

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СОФИЯ

Катедра по ортопедия и травматология

Д-р Георги Петров Георгиев

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

НА ТЕМА:

Нова епилигаментарна теория за оздравителния
процес на медиалната колатерална връзка и
невъзможността за такъв при предната кръстна
връзка на колянната става

За присъждане на научна степен „Доктор на науките“ по научна
специалност „Ортопедия и травматология“

София, 2022

Съдържание

Използвани съкращения и означения.....	6
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	10
II.1 Микроскопска и ултраструктурна организация на лигамента и ЕЛ.....	12
II.1.1 Структура на лигамента.....	12
II.1.1.1. Клетъчен състав.....	12
II.1.1.2 Екстрацелуларен матрикс.....	15
II.1.2 Определение на епилигамента.....	21
II.1.2.1 Макроскопска структура на ЕЛ.....	21
II.1.2.2 Светлинно-микроскопска характеристика на ЕЛ.....	22
II.1.2.3 Електронно-микроскопски изследвания на ЕЛ.....	24
II.2 Сравнителна характеристика между ЕЛ и лигамента.....	25
II.3 Образуване на ставната връзка по време на ембрионалното развитие.....	27
II.4 Кръвоснабдяване на ЕЛ и лигамента.....	28
II.5. Инервация на ЕЛ и лигамента.....	30
II.6 Функция на лигамента и ЕЛ.....	32
II.7. Оздравителен процес на ставната връзка при различни типове лечение.....	36
II. 7.1 Оздравителен процес на ставната връзка.....	36
II.7.2. Лечение на МКВ на коляното при експериментални модели на животни.....	40
II.7.2.1 Хирургично vs консервативно лечение.....	40
II.7.2.2 Лечение с/без имобилизация.....	44
II.7.2.3 Дегенеративни промени настъпващи в лигамента и ЕЛ на интактната странична връзка при увреда на предна кръстна и/или медиална странична връзка на колянна става.....	45
II.7.3. Възстановява ли се ПКВ след шев?.....	48
II.8. Подобряване на оздравителния процес.....	50

II.8.1 Използване на растежни фактори.....	50
II.8.2 Трансфер на гени и генна терапия.....	53
II.8.3 Трансфер на гени и генна терапия. Клетъчна терапия, богата на тромбоцити плазма и терапия с протеини.....	54
II.8.4 Биологични скелета.....	55
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	60
IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	62
IV. 1 Вземане на материал от МКВ и ПКВ.....	62
IV. 2 Светлинна микроскопия.....	63
IV. 2.1. Изготвяне на парафинови тъканни срези.....	64
IV. 2.2. Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	65
IV. 2.3 Оцветяване по метода на Малори	66
IV. 2.4 Оцветяване по метода на Ван Гизон.....	67
IV.3 Имунохистохимия	68
IV.3.1 Имунохистохимичен протокол на колаген тип I, проколаген тип III, колаген тип V при човек.....	68
IV.3.2 Имунохистохимичен протокол на колаген тип I, колаген тип III, колаген тип V при плъх.....	70
IV.3.3 Имунохистохимичен протокол на MMP-2 и -9, CD 34, α -SMA и VEGF при човек	70
IV.4 Полуколичествен анализ на имунохистохимичата експресия.....	72
IV.5 Количествен анализ на морфометричния параметри.....	72
IV.6 Трасмисионна електронна микроскопия.....	73
IV.7 Оперативен протокол при увреда на МКВ на колянна става у плъх.....	75
V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	77
V.1 Нормална морфологична структура на ЕЛ при плъх и човек.....	77
V.1.1 Светлинно-микроскопско, електронно-микроскопско и имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх.....	77
V.1.1.1 Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх.....	77

V.1.1.2	Електронно-микроскопско изследване на МКВ и ПКВ при плъх.....	79
V.1.1.3	Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ у плъх.....	82
V.2	Количествен анализ на ЕЛ и лигамента при плъх.....	86
V.3	Светлинно-микроскопско, електронно-микроскопско и имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.....	88
V.3.1	Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.....	88
V.3.2.	Електронно-микроскопско изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек.....	91
V.3.3.	Имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.....	93
V.3.3.1.	Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек.....	93
V.3.3.2.	Експресия на MMP-2 и 9 в ЕЛ на МКВ на човек.....	98
V.3.3.3	Експресия на MMP-2 и 9 в ЕЛ на ПКВ на човек.....	99
V.3.3.4.	Експресия на CD34, α -SMA, VEGF в ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.....	101
V.4	Количествен анализ на ЕЛ и лигамента при човек.....	105
V.5	Експериментален модел на увреда на МКВ на колянна става у плъх.....	107
V.5.1	Светлинно-микроскопско и електронно-микроскопско изследване на ранните промени настъпващи в ЕЛ при експериментален модел на увреда на МКВ на колянна става у плъх.....	107
V.5.1.1	Осми ден след увреда на МКВ.....	107
V.5.1.2	Шестнадесети ден след увреда на МКВ.....	111
V.5.1.3	Тридесети ден след увреда на МКВ.....	116
V.6	Имунохистохимично изследване (колаген тип I, III, V) на ранните промени настъпващи в ЕЛ при експериментален модел на увреда МКВ на колянна става у плъх.....	122
V.6.1	Осми ден след увреда на МКВ.....	122
V.6.2	Шестнадесети ден след увредата на МКВ.....	122
V.6.3	Тридесети ден след увреда на МКВ.....	123
VI.	ОБСЪЖДАНЕ.....	124
VI.1	Анатомия и морфология на МКВ и ПКВ на колянната става и тяхната съединително-тъканна обвивка нар. епилигамент.....	124

VI.2 Слабости на направените морфологични изследвания.....	150
VI.3 Лигаментарни увреди на коляното.....	151
VI.3.1 Оздравителен процес на МКВ.....	157
VI.3.1.1 Фази на оздравителния процес.....	159
VI.3.1.2 Експериментални данни на оздравителния процес на МКВ.....	164
VI.3.1.3 Експериментални данни на оздравителния процес на ЕЛ на МКВ.....	167
VI.4 Слабости на направените морфологични изследвания.....	171
VII. ИЗВОДИ	173
VIII. ПРИНОСИ	177
IX. БИБЛИОГРАФИЯ	179

Използвани съкращения и означения:

медиалната колатерална връзка – МКВ
предната кръстна връзка – ПКВ
епилигамент – ЕЛ
сканираща електронна микроскопия – СЕМ
трансмисионната електронна микроскопия – ТЕМ
матриксните металлопротеинази – ММП
екстрацелуларния матрикс – ЕЦМ
невропептид Y – NPY
вазоактивен интестинален пептид – VIP
комплекса бедрена кост-МКВ-тибия – КБМТ
инсулиноподобния растежен фактор-I – IGF-I
трансформация растежен фактор – TGF- β
тромбоцитния растежен фактор – PDGF
съдовия ендотелен растежен фактор – VEGF
фибробластния растежен фактор – FGF
мезенхимни стволови клетки – МСК
свинската тънкочревна субмукоза – СТС
3,3'-диаминобензидин тетрахидролорид – DAB
фосфатно-буфериран физиологичен разтвор – PBS
ligamentum popliteum obliquum – LPO
антеромедиално – АМ
постеролатерално – ПЛ
тъканни инхибитори на металлопротеази – ТИМП

I. Въведение

В съвременната литература има натрупано значително количество научна информация относно структурата и функцията на ставните връзки. Въпреки това, проблемът при оздравителният процес идва от значителните физиологични и структурни промени, които тя претърпява след травма. Тези промени, както в биологията, така и в биомеханичните отнасяния, водят до непълното ѝ възстановяване. Новосформираната тъкан, т. нар. неолигамент е с по-лоши биологични и биохимични качества. В резултат на това ставната връзка е със значителен лакситет, което довежда до увреди на самата става, които в бъдеще могат да доведат до ставна нестабилност, хронична болка, нарушена функция и остеоартроза.

Връзковият апарат на колянната става е сред най-честите увреди, като честотата му е 2/1000 души годишно по света и най-вече при хората, занимаващи се активно със спортна дейност. Деветдесет процента от травмите на връзките на колянната става засягат предната кръстна връзка (ПКВ) и медиалната колатерална връзка (МКВ). МКВ е лигаментът, който най-често подлежи на нараняване, като по-голям процент от увредите са изолирани и най-често се наблюдават при млади атлети. Въпреки добрите резултати, трябва да се посочи, че ремоделираните МКВ са изложени на риск от трайно удължаване, тъй като не могат да възвърнат първоначалната си дължина, което може да доведе до механична нестабилност на колянната става. Това впоследствие увеличава плъзгането между ставните повърхности, и причинява промени в разпределението на товара върху ставата, което води до допълнителни увреди на ставния хрущял.

Руптурата на ПКВ е втората по честота увреда след дисторзията на глезена сред колежанските атлети, като честотата се увеличава с 1,3% годишно. Тази увредата е честа причина за нестабилност на коляното, което повлиява функцията и на други структури на коляното. Това може да доведе до менискални и дегенеративни промени на ставния хрущял. Добре известен факт е, че за разлика от МКВ, ПКВ има лоша оздравителна способност, като в литературата съществуват редица обяснения за това.

Поради по-лошите механичните свойства за МКВ след увреда дори години след травмата, както и невъзможността на регенерация на ПКВ съществуват голям брой морфологични и клинични проучвания с цел да се разберат по-добре процесите на зарастването, ремоделирането на МКВ, както и невъзможността за първично зарастване на ПКВ. Нуждата от постигането на тези цели стимулират изследователите да търсят нови и иновативни методи за лечение. Поради сложния биологичен процес новите подходи трябва да се развиват в сътрудничеството между различни дисциплини, а не чрез индивидуалистичен подход в изследванията.

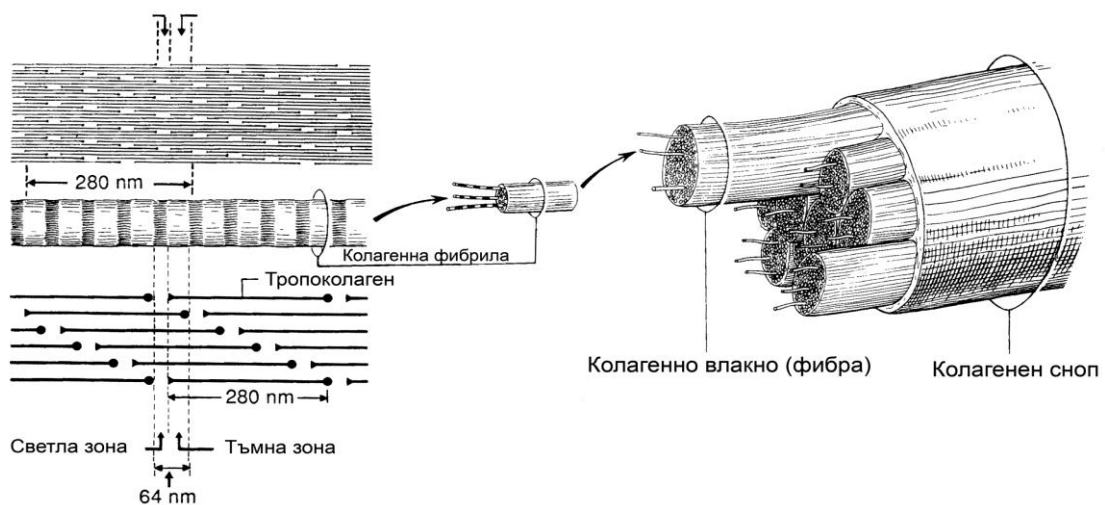
В търсене на отговорите и обясненията на гореизложените проблеми и с оглед на факта, че хистологията на ставните връзки е добре проучена, изследванията на настоящата работа се насочиха към една “проста“ и непредизвикваща до скоро интерес както сред морфолозите, така и сред ортопедичната общност обвивка на ставната връзка нар. епилигамент (ЕЛ). Поради голямото клинично значение и научен интерес, както към структурните особености, така и към начина на възстановяване на МКВ и ПКВ, като едни от най-честите увреди на колянната става, изучаването на ЕЛ именно на тези две връзки е основна тема на настоящият труд.

Но какви са литературните данни за ЕЛ и какво представлява той? Първоначално Вгау и съавт. (1990) описават тази структура, като

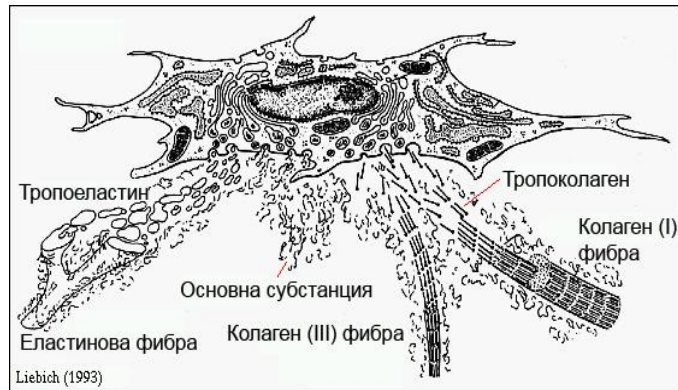
“покриваща лигаментна съединително-тъканна обвивка, която се отстранява заедно с него, но може да бъде разграничена от действителната лигаментарна тъкан”. В следствие съществуват основно предположения, че ЕЛ може да има роля в нарастването и възстановяването на лигаментите, както и да контролира навлизането на вода и метаболитно активни вещества в лигаментите. Тези оскъдни литературни данни, както и изключителното значение на експерименталните модели и морфологията за развитието на медицината е основна движеща сила на настоящето изследване. Целта бе ясна – представените нови данни да създадат една нова теория относно оздравителния процес на МКВ, както и създаване на нова хипотеза относно компрометираният оздравителен процес на ПКВ.

II. Литературен обзор

Ставните връзки, в това число и връзките на колянната става се дефинират като плътни, белезникави структури свързващи двата съседни края на костите. Те са изградени от колагенни фибри състоящи се от колагенни фибрили, които оформят колагенни снопове. Групи от колагенни снопове изграждат по-големи структури, нар. фасцикули, които са основните субединици на тъканта (Arnoczky и съавт., 1993; Laurencin и Freeman, 2005; Mescher и съавт., 2018) (Фиг. II.1). Те са разположени паралелно една на друга по посока на въздействащата сила. Притежават характерна вълнообразна структура, благодарение на която се намалява сътресението на ставната връзка (Khatod and Amiel, 2003). Между колагенните влакна се разполагат и основните клетки на лигамента – фибробластите. Тези клетки имат най-често вретеновидна форма и са наредко разположени в тъканта в права линия по дължината на колагенните влакна (Doroski и съавт., 2007) (Фиг. II.2). Като цяло латералният и медиалният лигамент на колянната става имат приблизително еднаква морфология и колагенно съдържание (Bland и Ashhurst, 1996).

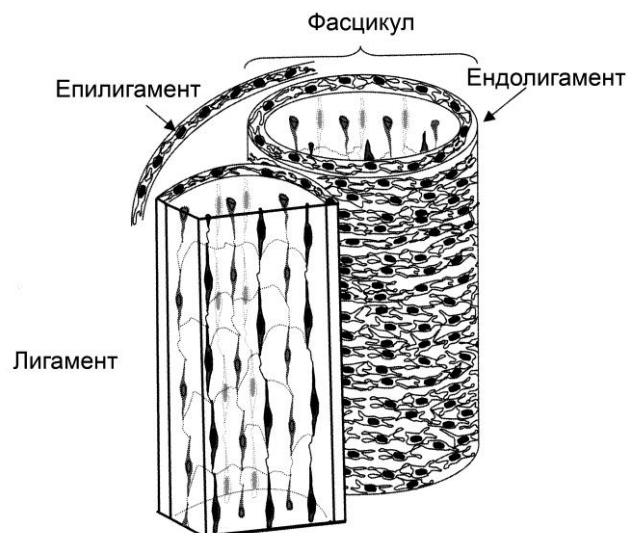


Фиг. II.1 Организация на колагенните фибрили, влакна и снопове (Junqueira и сътр. 1998).



Фиг. II.2 Схема на фибробласт (Liebich, 1993)

Ставните връзки притежават много добре кръвоснабдена и инервирана съединително-тъканна обвивка, добре разграничима от самия лигамент и преминаваща в периоста около инсерциите на лигамента нар. епилигамент (ЕЛ) (Chowdhury и съавт., 1991; Lo и съавт., 2002*a,b*; Frank и съавт., 1999*b*; Frank, 2004; Georgiev и Vidinov, 2009) (Фиг. II.3). ЕЛ продължава в дълбочина на ставната връзка, като съединително-тъканна структура нар. ендолигамент, която обвива отделните фасцикули (Lo и съавт., 2002*a,b*; Frank, 2004; Georgiev и Vidinov, 2009).



Фиг. II.3 Схема на лигамент, епилигамент и ендолигамент (Lo и съавт., 2002).

II.1 Микроскопска и ултраструктурна организация на лигаментата и ЕЛ

II.1.1 Структура на лигаментата

Ставната връзка се състои от клетъчна компонента и извънклетъчен матрикс (Lin и съавт., 2004). Клетъчната компонента е представена от фибробласти и малък брой други клетки, докато екстрацелуларният матрикс е преди всичко изграден от колаген, протеогликани, тенансин – С и малки количества други протеини и ензими (Khatod и Amiel, 2003; Wang, 2006; Mescher и съавт., 2018).

II.1.1.1. Клетъчен състав

От историческа гледна точка клетките на ставната връзка са описани като относително изолирани вретеновидни структури, разположени между отделните колагенни влакна и играят роля в продукцията на колагена и поддържането на междуклетъчния матрикс. Днес се смята, че морфологията на тези клетки варира и те представляват една от основните компоненти на лигаментата (Benjamin and Ralphs, 1997; Lo и съавт., 2002*a,b*; Chi и съавт., 2005). Установено е, че тези клетки са разположени в цялостни триизмерни редици и се свързват по между си чрез дълги цитоплазмени израстъци, както по продължение в самата редица, така и с клетките от съседни редици (Schwab и съавт., 1998; Frank и съавт., 1999*a*; Benjamin and Ralphs, 1997; Lo и съавт., 2002*a,b*; Mescher и съавт., 2018). Това подреждане показва комплекс от свързани клетки, който се намира от единия до другия край на лигаментата и е наречен “клетъчен матрикс” (Chi и съавт., 2005). Смята се, че този клетъчен матрикс облекчава преноса на информация към лигаментата и контролира отговора му на биохимични и механични въздействия (нещо

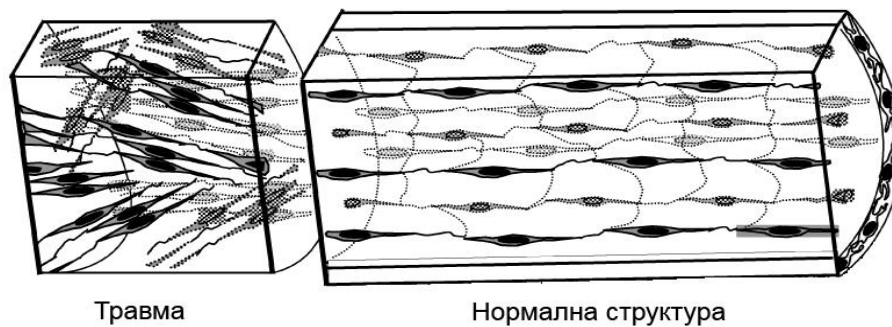
отричано дотогава). Chi и съавт. (2005) чрез сканираща електронна микроскопия (SEM) потвърждават близкостоящите клетки от една редица като предствят и разликите по отношение на клетъчната морфология, подреждането на самите клетки, както и пространствата между тях. По плазмената мембрана на фибробластите те откриват вдлъбнатини, които се явяват места за фибрилогенеза, подобна на тази при сухожилията (Фиг. II.2). Отделните фибробласти имат едно ядро, което има приплесната или сферична форма. Прикрепени до ядрото са центрозоми състоящи се от две центриоли. Центрозомата е заобиколена от добре представен апарат на Голджи. Цитоплазмата съдържа обширен цитоскелет, който играе важна роля и участва при предаването на биомеханична и химична информация (Lo и съавт., 2002*a,b*).

Клетките на ставната връзка притежават изобилие от големи цитоплазмени израстъци насочени към заобикалящите ги колагенни влакна. Някои от клетките са тясно свързани с колагенните влакна на лигамента, докато други притежават “перицелуларен матрикс”. Той съдържа колагенни влакна с малък диаметър, еластинови влакна и множество везикули (Chi и съавт., 2005). Той покрива както клетъчното, тяло така и цитоплазмените израстъци. Перицелуларният матрикс формира пълни с везикули пластове, разделяйки колагенните влакна в екстрацелуларния матрикс. Частта от клетките разположени извън латералната част на редицата, далече от междуклетъчните контакти са често свързани с малко, трудно забелязващо се пространство нар. “перицелуларно пространство” (Chi и съавт., 2005). В тези региони клетките лежат директно върху плазмената мембрана. Трансмисионната електронна микроскопия (TEM) разкрива два типа места на свързване на отделните клетки: първи тип – клетките се прикрепят в широки участъци, като двете ядра са максимално доближени едно към друго. При втория тип свързване клетките комуницират чрез разтягане на

клетъчното тяло и техните ядра се разполагат на известно разстояние от доближаващите се повърхности на клетките (Chi и съавт., 2005). В този случай повърхостта на свърване е по-малка. Този тип свързване на отделните клетки по редицата се осъществява чрез т. нар. цепковидни контакти или “gap junctions”. Откриването на тези контакти е важно при разбирането на начина по който лигаментът се нагласява към стимулите, тъй като те позволяват директен трансфер на сигнални молекули от клетка на клетка (Segretain and Falk, 2004). Тези свързвания са подчинени на фамилия протеини, нар. конексини, които имат над 20 изоформи при човека (Herve и съавт., 2004; Segretain and Falk, 2004, Sohl and Willecke, 2004). До днес две изоформи CX 43 и 32 са открити при лигаментите (Lo и съавт., 2002a). Вследствие на разположението на “gap junctions” между съседни клетки на лигамента в редицата се придава биполярност на тези клетки. “Gap junctions” са уникални мембранни структури, които позволяват трансфер на малки молекули (под 1 kDa) между свързаните клетки. Те са изградени от две хексамерни връзки (connexons), всяка една от които е предоставена от две съседни клетки. В пространството между двете клетки тези връзки взаимодействат и съкращават междуклетъчното разстояние, като формират плътно прилягащи, ограничени с двойни мембрани междуклетъчни канали. Тези канали са включени в междуклетъчната комуникация, която е важна за развитието, функцията и клетъчната хомеостаза на ставната връзка (Chi и съавт., 2005).

Проучването на оздравителния процес на ставната връзка показва, че тя се характеризира с богата клетъчност, представена от множество сравнително къси редици от клетки разположени хаотично. Нарастналият брой клетки се дължи на разположените в голяма близост отделни редици (Фиг. II.4). При тази структурна характеристика се нарушават контактите, както между фибробластите от една редица, така и между отделните редици.

Именно това нарушава взаимодействието между отделните клетки и компрометираща механичните отношения на тъканта. Ето защо се смята, че нарушаването на биомеханиката на ставната връзка се дължи на невъзможността на клетките да установят междуклетъчни контакти и следователно да оформят функционален клетъчен матрикс (Lo и съавт., 2002a).



Фиг. II.4 Структура на ставната връзка при травма и норма (Lo и съавт., 2002).

В литературата липсват данни за промените в междуклетъчния състав на ЕЛ при различни функционални и травматични състояния.

II.1.1.2 Екстрацелуларен матрикс

От биохимична гледна точка екстрацелуларният матрикс на лигаментата се състои от колаген, еластин, протеогликани, гликолипиди, вода (65-70%). Средно 70-80% от сухото вещество е представено от колаген тип I (Mescher и съавт., 2018). Той е изграден от белтъчни единици - тропоколаген с дължина 280 nm и ширина 1.5 nm. Тропоколагенът се състои от три полипептидни вериги образувачи тройна спирала. Различията в химичната структура на тези полипептидни вериги определят и различните типове колаген. Тропоколагенните молекули агрегират в микрофибрилни субединици, които образуват колагенните фибрили. Те са тънки удължени

структури с вариращ диаметър (20 - 90 nm), притежаващи напречни стрии с характерна периодичност от 64 nm. Тази стриираност се дължи на застъпването на тропоколагеновите молекули (Фиг. II.1). Тъмните участъци се визуализират, тъй като задържат по-голяма част от оловото използвано при обработката за ТЕМ поради това, че те имат повече свободни групи и реагират по-силно от светлите участъци.

Смята се, че колагенът е относително метаболитно инертен и има намалена жизнеспособност от 300 – 500 дни. Някои от компонентите на колагеновите молекули се реорганизируют по-бързо от други и това е от важно функционално значение при адаптационните процеси на околната среда (травматични или патологични процеси) (Woo и съавт., 2005). Колагенните влакна имат способността да формират ковалентни и вътремолекулни връзки помежду си, което обяснява тяхната разтегливост и устойчивост. Все още не е напълно изяснена ултраструктурната картина на колагенната мрежа при различни патологични състояния.

В екстрацелуларния матрикс на ставната връзка преобладават главно колаген I, III, V, като тип I е в най-голямо количество (Scott-Burden, 1994; Frank, 2004; Silver и съавт., 2005; Mescher и съавт., 2018). Те заедно с колаген тип II и XI спадат към фибрил-образуващите колагени (Junqueira и съавт., 1998; Mescher и съавт., 2018). Способността на колагена да осигурява силата на тъканите е важна характеристика, която зависи най-вече от структурата на неговата молекула. При колаген тип I и III се наблюдават спирални структури, които оформят дълги влакна, от чиято организация и диаметър зависи силата на тъканта. Колагенът формира триизмерна двойна спирална линия (superhelix), насочена по посока на часовниковата стрелка. Тази триизмерна двойна спирала се състои от три по-малки ориентирани обратно на часовниковата стрелка спирали, чиято структура осигурява висока якост посредством тяхната твърдост и нееластичност (Martin и съавт., 1998).

Основната пептидна редица на тези малки спирали се състои от глицин –X – Y повторения, където X – Y са пролин-хидроксипролин, съответно при 10% от тези повторения. Малкият размер на глицина позволява близкото пакетиране (Khatod и съавт., 2003), докато пролин-хидроксипролин осигурява спиралната структура, като по този начин спомага за твърдота на структурата на белтъка (Martin и съавт., 1998).

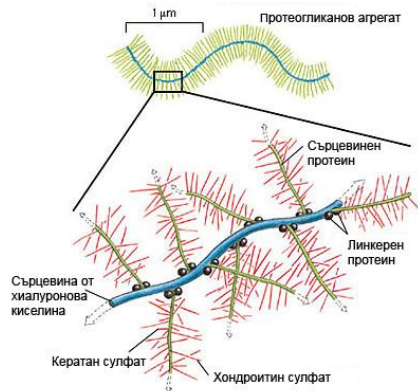
Друга важна характеристика на колагена е способността да образува напречни свързвания между отделните влакна. Те стабилизират механично влакната и подобряват издръжливостта на тъканта (Viidik, 1980; Kuhn, 1987). Бисулфидните връзки например, които се образуват при разпада на цистеина са открити при колаген тип III и други типове колагени (Tanzer, 1976). Други типове връзки са незрелите дихидроксилизионорлевцин и хидроксилизионорлевцин. Не е изяснено кога при патологични състояния се разкъсват тези връзки.

Освен горепосочените типове колаген в лигаментите се съдържат и малки количества от колаген тип VI, IX, X, XI, XII, XIV (Bray и съавт., 1993; Liu и съавт., 1995; Frank и съавт., 1999b; Riechert и съавт., 2001; Hsu и съавт., 2010; Mescher и съавт., 2018). Установено е, че напр. колаген тип III, който е характерен за ембрионалните тъкани (Bailey и съавт., 1973; Witkowski и съавт., 1997; Mescher и съавт., 2018) е необходим за зарастването. Смята се, че високите нива на колаген тип III водят до по-малък диаметър на колагеновите влакна по време на оздравителния процес и съответно пониските механични отнасяния на новообразуваната тъкан (Amiel и съавт., 1987; Romanic и съавт., 1991; Eriksen и съавт., 2002; Jia и съавт., 2005; Tashiro и съавт., 2006; Hsu и съавт., 2010). Колаген тип V, който се среща както в матрикса на лигамента, така и в неговата обвивка се счита, че служи за регулатор на диаметъра на колагеновите фибрили на колаген тип I (Linsenmayer и съавт., 1993; Niyibizi и Euge, 1993; 1994; Liu и съавт., 1995;

Niyibizi и съавт., 2000). Освен тип III и тип V се увеличава при оздравителния процес, като остава увеличен до края на първата година (Niyibizi и съавт., 2000). Счита се, че колаген тип V също играе роля в регулацията на тип I (Niyibizi и съавт., 2000; Woo и съавт., 2006). Тип XII служи за осигуряване на приплъзването на отделните колагенни влакна. Тип IX, X, XI се намират в близост до инсерцията на връзката и съществуват заедно с тип II. Предполага се, че тези типове намаляват стреса, като натоварванията се предават от лигамента към костта (Woo и съавт., 2005).

В литературата съществуват твърде оскъдни данни за разпределението на различните типове колаген в ЕЛ (Bland и Ashhurst, 1996). Не са установени количествените и качествените взаимоотношения на фибрил-образуващите колагени и тяхната функция в ЕЛ.

Протеогликаните са друга важна съставка на екстрацелуларния матрикс на лигамента, поради тяхното участие по отношение на вискоеластичните и механични отнасяния на връзката (Kavanagh и Ashhurst, 2001; Wang, 2006). В най-голямо количество е декоринът. Протеогликаните се състоят от вериги от глюкозаминогликани, като дерматан сулфат, хондроитин сулфат, кератан сулфат и хепаран сулфат (Фиг. II.5) (Junqueira и съавт., 1998; Mescher и съавт., 2018). Отрицателно заредените глюкозаминогликани се отблъскват едни от други, като по този начин привличат водните молекули и хидратират структурата си (Khatod and Amiel, 2003). Хидратацията причинява набъбване на протеогликаните, в резултат на което те се явяват като един вид амортизатори на ставната връзка (Scott-Burden, 1994).



Фиг. П.5 Схема на протеогликан (Lo и съавт. 2002).

Важни съставки на екстрацелуларния матрикс на ставните връзки имащи отношение към оздравителния процес са: гликопротеинът фибронектин и глюкозаминогликанът хиалуронова киселина (Frank и съавт., 1999b). Фибронектинът (fibra-влакно; nexus-връзка) е гликопротеин, синтезиран от фибробластите и някои епителни клетки. Той има молекулна маса 222-240 kDa и има места за свързване с колагена и глюкозаминигликаните. По този начин той участва в клетъчната адхезия и миграция и улеснява оздравителния процес (AbiEzzi и съавт., 1997; Junqueira и съавт., 1998; Mescher и съавт., 2018).

Хиалуроновата киселина също играе важна роля в оздравителния процес, като участва в процеса на освобождаване на разтежни фактори, ангиогенезата, клетъчната адхезия, миграционните процеси, диференциацията, колагенната синтеза и агрегацията (Hardingham и Fosang, 1992; Yanagishita, 1993; Frank и съавт., 1999b).

Матриксните металопроотеинази (ММП), известни още като матриксини, са група от калций и цинк зависими ендопептидази, които са отговорни за разграждането и възстановяването на различни компоненти на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). ММП-зи играят важна роля при оздравителния процес, както

и в процеса на ремоделиране (Armstrong и Jude, 2004). Различни ММП се експресират в ставните връзки. Поради научният интерес към колянната става, наличието на тези ензими е изследвано в МКВ и ПКВ. Наличието на различни ММП, включително ММП-1, 2, 14, 17, 23А, и 23В и TIMP-4 са в значително по-високи нива в МКВ, отколкото в ПКВ. Доказани са също и наличието в ставните връзки на ММП-21, 23А, 23В, 24, 25, 26, 27 и 28. Zhang и съавт. (2009) представят, че ПКВ експресира много повече ММП-2 от МКВ при механично нараняване. Тъй като ММП до голяма степен участват в промените, които настъпват в ЕЦМ, различната им експресия би могла да обясни различния потенциал на зарастване на МКВ и ПКВ. Високите нива на ММП-2, особено 62 kD MMP-2, може да се активира от други членове на ММП-зи, които да ускорят разграждането му след усредата (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). В литературата липсват данни за експресията на различни ММП-зи в ЕЛ, както в норма, така и при травматични състояния.

Лигаментите съдържат и тенансин – С. Той се свързва с фибронектина (Bradshaw and Sage, 2000) и неговата експресия се предизвиква при механично натоварване на ставата (Vunjak-Novakovic и съавт., 2004). Доказано е, че той променя (модулира) активността на разтежните фактори (Bradshaw and Sage, 2000) и инхибира β_1 интегрин зависимата клетъчна адхезия (Probstmeier и Pesheva, 1999). Поради факта, че този протеин е открит в по-големи количества в лигамента и сухожилието, отколкото в останалите ставни структури, той може да се използва като тъканно-специфичен маркер (Vunjak-Novakovic и съавт., 2004).

В заключение може да се каже, че компонентите на екстрацелуларния матрикс на лигамента са организирани в йерархична система, чиято роля е преди всичко да усъвършенства издръжливостта на връзката (Martin и съавт., 1998).

II.1.2 Определение на епилигамента (ЕЛ)

Подобно на останалите структури на опорно-двигателния апарат, като кости, хрущяли, мускули и сухожилия, ставните връзки притежават повърхностен съединително-тъканен слой, ЕЛ (Bray и съавт., 1990; Chowdhury и съавт. 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009). Това понятие е въведено за първи път в литературата от Bray и съавт. (1990) в статията “Съдова анатомия на лигаментите на колянна става при зайци”. Авторите описват ЕЛ като ясно различима съединителнотъканна ципа, която обгражда ставната връзка и се отделя едновременно с нея при дисекция. Терминът ЕЛ произлиза от (epi [Greek – на, върху]; ligament [Latin – ставна връзка, лигамент]. Тази съединително-тъканна ципа продължава в структура нар. ендолигамент, която разделя колагенните снопове по дължината на ставната връзка, като ги оформя във функционално независими единици и осигурява връзката на стромата на лигамента с ЕЛ (Chowdhury и съавт., 1991). Предполага се, че връзката на ЕЛ – ендолигамент обособява ставната връзка като единна структурна и функционална единица, която има важно значение за функцията на ставата (Chowdhury и съавт., 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009).

II.1.2.1 Макроскопска структура на ЕЛ

ЕЛ се описва като нежна прозираща тъкан, покриваща ставната връзка. Детайлното изследване на тази съединителнотъканна структура показва, че тя е подвижна във всички посоки и е по-гъвкава от самия лигамент. При остъргване с острие на скалпел обаче ЕЛ не се отделя изцяло от лигамента, като отделянето му е свързано с нарушаване на целостта на ставната връзка. Извънставната повърхност на ЕЛ е видима дори с невъоръжено око, докато

обърнатата му към ставата повърхност е изключително нежна и може да се види само с увеличителна лупа. ЕЛ продължава върху съседни структури като напр. кост, а при МКВ и към менискуса. При млади животни тази съединителнотъканна мембрана е по-трудно различима и има пихтиеста консистенция в сравнение с възрастни. Множество кръвоносни съдове се наблюдават по нейната повърхност, особено при инжектиране на мастило по време на перфузията на животното (Gray и съавт., 1990; Chowdhury и съавт., 1991). Те се кръстосват помежду си и косо навлизат към повърхността на лигамента. Някои от големите кръвоносни съдове се наблюдават при прехода им от периоста към костта, продължението им по дължината на връзката и преминаването им към противоположния край, където преминават в периоста на другото залавно място. Под увеличителна лупа може да се наблюдава преминаването на съдовете към матрикса на ставната връзка.

II.1.2.2 Светлинно-микроскопска характеристика на ЕЛ

При светлинномикроскопско наблюдение на извънставната повърхност на ЕЛ на МКВ у заек, Chowdhury и съавт. (1991) описват клетки, притежаващи множество израстъци (шипчести клетки) и адипоцити (мастни клетки). При изследването на повърхността на ЕЛ към колянната става тези автори откриват освен шипчести и клетки с кубоидална форма, но липсват адипоцитите. Те смятат, че различната структура на тези повърхности може би е свързана и с различни функционални качества на ЕЛ в зависимост от локализацията му. На определени места ЕЛ продължавайки в ендолигамента навлиза в дълбочина на ставната връзка (Chowdhury и съавт., 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009). Chowdhury и съавт. (1991) отбелязват и непостоянния размер и форма на шипчестите клетки,

съпоставяйки ги с фиброцитите на лигамента. Поради факта, че тези клетки са разположени навсякъде в ЕЛ някои автори смятат, че те са отговорни за синтезата и поддържането на околния екстрацелуларен матрикс, в частност на колагена (Chowdhury и съавт. 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009).

Другият тип клетки – кубоидалните, формират мембранозен слой, който е най-добре развит срещу медиалния мениск. Мембранозният слой продължава в синовията на ставната капсула и не се наблюдава по останалата повърхност на ЕЛ на МКВ. Предполага се, че тези клетки са специализирани клетки на ЕЛ, като представляват остатъци от ембрионалната част на ставната кухина. Кубоидалните клетки, формиращи слоя са по-добре разграничими при възрастни. При изследванията възху LCL на колянна става на плъх този тип клетки не са установени, което потвърждава присъствието им само по повърхността контактуваща със ставната кухина (Georgiev и Vidinov, 2009).

Третият тип клетки – адипоцити, са наблюдавани само по извънставната повърхност на ЕЛ и изглеждат типични мастни клетки подобни на тези изграждащи бялата мастна тъкан (Chowdhury и съавт., 1991). Богатството и разположението на тези клетки в ЕЛ варира, като при възрастни животни те са повече (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и Vidinov, 2009). Смята се, че адипоцитите участват в метаболизма и натрупването на липиди в ставната връзка. Групирането на тези клетки в гроздове вероятно е механизъм, служещ като пакетиращ материал за ставната връзка (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и Vidinov, 2009).

При светлинно-микроскопко изследване на ЕЛ на МКВ на заек и плъх се наблюдават и нервни стволоче, които са разположени само в извънставната част на ЕЛ (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и съавт. 2015). Често нервните структури се съпровождат от кръвоносни съдове, но се

наблюдават и свободни такива (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и Vidinov, 2009).

В заключение може да се каже, че ЕЛ е една динамична структура (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и Vidinov, 2009). Тя представлява значителна част, приблизително 24% от дебелината на комплекса ЕЛ-лигамент при млади зайци, докато при възрастни е 17% (Chowdhury и съавт., 1991). Извънставната повърхност на ЕЛ е значително по-дебела спрямо тази насочена към ставната кухина. При възрастни животни има значително нарастване на ЕЛ на повърхността противоположна на ставата, както и намаляване на дебелината му към ставната повърхност (Chowdhury и съавт., 1991). Светлинно-микроскопските изследвания представят, че морфологията на ЕЛ и ендолигамента е сходна на тази на синовията, което е в съответствие със схващането, че ЕЛ е специализирана форма на синовията (Lo и съавт., 2002a).

II.1.2.3 Електронно-микроскопски изследвания на ЕЛ

ТЕМ при изследването на ЕЛ се ограничава само с изследването на колагенните влакна. Ултраструктурното изследване показва малки с еднакъв диаметър колагенни влакна, което е в контраст със стромата на лигамента, където се наблюдават едновременно два типа – малки и големи колагенни влакна (Chowdhury и съавт., 1991). Недоизяснени остават промените, които настъпват в ЕЛ по време на ембрионалното и постнаталното развитие, както и характеристиките на клетъчните му съставки и съдово-нервните структури в него.

