, 58, 59].

Κεφάλαιο 3. Σύγχρονες Βιολογικές Θεραπείες στην Εκφυλιστική Νόσο του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος τόσο στις συντηρητικές όσο και στις επεμβατικές μεθόδους αντιμετώπισης των παθήσεων της σπονδυλικής στήλης. Ωστόσο, οι προσεγγίσεις αυτές αντιμετωπίζουν κυρίως τα συμπτώματα και δε στοχεύουν στην υποκείμενη παθολογία της νόσου. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην περιορισμένη κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεια της εκφύλισης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, και με στόχο την υπέρβαση αυτού του θεραπευτικού κενού, έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη έμφαση στην ανάπτυξη και εξέλιξη των βιολογικών θεραπειών που στοχεύουν στην κατανόηση και στην αποκατάσταση των παθολογικά αλλοιωμένων δισκικών δομών. Οι θεραπείες αυτές προσεγγίζουν την πάθηση σε μοριακό επίπεδο, επιδιώκοντας να τροποποιήσουν την παθογένεια της νόσου και όχι απλώς να ανακουφίσουν το σύμπτωμα [60].

Με βάση το στάδιο της εκφύλισης οι βιολογικές θεραπείες ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες [61]:

- 1) Βιομοριακή θεραπεία
- 2) Κυτταρική θεραπεία
- 3) Δισκικά υποκατάστατα ιστοτεχνολογίας (tissue engineered disc-like constructs)

Στα αρχικά στάδια της εκφύλισης, όπου ο δίσκος διατηρεί ακόμα επαρκή κυτταρική πυκνότητα, εφαρμόζονται οι βιομοριακές θεραπείες (πρωτεΐνες και γονίδια), οι οποίες στοχεύουν στην ενίσχυση της έκφρασης των πρωτεϊνών και στην προαγωγή της σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας.

Κατά το μέσο στάδιο εκφύλισης παρατηρείται σημαντική μείωση του αριθμού και της λειτουργικότητας των δισκικών κυττάρων. Σε αυτό το πλαίσιο, η κυτταρική θεραπεία- με τη μορφή έγχυσης ή μεταμόσχευσης κυττάρων- αποτελεί την πλέον κατάλληλη προσέγγιση, με στόχο την ενίσχυση της κυτταρικής δραστηριότητας και τη διατήρηση της ομοιόστασης του δίσκου.

Τέλος, στο προχωρημένο στάδιο της εκφύλισης, όπου έχει επέλθει εκτεταμένη αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής και απώλεια της λειτουργικότητας του δίσκου, ενδείκνυται η χρήση δισκικών υποκατάστατων ιστοτεχνολογίας. Η προσέγγιση αυτή αποσκοπεί στην αναδόμηση της δισκικής δομής και την αποκατάσταση της λειτουργικότητας της σπονδυλικής μονάδας. [62]

3.1. Βιομοριακή Θεραπεία

Κατά τα πρώιμα στάδια της εκφύλισης του ΜΣΔ, παρατηρείται βλάβη βασικών βιομορίων, όπως DNA και πρωτεϊνών, λόγω φλεγμονώδους και οξειδωτικού στρες. Η βλάβη αυτή οδηγεί σε ανισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας. Στο πλαίσιο αυτό, η εφαρμογή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ή γονιδίων δύναται να αποκαταστήσει την έκφραση των στοχευόμενων μορίων, είτε μέσω ενίσχυσης της παραγωγής αναβολικών παραγόντων είτε μέσω αναστολής της παραγωγής καταβολικών, προάγοντας έτσι τη σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας [63].

3.1.1 Έγχυση πρωτεϊνικών διαλυμάτων

Οι κυριότερες πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για αυτόν το σκοπό είναι οι BMPs, OP-1, TGF-β. Έρευνες έχουν δείξει ότι η έγχυση πρωτεϊνικών διαλυμάτων στο δίσκο μπορεί να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη, να μεταβάλει τον κυτταρικό μεταβολισμό προς αναβολική κατεύθυνση, να αποκαταστήσει τις βιοχημικές ιδιότητες και να αντιστρέψει την εκφυλιστική δραστηριότητα [64]. Ο Gruber et al. ανέφεραν ότι η προσθήκη TGF-β ενεργοποιεί τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και προάγει το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων του ανθρώπινου ινώδους δακτυλίου [65]. Ο Wehling P απέδειξε ότι η χρήση αυτόλογων αυξητικών παραγόντων, όπως του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra) και η σωματομεδίνη C ή αλλιώς ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (Insulin-like GF 1, IGF-1), μειώνει το ρυθμό απόπτωσης και την παραγωγή IL-1 και φλεγμονωδών κυτοκινών [66]. Επιπλέον, ο Liu et al. (2015) κατέδειξαν ότι η πρωτεΐνη ορυκτοποίησης-1 (Mineralization Protein-1, MP-1) αναστέλλει την TNF-α induced εκφύλιση του ΜΣΔ, διατηρώντας την παραγωγή του ΠΠ και της ECM [67]. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, η άμεση ενδοδισκική έγχυση απαιτεί συχνές επαναλήψεις λόγω

της χρονιότητας της νόσου καθώς και της βραχείας βιολογικής ημίσειας ζωής των παραγόντων, περιορίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συνολική θεραπευτική επίδραση.

3.1.2 Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet- Rich Plasma, PRP)

Η ενδοδισκική εφαρμογή PRP αποτελεί μία από τις πλέον υποσχόμενες βιολογικές παρεμβάσεις για την ανάταξη της εκφυλιστικής διαδικασίας του ΜΣΔ. Τα αιμοπετάλια περιέχουν και απελευθερώνουν πληθώρα αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των PDGF, TGF- β 1 και Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Vascular Endothelial GF, VEGF), οι οποίοι ενισχύουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων και προάγουν τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τόσο σε κύτταρα του ΙΔ όσο και του ΠΠ [68]. Σε κλινικό επίπεδο, οι Akeda et al. (2011) κατέδειξαν ότι η ενδοδισκική έγχυση PRP σε ασθενείς με χρόνια οσφυαλγία οδήγησε σε σημαντική μείωση του πόνου στους 6 μήνες παρακολούθησης, χωρίς καταγεγραμμένες ανεπιθύμητες ενέργειες [69]. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν επιπλέον τη δράση PRP: οι Chao et al. έδειξαν ότι μειώνει την έκφραση καταβολικών μεταλλοπρωτεϊνών και ενισχύει τη σύνθεση της ECM in vitro μοντέλο χοίρειου δίσκου [70], ενώ οι Χριστοφόρου Γ. και Gelalis et al. και (2016, 2019) διαπίστωσαν ότι η θεραπεία συμβάλλει στη διατήρηση της μορφολογίας του δίσκου σε μοντέλο κουνελιού [71,72]. Στα πρώιμα στάδια της εκφύλισης, η χρήση PRP φαίνεται να υποστηρίζει τη διατήρηση του ύψους και της ενυδάτωσης του δίσκου, με το πλεονέκτημα ότι αποτελεί πλήρως αυτόλογη θεραπεία, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο ανοσολογικής αντίδρασης ή μετάδοσης λοιμώξεων [73].

3.1.3 Γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια αναδυόμενη προσέγγιση για την τροποποίηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την εκφύλιση στο δίσκο. Βασίζεται στη μεταφορά επιλεγμένων γονιδίων στα δισκικά κύτταρα μέσω ιικών φορέων (αδενοϊοί, λεντιοϊοί) ή μη ιικών συστημάτων. Η μεταφορά μπορεί να γίνει είτε με άμεση έγχυση του φορέα στον ιστό είτε με εξωσωματική γενετική τροποποίηση κυττάρων και στη συνέχεια επαναμεταμόσχευση στο δίσκο [74]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ιική μεταφορά των BMP-7 και TGF- β 3 ενισχύει τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου II αι

γλυκοζαμινών, βελτιώνοντας το εξωκυττάριο περιβάλλον του δίσκου [75]. Πιο πρόσφατα, η χρήση της τεχνολογίας με το σύστημα συσσωρευμένων, τακτικά παρεμβλλόμενων, βραχέων παλινδρομικών επαναλήψεων/πρωτεΐνη μοριακού ψαλιδιού (CRISPR/Cas9) σε συνδυασμό φορέα αδενο-συσχετιζόμενων ιών (Adeno-Associated Virus, AAV) επέτρεψε τη στοχευμένη ρύθμιση του γονιδίου β-κατενίνη (β-Catenin, Ctnnb1) σε μοντέλο ποντικού, μειώνοντας την έκφραση καταβολικών ενζύμων όπως MMP13 και ADAMTS 5 προστατεύοντας τη δοκιμή ακεραιότητα του δίσκου [76].

Παρά τα ενθαρρυντικά αυτά δεδομένα, η χρήση ιικών φορέων συνοδεύεται από σημαντικές προκλήσεις, όπως κίνδυνο ανοσογονικότητας, τοξικότητας και ανεπιθύμητων ενσωματωμένων μεταλλάξεων, γεγονός που εντείνει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μη ιικών συστημάτων γονιδιακής μεταφοράς [77]. Οι μη ιικοί φορείς αποτελούν ασφαλέστερη εναλλακτική, ωστόσο η εφαρμογή τους περιορίζεται από τη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα γονιδιακής μεταφοράς.

3.2 Κυτταρική Θεραπεία

Με την εξέλιξη της εκφυλιστικής διαδικασίας, ο αριθμός των κυττάρων που μπορούν να ανταποκριθούν σε βιομοριακές θεραπείες μειώνονται σημαντικά. Ως εκ τούτου, καθίσταται η αναγκαία η εφαρμογή θεραπευτικών προσεγγίσεων που, μέσω της ενίσχυσης της κυτταρικής πυκνότητας και της μεταβολικής δραστηριότητας, στοχεύουν στην αποκατάσταση της ομοιόστασης του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

3.2.1 Μεταμόσχευση χονδροκυττάρων

Η μεταμόσχευση χονδροκυττάρων έχει προταθεί ως θεραπευτική επιλογή λόγω της ικανότητας των κυττάρων αυτών να επιβιώνουν και να λειτουργούν σε περιβάλλον με χαμηλό οξυγόνο και περιορισμένης θρέψης, χαρακτηριστικά του εκφυλισμένου δίσκου. Η εφαρμογή τους ενισχύει τη σύνθεση συστατικών της ECM, όπως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο τύπου I και II, συμβάλλοντας στη διατήρηση του ύψους και της μηχανικής ακεραιότητας του δίσκου [78]. Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς, όπως το αυξημένο κόστος και το χρόνο καλλιέργειας, τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης και της ενσωμάτωσης των

μεταμοσχευμένων κυττάρων στο δυσμενές μικροπεριβάλλον, καθώς και τον κίνδυνο διαρροής του μοσχεύματος.

3.2.2 Βλαστοκύτταρα (Stem Cells, SCs)

Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν αδιαφοροποίητα κύτταρα με υψηλό δυναμικό αυτοανανέωσης, πολλαπλασιασμού και μόνο- ή πολύκατευθυνόμενης διαφοροποίησης. Εντοπίζονται τόσο στον εμβρυϊκό (εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα- Embryonic Stem Cells, ESCs) όσο και στον ενήλικο οργανισμό, με κύριες πηγές τον μυελό των οστών (μεσεγχυματικά κύτταρα από τον μυελό των οστών- Bone Marrow Stem Cells, BMSCs), τον λιπώδη ιστό (adipose-derived stem cells, ADSCs), το αίμα (hematopoietic stem cells, HSCs), το αμνιακό υγρό (amniotic fluid stem cells, AFSCs) και τον ομφάλιο λώρο (umbilical cord stem cells, UCSCs) [79,80]. Τα παντοδύναμα βλαστοκύτταρα (totipotent stem cells) μπορούν να εξελιχθούν σε περισσότερους από 250 λειτουργικούς τύπους κυττάρων κατά τη διάρκεια της ζωής, και η επιβίωση κάθε οργανισμού εξαρτάται από τη συνεχή κυτταρική ανανέωση και ανάπτυξη τους μέσω μιτωτικής διαίρεσης [81].

Τα βλαστοκύτταρα δημιουργούνται με τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο. Το εσωτερικό τοίχωμα του πρώιμου εμβρύου επενδύεται από βραχύβια βλαστοκύτταρα, γνωστά ως εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Αυτά αποτελούνται από δύο διακριτούς κυτταρικούς πληθυσμούς: την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass -ICM) και το τροφοεξώδερμα (trophoectoderm- TE). Η ICM αποτελείται από επιβλάστες, οι οποίοι θα διαφοροποιηθούν στα εμβρυϊκά φύλα (εκτοδέρμα, μεσοδέρμα, ενδόδερμα), συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του εμβρύου. Το TE, από την άλλη, διαφοροποιείται σε εξωεμβρυϊκές στηρικτικές δομές (όπως ο πλακούντας), απαραίτητες για την ανάπτυξη του εμβρύου. Παράλληλα με την ανάπτυξη των εξωεμβρυϊκών δομών, η ICM παραμένει αδιαφοροποίητη, πολυδύναμη και υψηλής μιτωτικής δραστηριότητας. Η πολυδυναμικότητα αυτή επιτρέπει τη δημιουργία οποιουδήποτε κυτταρικού τύπου του οργανισμού. Τα ανθρώπινα εμβρυογενή βλαστοκύτταρα (Human embryonic stem cells- hESCs) προέρχονται από την ICM. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης τα κύτταρα οργανώνονται τρεις βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εκτόδερμα), οι οποίες διαφοροποιούνται σε όλους τους ιστούς του εμβρύου και, αργότερα, του ενήλικου οργανισμού. Μετά τη

διαφοροποίηση τους, τα hESCs καθίστανται πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, με τη δυναμική τους να περιορίζεται μόνο στη στοιβάδα από την οποία προήλθαν. Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα εντοπίζονται ευρέως στον ενήλικο οργανισμό ως αδιαφοροποίητα κύτταρα, με κύρια ιδιότητά τους την ικανότητα αυτοανανέωσης μέσω μιτωτικής διαίρεσης και τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους υπό φυσιολογικές συνθήκες [82].

Στον ενήλικο οργανισμό, τα βλαστοκύτταρα αποτελούν αδιαφοροποίητα κύτταρα με περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης, τα οποία εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναγέννηση, επιδιόρθωση και αντικατάσταση των κυττάρων που καταστρέφονται ή φθείρονται καθημερινά. Βασικές κατηγορίες ενήλικων βλαστοκυττάρων περιλαμβάνουν:

- **Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs):** Βρίσκονται σε πολλούς ιστούς, κυρίως στον μυελό των οστών, και διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα και ικανότητα διαφοροποίησης σε κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικής προέλευσης [83].
- **Νευρικά βλαστοκύτταρα:** Εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και διαφοροποιούνται σε νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα.
- **Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs):** Υπεύθυνα για την παραγωγή όλων των τύπων αιμοκυττάρων (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα αιμοπετάλια).
- **Δερμικά βλαστοκύτταρα:** Βρίσκονται στην επιδερμίδα και συμβάλλουν στη συνεχή ανανέωση του δέρματος μέσω διαφοροποίησης σε κερατινοκύτταρα.

3.2.3 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)

Πρόκειται για ιεραρχημένα μεταγεννητικά βλαστοκύτταρα, τα οποία αποτελούν βασικό αντικείμενο έρευνας στην αναγεννητική ιατρική λόγω της ικανότητάς τους για αυτοανανέωση, και πολυκατευθυνόμενη διαφοροποίηση σε ποικίλες κυτταρικές σειρές. Διακρίνονται για την εύκολη απομόνωση και καλλιέργειά τους, την υψηλή πλαστικότητα και τον έμφυτο τροπισμό τους προς περιοχές τραυματισμού (μετανάστευση). Παράλληλα, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιαποπτωτική και ανοσορρυθμιστική δράση μέσω παρακρινών μηχανισμών, επιδεικνύουν

αντιμικροβιακές ιδιότητες, προάγουν τη νεοαγγειογένεση και ενεργοποιούν τοπικούς πληθυσμούς βλαστοκυττάρων [84].

Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών μεθόδων απομόνωσης, καλλιέργειας και χαρακτηρισμού των MSCs, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση μεταξύ μελετών. Για το λόγο αυτό, η Επιτροπή Μεσεγγχυματικών και Ιστικών Βλαστοκυττάρων της Διεθνούς Εταιρείας Κυτταρικής Θεραπείας (ISCT) καθόρισε το 2006 τρία ελάχιστα κριτήρια για τον ορισμό των ανθρώπινων MSCs [85]:

1. Προσκόλληση σε πλαστική επιφάνεια υπό πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας.
2. Έκφραση των μορίων επιφανείας CD105, CD73 και CD90, με ταυτόχρονη απουσία CD45, CD34, CD14 ή CD11b, CD79α ή CD19, καθώς και HLA-DR.
3. Ικανότητα *in vitro* διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροβλάστες.

Η θεραπευτική δράση των MSCs βασίζεται κυρίως στην ικανότητά τους για μετανάστευση σε φλεγμονώδεις ή τραυματισμένους ιστούς, καθοδηγούμενη από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και από μόρια [86]. Επίσης διαθέτουν δυνατότητα μετατροπής σε κύτταρα μεσεγγχυματικής προέλευσης, (οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα τενοντοκύτταρα), αλλά και άλλων βλαστικών στοιβάδων (νευρώνες, ηπατοκύτταρα και καρδιοκύτταρα), το οποίο έχει τεκμηριωθεί εκτενώς *in vitro* μέσω εξειδικευμένων πρωτοκόλλων καλλιέργειας [87, 88]. Παράλληλα, τα MSCs εμφανίζουν έντονη ανοσορυθμιστική δράση, καταστέλλοντας την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό ανοσοκυττάρων και ενισχύοντας την παραγωγή των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (Regulatory T cells, Tregs) [89]. Τα MSCs δρουν κυρίως μέσω παρακρινών μηχανισμών, ασκώντας αντιαποπτωτική και κυτταροπροστατευτική δράση, με ενίσχυση της επιδιόρθωσης του Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ (Deoxyribonucleic acid, DNA) αναστολή της μιτοχονδριακής απόπτωσης και αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας [90]. Παράλληλα, προάγουν τη νεοαγγειογένεση μέσω έκκρισης αγγειογενετικών παραγόντων, βελτιώνοντας τη θρέψη και την αποκατάσταση των ιστών [91].

3.3 Μεσεγχυματικά κύτταρα απομονωμένα από λιπώδη ιστό (Adipose- Derived Stem Cells, ADMSCs ή Adipose Stem Cells, ASCs)

Τα ASCs αποτελούν μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον λιπώδη ιστό (Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Adipose Tissue, AT-MSCs). Διαθέτουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών, με τη σημαντική διαφορά ότι τα BMSCs είναι περιορισμένα σε αριθμό και η συλλογή τους απαιτεί περιπλοκότερες και εργώδεις διαδικασίες. Αντίθετα, ο λιπώδης ιστός συνιστά άφθονη, εύκολα προσβάσιμη και κλινικά εφικτή πηγή μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, με ελάχιστο επεμβατικό φορτίο και χαμηλό κίνδυνο για τον δότη κατά τη διαδικασία συλλογής. Τα πλεονεκτήματα αυτά έχουν συμβάλλει ουσιαστικά στην ανάπτυξη και εντατικοποίηση της έρευνας για την αξιοποίηση των ASCs στην αναγεννητική ιατρική και ειδικότερα στη θεραπευτική αντιμετώπιση της εκφυλιστικής νόσου του μεσοσπονδύλιου δίσκου. [92].

Ο λιπώδης ιστός αντιστοιχεί περίπου στο 20–30% της συνολικής μάζας σώματος, ανάλογα με το φύλο, τη σωματική διάπλαση και τη μυϊκή μάζα, και διακρίνεται σε δύο κύριους τύπους: τον καφέ και τον λευκό λιπώδη ιστό, οι οποίοι παρουσιάζουν διακριτά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά [93].

