

ΟΣΦΥΙΚΗ ΣΠΟΝΔΥΛΟΔΕΣΙΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΠΙΚΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Δ. ΤΣΟΥΚΑΣ

Η οπίσθια σπονδυλοδεσία είναι η συνθεότερη μέθοδος σταθεροποίησης της σπονδυλικής στήλης. Η μηχανική σταθερότητα που επιτυγχάνει μπορεί να ανακουφίσει συμπτώματα προκαλούμενα από την εκφυλιστική αρθρίτιδα, τη σκολίωση ή από αστάθεια απότοκη επεμβάσεων δισκεκτομής ή σπονδυλικής στένωσης με ευρεία αφαίρεση οστού.

Παρ' όλες τις σύγχρονες τεχνικές και τα συνεχώς εξελισσόμενα υλικά που χρησιμοποιούνται, το ποσοστό αποτυχίας μιας σπονδυλοδεσίας είναι υψηλό. Η ψευδάρθρωση κυμαίνεται στο 5-40%, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική, την εμπειρία του χειρουργού, την ηλικία του ασθενούς, τον αριθμό επιπέδων σπονδυλοδεσίας, το ιστορικό καπνίσματος, κ.ά. Σημαντικό είναι, επίσης, το γεγονός ότι η λήψη λαγόνιου αυτομοσχεύματος που χρησιμοποιείται τόσο σε πρόσθιες όσο και σε οπίσθιες τεχνικές δεν είναι άμοιρη επιπλοκών²². Το 6-20% των ασθενών εμφανίζουν άλγος ή υπερευαισθησία, και το 3-9% μπορεί να παρουσιάσουν σοβαρότερες επιπλοκές, ενώ στο 1/3 των ασθενών το άλγος στη δότρια περιοχή μπορεί να επιμείνει περισσότερο από ένα έτος⁹. Τα οστικά αλλομοσχεύματα παρουσιάζουν κατώτερο βιολογικό οστεογενετικό δυναμικό, ενώ ελλοχεύει και ο κίνδυνος ανοσολογικής απόρριψης ή μετάδοσης ιών.

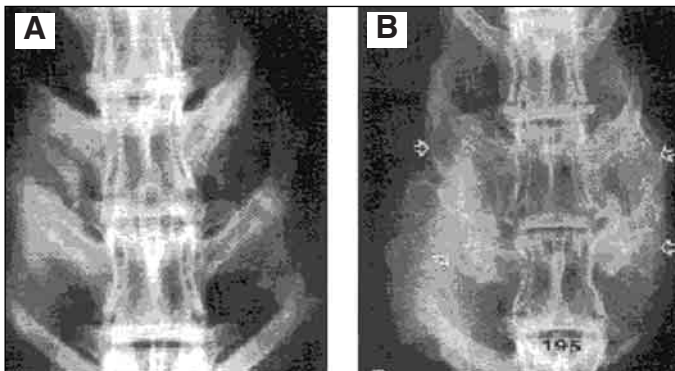
Τα τελευταία χρόνια, η προσπάθεια ελαχιστοποίησης του ποσοστού των ψευδαρθρώσεων και η αναγκαιότητα χρήσης λαγόνιου αυτομοσχεύματος στη σπονδυλοδεσία κατεύθυνε την έρευνα σε περισσότερο βιολογικούς προσανατολισμούς. Έτσι, πρόσφατα έχουμε μια έκρηξη στη χρήση βιολογικών οστεοεπαγωγικών παραγόντων τοπικά στο επιθυμητό επίπεδο αρθρόδεσης^{2,4}.

Οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες περιλαμβάνουν μια οικογένεια πρωτεϊνών που προάγουν *in vivo* την οστεογένεση. Η υπόθεση της ύπαρξης μορφογενετικών οστικών πρωτεϊνών (BMPs) εισήχθη για πρώτη φορά το 1965 από τον Urist¹⁸. Ανθρώπινη BMP από πωματικά οστά (ύστερα από ειδικές τεχνικές λήψης και καθαρισμού) χρησιμοποιήθηκε σε ψευδαρθρώσεις και για την ενίσχυση της δράσης των μοσχευμάτων στην πλήρωση μεγάλων οστικών κενών. Δυστυχώς, ανθρώπινη BMP υπάρχει σε περιορισμένες ποσότητες (1-2 μg/kg φλοιώδους οστού). Με τις σύγχρονες γονιδιακές τεχνικές, επιτεύχθηκε η πλήρης ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών σε αλυσίδα αμινοξέων και το συμπληρωματικό DNA τους (cDNA) απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 7 δυνπτικά οστεογενετικές πρωτεΐνες και 4 εκφράστηκαν σε κύτταρα δέκτη έχοντας αποδεδειγμένη οστεογενετική δράση. Η ανασυνδυασμένη γενετική τεχνολογία επιτρέπει την παρασκευή απεριόριστων ποσοτήτων BMP με συνεχή καθαρότητα.