Chowdhury и съавт. (1991) откриват прилика на фибробластите на ЕЛ с тези на новообразуваната тъкан след травма. Това им дава основание да смятат, че ЕЛ е основният източник на клетки по време на оздравителния

процес (Chowdhury и съавт., 1991). По-късно и други автори се присъединяват към тази хипотеза като предполагат, че ЕЛ участва в процеса на диференциация, фагоцитоза и колагенна синтеза и по този начин взема участие в оздравителния процес, но директни доказателства липсват (Lo и съавт. 2002a; Woo и съавт. 1994; Chamberlain и съавт., 2009). Chamberlain и съавт. (2009) отбелязват, че неоангиогенезата след травма първоначално се съсредоточава в ЕЛ и в последствие инфилтрира стромата на лигамента. Тези автори смятат, че травмата стимулира освобождаването на множество клетки от кръвоносните съдове в ЕЛ и веднъж достигнали тялото на лигамента, тези клетки пролиферират и мигрират. Тяхното изследване обаче засяга единствено клетките на възпалението.

В заключение може да се каже, че ЕЛ би могъл да бъде потенциален донор на клетки и съдово-нервни снопове по време на оздравителния процес. Ето защо детайлното изследване на тази структура, както в норма, така и при експеримент би могло да определи неговата роля при възстановяването на ставната връзка след травма, както и създаването на нова епилигаментарна теория на оздравителния процес.

II.2. Сравнителна характеристика между ЕЛ и лигамента

ЕЛ показва следните съществени разлики, които го различават от самия лигамент (Chowdhury и съавт., 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009).

1. При ЕЛ колагенните влакна са ориентирани и подредени по различен начин в сравнение с лигамента. Отделните колагенни влакна на тази съединителнотъканна обвивка са групирани в снопове с различна ориентация, докато при лигамента те са разположени по неговата дължина по посока на силата на натоварването. Разпределението на влакната в ЕЛ

определя неговата значителна подвижност под въздействието на различни сили (Chowdhury и съавт., 1991; Limbert и Taylor, 2002; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009).

2. ЕЛ се характеризира с хиперцелуларитет в сравнение с лигамента. Морфологията на клетките в ЕЛ е различна от тази на клетките изграждащи лигамента. В ЕЛ има повече типове клетки: фибробласти с различна форма, адипоцити, клетки на синовиалната мембрана и мастоцити (Chowdhury и съавт., 1991; Lo и съавт., 2002a; Georgiev и Vidinov, 2009). Поради ултраструктурните характеристики на синтезиращи клетки, се предполага евентуалното участие на фибробластите в ЕЛ в колагеннта синтеза на екстрацелуларния матрикс (Georgiev и Vidinov, 2009). Интересен факт е, че фибробластите отглеждани *in vitro* не се ориентират паралелно на надлъжната ос на връзката, а в друга посока, която наподобява тази на ЕЛ *in vivo* (Lo и съавт., 2002a). За вторият тип клетки, адипоцитите се предполага, че участват в метаболизма и натрупването на липиди и служат като пакетиращ материял. Кубоидалните клетки наподобяват клетките на синовията и се смята, че те са отговорни за формирането на мембранна структура защитаваща лигамента от износване, която продължава в синовиалната мембрана (Chowdhury и съавт., 1991).

3. Количеството кръвоносни съдове и нервни влакна е локализирано предимно в ЕЛ (Chowdhury и съавт., 1991; Georgiev и Vidinov, 2009). Те периодично навлизат заедно с колагенни влакна и фибробласти в стромата на лигамента (Chowdhury и съавт., 1991; Limbert и Taylor, 2002; Georgiev и Vidinov, 2009). Именно на тези места е преходът на ЕЛ в ендолигамента, който разделя колагенните снопове на лигамента на отделни функционални единици и осъществява връзката на стромата на лигамента с ЕЛ.

II.3 Образуване на ставната връзка по време на ембрионалното развитие

Ембрионалният произход на лигаментите понастоящем още не е напълно установен. Поради близостта на ставната връзка със ставата по време на ембрионалното развитие, както и при възрастни индивиди хипотезите относно произхода на лигаментите са свързани с това, че формирането на ставата служи като отключващ механизъм за образуването на ставните връзки. Въпреки това сигналите отговорни за появата на лигаментите са твърде оскъдно описани в литературата. Това е главно в резултат на трудностите при обособяването на отделните етапи по време на формирането на ставата (Tozer и Duprez, 2005).

В подкрепа на хипотезата за отключващия механизъм на формирането на ставата за образуването на лигаментите се подпомага от факта, че Wnt14, който е познат като ранен маркер за образуването на ставната цепка е разположен и при връзките на напълно развити стави (Hartmann и Tabin, 2001). Това дава основание да се смята, че той играе несъмнена роля при диференциацията на ставната връзка. Според Tozer и Duprez (2005) позитивно въздействие на Wnt14 върху фиброзни тъкани може да се дължи на неговата вероятна роля при препредаване на информация на таргетните цели от различни разтежни фактори. Доказано е, че инактивацията на Gdf5 и Gdf6 гени при мишки води до дефекти на лигаментите, както и на самите стави и хрущяли (Storm и съавт., 1994; Settle и съавт., 2003). Gdf5, 6, 7 аплицирани (подкожно или интрамускулно) при възрастни плъхове предизвикват образуването на подобни на сухожилия и връзки структури (Wolfmann и съавт., 1997). Други разтежни фактори, които вероятно са замесени при образуването на ставните връзки са Fgfs. Fgf10 е разположен в областта на ставата по време на развитието на крайника у пиле и се смята,

че участва при пролиферацията на мезенхимните клетки в този регион (Lovinescu и съавт., 2003). В добавка, Fgf MAP kinase ERK1/2 селективно се активира в клетките, формиращи ставната кухина (Bastow и съавт., 2005). Връзка между сигналите на Wnt и Fgf обаче не е доказана (Tozer и Duprez, 2005). Друг маркер, който се смята, че участва в образуването на ставните връзки е Scleraxis. Schweitzer и съавт. (2001), на основата на Scleraxis експресия във връзките на E14 в колена на пиле, установява че Scleraxis е маркер за лигаментите, като преди това е установен и при сухожилията. При миши ембриони Scleraxis транскрипцията е наблюдавана най-рано при страничните и кръстните връзки на колянна става при E16.5 ембриони (Asou и съавт., 2002). Това дава основание да се смята, че прогениторните клетки на ставните връзки са локализирани на същите места както сухожилията и са разположени в съседство с тях в ембрионалния зачатък на крайника (Kardon, 1998). Според Tozer и Duprez (2005) детайлното разглеждане на Scleraxis при развитието на връзките ще даде възможност за разбиране на начина на тяхното формиране по време на ембрионалното им развитие.

В литературата липсват данни за ембрионалното и постнаталното развитие на ЕЛ.

II.4. Кръвоснабдяване на ЕЛ и лигамента

Ставната връзка е хиповаскуларна структура, като средно 2% от нейния обем е зает от кръвоносни съдове (Bray и съавт., 1990; Bray, 1995). Най-голямата част от кръвоносните съдове се локализируют в ЕЛ, като тяхното количество е двадесет пъти по-голямо от това в стромата на лигамента (Bray и съавт., 1990; Chowdhury и съавт., 1991; Eng и съавт., 1992; Bray и съавт., 1995; Bray и съавт., 1996a,b; Frank, 2004; Bray и съавт., 2005; Georgiev и Vidinov, 2009). Те формират съдови сплитове хаотично разположени с

характерно разклоняване в малките съдови канали при навлизането им в лигамента. Предполага се, че тази съдова мрежа улеснява доставката и отстраняването на редица вещества към и извън лигамента. Високата честота на съдове в тази относително рехавя съединителна тъкан води до мнението, че ЕЛ служи също и за поддържането на специална хидростатична среда в и около ставната връзка (Chowdhury и съавт., 1991). Самата ставна връзка обаче е слабо кръвоснабдена и представя линейно подреждане на съдовете по дължината ѝ. Тези съдове се разполагат паралелно на колагенните снопове с редки анастомози по-между им. По време на развитието има значително разрастване на съдовете навлизащи от залавните места на връзката, но постепенно намаляват при израснали индивиди. Кръвоносните съдове често се съпътстват от нервни структури показващи подобно разпространение по дължината на връзката. Този вървеж на съдове и нерви предполага, че между тях съществува определена връзка – нервните осигуряват еферентни влакна към съдовете и притежават вазомоторна активност, а съдовете доставят редица вещества и изнасят отпадъчните продукти от нервните структури (Chowdhury и съавт., 1991). При травматични процеси се стимулира неоваскуларизацията, като новообразуваните кръвоносни съдове се локализируют предимно в ЕЛ. Травмата стимулира и освобождаването на множество клетки на възпалението от кръвоносните съдове на ЕЛ, като веднъж достигнали тялото на лигамента тези клетки пролиферират и мигрират. Това показва и евентуалното участие на ЕЛ в оздравителния процес (Bray и съавт., 1996; Chamberlain и съавт., 2009).

Съдовата анатомия на ставната връзка първоначално е описвана при експериментални модели на животни, при които се извършват инфузии с различни разтвори (най-често във феморалната артерия), като се наблюдава изпълването на лигаментите със съответната субстанция след

умъртвяването на животните (Eng и съавт., 1992; Chowdhury и съавт., 1991; Gray и съавт., 1996; McDougall и съавт., 2000). Днес това се осъществява с помощта на новите високоразделителни образни методи, които дават възможност да се визуализира кръвотока в лигаментата при живи индивиди. Пример за това е лазерното проследяване на кръвотока, което приблизително улавя движението на червените кръвни клетки. Благодарение на него съдовете в ЕЛ се визуализират и се наблюдават като разклоняваща се мрежа над повърхността на лигаментата, докато капилярната микроциркулация се вижда на фона без отчетливо изобразяване на отделните съдове (Forrester и съавт., 2005).

Локализацията на съдовете на ставната връзка е почти изцяло в нейната обвивка. Локализацията на новообразуваните кръвоносни съдове в ЕЛ през първата седмица след травмата определя значението на тази структура в оздравителния процес. Ето защо процесът на неоангиогенезата трябва да се прецизира през отделните етапи на оздравителния процес с цел добиване попълна яснота за промените, които настъпват в кръвообръщението на неолигаментата след травма.

II.5. Инервация на ЕЛ и лигаментата

Инервацията на ставните връзки е главно от намиращите се в съседство мускулни, кожни и ставни нервни стволоче. Тя се осъществява от миелинови и амиелинови влакна, които се срещат най-често в ЕЛ и често съпътстват кръвоносните съдове в него (McDougall и съавт., 1997). Те се разполагат паралелно на колагенните влакна и навлизат в субстанцията на лигаментата като свободни нервни окончания или съпътстват кръвоносните съдове (McDougall и съавт., 1997). Миелинизираните нервни влакна най-често завършват, като терминални нервни окончания, но понякога могат да

завършват и като рецептори на Руфини, Голджи – Мацони и Пачини (McDougall и съавт., 1997; Delgado-Baeza и съавт., 1999). Хистологичните резултати показват, че 20% от аксоните са миелинови $A\beta$ –, $A\gamma$ -, $A\delta$ – сензорни (сетивни) влакна, 40% са амиелинови C – сензорни влакна, а останалите 40% са симпатергични (Salo and Theriault, 1997). По-големите миелинови $A\alpha$ и $A\beta$ влакна са механорецептори, които се активират при механично въздействие и имат нисък праг и висока чувствителност. Свободните нервни окончания на $A\gamma$ -, $A\delta$ – и C – сензорни влакна от тип IV имат висок праг на дразнене. Те се активират в отговор на механични, химични и топлинни стимули и могат да бъдат сенсibiliзирани чрез повтарящи се дразнения или от лечение с аналгетични вещества (Schepelmann и съавт., 1992). При сенсibiliзацията взимат участие в широко дискутираната днес paradoxical efferent role, т. нар. неврогенно възпаление, описано от Bayliss през далечната 1901г. Нервните окончания на В-влакната са автономни и са главно локализирани в стените на малките артерии, артериоли и посткапилярни венули и се отнасят най-вече към еферентни вазомоторни действия. Симпатиковите и парасимпатиковите влакна се намират главно в лигамента. Невропептид Y (NPY) и вазоактивен интестинален пептид (ВИП) упражняват неутрализиращ ефект на вазоактивната регулация. Анализите показват, че концентрацията на симпатиковите по отношение на парасимпатиковите влакна е по-голяма при лигаментите, отколкото при сухожилията (Askermann и съавт., 2001). Това показва, че симпатиковия тонус доминира. Тази разлика би имала значение за регулацията на кръвния ток и способността за оздравяване, а вероятно и за противодействието на дегенерацията на лигамента (Brag и съавт., 2005).

Автономните влакна се наблюдават най-често като мрежи обвиващи съдовете разположени в ЕЛ. Като цяло наблюденията показват, че регулацията на кръвния ток към лигамента се осъществява в най-голяма

степен в неговата обвивка под действието на съдържащите се в него нервни структури. Смята се, че те допринасят за оздравителния процес на ставната връзка (McDougall и съавт., 2000), при който регенеративните процеси на нервните влакна протичат паралелно на ангиогенезата (Salo и съавт., 2008). Установено е, че шест седмици след травмата новообразуваните нервни влакна не са добре оформени (McDougall и съавт., 2000) и показват не добре завършен оздравителен процес. Те се възстановяват около 14 седмица (Salo и съавт., 2008). При експеримент е доказано, че денервацията на ставата оказва въздействие върху оздравителния процес като предизвиква по-бавна регенерация на ставната връзка (Ivie и съавт., 2002; Salo и съавт., 2008).

Както по отношение на кръвоснабдяването, така и по отношение на инервацията, детайлното познаване на промените, които настъпват в ЕЛ след травма биха допринесли за пълното разбиране на участието на тази структура в регенеративните и патологичните състояния, които настъпват в ставната връзка. Ето защо тяхното прецизиране трябва да бъде предмет на бъдещи изследвания в тази област.

II.6 Функция на лигамента и ЕЛ

Според класическите схващания главната функция на ставните връзки е стабилизатор на ставата, контролиращи нейния обхват на движение и предпазващи я от абнормни движения. Ставните връзки показват нелинейно анизотропно механично отнасяне, като при ниско натоварване те са относително устойчиви (вероятно дължащо се на възстановяването на вълнообразната структура на колагенните влакна при слаби въздействия), както и на вискоеластичните им свойства и взаимодействието между отделните колагенни влакна и другите изграждащи междуклетъчния

матрикс вещества (Frank, 2004). Продължителното натоварване обаче води до нарастваща скованост, докато се достигне определен праг, където те показват почти линейна зависимост като по нататък последва нарушаване на тяхната цялост (Frank, 2004). Друга основна функция на лигаментите е свързана с техните вискоеластични свойства, които са зависими от време и минали натоварвания, благодарение на които се поддържа относителното равновесие на ставата. Лигаментите са подложени на цикъла “натоварване-отпускане”, което означава, че натоварването (стресът) намалява в лигамента при постоянно въздействие (Frank, 2004). Те притежават т. нар. “пластична деформация” под въздействието на циклично повтарящи се натоварвания. Това е особено важно при разглеждането на травмите на ставите и реконструктивните операции, когато прекомерната пластична деформация може да доведе до лакситет на ставата и по този начин да се яви предразполагащ фактор за последващи нови травми. Поведението на лигаментите при натоварване (или липса на такова) е различно и кривата при натоварване е различна за различните периоди. По време на ходене или тичане връзките претърпяват повтарящо се периодично разтегляне. За еластична материя, каквато са ставните връзки, това повтарящо се разтягане предполага увреда на структурата в резултат на умората, но поради факта, че ставните връзки притежават вискоеластични свойства това периодично натоварване и отпускане намалява натоварването, което помага за защитата на лигамента в резултат на умората.

Има доказателства, които предполагат, че механорецепторите открити в лигамента и ЕЛ играят съществена роля в контрола на моторните движения (Chowdhury и съавт., 1991; Gray и съавт., 2005). Това обаче трябва да се различава от субективното явление на проприорецепция, което се определя като съзнателно усещане на позицията на крайника в

пространството. Проприорецепцията е медирана главно от мускулните рецептори и зависи от дължината на мускула (Gray и съавт., 2005).

Изследвания при котки показват, че кръстните връзки на коляното могат да предизвикат блок в отговор на приложени натоварвания. Стимулирането на механорецепторите в лигамента активира G моторни неврони, предизвикващи нарастване на мускулната чувствителност с последващо нарастване на напрежението във флексорните и екстензорни мускули (Soika и съавт., 1989). Нарастващият тонус на антагонистичния мускул води до стабилизиране на ставата, като се предпазват ставните повърхности от механично увреждане (Johansson и съавт., 1991). Въпреки, че функционалното значение на тези рефлексни връзки с нормалната моторна активност остава да бъде потвърдено може да се приеме, че те са най-важни при движения като вдигане на тежести, катерене и други дейности свързани с екстремни натоварвания на ставите. В последните години се потвърди наличието на тези или сходни рефлексни дъги при хора. Прилагането на валгусни натоварвания на разгънато коляно на човек предизвиква дълго латентен рефлекс на нарастване на тонуса на четириглавия мускул на бедрото и намаляване на ЕМГ активността на ахилесовото сухожилие, което е достатъчно да осигури стабилност на ставата (Dhaer и съавт., 2004). Директното електрично стимулиране на кръстните връзки също повлиява ЕМГ на мускулите, действащи върху колянната става. Други изследвания показват, че при увреда на ПКВ намалява силата на ахилесовото сухожилие по време на съпротивление на екстензиращи упражнения на коляното, подкрепяйки идеята за участието на рецепторите в лигамента при уравнивяването на мускулните сили (Osternig и съавт., 1995). Проучванията показват, че прилагането на постоянен товар на ПКВ е достатъчно да се причини прогресивно нарушение на лигамента и да предизвика активация на четириглавия бедрен

мускул (Chu и съавт., 2003). При хора с увреда на ПКВ също има абнормна мускулна активност в отговор на неочаквана промяна по време на ходене (Ferber, 2003). Трябва да се отбележи, че дори при реконструкция на връзката абнормният моторен отговор не се подобрява. Като заключение може да се каже, че при хора и животни съществуват убедителни доказателства, че основния елемент за нормалната функция на връзката е наличието на обратна връзка от моторната система.

Функцията на ЕЛ се определя преди всичко от характерната организация и ориентация на колагенните влакна и се предполага, че под действие на различни сили ЕЛ се поддава на движение в различни посоки, което дава основание да се смята за сравнително подвижна структура. В допълнение той може да предпазва лигамента от различни хидростатични въздействия (Chowdhury и съавт., 1991). Въпреки всичко неговата функция още не е добре изяснена.

Фактът, че фибробластите на ЕЛ имат прилика с тези на новообразуваната съединителна тъкан след травма дава основание да се предполага, че ЕЛ е основният източник на клетки по време на оздравителния процес (Chowdhury и съавт., 1991; Chamberlain и съавт., 2009). Предполага се, че тази тъкан може да играе роля в процеса на диференциация, фагоцитоза и колагенна синтеза и по този начин да вземе участие в оздравителния процес (Lo и съавт. 2002; Woo и съавт. 1994).

Всички тези данни водят до хипотезата, определяща може би най-важната функция на ЕЛ, която би била предмет на бъдещи изследвания и основна цел на настоящата работа.

II.7. Оздравителен процес на ставната връзка при различни типове лечение

II.7.1. Оздравителен процес на ставната връзка

Връзките на коляното се увреждат най-често при травми с пълно или частично нарушаване на тяхната цялост. В зависимост от това, увредите на ставните връзки на колянната става се класифицират на три типа (Provenzano и съавт., 2002). Тип I се характеризира със слабо разпъване, без нарушаване на целостта на лигамента и липса на клинични данни за лакситет на ставата. При тип II има умерено разтягане, при което някои от колагенните влакна биват разкъсани, но ставната връзка остава интактна и нейната здравина не се нарушава. Тип III увреда се характеризира с пълно или почти изцяло разкъсване на лигамента, в резултат на което има лакситет на ставата.

Поради трудностите на изследване на непълните увреди най-често изследванията са насочени към изучаване на пълната увреда (Provenzano и съавт., 2002; Wright и съавт., 2006; Sakti и съавт., 2015; Costa и съавт., 2017). При руптура на ставните връзки краищата им се контрахират и се образува мост от съединителна тъкан между двата им края. Тази зона е по-прозрачна от нормалната съединителна тъкан и се простира над повърхността (Provenzano и съавт., 2002). Образуването на неолигамента и оздравителният процес на връзките преминават през редица промени (Frank и съавт., 1992; Frank и съавт., 1999; Frank, 2004; Woo и съавт., 2004; Woo и съавт., 2006; Woo и съавт., 2009). Тези промени може да се разделят на четири последващи една след друга фази: хеморагична, възпалителна, пролиферативна и ремоделиране. Първата фаза включва ретракция на разкъсаните краища на връзката, формиране на кръвен съсирек в областта

на прекъснатите краища, който впоследствие се резорбира. Последва значително натрупване на кръвоносни съдове, изпълващи пространството и нарастване на кръвния ток. В отговор на нарастналата васкуларизация и клетъчни реакции в мястото на травмата се натрупват множество възпалителни клетки, които фагоцитират некротичната тъкан в областта. Това нарастване на кръвоносните съдове при едни хиповаскуларни структури (като лигаментите) се предполага, че има пагубна роля за характерната организация на колагенните влакна и е една от причините компроментиращи функционалните свойства на тъканта (McDougall и съавт., 2000). Втората фаза е възпалителна, при която множество цитокини и разтежни фактори се отделят от клетките на възпалението (главно от макрофагите) и в резултат на което започва образуването на грануляционна тъкан (McDougall и съавт., 2000). Възпалението води до увеличаване на съдовия пермеабилитет и съответно до екстравазация на течност и клетки от кръвта. През тази фаза се засилват възстановителните процеси и се продуцират и освобождават фактори, които подпомагат оздравителния процес (McDougall и съавт., 2000). Според Cohen и съавт. (1992) удължаването на инфламаторната фаза има негативен ефект към заздравяването на тъканта. Интересен факт е, че оздравителният процес при фетални лигаменти е способен да замести новобразуваната съединителна тъкан без формирането на грануляционна тъкан и ембрионалните лигаменти зарастват без възпалителна фаза (Murphy и съавт., 1993; Witkowski и съавт., 1997). При третата пролиферативна фаза образувалата се гранулоционна тъкан се характеризира с нови клетки, които пролиферират и изпълват празнината между увредените краища на ставната връзка. Тези клетки са представени от фибробласти, възпалителни клетки и съдови клетки (Frank и съавт., 1983; Frank, 2004). Наблюдава се агрегация на тези клетки в матрикса, изграден от вода, различни типове колаген, хиалуронова

киселина, протеогликани, фибронектин, протеини и гликопротеини (Frank и съавт., 1999). Локалната секреция на разтежни фактори през този период регулира оздравителния процес (Cool и съавт., 2004). Матрикса който се образува първоначално е много хаотичен, но с течение на времето той постепенно се възстановява (Frank и съавт., 1995; Frank, 2004). След няколко седмици колагенните влакна започват да се ориентират по дължината на ставната връзка, представени най-вече от колаген тип III, надвишаващ тип I и нарастване на колаген тип V (Inoue и съавт., 1990; Frank и съавт., 1999; Niyibizi и съавт., 2000; Lo и съавт., 2003). Характерното е, че колагенните влакна са с малък диаметър. Четвъртата фаза е свързана с ремоделирането на новобразуваната тъкан. Дефектът на увредата вече е запълнен, но въпреки това пълното възстановяване на ставната връзка не се наблюдава и тя остава различна от нормалната анатомия и се различава по някои показатели от нея. Въпреки, че изглежда промените да водят до възстановяване на матриксните компоненти близко до нормата, не всички от тях достигат пълна регенерация: напр. нарушаване на протеогликанната съставка (нарастване на бигликаните и намаляване на декорин и матриксната РНКи) (Plaas и съавт., 2000); нарушаване на типовете колаген (Amiel и съавт., 1987; Frank и съавт., 1992; Yamaji и съавт., 1996; Frank и съавт., 1999), като отношението тип V към тип I е значително по-голямо (Lo и съавт., 2003; Woo и съавт., 2006), както и на тип III към тип I (Lo и съавт., 2003; Inoue и съавт., 1990; Frank и съавт., 1999); нарушаване на свързването на колагенните влакна по между им чрез дихидропиримидинови мостове (Koob и съавт., 1994; Frank и съавт., 1995; Woo и съавт., 2004; Woo и съавт., 2006); наличие на колагенни влакна с малък диаметър (Frank и съавт., 1992; Frank и съавт., 1997; Frank и съавт., 1999; Niyibizi и съавт., 2000; Woo и съавт., 2004; Woo и съавт., 2006); нарушаване на междуклетъчните контакти (Lo и съавт., 2002), увеличено количество на съдове (Brau и съавт., 1996),

нарушена инервация (Frank, 2004). Колагенните влакна са с по-малък диаметър, дори и на втората година след травмата в сравнение с нормалната структура на лигаментата (Frank и съавт., 1997; Frank и съавт., 1999).

Оздравителният процес на ставната връзка се повлиява, както морфологично, така и функционално в зависимост от мястото на увредата. Frank и съавт. (1995) изследват връзката между мястото на увредата и неговата роля при зарастването на ставната връзка. Използвайки модел на заек, авторите показват, че хистологично зарастването на лигаментата близо до неговите залавни места е свързано с абнормно натрупване на калус и неправилна резорбция на локално костно вещество, в сравнение с увредата в средната част на ставната връзка. По-добър оздравителен процес морфологично се наблюдава при вторият тип увреда, което се потвърждава и при механичното изследване на ставите. В резултат на това авторите заключават, че травмите близо до инсерциите показват намалени вискоеластични и отслабени механични отнасяния, в резултат на което уврежданията при залавните места на ставните връзки зарастват по-бавно в сравнение с тези в средната част.

Фибробластите на лигаментата, които са основния вид клетки показват голямо биохимично и структурно разнообразие. Те са влючени в аморфния матрикс на заздравяващата тъкан и се наблюдава тяхната миграция в мястото на увредата от началото на възпалителната фаза до репаративния процес на формиране на нова съединителна тъкан. Те се считат за основното звено в репаративния процес на тъканта (Dunn, 1980; Matyas и съавт., 1990; Lyon и съавт., 1991; Witkowski и съавт., 1997; Sung и съавт., 1996). В последните години бяха откриха и друг тип фибробласти в обвивката на ставната връзка, които са специфични за нея и се различават от тези в стромата на лигаментата. Първоначално тези клетки са смятани за статични. В последствие обаче се установи, че тези клетки се реорганизируют в отговор

на стимули и са отговорни за развитието, поддръжката и приспособяването на лигамента.

II.7.2. Лечение на МКВ на коляното при експериментални модели на животни.

II.7.2.1 Хирургично vs консервативно лечение

Нарастването на спортния травматизъм през последните години възобнови интереса по отношение на заздравяването на ставните връзки на колянната става (Woo и съавт., 2000). Клиничният опит показва, че увреди тип I и тип II зарастват без хирургично лечение (Fetto и Marshall, 1978; Holden и съавт., 1983). При I и II степен на увреда пространството се изпълва с колаген тип I (Miyamoto и съавт., 2009).

Противоречия съществуват относно лечението на увреда тип III (Hart и Dahnert, 1987; Indelicato, 1983; Kannus, 1988; Weiss и съавт., 1991). За разлика от предишните типове увреждания, при този тип увреда се наблюдава нарастване на колаген тип III, чието по-голямо съотношение към тип I се счита за един от факторите компроментиращи оздравителния процес (Inoue и съавт., 1990; Frank и съавт., 1999; Miyamoto и съавт., 2009). През 50-те и 60-те години на миналия век се е смятало, че изолираните травми тип III изискват незабавно хирургично лечение (Miyamoto и съавт., 2009). O'Donoghue и съавт. (1961) при модел на куче представят, че хирургичното лечение води до намаляване на новообразуваната тъкан, ускоряване на колагенизацията и съответно на оздравителния процес, в резултат на което се подобряват морфологичните характеристики на тъканта. По-късно през 80-те и 90-те години обаче, множество проучвания показват много добри резултати, както на оперативното, така и на неоперативното лечение (Jones и съавт., 1986; Reider и съавт., 1994). При

експериментални модели Hart и Dahners (1987) и Hildebrand и Frank (1998) описват, че лечението със шев не показва статистически значима разлика водеща до по-голяма издръжливост на връзката. При тези модели обаче разстоянието между краищата е по-малко от 2мм. Редица други експериментални модели също доказват, че изолираните травми на страничните връзки на коляното зарастват спонтанно с отлично функциониране на колянната става (Weiss и съавт., 1991). Тези резултати подкрепят неоперативното лечение на травми тип III. Majima и съавт. (2006) представят резултати показващи, че няма статистически значима разлика във вълнообразния строеж на ставната връзка при оперирани и неоперирани животни. Дали връзката е оперирана или не, 6 седмици след травмата строежът е 3-4 пъти извън нормата. Авторите заключават, че при остра увреда на лигамента, хирургичната интервенция не променя потенциала на новообразуваната тъкан към по-добро възстановяване, дори и на 6-та седмица след травмата в сравнение с контролата.

Въпреки, че един от подръжниците на идеята за консервативно лечение на изолираните травми на страничните връзки на колянната става Indelicato (1983) предлага данни с които показва, че не съществува значима разлика между консервативното и хирургичното лечение, детайлното разглеждане на неговата работа показва, че 15% от пациентите на консервативно лечение имат умерено отваряне на колянната става при флексия от 30 градуса. Именно на тази ставна нестабилност се базират доводите срещу консервативното лечение, към които Kannus (1988) прибавя и субективни оплаквания като мускулна слабост, повече последващи травми, пост-травматичен остеоартрит. Abramowitch и съавт. (2003) считат, че в резултат на консервативното лечение остава валгус-варус нестабилност на колянната става. Експериментално обаче е доказано, че лечението с шев само първоначално намалява варус-валгус ротацията, но на 6-та и 9-та седмици

няма значителна разлика между оперираните и неоперираните животни (Weiss и съавт., 1991).

Hildebrand и Frank (1998) и Creighton и съавт. (2005) считат, че хирургичното лечение намалява максимално разстоянието между двата края на увредената връзка и е метод предназначен да усъвършенства заздравяването при цялостно разкъсване на лигамента. По този начин размерът на увредата се съкращава и ставната връзка се възстановява до състояние близко до анатомичното (McDougall и съавт., 2000). Chimich и съавт. (1991) смятат, че доближаването на краищата има предимства по време на периодите на гранулация и ремоделиране, като се подобряват макроскопските, хистологичните и биомеханичните свойства на лигамента. Според тези автори, при шев по-малкото разстояние между краищата (чрез типа обратна връзка) новообразуваната тъкан запълва по-бързо пространството между двата края и ремоделирането се извършва по-бързо. Въпреки това при своя експериментален модел на заек, Chimich и съавт. (1991) заключават (сравнявайки лекувани хирургично и консервативно животни), че след 40 седмици няма статистически значими разлики при изследванията за здравината на връзката. Авторите намират редица сходства и при двата модела на лечение. Зарастването е с гранулационна тъкан, макроскопски и хистологично различаваща се от нормата. Около 3-та седмица след травмата неолигамента се характеризира с хиперцелуларитет и се смесва с останалите здрави тъкани. На 14-та седмица се възвръща разтегливостта им в сравнение с контралатералния лигамент и наличието на скъсяване на новообразуваната съединителна тъкан (както и при другите съединително-тъканни модели) с течение на времето тъканта се ремоделира, но дори и след 40-та седмица има макро и микроскопски описания на заздравяваща тъкан. След 40-та седмица и при двата модела се възстановява около 65% от силата спрямо контралатералните връзки.

По-късно обаче, Loitz-Ramage и съавт. (1997) при модел на заек отново съпоставят консервативното и хирургичното лечение, но в по дългосрочен план. Авторите сравняват лечението на 8 мм разстояние между краищата на увредената връзка и 4 мм разстояние с Z –шев, при което 4 мм разстояние и пластика показва по-голяма здравина в сравнение с 8 мм разстояние. Тези резултати показват, че при големите увреди със загуба на тъкан между двата края при извънставни връзки предразполагат към по-голяма неустойчивост и по-бавен оздравителен процес. Ето защо, пренасяйки този резултат в клиничната практика, авторите считат, че при пациенти с големи разстояния между двата края на лигаментите (напр. при дислокация на съседни кости или при ретракция на краищата) ще могат да възстановят нормална функция при ниски или умерени натоварвания, но при тях ще има значителен риск от повторна руптура при големи натоварвания.

McDougall и съавт. (2000) при модел на заек установяват, че нивото на ангиогенезата след 6-та седмица на хирургичното лечение съответства на контролите, претърпели плацебо операция. Като евентуални причини за това авторите смятат, че лечението с шев вероятно ускорява оздравителния процес в такава степен, че ангиогенезата претърпява обратно развитие или репозицията на краищата на увредената връзка възпрепятства неоваскуларизацията.

Miyamoto и съавт. (2009) предлагат неоперативно лечение при увреда III степен на лигамента, последвано от ранна рехабилитация. Хирургично лечение се препоръчва в случаите на травми при атлети с персистиращ лакситет, който вероятно ще компроментира техните резултати. Друга индикация е персистиращ лакситет на колянната става в сравнение с контралатералното коляно по време на физикалния преглед, както и при стрес рентгенограми.

В заключение проучванията показват, че 52 седмици след травмата механичните отнасяния на увредения лигамент остават по-ниски от нормата (Inoue и съавт., 1990; Loitz-Ramage и съавт., 1997; Ohland и съавт., 1991; Abramowitch и съавт., 2003; Costa и съавт., 2017). Те не се възстановяват дори и след втората година след травмата (Inoue и съавт., 1990; Ohland и съавт., 1991; Loitz-Ramage и съавт., 1997; Abramowitch и съавт., 2003; Costa и съавт., 2017).

II.7.2.2 Лечение с/без имобилизация

В миналото се смятало за необходимо имобилизация на ставата след връзкова увреда, тъй като ще предпазва ставната връзка от натоварване (Woo и съавт., 2000). Впоследствие обаче е установено, че обездвижването води до промени в колагенните влакна, намаляване на структурните отнасяния на комплекса кост – ставна връзка – кост, резорбция на костта до залавното място на връзката, както и до редица други нарушаващи интегритета на ставата ефекти (Woo и съавт., 1990; Калниев, 2011; Калниев и Кръстев, 2011). За разлика от имобилизацията контролираното натоварване оказва благоприятен ефект върху оздравителния процес (Woo и съавт., 2000).

Vailas и съавт. (1981) доказват, че имобилизацията и упражненията повлияват оздравителния процес. По-късно Amiel и съавт. (1983) представят ефекта на имобилизация на МКВ у заек. Авторите отбелязват намаляване на колагенната маса и нарастване на увредените колагенни влакна (28% в сравнение с контролите) при имобилизация траеща 9-12 седмици. През 1986, Binkley и съавт. доказват, че имобилизацията на колянна става у плъх също води до увреждане на колагена и до по-ниски механични отнасяния. Woo и съавт. (1987) при модел на куче сравняват хирургичното лечение в

три групи: с ранно движение, имобилизация за 3 седмици и имобилизация за 6 седмици. Резултатите потвърждават, че ранното раздвижване води до по-добри резултати. Други проучвания разкриват вредния ефект на имобилизацията върху матриксната организация и клетъчния метаболизъм (Padgett и Dahners, 1992; Walsh и съавт., 1992), както и, че натоварването показва по-добри хистологични резултати и усъвършенства организацията на колагенните влакна (Woo и съавт., 1990; Gomez и съавт., 1991). Имобилизацията също така пречи и на нормалното развитие на колагенните влакна по време на постнаталното развитие (Walsh и съавт., 1993).

В заключение експерименталните модели ясно доказват, че ранното раздвижване подпомага оздравителния процес (Creighton и съавт., 2005). Клиничните данни също подкрепят тезата за предимствата на ранното раздвижване след увреда на връзката (Woo и съавт., 2000).

II.7.2.3 Дегенеративни промени настъпващи в лигаментата и ЕЛ на интактната странична връзка при увреда на предна кръстна и/или медиална странична връзка на колянна става

Морфологичните, хистологични, биохимични, молекулни и биомеханични промени са добре проучени, както при изолирани увреди на ПКВ, така и в съчетание с увреди на МКВ (Woo и съавт., 1990; Kanamori и съавт., 2003; Lo и съавт., 2003; Takeyama и съавт., 2007). Останалите интактни лигаменти на колянната става и техните адаптационни и/или патологични промени, които настъпват в тях след травма на горепосочените връзки са били пренебрегвани и рядко са били предмет на изследвания (Woo и съавт., 1990; Kanamori и съавт., 2003; Lo и съавт., 2003; Takeyama и съавт., 2007).

При експериментални модели е установено, че при увреда на МКВ се предизвиква възпалителна реакция не само на самата връзка, но и на разположените в съседство тъкани на ставата (McDougall и съавт., 1998; McDougall и съавт., 2000). При увреда на тази връзка настъпва допълнително натоваване на латералната колатерална връзка, което впоследствие предизвиква вторични микротравми свързани с повишена съдова реорганизация (McDougall и съавт., 2000). Въпреки, че се счита, че тези промени са транзиторни (напр. увеличение на мРНК на колаген тип I, III, V и MMP-13, ангиогенезата), те се наблюдават дори 12 седмици след травмата (Lo и съавт., 2003). Точната причина за това нарастване не е установена, но се предполага, че може да е резултат от адаптационни промени или патологична изява в резултат на променените биомеханични отнасяния, нарастналия кръвен ток, доставящ повече нутриенти, цитокини и ензими (Lo и съавт., 2003; Frank и съавт., 1994; Bray и съавт., 1996; Kanamori и съавт., 2000). Това предизвиква увеличаване на водното съдържание в колянната става, водещо до освобождаване на още повече медиатори на възпалението в околоставното пространство, вследствие на което се образува едем на ставата. Поради високото водно съдържание се увеличават и вискоеластичните отнасяния на тъканите, които я изграждат и като цяло водят до нарастване лакситета на ставата (McDougall и Bray, 1999). Като резултат може да се обобщи, че персистиращият оток на ставната структура предизвиква катастрофални ефекти върху функцията на самата става.

Подобно на увредата на МКВ, при травма на ПКВ също настъпва неоангиогенеза в неувредените МКВ и в латералната колатерална връзка, която нараства значително 4-14 седмици след увредата (Bray и съавт., 1996b; McDougall и съавт., 1998; McDougall и съавт., 2000). Тя води до нарушаване на подреждането на колагенните влакна, до бърза и значителна загуба на

механичните отнасяния на ставните връзки, и до нестабилност на самата става (Bray и съавт., 1997; McDougall и съавт., 1998). Това се наблюдава дори и при шев на връзката до 6-та седмица след травмата (McDougall и съавт., 2000). Според McDougall и съавт. (2000) хирургичното лечение подобрява съдовия отговор на новообразуваната тъкан, но въпреки това ставата все още е възпалена и в останалите ѝ компоненти се наблюдават промени във васкуларизацията. Механизмът на формирането на новите кръвоносни съдове е неясен, но се предполага участие на субстанция Р, която води до повишаване на неоангиогенезата, която се увеличава при травма (Ziche и съавт., 1990; McDougall и съавт., 1997; McDougall и съавт., 1998). Смята се, че възниква т. нар. “микротравма на заместващите структурата” и именно това е причина за появата на ставна нестабилност (McDougall и Bray, 1999).