Ο καφέ λιπώδης ιστός αποτελείται από πολύχρωμα λιποκύτταρα με πλούσια αγγείωση και υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια, εντοπίζεται κυρίως σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές και συμμετέχει καθοριστικά στη θερμογένεση. Αντίθετα, ο λευκός λιπώδης ιστός κυριαρχεί στον ενήλικο οργανισμό, αποτελείται από μονοχωρικά λιποκύτταρα και λειτουργεί ως κύρια αποθήκη ενέργειας του σώματος [94].

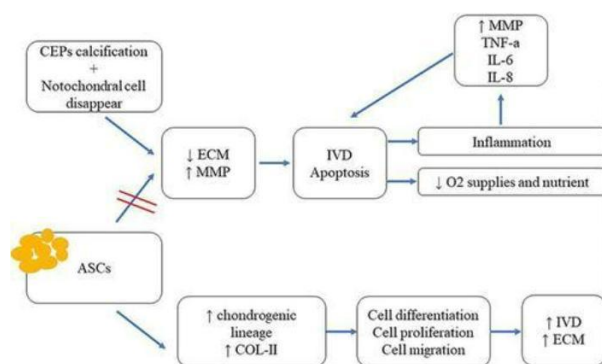
3.3.1 Η εφαρμογή των ADMSCs ως βιολογική θεραπεία στην εκφυλιστική νόσο του ΜΣΔ

Η χρήση των ASCs αποτελεί μία από τις πιο υποσχόμενες προσεγγίσεις στην κυτταρική θεραπεία του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου, συνδυάζοντας υψηλή προσβασιμότητα, χαμηλή νοσηρότητα της δότηρας περιοχής και ισχυρό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, πλεονεκτήματα που τα καθιστούν ανώτερα έναντι των BMSCs [95]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ASCs παρουσιάζουν ικανότητα

διαφοροποίησης προς κυτταρικούς τύπους που προέρχονται από όλες τις εμβρυϊκές στιβάδες, συμπεριλαμβανομένων εκτοδερμικών, ενδοδερμικών και μεσοδερμικών κυττάρων [96], γεγονός που αναδεικνύει την πλαστικότητα τους. Εφόσον προέρχονται από το μεσόδερμα, η διαφοροποίηση σε αδιπογενή, χονδρογενή και οστεογενή κύτταρα θεωρείται αναμενόμενη και ιδιαίτερα σχετική με την αποκατάσταση του ΜΣΔ [97].

Πλήθος ερευνητικών δεδομένων έχει καταδείξει ότι τα ASCs ενισχύουν την αναγέννηση του εκφυλισμένου δίσκου μέσω χονδρογενούς διαφοροποίησης και αυξημένης σύνθεσης αγγρεκάνης και κολλαγόνου τύπου II [98]. Η αλληλεπίδρασή τους με τοπικά χονδροκύτταρα ή ιστοτεμάχια χόνδρου σε περιοχές βλάβης αποτελεί κομβικό μηχανισμό επιτυχίας. Σε μοριακό επίπεδο, η αυξημένη έκφραση των γονιδίων COL2A1 (τύπου ΙΑ/ΙΙΒ) και αγγρεκάνης σχετίζεται με την εξέλιξη των ASCs προς χονδρογενή φαινότυπο, εύρημα που έχει παρατηρηθεί τόσο σε συγκαλλιέργειες με κύτταρα του πηκτοειδούς πυρήνα (NP cells) όσο και σε καλλιέργειες με υδρογέλη κολλαγόνου τύπου II [99]. Το κολλαγόνο τύπου II λειτουργεί ως κατάλληλο υπόστρωμα σύνδεσης και δημιουργεί ευνοϊκό μικροπεριβάλλον, που υποστηρίζει ή επάγει χονδρογενή διαφοροποίηση.

Επιπλέον, η καλλιέργεια των ASCs in vitro με TGF- β 3 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά την παραγωγή της ECM, ενώ η επαγωγή τους με TGF- β 1, GDF-5 ή GDF-6 οδηγεί σε ανώτερη διαφοροποίηση προς κύτταρα τύπου ΙΙΙ συγκριτικά με τα BMSCs, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ECM συστατικών, όπως οι σουλφωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (sGAGs) και το κολλαγόνο τύπου II [100]. Πέραν της διαφοροποίησης, τα ASCs επιδρούν θεραπευτικά και μέσω παρακρινών μηχανισμών, εκκρίνοντας κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. VEGF), οι οποίοι προάγουν την αναγέννηση και την αγγειογένεση στο μικροπεριβάλλον του δίσκου [98].



Εικόνα 1. Ο μηχανισμός εκφύλισης του ΜΣΔ και η αναγεννητική δράση των ASCs στον δίσκο και την ECM.

Romaniyanto, F., Mahyudin, F., Prakoeswa, C. R. S., Notobroto, H. B., Tinduh, D., Ausrin, R., Rhatomy, S. (2022). Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) for Regeneration of Intervertebral Disc Degeneration: Review Article. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 15, 67–76.

3.3.2 Κλινικές και πειραματικές μελέτες σε ζώα

Το 2010, οι Hoogendoorn et al. και οι Zhang J et al., σε ζωικά μοντέλα εκφύλισης σε ΜΣΔ, πραγματοποιήθηκε ενδοδισκική έγχυση ASCs, με τα αποτελέσματα να δείχνουν επιβράδυνση του ρυθμού μείωσης του δισκικού ύψους, καθώς και αποκατάσταση της έντασης του σήματος στη μαγνητική τομογραφία. Τα βλαστοκύτταρα αυτά εμφάνισαν ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα τύπου ΙΙΙ και παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας σε ανιονικές πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνο τύπου ΙΙ και αγγρεκάνη. [99, 101].

Μία μελέτη του 2020 αξιολόγησε τις επιδράσεις των ADMSCs που είχαν προ-ενεργοποιηθεί με ματριλίνη-3 (matrilin-3-primed ADMSCs) στην αποκατάσταση του εκφυλισμένου δίσκου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε μοντέλο εκφύλισης δίσκου σε κουνέλια. Η μελέτη στόχευε στη διερεύνηση της βέλτιστης συγκέντρωσης και διάρκειας προ- ενεργοποίησης, καθώς και στη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου παραγωγής ADMSCs. Η προ-ενεργοποίηση με 10 ng/mL ματριλίνης-3 για 5 ημέρες οδήγησε στη μεγιστοποίηση της έκφρασης mRNA κολλαγόνου τύπου ΙΙ και

αγγρεκάνης *in vitro*, ενώ παράλληλα προήγαγε αυξημένη έκκριση ευνοϊκών αυξητικών παραγόντων [TGF-β1, TGF-β2, IL-10, παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF0, MMP-1] και μείωση υπερτροφικών συστατικών της ECM. Η εμφύτευση των προ-ενεργοποιημένων ADMSCs σε μορφή σφαιροειδών σε κουνέλια συσχετίστηκε με βέλτιστη αποκατάσταση του εκφυλισμένου δίσκου. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η προ-ενεργοποίηση των MSCs με ματριλίνη-3 και η χρήση σφαιροειδών μπορεί να αποτελέσουν ιδιαίτερα αποτελεσματική στρατηγική για την υπέρβαση των περιορισμών που σχετίζονται με τη χρήση των MSCs στη θεραπεία της εκφύλισης του ΜΣΔ [102].

Το 2006 οι Haufe et al. πραγματοποίησαν προοπτική ανάλυση σε 10 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ενδοδισκική έγχυση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Παρά τα θετικά αποτελέσματα πειραματικών μελετών σε ζώα, που υποστήριζαν τη δυνατότητα αναγέννησης του δίσκου μέσω HSCs, κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίασε σημαντική βελτίωση στα συμπτώματα οσφυαλγίας δισκογενούς αιτιολογίας στους επανελέγχους στους 6 μήνες και στον 1 χρόνο μετά την έγχυση [103]. Συνολικά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πολυκεντρικές κλινικές μελέτες, ενώ οι υπάρχουσες περιλαμβάνουν μικρού μεγέθους δείγματα ασθενών. Επιπλέον, τα ερευνητικά πρωτόκολλα ποικίλουν σημαντικά ως προς τα κριτήρια ένταξης, τις πηγές MSCs, τις μεθόδους μεταμόσχευσης και τις συνθήκες παρακολούθησης [104].

Παρά τα ενθαρρυντικά δεδομένα για τα βλαστοκύτταρα στη θεραπεία της εκφύλισης του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Intervertebral Disc Degeneration, IDD), υπάρχουν και μελέτες που αναδεικνύουν αδυναμίες και περιορισμούς. Κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι η έγχυση κυττάρων σε δόσεις μεγαλύτερες από το φυσιολογικό εύρος δε βελτιώνει την εκφύλιση και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικά αποτελέσματα [105]. Η τοπική έγχυση υπερβολικού αριθμού κυττάρων μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση, νέκρωση και φλεγμονώδης αντίδραση. Επίσης, ανεπιθύμητη μετανάστευση ή διαρροή από το δίσκο μετά την έγχυση ενδέχεται να οδηγήσει σε αναποτελεσματική θεραπεία και σχηματισμό οστεοφύτων. Τέλος, ο ακατάλληλος χειρισμός κατά τη διαδερμική παρακέντηση μπορεί να προκαλέσει μόλυνση του δίσκου ή δισκίτιδα [101].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η ενδοδισκική έγχυση νεαρών γηρασμένων rADSCs μπορεί αντίστοιχα να βελτιώσει ή να επιταχύνει τη διαδικασία εκφύλισης του ΜΣΔ, συγκριτικά με τους δίσκους της ομάδας ελέγχου. Προκύπτουν οι ακόλουθες ερευνητικές υποθέσεις:

A) Η ιστολογική ανάλυση αναμένεται να απεικονίσει βελτίωση της δομής του δίσκου στην πειραματική ομάδα που έλαβε νεαρά rADSCs, ενώ στην ομάδα που έλαβε γηρασμένα rADSCs προβλέπεται εντονότερη εκφυλιστική εικόνα.

B) Το κολλαγόνο τύπου II, η αγγρεκάνη και το Ki67 αναμένονται να εμφανίζονται αυξημένα στην ομάδα έγχυσης νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένα από λιπώδη ιστό.

Γ) Η πρωτεΐνη p16 αναμένεται αυξημένη στην ομάδα έγχυσης γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένα από λιπώδη ιστό.

4.2 Διαδικασία της μελέτης

Η μελέτη υλοποιήθηκε σε διακριτές φάσεις, με αρχικό στάδιο την προετοιμασία και την επεξεργασία των κυττάρων που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Συγκεκριμένα, διενεργήθηκαν η απομόνωση, η αποθήκευση, η καλλιέργεια και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, το πρωτόκολλο γήρανσης και η προετοιμασία για την έγχυση. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δεκαέξι (16) άσπροι κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας ίδιου βάρους και ηλικίας, οι οποίοι προμηθεύτηκαν από το Εκτροφείο Πειραματόζωων του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Τα πειραματόζωα φιλοξενήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροχειρουργικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνθήκες συμβατές με το θεσμικό πλαίσιο περί πειραματόζωων. Οι κόνικλοι διαβιούσαν ένας ανά κλουβί, με εναλλαγή φωτός- σκότους ανά 12 ώρες, και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες και νερό. Στη

συνέχεια ακολούθησε το πειραματικό χειρουργείο και η ενδοδισκική έγχυση των μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από λιπώδη ιστό, το οποίο έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροχειρουργικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Κατά τη διάρκεια του πειραματικού πρωτοκόλλου απεβίωσαν δύο πειραματόζωα, χωρίς ενδείξεις λοίμωξης, φλεγμονής ή άλλων παθολογικών ευρημάτων που να σχετίζονται με τη χειρουργική επέμβαση ή τη χορηγούμενη παρέμβαση. Ακολούθησε ευθανασία 7 πειραματόζωων την 6η μετεγχειρητική εβδομάδα και των υπόλοιπων 7 κονίκλων την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πρώιμες μορφολογικές και ιστολογικές αλλοιώσεις του δίσκου είναι ανιχνεύσιμες ήδη από την 4η εβδομάδα μετά την πρόκληση της βλάβης, καθιστώντας αυτά τα χρονικά σημεία κατάλληλα για συλλογή δειγμάτων και περαιτέρω ανάλυση [106]. Πραγματοποιήθηκε συλλογή τριών σπονδυλικών μονάδων από κάθε ζώο από το επίπεδο Ο1 έως Ο4. Επομένως, προέκυψαν 38 δείγματα μεσοσπονδύλιων δίσκων, 17 δίσκοι την 6^η μετεγχειρητική εβδομάδα και 21 δίσκοι την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Η επιλογή των κονίκλων για την μέρα θανάτωσης έγινε τυχαία (Πίνακας 1). Τα δείγματα κατανεμήθηκαν σε τρεις ομάδες:

- **Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου (n=14):** εκφύλιση δίσκου και έγχυση θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας.
- **Ομάδα Β (n=18):** εκφύλιση δίσκου και ενδοδισκική έγχυση νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό.
- **Ομάδα Γ (n=6):** εκφύλιση δίσκου και ενδοδισκική έγχυση γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό

Μετά τη συλλογή πραγματοποιήθηκε η ιστολογική μελέτη των δειγμάτων για την εκτίμηση και τη διαβάθμιση μορφολογικών αλλοιώσεων εκφύλισης και πιθανής ανάπλασης του δίσκου. Ακολούθησε η ανοσοϊστοχημική μελέτη των δεικτών: Κολλαγόνο τύπου ΙΙ, την αγγρεκάνη, την πρωτεΐνη/ δείκτη p16 και τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67. Οι παραπάνω διαδικασίες έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η αξιολόγηση των ευρημάτων έγινε τυφλά, ώστε να επιτευχθεί αντικειμενική σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των ομάδων και τεκμηρίωση πιθανής αποδόμησης συστατικών του πηκτοειδούς πυρήνα ή επαγωγικής/κατασταλτικής δράσης των υπό μελέτη παραγόντων.

Πίνακας 1. Τα δείγματα των μεσοσπονδύλιων δίσκων κατανεμήθηκαν σε τρεις ομάδες. Στην Ομάδα Α/ Ομάδα ελέγχου (n=14 δίσκοι), πραγματοποιήθηκε έγχυση θρεπτικού υλικού σε δεκατέσσερις (14) ΜΣΔ. Στην Ομάδα Β (n=18 δίσκοι), εγχύθηκαν νεαρά μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από λιπώδη ιστό, ενώ στην Ομάδα Γ (n=6 δίσκοι) εγχύθηκαν γηρασμένα μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από λιπώδη ιστό.

Δισκικές Ομάδες	Νο Δίσκων	Διεργασία μετά την εκφύλιση του ΜΣΔ
Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου	14	Έγχυση θρεπτικού υλικού
Ομάδα Β	18	Έγχυση νεαρών rADSCs
Ομάδα Γ	6	Έγχυση γηρασμένων rADSCs

4.3 Προετοιμασία Κυττάρων

Όλες οι προπαρασκευαστικές πειραματικές διαδικασίες από την απομόνωση μέχρι και το μοριακό χαρακτηρισμό των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

1. Διατήρηση Άσηπτων Συνθηκών

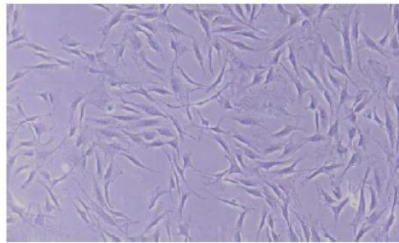
Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, ο χώρος των κυτταροκαλλιεργειών αποστειρώθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία (Ultraviolet, UV) για τουλάχιστον 15-20min, ενώ για την τοπική αποστείρωση περιορισμένης επιφάνειας, καθώς και την αποστείρωση των υλικών που εισέρχονται στο θάλαμο νηματικής ροής χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v). Τα επιμέρους ανάλωσιμα υλικά που ήταν απαραίτητα για την πειραματική διαδικασία αποστειρώθηκαν με την κατάλληλη μέθοδο αποστείρωσης ανά περίπτωση, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- i. Χρήση υγρής αποστείρωσης διαλυμάτων ανθεκτικών στη θερμότητα όπως η θρυψίνη, ανθεκτικών πλαστικών (ακροφύσια πιπετών), γυάλινων αναλώσιμων και νερού στους 121°C. Υπό τις συνθήκες αυτές πραγματοποιείται η νέκρωση του μεγαλύτερου ποσοστού μικροοργανισμών και των σπορίων τους.
- ii. Χρήση ξηρής θερμότητας σε θερμοκρασία 180 °C για μιάμιση ώρα για μεταλλικά εργαλεία, βελόνες και σύριγγες, προκαλώντας βραδεία οξείδωση των πρωτεϊνών των μικροβίων.
- iii. Αποστείρωση θερμοευαίσθητων διαλυμάτων με διήθηση χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα φίλτρα νιτροκυτταρίνης με πόρους διαμέτρου 0,2μm που αποτρέπουν τη διέλευση βακτηρίων.
- iv. Αποστείρωση επιφανειών με UV επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο επαγωγή κυτταρικής βλάβης σε γονιδιακό επίπεδο και στη συνέχεια παρεμπόδιση του σωστού διπλασιασμού καθώς και της κυτταρικής διαίρεσης.

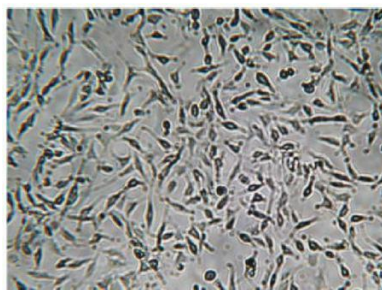
2. Καλλιέργεια Κυττάρων

1) Κυτταρική σειρά

Πρόκειται για μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από λιπώδη ιστό κονίκλου (Εικόνα 1) και φυλάσσονταν στην Τράπεζα Κυττάρων του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Στην Εικόνα 2 φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων πηκτοειδούς πυρήνα ΜΣΔ κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 1. Φωτογραφία μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων λιπώδους ιστού κουνελιού με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων.



Εικόνα 2. Μορφολογία κυττάρων ηπατοειδούς πυρήνα ΜΣΔ κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Τα κύτταρα στην εικόνα είναι προσκολλημένα στο τρυβλίο της καλλιέργειας.

Βήματα επεξεργασίας κυττάρων:

- i. Απομόνωση κυττάρων,
- ii. Αποθήκευση κυττάρων,
- iii. Καλλιέργεια και πολλαπλασιασμός κυττάρων,
- iv. Εκτίμηση της πολυδύναμης διαφοροποιητικής ικανότητας των κυττάρων
- v. Πρωτόκολλο γήρανσης,
- vi. Χαρακτηρισμός νεαρών και γηρασμένων κυττάρων σε μοριακό επίπεδο
- vii. Μέτρηση και υπολογισμός απαραίτητου αριθμού κυττάρων για την έγχυση
- viii. Προετοιμασία κυττάρων για έγχυση.

i. Απομόνωση κυττάρων:

Η διαδικασία απομόνωσης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με αφαίρεση του λίπους από τους κόνικλους και τεμαχισμό του ιστού σε θάλαμο νηματικής ροής πάντοτε υπό στείρες συνθήκες και με τη χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων.

Ακολούθησε κατεργασία του ιστού με διάλυμα κολλαγονάσης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) σε θρεπτικό υλικό (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) υπό συνεχή ήπια ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα έως ότου διασπαστεί η εξωκυττάρια μήτρα και απελευθερωθούν τα κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (500 g, 10 min, θερμοκρασία δωματίου), απομάκρυνση του υπερκείμενου και συλλέχθηκαν τα προϊόντα της πέψης και τα κύτταρα που ήταν εναποτεθειμένα στο ίζημα. Μετά την επαναιώρησή του σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με πενικιλίνη 100 U/ml, στρεπτομυκίνη 100 µg/ml (Biosera, Nuaille, Γαλλία) και 10% (v/v) ορό εμβρυϊκού μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) (από τη Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, Ηνωμένο Βασίλειο). Το ίζημα συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων μεταφέρθηκε σε φιάλη καλλιέργειας.

Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στον κλίβανο καλλιέργειας στους 37°C με ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία χωρίς ανακίνηση μέχρι την προσκόλληση των κυττάρων και τη δημιουργία του ταπητίου της πρωτογενούς καλλιέργειας στην επιφάνεια της φιάλης. Ακολούθησαν τουλάχιστον δύο ανακαλλιέργειες χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης- κιτρικού νατρίου- (0,25%, 30%, w/v) όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 90% - 100% της επιφάνειας του πυθμένα της φιάλης. Τέλος τα κύτταρα καταψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε επισημασμένα φιαλίδια σε δοχείο υγρό αζώτου.

Για την υπερωσμωτική επεξεργασία, ένα διάλυμα που περιείχε 5 M NaCl και 0,4 M KCl προστέθηκε στο βασικό μέσο καλλιέργειας (με ωσμωτικότητα 300 mOsm/kg H₂O) [107]. Οι επιθυμητές τελικές ωσμωτικότητες των θρεπτικών μέσων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας αυτόματο κρυοσκοπικό ωσμόμετρο Osmomat 030 (Gonotec, Βερολίνο, Γερμανία) με βάση το σημείο πήξης των διαλυμάτων.

ii. Αποθήκευση κυττάρων

Οι Hayflick και Moorhead διατύπωσαν ότι τα κυτταρικά στελέχη μπορούν να καταψυχθούν στους -196°C για μεγάλο χρονικό διάστημα και έπειτα μπορούν να αποψυχθούν και να επανέλθουν στους 37°C, να καλλιεργηθούν διατηρώντας ακέραιες τις ιδιότητες τους [108]. Για να επιτευχθεί αυτό τα κύτταρα κατεργάζονται και φυλάσσονται σε συγκεκριμένες και σταθερές συνθήκες, ώστε να εξασφαλιστεί η

μέγιστη βιωσιμότητα τους κατά την απόψυξη τους και την επαναφορά τους στην καλλιέργεια.

Για την αποθήκευση των κυττάρων: τα κύτταρα μετά τη θρυψινοποίηση επαναιωρούνταν σε 1,5ml διαλύματος ψύξης [θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS και 10% (v/v) διμέθυλο-σουλφοξείδο (Dimethyl sulfoxide , DMSO)]. Ο ρόλος του DMSO είναι κρυοπροστατευτικός και ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων κατά την ψύξη/ απόψυξη. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε αποστειρωμένη πλαστική αμπούλα, η οποία κλείνει ερμητικά και ψύχεται σταδιακά με σκοπό να προστατεύονται τα κύτταρα από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, 1h στους -20°C έπειτα από 24h στους -80 °C και τέλος βύθιση της αμπούλας εντός υγρού αζώτου στους -196 °C σε δεξαμενή. Η απόψυξη γίνεται ταχέως από τους -80 °C έως 0 °C και η αμπούλα με το περιεχόμενο της να μεταφέρεται σε τρυβλίο ή φιάλη καλλιέργειας με DMEM εμπλουτισμένο με FBS. Το επόμενο εικοσιτετράωρο πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας σε νέο πλήρες θρεπτικό υλικό για να απομακρυνθούν τα ίχνη του DMSO.

iii. Ανακαλλιέργεια και πολλαπλασιασμός κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης-κιτρικού νατρίου (0.25%, 0.30%, w/v), πριν τα κύτταρα ξεπεράσουν σε κάλυψη το 90% του πυθμένα φιάλης/τρυβλίου καλλιέργειας. Αρχικά χρησιμοποιούνταν αποστειρωμένη πιπέτα παστέρ, γινόταν αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού της φλάσκας και έκπλυση της επιφάνειας των κυττάρων από υπολείμματα ορού που περιέχει αναστολείς θρυψίνης. Μετά την αναρρόφηση του διαλύματος θρυψίνης ακολουθούσε η προσθήκη 3,5ml διαλύματος θρυψίνης- κιτρικού νατρίου με σκοπό την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας που καταλάμβανε η καλλιέργεια των κυττάρων. Η φλάσκα τοποθετούνταν στον κλίβανο για 2-3 min μέχρις ότου να είναι εμφανής η μορφολογική αλλαγή των κυττάρων μετά από μικροσκοπικό έλεγχο. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα άρχιζαν να στρογγυλοποιούνται και να συρρικνώνονται με έντονο το περίγραμμα της πλασματικής τους μεμβράνης επομένως άρχιζαν να αποκολλώνται από τον πυθμένα, γινόταν αναρρόφηση της περίσσειας της θρυψίνης. Έπειτα από τη μηχανική αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας ακολουθούσε μικροσκοπική παρατήρηση της κίνησής τους.

Τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 10ml DMEM με 10 % FBS και γινόταν ανακαλλιέργεια με λόγο $\frac{1}{2}$ ή $\frac{1}{4}$. Τέλος οι φλάσκες τοποθετούνταν και διατηρούνταν στον κλίβανο επώασης στους 37 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η επόμενη ανακαλλιέργεια.

iv. Εκτίμηση της πολυδυναμικής διαφοροποιητικής ικανότητας των απομονωμένων από το λιπώδη ιστό κονίκλων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων (rabbit adipose-derived stem cells, rADCs)

Η ικανότητα των απομονωμένων από το λιπώδη ιστό κονίκλων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων για χονδρογενετική, λιπογενετική και οστεογενετική διαφοροποίηση αξιολογήθηκε [109]. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% (v/v) εμβρυϊκό ορό βοός (FBS) σε πλάκες 12 θέσεων, πριν την αντικατάσταση του μέσου καλλιέργειας με τα αντίστοιχα θρεπτικά υλικά διαφοροποίησης StemPro® για χονδρογένεση, λιπογένεση ή οστεογένεση (Gibco BRL), όταν τα κύτταρα έφτασαν περίπου 80% πληρότητα (confluency).

Τα κύτταρα επώαστηκαν είτε με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης είτε με DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS (το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας), για 7 ημέρες, με αλλαγή του μέσου κάθε 2 ημέρες, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στο τέλος της περιόδου επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% (v/v) (Sigma-Aldrich) και πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες χρώσεις Alcian Blue, Oil Red O και Alizarin Red S για την εκτίμηση της χονδρογενετικής, λιπογενετικής και οστεογενετικής ικανότητας των κυττάρων, αντίστοιχα.

Χρώση με Alcian Blue:

Μετά από έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS δύο φορές, τα κύτταρα επώαστηκαν με τη χρωστική ουσία Alcian Blue 1% (w/v) σε 0.1 N HCl για 30 λεπτά, εκπλύθηκαν τρεις φορές με 0.1 N HCl και μία φορά με απεσταγμένο νερό. Η χρωστική Alcian Blue εκχυλίστηκε με 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη (Sigma-Aldrich) και η περιεκτικότητα σε γλυκοζαμινογλυκάνες προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 620 nm.

Χρώση με Oil Red O:

Τα κύτταρα επώαστηκαν με ισοπροπανόλη 60% (v/v) για 5 λεπτά και στη συνέχεια επισημάνθηκαν με διάλυμα Oil Red O [3 μέρη διαλύματος χρωστικής (300 mg Oil Red O σε 100 ml ισοπροπανόλης 99% v/v) και 2 μέρη νερού] (όλα από τη Sigma-Aldrich) για 5 λεπτά, ενώ ακολούθησε προσεκτική έκπλυση με νερό. Η χρωστική Oil Red O εκχυλίστηκε σε ισοπροπανόλη και μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 550 nm.

Χρώση με Alizarin Red S:

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με απεσταγμένο νερό, επισημάνθηκαν με διάλυμα Alizarin Red S 2% (w/v) (Sigma-Aldrich) (pH 4,2) για 5 λεπτά και εκπλύθηκαν τρεις φορές με απεσταγμένο νερό. Η εκχύλιση της χρωστικής έγινε με διάλυμα 10% (w/v) χλωριούχου σετυλοπυριδινίου (cetylpyridinium chloride, Sigma-Aldrich) σε 10 mM φωσφορικό νάτριο (pH 7,0), και η περιεκτικότητα σε ασβέστιο προσδιορίστηκε με μέτρηση απορρόφησης στα 560 nm.

Τα επισημασμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο ECLIPSE Ts2 (Nikon, Τόκιο, Ιαπωνία) και φωτογραφήθηκαν χρησιμοποιώντας κάμερα μικροσκοπίας και λογισμικό λήψης εικόνας της Basler (Ahrensburg, Γερμανία), ενώ όλες οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοποίησης Spark Tecan (Tecan Trading AG, Ελβετία).

v. Πρωτόκολλο Γήρανσης

α) Πρόκληση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από έκθεση σε γ- ακτινοβολία.

Για την επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης, νεαρά rADSCs εκτέθηκαν σε δόση γ-ακτινοβολίας περίπου 50 Gray (Gy) από πηγή κοβαλτίου-60 (60 Cobalt, Co) (Gamma Chamber 4000A, Isotope Group, Bhadha Atomic Research Company, Trombay, Bombay, India) με ρυθμό ακτινοβολήσης 3Gy/min. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 2-3 ανακαλλιέργειες έως ότου εκδηλωθεί ο φαινότυπος της γήρανσης, ο οποίος επιβεβαιώθηκε από το χαμηλό ποσοστό κυττάρων που ενσωματώνουν βρωμοδεοξουριδίνη (<5%) και τη θετική χρώση Senescence-Associated β-Galactosidase (SA-β-Gal).

β) Χαρακτηρισμός γηρασμένων κυττάρων

I) Χαρακτηριστική χρώση β- γαλακτοσιδάσης γηρασμένων κυττάρων SA-β-Gal.

Η χρώση της β- γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταρικής γήρανσης και βασίζεται στην ικανότητα των γηρασμένων κυττάρων να υδρολύουν τον X-γαλακτοζίτη (X-gal) σε pH=6,0. Η αντίδραση αποδίδει προϊόν μπλε χρώματος σε μεγαλύτερη ένταση και έκταση στο κυτταρόπλασμα γηραμένων κυττάρων σε σύγκριση με τα νεαρά.

Τα κύτταρα που υπέστησαν γήρανση λόγω στρες όπως και τα αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα είναι και αυτά θετικά στη χρώση SA-β-Gal. Η διαδικασία της χρώσης β- γαλακτοσιδάσης έχει ως εξής:

Τα κύτταρα επιστρώνονταν σε τρυβλία που περιείχαν αποστειρωμένες καλυπτίδες σε 2mL θρεπτικού υλικού παρουσία FBS με λόγο κατανομής τέτοιο ώστε να προκύψουν διάσπαρτες καλλιέργειες. Η μονιμοποίηση γινόταν με διάλυμα φορμαλδεΐδης 3% (v/v) σε ρυθμισμένο με φωσφορικά διάλυμα (Phosphate-Buffered Saline, PBS), για 5 λεπτά και ακολουθούσε έκπλυση 2 φορές με 2 mL PBS/τρυβλίο. Στη συνέχεια, τα μονιμοποιημένα κύτταρα επωάζονταν με το διάλυμα χρώσης SA-β-Gal [ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM κιτρικού οξέος/φωσφορικού νατρίου pH 6,0, 5 mM φερροκυανιούχου καλίου, 150mM χλωριούχου νατρίου και 2 mM χλωριούχου μαγνησίου, που περιείχε 1 mg/ml 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδοϋλ β-D-γαλακτοζίτη (X-Gal)] για 16-48 ώρες, σε σταθερές συνθήκες υγρασίας, στους 37°C, απουσία CO₂. Η αντίδραση τερματιζόταν με την απομάκρυνση του διαλύματος χρώσης και την αντικατάστασή του από διάλυμα PBS και τα κύτταρα παρατηρούνταν στο οπτικό μικροσκόπιο. Η θετική χρώση των γηρασμένων κυττάρων παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο ECLIPSE Ts2 εξοπλισμένο με κάμερα μικροσκοπίας Basler και το αντίστοιχο λογισμικό απεικόνισης.

II) Ανοσοφθορισμός για την εκτίμηση ενσωμάτωσης BrdU

Για την ανίχνευση κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή στη φάση σύνθεσης νέου DNA χρησιμοποιείται ένα ανάλογο της θυμιδίνης, η 5-βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU). Πραγματοποιείται προσθήκη της in vitro σε περίσσεια επιτυγχάνοντας έτσι την ενσωμάτωσή της στο νεοσυντιθέμενο DNA των κυττάρων που αντιγράφονται, στη θέση της θυμιδίνης. Τα

κύτταρα που την ενσωμάτωσαν είναι στη συνέχεια εφικτό να ανιχνευθούν με ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντίσωμα έναντι της BrdU.

Για το πείραμα εκτίμησης της ενσωμάτωσης BrdU στον πυρήνα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων αρχικά επιστρώνονταν μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα λιπώδους ιστού κουνελιού σε DMEM εμπλουτισμένο με ορό (10% FBS) επάνω σε γυάλινη αποστειρωμένη καλυπτρίδα και επώζονταν στους 37°C για 24 h. Ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος BrdU συγκέντρωσης 50 μ M για 48 h στους 37°C. Έπειτα, πραγματοποιούνταν μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% (v/v) σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν δύο εκπλύσεις με PBS και επώαση με διάλυμα Triton X-100 0.2% (v/v) σε PBS για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν άλλες δύο εκπλύσεις με PBS και επώαση με διάλυμα 2 N HCl σε PBS για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γινόταν επώαση διάρκειας 30 min με διάλυμα ζελατίνης 0.5% (v/v) σε PBS για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πριν από την προσθήκη αντισώματος anti-BrdU-FITC. Τα δείγματα επώζονταν προφυλαγμένα από το φως στους 4°C για 16 h. Τα δείγματα παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan 2 (Zeiss, Jena, Germany) μετά από την επισήμανση και των πυρήνων με 2 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) σε PBS για 15 λεπτά. Η λήψη εικόνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Ocular Image Acquisition Software (QImaging, BC, Canada).

vi. Χαρακτηρισμός νεαρών και γηρασμένων κυττάρων σε μοριακό επίπεδο

α) MTT assay

Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας των rADSCs πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου βρωμίδιο (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT), όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως [110]. Συνοπτικά, το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων αφαιρέθηκε και προστέθηκε διάλυμα που περιείχε 1 mg/mL MTT σε μέσο DMEM χωρίς ορό και χωρίς ερυθρό της φαινόλης (PAN-Biotech, Aidenbach, Γερμανία). Οι κρύσταλλοι φορμαζανίου που σχηματίστηκαν μετά από επώαση 4 ωρών διαλυτοποιήθηκαν σε ισοπροπανόλη και η οπτική πυκνότητα στα 550 nm μετρήθηκε σε φωτόμετρο για

πλάκες μικροτιτλοποίησης FLUOstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Γερμανία). Το ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας υπολογίστηκε διαιρώντας τις τιμές OD₅₅₀ των κυττάρων που επωάστηκαν με τα θρεπτικά μέσα υψηλών τιμών ωσμωτικότητας με τις αντίστοιχες τιμές των κυττάρων ελέγχου (κύτταρα που επωάστηκαν σε ισοοσμωτικές συνθήκες).

β) Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, τα rADSCs συλλέχθηκαν μέσω τρυψινοποίησης, εκπλύθηκαν μία φορά με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 50% (v/v) παγωμένη αιθανόλη. Στη συνέχεια, επισημάνθηκαν με 50 µg/ml ιωδιούχο προπιδιο (PI) (Sigma) παρουσία 5 mM χλωριούχου μαγνησίου και 10 µg/ml RNase A (Sigma). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρηστή ροής Cytomics FC500 με το λογισμικό CXP System Software (Beckman Coulter, Brea, CA, ΗΠΑ). Η ανάλυση και απεικόνιση των ιστογραμμάτων του κυτταρικού κύκλου έγινε με τα λογισμικά **Modfit** (Verity Software House, Topsham, ME, ΗΠΑ) και **FCS Express** (De Novo Software, Los Angeles, CA, ΗΠΑ), αντίστοιχα.

γ) Western blot ανάλυση

Πραγματοποιήθηκαν η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών και η ανάλυση western blot [111]. Ειδικότερα, τα κυτταρικά λύματα των rADSCs συλλέχθηκαν με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Laemmli εμπλουτισμένου με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (Sigma). Τα απομονωμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες PVDF (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Γερμανία). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι:

- phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), p38 MAPK
- phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), SAPK/JNK
- **phospho-p53 (Ser15)** (Cell Signaling Technology, Hertfordshire, UK)
- **phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), panERK, p21^{WAF1}** (BD Transduction Laboratories, Bedford, MA, USA)

- **p16^{INK4a}** (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- **α -tubulin** (ως δείκτης ισοφόρτωσης, από τη Sigma)

Τα δευτερογενή αντισώματα IgG συζευγμένα με HRP προμηθεύτηκαν επίσης από τη Sigma. Τα ανοσοσυμπλέγματα ανιχνεύθηκαν με το υπόστρωμα ECL **Immobilon Crescendo Western HRP substrate** (Merck Millipore).

vii. Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer. Στο στάδιο της επαναιώρησης των κυττάρων κατά την ανακαλλιέργεια, λαμβάνεται ποσότητα 10 μ l και μεταφέρεται στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ο συγκεκριμένος όγκος κυτταρικού εναιωρήματος καλύπτει τέσσερα τεταρτημόρια του αιμοκυτταρομέτρου, με το καθένα από αυτά να έχει χωρητικότητα 10⁻⁴mL. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο και υπολογίζεται ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων στα 4 τεταρτημόρια. Στη συνέχεια, ο μέσος όρος πολλαπλασιάζεται με 10⁴ για να γίνει η αναγωγή του κυτταρικού αριθμού στο 1mL εναιωρήματος.

Βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η διάκριση και καταμέτρηση μόνο των ακέραιων κυττάρων και όχι κυτταρικών υπολειμμάτων ή άλλων σωματιδίων που μπορεί να έχουν συμπαρυσθεί στο κυτταρικό εναιώρημα.

viii. Προετοιμασία κυττάρων με σκοπό την έγχυση τους στο μεσοσπονδύλιο δίσκο των κονίκλων

Σε ένα χρονικό διάστημα ενός μήνα πριν την έναρξη των πειραματικών χειρουργειών πραγματοποιήθηκε απόψυξη νεαρών κυττάρων με σκοπό την εφαρμογή του πρωτοκόλλου επαγωγής κυτταρικής γήρανσης έπειτα από έκθεση τους σε ιονίζουσα ακτινοβολία και να αποκτηθεί ικανοποιητικός αριθμός νεαρών και γηρασμένων κυττάρων για το πείραμα. Ο χαρακτηρισμός των γηρασμένων κυττάρων έγινε με τις δύο μεθόδους που προαναφέρθηκαν. Οι ανακαλλιέργειες έγιναν σε φιάλες καλλιέργειας επιφάνειας 75 cm², για την αποφυγή μολύνσεων και προκειμένου να μπορούν τελικά τα κύτταρα να μεταφερθούν με ασφάλεια οδικώς από το Εργαστήριο

Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» στο Εργαστήριο Ιωαννίνων όπου ακολούθησαν οι θρυψινοποιήσεις και η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού. Συγκεκριμένα, είκοσι φιάλες καλλιέργειας με νεαρά και γηρασμένα rADSCs μεταφέρθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή σε ειδικό εργαστήριο με σκοπό τη θρυψινοποίηση, επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (απουσία FBS) και μέτρηση του κυτταρικού αριθμού των νεαρών και γηρασμένων κυττάρων ανά φιάλη καλλιέργειας προκειμένου να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων από κάθε κατηγορία που απαιτούνταν για την έγχυση στους κονίκλους. Στη συνέχεια, ο κατάλληλος όγκος με τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωληνάριο, ακολούθησε φυγοκέντρηση (500g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου). Τέλος το ίζημα επαναιωρήθηκε σε όγκο θρεπτικού υλικού DMEM (απουσία FBS) με σκοπό να εξασφαλιστεί ο επιλεγμένος αριθμός κυττάρων ανά ΜΣΔ (10^6 κύτταρα σε 100 μ L διαλύματος ανά ΜΣΔ).



Εικόνα 3. Σύριγγες περιέχουσες κύτταρα προετοιμασμένα για έγχυση. Οι σύριγγες διατηρήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας σε ισοθερμικό περιβάλλον κατά τη μεταφορά, προκειμένου να διατηρηθεί η βιωσιμότητα και η λειτουργικότητα των κυττάρων έως τη στιγμή της χορήγησης.