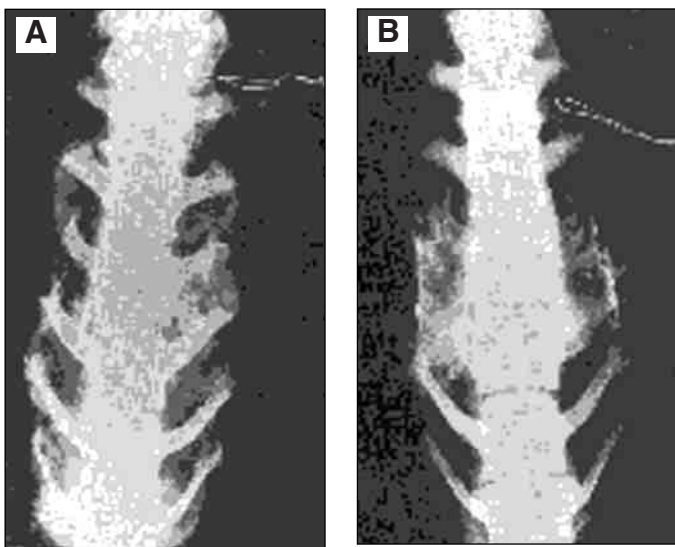
Τα τελευταία πέντε χρόνια, διάφοροι ερευνητές ανέδειξαν ότι η rhBMP-2 και η rhBMP-7 με τον κατάλληλο φορέα τους προάγουν τη σταθερή οπισθοπλάγια σπονδυλοδεσία σε κουνέλια, σκύλους και rhesus πιθήκους χωρίς τη χρήση λαγόνιου αυτομοσχεύματος^{15,16}.

Ο κατάλληλος "φορέας - όχημα" (carrier) είναι απαραίτητος για την αποτελεσματική μεταφορά και αποδέσμευση των οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων στον κατάλληλο χώρο και χρόνο. Οι φορείς αυτοί επιτρέπουν στα βιολογικά ή τα τεχνητά υλικά που χρησιμοποιούνται ως μόσχευμα να καθοδηγούν και να προάγουν την ανάπτυξη τριχοειδών αγγείων, περιαγγειακών ιστών και πρόδρομων οστικών κυττάρων μέσα στην τρισδιάστατη δομή τους⁷. Τέτοιοι φορείς είναι τα κεραμικά υλικά φωσφορικού ασβεστίου (Tricalcium Phosphate, υδροξυαπατίτης), η απομεταλλοποιημένη θεμέλιος ουσία (DBM), το κολλαγόνο, το τιτάνιο, το αυτομόσχευμα, το κοράλλι (σε μορφή αραγονίτη και με δομή όμοια με του σπογγώδους οστού), τα συνθετικά βιοδιασπώμενα πολυμερή (OPLA), κ.ά.^{10,14}

Οι Boden και συν.¹³ (εικόνες 1A, B) παρουσίασαν 100% ποσοστό επιτυχούς μεσεγκάρσιας σπονδυλοδεσίας σε κουνέλι, 4 μήνες μετά την εμφύτευση DBM με rhBMP - 2, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό με αυτομόσχευμα ήταν 42%.



Εικόνα 1A. Λαγόνιο αυτομόσχευμα. **B.** rhBMP - 2 και DBM.



Εικόνα 2A. rhBMP-2 και OPLA. Σπονδυλοδεσία μετά 8 μήνες. **B.** Λαγόνιο αυτομόσχευμα. Σπονδυλοδεσία μετά 8 μήνες.