При увреда на МКВ се наблюдава промяна и в активността на клетките на латералната колатерална връзка (Lo и съавт., 2003). Нещо повече – освен посочените промени в контралатералния лигамент се наблюдават и промени на контралатералните неувредени стави (Frank и съавт., 1994).

Проучвани са също така животни, които са по-големи по размер и са по-устойчиви по отношение нивото на активност, като например при модел на коза (Ng и съавт., 1995). Свойствата при опън на този модел на комплекса бедрена кост-МКВ-тибия (КБМТ) може да постигне устойчивост на разтягане и максимално натоварване, които са по-близки до контролните стойности за по-кратък период от време, в сравнение със зарастващия заешки КБМТ (Abramowitch и съавт., 2003a). И все пак, тангенциалният модул и морфологията на зарастващата връзка при модел на коза и заек не са били различни, което предполага, че и при двата модела връзките зарастват със сходно качество на тъканите.

Освен това вискоеластичните експерименти показват, че процентът на релаксация на натоварването на зарастващата МКВ остава два пъти по-голям от този на контралатералните контроли (Abramowitch и съавт., 2004). Проучвани са също така, модели, които представляват увреждания на повече от една връзка, например МКВ и ПКВ. При модел на заек зарастващите МКВ могат да се повлияят добре от реконструкция на ПКВ, но не са установени дългосрочни предимства от първично възстановяване на МКВ (Yamaji и съавт., 1996). Така лабораторните данни са помогнали на много клиницисти да изберат да реконструират ПКВ и да лекуват разкъсаните МКВ неоперативно. Независимо от това структурните свойства на КБМТ, механичните свойства на зарастващата МКВ и функцията на коляното са останали по-лоши от тези при изолирани увреждания на МКВ (Abramowitch и съавт., 2003c). Клиничните данни също подкрепят тези находки (Yamaji и съавт., 1996).

В литература липсват данни относно промените, които настъпват в ЕЛ по време на оздравителния процес на МКВ при експериментален модел, което е една от целите на настоящия труд.

II.7.3. Възстановява ли се ПКВ след шев?

За разлика от възстановителните процеси, които макар и непълни като морфология настъпват след травма при МКВ, възстановяването на ПКВ след увреда не е възможно. Затова днес то е насочено основно към заместването ѝ с различни графтове. Първоначално, през 1903 г. Robson прави опит за възстановяването ѝ чрез шев. Именно на неговите първи опити са подчинени и бъдещите изследвания в областта. (O'Donoghue и съавт., 1966 и 1971). В последствие, обаче се натрупват достатъчно дългосрочни проучвания, които показват незадоволителни резултати

(Feagin, 1976; Cabaud и съавт., 1979, 1980). През 1976, Feagin представя първите лоши резултати след шев на ПКВ и то при над 90% от пациентите. В последствие и други автори подкрепят тези негови резултати. (Sandberg и съавт., 1987) След тези проучвания, подкрепени и от лошите резултати при лабораторни животни се преустановява интересът към първичното възстановяване на ПКВ и насочва изследователите към извършването на реконструкция след лезия на тази връзка.

В литературата съществуват разбира се и редица теории, обясняващи лошата оздравителна способност на ПКВ: разлика в ултраструктурната характеристика на клетките, изграждащи ПКВ в сравнение с МКВ (Lyon и съавт., 1991); различен пролиферативен потенциал на фибробластите на ПКВ (Amiel и съавт., 1995; Yoshida и Fujii 1999); по-висока продукция на азотен оксид от ПКВ (Сао и съавт., 2000); слаби възможности за неоангиогенеза след увреда (Bray и съавт., 2003); характерни специфични за лигамента качества на стволовите клетки (Furumatsu и съавт., 2012; Zhang и съавт., 2011); разлика в експресията на различни типове ММП-2, -9 и -13 (Nishikawa и съавт., 2018); неспособността на клетките и кръвоносните съдове да запълнят разстоянието между разкъсаните краища на ПКВ след ретрахирането му; вътреставното му разположение, което инхибира фибробластите на ПКВ (Chen, 2009; Andrish and Holmes 1979); различната експресия на лизил оксидазите и ММП-зи от фибробластите би могла да обясни различния потенциал на зарастване на МКВ и ПКВ. (Хіе и съавт., 2014; Cai и съавт., 2017); разликата в броя на миофибробластите и експресията на TGF- β рецептор I (TGF- β RI) при двата лигамента (Menetrey и съавт., 2011).

В настоящата работа бе зададен въпросът може ли да има ЕЛ на ПКВ също роля, която да обясни слабите регенеративни възможности на тази връзка.

II.8. Подобряване на оздравителния процес

За да се подобри качеството на зарастващите тъкани и да се възстанови нормалната функция на МКВ се въвеждат нови биологични и биоинженерни техники: използването на различни растежни фактори, трансфер на гени и генна терапия, клетъчна терапия, както и използването на материали като скеле (Khan и съавт., 2012).

II.8.1 Използване на растежни фактори

Редица проучванията представят промяна на експресията на инсулиноподобния растежен фактор-I (IGF-I), трансформирания растежен фактор (TGF- β), тромбоцитния растежен фактор (PDGF), съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF) и фибробластния растежен фактор (FGF) при зарастване на връзките и сухожилията (Pierce и съавт., 1989; Steenfos, 1994; Schmidt и съавт., 1995; Duffy и съавт., 1995; Panossian и съавт., 1997; Sciore и съавт., 1998; Molloy и съавт., 2003; Khan и съавт., 2012).

Sciore и съавт. (1998) представят, че нивата на IGF-I иРНК са над 5 пъти по-високи в сравнение с контролите 3 седмици след нараняването на МКВ, след което намаляват между 6 и 14 седмица след травмата. По-късно, Letson и Dahners (1994) представят резултатите от прилагането на PDGF, както и в комбинация с IGF-I или bFGF по време на оздравителния процес на МКВ при плъх. Авторите отбелязват, че лечението с PDGF повишава здравината на ставната връзка, но не наблюдават синергично действие при комбинирането му с другите разтежни фактори.

В ранните етапи на зарастване на МКВ участват три изоформи на TGF: TGF- β 1 се увеличава на и около мястото на увредата седем дни след травмата (Lee и съавт., 1998). Ин витро проучванията показват, че

прилагането на TGF- β 1 увеличава синтеза на колаген 1.5 пъти над контролите във фибробластите както на МКВ, така и на ПКВ (Marui и съавт., 1997). TGF- β 2 увеличава експресията на колаген тип I на 6-тата седмица след травмата, което води до увеличаване на зарастващата тъкан (Spindler и съавт., 2002, 2003). Natsuume и съавт. (1997) представят значително и ранно повишаване на нивата на TGF β -1 по време на оздравителния процес на пателарния лигамент на плъхове, който остава висок до 8 седмици след травмата. Имунохистохимичните резултати показват, че първоначално TGF β -1 е бил локализиран в извънклетъчното пространство (вероятно поради дегранулацията от тромбоцитите), но по-късно се свързва с клетките, отразявайки *de novo* синтеза му. Подобно на другите разтежни фактори, TGF β -1 работи по дозозависим начин и в синергия с други растежни фактори (Centrella и съавт., 1991). Например, *in vitro* изследвания върху фибробласти на ПКВ при куче показват, че ниските дози TGF β -1 действат положително с изомера PDGF-AB за насърчаване пролиферацията на фибробластите, докато при повишени концентрации това е реципрочно (Boyer и съавт., 2001).

PDGF може също да играе важна роля в ранните етапи на зарастване, тъй като прилагането на PDGF-BB е подобрило структурните свойства на заешкия КБМТ между 2 и 6 седмица (Batten и съавт., 1996; Lee и съавт., 1998). Подобни резултати са доказани в проучване при плъхове (Batten и съавт., 1996). Локално приложеният PDGF може също така да подобри механичните свойства на сухожилната присадка след реконструкция на ПКВ (Weiler и съавт., 2004).

Изследван е потенциалът на синергичните ефекти на два или повече растежни фактора. Комбинацията от PDGF-BB/TGF- β 1 не води до повишаване на структурните свойства на зарастващия КБМТ в сравнение с използването само на PDGF-BB (Woo и съавт., 1998). В допълнение

комбинацията PDGF/TGF- β 2 също няма съществен ефект в сравнение със самостоятелното използване на TGF- β 2 (Spindler и съавт., 2003). От друга страна друго проучване показва, че комбинираното локално приложение на TGF- β 1 и EGF би могло да подобри структурните свойства на костно-пателарната сухожилно-костна автоложна присадка за реконструкция на ПКВ при кучета (Yasuda и съавт., 2004).

За да изследват ролята на фактора на растежа на съдовия ендотел (VEGF) при увреда МКВ, Nishimori и съавт. (2012) използват МСК ретровирусно трансдуцирани, за да се експресират VEGF и др. фактори на ангиогенезата. По този начин авторите посочват изключителната роля на тези фактори относно оздравителния процес на ставната връзка.

Saiga и съавт. (2010) представят, че локалната апликация на основен фибробластен растежен фактор (bFGF) и фактор на растеж и диференциация (GDF-5) подобряват оздравителния процес на МКВ при експериментален модел на заек, чрез увеличаване на пролиферацията и миграцията на фибробластите и чрез регулиране на синтеза на колаген и организацията на отделните влакна.

Yoshioka и съавт. (2013) представят, че локалната апликация на плазма, богата на растежни фактори подобрява оздравителния процес на МКВ при експериментален модел на заек. Costa и съавт. (2017) изследвайки здравината на МКВ при опън след увреда също посочват, че използването на богата на тромбоцити плазма на мястото на увредата ускорява оздравителния процес и подобрява механичните качества на връзката.

II.8.2 Трансфер на гени и генна терапия

Трансферът на гени, с помощта на носители, включващи както ретровирусни, така и аденовирусни вектори, а също и липозоми също се използва за подобряване на качеството на зарастващите тъкани, както и да се възстанови нормалната функция на МКВ (Nakamura и съавт., 1998).

Аденовирусния вектор се експресира по-ефективно във връзките, в сравнение с ретровирусните вектори. Menetrey и съавт. (1999) изследват експресията на маркерен ген (β -галактозидаза) в ПКВ на заек. Те изследват продължителността на експресията на трансгена, използвайки директно инжектиране на аденовирус с дефицит на репликация с LacZ гена или въвеждането му чрез инжектиране на предварително трансдуцирани клетки на ПКВ. Авторите посочват, че директното инжектиране на вирусен вектор води до по-дълга експресия на гена във връзката. Чрез използване на LacZ гена като маркерен ген, беше показано, че генната експресия може да продължи 6 седмици в ставните връзки при използването на аденовирус (Hildebrand и съавт., 1999). Освен това *in situ* генен трансфер на TGF- β 1, използвайки аденовирусен вектор, увеличава целуларността и повишава отлагането на колаген тип I и III в разкъсана ПКВ (Pascher и съавт., 2004).

Декоринът е нискомолекулен, богат на левцин протеогликан, който участва в колагеновата фибрилогенеза, като повишените нива на декорин водят до колагенови фибрили с по-малък диаметър. Ето защо, понижената експресия на декорин ще намали броя на фибрилите с по-малък диаметър и би подобрило биомеханичните качества на МКВ след увреда. Антисенс генната терапия, използваща олигонуклеотиди успешно редуцира декорина в зарастващата МКВ при заек, което води до увеличаване диаметъра на колагеновите фибрили, както и до 85 % увеличаване на якостта на опън на зарастващата МКВ (Nakamura и съавт., 2000). Антисенс генната терапия е

използвана за да се намали по-високото ниво на колаген тип III и V в зарастващата МКВ. Предварителните *in vitro* данни показват, че генната експресия на тези колагени може да бъде понижена с приблизително 40% (Jia и съавт., 2002, 2001; Shimomura и съавт., 2002). Изследванията *in vivo* показват, че олигонуклеотидите се поглъщат от фибробластите и намаляват експресията на протеина колаген тип V.

II.8.3 Трансфер на гени и генна терапия. Клетъчна терапия, богата на тромбоцити плазма и терапия с протеини

Мезенхимни стволови клетки (МСК) могат да се диференцират в различни клетъчни типове, включително фибробласти (Lazarus и съавт., 1995). МСК, изолирани от костния мозък, култивирани с или без трансфер на гени и накрая трансплантирани в приемните тъкани изглежда запазват своя потенциал за диференциране (Goshima и съавт., 1991; Haynesworth и съавт., 1992; Bruder и съавт., 1997; Khan и съавт., 2012; Lee и съавт., 2017).

МСК, имплантирани в увредена МКВ на плъх се диференцират във фибробласти. Клетките са мигрирали към неувредената област на връзката след 3 дни. Това показва, че МСК имат потенциала да се използват като средство за доставяне на терапевтични молекули, както и директно да стимулират зарастването на връзките (Watanabe и съавт., 2002). Saether и съавт. (2014) използват МСК *in vivo* по време на лечението на увреда на МКВ при плъх. Авторите използват две различни клетъчни дози - ниска и висока. Saether и съавт. (2014) установяват подобрени механични свойства след лечението с МСК, но по-интересното е, че те подобряват функционалното заздравяване когато се прилагат в по-ниска доза. Jiang и съавт. (2015) представят, че комбинацията от стволови клетки на МКВ и

CD34 + клетки, получени от пъпната връв, имат синергичен ефект върху оздравителния процес.

Amar и съавт. (2015) представят, че приложението на богата на тромбоцити плазма (PRP), не подобрява оздравителния процес на МКВ при експериментален модел на плъх след увреда.

Xu и съавт. (2013) посочват ролята на тимозин $\beta 4$ при оздравителния процес на МКВ при плъх след увреда. Авторите установяват 4 седмици след операцията и прилагането на тимозин $\beta 4$, че диаметрите на колагеновите фибрили са значително увеличени, съответно и механичните качества на връзките в сравнение с контролната група. Sakti и съавт. (2015) посочват, че локалното инжектиране на микро-рибонуклеиновата киселина – 210 (miRNA-210) може да ускори оздравителния процес на МКВ след увреда при плъх, което вероятно се дължи на стимулация на ангиогенезата. Hanhan и съавт. (2016) посочват, че прилагането на амелогенин подпомага оздравителния процес след увреда на МКВ при плъх. На 12-та седмица след увредата механичните свойства, структурата и състава на ставните връзки, третирани с този белтък са близки до нормата и значително превъзхождат по качества увредените лигаменти при нетретирани животни.

II.8.4 Биологично скеле

Естествените и синтетичните материали намират приложение за реконструкция на ставни връзки под формата на гелове, мембрани или 3D скелета (колаген, коприна, хиалуронова киселина, тънкочревна субмукоза от свиня, мембранозен слой от пикочния мехур, полихидоксиалканоати, като поли β -хидроксибутират, поли-3- хидроксибутират-ко-хидровалерат и поли-3-хидрокси-10-ундецеаноат). Изпозват се и синтетични материали:

дакрон полиестер, полигликолова киселина, поли L-млечна киселина, млечна киселина-ко-гликолид, ϵ -капролактон и етиленоксид са примери за синтетични материали (Yilgor и съавт., 2012).

Колагенът е един от първите естествени скелетни материали, използвани при реконструкцията на ставните връзки. В скелето може да бъдат допълнително включени фибробласти, PRP (Murray и съавт., 2007) и различни автоложни и алогенни типове клетки (Kinneberg и съавт., 2010) за постигане на подобрени механични свойства и репарация на ставната връзка (Yilgor и съавт., 2012). Съществуват и други биологични скелета: гелове или мембрани, направени от алгинат, хитозан или хиалуронова киселина (Druy and Mooney, 2003; Kim и съавт., 1998). За връзките е установено, че свинската тънкочревна субмукоза (СТС) подобрява тяхното възстановяване (Badylak и съавт., 1999; Musahl и съавт., 2004). СТС се състои главно от колаген (90 % от сухото тегло) и съдържа малко количество цитокини и растежни фактори като FGF и TGF- β (Badylak и съавт., 1999). Тя е резорбируемо скеле, което може да побере клетки и хранителни вещества, необходими за зарастването, както и да осигури колагенна структура, която да бъде ремоделирана (Badylak и съавт., 1995). При модел на кози Badylak и съавт. (1999) представят ролята на СТС, като резорбируем скелетен материал при реконструкцията на ПКВ.

Musahl и съавт. (2004) използват СТС като колагеново скеле за подобряване на процеса на оздравяване на МКВ при заек. Авторите доказват, че при групата с използваното скеле има повишена клетъчност, по-голяма плътност и по-правилно подреждане на колагеновите влакна. Ефектът от лечение с единичен слой СТС на 6 мм. цепковидна травма на заешка МКВ е изследван 12 и 26 седмици след операцията. Установено е, че устойчивостта на разтягане на КБМТ се повишава с 56 % в сравнение с нетретираната контрола, а максималното натоварване почти се удвоява на

12-тата седмица след травмата. Освен това тангенциалният модул на зарастващата МКВ се увеличава с повече от 50 % на 12-тата седмица и този ефект се запазва до 26 седмици, като групата третирана със СТС има с 33 % по-висок тангенциален модул и с 49 % по-високо натоварване при отказ. Хистологичният вид на третираната със СТС МКВ показва повишена целуларност, по-голяма плътност на колагена и по-добро подреждане на колагенните влакна (Musahl и съавт., 2004). Корелативно, съотношението на колаген тип V/I намалява със съответното увеличаване на диаметъра на колагенните фибрили. При лечението на увреди на МКВ прилагането на СТС подобрява значително лечебния процес (Liang и съавт., 2006; Liang и съавт., 2008). Woo и съавт. (2006) също посочват, че СТС подобрява морфологията на фибрилите и колагеновия състав при модел на увреда на МКВ при заек.

От направения литературен обзор се установяват следните неизяснени проблеми:

1. В литературата има редица експериментални модели относно оздравителния процес на МКВ и ПКВ, като се посочва и различния потенциал на възстановяване на двете връзки (Kim и съавт., 2003; Wijdicks и съавт., 2010; Kiarour и Murray, 2014; Vaishya и съавт., 2015; Andrews и съавт., 2017; Cai и съавт., 2017; Cai и съавт., 2019; Lee и съавт., 2020; Yu и съавт., 2020; Wang и съавт., 2020; Jin et al., 2021; Karamchedu и съавт., 2021; Li и съавт., 2021; Ryu и съавт., 2021; Maurice и съавт., 2022). Въпреки това, поради многото неизяснени въпроси за непълното възстановяване на МКВ и липсата на такова при ПКВ, както и за подобряване на терапевтичните алгоритми, експерименталните животински модели на заек, овца, куче, плъх и др. продължават и понастоящем. Нуждата от постигането на тези цели стимулират изследователите да търсят нови и иновативни методи за лечение. Поради сложния биологичен процес новите подходи трябва да се развиват в сътрудничеството между различни дисциплини, а не чрез индивидуалистичен подход в изследванията.

2. Хистологията на ставните връзки е добре проучена, но това не се отнася до една “проста“ и непредизвикваща до скоро интерес както сред морфолозите, така и сред ортопедичната общност обвивка на ставната връзка нар. ЕЛ. В литературата съществуват твърде оскъдни данни относно светлинно – микроскопското изследване на разпределението на клетъчния състав, както и на съдово-нервните комплекси в ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх както в норма, така и при различни модели на увреди. Липсват данни за съпоставянето на ЕЛ на плъх и човек, както и изучаването на ЕЛ при редица експериментални постановки свързани с клиничната практика.

3. Непроучени остават ултраструктурните характеристики на различните клетъчни съставки на ЕЛ при МКВ и ПКВ, както и наличието на съдово-нервните комплекси в ЕЛ при плъх и човек.

4. Не е проучено разпределението на фибрилообразуващите типове колагени в ЕЛ при експериментални животни. В литературата липсват данни и за разпределението им при човек.

5. Не е проучено разпределението на MMP-2 и -9, CD 34, α -SMA и VEGF в ЕЛ при МКВ и ПКВ при човек.

6. Не е изяснена ролята, като съществуват само хипотези относно функцията на клетъчния състав на ЕЛ, както и на съдово-нервните комплекси в него относно развитието и ролята им в комплекса на ставната връзка при животни и човек.

7. В литературата не се срещат данни относно разпределението на фибрилообразуващите типове колагени и промените в клетъчния състав в ЕЛ на МКВ при експериментални модели на регенерация на ставната връзка.

8. Не се откриват данни за процесите, които настъпват в ЕЛ на МКВ след увреда и шев на последната, както и сравнението ѝ с лечение без шев.

9. Съществуват редица теории относно липсата на оздравителен процес след увреда на ПКВ. Остава неизяснен въпросът може ли разликата в структурата на ЕЛ на ПКВ да има роля за обяснението на невъзможността за регенерация на ПКВ в сравнение с МКВ.

III. Цел и задачи

Цел:

Характеристика на клетъчния състав и съдово-нервните снопове в ЕЛ на МКВ и ПКВ на колянна става у плъх и съпоставянето и с тази при човек, с цел използването на експериментални модели на животни за изследване на ЕЛ, както в норма, така и при различни патологични състояния и приложението им в клиничната практика. Определяне на ролята на ЕЛ по отношение на нормалната функция на ставната връзка и по време на оздравителните процеси при експериментален модел. Въз основа на сравнението на тази структура при МКВ и ПКВ, чиито лечение и до днес представлява актуална тема в ортопедичната практика, предлагане на нова теория относно оздравителния процес на МКВ, както и невъзможността за такъв при ПКВ.

Задачи:

1. Определяне на разпределението на клетъчния състав и съдово-нервните снопове в ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек и сравнителна характеристика между тях. За целта се използва рутинна хистологична техника, трансмисионна електронна микроскопия, имунохистохимични методи, статистически анализ, както и използването на програма за оценка на имунохистохимичната експресия (ImageJ 1.52a), която да избегне субективната оценка на изследователя.

2. Установяване на статистически значими разлики в клетъчния състав на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек.

3. Установяване в ЕЛ на МКВ и ПКВ на фибрил-образуващите колагени у плъх и човек, както и разликите в експресията им с помощта на ImageJ 1.52a.

4. Изучаване ролята на ЕЛ по време на ранния оздравителен процес на МКВ при експериментален модел на плъх с помощта на светлинно-микроскопска техника, трансмисионна електронна микроскопия, имунохистохимични методи (оценка на фибрил-образуващите колагени), статистически анализ и софтуер.

5. Установяване в ЕЛ на МКВ и ПКВ на MMP-2 и -9, CD 34, α -SMA и VEGF у човек, както и разликите в експресията им с помощта на ImageJ 1.52a.

6. След анализа на горепосочените резултати създаване на нова «епилигаментарна теория» относно оздравителния процес на МКВ, както и невъзможността за първичен оздравителен процес на ПКВ.

IV. Материал и методи

Проучванията на ЕЛ в норма и след ятрогенна увреда бяха проведени върху МКВ на колянна става на плъх от породата “Вистар”. ЕЛ в норма бе изследван при ПКВ на същата порода. Детайлно изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ на колянна става се проведе и при човек.

Лабораторните плъхове за нуждите на настоящето изследване бяха осигурени от една затворена колония, създадена и развъдена във вивариума на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински Университет София. Те бяха отглеждани при стандартни условия – 12-часов светло-тъмен интервал, осигуряване на оптимална температура, влажност, достатъчни количества вода и стандартни гранули за гризачи. Спазени бяха международните принципи за експериментиране с животни (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC, National Academy Press, 1996), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет – София (КЕНИМУС). Трябва да се подчертае, че колянната става на плъх е със значителни анатомични прилики с човешкото коляно, което го прави отличен експериментален модел (Hildebrand и съавт., 1991).

IV. 1 Вземане на материал от МКВ и ПКВ

За хистологичен и имунохистохимичен анализ се използва материал от срединната част на МКВ и ПКВ на колянната става от 21 човешки стави (10 от мъжки пол и 11 женски пол), като средната възраст е 55 г. За анализа при плъх се използваха коленните стави на тридесет и два 8-месечни мъжки плъха.

При изследвания човешки материал липсваха клинични данни за остероартрит, както и нямаше белези от предишни операции около тях. Липсваше медицинска или оперативна история на заболяване за минала травма в областта.

След кожен разрез подлежащата подкожна тъкан беше дисецирана за да се покаже МКВ на коляното. МКВ и външната повърхност на обкръжаващия го ЕЛ бяха прецизно дисецирани и фиксирани в 10% формалин за 24 часа за хистологично и имунохистохимично изследване (желаната концентрация формалин бе изготвена в лабораторна среда от 37% разтвор на формалдехид - Merck Catalogue No. 1040031000, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). След отварянето на колянната става, материал беше взет и от междинната част на ПКВ и фиксиран отново в 10% формалин.

Впоследствие бе извършена дехидатация на материала в повишаващи се концентрации на етанол (70%, 80%, 95%, 100%) (Merck Catalogue No. 1009835000). Етанолът след това беше премахнат с помощта на кедрово масло, докато материалите не придобиха прозрачност. Последните бяха потопени в ксилен (Merck Catalogue No. 1082984000), след което в парафин (Merck Catalogue No. 1071511000).

IV.2 Светлинна микроскопия

За рутинното светлинно-микроскопско изследване бяха направени срезове на микротом (Leica, Wetzlar, Germany) с дебелина 5 μm . Така получените срезове бяха поставени на предметни стъкла. Те бяха рутинно оцветени с хематоксилин (Merck Catalogue No. 1051741000) и еозин Merck (Catalogue No. 1170811000), Малори и ван Гизон.

IV. 2.1 Изготвяне на парафинови тъканни срези

Промиване

Материалът престоя 24 часа във формалин (10%), след което беше промит с вода за отстраняване на формалина.

Обезводняване

Процесът бе извършен, като пробите преминаха през спиртова редица с различна концентрация (70-80-96% + 2 броя абсолютен алкохол) и след това последва 3 броя ксилол и 3 броя парафин.

Включване в уплътняваща среда

Включване на тъканните късчета в разтопен лабораторен парафин, специално приготвен за тази цел и съхраняван в термостат при температура 56-60°C. За включването бяха използвани специфични форми, поставени върху метална плоча. Оформиха се тъканни късчета в парафинови блокчета.

Приготвяне на срези от парафинови блокчета

1. Подготовката на предметните стъкла, върху които бяха залепени срезите премина през обработка с глицерин – белтък.
2. Фиксиране на микротомната пластина и подготвяне за рязане (ъгълът на пластината беше стандартизиран за движение в определен период).
3. Поставяне на парафиновото блокче на микротомната глава.
4. Определяне на дебелината на микротомния срез – 7-10 μm .
5. Извършване на среза, пренос върху предметно стъкло и опъване в периферните зони.

6. Подреждане на готовите препарати върху електрически нагревател за отстраняване на парафина от материала.

IV. 2.2 Оцветяване с хематоксилин и еозин

Отстраняване на парафина от предметните стъкла преди стартиране на процедурата. Преминаване на пробите през 3 броя ксилол за 30 минути. Последва премахване на ксилола чрез обработване на пробите с 3 броя етанол с низходяща концентрация, промиване с течаща вода и попиване. Последва стартиране на процедурата по оцветяване на готовите препарати.

Методика

7. Оцветяване с хематоксилин в рамките на 5 минути.
8. Вода за диференциране за 5-30 минути.
9. Диференциране в 1% разтвор на солна киселина в 70% спирт с продължителност 5-10 секунди.
10. 1% разтвор на еозин в рамките на 10 минути.
11. Течаща вода за 5 минути.
12. Диференциране в спирт.
13. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

Работни разтвори

1. За приготвянето на 0,2% разтвор на еозин се разтваря 1 грам еозин в 500 ml 70% разтвор на спирт.

2. За приготвянето на хематоксилин се разтваря 1 грам хематоксилин в 1 литър дестилирана вода на топло. На следващия етап към разтвора се прибавя 0,2 грама натриев или калиев йодат до пълното му разтваряне, след което се добавя 50 грама калиево-алуминиева стипца и 50 грама хлоралхидрат. След тяхното разтваряне се добавя 0,5 грама лимонена киселина.

IV. 2.3 Оцветяване по метода на Малори

След фиксацията във формалин бе проведена допълнителна фиксация в сместа на Ценкер за 15-30 минути, след което препаратите бяха поставени в йодна тинктура за премахване на сублиматните утайки. Последва депарафиниране на срезите и процедурата по оцветяване на готовите препарати.

Методика

1. Поставяне на препаратите в 1% разтвор на кисел фуксин за 1–2 минути.
2. Изплакване в дестилирана вода за 1 – 2 минути.
3. Пренасяне в 1% разтвор на фосфомолибденова киселина за 3–5 минути.
4. Изплакване в дестилирана вода.
5. Поставяне на срезите в прясно филтрирана смес от анилиново синьо, оранж G и оксалова киселина за 2 минути.
6. Промиване в дестилирана вода.
7. Диференциране в 96% спирт за 3–5 минути, докато под микроскоп се появиха колагенните влакна, оцветени в синьо.

8. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

Работни разтвори

1. 0,1 % воден разтвор на кисел фуксин.
2. 1% разтвор на фосфолибденова киселина.
3. Смес от 0,5 грама анилиново синьо, 2 грама оранж G, 2 грама оксалова киселина и 100 ml дестилирана вода. Сместа бе загрята до кипване, след което бе охладена и филтрирана непосредствено преди провеждане на процедурата по оцветяване на препаратите.

IV. 2.4 Оцветяване по метода на Ван Гизон

Отстраняване на парафина от предметните стъкла преди стартиране на процедурата. Преминаване на пробите през 3 броя ксилол за 30 минути. Последва премахване на ксилола чрез обработване на пробите с 3 броя етанол с низходяща концентрация. Извършване на промиване с течаща вода и попиване. Последва стартиране на процедурата по оцветяване на готовите препарати.

Методика

1. Оцветяване с хематоксилин на Вайгерт в рамките на 5 минути.
2. Вода за диференциране за 10-30 минути.
3. Разтвор на пикрофуксин в рамките на 1-3 минути.
4. Течаща вода за 5 минути.
5. Обезцветяване в 96% спирт.

6. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването бе извършено чрез накапване на карбол-толуол и толуол и включване в канадска балсам.

Работни разтвори

1. За приготвянето на първи разтвор на Вайгерт: 1 гр. хематоксилин се разтваря в 100 ml 96% спиртен разтвор.
2. За приготвянето на втори разтвор на Вайгерт: 4 ml от 29% разтвор на ликвор сескви хлоратум (50% железен трихлорид) се смесват с 1 ml концентрирана солна киселина и след това се добавят 95 ml дестилирана вода.
3. За приготвянето на разтворите вторият се налива към първия в по-малко количество, а не в равен обем, като останала част се добавя към сместа на капки с пипета.
4. За приготвянето на разтвор на пикрофуксин към 100 ml наситен разтвор на пикринова киселина се добавят 5-10 ml 1% воден разтвор на кисел фуксин.

IV. 3 Имунохистохимия

IV.3.1 Имунохистохимичен протокол на колаген тип I, проколаген тип III, колаген тип V при човек

За имунохистохимичния анализ на ЕІ на МКВ и ПКВ на човек срезове бяха поставени на предметни стъкла с желатиново покритие и бяха инкубирани за 1 час в 5% серум от коза (Vector Laboratories Catalogue No. S-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, United States) във фосфатен буфер (Merck Catalogue No. 6505-4 L). В последствие бе извършена инкубация с първичното антитяло за 24 часа на стайна

температура. Бяха използвани следните реагенти: миши моноклонални анти-колаген тип I IgG антитета (Santa Cruz Biotechnology Catalogue No. sc-293182, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany); миши моноклонални анти-проколаген тип III IgG антитета (Santa Cruz Biotechnology Catalogue No. sc-166316); миши моноклонални анти-колаген тип V IgG антитета (Santa Cruz Biotechnology Catalogue No. sc-166155); всички антитета бяха използвани в разреждане 1:500. След изплакване с фосфат буфериран физиологичен разтвор (PBS) (Merck Catalogue No. 6505-4 L), бе направена инкубация в биотинилирани кози анти-миши IgG антитета (Vector Laboratories Catalogue No. BA-9200) в разреждане 1:500 за 2 часа. Срезове бяха измити в PBS (Merck Catalogue No. 6505-4 L) и инкубирани в авидин-биотин пероксидазен комплекс (Vector Laboratories Catalogue No. PK-6100) за 1 час. Последва изплакване в PBS (Merck Catalogue No. 6505-4 L), а след това в 0.05 M Tris-HCl буфер с рН 7.6 (Sigma Aldrich Catalogue No. T5941, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Последва инкубация в 0.05% 3,3'-диаминобензидин тетрахидролорид (DAB) (Sigma Aldrich Catalogue No. D12384) съдържащ 1% H₂O₂ 1:100) за визуализиране на реакцията. Срезове бяха за кратко измити в 0.05M Tris-HCl буфер (Sigma Aldrich Catalogue No. T5941), рН 7.6. Предметните стъкла бяха изсушени на стайна температура за 24 часа, след което бяха измити с дестилирана вода 3 пъти за по 5 минути, контраоцветени с хематоксилин (Merck Catalogue No. 1051741000), изсушени на стайна температура и покрити с Entellan (Merck Catalogue No. 1079600500). 18 от срезите бяха използвани за контроли. Всички бяха инкубирани по гореописания метод, но без използването на първично или вторично антитяло. Всички контроли бяха негативни.

Фотомикографии на репрезентативни полета от имунохистохимичното оцветяване бяха получени с микроскоп Olympus CX

21 снабден с дигитална камера Olympus C5050Z (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan).

IV.3.2 Имунохистохимичен протокол на колаген тип I, колаген тип III и колаген тип V при плъх

За имунохистохимичния анализ на ЕЛ на МКВ и ПКВ на пъх бяха използвани слените първични антитела: миши моноклонални антитела срещу колаген тип I IgG (Santa Cruz Biotechnology Catalogue No. sc-293182, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany); миши моноклонални антитела срещу колаген тип III IgG (Abcam Catalogue No. ab6310, Abcam, Cambridge, United Kingdom); миши моноклонални антитела срещу колаген тип V IgG (Santa Cruz Biotechnology Catalogue No. sc-166155). Всички антитела бяха използвани в разреждане 1:500.

IV.3.3 Имунохистохимичен протокол на MMP-2 и -9, CD 34, α -SMA и VEGF при човек

Срезове се депарафинираха, обработиха в низходяща редица с етанол (100%, 95%, 80%, 70%) (Merck Catalog No. 1009835000) и се промива с 0,1 М фосфатен буфер (Merck Catalog No. 1465920006), рН 7,4, при стайна температура. Ендогенната пероксидазна активност се блокира с 3% водороден пероксид (H_2O_2) в продължение на 10 минути при стайна температура. Срезове се изплакнаха във фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS) (Merck Catalog No. 6505-4L) и неспецифичните места за свързване се блокират със Super Block cyTeK (Catalog No. AAA125, ScyTek Laboratories, Inc., Logan, Utah, USA) за пет минути. Първичните заешки анти-човешки поликлонални антитела срещу

ММП-2 (Sigma Aldrich Catalog No. HPA001939, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) и ММП-9 (Sigma Aldrich Catalog No. АВТ544) бяха добавени в разреждане 1:500, като се инкубираха за една нощ при 4°C. Миши анти-човешки моноклонални антитела срещу CD34 (M7165, DAKO, Agilent), миши анти-човешки моноклонални антитела срещу VEGF (M7273, DAKO, Agilent) и миши анти-човешки моноклонални антитела срещу α -SMA (M0851, DAKO, Agilent) бяха добавени в разреждане 1:100, като се инкубираха за една нощ при 4°C. Последва изплакване на срезове за ММП-2 и -9 в PBS (Merck Catalog No. 6505-4L) и инкубиране с биотинилиран кози анти-заешки имуноглобулин G (IgG) (UltraTek Anti-Rabbit, ScyTek Catalog No. UAR125) в продължение на 10 минути на стайна температура. След ново измиване на срезове и инкубирането им със стрептавидин-HRP (ItraTek HRP Anti-Rabbit, ScyTek Catalog No. UHR125) в продължение на 10 минути при стайна температура последва инкубация в DAB (Sigma Aldrich Catalog No. D12384) за 10 минути за визуализиране на реакцията. На срезите за CD 34, α -SMA и VEGF, като детектираща система бе използвана EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link) (K8002, DAKO Cytomation, Denmark, Agilent). Всички срези бяха контраоцветени с хематоксилин (Merck Catalog No. 1051741000), дехидратирани в повишаващи се концентрации на етанол (70%, 80%, 95%, 100%) (Merck Catalog No. 1009835000) и просветлени в ксилол (Merck Catalog No. 1082984000). За включването им се използва специфична среда – канадски балсам (Sigma Aldrich Catalog No. C1795). Срезове, използвани като контроли, се инкубираха по описания по-горе начин, но пропускайки първичното или вторичното антитяло. Всички контроли бяха отрицателни.

IV.4 Полуколичествен анализ на имунохистохимичата експресия

За полуколичествения анализ на експресията на колаген тип I и V и проколаген тип III се използва софтуер ImageJ 1.52a от National Institute of Health (NIH) (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Интензитетът на оцветяване е оценен чрез IHC Profiler plugin, свален от Sourceforge (<https://sourceforge.net/projects/ihcprofiler/>), в съгласие с приетия протокол на Varghese и съавт. (2014). IHC Profiler представя резултат за всяко визуализирано поле, като го оценява по четиристепенна система - високо позитивен (3+), позитивен (2+), слабо позитивен (1+) и негативен (0). Пет среза бяха използвани от всяка връзка, като се анализираха поне десет случайно избрани полета от всяко предметно стъкло. Финалният резултат бе средно аритметичното от всички визуализирани полета изчислен чрез IHC Profiler.

IV. 5 Количествен анализ на морфометричния параметър- брой клетки

За количествения анализ се използваха три случайно избрани стъкла получени от всеки парафинов блок съдържащ материал от МКВ или ПКВ, както следва: 36 стъкла от МКВ и 36 от ПКВ. ЕЛ, ендолигаментата и лигаментарната тъкан бяха визуализирани на всеки срез. Срезове бяха оцветени с хематоксилин (Merck Catalogue No. 1051741000) и еозин (Merck Catalogue No. 1170811000). Количествените данни бяха получени с компютъризираната система за снимков анализ NIS-Elements Advanced Research, Ver. 2.30 (Nikon CEE GmbH, Vienna, Austria). Представляващите интерес райони от всеки срез бяха случайно избрани от зони без руптури на лигаментата вследствие на лабораторното изготвяне на препарата.

Въпросните зони бяха първоначално открити на увеличение (x100, x200). Последва (при увеличение x400) случайния избор на зона кореспондираща на повърхност от 0.012 мм² от всяка от трите структури (ЕЛ, ендолигамент, лигаментарна тъкан). Пет такива зони бяха анализирани във всяка структура. Ядрата бяха ръчно маркирани с мишката. След това броят на клетките във всяка 0.012 мм² зона беше изчислен автоматично, оповавайки се на броя на ядрата. За по-ясно отразяване на получените резултати, броят на клетките бе изчислен пропорционално спрямо повърхност от 1 мм².

Получените резултати бяха обобщени и анализирани чрез Microsoft Excel 2010. За статистическия анализ беше използван Statistica software (Dell Software Inc., Round Rock, Texas, United States). При оценката на количествените данни се използва Sign test, като непараметрична алтернатива на t-test за срезове. Нулевата хипотеза (H₀) бе отхвърлена, а алтернативната хипотеза (H₁) бе приета. Статистически значима разлика бе отчетена при случай $p < 0.05$.