4.4 Πειραματικό Χειρουργείο

Τα πειραματικά χειρουργεία πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροχειρουργικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό αυστηρά άσχηπτες συνθήκες.

Οι κόνικλοι τοποθετήθηκαν σε πλάγια πρηνή θέση (lateral prone position) και έλαβαν γενική αναισθησία με ενδομυϊκή ένεση 3ml μιδαζολάμης (Dormicum), 40mg/kg κεταμίνης και 5mg/kg ξυλαζίνης. Ακολούθησε κατάλληλη προετοιμασία και αντισηψία του δέρματος και του χειρουργικού πεδίου (Εικόνα 4). Με πλάγια οπισθοπεριτοναϊκή προσπέλαση (lateral retroperitoneal approach), (Εικόνα 5), αναγνωρίστηκε η οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και με προσοχή παρασκευάστηκε και αποκαλύφθηκε το επιθυμητό επίπεδο των οσφυϊκών σπονδύλων και οι αντίστοιχοι ΜΣΔ (Εικόνα 6). Στη συνέχεια προκλήθηκε καταστροφή- εκφύλιση του δίσκου με την εισαγωγή βελόνης διαμέτρου 25G και σε βάθος νυγμού 5mm σε αυτόν. Η βελόνη εισερχόταν δύο φορές για πέντε δευτερόλεπτα δια του ινώδους δακτυλίου στον πηκτοειδή πυρήνα σύμφωνα με την τεχνική που έχει περιγραφεί από τους Koichi Masuda et al. [112], οι οποίοι τεκμηρίωσαν επαρκώς το μοντέλο της εκφύλισης του δίσκου με παρακέντηση του ινώδους δακτυλίου σε κόνικλους (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, σε κάθε κόνικλο οι ΜΣΔ παρακεντήθηκαν με μία από τις τρεις διαφορετικές διαμέτρους βελόνας (16G, 18G και 21G). Το βάθος της παρακέντησης ρυθμίστηκε με ακρίβεια στα 5mm και η βελόνα εισήχθη στο κέντρο του δίσκου δια του ινώδους δακτυλίου έως τον πηκτοειδή πυρήνα και διατηρήθηκε στη θέση αυτή για το χρονικό διάστημα των 5 δευτερολέπτων. Αμέσως μετά τη διαδικασία της εκφύλισης πραγματοποιήθηκε ενδοδισκική έγχυση με βελόνη 25G (Εικόνα 8):

- 0,1ml θρεπτικού υλικού σε 14 ΜΣΔ, διαμορφώνοντας την **Ομάδα Α** ή αλλιώς ομάδα ελέγχου (**Control Group**). Ως θρεπτικό υλικό ορίζεται διάλυμα με Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM: θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας] με 20% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) και 10% (v/v) διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO). Το DMSO δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας, ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης και μειώνει τη δημιουργία κρυστάλλων.

- 0,1 ml νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από λιπώδη ιστό κονίκλων σε 18 ΜΣΔ, διαμορφώνοντας την **Ομάδα Β** (Ομάδα νεαρών rADSCs),
- 0,1ml γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από λιπώδη ιστό κονίκλου σε 6 ΜΣΔ, διαμορφώνοντας την **Ομάδα Γ** (Ομάδα γηρασμένων rADSCs) (Πίνακας 1).

Ακολούθησε συρραφή των ιστών κατά στρώματα με απορροφήσιμα ράμματα και δέρματος με μεταλλικά κλιπ. Μετά από σύντομη μετεγχειρητική παρακολούθηση, τα ζώα μεταφέρθηκαν στα κλουβιά τους χωρίς περιορισμούς. Τα χειρουργεία των ζώων, πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαδοχικές ημέρες από τον ίδιο χειρουργό, εξασφαλίζοντας ομοιομορφία στη διαδικασία του πρωτοκόλλου και ακρίβεια στην εκτέλεση της χειρουργικής τεχνικής. Μετεγχειρητικά, οι κόνικλοι παρακολουθούνταν καθημερινά για σημεία σύγχυσης, μετεγχειρητικού πόνου ή φλεγμονής του χειρουργικού τραύματος. Δύο ζώα απεβίωσαν την πρώτη μετεγχειρητική μέρα χωρίς ενδείξεις λοίμωξης, φλεγμονής ή άλλων παθολογικών ευρημάτων που να σχετίζονται με τη χειρουργική επέμβαση ή τη χορηγούμενη παρέμβαση. Δεν παρατηρήθηκαν λοιμώξεις ή διαταραχές πρόσληψης τροφής, βάρους ή ύπνου. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 6η και την 8η μετεγχειρητική εβδομάδα. Χορηγήθηκε νάρκωση με ενδομυϊκή ένεση κεταμίνης και ξυλαζίνης και στη συνέχεια θανατώθηκαν με ενδοκαρδιακή ένεση. Ακολούθησε η ίδια χειρουργική προσπέλαση καθώς η αφαίρεση και συλλογή των τριών επιθυμητών σπονδυλικών μονάδων από κάθε ζώο από το επίπεδο O1 έως O4 με σκοπό να πραγματοποιηθεί η ιστολογική μελέτη και η ανοσοϊστοχημική ανάλυση (Εικόνα 9) (Πίνακας 2&3).



Εικόνα 4. Το χειρουργικό πεδίο: τοποθέτηση πειραματόζωων σε πλάγια πρηνή θέση και εφαρμογή κατάλληλης αντισηψίας του δέρματος και του χειρουργικού πεδίου.



Εικόνα 5. Πλάγια οπισθοπεριτοναϊκή προσπέλαση υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες.



Εικόνα 6. Αναγνώριση της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης και με προσοχή παρασκευή αποκαλύφθηκε το επιθυμητό επίπεδο των οσφυϊκών σπονδύλων και οι αντίστοιχοι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι



Εικόνα 7. Πραγματοποιήθηκε καταστροφή- εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου με την εισαγωγή βελόνης διαμέτρου 25G και σε βάθος νυγμού 5mm σε αυτόν. Η βελόνη εισερχόταν δύο φορές για πέντε δευτερόλεπτα δια του ινώδους δακτυλίου στον πηκτοειδή πυρήνα, σύμφωνα με την τεχνική που έχει περιγραφεί από τους Koichi Masuda et al. (1976). Μετά τη διαδικασία πρόκλησης εκφύλισης, πραγματοποιήθηκε

ενδοδισκική έγχυση με βελόνη διαμέτρου 25G: 0,1ml θρεπτικού υλικού σε 14 μεσοσπονδύλιους δίσκους, 0,1ml νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από λιπώδη ιστό κονίκλων σε 18 δίσκους και 0,1ml γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από λιπώδη ιστό κονίκλου σε 6 δίσκους.



Εικόνα 9. Μακροσκοπική απεικόνιση δείγματος σπονδυλικής μονάδας που συλλέχθηκε για Ιστολογική και Ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Διακρίνεται ο μεσοσπονδύλιος δίσκος με τον πολφώδη πυρήνα ορατό στο κέντρο της εγκάρσιας διατομής.

4.5 Ιστολογική Μελέτη

Τα δείγματα των ΜΣΔ σταθεροποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεϋδη σε ρυθμισμένο με PBS για 72 ώρες και στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε απασβεστοποίηση σε 10% αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid- EDTA) σε pH 7.4 για διάστημα για 7 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από έκπλυση με νερό, ακολούθησε βαθμιδωτή αφυδάτωση των δειγμάτων σε αιθανόλη 50%-100% (v/v), διάγυση σε ξυλόλιο και τελική εμφάνιση σε παραφίνη. Πραγματοποιήθηκαν συνεχείς τομές πάχους στα 4μm στο εγκάρσιο επίπεδο με χρήση μικροτόμου, οι οποίες χρωματίστηκαν με HE, Alcian Blue και Τριχρωμία Masson. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις αξιολογήθηκαν από παθολογοανατόμο που δεν είχε γνώση των πειραματικών χειρισμών.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη πραγματοποιήθηκε με αυτόματο χρωστήρα DakoCytomation Autostainer Instrument (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Συγκεκριμένα ιστολογικές τομές πάχους 4μm αποπαραφινώθηκαν σε ξυλόλιο και ενυδατώθηκαν σε χαμηλής συγκέντρωσης αιθανόλη. Η ενδογενής δραστηριότητα της υπεροξειδάσης αναχαιτίστηκε έπειτα από επώαση σε διάλυμα αναστολής υπεροξειδάσης (DakoCytomation) για 5 λεπτά. Η ανάκτηση αντιγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση αυτόκλειστου για 30 λεπτά σε διάλυμα ανάκτησης στόχου (pH 6.0, DakoCytomation).

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αντίσωμα κατά του κολλαγόνου τύπου II (Πολυκλωνικό αντίσωμα, Proteintech, Wuhan, Κίνα, 1:2,00), κατά της αγγρεκάνης (κλώνος: ab216965, Abcam, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο. 1:1.50), κατά του Ki67 (Dako, Glostrup, Δανία. Λόγος αραιώσης 1: 1,50) και τέλος το p16 (RT4, Ventana, σε Ventana machine). Με τη χρήση του Envision Kit (Dako), οι τομές επώαστηκαν με πολυμερή σύμπλοκο δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση του χρένου για 30 λεπτά και στη συνέχεια με υποστρωματικό διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB) ενώ έγινε και ήπια αντίχρωση με αιματοξυλίνη Mayer's. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος μάρτυρας (control).

Η ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των πειραματικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με τυφλό τρόπο. Εκτιμήθηκε η αναλογία των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε χρώση καθώς και η έντασή τους. Βαθμολογήθηκε στη συνέχεια η

ένταση και το ποσοστό των θετικών κυττάρων. Η απεικόνιση των τομών πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο Olympus BX43 και ψηφιακή κάμερα Olympus SC30 digital.

Πίνακας 2 & 3. Συνολικά προέκυψαν 38 παρασκευάσματα. Ο αριθμός σε κάθε παρασκεύασμα αντιστοιχεί στο πειραματόζωο από το οποίο προήλθε, π.χ. το νούμερο 1= κόνικλος Νο 1). Το γράμμα σε κάθε παρασκεύασμα αντιστοιχεί σε μία από τις τρεις δισκικές ομάδες, π.χ. το γράμμα Α= Ομάδα Α. Στην 1^η φάση, την 6^η μετεγχειρητική εβδομάδα, θυσιάστηκαν τα ζώα 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα, στη 2^η φάση, θυσιάστηκαν τα ζώα 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14. Τα πειραματόζωα Νο 15 και 16 απεβίωσαν στο 1^ο εικοσιτετράωρο μετεγχειρητικά.

Την 6^η μετεγχειρητική εβδομάδα: Πραγματοποιήθηκε η θανάτωση 7 πειραματικών κόνικλων. Προκύπτουν 17 δείγματα: 7 ΜΣΔ έγχυσης θρεπτικού υλικού (Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου), 7 ΜΣΔ έγχυσης νεαρών rADCs (Ομάδα Β) και 3 ΜΣΔ έγχυσης γηρασμένων rADCs (Ομάδα Γ).

2^η πειραματική φάση, την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα: Πραγματοποιήθηκε η θανάτωση 7 πειραματικών κόνικλων. Προκύπτουν 17 δείγματα: 7 ΜΣΔ έγχυσης θρεπτικού υλικού (Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου), 11 ΜΣΔ έγχυσης νεαρών rADCs (Ομάδα Β) και 3 ΜΣΔ έγχυσης γηρασμένων rADCs (Ομάδα Γ).

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
1A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
1B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση rADCs	0,1ml
1Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
2A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
2B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
2Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
3A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
3B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
3Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
4A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
4B	O2		Ομάδα B Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
5A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
5B	O2		Ομάδα B Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
6A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
6B	O2		Ομάδα B Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
7A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
7B	O2		Ομάδα B Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
8A	O1	Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
8B	O2	Ομάδα Β	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADSCs	0,1ml
8Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADSCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
9A	O1	Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
9B	O2	Ομάδα Β	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADSCs	0,1ml
9Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADSCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
10A	O1	Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
10B	O2	Ομάδα Β	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
10Γ	O3	Ομάδα Γ	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση γηρασμένων rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
11A	O1	Ομάδα Α/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml

11B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
11B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
12A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
12B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
12B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
13A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
13B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
13B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

Δείγμα	Δίσκος	Ομάδα	Διεργασία	Δοσολογία
14A	O1	Ομάδα A/ Ομάδα Ελέγχου	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση θρεπτικού υλικού	0,1ml
14B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml
14B	O2	Ομάδα B	Εκφυλισμένος Δίσκος με έγχυση νεαρών rADCs	0,1ml

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της ενδοδιακυκτικής έγχυσης νεαρών (Ομάδα Β) και γηρασμένων (Ομάδα Γ) μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων απομονωμένων από το λιπώδη ιστό κονίκλου σε μεσοσπονδύλιους δίσκους ζώων, σε σύγκριση με δίσκους στους οποίους εγχύθηκε αποκλειστικά θρεπτικό υλικό (Ομάδα Α). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικά σημεία: την 6η μετεγχειρητική εβδομάδα (Φάση 1η) και την 8η μετεγχειρητική εβδομάδα (Φάση 2η).

Η εκτίμηση της επίδρασης της έγχυσης των κυττάρων στην ποιότητα του ιστού βασίστηκε στη μελέτη των ακόλουθων δεικτών: κολλαγόνο τύπου II (%), αγγρεκάνη (%), δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (%) και δείκτης κυτταρικής γήρανσης p16 (%).

5.1 Αποτελέσματα

Κατά την 1^η φάση της μελέτης (6^η μετεγχειρητική εβδομάδα), η Ομάδα Α / ομάδα ελέγχου, παρουσίασε περιορισμένη αλλά ανιχνεύσιμη αναγεννητική ικανότητα, ενώ στη 2^η φάση (8^η μετεγχειρητική εβδομάδα) παρατηρήθηκε σαφής μείωση της ικανότητας αυτής. Αντίθετα, η Ομάδα Β, στην οποία εγχύθηκαν νεαρά μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από λιπώδη ιστό κονίκλου, οδήγησε στη μεγαλύτερη αναγεννητική ικανότητα ήδη από την 1^η φάση της μελέτης. Η Ομάδα Γ, στην οποία εγχύθηκαν γηρασμένα μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα, παρουσίασε συνολικά χαμηλότερη ποιότητα ιστού και στις δύο χρονικές φάσεις.

Συγκεκριμένα, έως και την 6^η εβδομάδα, η ανάλυση της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p=0,002$). Η Ομάδα Β παρουσίασε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κολλαγόνου II σε σύγκριση με την Ομάδα Γ ($p=0,0009$), ενώ μεταξύ της Ομάδας Α και της Ομάδας Γ καταγράφηκε επίσης στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,024$). Τα ευρήματα αυτά τεκμηριώνουν την ευνοϊκή επίδραση των νεαρών κυττάρων και την επίδραση των γηρασμένων κυττάρων στην παραγωγή κολλαγόνου II ήδη από πρώιμο χρονικό σημείο.

Αντίστοιχα, για την αγγρεκάνη, παρατηρήθηκαν εξαιρετικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p < 0,001$). Η Ομάδα Β εμφάνισε σαφή υπεροχή τόσο έναντι της Ομάδας Α ($p < 0,001$) όσο και έναντι της Ομάδας Γ ($p < 0,001$), ενώ και μεταξύ των τελευταίων δύο ομάδων καταγράφηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p = 0,02$). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η αυξημένη παραγωγή αγγρεκάνης αποτελεί χαρακτηριστικό που σχετίζεται κυρίως με την παρουσία νεαρών κυττάρων, ενώ η παρουσία γηρασμένων κυττάρων σχετίζεται με τη μειωμένη συσσώρευση αγγρεκάνης.

Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 εμφάνισε οριακά μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων Α και Β ($p = 1$), με ωστόσο εμφανή τάση υπεροχής των Ομάδων Α και Β έναντι της Ομάδας Γ ($p = 0,04$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα), γεγονός που υποδηλώνει μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων στους ιστούς της Ομάδας Γ. Όσον αφορά το δείκτη κυτταρικής γήρανσης p16 ($p = 0,05$), περιέργως δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην Ομάδα Γ σε σχέση με τις Ομάδες Α και Β.

Με τη πάροδο του χρόνου, στη δεύτερη φάση, παρατηρήθηκε περαιτέρω ενίσχυση των διαφορών. Η έκφραση του κολλαγόνου ΙΙ παρουσίασε ιδιαίτερα σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ($p < 0,001$), με την Ομάδα Β να υπερέχει σαφώς τόσο έναντι της Ομάδας Γ ($p < 0,005$), όσο και έναντι της Ομάδας Α ($p < 0,001$), ενώ η Ομάδα Α παρουσίασε και αυτή στατιστικώς σημαντική υπεροχή έναντι της Ομάδας Γ ($p = 0,007$).

Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία νεαρών κυττάρων συμβάλλει στη διατήρηση αυξημένης παραγωγής κολλαγόνου ΙΙ, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα διάρκειας του παρόντος πειράματος. Ανάλογο πρότυπο καταγράφηκε και για την αγγρεκάνη, με στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p < 0,001$). Η Ομάδα Β εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση τόσο με την Ομάδα Α ($p < 0,001$) όσο και με την Ομάδα Γ ($p < 0,001$), ενώ μεταξύ των Ομάδων Α και Γ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p = 0,09$), γεγονός που αναδεικνύει ότι η αυξημένη παραγωγή αγγρεκάνης αποτελεί χαρακτηριστικό αποκλειστικά των νεαρών κυττάρων.

Παράλληλα, ο δείκτης Ki67 εμφάνισε πλέον σαφώς στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($0,001 \leq p < 0,01$), με την Ομάδα Β να υπερέχει τόσο έναντι της Ομάδας Γ ($p < 0,001$), όσο και έναντι της Ομάδας Α ($p < 0,001$), ενώ η Ομάδα Α παρουσίασε σημαντικά

υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την Ομάδα Γ ($p = 0,003$). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η παρουσία νεαρών κυττάρων συνοδεύεται από αυξημένο βαθμό πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο. Τέλος, η ανάλυση του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p16 ανέδειξε μη αναμενόμενα ευρήματα, καθώς η Ομάδα Γ δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την Ομάδα Α ($p = 0,33$), παρά την παρατηρούμενη τάση διαφοροποίησης. Αντιθέτως, η Ομάδα Β εμφάνισε στατιστικώς σημαντική αύξηση του p16 έναντι της Ομάδας Α ($p = 0,001$).

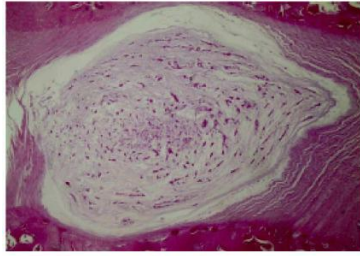
	Ομάδα Α		Ομάδα Β		Ομάδα Γ		
N≥6	<u>Μέση Τιμή</u>	<u>SD</u>	<u>Μέση Τιμή</u>	<u>SD</u>	<u>Μέση Τιμή</u>	<u>SD</u>	P**(ANOVA)
% Κολλαγόνου τύπου II- 6 ^η w	2	1,52	3,14	1,57	1,00	0,00	p= 0,002
% Κολλαγόνου τύπου II- 8 ^η w	1,57	0,78	3,36	3,01	1,00	0,00	p < 0,006
p* (paired t-test)	0,58		0,52		-		
% Αγγρεκάνης- 6 ^η w	1,71	1,25	13,42	2,37	1,00	0,00	p < 0,001
% Αγγρεκάνης- 8 ^η w	1,57	0,78	12,81	3,86	1,66	0,57	p < 0,001
p*	0,82		0,80		0,11		
% Ki67- 6 ^η w	2,57	2,50	2,57	0,78	1,00	0,00	p = 0,03
% Ki67- 8 ^η w	2,00	1,00	4,63	1,68	1,00	0,00	p < 0,005
p*	0,52		0,58		-		
% p16- 6 ^η w	11,85	6,51	9,57	4,72	13,33	2,88	p = 0,057
% p16- 8 ^η w	7,85	2,08	11,72	3,16	14	1,73	p = 0,0006
p*	0,2		0,29		0,74		
* Paired sample t-test							
** One- way ANOVA							

Πίνακας 1. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Α, Β, Γ) και των χρονικών σημείων αξιολόγησης (6^η και 8^η εβδομάδα) για τους δείκτες Κολλαγόνο τύπου II, Αγγρεκάνη, Ki67 και p16 (%). Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των χρονικών σημείων για κάθε ομάδα με paired sample t-test. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (SD), με $N \geq 6$. Τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Για τους δείκτες Κολλαγόνο τύπου II και Αγγρεκάνη καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, με την Ομάδα Β να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις Ομάδες Α και Γ, τόσο την 6^η όσο και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα ($p < 0,001$ ANOVA). Ο δείκτης Ki67 παρουσίασε αύξηση στην Ομάδα Β μεταξύ της 6^{ης} και της 8^{ης} εβδομάδας ($p = 0,58$, paired t-test) και στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στην 8^η εβδομάδα ($p < 0,0001$, ANOVA). Ο δείκτης p16 ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων Α-Β και Β-Γ ($p \leq 0,001$ ANOVA) και στα δύο χρονικά σημεία αξιολόγησης.