Οι Cook και συν. ανέδειξαν ότι με τη χρήση οστεογενετικής πρωτεΐνης - 1 (OP-1) επιτεύχθηκε οπίσθια μεσοπετάλιος σπονδυλοδεσία σε σκύλους σε 12 εβδομάδες, ενώ με λαγόνιο αυτομόσχευμα σε 26 εβδομάδες. Οι Sandhu και David σε χωριστές εργασίες κατέδειξαν 100% σταθερή σπονδυλοδεσία σε σκύλους 8 μήνες μετά την εμφύτευση rhBMP-2 και OPLA (open cell poly(lactide acid polymer) (εικόνα 2A), ενώ με λαγόνιο αυτομόσχευμα 0-33% (εικόνα 2B).

Η χρησιμοποίηση οστεοεπαγωγικών αυξητικών παραγόντων με τον κατάλληλο φορέα ήταν επιτυχής σε προκλινικές μελέτες με ζώα και στην πρόσθια μεσοσπονδύλια σπονδυλοδεσία. Οι Sandhu και συν. ανέδειξαν ταχύτατη μεσοσπονδύλια αρθρόδεση, όταν χρησιμοποιήσαν βιδωτούς κλωβούς τιτανίου με rhBMP-2 και όχι αυτομόσχευμα σε μοντέλο ALIF σε πρόβατο. Οι Boden και συν. παρουσίασαν επιτυχή μοντέλα ALIF με rhBMP-2 σε rhesus πιθήκους. Λαπαροσκοπικές τεχνικές πρόσθιας μεσοσπονδύλιας σπονδυλοδεσίας O5-I5 με κλωβούς τιτανίου πραγματοποιήθηκαν σε 7 ζώα²⁴. Στους κλωβούς τοποθετήθηκε υψηλή δόση rhBMP-2 με κολλαγόνο τύπου I σαν φορέα, χαμηλή δόση rhBMP-2 ή καθόλου αυξητικός παράγοντας. Επιτυχείς σπονδυλοδεσίες επιτεύχθηκαν μόνο με την παρουσία rhBMP-2.

Βασιζόμενες στις πολλά υποσχόμενες προκλινικές μελέτες, οι προσεκτικά επιλεγμένες κλινικές μελέτες επιτελούνται με τη χρήση rhBMP-2, βρίσκονται, όμως, ακόμα σε αρχικά στάδια. Μια κλινική μελέτη (Harvinder, Sandhu, et al) σε 14 ασθενείς μόλις έχει ολοκληρωθεί. Ο έλεγχος με C/T στους 3 και 6 μήνες μετεγχειρητικά ανέδειξε οστικό σχηματισμό μέσα στους βιδωτούς κλωβούς τιτανίου (με rhBMP-2 και κολλαγόνο) που χρησιμοποιήθηκαν για την οσφυϊκή πρόσθια μεσοσπονδύλια σπονδυλοδεσία²⁵. Κλινικά συμπεράσματα και τελικά ασφαλή στοιχεία για την παρατηρούμενη οστική ένωση των παρακείμενων σπονδυλικών σωμάτων δεν έχουν ακόμα εξαχθεί. Επίσης, βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές μελέτες για τη χρήση BMPs σε οπίσθια σπονδυλοδεσία.

Όλες οι παραπάνω εργασίες, εκτός από τα αρχικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ανθρώπους και τα ασφαλώς επιτυχή σε ζώα, παρουσίασαν και ένα πρόβλημα: σε ανθρώπους και σε υψηλότερα βιολογικά ζώα απαιτούνται υψηλότερες δόσεις BMPs, χωρίς το αποτέλεσμα να ανταποκρίνεται πάντα στο προσδοκώμενο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε χρήση πρωτεϊνών, για τις οποίες οι υποδοχείς τους δεν εκφράζονται επαρκώς στα ανταποκρινόμενα κύτταρα ή σε κύτταρα που ανταποκρίνονται λιγότερο (οστεοπρογεννήτορες).