При оценката на експерименталния модел на оздравителния процес след руптура на МКВ се използваха два непараметрични теста за сравнение на получените данни на s- (без шев) и s + (с шев), Kruskal-Wallis H test, както и Mood's median test.

IV.6. Електронно-микроскопско изследване – трасмисионна електронна микроскопия

Фиксацията на материала се извърши в 3% разтвор на глутаралдехид (catalogue No. 354400, Merck KGgA, Darmstadt, Germany) за 2 часа. Последва многократно промиване на материала с 0.1M фосфатен буфер (catalogue No. 1465920006, Merck), рН 7,2 – 7,4, целящо да измие фиксатора. Извърши се допълнително фиксиране в 1% разтвор на OsO₄

(catalogue No. 1245050500, Merck) във фосфатен буфер (pH 7,4) при стайна температура за 2 часа. Промеждението се отново с 0.1M фосфатен буфер, а в последствие материалът бе дехидратиран във възходящи редици с етилов алкохол съотв. 50%, 75%, 95% и абсолютен алкохол (catalogue No. 1009835000, Merck). След дехидратацията материалът бе поставен за 15 минути в пропилен оксид (catalogue No. 8070270100, Merck), после в смес от пропилен оксид и смола 2:1 за 30 минути, след което в термостат на 56 градуса за 30 минути. След това материалът бе оставен в смола до следващата сутрин на стайна температура, а в последствие бе включен в Durcupan (Fluka Catalogue No. 14040, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), така че лентичките да заемат вертикално положение в най-долната част на желатиновите капсули за 48 часа в термостат на 56 градуса.

От получените капсули се изготвиха полутънки срезове, които се оцветиха с метиленово-синьо (catalogue No. 1159430025, Merck) азур II (catalogue No. 1092110010, Merck) фуксинова (catalogue No. 1159370025, Merck) базична боя. По този начин на светлинен микроскоп бе определена желаната за изследване зона. Посочените полутънки срезове се използваха и за рутинно светлинномикроскопско изследване. В последствие се извърши обрязване на ултратом (LKB, Stockholm-Bromma, Sweden) така, че да остане само желаната зона, като изготвените ултратънки срезове (100 nm) се поставиха на мрежички. Препаратите се контрастираха в 5% алкохолен разтвор на уранил ацетат (catalogue No. 102092-284, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) за 30 минути и разтвор на натриев цитрат (4,3%) (Catalogue No. 1110371000, Merck) и оловен нитрат (2,6%) (catalogue No. 1073980100, Merck). Наблюдението на обектите бе извършено на електронен микроскоп Hitachi 500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan).

IV.7 Оперативен протокол при увреда на МКВ на колянна става у плъх.

Времевите периоди на експерименталния модел за изследване бяха съответно 8, 16 и 30 ден след увредата, с цел да се извърши точен морфологичен анализ на промените по време на ранния оздравителен процес на ЕЛ и лигаментата след пълното му прекъсване (III степен увреда).

Тези периоди включват: острата репаративна фаза (до 3 седмица) и началото на хроничния репаративен период (след 3 седмици) (Encinas-Ullán и Rodríguez-Merchán, 2018).

Възстановяването на МКВ се състои от три фази - възпаление, пролиферация и ремоделиране. Осмият ден беше избран за представителна фаза на възпалението с образуване на изобилна грануляционна тъкан. Шестнадесетият ден представлява фазата на пролиферация с повишен синтез на колаген от фибробластите. Тридесетият ден представлява края на ранното заздравяване, с пролиферация и първоначално ремоделиране на лигаментата.

Чрез интраперитонеална апликация на комбинация от Ketamine (Calypsol, RG, Hungary) 45mg/kg и Nylazine (Bioveta, Czech Republic) 5mg/kg плъховете бяха въведени в анестезия. Левият долен крайник на животното бе обръснат и обработен с Braunol (B. Braun Melsungen, Germany). С помощта на скалпел беше направен малък разрез на кожата в областта над МКВ на колянната става. Последва екартиране на подлежащата съединителна тъкан над горепосочената ставна връзка. Със скалпел бе прерязана срединната и част, като двата прерязани края на връзката бяха маркирани с конец 9/0 Етхилон (Ethicon). При модела на хирургично лечение двата края на връзката бяха максимално репонирани с последващ шев на връзката с конец 5/0 Етхилон (Ethicon). След увредата

/шева на връзката/ кожата бе възстановена с непрекъснат шев. Последният бе дезинфекциран с Braunol. Животните, претърпели оперативна интервенция бяха оставени на свободен режим на движение.

При вземането на материала за светлинна и електронна микроскопия животните първоначално се наркотизираха с етер, след което се умъртвяваха чрез интраперитонеално инжектиран Phenobarbital (Софарма, България). След настъпване на смъртта се инжектираше 10% формалин или 3% разтвор на глутаралдехид около връзката, с последващо внимателно отпрепариране на МКВ на колянната става.

V. Нормална морфологична структура на ЕЛ при плъх и човек

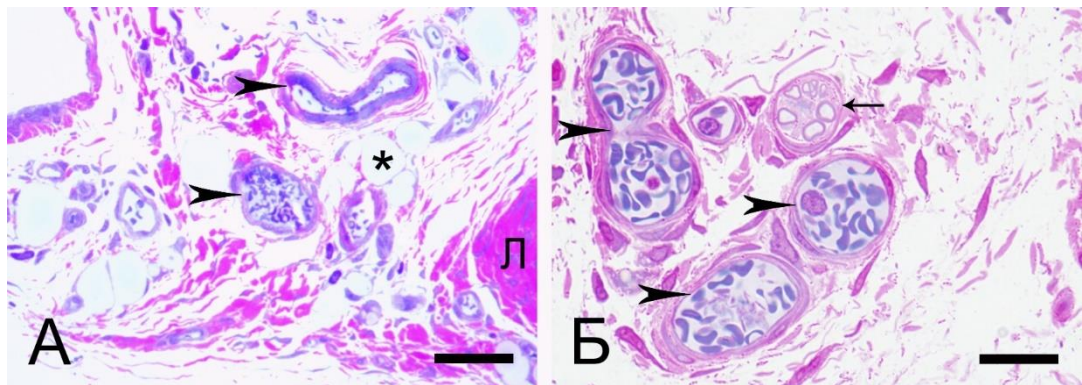
V.1. Светлинно-микроскопско, електронно-микроскопско и имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх.

V.1.1.1 Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх

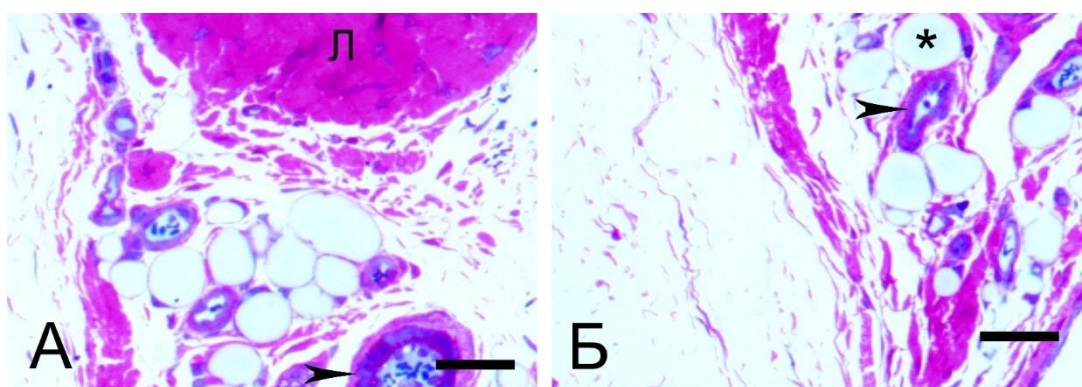
Нормалната структура на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх бе доста различна от морфологията на лигаментарната субстанция (Фигура V.1 и V.2 А, Б). За разлика от лигамента, където колагенните влакна са подредени във високо организирани компактни системи по неговата дължина, при ЕЛ те са ориентирани в различни посоки. Тези влакна заедно с разположените между тях фибробласти оформят добре обособен слой, който покрива ставната връзка. Фибробластите в ЕЛ на МКВ и ПКВ са разположени както по дължината му, така и в различни посоки, без ясно различаваща се закономерност на тяхната ориентация. Вътрешната повърхността на ЕЛ на МКВ бе близко разположена и свързана с медиалния менискус. Морфологията на ЕЛ бе доста подобна на тази на синовиума. Фибробластите на ЕЛ на МКВ и ПКВ притежават централно разположено или допряно до стената на клетката базофилно ядро и светла цитоплазма. Трябва да се отбележи, че броят на фибробластите в ЕЛ на МКВ бе отчетливо по-висок от този на ЕЛ на ПКВ. Между отделните фибробласти се наблюдаваха и синтезираните от тях колагенни влакна, изпълващи междуклетъчния матрикс. В пространствата между тях се откриваха нервни стволоче и добре обособени артериални и венозни съдове, чиито лумени бяха изпълнени с кръвни клетки. В нервните стволоче много добре се различаваха миелинови и амиелинови влакна, обвити от външна обвивка

(нар. епиневриум), изпълващ пространството между сноповете нервни влакна. Всеки сноп бе обвит също от обвивка (нар. периневриум). Наред с фибробластите се наблюдаваха и фиброцити, както и единични или групи клетки на бяла мастна тъкан – адипоцити (липоцити). Те имаха сферична форма и бяха разположени поединично или групирани на гроздове.

ЕЛ на МКВ и ПКВ се продължаваше в слой нар. ендолигамент, който обвиваше отделните снопове на лигамента.



Фигура V.1. Нормална морфология на външната повърхност на ЕЛ на МКВ на плъх. А) Светлинно-микроскопско изследване на ЕЛ представен от фибробласти, фиброцити, адипоцити (звездичка), заобиколени от колагенови влакна и кръвоносни съдове (стрелки). Размерна линия - 100 μm . Б) ЕЛ представен от фибробласти, фиброцити, колагенови влакна, нервни влакна (стрелка) и кръвоносни съдове (глави на стрелки). Размерна линия - 50 μm .



Фигура V.2. Нормална морфология на ЕЛ на ПКВ. Светлинно-микроскопско изследване на ЕЛ представен от фибробласти, фиброцити, адипоцити, заобиколени от колагенови влакна и кръвоносни съдове (стрелки). Л, лигаментарна тъкан. Б) ЕЛ представен от фибробласти, фиброцити, адипоцити (звездичка), колагенови влакна и кръвоносни съдове (стрелки). Размерна линия - 50 μm .

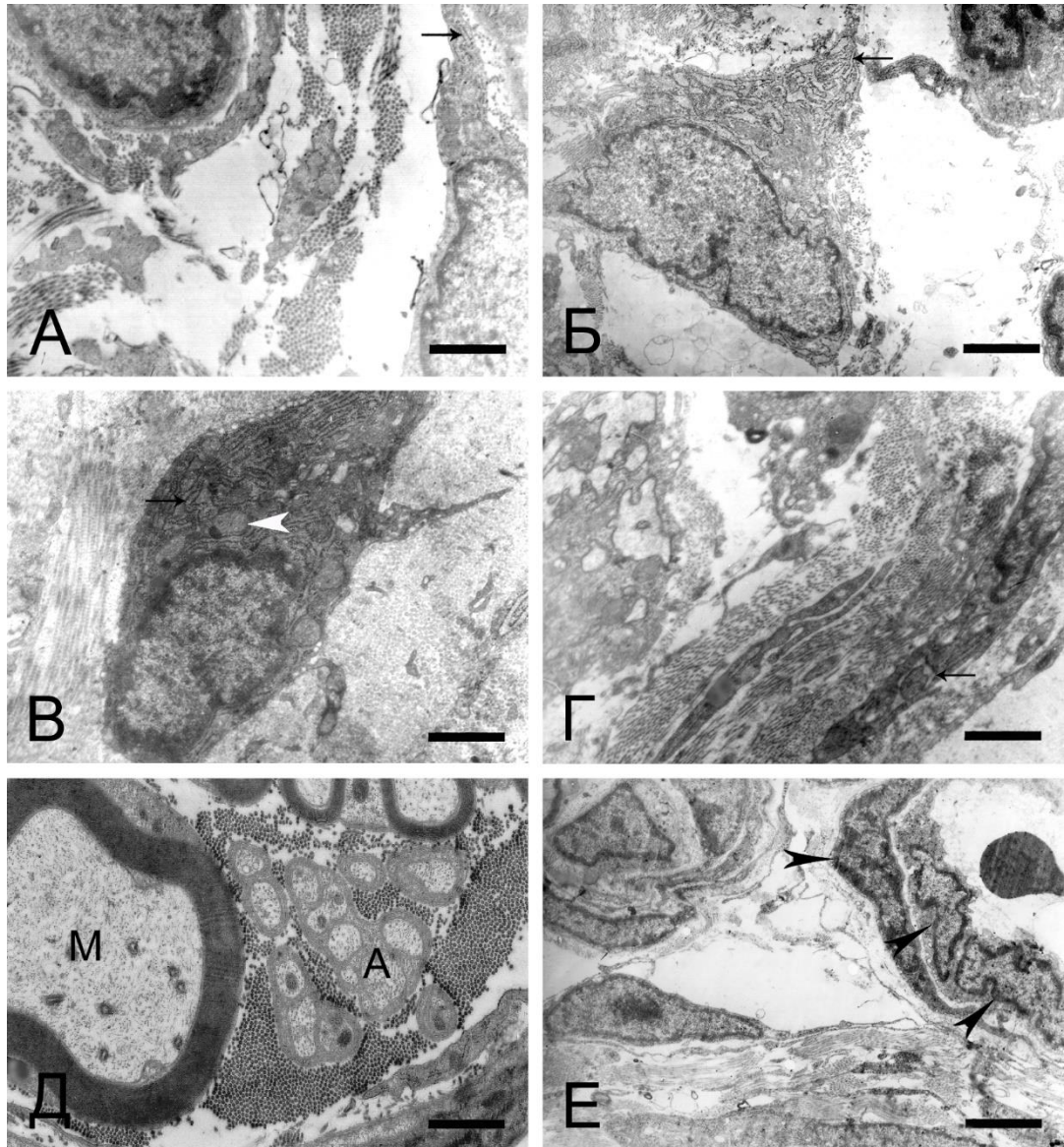
V.1.1.2 Електронно-микроскопско изследване на МКВ и ПКВ при плъх

Ултраструктурното изследване на МКВ и ПКВ показваше добре оформени единични или групи от фибробласти с голямо ядро, с едно ядърце и дифузно пръснат хроматин. Цитоплазмата на клетките съдържаше малко количество свободни рибозоми. Наблюдаваха се и относително малко кръгли митохондрии, по вътрешната мембрана на които се образуваха митохондриални кристи. Гранулираният ендоплазмен ретикулум бе представен от единични или двойни ламели покрити с рибозоми. Наблюдаваше се и недобре оформен апарат на Голджи като отделни двойни гладки мембрани, везикули или вакуоли. Фибробластите бяха ориентирани в различни посоки. (Фигура V.3 А-Г; Фигура V.4 А)

В междуклетъчното пространство се откриваха кръвоносни съдове с множество перипцити, обхващащи съда, мултивезикуларни телца, единични или снопове колагенни влакна, както и нервни структури. (Фигура V.3 Д, Е; Фигура V.4 В, Г) Рядко също се откриваха мастоцити с неправилна овална форма. Те притежаваха централно разположено сферично ядро с периферно разположен хетерохроматин. Цитоплазмата им съдържаше специфични кръгли или овални гранули, обвити с мембрана и разделени една от друга с цитоплазмени прегради. Сърцевината на всяка гранула беше хомогенна и електронно плътна. Мастоцитите притежаваха и къси цитоплазмени израстъци. В междуклетъчното пространство се откриваха хаотично ориентирани колагенни влакна, рядко групирани в снопове. (Фигура V.4 Б) Честотата им при МКВ бе отчетливо по-висока от тази при ПКВ.

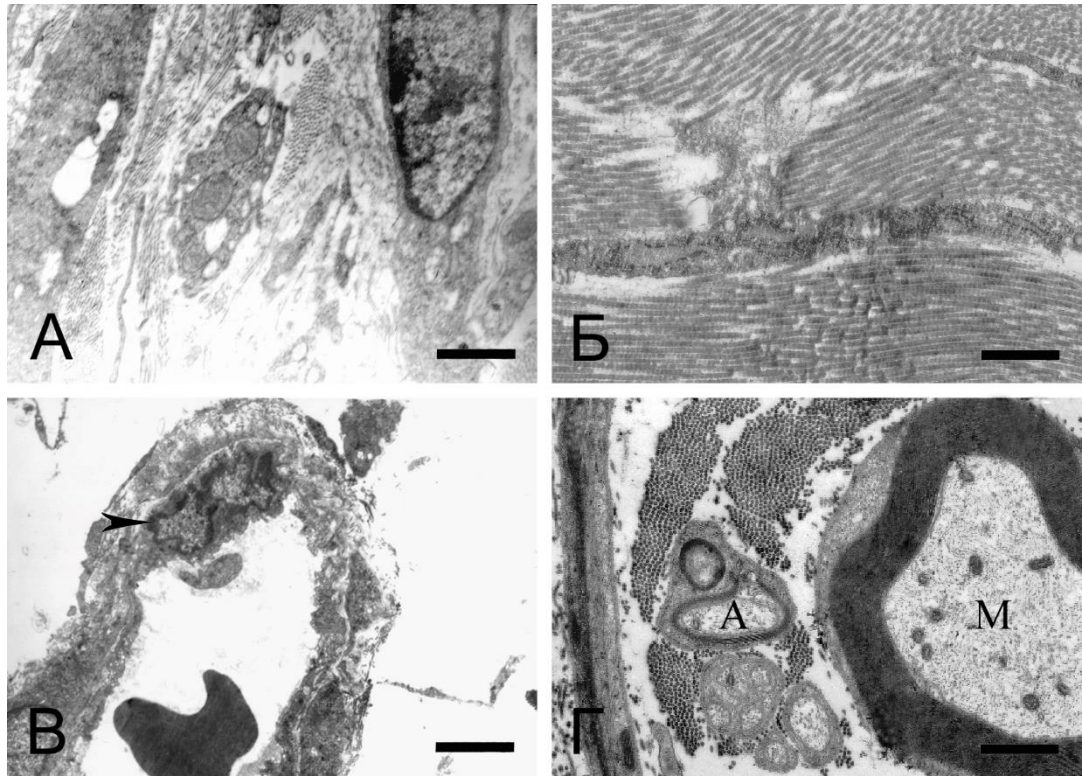
ЕЛ на МКВ и ПКВ продължаваше в слой нар. ендолигамент, който обвиваше отделните снопове на лигамента. В лигамента фибробластите имаха звездовидна форма, разположени между отделните колагенни снопове, като оформяха мрежовидни структури. Фибробластите

притежаваха голямо ядро, добре оформен гранулиран ендоплазмен ретикулум, слабо развит апарат на Голджи, рибозоми, полизоми и големи цитоплазмени израстъци, които обвиваха отделните снопове колагенни влакна на лигамента.



Фигура V.3. Нормална морфология на външната повърхност на ЕЛ на МКВ у плъх. А) Електронограма на фибробласти с голямо ядро, добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка) и колагенови влакна; Размерна линия – 1.5 μm ; Б) Електронограма на фибробласт с голямо ядро и добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка). Размерна линия - 2.3 μm ; В) Електронограма на фибробласт в междуклетъчното пространство с голямо ядро, силно развит гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки), сферични митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна; Размерна линия - 1,1 μm ; Г) Електронограма

на фибробласти в междуклатъчното пространство с голямо ядро, добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка) и колагенови влакна; Размерна линия - 2.3 μm ; Д) Електронограма на миелинизирани (М) и амиелинизирани влакна (А) в ЕЛ; Размерна линия - 1,1 μm . Е) Електронограма на фибробласт с триангуларна фотма и фиброцити с вретеновидна форма, както и перицити около кръвоносен съд. Размерна линия - 1,5 μm .

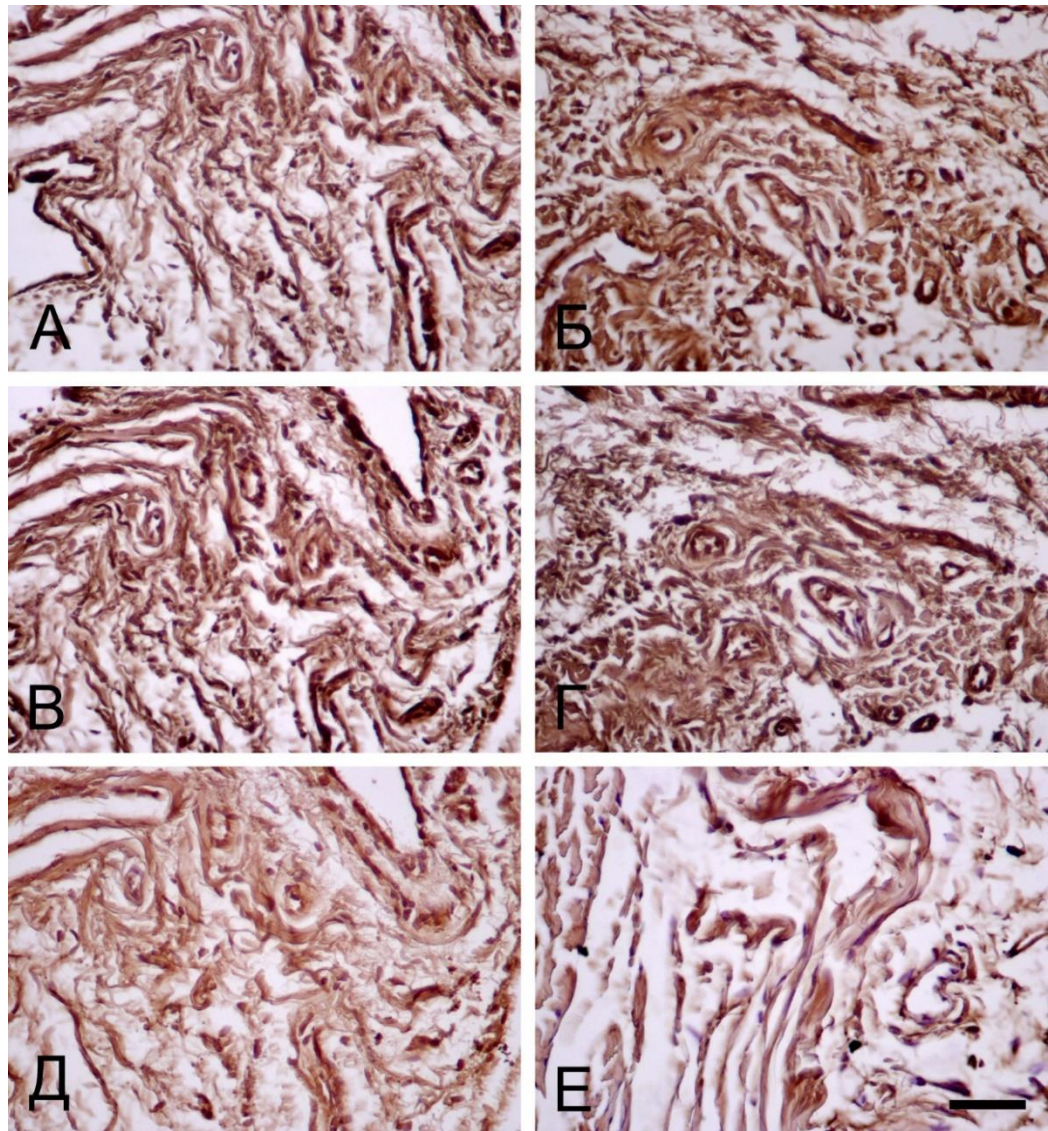


Фигура V.4. Нормална морфология на външната повърхност на ЕЛ на ACL у плъх. А) Електронограма на фибробласт с голямо ядро, слабо представен гранулиран ендоплазмен ретикулум и колагенови влакна; Размерна линия – 1.5 μm ; Б) Електронограма на междуклетъчно вещество с колагенови влакна. Размерна линия - 2.3 μm ; В) Електронограма на кръвоносен съд и перицити (глава на стрелка). Размерна линия - 1,5 μm ; Г) Електронограма на миелинизирани (М) и амиелинизирани влакна (А) в ЕЛ; Размерна линия - 1,1 μm .

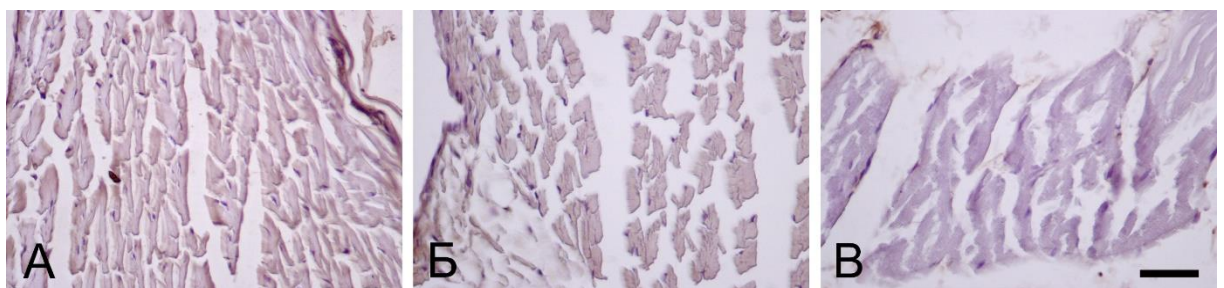
Сходна морфология на ЕЛ, както на светлинномикроскопско, така и на ултраструктурно ниво се наблюдаваше и при ЕЛ на латералната колатерална връзка връзка на колянната става.

V.1.1.3 Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ у плъх

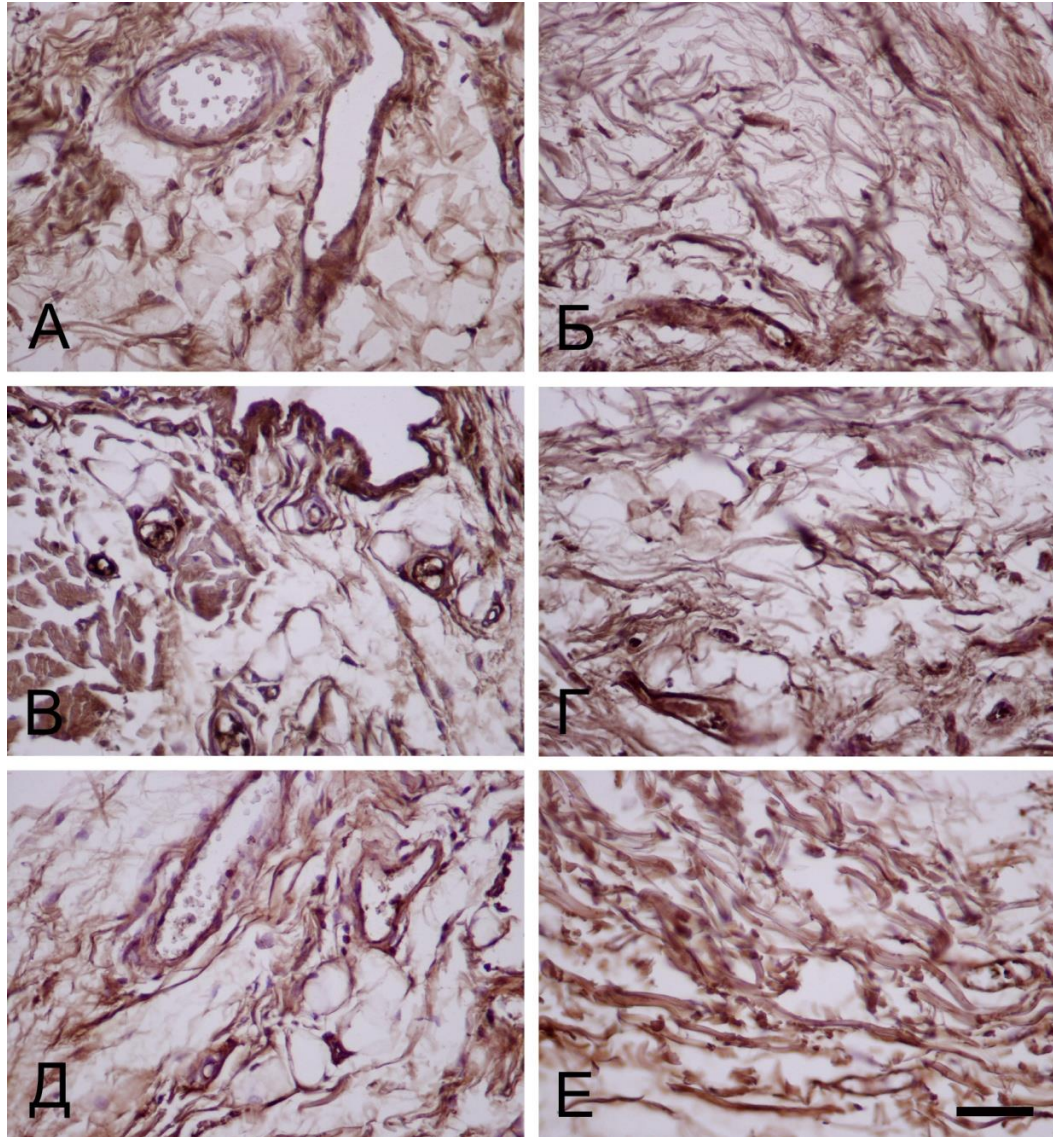
При МКВ имунохистохимичната реакция за колаген тип I бе твърде отчетлива в ЕЛ и особено силно изразена във всички слоеве на стените на кръвоносните съдове (Фигура V.5 А, Б). В ЕЛ на ПКВ се отчете експресия на колаген тип I в адвентицията на кръвоносните съдове (Фигура V.7 А, Б). В двата лигамента оцветяването изглеждаше умерено интензивно по цялата им площ (Фигури V.6 А и V.8 А). В стените на кръвоносните съдове, в периферията на адипоцитите и в периферния слой на ЕЛ се наблюдаваше имунореактивност за проколаген тип III (Фигура V.5 В, Г и Фигура V.7 В, Г). Експресията на този колаген в лигамента при МКВ и ПКВ и бе слаба до липсваща (Фигури V.6 Б и V.8 Б). Имунохистохимичната реакция за колаген тип V се отчете най-вече в адвентицията на кръвоносните съдове, в повърхностния слой на ЕЛ и при двата лигамента (Фигура V.5 Д, Е и Фигура V.7 Д, Е). Експресията му в лигамента при МКВ и ПКВ бе слаба до липсваща (Фигури V.6 В и V.8 В).



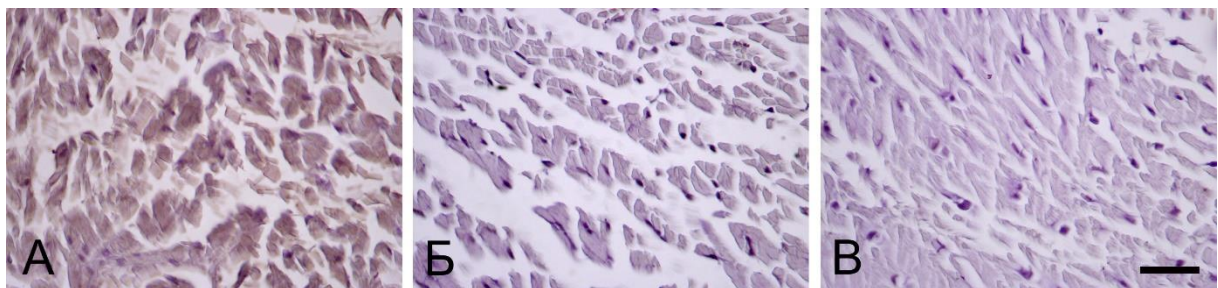
Фигура V.5. Имунохистохимична експресия (ИХЕ) на колаген тип I, III и V в епилигаментата на МКВ на плъх. А, Б) ИХЕ на колаген тип I; В, Г - ИХЕ на колаген тип III; Д, Е - ИХЕ на колаген тип V. Размерна линия - 50 μ m.



Фигура V.6. ИХЕ на колаген тип I, III и V в лигаментарната част на МКВ на плъх. А) ИХЕ на колаген тип I; Б) ИХЕ на колаген тип III; В) ИХЕ на колаген тип V. Размерна линия - 50 μ m.



Фигура V.7. ИХЕ на колаген тип I, III и V в епилгамента на ПКВ на плъх. А, Б) ИХЕ на колаген тип I; В, Г - ИХЕ на колаген тип III; Д, Е - ИХЕ на колаген тип V. Размерна линия - 50 μm .



Фигура V.8. ИХЕ в ЕЛ на ПКВ на плъх. А, Б) ИХЕ на колаген тип I; В, Г - ИХЕ на колаген тип III; Д, Е - ИХЕ на колаген тип V. Размерна линия - 50 μm .

От извършения полуколичествен анализ с ИНС Profiler бе определена разликата в интензивността на имунохистохимичната реакция между ЕЛ и лигамента на МКВ и ПКВ. Резултатите са показани в *Таблица 1*.

Типове колаген	МКВ		ПКВ	
	ЕЛ	Л	ЕЛ	Л
Колаген тип I	Силно позитивна (3+) (6%) Позитивна (2+) (58%) Слабо позитивна (1+) (19%) Негативна (0) (17%)	Позитивна (2+) (22%) Слабо позитивна (1+) (42%) Негативна (0) (36%)	Позитивна (2+) (25%) Слабо позитивна (1+) (56%) Негативна (0) (19%)	Позитивна (2+) (27%) Слабо позитивна (1+) (39%) Негативна (0) (34%)
Проколаген тип III	Силно позитивна (3+) (56%) Позитивна (2+) (22%) Слабо позитивна (1+) (13%) Негативна (0) (9%)	Позитивна (2+) (3%) Слабо позитивна (1+) (50%) Негативна (0) (47%)	Позитивна (2+) (49%) Слабо позитивна (1+) (30%) Негативна (0) (21%)	Слабо позитивна (1+) (31%) Негативна (0) (69%)
Колаген тип V	Силно позитивна (3+) (39%) Позитивна (2+) (35%) Слабо позитивна (1+) (20%) Негативна (0) (6%)	Слабо позитивна (1+) (12%) Негативна (0) (88%)	Позитивна (1+) (44%) Слабо позитивна (1+) (31%) Негативна (0) (25%)	Слабо позитивна (1+) (17%) Негативна (0) (83%)

Таблица 1. Представя интензитетът на имунохистохимичната реакция на колаген тип I и V и проколаген тип III изчислен полуколичествено използвайки ИНС Profiler.

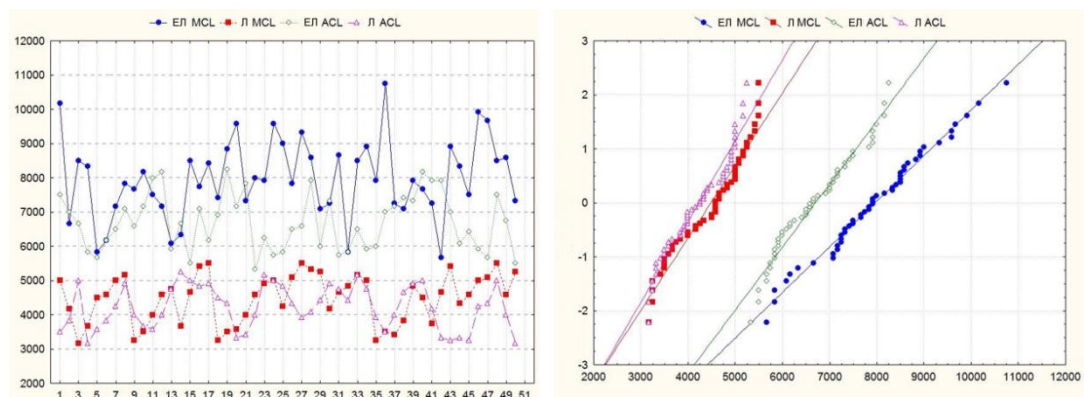
Установиха се разлики в ЕЛ при МКВ и ПКВ, както и вариации в експресията на изследваните молекули.

Експресията на колаген тип I е основно позитивна (2+) в ЕЛ на МКВ и слабо позитивна (1+) в ЕЛ на ПКВ. В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията бе слабо позитивна до липсваща. Експресията на проколаген тип III беше силно позитивна (3+) в ЕЛ на МКВ и позитивна (2+) в ЕЛ на ПКВ. В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията бе

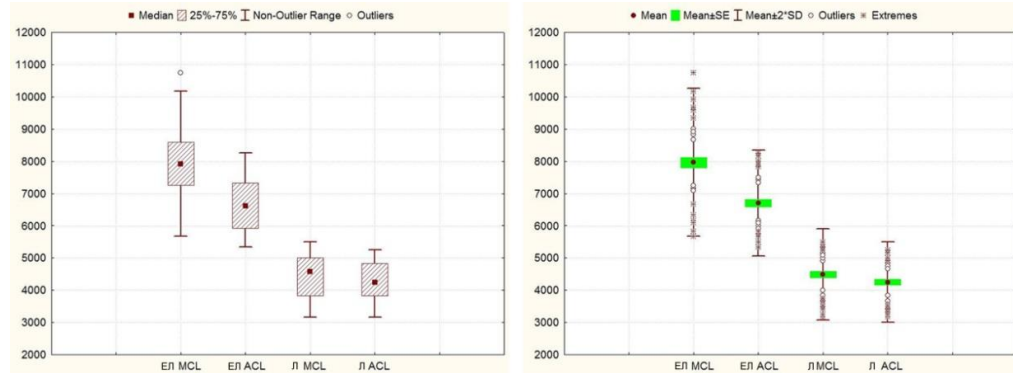
слабо позитивна до липсваща. Експресията на колаген тип V бе силно (3+) до позитивна (2+) в ЕЛ на МКВ и позитивна (2+) и слабо позитивна (1+) в ЕЛ на ПКВ. В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията бе слабо позитивна до липсваща.

V.2 Количествен анализ на ЕЛ и лигамента при плъх

Броя на клетките е оценен на площ от $0,012 \text{ mm}^2$ в 50 области от препарата, както на ЕЛ така и на самия лигамент, след което се изчислява пропорционално на площ от 1 mm^2 . Получените стойности са представени с диаграми (Фигура V.9). Средните стойности, медианата и стандартното отклонение са изчислени и представени в Таблица 2. Графиките представени на Фигура V.10 са създадени за визуално представяне на разликата в средните стойности и медианата. Разликата в броя на клетките на mm^2 бе тествана със Student T-test. Статистически значима разлика ($p < 0,05$) е отчетена между средните стойности за брой клетки на mm^2 между ЕЛ на МКВ и този на ПКВ. Обратно, анализът на разликата между стойностите в лигаментарната тъкан дава $p > 0,05$, като отчетената разлика не се счита за статистически значима (Таблица 3).



Фигура V.9. Графика показваща обхвата на получените стойности за броя клетки на mm^2 в ЕЛ и лигамента (Л) на МКВ и ПКВ на колянна става на плъх. а - линейна графика по оста х е нанесен броят на измервания, по оста у - получените стойности. б - графика на нормалното разпределение.



Фигура V.10. Графично представяне на данните от дескриптивния статистически анализ на данните за броя на клетките в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. а) вляво кватилна диаграма, показваща медианата (квадратите). Долната и горната граница на правоъгълника показват съответно 25-ти и 75-ти перцентил. Отсечките под и над правоъгълника представят диапазона на броя, а кръга – отдалечените стойности; б) вдясно кватилна диаграма показваща средната стойност (червена точка). Долната и горната страна на правоъгълниците показват съответно средната стойност (Mean) коригирана със стандартната грешка (SE) [Mean - SE Mean + SE]. Отсечките под и над правоъгълника показват средната стойност, коригирана с две стандарти отклонения (2SD) [Mean - 2SD Mean + 2SD].