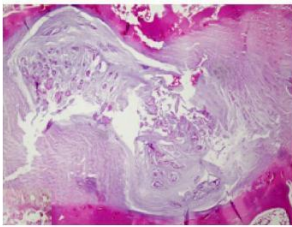
5.2 Ιστολογική Ανάλυση

Όπως απεικονίζονται στις ιστολογικές τομές μετά από χρώση με HE, ο φυσιολογικός μεσοσπονδύλιος δίσκος (Εικόνα 1) χαρακτηρίζεται από πηκτοειδή πυρήνα πλούσιο σε μεγάλα νοτοχονδρικά κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από εκτεταμένες ζώνες εξωκυττάριας μήτρας. Οι χόνδρινες τελικές πλάκες εμφανίζουν υαλώδη χόνδρο με χαρακτηριστικά χονδροκύτταρα, ενώ παρατηρείται σαφές και ευδιάκριτο όριο μεταξύ του ΠΠ και του ΙΔ.

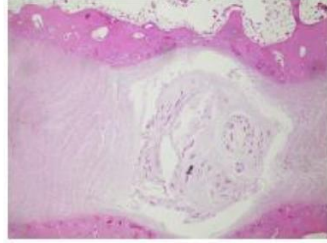
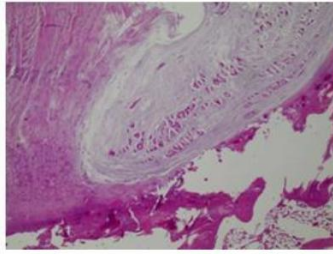
Μετά την πρόκληση της εκφύλισης μέσω παρακέντησης με βελόνη, παρατηρείται έντονος ο βαθμός της εκφυλιστικών αλλοιώσεων, με απώλεια του σαφούς ορίου μεταξύ του ΠΠ και ΙΔ, αυξημένη ίνωση και παρουσία αιμοφόρων αγγείων εντός του δίσκου (Εικόνα 2). Στην ομάδα έγχυσης θρεπτικού υλικού καταγράφονται εμφανείς εκφυλιστικές βλάβες, που περιλαμβάνουν μείωση του όγκου και αλλοίωση της μορφολογίας του ΠΠ, ελάττωση του αριθμού των κυττάρων και των πρωτεογλυκανών, καθώς και αντικατάσταση από ινοχόνδρινα κύτταρα. Το φυσιολογικό όριο μεταξύ ΠΠ και ΙΔ εμφανίζεται διακεκομμένο ή ασαφές, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται σημαντική φλεγμονώδης αντίδραση (Εικόνα 3). Αντιθέτως στην ομάδα Β, με την ενδοδισκική έγχυση νεαρών κυττάρων, παρατηρείται μικρότερος βαθμός εκφύλισης και ίνωσης, με σχετική διατήρηση της δομικής οργάνωσης του δίσκου και έντονα στοιχεία αγγειογένεσης (Εικόνα 4). Στην ομάδα έγχυσης γηρασμένων κυττάρων, αντίθετα, επικρατεί σοβαρός βαθμός εκφύλισης, με εκτεταμένη ίνωση, σημαντική απώλεια ECM και έντονη ασάφεια μεταξύ των επιμέρους δομικών στοιχείων του μεσοσπονδύλιου δίσκου (Εικόνα 5).



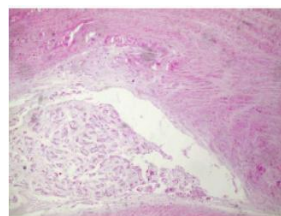
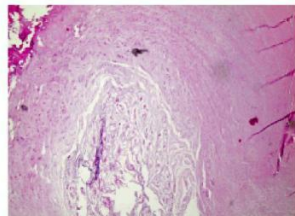
Εικόνα 1. Φυσιολογικός μεσοσπονδύλιος δίσκος. Διακρίνεται ο πηκτοειδής πυρήνας με άφθονη εξωκυττάρια μήτρα και νοτοχονδρικά κύτταρα, καθώς και ο ινώδης δακτύλιος με σαφή οριοθέτηση μεταξύ των δύο δομών.



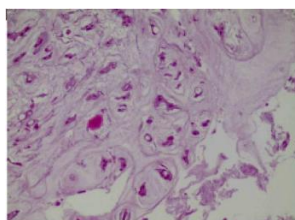
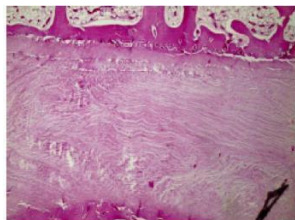
Εικόνα 2. Μεσοσπονδύλιος δίσκος μετά την εισαγωγή της βελόνης. Παρατηρείται διαταραχή της αρχιτεκτονικής του δίσκου, απώλεια της σαφούς οριοθέτησης μεταξύ πηκτοειδούς πυρήνα και ινώδους δακτυλίου, καθώς και πρώιμα μορφολογικά χαρακτηριστικά εκφύλισης.



Εικόνα 3. Ομάδα Α (ομάδα ελέγχου). Μεσοσπονδύλιος δίσκος μετά από έγχυση θρεπτικού υλικού την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Παρατηρούνται εκφυλιστικές αλλοιώσεις με μείωση του πηκτοειδούς πυρήνα, ελάττωση της εξωκυττάριας μήτρας και διαταραχή της οριοθέτησης μεταξύ πηκτοειδούς πυρήνα και ινώδους δακτυλίου.



Εικόνα 4. Ομάδα Β. Μεσοσπονδύλιος δίσκος την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα μετά από ενδοδισκική έγχυση νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό. Παρατηρείται σαφώς ηπιότερος βαθμός εκφύλισης, διατήρηση της αρχιτεκτονικής του πηκτοειδούς πυρήνα, αυξημένη κυτταρική πυκνότητα και ενίσχυση της εξωκυττάριας μήτρας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 5. Ομάδα Γ. Μεσοσπονδύλιος 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα μετά από ενδοδισκική έγχυση γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό. Παρατηρείται έντονος βαθμός εκφύλισης, εκτεταμένη ίνωση, απώλεια της εξωκυττάριας μήτρας και σαφής διαταραχή της οριοθέτησης μεταξύ πηκτοειδούς πυρήνα και ινώδους δακτυλίου, με επιδείνωση της εικόνας στη μεταγενέστερη χρονική στιγμή.

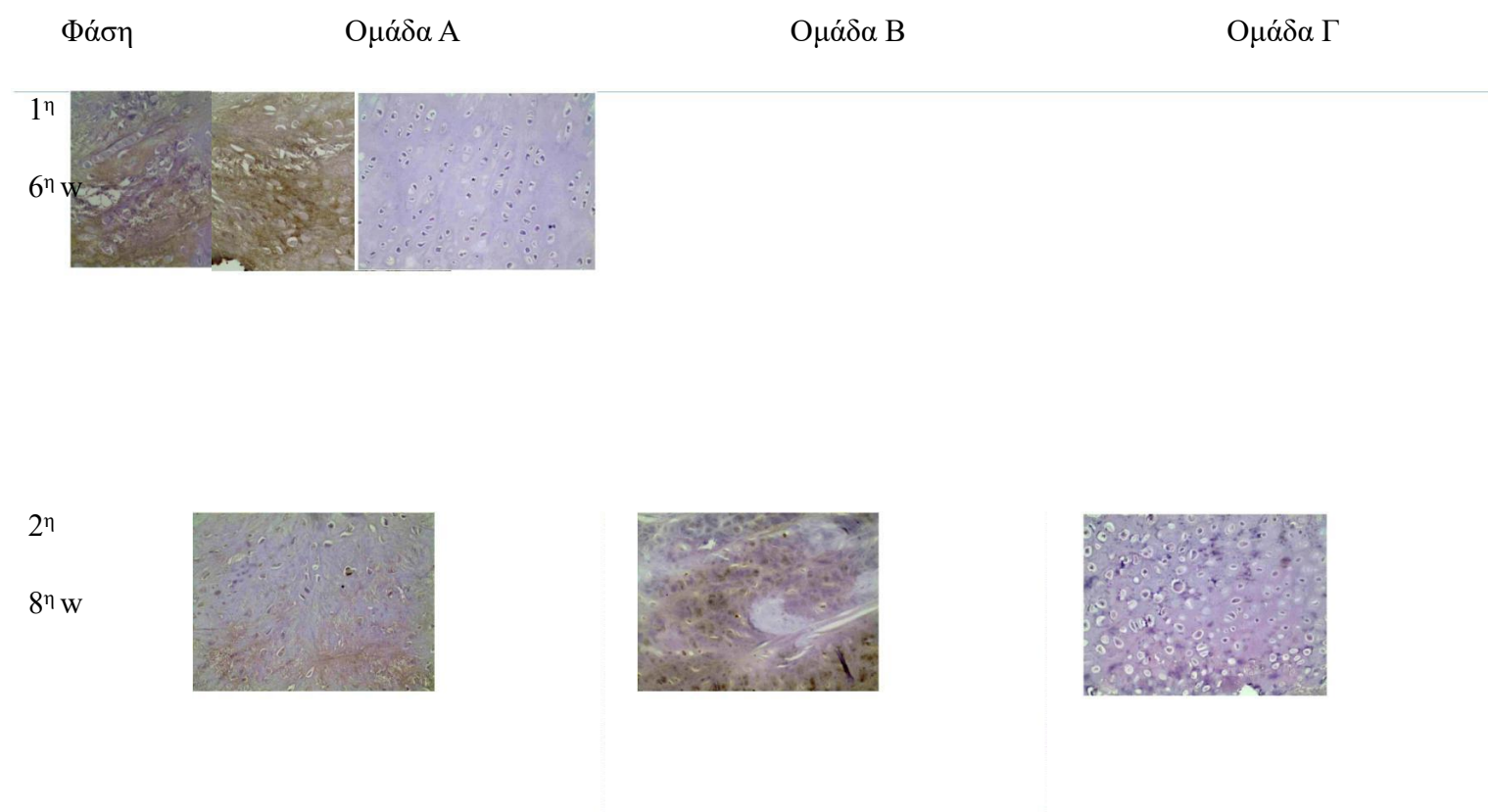
5.3 Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης των δεικτών Κολλαγόνου τύπου II, Αγγρεκάνης, Ki67 και p16, η οποία πραγματοποιήθηκε σε μεσοσπονδύλιους δίσκους δεκατεσσάρων (14) κονίκλων. Σκοπός της ανάλυσης ήταν η αξιολόγηση της αναγεννητικής ή εκφυλιστικής ικανότητας και στις τρεις πειραματικές ομάδες (Α, Β και Γ), τόσο κατά την 6^η όσο και κατά την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται οργανωμένα ανά δείκτη και συνοδεύονται από αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες, πίνακες και γραφήματα, προκειμένου να αποδοθούν με σαφήνεια οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των ομάδων και των χρονικών σημείων.

5.3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη Κολλαγόνου τύπου II

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση του κολλαγόνου τύπου II κατέδειξε σαφή και ταχεία αύξηση της έκφρασής του μετά την ενδοδισκική έγχυση νεαρών μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων (Ομάδα Β) τόσο κατά την 6^η όσο και κατά την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Αντίθετα, στους μεσοσπονδύλιους δίσκους της Ομάδας Γ, μετά τη χορήγηση γηρασμένων μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II, υποδηλώνοντας επιδείνωση της εκφυλιστικής διαδικασίας. Τα ευρήματα αυτά απεικονίζονται χαρακτηριστικά στις Εικόνες 6 και 7 και συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

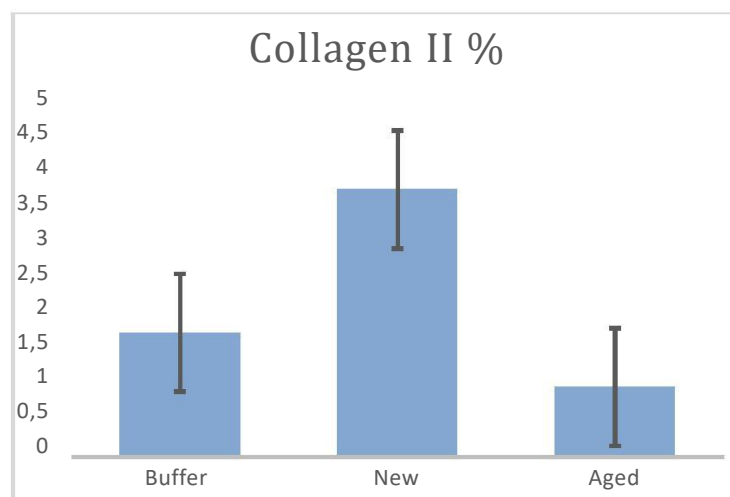


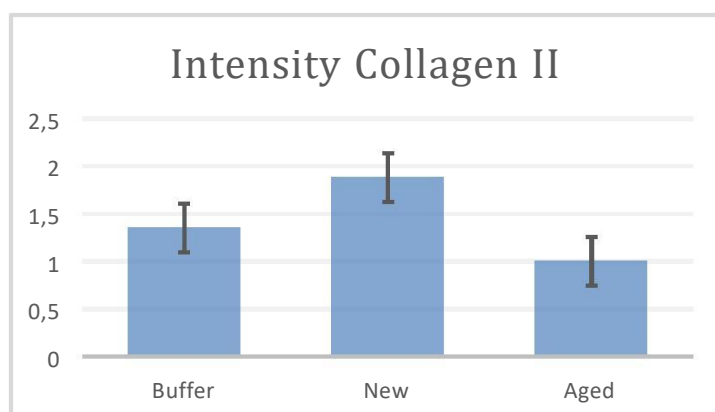
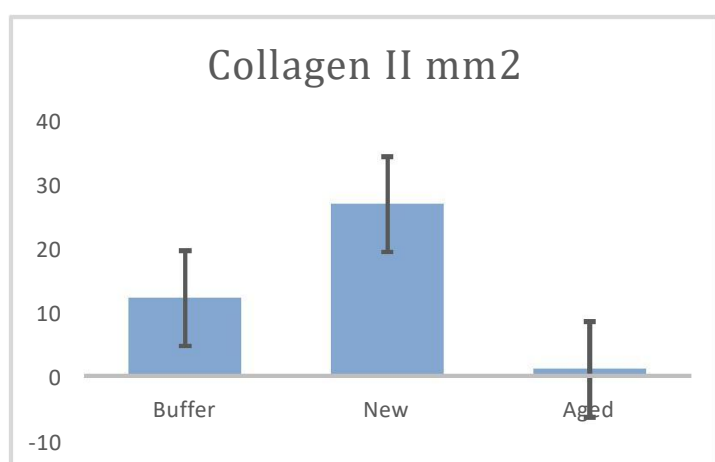
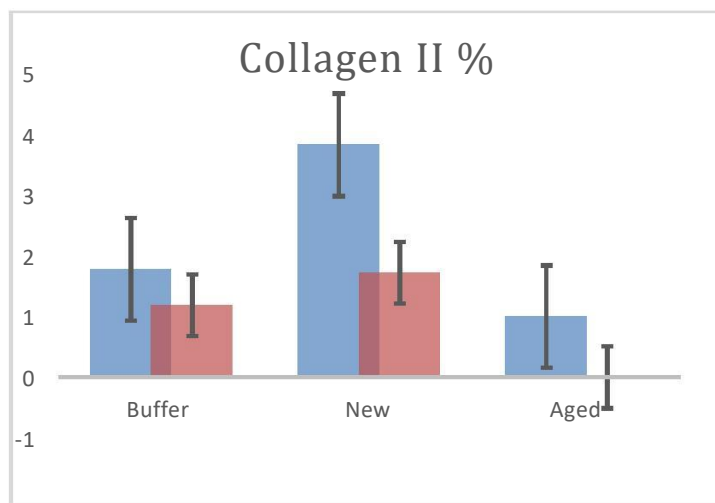
Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του κολλαγόνου τύπου II στον ιστό του δίσκου και στις τρεις πειραματικές ομάδες κατά την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Στην ομάδα ελέγχου (Ομάδα Α) παρατηρείται σταδιακή μείωση της έκφρασης του

κολλαγόνου τύπου II μεταξύ των δύο φάσεων. Αντίθετα, στην Ομάδα Β καταγράφεται σημαντική αύξηση της έκφρασης κολλαγόνου τύπου II, ενώ στην Ομάδα Γ η ανοσοϊστοχημική έκφραση του κολλαγόνου τύπου II είναι ελάχιστη έως μη ανιχνεύσιμη.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης κολλαγόνου τύπου II την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα στις Ομάδες Α, Β και Γ.

Ομάδα	Ποσοστό (%) + χονδροκυττάρων σε κολλαγόνο	Έκταση κολλαγόνου mm ²	Ένταση Κολλαγόνου
A	1,78	12,14	1,35
B	4,33	26,88	1,88
Γ	1	1	1

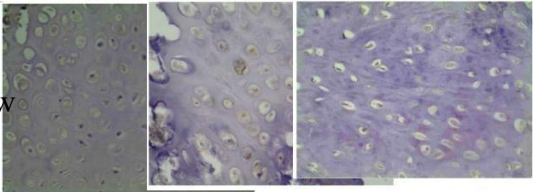
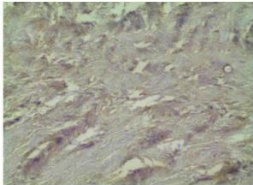
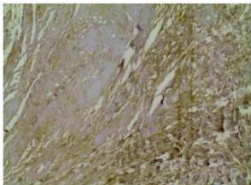
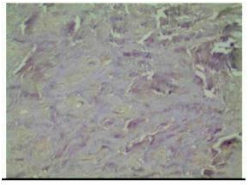




Εικόνα 7. Γραφική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις πειραματικές ομάδες κατά την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ανά ζεύγη

(ANOVA, Tukey's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: μη στατιστικά σημαντικές διαφορές).