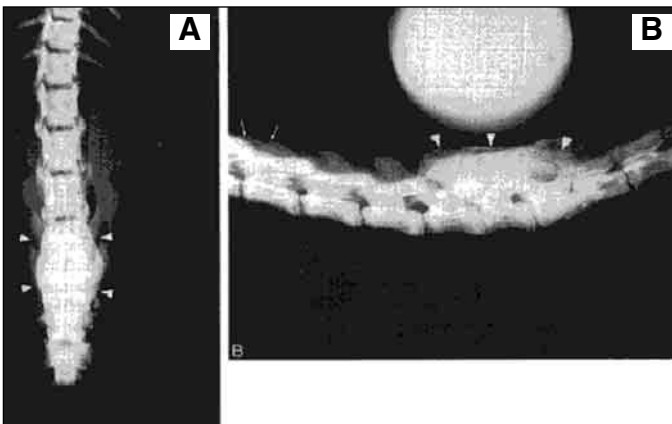
Έτσι, έχουν ξεκινήσει νέες μέθοδοι παρασκευής και μεταφοράς των πρωτεϊνών. Σε πρόσφατη (1998) εργασία τους, οι Boden και συν. κλωνοποίησαν και σειριοποίησαν το cDNA μιας πρωτότυπης οστεοεπαγωγικής

πρωτεΐνης που βρήκαν στο εργαστήριό τους και την ονόμασαν LMP-1. Η ενδοκυττάρια αυτή πρωτεΐνη προάγει *in vivo* το σχηματισμό οστού, όταν το γονίδιο της εκφράζεται σε κύτταρα μυελού των οστών²³.

Σε αντίθεση με τις BMPs που είναι εξωκυττάρια πρωτεΐνες και συνδέονται με υποδοχεία στην επιφάνεια των κυττάρων, η LMP-1 είναι ενδοκυττάριο μόριο και συντίθεται *in situ* μέσα στο κύτταρο, όταν μεταφερθεί μέσα σε αυτό το DNA της, ο γενετικός δηλαδή κώδικας της πρωτεΐνης. Όταν η πρωτεΐνη εκφραστεί, ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση.

Οι ερευνητές μεταμόσχευσαν κύτταρα μυελού των οστών (από μακρά οστά ποντικών) στα επίπεδα Θ11-Θ12 και Ο5-Ο6 14 ποντικών με φορέα DBM. Το cDNA της LMP-1 μεταφέρθηκε μέσα στα κύτταρα αυτά (με φορέα PCMV2) είτε με τη σωστή γενετική σειρά είτε με αντίθετο προσανατολισμό, ώστε να είναι αδύνατη η ανάγνωση του γενετικού κώδικα και επομένως η σύνθεση της πρωτεΐνης. Στα μισά ζώα τα κύτταρα του μυελού με ενεργό το LMP-1 γονίδιο εμφυτεύτηκαν στη θωρακική μοίρα και τα κύτταρα ελέγχου (ανενεργό γονίδιο) στην οσφυϊκή μοίρα, ενώ το αντίθετο έγινε στα άλλα μισά ζώα. Μετά από 4 εβδομάδες διαπιστώθηκε σταθερή αρθρόδεση στα σπονδυλικά επίπεδα που μεταμοσχεύτηκαν κύτταρα μυελού των οστών με το ενεργό cDNA της LMP-1 (ψηλαφητικά, ακτινολογικά και ιστολογικά). Αντίθετα, τα επίπεδα εμφύτευσης κυττάρων στα οποία δεν εκφράστηκε η LMP-1, δεν ανέδειξαν παρά σχηματισμό ινώδους ιστού (εικόνες 3Α, Β).

Έτσι, η πρωτότυπη αυτή ενδοκυττάρια πρωτεΐνη (LMP-1), όταν εκφράζεται μέσω ειδικού γονιδιακού φορέα σε κύτταρα μυελού των οστών, προάγει τον οστικό σχηματισμό *in vivo*, γεγονός που όπως έδειξαν οι ερευνητές δεν οφείλεται ούτε στο φορέα ούτε στα κύτταρα του μυελού που δεν αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη.



Εικόνα 3. Κύτταρα με ενεργό το LMP-1 γονίδιο εμφυτεύτηκαν στην οσφυϊκή μοίρα και με ανενεργό στη θωρακική. **A.** Face. **B.** Profile.