	ЕЛ МКВ	Л МКВ	ЕЛ ПКВ	Л ПКВ
Средна стойност	7963.33	4483.33	6701.67	4230
Медиана	7916.67	4583.33	6625	4250
SD	1148.44	708.11	822.22	636.11
Мин	5667	3167	5333	3167
Макс	10750	5500	8250	5250
_25%	7250	3833.33	5916.67	3666.67
_75%	8583.33	5000	7333.33	4833.33

Таблица 2. Таблица представяща дескриптивния статистически анализ на данните за броя на клетките на mm^2 в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. SD стандартно отклонение.

	Средна стойност Група 1	Средна стойност Група 2	Група 1-Група 2	SD1	SD2	p-value
ЕЛ МКВ c/y ЕЛ ПКВ	7963.33	6701.67	1261.66	1148.44	822.22	0.000
Л МКВ c/y Л ПКВ	4483.33	4230	253.33	708.11	636.11	0.063

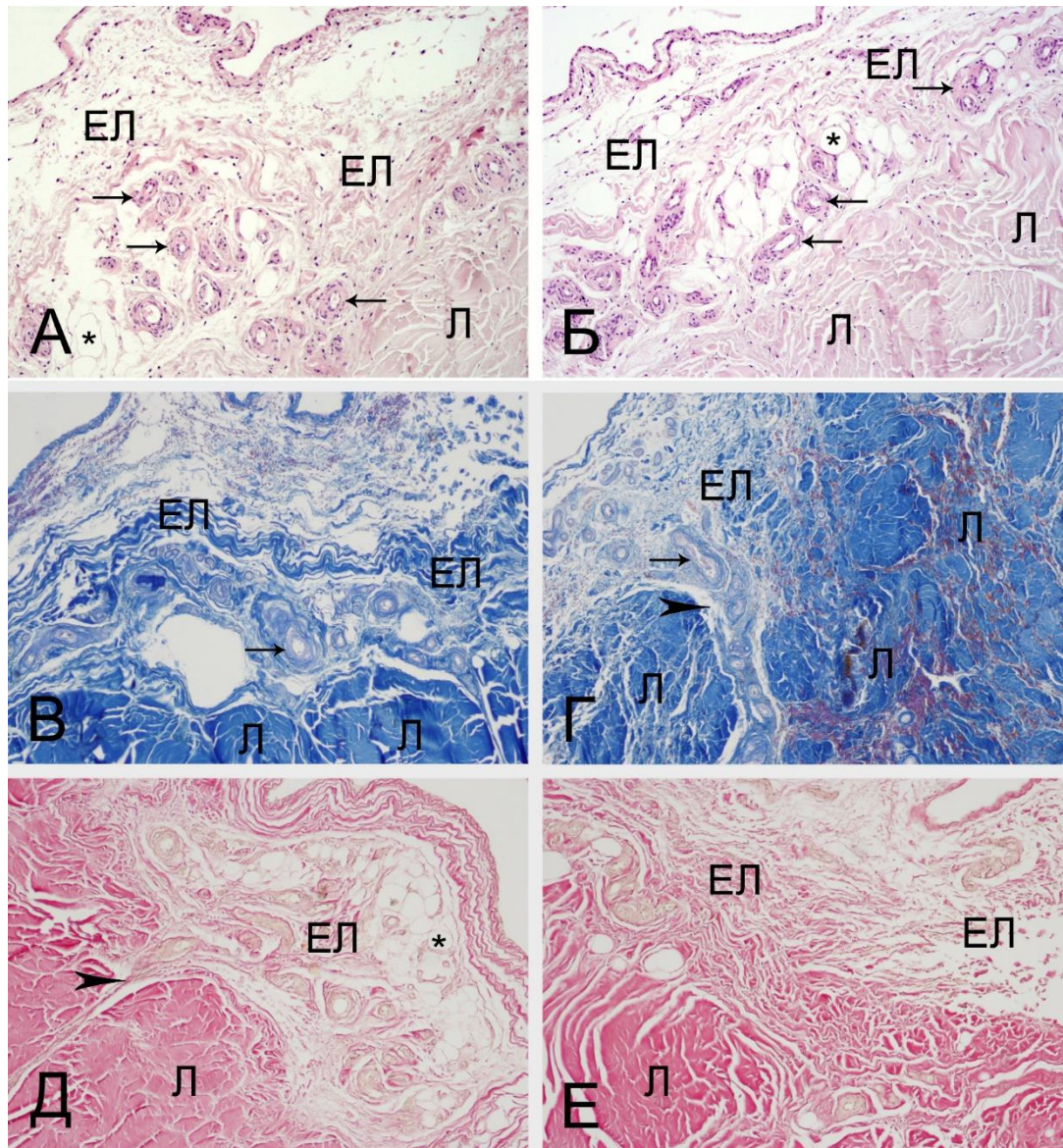
Таблица 3. Таблица представяща разликите между средните стойности на данните за броя на клетките на mm^2 в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. SD - стандартни отклонения.

V.3 Светлинно-микроскопско, електронно-микроскопско и имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.

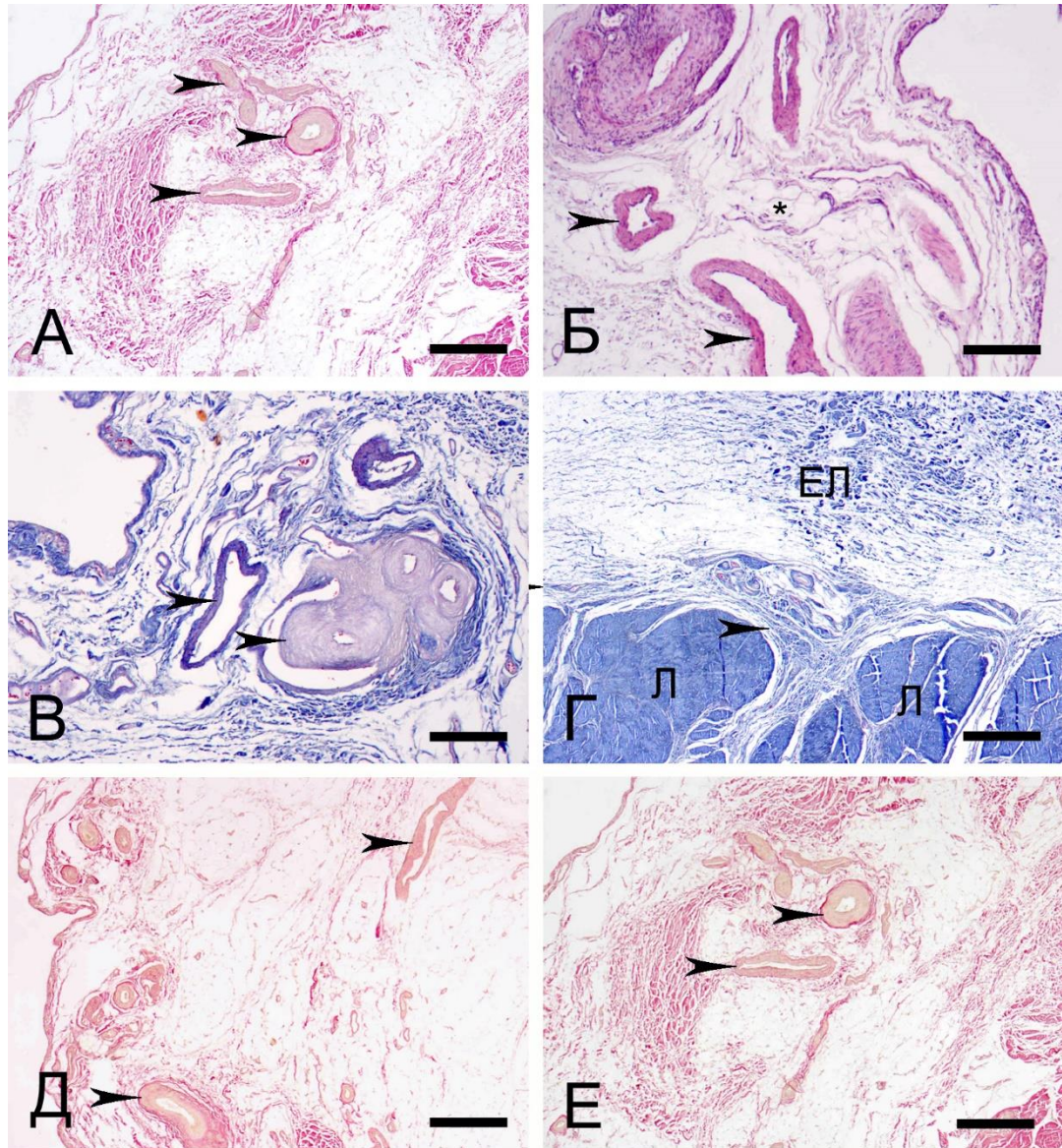
V.3.1 Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.

Нормалната структура на ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек е с доста различна морфология на лигаментарната им субстанция. Външната повърхност на ЕЛ на МКВ и ЕЛ на ПКВ е съставена от различни типове съединително тъканни клетки, включително фибробласти, фиброцити, мастни клетки (адипоцити), както и наличие на съдово-нервни снопове, разположени сред многобройни фасцикули (Фигура V.11 и Фигура V.12). Броят на фибробластите в ЕЛ на МКВ бе отчетливо по-висок от този на ЕЛ на ПКВ. В ЕЛ на човек се наблюдава наличието на голям брой екстрацелуларни колагенови влакна, както с хаотично разпределение, така и ориентирани в снопове. Вътрешната част от повърхността на ЕЛ на МКВ е близко разположена и свързана с медиалния менискус. Морфологията на вътрешният слай на ЕЛ наподобява тази на синовията.

За разлика от ЕЛ, лигаментната тъкан на МКВ и ПКВ се характеризира с обичайна подредба и е изградена от колагенови влакна, които са паралелно ориентирани, формирайки фасцикули (Фигура V.11 и Фигура V.12). Всеки фасцикул е привидно хипоцелуларен и клетките са разположени между колагеновите влакна. Лигаментната тъкан съдържа много по-малко кръвоносни съдове и нервни елементи, в сравнение с тази на ЕЛ.



Фигура V.11. Нормална морфология на ЕЛ и лигаментарната тъкан на МКВ при човек. ЕЛ - епилигамент; Л - лигамент; стрелки – кръвоносни съдове в ЕЛ; звездички – адипоцити; глава на стрелка (място на навлизане на ЕЛ в Л). А, Б) Хематоксилин еозин. Размерна линия - 100 μm . В, Г) Оцветяване по Малори . Размерна линия - 50 μm . Д, Е) Оцветяване по ван Гизон. Размерна линия - 100 μm .



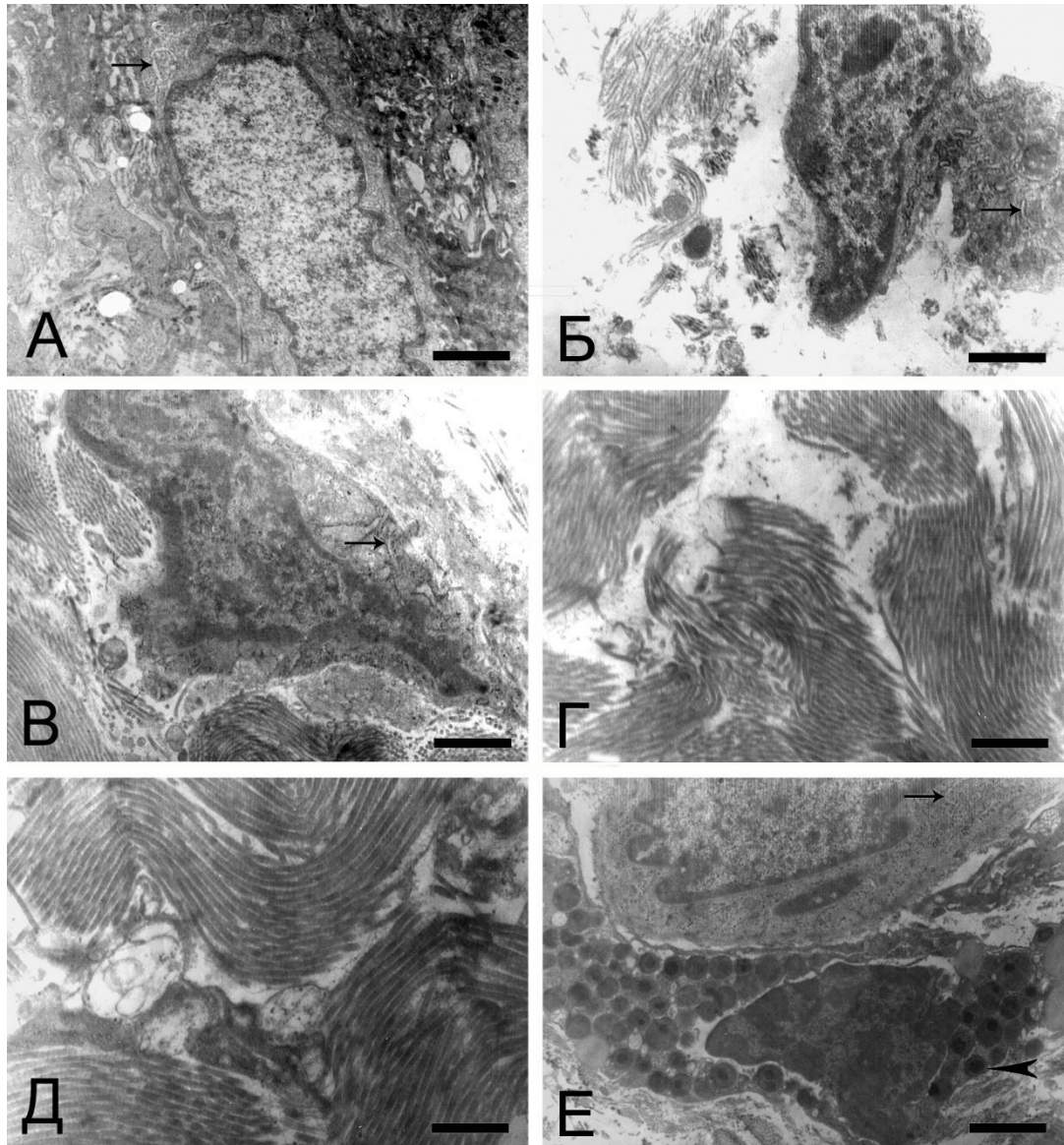
Фигура V.12. Нормална морфология на ЕЛ и лигаментарната тъкан на ПКВ при човек. ЕЛ - епилигамент; Л - лигамент; стрелки – кръвоносни съдове в ЕЛ; звездички – адипоцити. А) Хематоксилин еозин. Скала – А) 100 μm , Б) 50 μm . В, Г) Оцветяване по Малори . Скала - 50 μm . Д, Е) Оцветяване по ван Гизон. Д) Размерна линия - 100 μm , Е) Размерна линия - 50 μm .

V.3.2. Електронно-микроскопско изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек

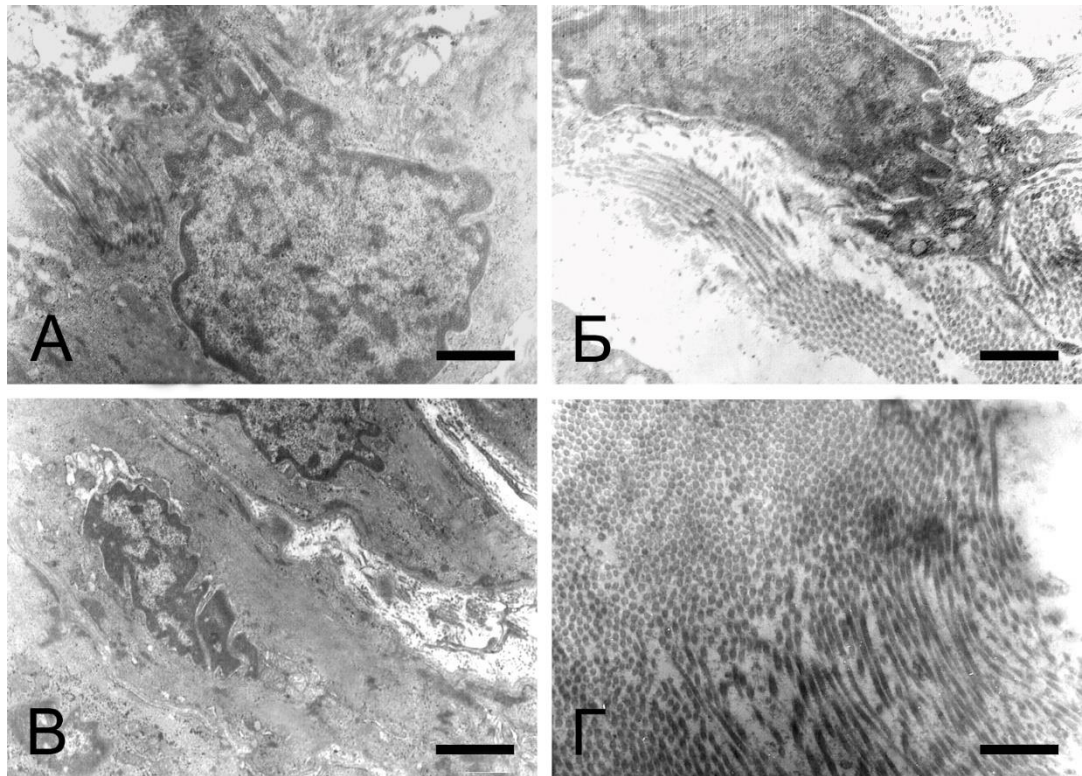
ТЕМ представи наличието на различни по форма фибробласти в ЕЛ: с удължена или вретеновидна форма, с множество спинозни израстъци и такива с неправилна форма. Те имаха големи ядра, добре развит гранулиран ендоплазмен ретикулум, множество рибозоми, слабо развит апарат на Голджи, единични митохондрии и лизозоми с овална форма (Фигура V.13 А-В, V.14 А-В). Електронно микроскопското изследване представи и наличието на адипоцити и мастоцити. Мастоцитите притежаваха добре оформени ядра с периферно разположен хетерохроматин. Цитоплазмата им съдържаше специфични гранули с електронно плътна хомогенна сърцевина, с кръгла или овална форма. Отделните гранули бяха обвити с мембрана и разделени една от друга с цитоплазмени прегради (Фигура V.13 Е). ТЕМ представи адипоцитите с големи липидни капки, които изтласкват цитоплазмата в периферията на клетката. Ядрата на адипоцитите са ексцентрично разположени. Колагенните влакна в ЕЛ бяха организирани в снопове с различна ориентация или по единично хаотично ориентирани, за разлика от успоредното им разположение в лигаментарната тъкан. (Фигура V.13 Г, Д, V.14 Г). Отново хаотично ориентирани се наблюдаваха малки групи от колагенови фибри, рядко групирани в снопове. Честотата им при МКВ бе отчетливо по-висока от тази при ПКВ. Значителни разлики се наблюдаваха и по отношение на броя на фибробластите, които превалираха в ЕЛ на МКВ. Миелинови и амиелинови влакна изграждаха нервните снопове.

Както и при ЕЛ на плъх се наблюдаваше значителна разлика в сравнение с тази на лигаментарната тъкан. Тя отново се характеризираше с колагенови влакна, които бяха паралелно ориентирани формирайки фасцикули. Последните бяха хипоцелуларни и фибробластите им се

разполагаха между колагеновите влакна. Лигаментната тъкан съдържаше много по-малко кръвоносни съдове и нервни елементи, в сравнение с тази на ЕЛ и при двата лигамента.



Фигура V.13. Нормална морфология на ЕЛ на МКВ при човека. А-В) електронограма на фибробласт с добре представено голямо негово ядро. В цитоплазмата се наблюдават митохондриите, лизозомите и гранулитан ендоплазмен ретикулум (стрелка); в извънклетъчното пространство има наличие на множество колагенови влакна $\times 7000$. Г, Д) електронограма на колагенови влакна извънклетъчното пространство на ЕЛ, ориентирани в различни посоки $\times 7000$, $\times 9000$. Е) електронна микрография на фибробласт и мастоцит (Mc) с многобройни гранули (глава на стрелка) и негово ядро. $\times 9000$.



Фигура V.14. Нормална морфология на ЕЛ на ACL при човек. А-В) електронограма на фибробласт с добре представено ядро. В цитоплазмата се наблюдават рядко добре представен гранулитан ендоплазмен ретикулум, митохондрии и лизозомите; в извънклетъчното пространство има наличие на колагенови влакна x 7000, x 7000, x 7000. Г) Електронограма на колагенови влакна в извънклетъчното пространство на ЕЛ. X 9000.

V.3.3. Имунохистохимично изследване на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.

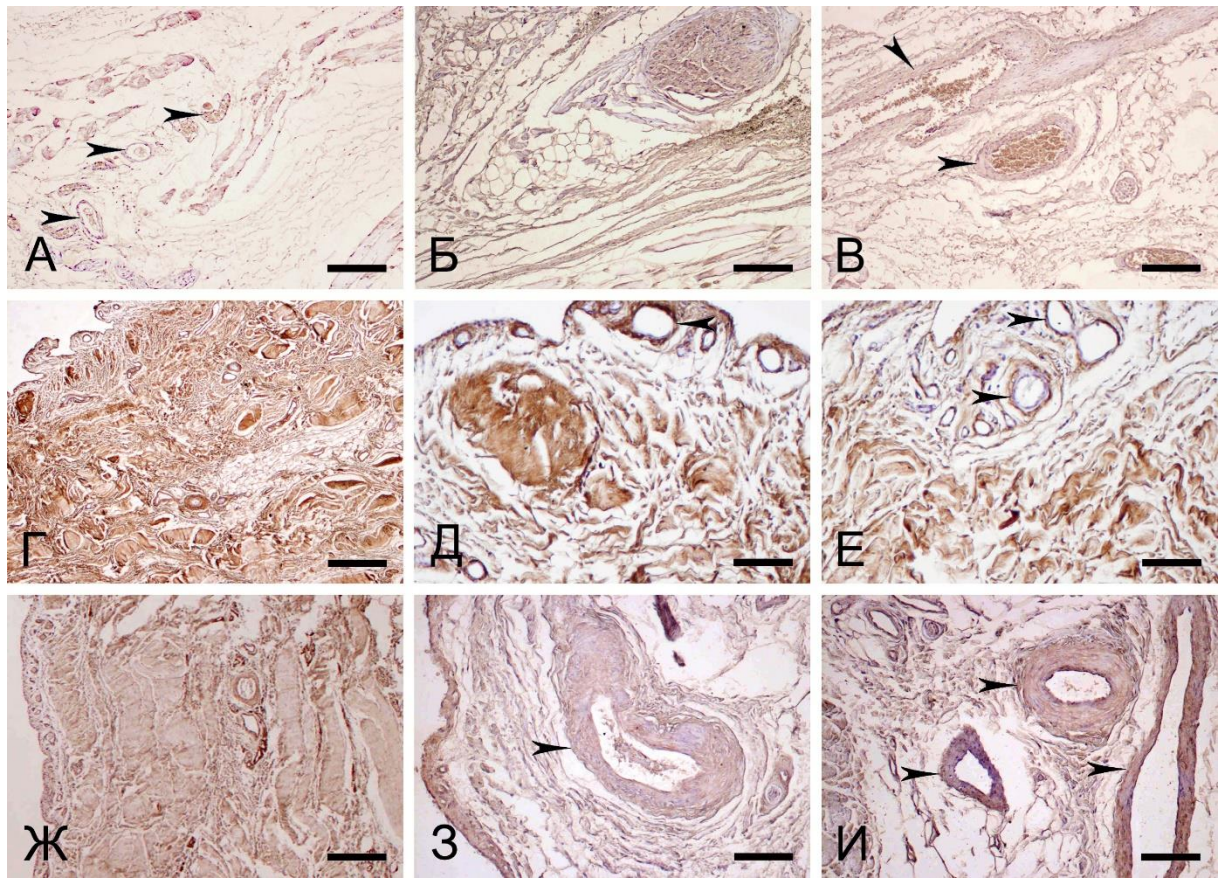
V.3.3.1. Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек

В ЕЛ имунологична експресия за колаген тип I се наблюдава основно в tunica media на кръвоносните съдове (Фигура V.15 В). В лигаментарната тъкан на МКВ и на ПКВ имунореактивността е проявена на целия препарат (Фигура V.17 А, Фигура V.18 А). Имунохистохимичната реакция за проколаген 3 бе отчетена в адвентицията на кръвоносните съдове и по повърхността на адипоцитите в ЕЛ, като е много по-силно изразена в ЕЛ на МКВ в сравнение с ЕЛ на ПКВ (Фигура V.15 Г-Е; Фигура V.16 Г-Е). В

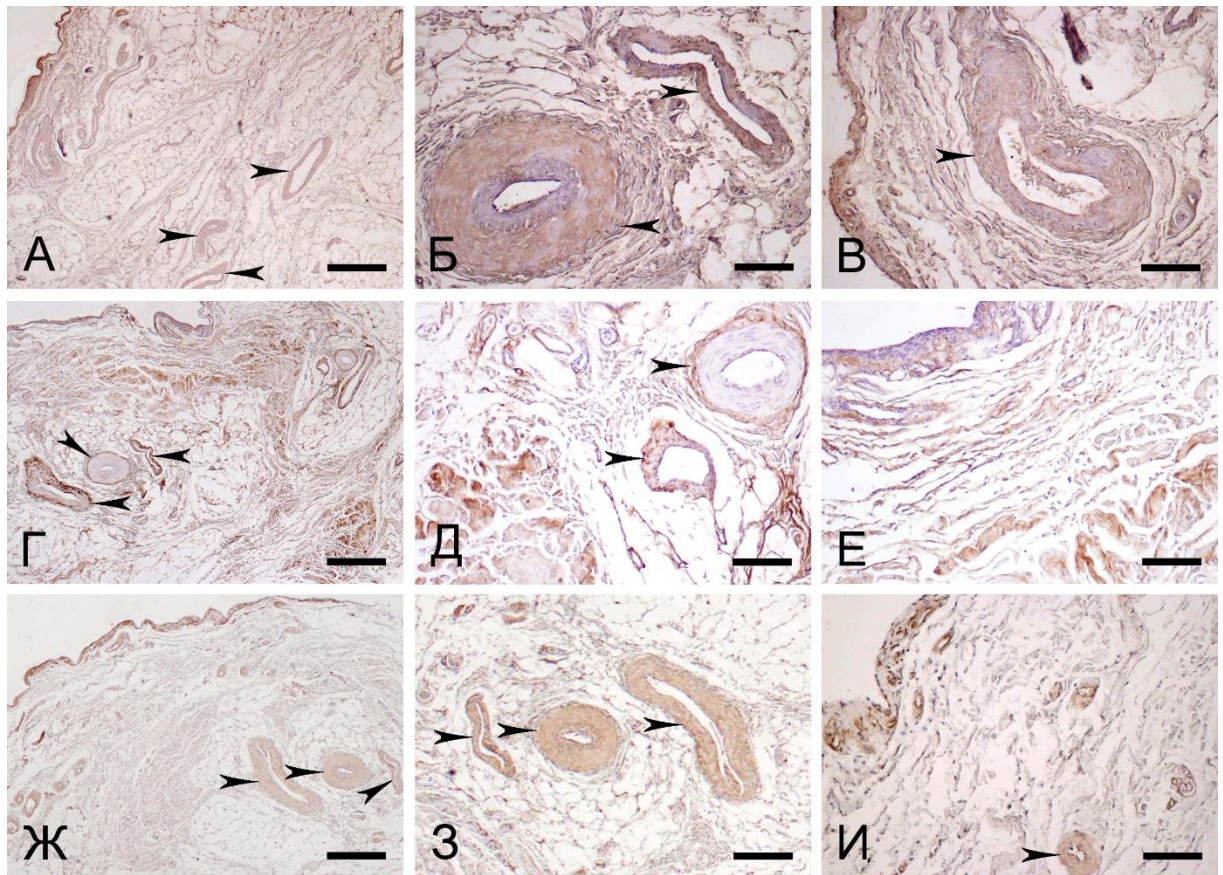
лигаментарната тъкан на МКВ експресията е силно изразена навсякъде. (Фигура V.17 Б). В лигаментарната тъкан на ПКВ имунореактивността е слабо представена до липсваща (Фигура V.18 Б). Колаген тип V се експресира основно в tunica media на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ на двата лигамента (Фигура V.15 Ж-И; Фигура V.16 Ж-И). В лигаментарната тъкан експресията му бе слаба до липсваща (Фигура V.1 В; Фигура V.18 В). Тъй като интензитетът на имунохистохимичната реакция варира между ЕЛ на МКВ и ПКВ, за изследваните типове колаген и проколаген тип III е изчислено полуколичествено използвайки ИНС Profiler, като резултатите са обобщени в Таблица 4.

Типове колаген/проколаген	ПКВ		МКВ	
	ЕЛ	Л + ЕндоЛ	ЕЛ	Л + ЕндоЛ
Колаген тип I	Позитивна (2+) (11%)	Позитивна (2+) (54%)	Позитивна (2+) (13%)	Позитивна (2+) (61%)
	Слабо позитивна (1+) (50%)	Слабо позитивна (1+) (31%)	Слабо позитивна (1+) (65%)	Слабо позитивна (1+) (29%)
	Негативна (0) (39%)	Негативна (0) (15%)	Негативна (0) (22%)	Негативна (0) (10%)
Проколаген тип III	Позитивна (2+) (38%)	Слабо позитивна (1+) (23%)	Силно позитивна (3+) (31%)	Силно позитивна (3+) (33%)
	Слабо позитивна (1+) (52%)		Позитивна (2+) (45%)	Позитивна (2+) (48%)
	Негативна (0) (10%)	Негативна (0) (77%)	Слабо позитивна (1+) (17%)	Слабо позитивна (1+) (15%)
			Негативна (0) (7%)	Негативна (0) (4%)
Колаген тип V	Позитивна (2+) (27%)	Слабо позитивна (1+) (25%)	Позитивна (2+) (34%)	Слабо позитивна (1+) (29%)
	Слабо позитивна (1+) (49%)		Слабо позитивна (1+) (46%)	
	Негативна (0) (24%)	Негативна (0) (75%)	Негативна (0) (20%)	Негативна (0) (71%)

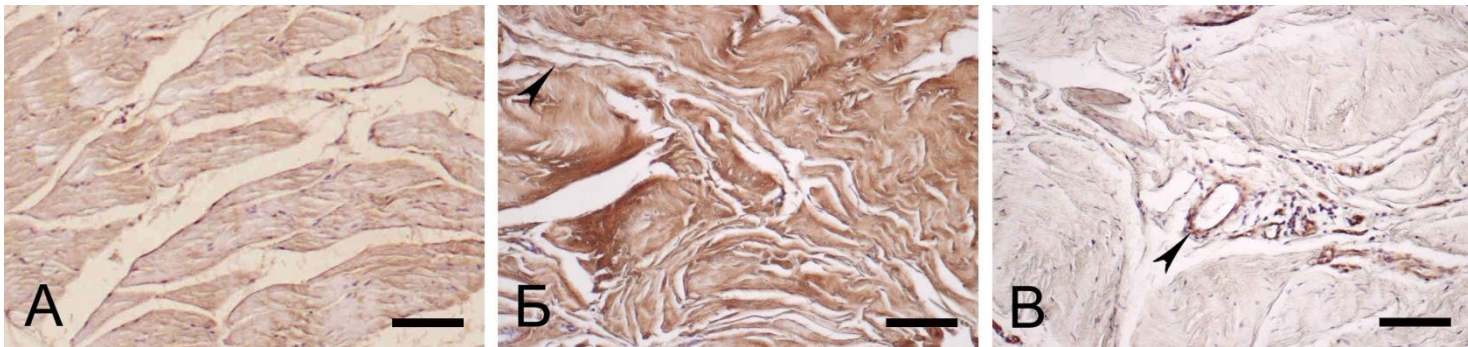
Таблица 4 представяща интензитетът на имунохистохимичната реакция на колаген тип I, и V и проколаген III изчислен полуколичествено използвайки ИНС Profiler.



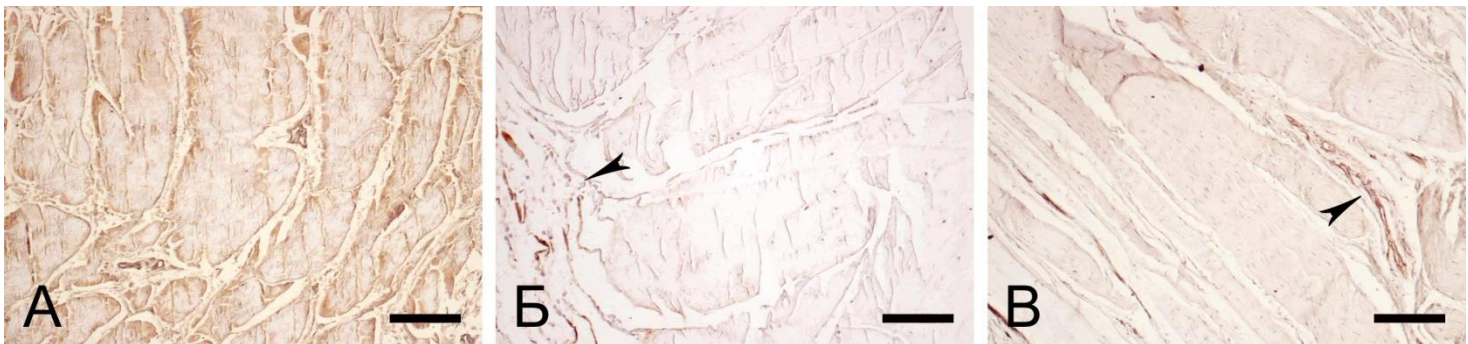
Фигура V.15. Имунохистохимична реакция на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ при човек. Стрелки – означаващи имунореактивният продукт в tunica adventicia и tunica media на кръвоносните съдове. А-В. Имунохистохимична експресия на колаген тип I. Размерна линия-100 μm . Г-Е. Имунохистохимична експресия на проколаген тип III. Размерна линия - Г: 200 μm ; Д, Е: 50 μm . Ж-И. Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - Ж: 200 μm ; З, И: 50 μm .



Фигура V.16. Имунохистохимична реакция на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на ПКВ при човек. Стрелки - означаващи имунореактивният продукт в tunica adventicia и tunica media на кръвоносните съдове. А-В. Имунохистохимична експресия на колаген тип I. Размерна линия – А) 200 μm ; Б, В) 50 μm . Г-Е. Имунохистохимична експресия на проколаген тип III. Размерна линия - Г: 200 μm ; Д, Е: 50 μm . Ж-И Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - Ж: 200 μm ; З, И: 50 μm .



Фигура V.17. Имунохистохимична експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в лигаментарната част на МКВ при човек. Стрелки – ендолигамент, обвиващ отделните колагенови снопове в лигаментарната тъкан. А) Имунохистохимична експресия на колаген тип I. Размерна линия - 50 µm . Б) Имунохистохимична експресия на проколаген тип III. Размерна линия - 50 µm . В) Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - 50 µm.



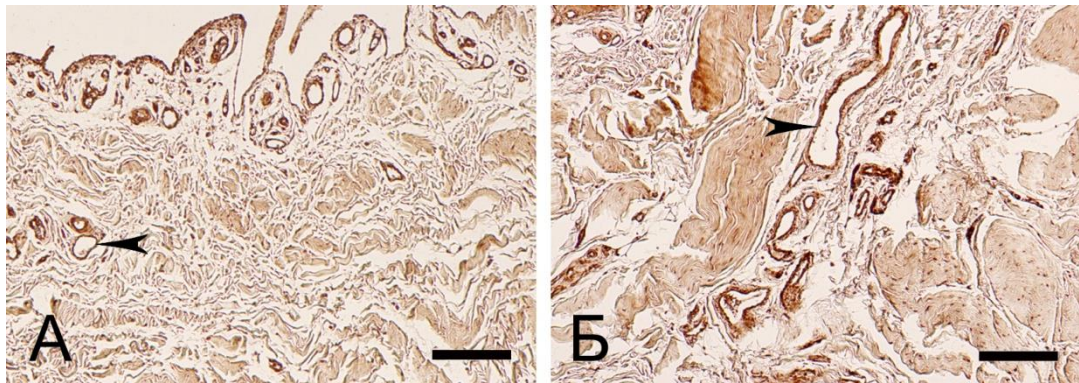
Фигура V.18. Имунохистохимична експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в лигаментарната част на ПКВ при човек. Стрелки – ендолигамент, обвиващ отделните колагенови снопове. А). Имунохистохимична експресия на колаген тип I. Размерна линия - 100 µm. Б) Имунохистохимична експресия на проколаген тип III. Размерна линия - 200 µm. В) Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - 100 µm.

В настоящето изследване бяха установени някои разлики в ЕЛ при МКВ и ПКВ на човек, както и вариации в експресията на изследваните колагени. Експресията на колаген тип I бе отчетена, като слабо позитивна (1+) в ЕЛ и позитивна (2+) в лигаментарната тъкан и на двата лигамента. Експресията на проколаген тип III бе позитивна (2+) в ЕЛ и лигаментарната част на МКВ, слабо позитивна (1+) в ЕЛ и негативна (0) в лигаментарната

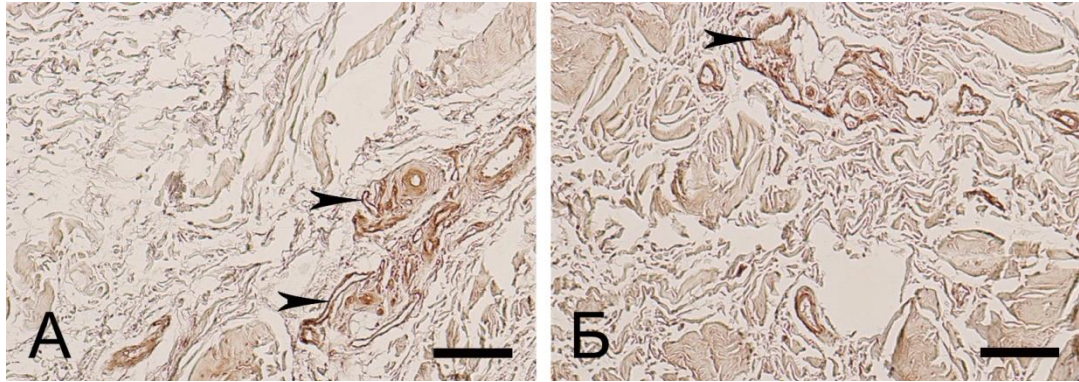
тъкан на ПКВ. Експресията на колаген тип V бе слабо позитивна (1+) в ЕЛ и негативна (0) в лигаментарната тъкан при МКВ и ПКВ. Имунореактивността на трите молекули бе винаги по-висока в ЕЛ на МКВ, отколкото в ПКВ.

V.3.3.2. Експресия на ММП-2 и 9 в ЕЛ на МКВ на човек

Имунохистохимичният анализ на експресията на ММП-2 и -9 представя хетерогенно разпределение на ензимната активност на двата ензима в ЕЛ и в лигаментарната тъкан на МКВ. Положителната реакция за ММП-2 бе разпределена по цялата му повърхност, като най-добре се експресираше в адвентицията на кръвоносните съдове в ЕЛ, както и в периваскуларната зона (Фигура V.19). Имунопозитивната реакция за ММП-9 бе слабо представена най-вече в адвентицията на съдовете и периваскуларно (Фигура V.20).