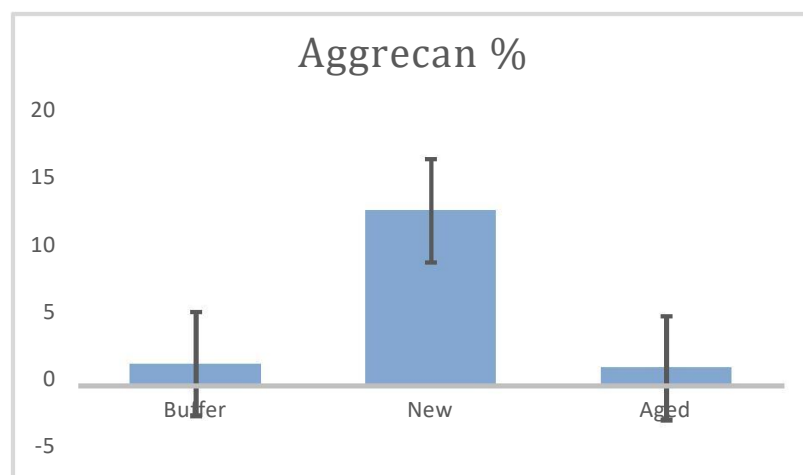
5.3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Αγγρεκάνης

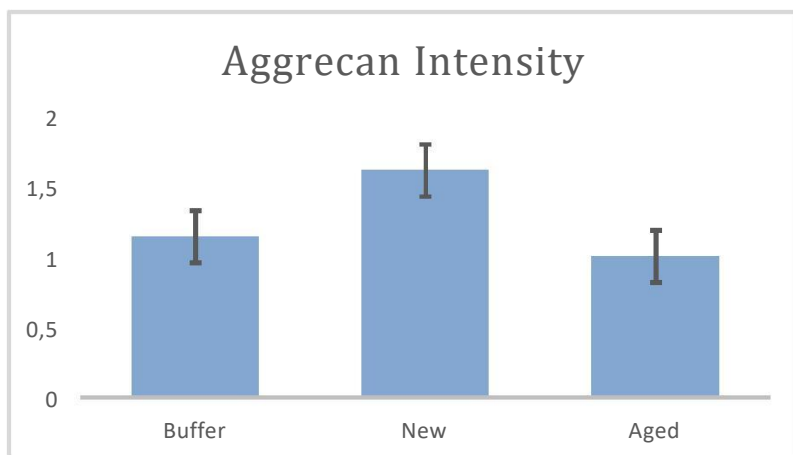
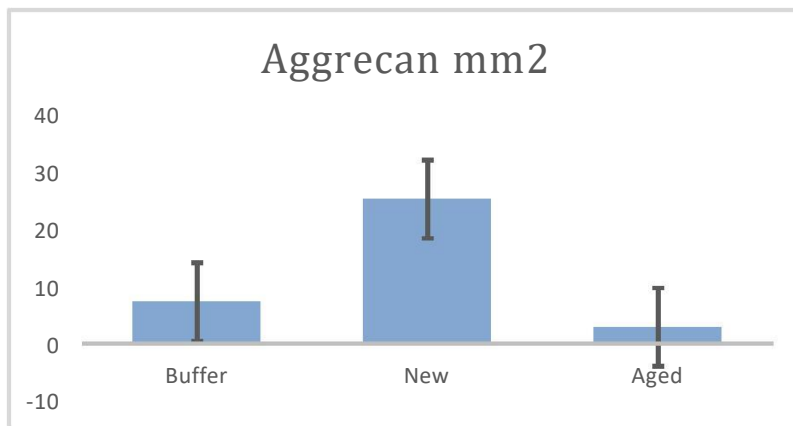
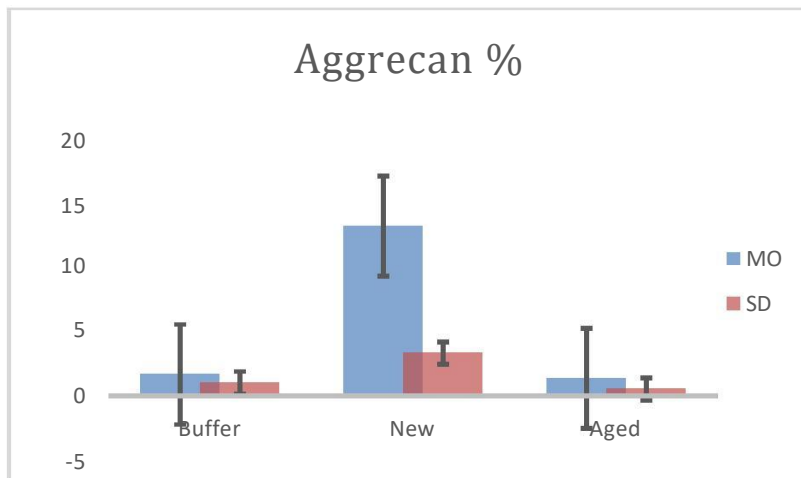
Φάση	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ
1 ^η , 6 ^η w			
2 ^η , 8 ^η w			

Εικόνα 8. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της αγγρεκάνης στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις ομάδες τη χρονική στιγμή κατά την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Στην Ομάδα Γ παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού αγγρεκάνης, με εμφανή αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και απώλεια της χαρακτηριστικής αρχιτεκτονικής του ιστού.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της αγγρεκάνης στους μεσοσπονδύλιους δίσκους των ομάδων Α, Β και Γ κατά την 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα.

Ομάδα	Ποσοστό aggrecan (%)	Έκταση aggrecan (mm ²)	Ένταση aggrecan
A	1,64	12,14	1,35
B	13,05	26,88	1,88
Γ	1,33	1	1

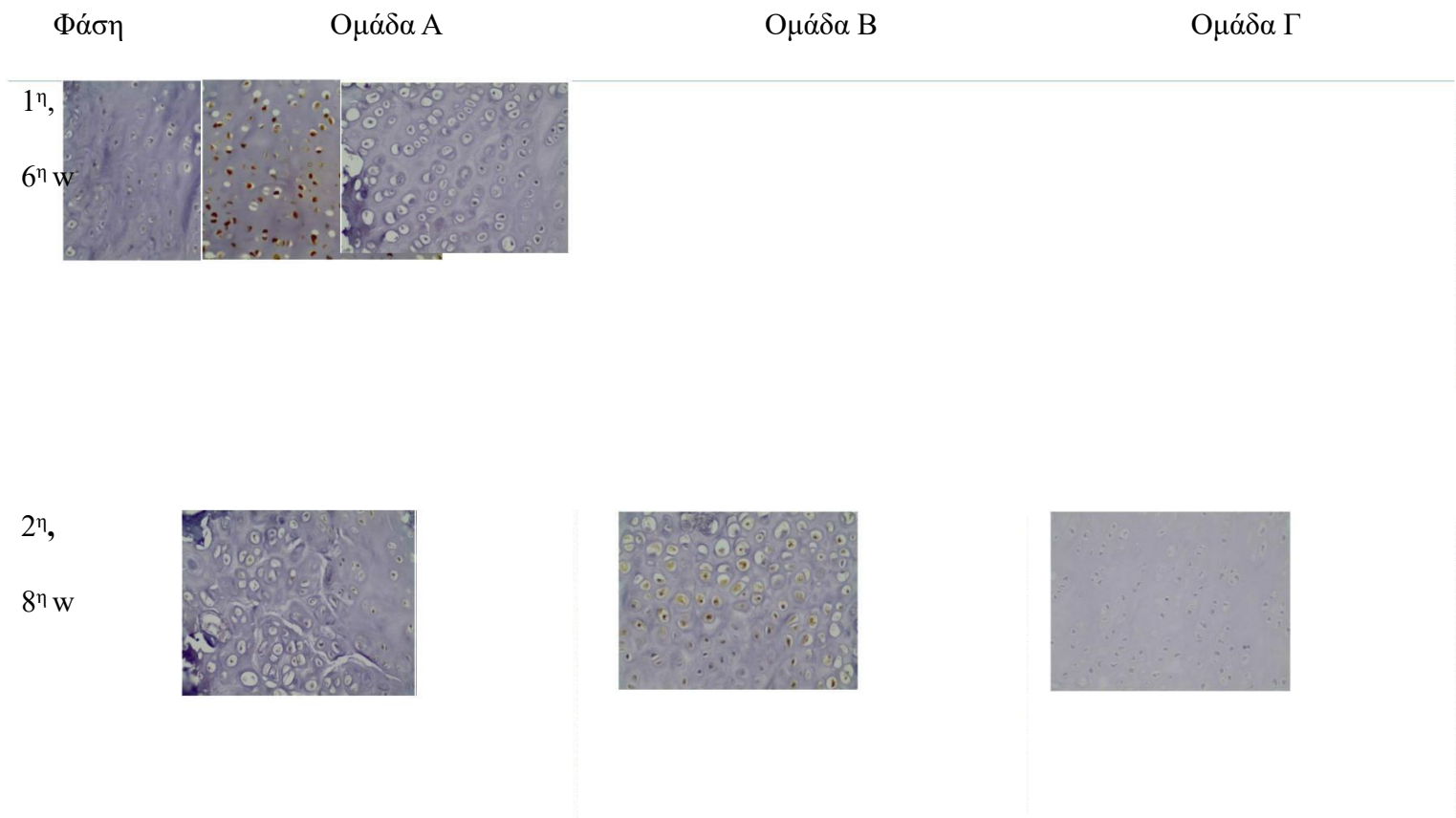




Εικόνα 9. Γραφική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης της έκφρασης της αγγρεκάνης στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις ομάδες την 8^η

εβδομάδα. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ανά ζεύγη (ANOVA, Tukey's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: μη στατιστικά σημαντικές διαφορές)

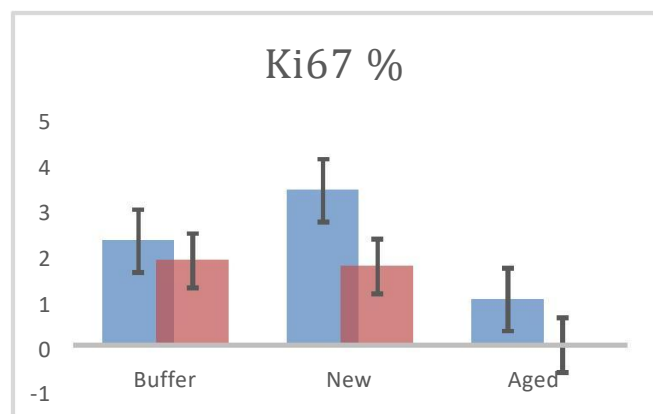
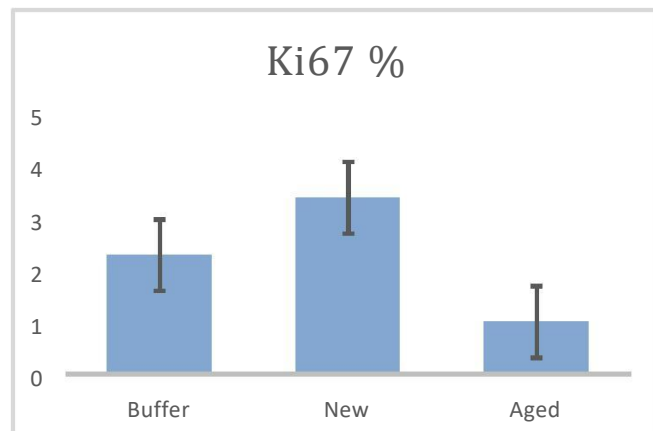
5.3.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Ki67



Εικόνα 10. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση του δείκτη Ki67 στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις ομάδες τις χρονικές στιγμές της 6^{ης} και της 8^{ης} εβδομάδας. Ως δείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην Ομάδα Β τα Ki67-θετικά κύτταρα εντοπίζονται σε μορφή κυτταρικών συσσωματωμάτων, εύρημα που παρατηρείται σε σημαντικά μικρότερο βαθμό στην ομάδα έγχυσης γηρασμένων κυττάρων.

Πίνακας 4 . Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Ki67 την 6^η και την 8^η εβδομάδα στις Ομάδες Α, Β και Γ.

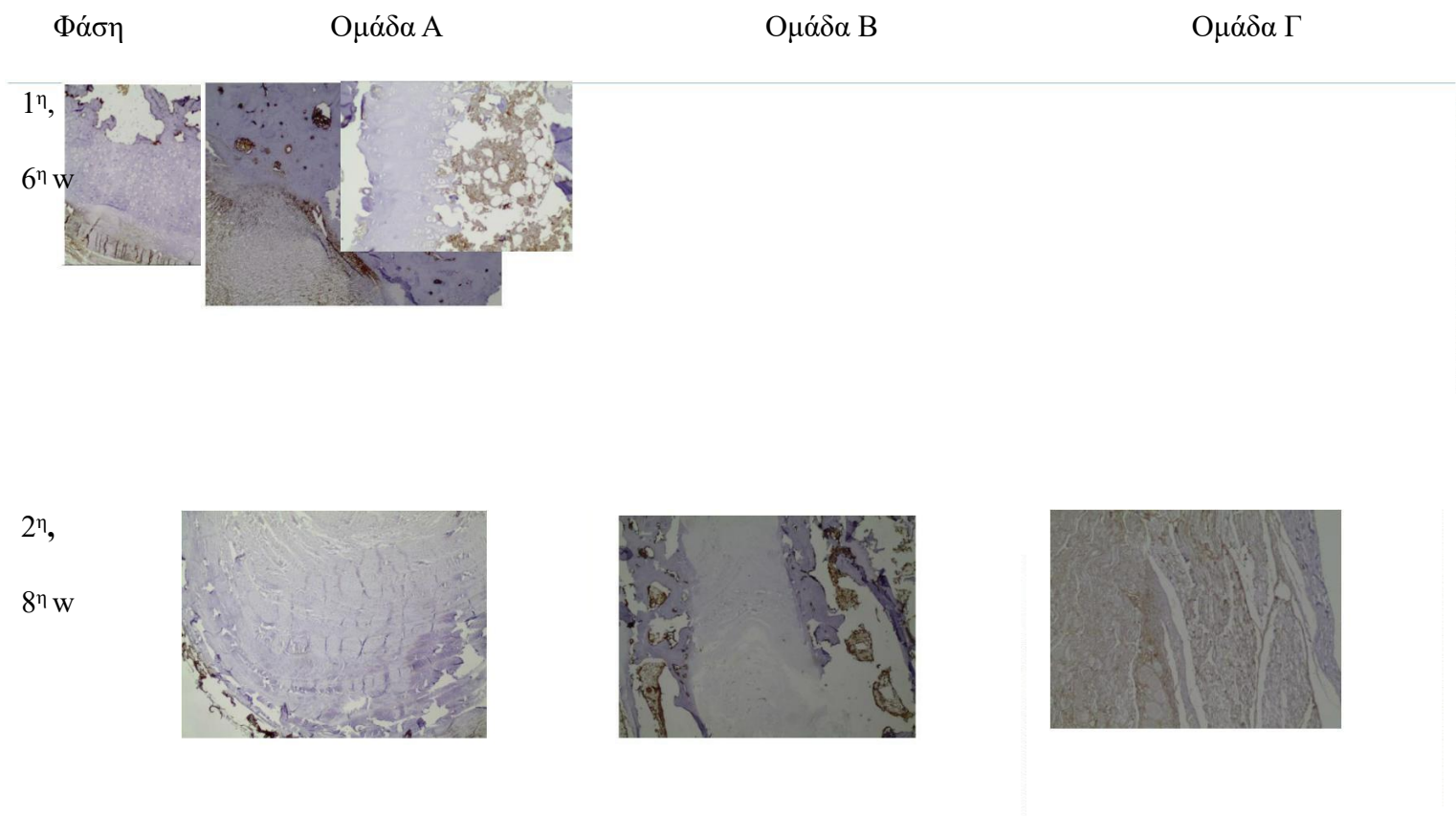
Ομάδα	Ποσοστό Ki67 (%)
A	2,28
B	3,38
Γ	1



Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης του δείκτη Ki67 στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις ομάδες στη χρονική στιγμή της 8^{ης} εβδομάδας. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές

μεταξύ των ομάδων ανά ζεύγη (ANOVA, Tukey's test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns: μη στατιστικά σημαντικές διαφορές).

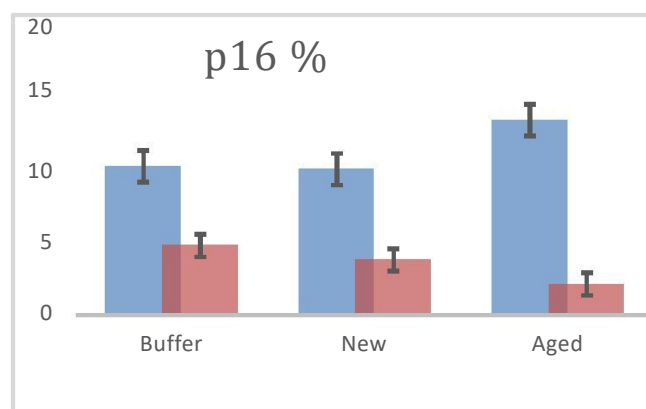
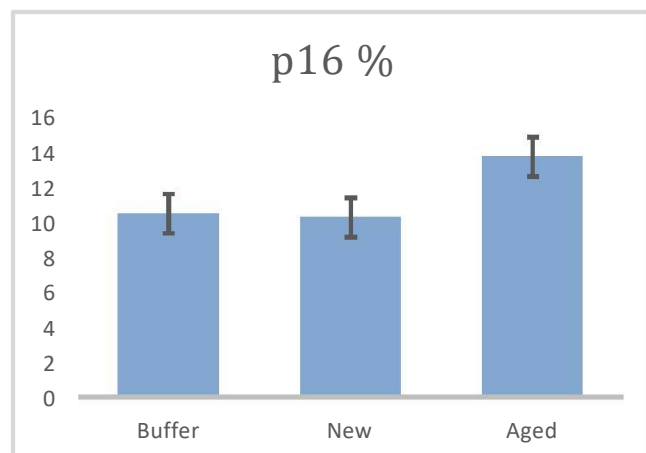
5.3.4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του p16



Εικόνα 12. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης του δείκτη p16 στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου και στις τρεις ομάδες στις χρονικές στιγμές, 6^η και την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα. Στις εικόνες της Ομάδας Γ είναι εμφανής η απώλεια των ορίων μεταξύ του ΙΔ και του ΠΠ, η αποσαφηνισμένη δομή του ΙΔ (λιγότερο ομόκεντρο και περισσότερη ελικοειδής) και η απώλεια της εξωκυττάριας μήτρας του πυρήνα (μεγάλα κενά και ρωγμές).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του δείκτη p16 την 6^η και την 8^η εβδομάδα για τις Ομάδες Α, Β και Γ.

Ομάδα	Ποσοστό p16 (%)
A	10,42
B	10,22
Γ	13,66



Εικόνα 13. Γραφική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης της έκφρασης του δείκτη p16 στον ιστό του μεσοσπονδύλιου δίσκου για τις τρεις ομάδες στη χρονική στιγμή της 8^{ης} εβδομάδας. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (ANOVA, Tukey's test, ns: μη στατιστικά σημαντικές διαφορές).