Η γονιδιακή θεραπεία έχει εξελιχθεί την τελευταία δεκαετία σε τέτοιο βαθμό, ώστε να εφαρμόζεται κλινικά σε παθήσεις όπως η μυϊκή δυστροφία και η ινοκυστική νόσος. Το πρόβλημα είναι ότι απαιτείται η έκφραση του ελλείποντος γονιδίου σε μεγάλη επιφάνεια ιστών (πνεύμονας ή σκελετικοί μύες) και για μεγάλο χρονικό διάστημα (όλη την υπόλοιπη ζωή του ασθενούς).

Αντίθετα, η έκφραση της LMP-1 σε ορισμένα κύτταρα μπορεί να επηρεάσει γειτονικά κύτταρα για το σχηματισμό άλλων οστεογενετικών παραγόντων. Η αντίδραση αυτή που πυροδοτείται από την LMP-1 καθιστά τη γονιδιακή της έκφραση απαραίτητη για μικρό χρονικό διάστημα και για μικρό αριθμό κυττάρων.

Η γονιδιακή θεραπεία για την επίτευξη κλινικής αλλά και πειραματικής σπονδυλοδεσίας βρίσκεται σε πρόδρομα στάδια. Ανοίγει, όμως, το παράθυρο σε ένα θαυμαστό κόσμο προοπτικών για ασθενείς με προβλήματα σπονδυλικής στήλης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse process spine arthrodesis using a bovine-derived osteoinductive bone protein. *J Bone Joint Surgery [Am]* 1995, 77:1404-1417.
2. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Volvo Award in Basic Sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion Part II: Study of dose, carrier, and species. *Spine* 1995, 20:2633-2644.
3. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model: Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. *Spine* 1995, 20:412-420.
4. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Chen MI. Volvo Award in Basic Sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part I: The biology of spinal fusion. *Spine* 1995, 20:2626-2632.
5. Chiroff RT, White EW, Weber JN, Roy DM. Tissue ingrowth of replamineform implants. *J Biomed Res Symp* 1975, 6:29-45.
6. Damien CJ, Christel PS, Benediet JJ, Patat JL, Guillemin G. A composite of neutral coral, collagen, bone protein, and basic fibroblast growth factor tested in a rat subcutaneous model. *Ann Chir Gynaecol* 1993, 82:117-128.
7. Damien CJ, Parsons JR, Benedict JJ, Weisman DS. Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J Biomed Mater Res* 1990, 24:639-654.
8. DePalma AF, Rothman RH. The nature of pseudarthrosis. *Clin Orthop* 1968, 59:113-118.
9. Fernyhough JC, Schimandle JH, Weigwl MC, Edwards CC, Levine AM. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 1992, 17:1474-1480.
10. Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen J, Sedel L. Comparison of coral resumption and bone apposition

- with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res* 1989, 23:765-779.
11. Guillemin G, Patat J, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res* 1987, 21:557-567.
 12. Laurie SWS, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984, 73:933-938.
 13. Pouliquen JC, Noat M, Verneret C, Guillemin G, Patat J. Coral as a substitute for bone graft in posterior spine fusion in childhood. *French J Orthop Surg* 1989, 3:272-280.
 14. Roux FX, Brasnu D, Loty B, George B, Guillemin G. Mandreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery. *J Neurosurg* 1988, 69:510-513.
 15. Schimandle JH, Boden SD. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine* 1994, 19:1998-2006.
 16. Schimandle JH, Boden SD, Hutton WC. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rh-BMP-2). *Spine* 1995, 20:1326-1337.
 17. Steinemann JW, Horkowitz HN. Pseudarthrosis of the spine. *Clin Orthop* 1992, 284:80-90.
 18. Urist M. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965, 150:893-899.
 19. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983, 220:680-686.
 20. Watkins MB. Posterolateral bone grafting for fusion of the lumbar and lumbosacral spine. *J Bone Joint Surg [Am]* 1959, 41:388-396.
 21. Wiltse LL, Bateman JG, Hutchinson RH, Nelson WE. The paraspinal sarcospinalis-splitting approach to the lumbar spine. *J Bone Joint Surg [Am]* 1968, 50:919-926.
 22. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989, 3:192-195.
 23. Scott D, Boden MD. Lumbar spine fusion by local gene therapy. *Spine* 1998, 23:2486-2492.
 24. Boden SD, Horton WC. Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rh-BMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *NASS Annual Meeting October 22 - 25, New York 1997*.
 25. Harvinder. Update on spinal applications for rh-BMP-2: *Spinal Frontiers* 1998, 5:8-10.