Фигура V.19 А, Б) Имунохистохимична експресия на ММП-2 в ЕЛ и лигамента на МКВ на човек. Стрелка – кръвоносен съд. А) Размерна линия - 100 μm . В) Размерна линия - 50 μm .



Фигура V.20 А, Б) Имунохистохимична експресия на ММП-9 в ЕЛ и лигамента на МКВ на човек. Стрелка – кръвоносен съд. А) Размерна линия - 100 µm. В) Размерна линия - 50 µm.

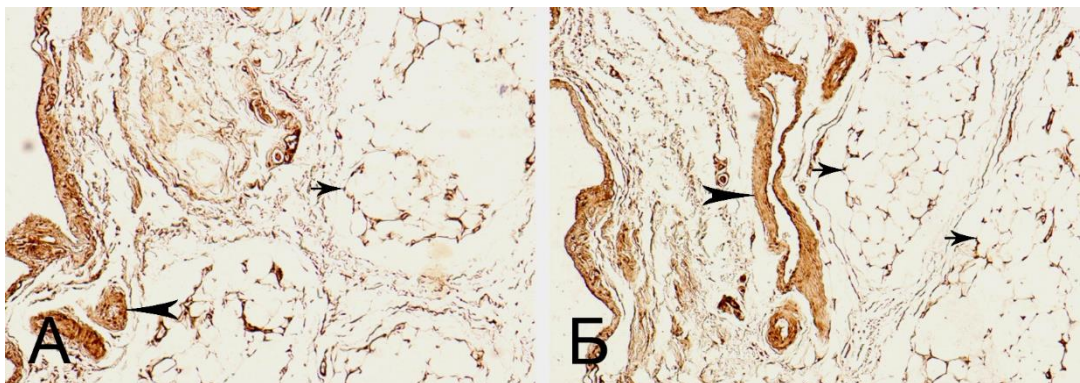
Полуколичественият анализ за ММП-2 представи положителна (2+) експресия в ЕЛ при 70% от визуалните полета и слабо позитивна (1+) в останалите 30%. Трябва да се отбележи, че някои фибробласти в лигаментарната тъкан също показваха положителна експресия за ММП-2. Имунореактивността бе отчетена, като отрицателна (0) в 76% от зрителните полета и като слабо положителна (+) в останалите 24%. Ензимната активност на ММП-9 в ЕЛ бе отчетена като слабо положителна (+) в 63%, положителна (2+) в 28% и отрицателна (0) в 9% от зрителните полета. Както и при ММП-2 експресията бе най-добре изразена в адвентицията на кръвоносните съдове и в периваскуларната зона (Фигура V.22). В лигаментарната тъкан експресията на ММП-9 бе отчетена, като отрицателна (0) в 88% и слабо положителна (1+) в 12% от зрителните полета, като се наблюдава най-вече във фибробластите и в адвентицията на малкото кръвоносни съдове.

V.3.3.3 Експресия на ММП-2 и 9 в ЕЛ на ПКВ на човек

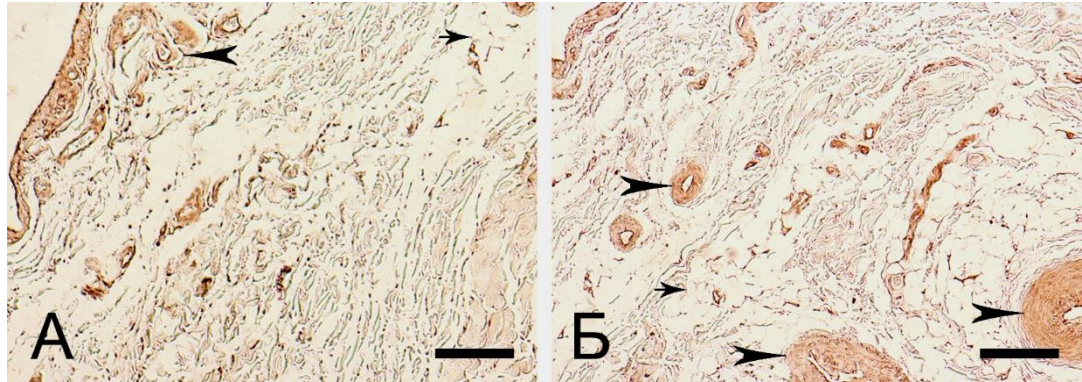
В ЕЛ на ПКВ експресията на ММП-2 бе локализирана във фибробластите, клетките на мастната тъкан и адвентицията на кръвоносните

съдове (Фигура V.21). В 74% от зрителните полета имунореактивността бе отчетена, като ниско положителна (1+), докато в останалите 26% тя бе изчислена като положителна (2+). В лигаментарната тъкан ензимната активност бе предимно отрицателна (92% от зрителните полета). В определени области тя бе отчетена, като ниско положителна (1+) в 8% от зрителните полета. Тази ниско положителна реакция бе наблюдавана и при някои фибробласти, разположени близо до границата между ЕЛ и лигаментарната тъкан.

Разпределението на имунореактивността на ММП-9 бе подобно на това на ММП-2. При ЕЛ бе наблюдавано в адвентицията на кръвоносните съдове, периваскуларното пространство и в клетките на мастната тъкан (Фигура V.22). Полуколичественият анализ представи слабо положителна реакция (1+) в 83% и отрицателна реакция (0) в 17% от зрителните полета. В лигаментарната тъкан ензимната активност бе отчетена като отрицателна (0) в 94% и ниско положителна (1+) в останалите 6% от зрителните полета. Тази ензимна експресия в лигаментарната тъкан бе отбелязана само при отделни фибробласти, разположени близо до границата между лигаментарната тъкан и ЕЛ.



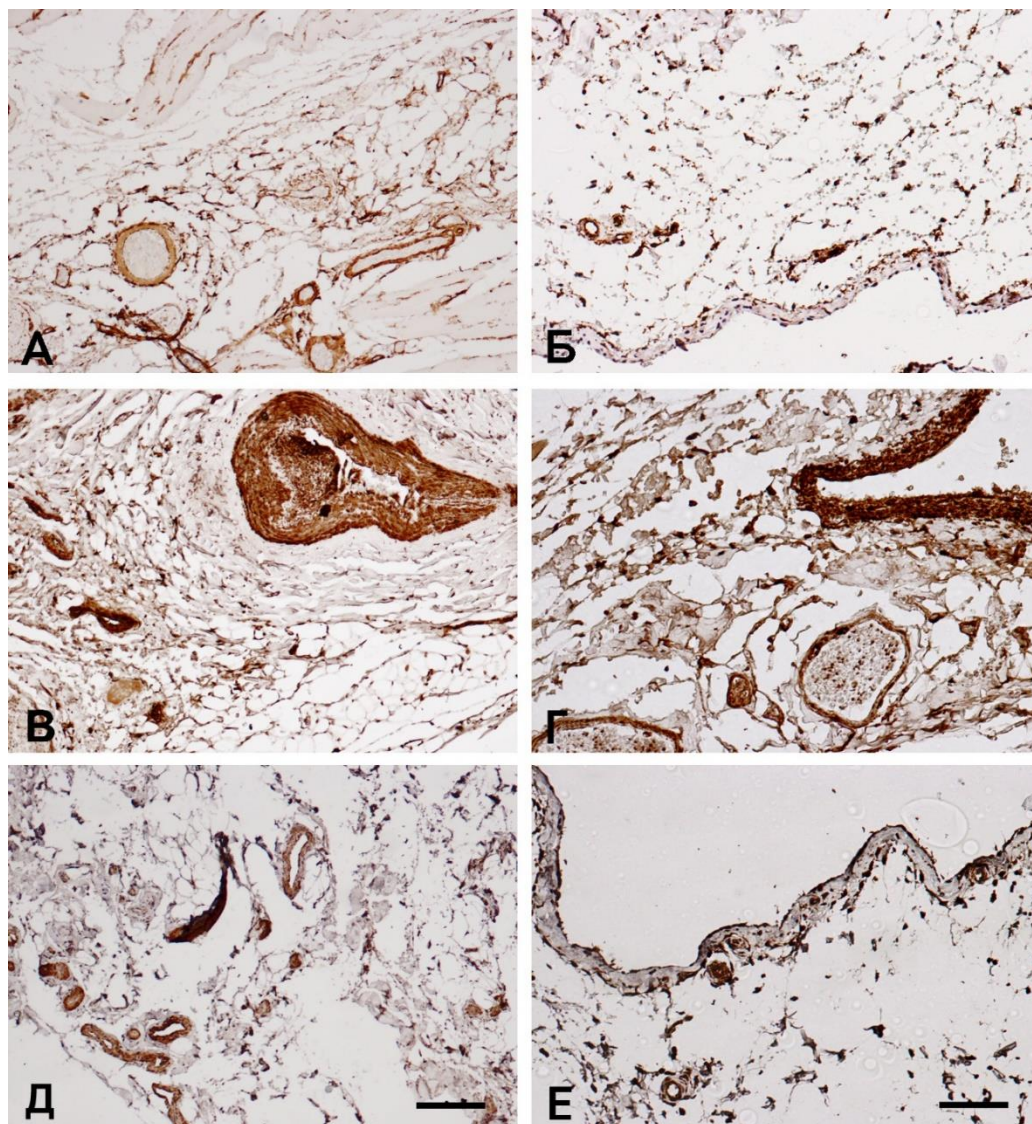
Фигура V.21. А, Б) Имунохистохимична експресия на ММП-2 в ЕЛ и лигамента на ПКВ на човек. Глава на стрелка – кръвоносен съд; стрелка – група от мастни клетки. Размерна линия - 100 μm .



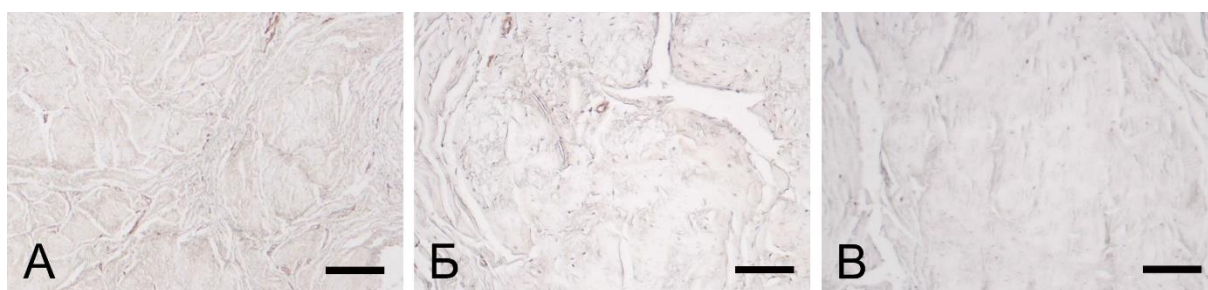
Фигура V.22. А, Б) Имунохистохимична експресия на ММП-9 в ЕЛ и лигаментата на ПКВ на човек. Глава на стрелка – кръвоносен съд; стрелка – група от мастни клетки. Размерна линия - 100 μm .

V.3.3.4. Експресия на CD34, α -SMA, VEGF в ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек

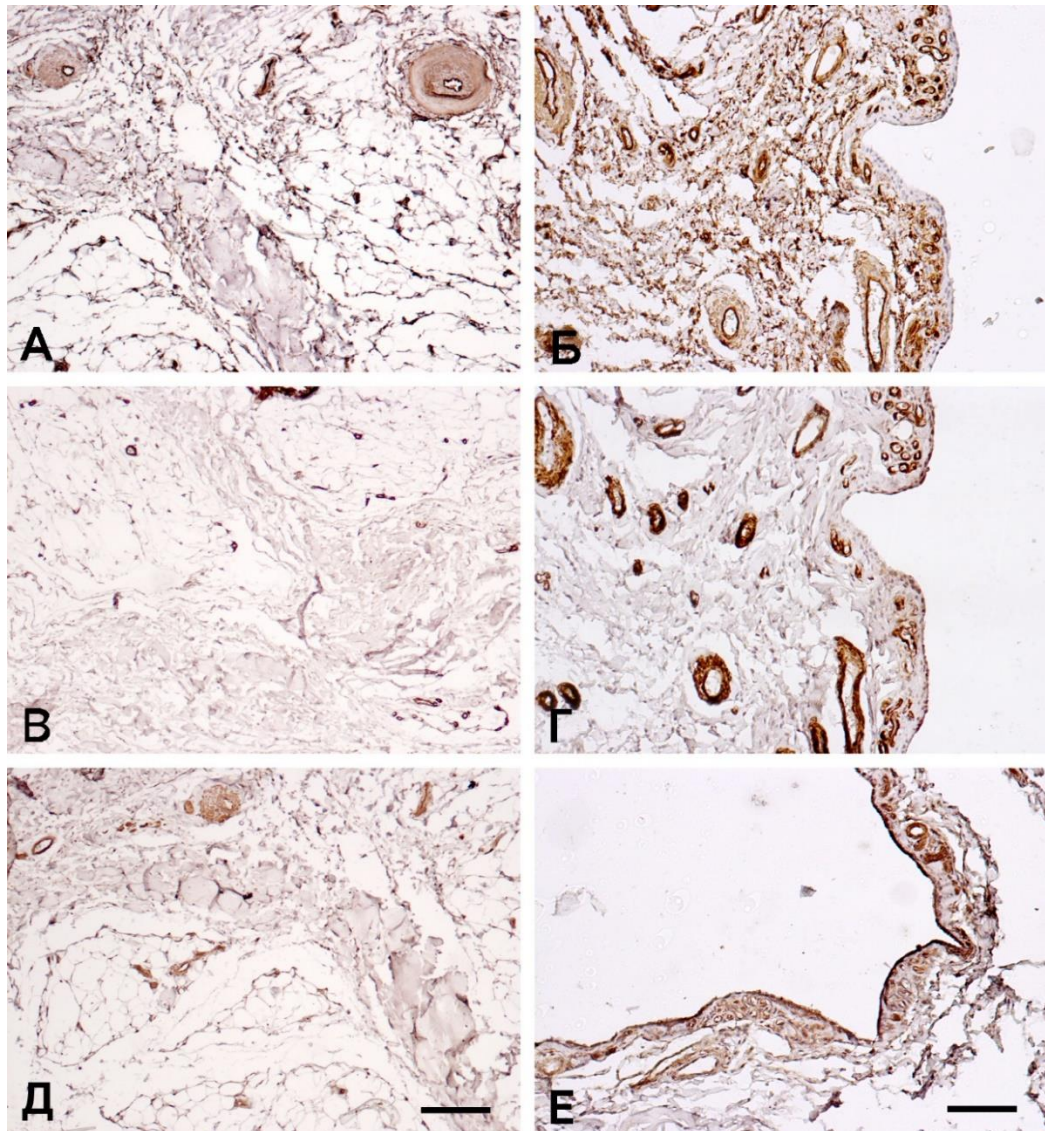
В ЕЛ на МКВ (Фигура V.23 А, Б) и ПКВ (Фигура V.25 А, Б) експресията за CD34 се наблюдава предимно в ендотелния слой на кръвоносните съдове и равномерно в областта на ЕЛ. В областта на лигаментарната тъкан, горепосочената експресия продължава в ендолигамента, като експресия в лигамента не се отчита (Фигура V.24 А и V.26 А). Имунохистохимичната реакция за α -SMA се открива предимно в гладкомускулните клетки на tunica media на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ на МКВ (Фигура V.23 В, Г) и ПКВ (Фигура V.25 В, Г). В областта на лигаментарната тъкан, експресия на α -SMA се открива само в кръвоносните съдове в ендолигамента, а позитивна реакция в лигамента не се отчита (Фигура V.24 Б и V.26 Б). Позитивна имунохистохимична реакция на VEGF в ЕЛ на МКВ (Фигура V.23 Д, Е) и ПКВ (Фигура V.25 Д, Е) се наблюдава най-вече в ендотелния слой на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ на двата лигамента. В областта на лигаментарната тъкан, експресия на VEGF се открива само в кръвоносните съдове в ендолигамента (Фигура V.24 В и V.26 В).



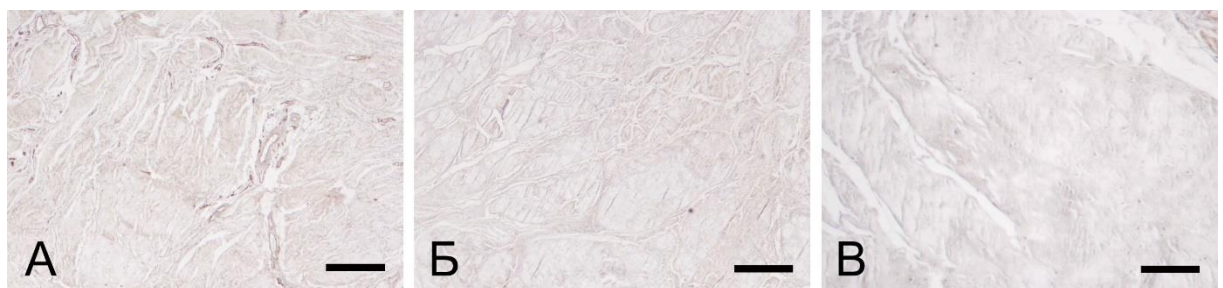
Фигура V.23. Имунохистохимична реакция на CD 34, α -SMA и VEGF в ЕЛ на МКВ при човек. А,Б. ИХЕ на CD 34. В,Г. ИХЕ на α -SMA. Д,Е. ИХЕ на VEGF. Увеличение: размерна линия - вляво: 50 μ m; вдясно: 100 μ m.



Фигура V.24. Имунохистохимична реакция на CD 34, α -SMA и VEGF в ЕЛ на МКВ при човек. А) CD 34; Б) α -SMA; В) VEGF. Увеличение: Размерна линия – А) 50 μ m. Б) 100 μ m; В) 200 μ m.



Фигура V.25. Имунохистохимична реакция на CD 34, α -SMA и VEGF в ЕЛ на ПКВ при човек. А,Б. ИХЕ на CD 34. В,Г. ИХЕ на α -SMA.. Д,Е. ИХЕ на VEGF. Увеличение: *размерна линия* - вляво: 50 μ m; вдясно: 100 μ m.



Фигура V.26. Имунохистохимична реакция на CD 34, α -SMA и VEGF в ЕЛ на ПКВ при човек. А) CD 34; Б) α -SMA; В) VEGF. Увеличение: *Размерна линия* – А) 50 μ m. Б) 50 μ m; В) 100 μ m.

Тъй като интензитетът на имунохистохимичната реакция варира между ЕЛ на МКВ и ПКВ за CD34, α -SMA и VEGF, е изчислено полу-количествено използвайки ИНС Profiler, като резултатите са са обобщени в

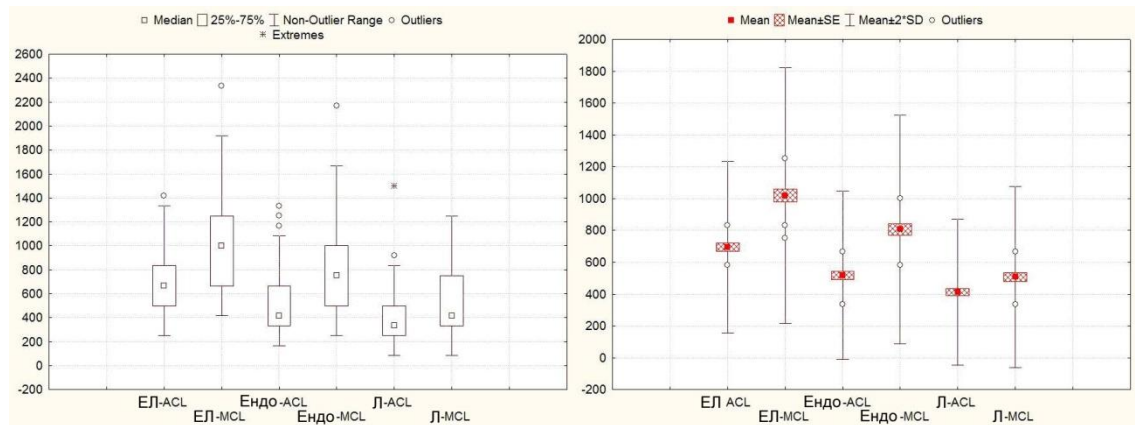
Таблица 5

	ПКВ ЕЛ	МКВ ЕЛ
VEGF	<u>Силно позитивна (3+)</u> (7.7%) <u>Позитивна (2+)</u> (9.8%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (28.9%) <u>Негативна (0)</u> (53.6%)	<u>Силно позитивна (3+)</u> (3.1%) <u>Позитивна (2+)</u> (4.7%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (13.1%) <u>Негативна (0)</u> (79.1%)
CD34	<u>Силно позитивна (3+)</u> (4.5%) <u>Позитивна (2+)</u> (10.0%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (21.1%) <u>Негативна (0)</u> (64.4%)	<u>Силно позитивна (3+)</u> (3.9%) <u>Позитивна (2+)</u> (8.2%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (21.1%) <u>Негативна (0)</u> (44.8%)
α -SMA	<u>Силно позитивна (3+)</u> (10.6%) <u>Позитивна (2+)</u> (9.3%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (20.8%) <u>Негативна (0)</u> (59.3%)	<u>Силно позитивна (3+)</u> (3.0%) <u>Позитивна (2+)</u> (5.5%) <u>Слабо позитивна (1+)</u> (21.2%) <u>Негативна (0)</u> (70.3%)

Като цяло, по-голям процент на експресията в ЕЛ на ПКВ са оценени като положителни (2+) и слабо положителни (1+) за CD 34, α -SMA и VEGF в сравнение с ЕЛ на МКВ. При ЕЛ на ПКВ има по-голям процент силно положителна експресия на α -SMA и VEGF, в сравнение с CD34. За разлика от това, в ЕЛ на МКВ, CD34-позитивните експресии преобладаваха над тези с α -SMA, а при VEGF се отчита предимно липса на експресия. Експресията на α -SMA е най-вече слабо положителна (1+) в ЕЛ на ПКВ и отрицателна (0) в МКВ. Като цяло, експресията на α -SMA е най-силно изразена ЕЛ на ПКВ, а тази на CD 34 в ЕЛ на МКВ. ЕЛ на ПКВ показва малко по-силна експресия на CD 34, α -SMA и VEGF, в сравнение с ЕЛ на МКВ.

V.4 Количествен анализ на ЕЛ и лигамента при човек

Сравнителният количествен анализ на параметъра брой клетки в МКВ и ПКВ показва определени разлики при ЕЛ на тези връзки (Фигура V.27; Таблица 6).



Фигура V.27 Графично представяне на данните от дескриптивния статистически анализ на данните за броя на клетките в ПКВ и МКВ. А) Квартилна диаграма показваща медианата (квадратите), долната и горната граница на правоъгълника показват съответно 25-ти и 75-ти перцентил. Отсечките под и над правоъгълника достигат съответно до десети и деветдесети перцентил. Точките – стойности извън обхвата. Звезди – екстремни стойности; Б) Квартилна диаграма показваща средната стойност (червени квадрати), долната и горната страна на правоъгълниците показват съответно средната стойност (Mean) коригирана със стандартната грешка (SE) [$\text{Mean} - \text{SE}$ $\text{Mean} + \text{SE}$]. Отсечките под и над правоъгълника показват средната стойност коригирана с две стандарти отклонения (2SD) [$\text{Mean} - 2\text{SD}$ $\text{Mean} + 2\text{SD}$].

	ЕЛ-ПКВ	ЕЛ-МКВ	Ендо-ПКВ	Ендо-МКВ	Л-ПКВ	Л-МКВ
Средна стойност	694.4	1019.4	518.5	806.4	412.5	507.6
Медиана	666.7	1000.0	416.7	750.0	333.3	416.7
SD	268.6	400.9	263.9	358.9	229.7	284.2
Мин	250.0	416.7	166.7	250.0	83.3	83.3
Макс	1416.7	2333.3	1333.3	2166.7	1500.0	1250.0
_25%	500.0	666.7	333.3	500.0	250.0	333.3
_75%	833.3	1250.0	666.7	1000.0	500.0	750.0

Таблица 6. Таблица представяща разликите между средните стойности на данните за броя на клетките на mm^2 в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. SD - стандарти отклонения.

Средният брой клетки в ЕЛ на МКВ бе с 32% по-висок от този в ЕЛ на ПКВ, а стойността на медианата бе приблизително с 33% по-висока. Трябва да се отбележи, че тази разлика бе по-изразена и в ендолигамента, като ендолигамента на МКВ съдържа приблизително 36% повече клетки от този на ПКВ, а медианата е приблизително с 44% по-висока. Относно лигаментарната тъкан бе отчитана само разлика при медианата (19% и 20%), като отново броят на клетките е по-голям в МКВ.

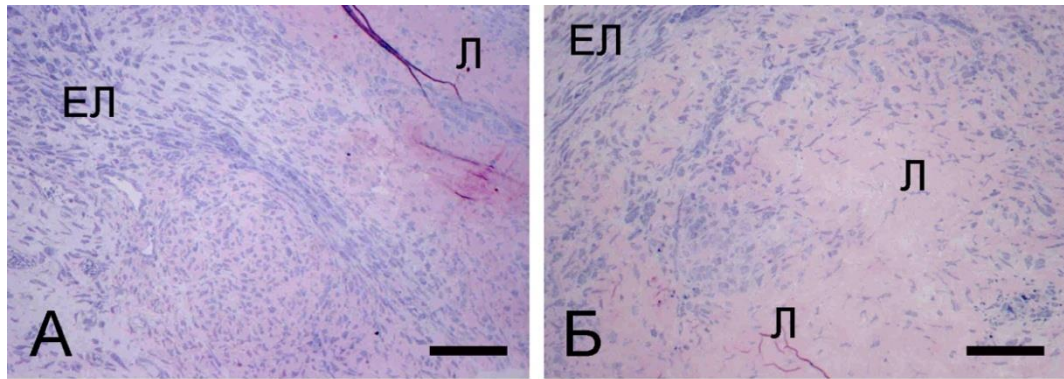
Статистическа значимост на разликата в броя на клетките във всяка от тези три части на двата лигамента беше изчислена със Sign test. Сравнението на медианите в ЕЛ на МКВ и ПКВ показва $p=0.0000\dots(p<0.05)$, което отхвърля нулевата хипотеза (H_0). Алтернативната хипотеза (H_1) се приема, защото бе установена статистически значима разлика. Сравнението на стойностите в ендолигамента показва $p= 0.000004$ ($p< 0.05$), като (H_0) бе отхвърлена, а (H_1) бе прието (статистически значима разлика бе установена). Когато се сравниха стойностите при лигаментарната тъкан се получи $p= 0.113846$ (> 0.05) и (H_0) бе приета. H_1 бе е отхвърлена - разликата между медианата на броя на клетките в лигаментарната тъкан на МКВ и ПКВ не бе статистически значима.

V.5 Експериментален модел на увреда на МКВ на колянна става у плъх

V.5.1 Светлинно-микроскопско и електронно-микроскопско изследване на ранните промени настъпващи в ЕЛ при експериментален модел на увреда на МКВ на колянна става у плъх

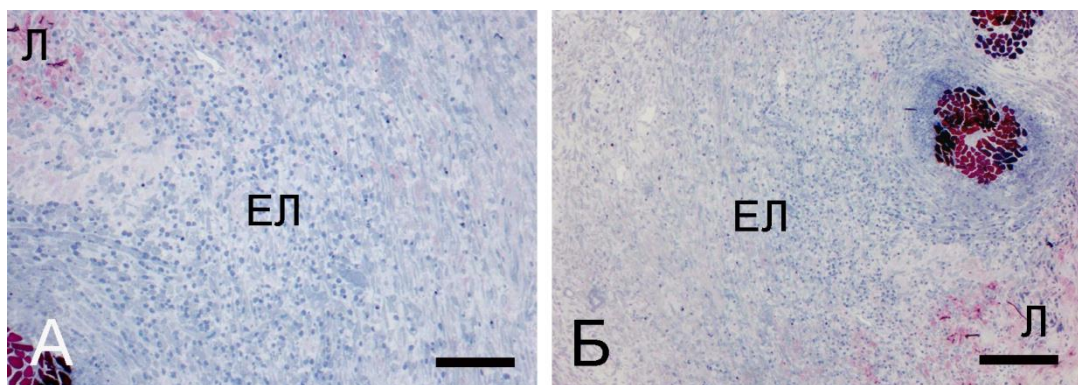
V.5.1.1 Осми ден след увреда на МКВ

Резултатите от светлинно-микроскопското изследване показаха, че на 8-я ден след увредата съществува добре представена грануляционна тъкан между прерязаните краища на ставната връзка. Новообразуваната грануляционна тъкан се отличаваше с добре различими граници и навлизаше към неувредените части на лигамента. В областта на увредата ЕЛ се характеризираше с богата клетъчност, представена от фибробласти и прогениторни клетки. Тези клетки имаха светла цитоплазма и сравнително голямо ядро (Фигура V28). Наблюдаваха се както единични, така и групи от фибробласти. Междуклетъчното пространство бе представено от хомогенно вещество, като в него се откриваха колагенни влакна, като неразклонени ацидофилни структури, организирани в тънки и плоски снопчета, кръстосващи се в различни посоки. Тези влакна заедно с фибробластите и прогениторните клетки навлизаха в ендолигамента. Ендолигамента на прехода с ЕЛ също се характеризираше с богата клетъчност, представена от фибробласти и прогениторни клетки. В ЕЛ се наблюдаваше усилена ангиогенеза в отговор на хаотичното образуване на капиляри от по-големите съдове в региона, както и единични кръвоносни съдове. Лумените на тези съдове бяха изпълнени с множество кръвни клетки.



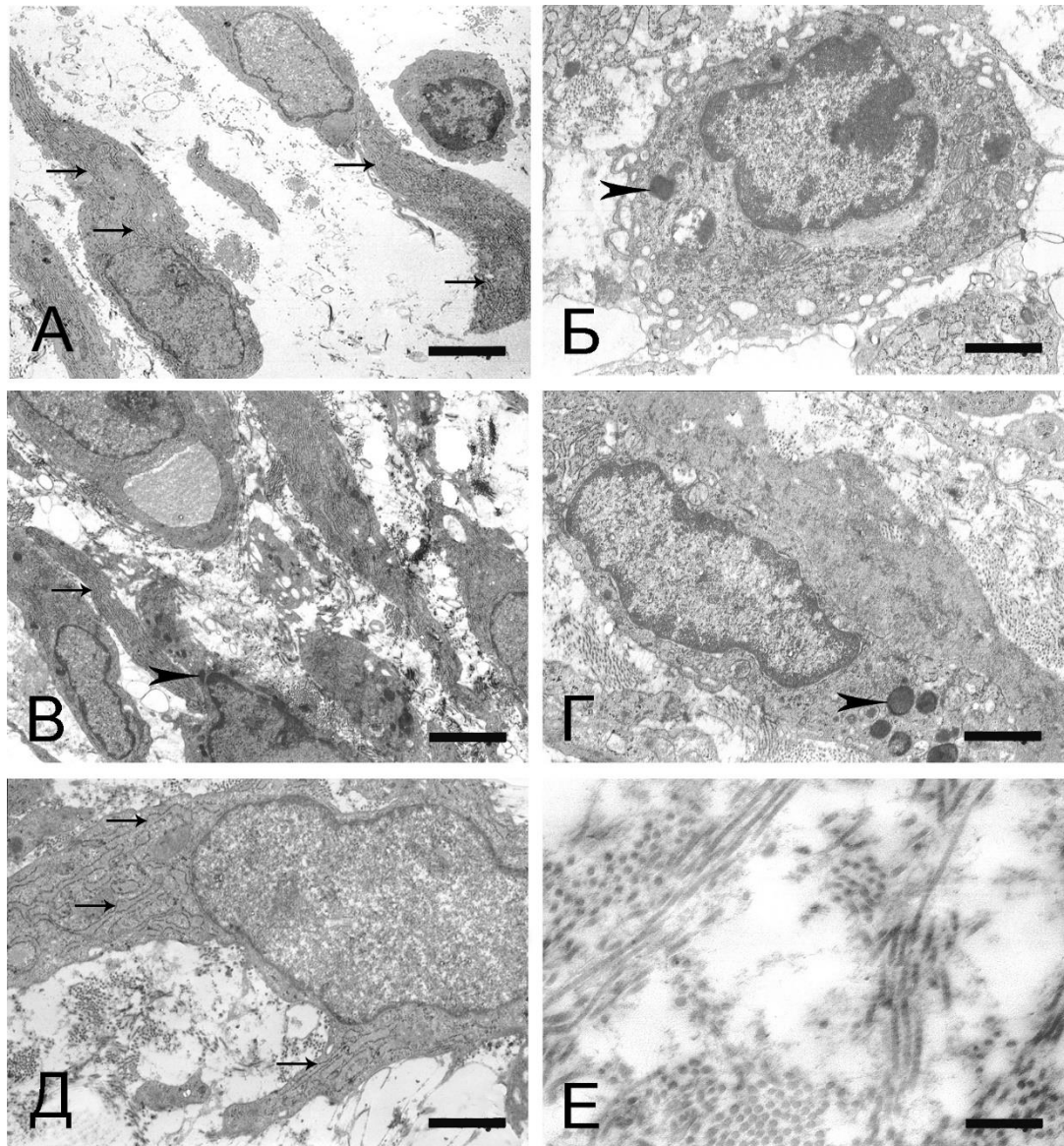
Фигура V28. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда на МКВ. ЕЛ, епилигамент; Л, лигаментарна част. А, Б) ЕЛ-лигамент комплекс на 8-ия ден след увреда, съставен от значителни по размери фибробласти (в синьо) и дезорганизиран екстрацелуларен матрикс с колагенови влакна (в червено). Размерна линия, 100 μm .

При животните лекувани с шев на МКВ се наблюдаваха сходни морфологични промени, като в допълнение бе отчетен добре представен слой от грануляционна тъкан около шевния материал. (Фигура V29)

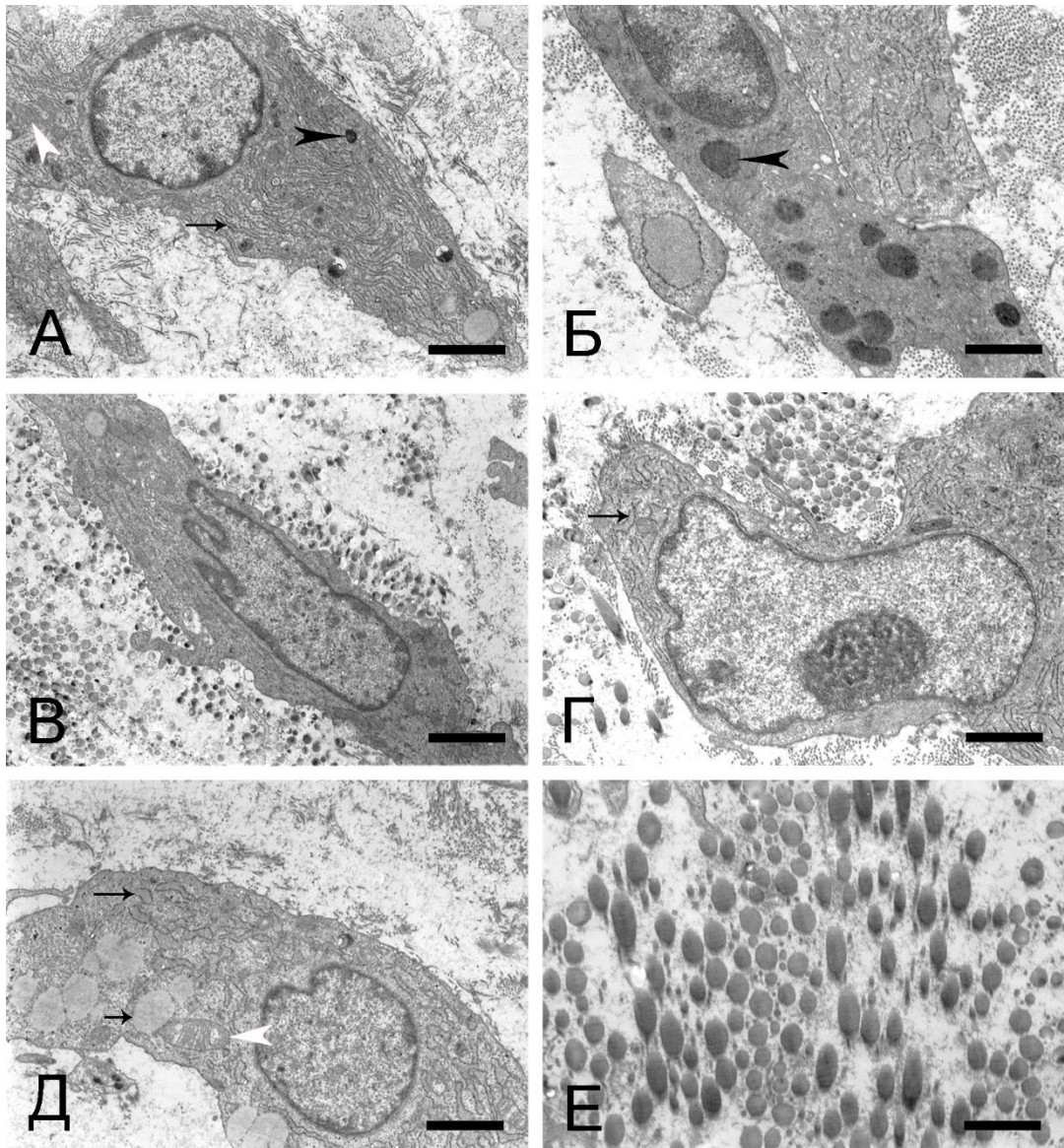


Фигура V29. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда и шев на МКВ. А, Б) комплекс ЕЛ-лигамент -гранулоционна тъкан, съставена от значителни по размери фибробласти (в синьо) и дезорганизиран екстрацелуларен матрикс с колагенови влакна (в червено) и наличие на шевен материал обхванат от гранулоционна тъкан. Размерна линия, 100 μm .

От електронно-микроскопското изследване през този период в ЕЛ се наблюдаваха добре оформени фибробласти (Фигури V30 А, В-Д; V31 А-Д). Някои от тях притежаваха по клетъчната си повърхност разклонени цитоплазмени израстъци. Повечето фибробластни клетки притежаваха добре оформено ядро с огромно ядръце и дифузно пръснат хроматин. Цитоплазмата на клетките съдържаше множество свободни рибозоми, относително голям брой кръгли митохондрии с добре различими митохондриални кристи, както и разширен гранулиран ендоплазмен ретикулум с единични или двойни ламели. В част от фибробластите гранулираният ендоплазмен ретикулум бе много добре представен и почти изцяло изпълваше вътреклетъчното пространство. Правеше впечатление в отделни клетки и обилното количество на вторични лизозоми в цитоплазмата им. Вторичните лизозоми бяха представени като електроннопътни окръглени структури. Във вътреклетъчното пространство на част от фибробластите се забелязваха фагоцитиращи вакуоли, а рядко се наблюдаваше и силно развит апарат на Голджи, представен с двойни гладки мембрани, везикули или вакуоли. Наблюдаваха се и макрофаги с многобройни псевдоподи, а в цитоплазмата им се откриваха митохондрии с добре представени кристи, както и лизозоми (Фигура V30 Б). В междуклетъчния матрикс се откриваха единични хаотично разположени влакна необразуващи снопове. Сравнително рядко се наблюдаваха колагенни влакна групирани в снопове и ориентирани в различни посоки (Фигури V30 Е; V31 Е). Част от влакната притежаваха характерна ултраструктурна характеристика - редуване на тъмни и светли ивици, с периодичност 64 nm. Между отделните снопове се откриваха и колагенни влакна с нарушена напречна стрираност.