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα και Συζήτηση

Η εκφυλιστική νόσος του μεσοσπονδύλιου δίσκου (ΜΣΔ) αποτελεί κεντρικό παθοφυσιολογικό παράγοντα στην αιτιολογία της οσφυαλγίας, μιας κλινικής οντότητας που αναγνωρίζεται ως μία από τις κυριότερες αιτίες λειτουργικού περιορισμού και αναπηρίας διεθνώς, επιβαρύνοντας σημαντικά τα συστήματα υγείας και την παγκόσμια οικονομία. Παρά τη χρήση τόσο των συντηρητικών όσο και των επεμβατικών θεραπευτικών παρεμβάσεων, οι υφιστάμενες μέθοδοι συχνά αποδεικνύονται ανεπαρκείς ως προς την επίτευξη μακροχρόνιας κλινικής βελτίωσης, καθώς δεν στοχεύουν τους πρωτογενείς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου. Δεδομένου ότι η εκφύλιση του ΜΣΔ είναι πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία απορρέει από τη σύμπραξη γενετικών, θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων, έχει διαμορφωθεί η ανάγκη ανάπτυξης θεραπευτικών προσεγγίσεων που να παρεμβαίνουν κατευθείαν στην παθοφυσιολογία της εκφύλισης. Τα τελευταία χρόνια καταγράφεται αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για τις βιολογικές θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων βιομοριακών, κυτταρικών και ιστοτεχνολογικών παρεμβάσεων, οι οποίες διερευνώνται ως δυνητικά αναγεννητικές στρατηγικές με στόχο την αποκατάσταση της δομικής ακεραιότητας και της λειτουργικότητας του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Η εκφύλιση του δίσκου σε κυτταρικό επίπεδο χαρακτηρίζεται κυρίως από μείωση του αριθμού των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα και μεταβολική μετατόπιση προς καταβολικές διεργασίες, με επακόλουθη απώλεια πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τύπου II [113]. Στο πλαίσιο αυτό, οι κυτταρικές θεραπείες στοχεύουν στην αναστροφή αυτών των παθολογικών μεταβολών μέσω ενδοδισκικής εμφύτευσης υγιών κυττάρων ικανών για παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας, προσφέροντας μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αναγέννηση του εκφυλισμένου μεσοσπονδύλιου δίσκου. Σε αντιδιαστολή προς τους περιορισμούς που συνοδεύουν τη χρήση κυττάρων του ΠΠ για εφαρμογές ιστικής μηχανικής, όπως η περιορισμένη διαθεσιμότητα, οι τεχνικές δυσκολίες κατά τη συλλογή τους, καθώς και ο κίνδυνος πρόκλησης εκφύλισης στον υγιή δίσκο από τον οποίο λαμβάνονται, η αξιοποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προβάλλει ως ανώτερη εναλλακτική. Τα MSCs χαρακτηρίζονται από ευκολία πρόσβασης και υψηλή διαθεσιμότητα, χαμηλή νοσηρότητα στο σημείο δότη, υψηλό ρυθμό πολλαπλασιαστικού δυναμικού, ικανότητα αυτοανανέωσης, πολυδυναμικότητα και

αντιφλεγμονώδη δράση. Επιπλέον, η χρήση τους δεν εγείρει ηθικά ζητήματα ούτε σχετίζεται με προβλήματα γονιδιωματικής σταθερότητας [91]. Επιπροσθέτως, δεν έχουν ανιχνευθεί διαφορές μεταξύ μεταμοσχευμένων MSCs και κύτταρα του ΠΠ ως προς την ικανότητα αναγέννησης του δίσκου σε μοντέλα κουνελιού [114]. Παράλληλα, οι Sakai et al. έχουν αποδείξει ότι μετά από ενδοδισκική έγχυση, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς τύπους οι οποίοι εμφανίζουν τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του πηκτοειδούς πυρήνα και να ενισχύσουν τη λειτουργία των ήδη εκφυλισμένων κυττάρων του πυρήνα μέσω παρακρινών μηχανισμών [115]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση των μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων από λιπώδη ιστό (ADSCs), έχει εδραιωθεί στη φάρετρα της κυτταρικής θεραπείας για την αναγέννηση του μεσοσπονδύλιου δίσκου λόγω των όμοιων χαρακτηριστικών με τα ευρέως μελετημένα BM-MSCs, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής ικανότητας διαφοροποίησης. Μάλιστα, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα ADSCs παρουσιάζουν ακόμη ισχυρότερη διαφοροποιητική ικανότητα σε φαινότυπο πηκτοειδούς πυρήνα και ενδέχεται να είναι καταλληλότερα για την αντιμετώπιση εκφυλιστικών διαταραχών του ΜΣΔ [116]. Ένας άλλος λόγος υπεροχής των ADSCs είναι η ανατομική τους θέση, καθώς εντοπίζονται διάσπαρτα στο σώμα, γεγονός που εξασφαλίζει ευκολότερη πρόσβαση και ελάχιστο έως μηδενικό κίνδυνο κατά τη συλλογή [92, 98]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η *ex vivo* καλλιέργεια είναι συχνά απαραίτητη, προκειμένου να επιτευχθεί ένας επιθυμητά υψηλός αριθμός βιώσιμων κυττάρων για την αναγέννηση ιστού, μπορεί να προκληθεί κυτταρική γήρανση λόγω των διαδοχικών καλλιιεργειών ή εξωτερικών/ εργαστηριακών στρεσογόνων παραγόντων. Επομένως, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η άμεση επίδραση νεαρών και γηρασμένων rADSCs στην ποιότητα του ιστού του μεσοσπονδύλιου δίσκου, μετά από ενδοδισκική έγχυση αυτών σε κονίκλους.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσθηκε η χρήση της κυτταρικής θεραπείας σε ΜΣΔ που υπέστησαν εκφύλιση- σύμφωνα με το εκφυλιστικό πρωτόκολλο των Koichi Masuda et al. [112]. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από το λιπώδη ιστό κονίκλων New Zealand White. Ένας αριθμός των κυττάρων υπέστη πρωτόκολλο γήρανσης με την έκθεση αυτών σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Ακολούθησε έγχυση των νεαρών και των γηρασμένων rADSCs στους εκφυλισμένους μεσοσπονδύλιους δίσκους των κονίκλων. Η 1η προσπάθεια για επαναμεταμόσχευση κυττάρων του ΠΠ σε εκφυλισμένο ΜΣΔ πραγματοποιήθηκε το 1998 από τους

Nishimura και Mochida σε επίμυες [117]. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά κύτταρα απομονωμένα από το λιπώδη ιστό κονίκλου λόγω της εύκολης προσβασιμότητας, χαμηλής νοσηρότητας της δότριας περιοχής και του υψηλού πολλαπλασιαστικού δυναμικού [91, 118]. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, ήδη από την έκτη (6^η) εβδομάδα, η ενδοδισκική έγχυση νεαρών rADSCs (Ομάδα Β) πυροδότησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προήγαγε την παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας, με στατιστικά σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε κολλαγόνου τύπου II της αγγρεκάνης και του δείκτη Ki67, σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες. Ήδη στο χρονικό αυτό σημείο, η Ομάδα Β εμφάνισε τα χαρακτηριστικά μιας σταθερής και αποτελεσματικής αναγεννητικής ικανότητας. Αντιθέτως, η χορήγηση γηρασμένων rADSCs (Ομάδα Γ) όχι μόνο δε βελτιώθηκε το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και της σύσταση της ECM, αλλά παρουσίασε και χαμηλά επίπεδα αναπλαστικής ικανότητας. Η χαμηλή παραγωγή των συστατικών της ECM και ο περιορισμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός αντανακλούν τη χαμηλή μεταβολική και αναγεννητική ικανότητα των γηρασμένων κυττάρων. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει ότι η παρουσία κυττάρων με χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης επιβαρύνει σε σοβαρό βαθμό το περιβάλλον του δίσκου, ενισχύοντας τον αλγόριθμο της εκφύλισης. Η Ομάδα Α (ομάδα ελέγχου) παρουσίασε περιορισμένη αλλά υπαρκτή αναγεννητική ικανότητα, γεγονός που υποδηλώνει μια αρχική προσπάθεια του μεσοσπονδύλιου δίσκου να ανταποκριθεί στην εκφυλιστική διεργασία. Η παρουσία περιορισμένης σύνθεσης κολλαγόνου τύπου II και αγγρεκάνης υποδεικνύει ότι η εγγενής ικανότητα των κυττάρων του δίσκου παραμένει ενεργή αλλά μειωμένη, πιθανότατα λόγω των υφιστάμενων εκφυλιστικών μεταβολών του μικροπεριβάλλοντος. Την 8^η εβδομάδα της μελέτης, οι διαφορές μεταξύ των ομάδων έγιναν ακόμη πιο εμφανείς. Η Ομάδα Α παρουσίασε μείωση της αναπλαστικής δραστηριότητας συγκριτικά με την πρώτη φάση γεγονός που δείχνει ότι η φυσική αναγεννητική δυνατότητα του ιστού εξασθενεί με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα η Ομάδα Β ενίσχυσε παρά διατήρησε την αναγεννητική της συμπεριφορά με σταθερά αυξανόμενη παραγωγή κολλαγόνου τύπου II και αγγρεκάνης. Ταυτόχρονα ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιαστικού δυναμικού υποδηλώνει τη συνεχή παρουσία ενός ενεργού, αναγεννητικού μικροπεριβάλλοντος. Ο δείκτης κυτταρικής γήρανσης εντοπίζεται μειωμένος σε σημαντικό βαθμό. Αντίθετα στην Ομάδα Γ ο δείκτης p16 εκφράζεται σε μεγάλα ποσοστά. Σημειώνεται σημαντικός περιορισμός στην παραγωγή του Ki67, κολλαγόνου τύπου II και αγγρεκάνης με αποτέλεσμα απώλεια της ιστικής ομοιόστασης και περαιτέρω αποδυνάμωση της αναγεννητικής ικανότητας. Η

ιστολογική αξιολόγηση των τομών ανέδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις στην αρχιτεκτονική δομή του δίσκου σε κάθε πειραματική ομάδα ξεχωριστά. Με την εισαγωγή της βελόνης στα πλαίσια πρωτοκόλλου εκφύλισης καταγράφονται αλλοιώσεις όπως απώλεια των ορίων μεταξύ του ΠΠ και του ΙΔ, αύξηση της ίνωσης και διαταραχή στην οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας. Με την έγχυση του θρεπτικού υλικού σημειώθηκε μερική διατήρηση της δομής του ΜΣΔ χωρίς ωστόσο να αποτραπεί ο εκφυλιστικός αλγόριθμος. Συγκεκριμένα, στην 1^η φάση οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις δεν απεικονίζονται σε έντονο βαθμό σε αντίθεση με την 8^η μετεγχειρητική εβδομάδα, όπου οι μεταβολές είναι σαφώς εντονότερες με τη μείωση των πρωτεογλυκανών και την αντικατάσταση αυτών με ινοχόνδρινα κύτταρα και αλλοίωση της μορφολογίας του ΠΠ. Στην Ομάδα Β, οι αλλοιώσεις αυτές εντοπίζονται σε ήπιο βαθμό με επικρατέστερη εικόνα αυτή της αγγειογένεσης. Τέλος στην Ομάδα Γ με την έγχυση των γηρασμένων rADSCs οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό με παρουσία ίνωσης, σημαντική απώλεια των ορίων μεταξύ του ΙΔ και του ΠΠ και τέλος καταστροφική βλάβη της ECM.

Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης των MSCs και συγκεκριμένα των ADSCs, γεγονός που έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Οι Zhen Sun et al. διερεύνησαν την επίδραση των ADSCs στα κύτταρα του ΠΠ σε συνθήκες άσκησης συμπίεστικών δυνάμεων, όπως ακριβώς τα μηχανικά stress που δρουν σε έναν εκφυλισμένο δίσκο. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την επιβίωση την απόπτωση και την έκφραση γονιδίων της ECM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ADSCs περιορίζουν σημαντικά την απόπτωση των NP κυττάρων μέσω αναστολής της ενδογενούς οδού, ενισχύουν την έκφραση γονιδίων σύνθεσης της ECM και αυξάνουν τους αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε μείωση των αποδομητικών και φλεγμονώδων παραγόντων (MMPs, ADAMTSs, IL-1β, IL-6, TGF-β1, TNF-α) συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και λειτουργικότητας του ιστού [119]. Το 2023 οι Zhang et al. μέσω μίας μετανάλυσης αξιολόγησαν τη χορήγηση MSCs σε ασθενείς με εκφυλιστική νόσο του ΜΣΔ. Η ανάλυση περιλάμβανε εννέα κλινικές μελέτες με συνολικά 245 ασθενείς. Η αξιολόγηση του πόνου και της λειτουργικής αναπηρίας πραγματοποιήθηκε με το VAS score (Visual Analogue Scale) και το ODI (Oswestry Disability Index). Τα αποτελέσματα κατέγραψαν σημαντική μείωση του πόνου και βελτίωση της λειτουργικότητας του ασθενούς. Δεν καταγράφηκαν

ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι συγγραφείς υπογράμμισαν ότι η θεραπεία με MSCs αποτελεί ασφαλή και αποτελεσματική εναλλακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του δισκογενούς πόνου, ενισχύοντας την άποψη ότι η έγχυση MSCs μπορεί να συμβάλλει ουσιαστικά στην επαναφορά της δισκικής ομοιόστασης και στη μείωση της εκφύλισης [120].

Από πολύ νωρίς στη μελέτη μας, ήδη από την 6^η εβδομάδα, η παραγωγή του δείκτη κολλαγόνου τύπου II αυξήθηκε με την έγχυση των νεαρών ADSCs. Η μελέτη των Sun et al. αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο τα ADSCs μπορούν να τροποποιήσουν άμεσα τον φαινότυπο των κυττάρων του ΠΠ, με ιδιαίτερη έμφαση στην αποκατάσταση του κολλαγόνου τύπου II και της Αγгреκάνης. Η εφαρμογή μη φυσιολογικού συμπίεστικού φορτίου οδήγησε σε έντονη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων COL2A1 και ACAN, αντανakλώντας τη χαρακτηριστική απώλεια δομικής ακεραιότητας και ενυδάτωσης του εκφυλισμένου πυρήνα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παρουσία των ADSCs ανέστειλε άμεσα με την απόπτωση των κυττάρων του ΠΠ μέσω καταστολής της ενεργοποιημένης κασπάσης-9 και κασπάσης-3. Επιπλέον, τα ADSCs προστατεύσαν τα κύτταρα του πυρήνα από την εκφυλιστική επίδραση του συμπίεστικού φορτίου, αυξάνοντας σημαντικά την έκφραση των γονιδίων της ECM (COL2A1 και ACAN), των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP-1 και TIMP-2) καθώς και της κυτταροκερατίνης-8 (CK8). Παράλληλα, άσκησαν προστατευτική δράση αναστέλλοντας την αύξηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-3 και MMP-13), των ADAMTS πρωτεϊνών (ADAMTS-1 και 5), καθώς και προφλεγμονωδών παραγόντων (IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 και TNF- α) [119].

Πέρα από την έγχυση των νεαρών rADSCs, στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν και γηρασμένα rADSCs, τα οποία είναι rADSCs που υποβλήθηκαν σε γ - ακτινοβολία με σκοπό την πρόωρη κυτταρική γήρανση. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία του πιο τυπικού και ισχυρού δείκτη κυτταρικής γήρανσης, το p16. Πράγματι, στα αποτελέσματα, ήδη από την 1^η πειραματική φάση σημειώθηκε σημαντική μείωση της αναγεννητικής δραστηριότητας με τη 2^η φάση να παρουσιάζει πλήρης απώλεια της δομής και της λειτουργικότητας του ΜΣΔ. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τη μελέτη των Papadopoulou et al., οι οποίοι διερεύνησαν τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας στα ADSCs και έδειξαν ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί πρόωρη κυτταρική γήρανση και οδηγεί σε σημαντικές λειτουργικές και φαινοτυπικές αλλοιώσεις [109]. Τα

ακτινοβολημένα κύτταρα παρουσίασαν απώλεια διαφοροποιητικής ικανότητας, ιδίως στη χονδρογενετική οδό μέσω μείωσης της έκφρασης του SOX9, χαμηλότερη έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών και εμφάνισαν προφλεγμονώδη και καταβολικό φαινότυπο, με αύξηση των IL-6, IL-8, ICAM-1, MMP-1 και MMP-13, καθώς και μείωση του κολλαγόνου τύπου I και του decorin. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα γηρασμένα ή ακτινοβολημένα ADSCs χάνουν τις αναγεννητικές τους ιδιότητες και αποκτούν χαρακτηριστικά που προάγουν τη φλεγμονή και την αποδόμηση του εξωκυττάριου μικροπεριβάλλοντος. Όσον αφορά τον δείκτη κυτταρικής γήρανσης p16, ήδη από την πρώτη πειραματική φάση παρατηρήθηκε ότι η Ομάδα Γ (έγχυση γηρασμένων κυττάρων) εμφάνιζε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με τις Ομάδες Α και Β. Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι και στις δύο τελευταίες ομάδες καταγράφηκαν μη αμελητέες τιμές p16, εύρημα που υποδηλώνει την έναρξη μιας εκφυλιστικής ακολουθίας η οποία σχετίζεται με τον μηχανικό ερεθισμό που προκάλεσε η είσοδος της βελόνας. Στη δεύτερη φάση της μελέτης, η έκφραση του δείκτη p16 αυξήθηκε περαιτέρω και ήταν σημαντικά υψηλότερη στην Ομάδα Γ σε σχέση με την ομάδα έγχυσης νεαρών κυττάρων. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα γηρασμένα κύτταρα ενισχύουν ή επιταχύνουν την εγκαθίδρυση του φαινοτύπου κυτταρικής γήρανσης στον μεσοσπονδύλιο δίσκο, σε αντίθεση με τα νεαρά rADSCs τα οποία φαίνεται να ασκούν πιο προστατευτική και ανασταλτική δράση στη διαδικασία εκφύλισης. Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Alcorta et al. όσον αφορά τη λειτουργία του p16 ως κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής γήρανσης. Τα δεδομένα της μελέτης υποστηρίζουν ότι η αναπαραγωγική κυτταρική γήρανση αποτελεί μια πολυβηματική διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από διαδοχικές μεταβολές στην έκφραση συγκεκριμένων αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, καθώς τα κύτταρα πλησιάζουν το όριο της αναπαραγωγικής τους ικανότητας, παρατηρείται σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης p21, η οποία συμβάλλει στην επιβράδυνση και τελικά στην απώλεια του πολλαπλασιαστικού δυναμικού. Ωστόσο, στη φάση της πλήρους γήρανσης, τα επίπεδα του p21 μειώνονται και στη θέση του αναλαμβάνει κεντρικό ρόλο το p16. Το p16 εμφανίζει εντυπωσιακή αύξηση στη γήρανση, με τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του mRNA να ανέρχονται έως και 40 φορές σε σύγκριση με τα νεαρά rADSCs. Η κομβική αυτή λειτουργία τεκμηριώνει τον ρόλο του p16 ως κύριου μοριακού δείκτη και ρυθμιστή της κυτταρικής γήρανσης, αλλά και ως κρίσιμου παράγοντα στην παθογένεση της εκφύλισης [121].

Η αναγεννητική θεραπεία με τη χρήση MSCs και, ειδικότερα, ADSCs, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική σε σύγκριση με τις συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της εκφυλιστικής νόσου του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ωστόσο, για μια αποτελεσματική ενδοδισκική έγχυση απαιτείται η συνεκτίμηση πολλαπλών κρίσιμων παραμέτρων, όπως: (α) το στάδιο εκφύλισης του δίσκου, (β) το δυσμενές και ιδιαίτερα απαιτητικό βιοχημικό μικροπεριβάλλον του ΜΣΔ, (γ) η ενδεχόμενη επιπρόσθετη βλάβη που μπορεί να προκληθεί από τη διαδικασία της έγχυσης, (δ) η πιθανότητα διαρροής των εγχυθέντων κυττάρων μέσω του σημείου εισόδου ή από εκφυλισμένες περιοχές του δίσκου και (ε) οι σημαντικές δομικές διαφορές που παρουσιάζουν τα μικρά ζωικά μοντέλα σε σχέση με τον ανθρώπινο ΜΣΔ. Επιπλέον, τα ευρήματα της παρούσας πειραματικής μελέτης επιβεβαιώνουν την αναγεννητική ικανότητα της κυτταρικής θεραπείας με ADSCs, καθώς και τη σημασία της κυτταρικής γήρανσης στη δισκική ομοιόσταση. Συγκεκριμένα, η ενδοδισκική έγχυση γηρασμένων rADSCs οδήγησε σε επιτάχυνση της εκφυλιστικής διαδικασίας, υπογραμμίζοντας ότι η παρουσία κυτταρικών πληθυσμών με χαρακτηριστικά γήρανσης μπορεί όχι μόνο να αποδυναμώσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα, αλλά και να επιδεινώσει τη μορφολογική και ιστολογική ποιότητα του ΜΣΔ.