Фигура V30. Електроннограми на 8 ден след увредата на МКВ. А) Фибробласти с големи ядра и преобладаващ гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки). Размерна линия, 2,3 μm . Б) Макрофаг с многобройни псевдоподи. В цитоплазмата се наблюдават митохондрии с добре представени кристи (бяла стрелка) и лизозоми (черна глава на стрелка). Размерна линия, 1,4 μm . В) Фибробласти с големи ядра, преобладащ гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки) и ясно видими лизозоми (черни стрелки). Размерна линия, 2,8 μm . Г, Д) Фибробласти с големи ядра, преобладащ гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки), лизозоми (черна стрелка) и сферични митохондрии (бяла стрелка). Размерна линия, 1,4 μm . Е) Хаотично разположени или ориентирани в малки снопове колагенови влакна в EL. Размерна линия, 0,6 μm .

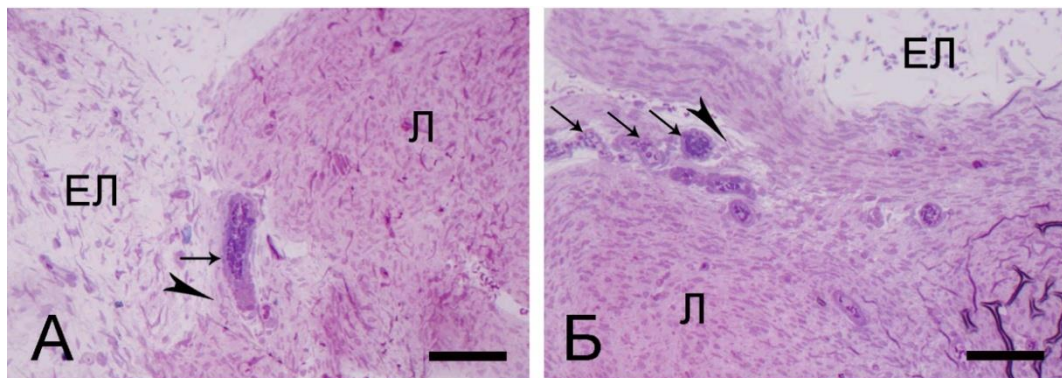


Фигура V31. Електроннограма на 8 ден след увредата на МКВ и последващ оперативен шев. А-Д) Фибробласти с големи ядра, лизозоми (черна глава на стрелка), гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки), митохондрии (бяла стрелка), вакуоли (къса стрелка) и колагенови влакна в извънклетъчното пространство. Размерна линия, 2.3 μm (А, В, Д), 1.4 μm (Б), 1.5 μm (Г). Е) Колагенни влакна. Размерна линия, 0,8 μm .

V.5.1.2 Шестнадесети ден след увреда на МКВ

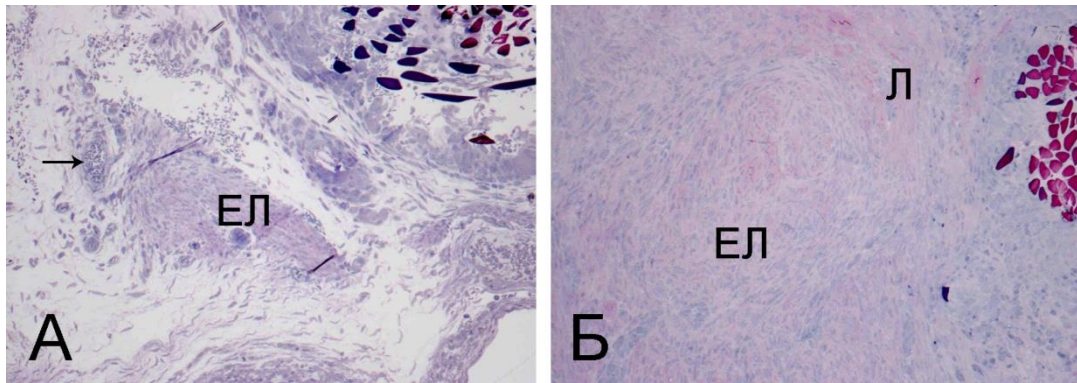
На шестнадесетия ден след увредата гранулационната тъкан все по-слабо се различаваше поради увеличения брой новообразувани колагенни

влакна, смесващи се с тези на неувредената тъкан. Наблюдаваните в голямо количество фибробласти и прогениторни клетки в областа на ЕЛ бяха по-малко в сравнение с предишния период (Фигура V32). Фибробластите локализирани в ЕЛ бяха значително по организирани и компактни в сравнение с осмия ден от травмата и отново се ориентираха по посока към ендолигамента (Фигура V32). Наблюдаваха се и адипоцити с неправилна форма, които се различаваха съществено по размера си. В ЕЛ се откриваха и единични клетки, в чиято цитоплазма личаха едри базофилни, метахроматично оцветени гранули. Броят на кръвоносните съдове постепенно намаляваше.



Фигура V32. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда на МКВ. А, Б) ЕЛ-лигамент комплекс грануляционна тъкан на ден 16 след травма, съставена от фибробласти (в синьо), колагенови влакна (в червено) и кръвоносни съдове (стрелки), които навлизат към ендолигамента (стрелките). Размерна линия, 100 μm .

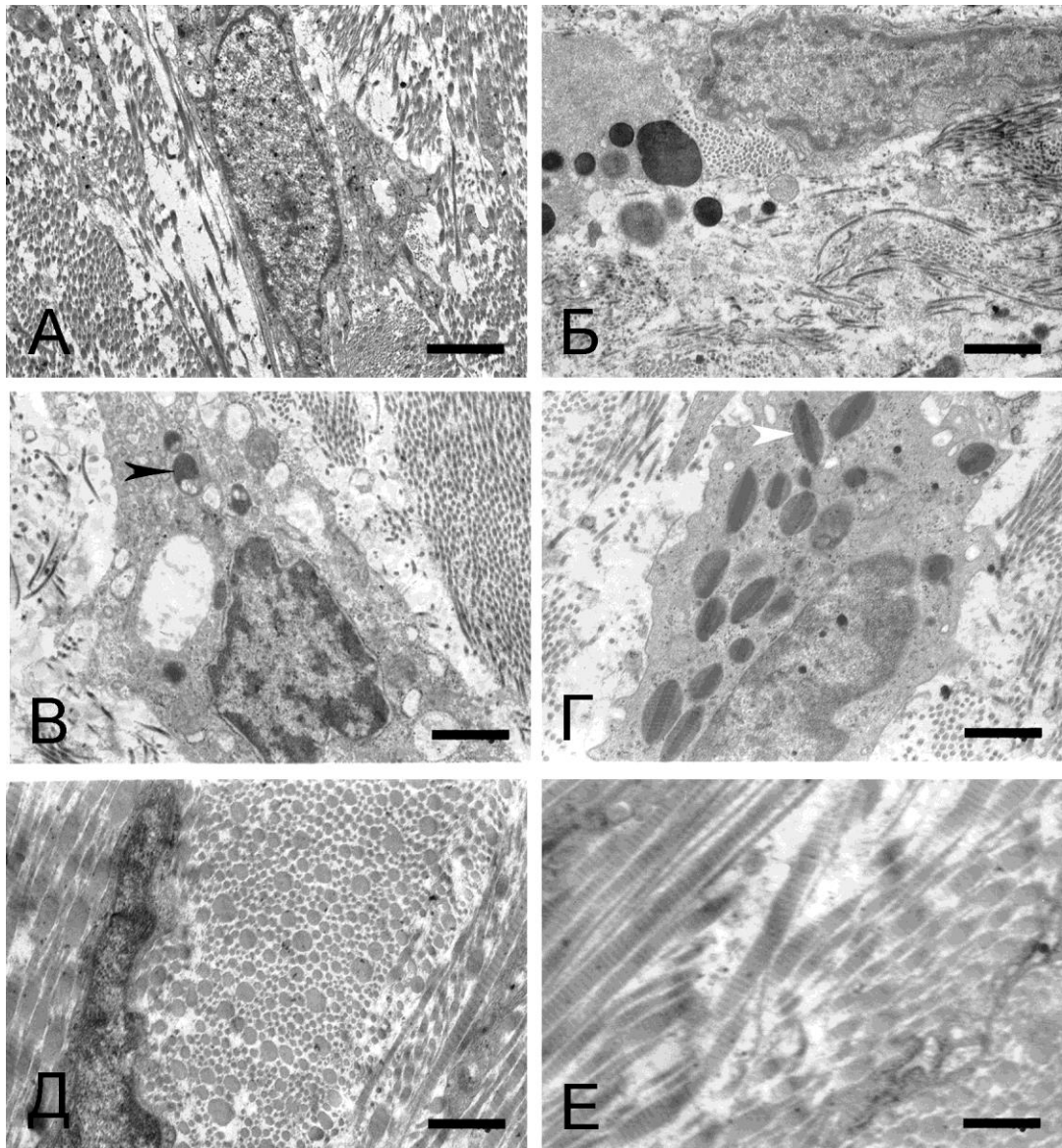
При животните лекувани с шев на МКВ се наблюдаваха сходни морфологични промени, като е необходимо да се отбележи, че слой от грануляционна тъкан около шевния материал е значително намалял. (Фигура V33).



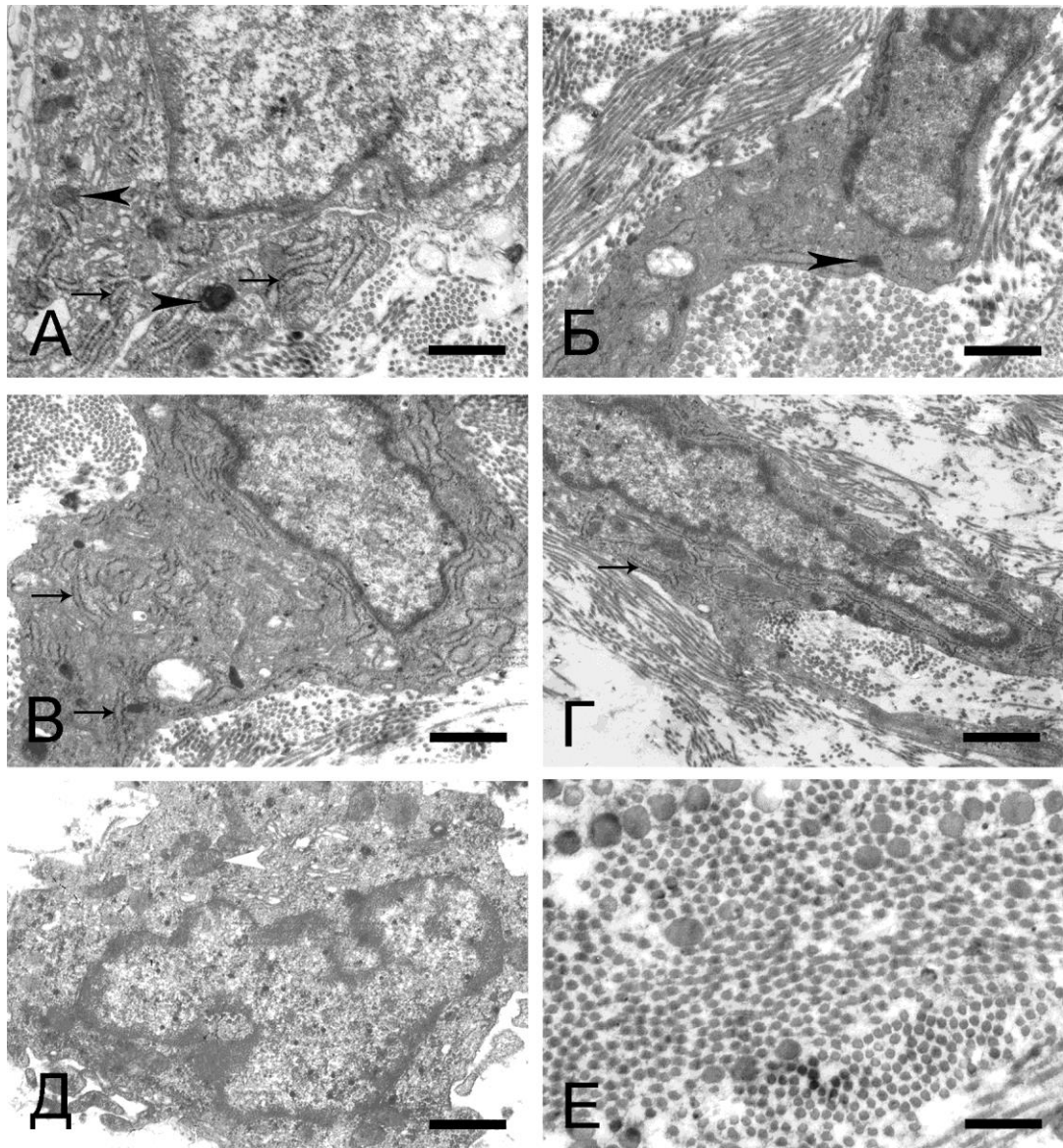
Фигура V33. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда и шев на МКВ. А,Б) комплекса ЕЛ-лигамент в областта на увредата, съставен от фибробласти (в синьо), колагенови влакна (в червено), кръвоносни съдове (стрелка) и наличие на шевен материал заобиколен от гранулоционна тъкан. Размерна линия, 100 μm .

ТЕМ представи различни типове фибробласти с голямо ядро с много еухроматин и добре оформено ядърце. Откриваха се както единични фибробласти, така и групи от такива (Фигури V34 А-В; V35 А-Г). Отделните фибробласти притежаваха финни цитоплазмени израстъци, а се наблюдаваха и такива с пикнотични ядра. В цитоплазмата им се откриваха свободни рибозоми, разширен гранулиран ендоплазмен ретикулум, представен от единични или двойни ламели с множество рибозоми прикрепени по външната му повърхност. Във вътреклетъчното пространство на фибробластите се откриваха фагоцитиращи вакуоли. Апарата на Голджи не бе ясно различим. Лизозомите имаха същите ултраструктурни характеристики както при предишния период. В някои фибробласти се наблюдаваха и комплексни лизозоми. Митохондриите запазваха своите характеристики и разпределение. Наблюдаваха се и фибробласти с нормални морфологични характеристики, както при контролните животни. Адипоцитите се характеризираха с голяма вакуола и ексцентрично разположено приплеснато ядро, заобиколено от базална ламина. Наблюдаваха се и единични еозинофилни гранулоцити с

характерно двуделчесто ядро (Фигура V34 Г). Те притежаваха къси цитоплазмени израстъци. Характерна особеност на гранулите им е кристалоидната структура, ориентирана по надлъжната им ос. В цитоплазмата им се наблюдаваше и добре развит апарат на Голджи, единични цистерни на гранулирания ендоплазмен ретикулум, малки митохондрии и свободни лизозоми. Наблюдаваха се и макрофаги с многобройни псевдоподи, а в цитоплазмата им се откриваха митохондрии с добре представени кристи, както и лизозоми (Фигура V35 Д). В междуклетъчното пространство броя на колагенните влакна групирани в снопове се увеличаваше в сравнение с предишния период (Фигури V34 Д,Е; V35 Е). Те притежаваха характерна ултраструктурна характеристика - редуване на тъмни и светли ивици с периодичност 64 nm. Отново се откриваха колагенни влакна с нарушена морфология. През този период се срещаха и единични колагенни влакна ориентирани хаотично в различни посоки. В местата на прехода на ЕЛ в ендолигамента се наблюдаваха и ориентирани по дължината на лигамента колагенни влакна с различен диаметър (големи и малки), характерни за лигамента.



Фигура V34. Електроннограма на 16 ден след увредата на МКВ. А-В) Фибробласти с големи ядра, лизозоми (черна стрелка), гранулиран ендоплазмен ретикулум, митохондрии и колагенови влакна в извънклетъчния матрикс. Размерна линия, 2,3 μm (А), 1,4 μm (Б), 1,3 μm (В). Г) Еозинофил с многобройни гранули (бяла стрелка). Размерна линия, 0,8 μm . Д, Е) Колагенови влакна. Размерна линия, 0,6 μm .

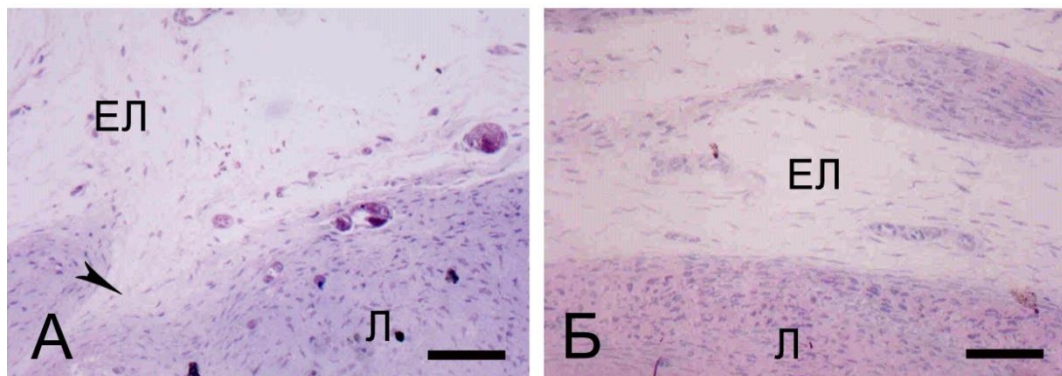


Фигура V35. Електронोगрама на 16 ден след увредата на МКВ и последващ шев. А –Г) Фибробласти с големи ядра, лизозоми (черни стрелки), гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки), митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в извънклетъчния матрикс. Размерна линия, 0,8 μm (А-В), 1,3 μm (Г). Д) Макрофаг с многобройни псевдоподи и изявени митохондрии (бяла стрелка). Размерна линия, 0,8 μm . Е) Колагенни влакна. Размерна линия, 0,2 μm .

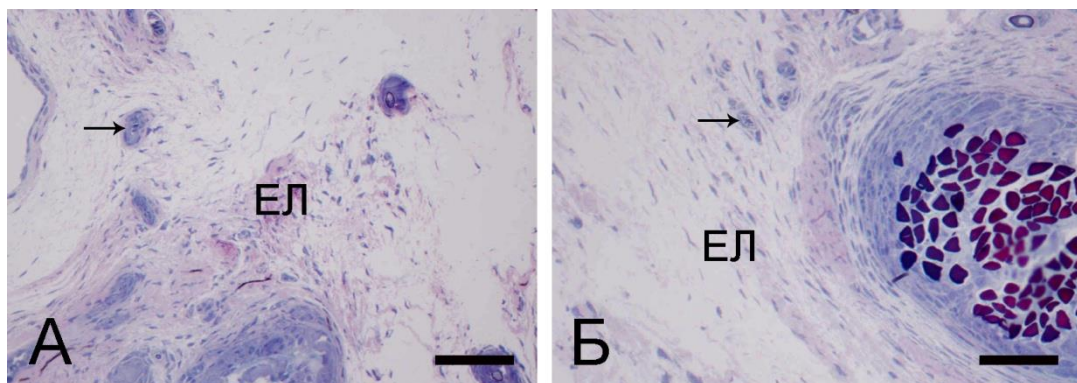
V.5.1.3 Тридесети ден след увреда на МКВ

На тридесетия ден след травмата оздравителният процес в ЕЛ на МКВ напредва. Светлинно-микроскопски постепенно, макар и непълно, той е

възстановил своята структура. Наблюдават се фибробласти с различни форми, адипоцити, колагенни влакна и съдове. Неправилното организиране на влакната в лигамента обаче продължаваше, но все по отчетливо ендолигамента обвиваше колагенните снопове изграждащи фасцикулите (Фигура V36 и 37).



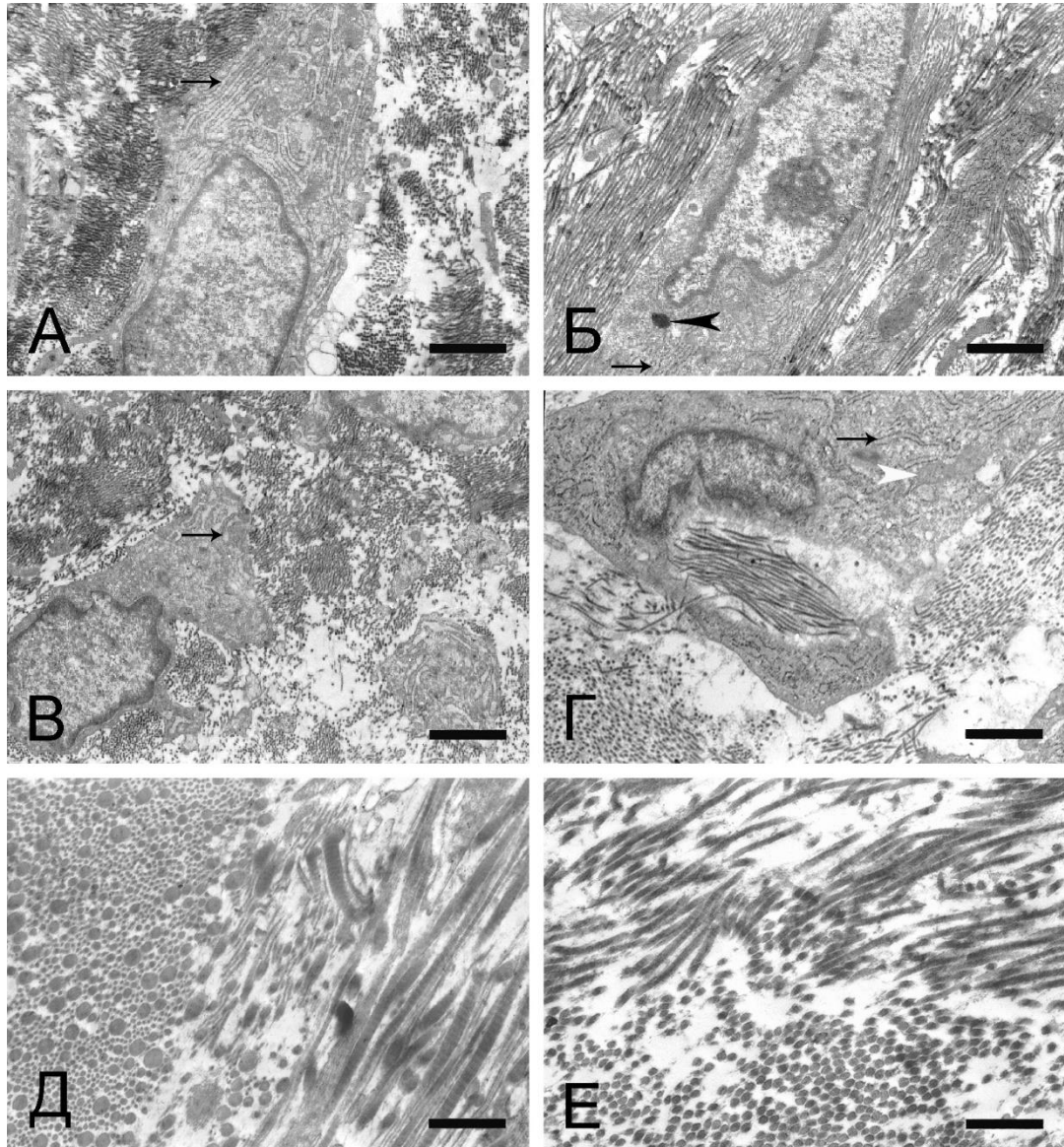
Фигура V36. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увреда. А) ЕЛ-лигамент комплекс гранулоционна тъкан на 30-ия ден след нараняването, съставен от фибробласти (в синьо) и колагенови влакна (в червено), който продължава в ендолигамента (глава на стрелка). Размерна линия, 100 μm



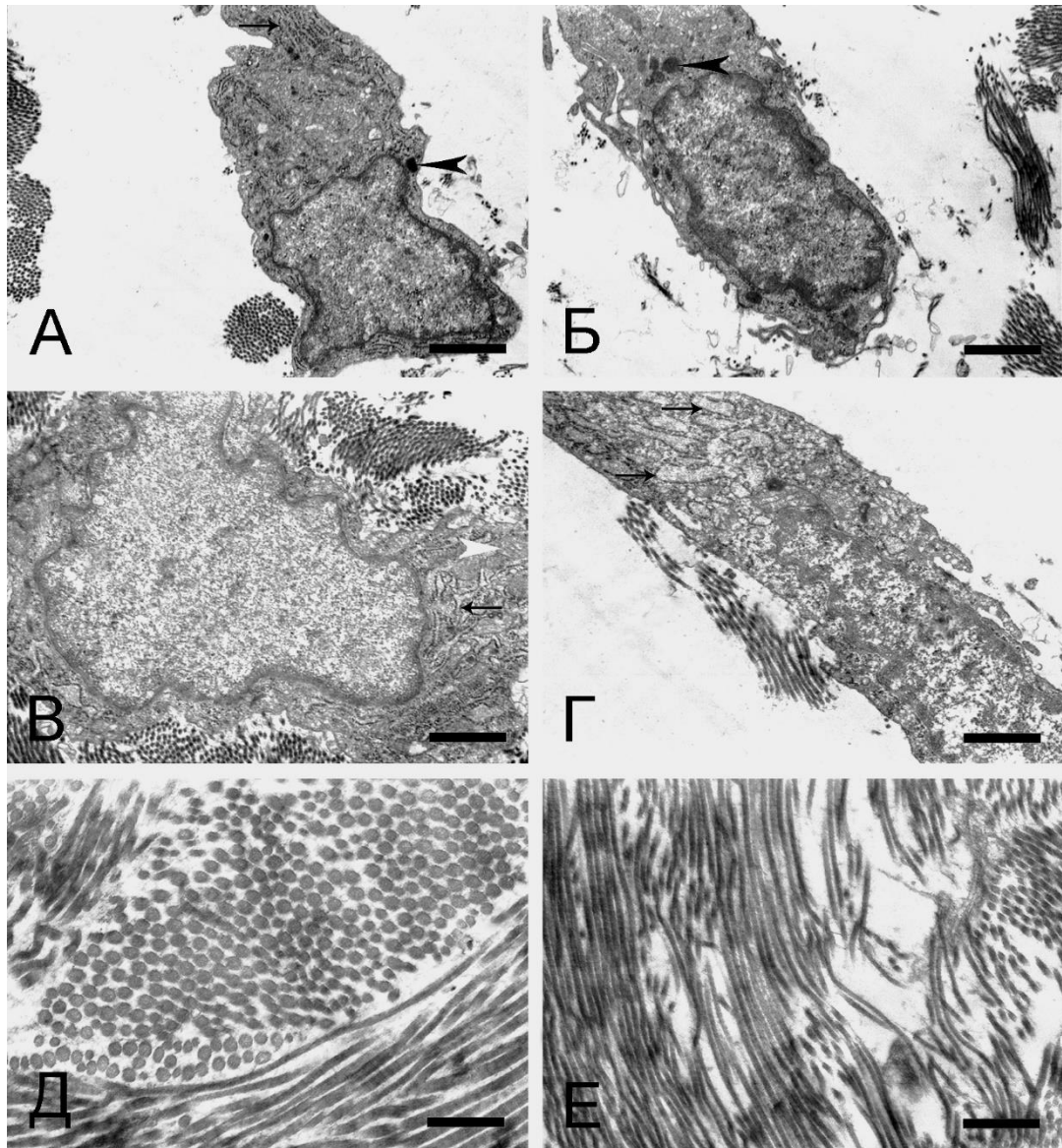
Фигура V37. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увредата и шев на МКВ. А, Б) Комплекс ЕЛ-лигамент на 30 ден съставен от фибробласти (в синьо), колагенови влакна (в червено), кръвоносни съдове (стрелка) и наличие на шевен материал, заобиколен от гранулоционна тъкан. Размерна линия, 100 μm .

Ултраструктурно през този период фибробластите от различните типове притежаваха голямо ядро и добре оформено ядърце. В цитоплазмата на клетките отново се наблюдаваха рибозоми, полизоми и добре развит гранулиран еноплазмен ретикулум, единични лизозоми и митохондрии (Фигури V38 А-Г; V39 А-Г). Наблюдаваха се и единични фибробласти с голямо количество вторични лизозоми в цитоплазмата. Клетките в дълбоките слоеве на ЕЛ показваха силно развит гранулиран еноплазмен ретикулум и единични лизозоми. Те притежаваха дълги цитоплазмени израстъци, обвиващи отделните колагенни снопове в периферните части на лигамента. В междуклетъчното пространство на ЕЛ колагенните влакна се групираха в снопове с различна ориентация и изпълваха пространството между отделните фибробласти. Техните ултраструктурни характеристики отново показваха характерно редуване на тъмни и светли ивици. Наблюдаваха се и единични колагенни влакна разположени хаотично, както между колагенните влакна, така и поотделно (Фигури V38 Д, Е; V39 Д, Е). Рядко се наблюдаваха колагенни влакна с нарушени ултраструктурни характеристики.

Сходна морфологична картина на възстановяване бе наблюдавана и при експериментален модел на увреда на латералната колатерална връзка при плъх.



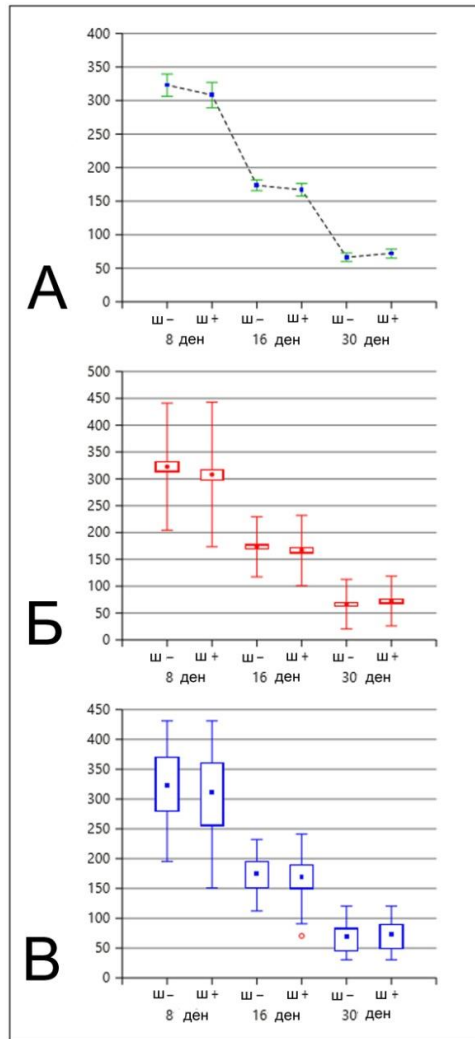
Фигура V38. Електронोगрама на 30 ден след увредата на МКВ. А-Г) Фибробласти с добре представени ядра, лизозоми (черна стрелка), гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки) и сферични митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в извънклетъчното пространство. Размерна линия, 1.4 μm (А, Б), 1.5 μm (В), 1.3 μm (Г). Д, Е) Колагенови влакна в ЕЛ. Размерна линия 0.7 μm (Д), 0.5 μm (Е).



Фигура V39. Електронограма на 30 ден след увреда и шев на МКВ. А-Г Фибробласти с големи ядра, лизозоми (черни стрелки), гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелки), сферични митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в екстрацелуларния матрикс. Размерна линия, 1,5 μm (А, Б), 0,8 μm (В), 1,0 μm (Г). Д, Е) Колагенови влакна в ЕЛ. Размерна линия, 0,5 μm (Д), 0,7 μm (Е)

За да се премахне субективността при оценката на ролята на ЕЛ по време на оздравителния процес бе проведен сравнителен статистически анализ на броя клетките в двата експериментални модела. Резултатите от

анализа показаха, че няма статистически значима разлика между неоперативното и оперативното лечение на МКВ въз основа на сравнението на броя на клетките, който не се променя от намаленото разстояние между двата края на разкъсания лигамент (Фигура V40).

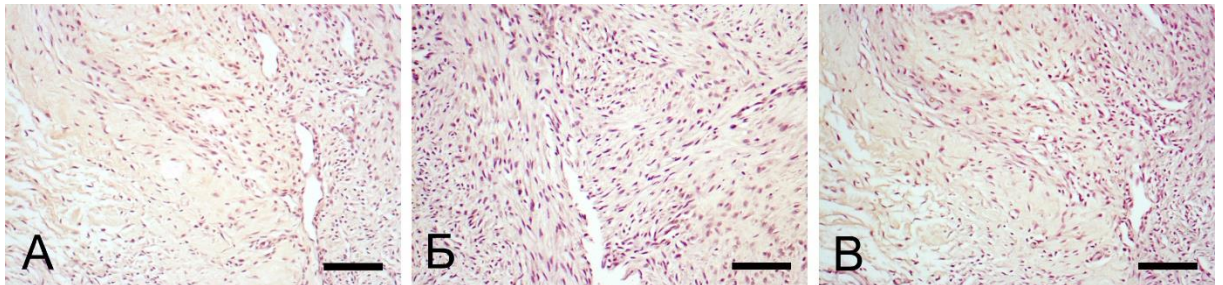


Фигура V40. Графично представяне на статистическия анализ на данните в групата със спонтанно оздравяване, без хирургически шев (ш-) и в групата лекувана с хирургически шев (ш+) на 8, 16 и 30 ден след увредата на МКВ. А) сравнение на средните стойности (сини квадрати); отсечките под и над правоъгълника представят 95% интервала на доверителност на средните стойности. Б) хистограма показваща средната стойност (червен кръг). Долната и горната граница на правоъгълника показват средната стойност (Mean), коригирана със стандартната грешка (SE) [Mean – SE, Mean + SE]. Отсечките под и над правоъгълника представят интервала на средната стойност, коригиран с две стандартни отклонения (2SD) (Mean – 2×SD, Mean + 2SD). В) Квартилна диаграма, показваща средната стойност (син квадрат). Долната и горната граница на правоъгълника показват съответно 25-ти и 75-ти персентил. Отсечките под и над правоъгълника достигат съответно границите на 10-ти и 90-ти персентил. Кръговете представят стойностите извън обхвата.

V.6. Имунохистохимично изследване (колаген тип I, III, V) на ранните промени настъпващи в ЕЛ при експериментален модел на увреда МКВ на колянна става у плъх.

V.6.1 Осми ден след увреда на МКВ

Резултатите от имунохистохимичното изследване показаха, че на 8-я ден след увредата в областа на ЕЛ има наличие на имунохистохимична реакция за колаген тип I (Фигура V41 А), тип III (Фигура V41 Б) и колаген тип V (Фигура V41 В) между отделните базофилни ядра на фибробластите. Експресията на колаген тип I бе отчетена, като слабо позитивна (1+) до липсваща в 85% от зрителните полета. На колаген тип III и тип V слабо позитивна (1+). Новообразуваната тъкан отново се отличаваше с богата клетъчност.

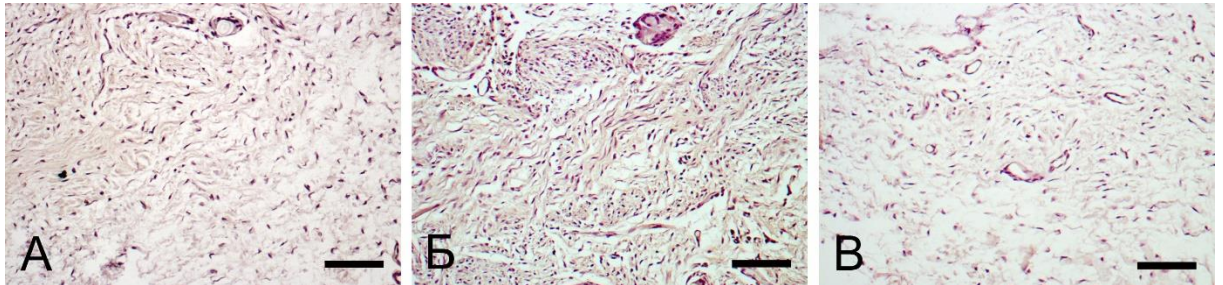


Фигура V41. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда на МКВ. А). Имунохистохимична експресия на колаген тип I; Б) Имунохистохимична експресия на колаген тип III; В) Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - 100 μ m

V.6.2 Шестнадесети ден след увредата на МКВ

На шестнадесетия ден след травмата отново се наблюдаваше позитивна реакция за колаген тип I (Фигура V42 А), тип III (Фигура 42 Б) и

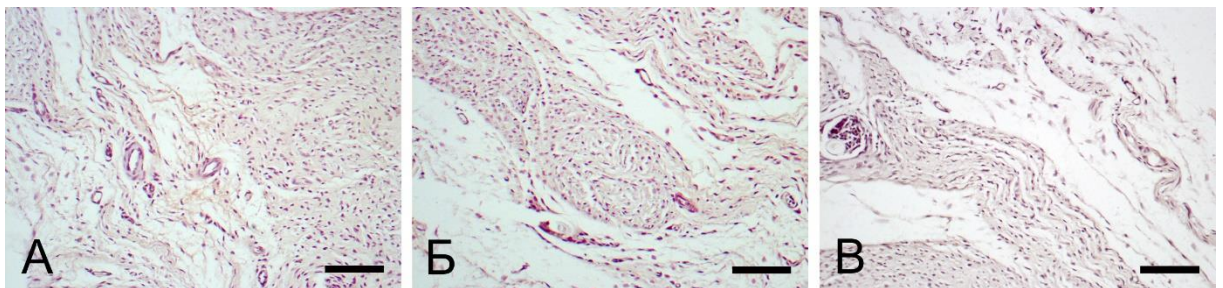
колаген тип V (Фигура V42 В). Експресията на колаген тип I бе отчетена, като слабо позитивна (1+) до негативна в 75% от зрителните полета. На колаген тип III бе позитивна (2+), а на тип V слабо позитивна (1+).



Фигура V42. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда. А) Имунохистохимична експресия на колаген тип I; Б) Имунохистохимична експресия на колаген тип III; В) Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - 100 μm

V.6.3 Тридесети ден след увреда на МКВ

Резултатите от имунохистохимичното изследване показаха, че на 30-я ден след увредата на МКВ в областа на ЕЛ има наличие на имунохистохимична реакция за колаген тип I (Фигура V43 А), тип III (Фигура V43 Б) и тип V (Фигура V43 В). Експресията на колаген тип I бе отчетена, като позитивна (2+), както и на колаген тип III и V.



Фигура V43. Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увреда. А). Имунохистохимична експресия на колаген тип I; Б) Имунохистохимична експресия на колаген тип III; В) Имунохистохимична експресия на колаген тип V. Размерна линия - 100 μm

VI. Обсъждане

VI.1 Анатомия и морфология на МКВ и ПКВ на колянната става и тяхната съединително-тъканна обвивка нар. епилигамент

Ставните връзки (лигаментите) се описват като хипоцелуларни и хиповаскуларни структури изградени от плътно организирани снопове от колагенови влакна, ориентирани успоредно, като по този начин те осигуряват стабилност на ставите в опорно-двигателната система. Основният вид клетки на тези структури са фибробластите, разпръснати между успоредните снопчета от колаген (Arnoczky и съавт., 1993; Frank, 2004; Laurencin и Freeman, 2005; Hsu и съавт., 2010; Овчаров и Такева, 2012; Mescher и съавт., 2018). Ставните връзки спомагат за хомеостазното равновесие на ставата чрез техните вискоеластични свойства (функция, която отразява комплексните взаимодействия между колагените, протеогликаните, водата и други протеини). Когато се прилага напрежение лигаментите се деформират (т.е. удължават) нелинейно под действието на колагеновите фибрили. При нарастване на напрежението върху лигамента колагеновите фибрили се удължават, докато всички не станат почти линейни. Позиционирането на колагеновите влакна в една линия води до здравина на връзката. Различни степени на здравина са необходими за различните натоварвания и различните ставни движения. Когато приложеното напрежение предизвика всички нишки да станат почти линейни, ставната връзка абсорбира енергия, което води до ставна нестабилност. Когато връзките са преудължени за определен период от време, те могат да загубят своята способност да възстановяват първоначалната си форма. В тези случаи лигаментът се разрехва и не

може да поддържа ставата, което от своя страна води до нестабилност и болка (Khatod and Amiel, 2003; Jung и съавт., 2012).