Ωστόσο η παρούσα μελέτη, παρότι προσφέρει σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τον ρόλο της κυτταρικής γήρανσης στην αναγεννητική ικανότητα των ADSCs εντός του μεσοσπονδύλιου δίσκου, συνοδεύεται από ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αρχικά, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στην 6η και 8η εβδομάδα, χρονικά σημεία τα οποία επιλέχθηκαν βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, όπου οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται σε πρώιμες φάσεις (2η, 4η και 6η εβδομάδα), ενώ λιγότερες επεκτείνονται έως τη 10η ή 12η εβδομάδα. Ως εκ τούτου, η επιλογή των συγκεκριμένων χρονικών σημείων κρίθηκε επαρκής για την αποτύπωση των κυτταρικών επιδράσεων στον μεσοσπονδύλιο δίσκο. Επιπρόσθετα, η ενδοδισκική κυτταρική έγχυση πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του νυγμού με τη βελόνη, διαδικασία η οποία παρότι αναγκαία για την εφαρμογή της θεραπείας, δεν αναπαριστά πλήρως τη φυσική, σταδιακή και πολυπαραγοντική πορεία της εκφύλισης του ΜΣΔ στον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να επηρεάζει την αλληλεπίδραση των εμφυτευόμενων κυττάρων με το ενδοδισκικό μικροπεριβάλλον, καθώς και τη δυναμική

της αναγεννητικής απόκρισης. Συνολικά, οι προαναφερθέντες παράγοντες υποδεικνύουν ότι, παρά την αξία της παρούσας μελέτης, απαιτείται περαιτέρω έρευνα με βελτιστοποιημένες πειραματικές συνθήκες, μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και μοντέλα εκφύλισης που να προσομοιάζουν τον ανθρώπινο μεσοσπονδύλιο δίσκο, ώστε να ενισχυθεί η μεταφραστική δυναμική των ευρημάτων στην κλινική πράξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tomaszewski KA, Saganiak K, Gładysz T, Walocha JA. The biology behind the human intervertebral disc and its endplates. *Folia Morphol (Warsz)*. 2015;74(2):157-68. doi: 10.5603/FM.2015.0026. PMID: 26050801.
2. Broberg KB (1983) On the mechanical behaviour of intervertebral discs. *Spine*, 8: 151–165.
3. Ζερβάκης Ν. Δομή, κατασκευή και μηχανική λειτουργία του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Στο: Σάπκας Γ (επιμ.). Εμβιομηχανική – Παθοφυσιολογία του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου και του Νευρικού Ιστού. Αθήνα: Εκδόσεις Καυκάς; 2006.
4. 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.
5. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR Jr (1995) Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat*, 186: 43–53.
6. Colombier P, Clouet J, Hamel O, Lescaudron L, Guicheux J (2014) The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration. *Joint Bone Spine*, 81: 125–129.
7. Marchand F, Ahmed AM (1990) Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine*, 15: 402–410.
8. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract*. 2008 Jan-Feb;8(1):18-44. doi: 10.1111/j.1533-2500.2007.00171. x. PMID: 18211591.
9. Yu J, Winlove CP, Roberts S, Urban JP. Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *J Anat*. 2002; 201:465–475.
10. Errington RJ, Puustjarvi K, White IR, Roberts S, Urban JP (1998) Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat*, 192: 369–378.
11. Inoue H. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine*. 1981; 6:139–146.

12. Nerlich AG, Schaaf R, Walchli B, Boos N (2007) Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs. *Eur Spine J*, 16: 547–555.
13. Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, Harfe BD, Elliott DM (2011) Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech*, 4: 31–41.
14. Chandraraj S, Briggs CA, Opeskin K (1998) Disc herniations in the young and end-plate vascularity. *Clin Anat*, 11: 171–176.
15. Urban JP, Smith S, Fairbank JC (2004) Nutrition of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29: 2700–2709.
16. Crock HV, Goldwasser M. Anatomic studies of the circulation in the region of the vertebral end-plate in adult greyhound dogs. *Spine* 1984; 9:702–6.
17. Ratcliffe JF. The anatomy of the fourth and fifth lumbar arteries in humans: an arteriographic study in one hundred live subjects. *J Anat* 1982; 135:753–61.
18. Maroudas A, Nachemson A, Stockwell R, Urban J. Some factors involved in the nutrition of the intervertebral disc. *J Anat.* 1975; 120:113–130.
19. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Dec 1;29(23):2691-9.
20. Taylor JR, Scott JE, Cribb AM, Bosworth TR. Human intervertebral disc acid glycosaminoglycans. *J Anat.* 1992 Feb;180 (Pt 1):137-41. PMID: 1452468; PMCID: PMC1259617.
21. Grunhagen T, Shirazi-Adl A, Fairbank JC, Urban JP. Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites. *Orthop Clin North Am.* 2011 Oct;42(4):465-77, vii.
22. Bernick S, Cailliet R. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. *Spine* 1982;7(2): 97–102.
23. Grunhagen T. Nutrient transport into intervertebral discs; modelling and electrochemical measurements [thesis/dissertation]. Oxford (UK): University of Oxford; 2010.
24. Vo NV, Hartman RA, Yurube T, Jacobs LJ, Sowa GA, Kang JD. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J.* 2013 Mar;13(3):331-41.

25. Wang WJ, Yu XH, Wang C, Yang W, He WS, Zhang SJ, Yan YG, Zhang J. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta*. 2015 Aug 25; 448:238-46.
26. O'Connell GD, Johannessen W, Vresilovic EJ, Elliott DM (2007) Human internal disc strains in axial compression measured noninvasively using magnetic resonance imaging. *Spine*, 32: 2860–2868.
27. Μπάμπης Γ.Χ., Παπαδόπουλος Η.Χ., Σαπκας Γ. Εμβιομηχανική του Μεσοσπονδύλιου Δίσκου (Εμβιομηχανική ΜΣΔ). Ορθοπαιδική Εμβιομηχανική. Πανεπιστημιακή έκδοση, Ελλάδα, 2024.
28. Guerin HL, Elliott DM (2007) Quantifying the contributions of structure to annulus fibrosus mechanical function using a nonlinear, anisotropic, hyperelastic model. *J Orthop Res* 25: 508–516.
29. Schmidt H, Kettler A, Heuer F, Simon U, Claes L, Wilke HJ (2007) Intradiscal pressure, shear strain, and fiber strain in the intervertebral disc under combined loading. *Spine*, 32: 748–755.
30. Taylor JR, Twomey LT (1988) Growth of human intervertebral discs and vertebral bodies. *J Anat*, 120: 49–68.
31. Roberts S, Urban JP, Evans H, Eisenstein SM (1996) Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine*, 21: 415–420.
32. Whalen JL, Parke WW, Mazur JM, Stauffer ES. The intrinsic vasculature of developing vertebral end plates and its nutritive significance to the intervertebral disc. *J Pediat Orthop* 1985; 5:403-10.
33. Sadaaki O, Matsuda Y, Itoh T, Shibata T, Okumura H, Desaki J. Scanning electron microscopic observations of the vascular structure on vertebral end plates in rabbits. *J Orthop Res* 1994; 12:447-9.
34. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, Risbud MV, Kletsas D, Iatridis JC, Hoyland JA, Le Maitre CL, Sowa GA, Kang JD. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *J Orthop Res*. 2016 Aug;34(8):1289-306. PMC4988945.
35. Adams MA, Roughley PJ. 2006. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila. Pa. 1976)* 31:2151–2161.

36. Mayer JE, Iatridis JC, Chan D, Qureshi SA, Gottesman O, Hecht AC. Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration. *Spine J.* 2013; 13, 3:299–317.
37. Vo, N., & Kang, J. D. (2019). Molecular relationships among obesity, inflammation and intervertebral disc degeneration: Are adipokines the common link? *Biomolecules*, 9(4), 84.
38. Sobajima, S., Kompel, J. F., Kim, J. S., Wallach, C. J., Robertson, D. D., Vogt, M. T., Kang, J. D., & Gilbertson, L. G. (2015). Effects of tobacco smoking on the degeneration of the intervertebral disc: A finite element study. *Spine*, 40(24), 1903–1910.
39. Dowdell J, Erwin M, Choma T, Vaccaro A, Iatridis J, Cho SK. Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery.* 2017 Mar 1;80(3S): S46-S54. doi: 10.1093/neuros/nyw078. Erratum in: *Neurosurgery.* 2018 Nov 1;83(5):1084.
40. Duance VC, Crean JK, Sims TJ, et al. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine.* 1998; 23:2545–2551.
41. Johnson SL, Aguiar DJ, Ogilvie JW. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc. *Spine.* 2000; 25:2742–2747.
42. Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 673:443–453.
43. Adams MA, McNally DS, Dolan P. “Stress” distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br.* 1996; 78:965–972.
44. Adams MA, Dolan P, Hutton WC, Porter RW. Diurnal changes in spinal mechanics and their clinical significance. *J Bone Joint Surg Br.* 1990; 72:266–270.
45. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, Perugia D, DeMartino C. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology. *Spine.* 1994;19:917–922.
46. Maroudas A. Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. *Biorheology.* 1975; 12:233–248.
47. Melrose J, Roberts S, Smith S, Menage J, Ghosh P. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration. *Spine.* 2002; 27:1278–1285.

48. Boos N, Rieder R, Schade V, Spratt KF, Semmer N, Aebi M. Volvo Award in clinical sciences. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging, work perception, and psychosocial factors in identifying symptomatic disc herniations. *Spine* 1995. 1995; 20:2613–2625.
49. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produced matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine*. 1996; 21:271–277.
50. Kawakami M, Tamaki T, Weinstein JN, Hashizume H, Nishi H, Meller ST. Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat. *Spine*. 1996; 21:2101–2107.
51. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, Freeman MAF. In vitro diffusion of dye through the end-plates and annulus fibrosus of human lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand*. 1970; 41:589–607.
52. Horner HA, Urban JP. Volvo Award Winner in Basic Science Studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine* 2001. 2001; 26:2543–2549.
53. Kauppi LI, McAlindon T, Evans S, Wilson PW, Kiel D, Felson DT. Disc degeneration/back pain and calcification of the abdominal aorta. A 25-year follow-up study in Framingham. *Spine*. 1997; 22:1642–1647.
54. Holm S, Nachemson A. Variation in the nutrition of the canine intervertebral disc induced by motion. *Spine*. 1983; 8:866–874.
55. Roberts S, Urban JPG, Evans H, Eisenstein SM. Transport properties of the human cartilage end-plate in relation to its composition and calcification. *Spine*. 1996; 21:415–420.
56. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*. 2001 Sep 1;26(17):1873-8.
57. Modic MT, Masaryk TJ, Ross JS, Carter JR. Imaging of degenerative disk disease. *Radiology*. 1988; 168:177–186.
58. Lee SH, Daffner SD, Wang JC, Davis BC, Alanay A, Kim JS. The change of whole lumbar segmental motion according to the mobility of degenerated disc in the lower lumbar spine: a kinetic MRI study. *Eur Spine J*. 2015;24(9):1893–1900.

59. Ferguson SJ, Steffen T. 2003. Biomechanics of the aging spine. *Eur Spine J* 12: S97–S103.
60. Korompilia M, Gkias I, Gelalis D, Korompilias A, Pakos E, Gelalis I, “Biological approaches in degenerative disc disease. Where are we now?”, *ACTA ORTHOPAEDICA ET TRAUMATOLOGICA HELLENICA*, vol. 72, Issue 1, p 14-20, January- March 2021
61. An HS, Masuda K, Cs-Szabo G, et al. Biologic repair and regeneration of the intervertebral disk. *J Am Acad Orthop Surg* 2011;19(7):450–452
62. Yu Moriguchi, Marjan Alimi, Thamina Khair, George Manolarakis, Connor Berlin, Lawrence J. Bonassar, Roger Härtl, Biological Treatment Approaches for Degenerative Disk Disease: A Literature Review of In Vivo Animal and Clinical Data, *Global Spine J*, 2016;6:497-518
63. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *J Orthop Res*. 2016;34(8):1289-1306.
64. Chubinskaya S, Kawakami M, Rappoport L, Matsumoto T, Migita N, Rueger DC. Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs. *J Orthop Res* 2007;25(4):517–530
65. Gruber HE, Fisher EC, Jr, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN., Jr Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta1. *Exp Cell Res*. 1997; 235:13–21.
66. Wehling P (2002) Antiapoptotic and antidegenerative effect of an autologous IL-1ra/IGF-1/PDGF combination on human intervertebral disc cells in vivo. In: Proceeding of the international society for the study of the lumbar spine, 29th Annual Meeting, Cleveland, OH, p 24
67. Liu, H., Pan, H., Yang, H., Wang, J., Zhang, K., Li, X., Wang, H., Ding, W., Li, B., & Zheng, Z. (2014). LIM mineralization protein-1 suppresses TNF- α induced intervertebral disc degeneration by maintaining nucleus pulposus extracellular matrix production and inhibiting matrix metalloproteinases expression. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(3), 294–303
68. Paglia DN, Singh H, Karukonda T, Drissi H, Moss IL. PDGF-BB Delays Degeneration of the Intervertebral Discs in a Rabbit Preclinical Model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016;41(8): E449-E458.

69. Akeda K, Imanishi T, Ohishi K, et al. Intradiscal injection of autologous serum isolated from platelet rich plasma for the treatment of discogenic low back pain: preliminary prospective clinical trial: GP141. Spine: Affiliated Society Meeting Abstracts 2011.
70. Ma, C., Wang, R., Zhao, D., Wang, N., Han, Y., Wang, S., Gao, T., Wang, B., & Lu, L. (2019). Efficacy of Platelet-Rich Plasma Containing Xenogenic Adipose Tissue-Derived Stromal Cells on Restoring Intervertebral Disc Degeneration: A Preclinical Study in a Rabbit Model. Pain Research & Management, 2019, Article ID 6372356.
71. Μελέτη της αναγεννητικής δράσης των αυτόλογων αυξητικών παραγόντων (platelet rich plasma) σε μεσοσπονδύλιο δίσκο: πειραματικό μοντέλο σε κόνικλους. Χριστοφόρου Γεώργιος. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Χειρουργικός. Κλινική Ορθοπαιδική, 2016
72. Gelalis ID, Christoforou G, Charchanti A, et al. Autologous platelet-rich plasma (PRP) effect on intervertebral disc restoration: an experimental rabbit model. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2019;29(3):545-551
73. Navani A, Ambach MA, Wei JJ and Gupta D, Biologic Therapies for Intervertebral Degenerative Disc Disease: A Review of Novel Applications, J Stem Cells Res, Rev & Rep. 2017; 4(1): 1023
74. Ren XF, Diao ZZ, Xi YM, et al. Adeno-associated virus-mediated BMP-7 and SOX9 in vitro co-transfection of human degenerative intervertebral disc cells. Genet Mol Res. 2015;14(2):3736-3744. Published 2015 Apr 22.
75. Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(2):206-212.
76. Fan, Y., Zhao, L., Lai, Y., Lu, K., & Huang, J. (2022). CRISPR-Cas9-mediated loss of function of β -catenin attenuates intervertebral disc degeneration. Molecular Therapy – Nucleic Acids, 28, 387–396.
77. Leung VYL, Chan D, Cheung KMC. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. European Spine Journal. 2006;15(3):S406–S413
78. Hans Jörg Meisel, Vilma Siodla, Timothy Ganey, Yvonne Minkus, William C. Hutton, Olivera J. Alasevic, Clinical experience in cell-based therapeutics: Disc

- chondrocyte transplantation: A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc, *Biomolecular Engineering*, Volume 24, Issue 1, 2007.
79. Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, Volume 126, Issue 4, 2006
 80. MZ Ratajczak, E Zuba-Surma, M Kucia, A Poniewierska, M Suszynska, J Ratajczak, Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues, *Advances in Medical Sciences*, Volume 57, Issue 1, 2012
 81. Kevin G. Chen, Barbara S. Mallon, Ronald D.G. McKay, Pamela G. Robey, Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics, *Cell Stem Cell*, Volume 14, Issue 1, 2014
 82. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 10, 68 (2019).
 83. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143–147.
 84. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*. 2013 Jul;28(4):387-402.
 85. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
 86. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006; 24:1254–1264.
 87. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418:41–49.
 88. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; 109:1291–1302
 89. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006;107:2570–2577.

90. Hamed-Asl P, Halabian R, Bahmani P, et al. Adenovirus-mediated expression of the HO-1 protein within MSCs decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses. *Cell Stress Chaperones* 2012.
91. Wannemuehler TJ, Manukyan MC, Brewster BD, et al. Advances in mesenchymal stem cell research in sepsis. *J Surg Res* 2012.
92. Romaniyanto FNU, Mahyudin F, Prakoeswa CRS, Notobroto HB, Tinduh D, Ausrin R, Rantam FA, Suroto H, Utomo DN, Rhatomy S. Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) for Regeneration of Intervertebral Disc Degeneration: Review Article. *Stem Cells Cloning*. 2022 Nov 4; 15:67-76.
93. Peng XG, Ju S, Fang F, et al. Comparison of brown and white adipose tissue fat fractions in ob, seipin, and Fsp27 gene knockout mice by chemical shift-selective imaging and ¹H-MR spectroscopy. *Am J Physiol*. 2013;304(2):160–167.
94. Hutchings G, Janowicz K, Moncrieff L, et al. The proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells in neovascularization and angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):1–25.
95. Liang C, Li H, Tao Y, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med*. 2012;10(1):49.
96. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5–14.
97. Vadalà G, Russo F, Ambrosio L, Loppini M, Denaro V. Stem cells sources for intervertebral disc regeneration. *World J Stem Cells*. 2016;8 (5):185–201.
98. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016;43(4):268–274.
99. Hoogendoorn RJW, Lu ZF, Kroeze RJ, Bank RA, Wuisman PI, Helder MN. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: current status and concepts for the future: tissue Engineering Review Series. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2205–2216.
100. Clarke LE, McConnell JC, Sherratt MJ, Derby B, Richardson SM, Hoyland JA. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition,

- and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R67
101. Zhang J, Liu Y, Chen Y, et al. Adipose-Derived Stem Cells: current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem Cells Int*. 2020; 2020:1–26.
 102. Muttigi MS, Kim BJ, Kumar H, et al. Efficacy of matrilin-3-primed adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids in a rabbit model of disc degeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–12.
 103. Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem Cells Dev*. 2006 Feb;15(1):136-7.
 104. Loibl M, Wuertz-Kozak K, Vadala G, Lang S, Fairbank J, Urban JP. Controversies in regenerative medicine: should intervertebral disc degeneration be treated with mesenchymal stem cells? *JOR Spine*. 2019;2(1):e1043
 105. Meisel HJ, Agarwal N, Hsieh PC, et al. Cell therapy for treatment of intervertebral disc degeneration: a systematic review. *Glob Spine J*. 2019;9 (1_suppl):39S–52S.
 106. Poletto DL, Crowley JD, Tanglay O, Walsh WR, Pelletier MH. Preclinical in vivo animal models of intervertebral disc degeneration. Part 1: A systematic review. *JOR Spine*. 2022 Dec 20;6(1):e1234
 107. Mavrogonatou, E. and D. Kletsas, High osmolality activates the G1 and G2 cell cycle checkpoints and affects the DNA integrity of nucleus pulposus intervertebral disc cells triggering an enhanced DNA repair response. *DNA Repair (Amst)*, 2009. 8(8): p. 930-43.
 108. Hayflick L Moorhead PS the serial cultivation of human diploid cell strains *Exp Cell Res* 25 585-621
 109. Papadopoulou, A., V.E. Kalodimou, E. Mavrogonatou, et al., Decreased differentiation capacity and altered expression of extracellular matrix components in irradiation-mediated senescent human breast adipose-derived stem cells. *IUBMB Life*, 2022. 74(10): p. 969-981.
 110. Sklirou, A.D., M.T. Angelopoulou, A. Argyropoulou, et al., Phytochemical Study and In Vitro Screening Focusing on the Anti-Aging Features of Various Plants of the Greek Flora. *Antioxidants (Basel)*, 2021. 10(8).

111. Fotopoulou, A., M.T. Angelopoulou, H. Pratsinis, et al., A subset of human dermal fibroblasts overexpressing Cockayne syndrome group B protein resist UVB radiation-mediated premature senescence. *Aging Cell*, 2025. 24(3): p. e14422.
112. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, Andersson GB, An HS. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Jan 1;30(1):5-14
113. Chung, S.A., S.N. Khan, and A.D. Diwan, The molecular basis of intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am*, 2003. 34(2): p. 209-19.
114. Feng, G., X. Zhao, H. Liu, et al., Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration. *J Neurosurg Spine*, 2011. 14(3): p. 322-9.
115. Sakai, D. and G.B. Andersson, Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. 11(4): p. 243-56.
116. Zhang, W., T. Sun, Y. Li, et al., Application of stem cells in the repair of intervertebral disc degeneration. *Stem Cell Res Ther*, 2022. 13(1): p. 70.
117. Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998 Jul 15;23(14):1531-8; discussion 1539
118. Liang C, Li H, Tao Y, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med*. 2012;10(1):49.
119. Sun Z, Luo B, Liu ZH, Samartzis D, Liu Z, Gao B, Huang L, Luo ZJ. Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy. *Int J Biol Sci*. 2015 Jan 1;11(2):133-43
120. Zhang W, Wang D, Li H, Xu G, Zhang H, Xu C, Li J. Mesenchymal stem cells can improve discogenic pain in patients with intervertebral disc

degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Jun 16; 11:1155357

121. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13742-7.