Лигаментите се залавят за костта на специфични места, наречени инсерции. Геометричната форма на ставните връзки зависи от начина по който нишките са свързани помежду си когато ставата се движи. Посоката на движение на ставата определя кои нишки в състава на лигамента ще извършат определеното движение. Лигаментите имат надлигаментарна част от клетъчен и съдов слой, която често макроскопски е неразличима от самия лигамент. Надлигаментната част съдържа сетивни и проприосетивни нерви, по-голямата част от които се намират близо до залавните места на лигаментите. Когато лигаментите претърпят увреда, нервните окончания изпращат сигнали до мозъка, които водят до възникване на мускулна контракция около ставата. Това позволява на тялото да защити и стабилизира ставата при нараняване. Лигаментите предпазват ставите от прекомерно движение, осигурявайки пасивна стабилизация и осигуряват нормалната подвижност на ставите. Ставните връзки пренасят силата от и върху скелета, като разпределят натоварванията, за да може да се извърши определено движение. Освен сухожилията, лигаментите също могат да се залавят за периоста (тъкан, която играе важна роля в растежа и регенерацията на костите и има значение за кръвоснабдяването както на костите, така и на скелетните мускули) (Chowdhury и съавт, 1991; Bray, 1995; Frank, 2004; Benjamin и съавт., 2006).

Морфологичните изследвания на лигаментарната тъкан показват, че колагеновите снопове, които представляват основната ѝ съставка са изградени от по-малки снопчета, подредени в посока паралелна на дългата ос на ставната връзка. Мрежовидната структура, която колагеновите фибри изграждат, придава здравината присъща за лигаментите. Под светлинен микроскоп колагеновите нишки имат вълнообразна структура по дължина,

което се свързва с натоварването, което лигаментите поемат. Някои снопове се изопват, други се отпускат в зависимост от положението на костите спрямо мускулите и приложените сили. По този начин се осигурява стабилност на ставите при различните движения и натоварвания (Arnoczky и съавт., 1993; Frank, 2004; Laurencin и Freeman, 2005; Hsu и съавт., 2010; Mescher и съавт., 2018).

Обикновено връзките се свързват с костите по два начина: директно и индиректно. При директното свързване (например свързването на МКВ с бедрената кост) влакната се прикрепват директно за костта, а преходът на връзката към костта се извършва в четири зони: връзка, влакнест хрущял, минерализиран влакнест хрущял и кост (Woo и съавт., 1987). При индиректното свързване (например свързването на МКВ с тибията) повърхностните влакна са прикрепени към периоста, докато по-дълбоките влакна са прикрепени директно към костта под остър ъгъл (Woo и съавт., 1987). Свързването на МКВ с тибията пресича епифизарната и част така, че тя може да бъде удължена в синхрон с растежа на костта.

Ставните връзки са съставени главно от вода, колаген и аминокиселини. От цялата маса на лигамента около 2/3 е вода, а 1/3 са минерали (Arnoczky и съавт., 1993; Frank, 2004; Laurencin и Freeman, 2005; Hsu и съавт., 2010; Mescher и съавт., 2018). Колагенът изгражда около 75% от масата на ставната връзка, а останалите 25% са представени от еластин, гликопротеини и протеогликани. Между 65 и 70 % от общото тегло на връзките се състои от вода. Основната съставка е представена от колаген тип I (70–80% от сухото тегло). Колаген тип III (8 % от сухото тегло) и колаген тип V (12% от сухото тегло) са други основни компоненти (Birk и Mayne, 1997; Linsenmayer и съавт., 1993). Описано е още наличието на колаген тип II, IX, X, XI и XII, XIV (Niyibizi и съавт., 1996; Sagarriga

Visconti и съавт., 1996; Fukuta и съавт., 1998; Frank, 2004; Laurencin и Freeman, 2005; Hsu и съавт., 2010; Mescher и съавт., 2018).

Докато колаген тип I отговаря за силата и издръжливостта на лигаментите, тип III е свързан с възстановяването и неговата синтеза е силно повишена след увреда на връзката (Hsu и съавт., 2010; Chamberlain и съавт., 2011; Hauser и съавт., 2013; Mescher и съавт., 2018). Синтезата на колаген тип V също се повишава по време на възстановяването на лигаментите и има значение за диаметъра на фибрилите (Niyibizi и съавт., 2000), а тип XIV има роля в линеарния растеж на фибрилите (Hsu и съавт., 2010). Вариациите в концентрацията на тези основни съставки водят до разнообразен набор от механични поведения на връзките на колянната става, които са подходящи за съответните им функции. Сравнително проучване показва, че тангенциалният модул и якостта на опън на заешката МКВ са по-високи от тези на ПКВ (Woo и съавт., 1992), което корелира с по-голям среден диаметър на фибрилите за МКВ (Hart и съавт., 1992). В допълнение – фибробластите на МКВ са с по-вретеновидна форма (Lyon и съавт., 1991), произвеждат по-високи нива на иРНК за преколаген тип I (Wiig и съавт., 1991) и имат по-ниско съотношение на колаген тип III към колаген тип I при култивиране (Ross и съавт., 1990). Освен това е установено, че механичното натоварване регулира генната експресия на колагените във връзките. Поради това, съставът на всяка връзка е пряко свързан с нейните механични свойства (Hsieh и съавт., 2002).

Фибробластите, които са разположени в пространствата между колагеновите снопове участват в продукцията и поддържането на извънклетъчния матрикс. Нови проучвания доказват, че фибробластите могат да комуникират помежду си, като по този начин се осигурява клетъчната организация и се контролират метаболитните процеси в тъканта. Протеогликаните, които се намират в екстрацелуларния матрикс,

служат за съхраняването на водата, което допринася за вискоеластичните качества на лигаментите. Тези свойства позволяват на ставните връзки да се удължават при опъване и да се връщат в нормалното си положение, след като опъването се прекрати (Lo и съавт., 2002; Frank, 2004; Mescher и съавт., 2018).

От изброеното по-горе се разбира, че хистологията на ставните връзки е добре проучена, но това не се отнася до една “проста“ и непредизвикваща до скоро интерес както сред морфолозите, така и сред ортопедичната общност обвивка на ставната връзка нар. ЕЛ. Поради голямото клинично значение и научен интерес, както към структурните особености, така и към начина на възстановяване на МКВ и ПКВ, като едни от най-честите увреди на колянната става, изучаването на ЕЛ именно на тези две връзки е основна тема на настоящата работа. Основната цел е представянето на морфологията на ЕЛ на МКВ и ПКВ, както и сравнението му с лигаментарната структура. Дали тази обвивка има някаква научна стойност от морфологична гледна точка и как тя би допринесла за нормалната функция на ставните връзки?

Първоначално изследванията на ЕЛ бяха насочени върху експериментално животно. В последствие предмет на изучаването бе и евентуалната му роля при експериментален модел на увреда на МКВ при плъх. Получените морфологични данни, както за нормалната морфология на ЕЛ, така и за промените, които настъпват в него при експериментална увреда представиха ролята му за нормалната функция на ставната връзка и възстановяването ѝ след увреда. Това подтикна към разширяване на изследванията и изучаването на тази структура и при човека. Усилията отново се насочиха най-вече към изключително актуалните от ортопедична гледна точка МКВ и ПКВ на колянната става, както поради честотата на травматизма им, така и от разликите, които съществуват както

морфологично, така и при лечението им. Целите на изследванията се насочиха към създаване на нова теория, целяща да обясни на базата на разликите в ЕЛ невъзможността за оздравител процес при ПКВ.

Оценката на ролята на ЕЛ за нормалното функциониране на ставната връзка, както и ролята му при оздравителния процес първоначално започна с рутинна светлинна микроскопия. Впоследствие данните се доразвиха с помощта, както на различни имунохистохимични техники, така и на ултраструктурно ниво.

Но какво знаем за ЕЛ? Първоначално тази структура бе описана, като “покриваща лигаментна съединителнотъканна обвивка, която се отстранява заедно с него, но може да бъде разграничена от действителната лигаментарна тъкан” (Gray и съавт., 1990). Освен, че покрива лигаментарната тъкан, ЕЛ се слива с периоста на костта на мястото на инсерцията на лигаментна (Frank, 2004). Тази съединителнотъканна структура се състои от колагенни фибри с по-малък размер и диаметър, както и с различна ориентация спрямо тези, които се откриват в лигаментна (Chowdhury и съавт., 1991; Frank, 2004). Многобройни сензорни и проприосетивни нервни структури участват във формирането на съдово-нервните плексуси, които преминават дълбоко в ЕЛ (Chowdhury и съавт., 1991; Frank 2004). Предполагаше се, че ЕЛ може да има роля в нарастването и възстановяването на лигаментите, както и да контролира навлизането на вода и на метаболитно активни вещества в лигаментна (Chowdhury и съавт., 1991). Всички тези хипотези относно възможната роля на тази обвивка не бяха подкрепени със съответен доказателствен снимков материал.

Тези твърде оскъдни литературни данни засилиха интереса на автора в областта, както на морфологията, така и в ортопедията и

травматологията. Изключителното значение на експерименталните модели и морфологичните данни за развитието на добрата клиничната практика бе основна движеща сила на настоящата работа. Целта бе ясна: с натрупаните нови данни да се даде една здрава основа, с която в последствие да се търси подобряването на терапевтичните алгоритми. Както личи от българските и световните ортопедични бази данни, бъдещето на науката е насочено към пряката връзка на комплексността на съвременния учен ортопед, а именно съчетаването на знанията, които започват от отделната клетка до най-съвременните достижения на ортопедичните техники.

Въпреки, че повечето предишни разработки в областта на връзковият апарат на колянната става бяха на заек, куче, овца и др. по-едри животни, основните насоки на настоящата работа започнаха при плъх поради няколко причини: сходната морфология с човек, по-лесната достъпност, по-ниската цена, по-лесното отглеждане и по-голямата устойчивост на това животно.

Първоначалните данни показаха, че клетките изграждащи ЕЛ на МКВ и ПКВ, както и латералната колатерална връзка на колянна става при плъх са представени от фибробласти, фиброцити, адипоцити и мастоцити, което потвърждаваше изследванията при заек. В настоящето изследване първоначално интерес предизвика наличието на значително голямо количество съдово-нервни снопове локализиращи в ЕЛ, както и неговия хиперцелуларитет в сравнение с лигаментарната тъкан на МКВ и на ПКВ. Оценката на клетъчната морфология на ЕЛ продължи с помощта на ТЕМ. От представените в частта резултати и данни се разкриват наличието на ултраструктурни характеристики на метаболитно активни клетки, фибробласти, както и наличието на миелинови и амиелинови влакна изграждащи нервните снопове. Светлинномикроскопските и ултраструктурните данни за първи път показаха навлизането на ЕЛ в самия

лигамент, както и продължаването му в ендолигамента, обвиващ хиповаскуларните и хипоцелуларните лигаментарни структури. Още при самото светлинномикроскопско изследване се установи (макар и по твърде субективен начин на базата само на наблюдение), че клетките на ЕЛ на МКВ у плъх са значително в по-голямо количество в сравнение с тези на ПКВ, което по-долу детайлно ще бъде дискутирано. В следствие това бе потвърдено с помощта на статистически методи.

Поради добре известната роля на колаген тип I, III и V, описани по горе, както и литературните данни за наличието им в лигаментарните структури и тяхната роля за оздравителния процес, изследванията се насочиха към установяването им в ЕЛ на МКВ и ПКВ първоначално при плъх. Направена бе и съпоставка с експресията им в самата лигаментарна структура. Представени в детайли в частта резултати, наблюденията могат накратко да се обобщят така: 1) Установиха се съществени разлики в ЕЛ при МКВ и ПКВ (експресията на колаген тип I е основно позитивна (2+) в ЕЛ на МКВ и слабо позитивна (1+) в ЕЛ на ПКВ). 2) В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията е слабо позитивна до липсваща. 3) Експресията на проколаген тип III е силно позитивна (3+) в ЕЛ на МКВ и позитивна (2+) в ЕЛ на ПКВ. 4) В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията е слабо позитивна до липсваща. 5) Експресията на колаген тип V е силно (3+) до позитивна (2+) в ЕЛ на МКВ и позитивна (1+) и слабо позитивна (1+) в ЕЛ на ПКВ. 6) В лигаментарната тъкан и на двата лигамента експресията е слабо позитивна до липсваща.

В резюме на гореописаното може да се обобщи: светлинномикроскопските и ултраструктурните изследвания при МКВ и ПКВ на плъх ясно показаха, че ЕЛ е хиперцелуларен в сравнение с лигамента, както и, че навлизайки в лигаментарната част продължава в ендолигамента, обвиващ отделните снопове. Ултраструктурните

изследвания показаха метаболитно активни фибробласти, чиято активност отново се оцени с помощта на имунохистохимично изследване за колаген тип I, III и V. Представените данни от имунохистохимичното изследване показват, че по-горе изброените колагени се синтезират основно от фибробластите в ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх, което заедно с наличието на добре представени съдово-нервни снопове в него позволява да се приеме, че ЕЛ би могъл да бъде основен субстрат, както за нормалната функция на ставната връзка, така и за оздравителния процес.

Натрупаните до момента данни се разшириха при МКВ и ПКВ при човек с оглед съпоставката им с плъх и прилагането на знанията натрупани за тази структура в реалната клинична практика. Целта бе създаването на нова епителиална теория за оздравителния процес на МКВ, както и на нова теория обясняваща невъзможността за оздравителен процес на ПКВ.

Получените данни за изследването на МКВ и ПКВ при човек са представени в детайли в частта резултати и накратко може да се обобщят така: експресията на колаген тип I бе слабо позитивна (1+) в ЕЛ и позитивна (2+) в лигаментарната тъкан и на двата лигамента. Експресията на проколаген тип III бе позитивна (2+) в ЕЛ и лигаментарната част заедно с ендолигамента на МКВ, слабо позитивна (1+) в ЕЛ и негативна (0) в лигаментарната тъкан и ендолигамента на ПКВ. Експресията на колаген тип V беше слабо позитивна (1+) в ЕЛ и негативна (0) в лигаментарната тъкан при МКВ и ПКВ. Имунореактивността на трите молекули бе винаги по-висока в ЕЛ на МКВ, отколкото в ПКВ. Нещо повече, експресията на колаген тип III и V в ЕЛ и ендолигамента, както и богатата му клетъчност води до заключението, че именно той е основния донор на клетки и допринася за експресията на тези колагени по време на ранният оздравителен процес на МКВ, което е в съответствие с натрупаните данни при изследването на тази структура при плъх.

В последните години значително внимание се отделя и на секрецията на ММП-зи от фибробластите, както в норма, така и при експериментални увреди на МКВ и ПКВ. По време на увредата и възстановяване на МКВ, увредените молекули в екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) се отстраняват и нови такива се синтезират и натрупват. Финният баланс между процесите на разграждане и синтезиране при процеса на ремоделиране на тъканите се контролира от ММП-зи и техните инхибитори (тъканни инхибитори на металопротеази, ТИМП) (Хие и съавт., 2009). ММП-зи са сложна група от калций и цинк-зависими ендопептидази, които притежават свойствата да се прикрепват и участват в разграждането на компоненти на ЕЦМ и в частност към колагена и еластина. Те се секретират в латентна форма, изискваща активация за превръщането им в активна за протеолиза форма. Активността им е ниска в здрави тъкани и се контролира много стриктно от различни ендогенни инхибитори в отговор на редица стимули. Тя зависи до голяма степен от генната транскрипция и се регулира също чрез тяхната секреция, като неактивни зимогенни форми, изискващи екстрацелуларна активация и ко-секреция на ТИМП. Чрез регулиране на целостта и състава на структурата на ЕЦМ, ММП-зи играят основна роля в контрола на сигналите излъчвани от различни молекули, които регулират клетъчната пролиферация, диференциация и смърт. Повишена експресия на ММП-зи се наблюдава при различни патологични процеси. Тези ензими се отделят от различни клетки на съединителната тъкан, като фибробласти, ендотелни клетки, остеобласти, макрофаги и други (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015; Пиев и съавт., 2016). Според литературните данни ММП-2 и -9 участват в ремоделирането и възстановяване на тъканите, разграждане на клетъчните мембрани, оздравителните процеси на МКВ и ПКВ, туморо и ангиогенезата и др. (Georgiev и съавт., 2012; Blázquez-Prieto и съавт., 2018; Juan и съавт., 2018).

Получените данни за ММП-2 и -9 при МКВ, представени в детайли в частта резултати, накратко може да се обобщят така: положителна (2+) експресия в 70% и слабо позитивна (1+) експресия в останалите 30% от полетата в ЕЛ; в лигамента се отчита предимно отрицателна (0) в 76% от зрителните полета и като слабо положителна (+) в останалите 24%. Ензимната активност на ММП-9 в ЕЛ се отчита като слабо положителна (+) в 63%, положителна (2+) в 28% и отрицателна (0) в 9% от зрителните полета; в лигаментарната тъкан експресията на ММП-9 се отчита като отрицателна (0) в 88% и слабо положителна (1+) в 12% от зрителните полета.

Получените данни за ММП-2 и -9 при ПКВ (също представени в детайли в частта резултати), накратко може да се обобщят така: в ЕЛ на ПКВ при 74% от зрителните полета имунореактивността е ниско положителна (1+), докато в останалите 26% тя се изчислява като положителна (2+); в лигаментарната тъкан ензимната активност е предимно отрицателна в 92% или ниско положителна (1+) в 8% от зрителните полета. Разпределението на имунореактивността на ММП-9 в ЕЛ е слабо положителна (1+) в 83% и отрицателна (0) в 17% от зрителните полета; в лигаментарната тъкан ензимната активност е отрицателна (0) в 94% и ниско положителна (1+) в останалите 6% от зрителните полета.

След сравняване на експресията на различни ММП-зи в МКВ и ПКВ, Zhou и съавт. (2005) заключават, че ММП-зите имат отношение относно различията в оздравителния процес на тези две връзки. Авторите съобщават, че експресията на ММП-2 е по-висока при увредената ПКВ, отколкото при МКВ, поради което смятат, че това е една от възможните причини за невъзможността за регенерация на ПКВ. Tang и съавт. (2009) описва 6.3-кратно увеличение на експресията на ММП-2 във

фибробластите при увреда на ПКВ в сравнение с тази на МКВ. ММП-9 се експресира повече при увреда на МКВ, но в много по-малка степен, отколкото при ПКВ. Ishiguro и съавт. (2000) съобщават за наличието на про ММП-9 в периваскуларната област в разкъсаните краища на ПКВ и про ММП-2 експресия на клетките между неправилно ориентирани колагенови снопове на този лигамент. Според авторите не може да бъде определено дали положителната реакция на тези ММП-зи се дължи на бързо разграждане или е в резултат на разпадни процеси. Zhang и съавт. (2009) съобщават за по-висока експресия на фибробластите на ММП-2 при МКВ, в сравнение с тези на ПКВ. Авторите предполагат, че различната експресия на ММП в МКВ и в ПКВ може да бъде причина за различните възможности за зарастване на двата лигамента.

По-горе представените резултати подкрепят проучванията на Zhang и съавт. (2009), които съобщават за по-силна експресия на ММП-2 в МКВ в сравнение с ПКВ. От друга страна, Tang и съавт. (2009) описва много по-силна експресия на ММП-2 в ПКВ за разлика от МКВ след травма. Тези различия вероятно произтичат от факта, че авторите са изследвали експресията и разпределението на ензима след травматична увреда. Различната експресия на ММП-9 между двата лигамента не е изследвана специално в литературата. Най-често авторите са избрали да оценят голям брой други ензими от семейството на ММП-зи (Tang и съавт., 2009; Zitka и съавт., 2010; Evrosimovska и съавт., 2011). Настоящите резултати отчитат по-силна ензимна активност на ММП-9 в МКВ, отколкото в ПКВ, като експресията се наблюдава предимно в ЕЛ.

В заключение може да се обобщи, че експресията на ММП-2 и -9 е локализирана предимно в ЕЛ на МКВ. В ЕЛ на ПКВ тези ММП-зи се експресират, но в значително по-малка степен. Иммунохистохимичната

реакция в областта на лигаментарната част на тези връзки е сравнително сходна.

С оглед разширяване на данните за ЕЛ при МКВ и ПКВ и в съгласие с наличните литературни данни за други молекули, имащи отношение към оздравителния процес на ставната връзка се проведе изследване и анализ за наличието на тези молекули, а именно CD34, α -SMA и VEGF в ЕЛ при човек. Целата на това изследване бе да се представи и съпостави експресията им в ЕЛ на двата лигамента, което да потвърди и доразвие натрупаните до момента данни за ролята на тази съединително-тъканна обвивка.

При ЕЛ на МКВ, най-много се отчитат слабо положителни резултати за CD34, и в по-малка степен за α -SMA. В ЕЛ на МКВ при оценка на експресията за VEGF се отчита предимно отрицателна имунохистохимична реакция. В ЕЛ на МКВ се наблюдава предимно слабо положителна реакция за α -SMA и CD34, а в по-малка част от зрителните полета се отчита слаба експресия за VEGF. Като цяло, при ЕЛ на МКВ експресията на CD34 е най-висока, следвана от α -SMA и VEGF.

Анализът на експресията на CD34, α -SMA и VEGF показва, че в ЕЛ на ПКВ се наблюдават най-голяма част от положителни резултати (1+ и 2+) в сравнение с ЕЛ на МКВ. Повечето силно позитивни и позитивни резултати за CD34 се отчитат в ЕЛ на ПКВ, последвани от VEGF. Въпреки това, най-висок процент силно позитивна реакция се наблюдава при α -SMA, следвана от VEGF и CD34. Най-много зрителни полета с положителна реакция се наблюдават в ЕЛ на ПКВ за CD 34, следвани от VEGF и α -SMA. Има значителни полета от ЕЛ на ПКВ със слабо положителна реакция за α -SMA и силно позитивна за VEGF, но броят на отрицателните реакции е по-висок за α -SMA, отколкото за VEGF.

Различни проучвания показват, че стените на кръвоносните съдове са богати на стволови/прогениторни клетки, които експресират CD34 протеин (Howson и съавт., 2005; Zengin и съавт., 2006; Crisan и съавт., 2008). Теi и съавт. (2008) представят обещаващи резултати за клиничното приложение на циркулиращи CD34+ клетки оказващи влияние върху оздравителните процеси на ставните връзки, както и при процеса на ремоделиране.

На базата на представените резултати, може накратко да се обобщи, че в ЕЛ на двете връзки, CD34 се експресира основно в ендотела на кръвоносните съдове и в ЕЛ тъкан. Нещо повече, в областта на лигаментарната тъкан, горепосочената експресия продължава в ендолигамента, като експресия в лигамента не се отчита. Ето защо, ЕЛ може да се приеме, като основен резервоар на стволови/прогениторни клетки.

По отношение на експресията на α -SMA тя е характерна за миофибробластите, както при интактна връзка така и при руптурирана такава (Murray и Spector, 1999; Murray и съавт., 2000). Тези клетки допринасят значително за контрактилната фаза при оздравителния процес на МКВ, позволявайки възстановяването на първоначалната ѝ дължина (Faryniarz и съавт., 1996). Установено е, че след нараняване фибробластните клетки, подложени на различни стимули (цитокини, механична микросреда) се диференцират в миофибробласти, които се характеризират с *de novo* експресия на α -SMA (Hinz и съавт., 2007).

По отношение на експресията на α -SMA може да се обобщи, че положителна имонохистохимична реакция се наблюдава предимно в стените на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ на двете връзки, както и в ендолигамента, а липсва в лигаментарната тъкан. Трябва да се отбележи, че експресията на α -SMA е най-силно изразена в ЕЛ на

ПКВ, което би могло да окаже допълнително негативно влияние върху образуваната репаративна мостова тъкан след увреда на връзката, което се дискутира по-долу.

Съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) е мощен медиатор на ангиогенезата, която включва активиране, миграция и пролиферация на ендотелни клетки при различни патологични състояния (Ferrara и съавт., 1997). VEGF е неразделна част от ранните пролиферативни и ремоделиращи фази, в които е доказано, че е мощен стимулатор на ангиогенезата (Molloy и съавт., 2003). Този растежен фактор се експресира в развиващите се кръвоносни съдове и неговите рецептори се намират изключително върху ендотелните клетки (Nicosia и съавт., 1997). VEGF се счита за най-мощния стимулатор на неоангиогенезата и играе важна роля в контрола и регулирането на поведението на ендотелните клетки при процесите на тяхната миграция, пролиферация и диференциация (Jackson и съавт., 1997; Harry и Paleolog, 2003). Не е ясно дали увеличаването на неоваскуларизацията е благоприятно за клиничния резултат (Zumstein и съавт., 2014). VEGF е ендогенен стимулатор както на ангиогенезата, така и на повишената съдова пропускливост (Flamme и съавт., 1995). Различни проучвания показват, че VEGF играе съществена роля в оздравителния процес чрез индукция на ангиогенезата (Phillips и съавт., 1994; Corral и съавт., 1999; Nishimori и съавт., 2012). Molloy и съавт. (2003) и Chamberlain и съавт. (2009) посочват, че VEGF се произвежда в най-високите си нива след фазата на възпаление и че образуването на VEGF в кръвоносните съдове настъпва между 5 и 9 ден след увредата. Повишените нива на ангиогенни растежни фактори като VEGF в рамките на мястото на увредата са свързани с добре дефиниран модел на съдово вращване от епи- и интратендинозното кръвоснабдяване към мястото на руптурата. Тази неоваскуларизация протича по повърхността на епитенона, през

аваскуларна област и осигурява репаративни клетки, хранителни вещества и растежни фактори в мястото на увредата (Molloy и съавт., 2003). Нещо повече, ако се възприеме становището на Kirizuki и съавт. (2018), че запазването на остатъците на ПКВ при пластиката би осигурило по-голямо количество CD34+ клетки и по-добри клинични резултати, би могло да се приеме, че тези остатъци заедно с прилежащия към тях ЕЛ, биха били един добър източник на VEGF, който да подпомогне процеса на инкорпориране графта след реконструкция на ПКВ.

Настоящите резултати представят, че положителната имунохистохимична експресия на VEGF е локализирана предимно в стените на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ при ПКВ и МКВ; това отново подчертава валидността на твърдението, че ЕЛ е основният донор на кръвоносни съдове и VEGF, и играе важна роля както за нормалната функция на ставната връзка, така и по време на оздравителния процес.

Получените резултати от проведените имунохистохимични изследвания при човек може да се обобщят накратко:

1) Броят на съединително тъканните клетки (в частност фибробластите) е по-висок в ЕЛ на МКВ в сравнение с този на ПКВ, като разликата е статистически значима.

2) Фибробластите в ЕЛ на двата лигамента не са статични клетки, а произвеждат колаген тип I и V и проколаген тип III, МПП -2 и -9, CD34, α -SMA и VEGF.

3) Експресията на колаген тип I бе в голяма степен позитивна (2+) в лигаментарната тъкан на двата лигамента, но остава слабо положителна (1+) в ЕЛ.

4) Проколаген тип III бе експресиран в ЕЛ на двата лигамента, но експресията бе по-силна в ЕЛ на МКВ.

5) Проколаген тип III бе експресиран в лигаментарната тъкан и ендолигамента на МКВ, като имунореактивността бе основно позитивна (2+) (48%), докато в лигаментарната тъкан и ендолигамента на ПКВ бе основно негативна (0) (77%).

6) Експресията на колаген тип V бе предимно слабо-позитивна (1+) в ЕЛ на двата лигамента и негативна (0) в лигаментарната тъкан.

Настоящите светлинно-микроскопски, ултраструктурни и имуно-хистохимични изследвания на ЕЛ на МКВ и ПКВ дадоха възможност да се заключи следното:

1) ЕЛ е основния източник на клетки и кръвоносни съдове, които обуславят ранното възстановяване на МКВ, както и нормалната му функция.

2) ЕЛ на МКВ и ПКВ е морфологично различен по структура от лигаментарната тъкан.

3) ЕЛ на двата лигамента е хиперцелуларен в сравнение с лигаментарната тъкан.

4) Клетките на ЕЛ на ПКВ и МКВ са представени от фибробласти, фиброцити, адипоцити и мастоцити. Наблюдава се и наличие на съдовонервни снопове, локализирани най-вече в ЕЛ и ендолигамента.

5) Фибробластите в ЕЛ на МКВ и ПКВ не са статични клетки, а продуцират различни видове молекули (колаген тип I, III, V, MMP-2, MMP-9, CD34, α -SMA и VEGF и др.).

6) ЕЛ навлиза към лигаментарната тъкан и се продължава в ендолигамента.

7) Колагеновите влакна в ЕЛ на МКВ и ПКВ са с по-малък диаметър и са организирани в снопове с различни ориентации, както и по единично с хаотично разположение.

8) Броят на кръвоносните съдове в ЕЛ е значително е по-голям от този в лигаментната тъкан.

9) Броят на фибробластите в ЕЛ на ПКВ е по-малък от този в МКВ, като разликата е статистически значима.

10) Експресията на колаген тип I и V, както и на проколаген тип III е по-висока в ЕЛ на МКВ отколкото в ЕЛ на ПКВ.

11) Проколаген тип III се експресира в лигаментарната тъкан на МКВ при физиологични условия.

Поради факта, че в норма клетките в ЕЛ на ПКВ на плъх и човек са по-малобройни в сравнение с тези на МКВ, може да се приеме, че те не могат да осигурят необходимия клетъчен отговор за регенерацията. Също така, експресията на колаген тип I (отговарящ за силата на ставната връзка), колаген тип III (с основна роля при регенерацията на ставните връзки) и колаген тип V (отговорен за организацията и регулацията на диаметъра на фибрилите на колаген тип I, синтезирани от фибробластите в тези връзки) е значително по-силна в ЕЛ на МКВ в сравнение с ПКВ и може да доведе до нова теория за невъзможността на оздравителния процес на ПКВ.

Накратко: причините за компрометирания оздравителен процес на ПКВ могат да се определят така: 1) по-малкият брой фибробласти в ЕЛ при

ПКВ, спрямо МКВ; 2) по-малката експресия на колаген тип I, III и V, MMP-2 и -9.

Представените резултати и техният анализ водят до създаването на нова хипотеза за компрометирания оздравителен процес на ПКВ и развитието на т. нар. епилигаментарна теория. Считаю, че тя ще разшири наличния до момента материал в областта на познанията за МКВ и ПКВ, както от морфологична гледна точка, така и от ортопедична. И при досегашните теории отговорът за лошият регенеративен потенциал лежи основно на базата на сравнението на морфологията и локацията на двете връзки. Но какво знаем до днес относно компрометираният оздравителен процес на ПКВ?

При пресните руптури се наблюдава кръвонасядане на мястото на лезията. Впоследствие руптурираните краища на ПКВ се ретрахираат и тя се долепва до средната част на задната кръстна връзка. При по-стари лезии се наблюдава характерно задебеляване на лезията. Детайлните микроскопски изследвания представят, че синовиалната мембрана в областта има белези на хипертрофия и богато кръвоснабдена. Отделните колагенни снопове във вътрешността са дезорганизираны, с голям брой дегенерирани клетки и макрофаги между тях. Цитоплазмата на тези клетки е изпълнена с фагоцитиран материал (Василев Ив. и съавт., 2003; Василев Ив. и Василев В, 2008).

Добре известен факт е, че за разлика от МКВ, ПКВ има лоша оздравителна способност (Wijedicks и съавт., 2010; Kiarour и Murray, 2014; Andrews и съавт., 2017). В литературата съществуват няколко обяснения за това, а именно различна ултраструктурна характеристика на съединително тъканните клетки изграждащи МКВ и ПКВ (Lyon и съавт., 1991), различия в пролиферативния потенциал на фибробластите (Amiel и съавт., 1995; Yoshida и Fujii, 1999); по-висока продукция на азотен оксид от ПКВ, която

инхибира синтеза на колаген и протеогликани (Сао и съавт., 2000); подобър капацитет на МКВ да увеличи кръвоснабдяването чрез ангиогенеза и повишен приток на кръв (Вгау и съавт., 2003); характерни специфични за лигамента качества на стволовите клетки (Zhang и съавт., 2011; Furumatsu и съавт., 2012); експресията на различни типове ММП-2, -9 и -13 (Nishikawa и съавт., 2018); неспособността на клетките и кръвоносните съдове да запълнят разстоянието между разкъсаните краища на ПКВ след ретрахирането ѝ при увреда; вътреставното разположение на ПКВ (Chen, 2009). Murray и съавт. (2000) посочват, че при ПКВ върху разкъсаните краища на връзката се наблюдава повърхостен синовиален слой експресиращ α -гладко мускулен актин. Освен това голям брой клетки в ЕЛ, също експресират този белтък. Авторите смятат, че тези клетки се диференцират в миофибробласти, които биха могли да играят роля при ретрахирането на връзката, което води и до липсата на зарастване на ПКВ. Интраартикуларното разположение на ПКВ означава, че тя е изложена на действието на синовиалната течност, която инхибира фибробластите ѝ (Andrish и Holmes, 1979). Нещо повече, плазмините циркулиращи в синовиалната течност разрушават фибриновия съсирек (Vavken и Murray, 2011).

Василев Ив. и съавт. (2003) представят морфологични данни за блокиране на оздравителния процес след увреда на ПКВ. Според тях хипертрофията на синовиалното покритие на връзката, както и наличието на множество активни макрофаги в областта представят едно протрахирано асептично възпаление в ставата. Наличието на множество лизозоми в макрофагите представя една крайна фаза на разграждането на компонентите на ЕЦМ. Според тях това води до псевдоретракция на краищата на прекъснатата връзка, което прави зарастването невъзможно. Авторите посочват обаче, в противовес на литературните данни, които и те

използват като цитат в тяхната работа, че оздравителния процес на извънставните връзки, като МКВ преминава през четири фази: възпаление, епилигаментозна регенерация, регенерация, пролиферация и ремоделиране.

Понастоящем, Lee и съавт. (2020) посочват, че разкъсаната ПКВ притежава съдови стволони клетки и че CD34+ клетки, получени от нея, могат да подобрят оздравителния процес. Циркулиращи в периферната кръв на човека CD34+ клетки представляват един мощен стимулатор на неоангиогенеза при увреда на МКВ, което определя и тяхната значителна роля при оздравителния процес на тази връзка. CD34-експресиращи клетки в ПКВ също имат потенциал за многолинейна диференциация и способност да мигрират към мястото на увредата на връзката и могат да допринесат за оздравителния процес (Matsumoto и съавт., 2012). Нещо повече, Matsumoto и съавт. (2012) представят подобрена интеграция в областта на костно-сухожилия графт при куче при пластика на ПКВ, както и увеличена неоангиогенеза в присадките от тъкан, третирани с CD34+ клетки. Руптурираната ПКВ съдържа по-висок процент CD34 позитивни клетки (46%) в сравнение с тези на периферната кръв (1%) (Matsumoto и съавт., 2006; Matsumoto и съавт., 2012). Mifune и съавт. (2012) използва CD34+ ендотелни прогениторни клетки от ПКВ на човек от пациенти подложени на реконструкция на последната и ги използват да подобрят регенеративния процес на присадката към костта при модел на увреда на ПКВ у плъх. По-късно Mifune и съавт. (2013) представят, че CD34+ подобряват интеграцията на графта към костта чрез подобряване на ангиогенезата и остеогенезата. Тези автори съобщават, че разкъсаната остатъчна тъкан на ПКВ съдържа по-голямо количество CD34+ съдови стволони клетки, отколкото при здрава ПКВ в средната и част. Nakano и съавт. (2015) установят, че в остатъците от ПКВ при по-млади пациенти

има по-голямо количество имунопозитивни клетки, които показват по-висок потенциал за пролиферация и многолинейна диференциация, като този потенциал намалява с възрастта. Kirizuki и съавт. (2018) изследват възможността за оздравителния потенциал на ПКВ по морфологичен модел (прикрепване на остатъците към околните структури) и откриват значително по-голям брой CD34+ клетки в групата без прикрепване в сравнение с групата с прикрепване. Авторите откриват, че дисталната трета на остатъка от ПКВ показва по-силна тенденция към хондрогенна диференциация с по-висока експресия на CD34+ клетки. От друга страна, по-проксималната част от остатъците има по-силна тенденция към остеогенна и лигаментна диференциация. Характеристиките на остатъчната тъкан от ПКВ трябва да се имат предвид при извършване на реконструкция на ПКВ със запазване на остатъците или събиране на остатъци от ПКВ за тъканно инженерство (Lee и съавт., 2020). В заключение авторите посочват, че ако оздравителния потенциал се различава между морфологичните модели на остатъците от ПКВ, хирурзите могат да очакват по-добър оздравителен потенциал при запазване на остатъците от връзката. Поради нарастващия интерес към възможностите на регенеративната медицина, новите стратегии за лечението на руптурите на ПКВ се насочват към запазване на нейните остатъци, като по този начин се смята, че се стимулира оздравителният процес. Цели се първично възстановяване, комбинирано с различни аугменти, различни модели скоби, анкери и синтетични устройства, или чрез запазване и/или разпъване на остатъците от ПКВ, както и реконструкция с помощта на различни сухожилни графтове. Запазването на остатъците осигурява редица предимства, като подобрена проприорецепция, по-добра стабилност, по-висок Lysholm score и по-прецизно позициониране на костните тунели, възстановяване на

естествената кинематика на коляното, по-малко увеличаване на тибиялния костен тунел и по-ниска честота на остеоартрит (Wang и съавт., 2019). Не случайно създаването на различни животински модели в тази насока продължава интензивно да се развива и представя в ортопедичните списания и понастоящем (Cai и съавт., 2019; Lee и съавт., 2020; Yu и съавт., 2020; Wang и съавт., 2020; Jin и съавт., 2021; Karamchedu и съавт., 2021; Li и съавт., 2021; Ryu и съавт., 2021; Maurice и съавт., 2022).

Настоящите резултати представят, че в ЕЛ на МКВ и ПКВ, CD34 се експресира както в ендотела на кръвоносните съдове, така и в самата ЕЛ тъкан, като се отчита малко по-силна експресия на CD34 в МКВ, отколкото в ПКВ. Ако приемем мнението на Kirizuki и съавт. (2018), че най-голямо количество CD34+ клетки има в неприкрепените към околните тъкани остатъци на ПКВ, запазването им при пластиката би осигурило най-голямо количество CD34+ клетки, което би довело до по-добри клинични резултати. По отношение на настоящите резултати трябва да се посочи, че именно ЕЛ тъкан на МКВ и ПКВ е основният резервоар на CD34+ клетки.

Миофибробластите в ПКВ са намерени както при интактна връзка така и при руптурирана такава (Murray и Spector, 1999; Murray и съавт., 2000). Експресията на α -SMA показва значително повишаване на контрактилната активност на миофибробластите (Hinz и съавт., 2001). Menetrey и съавт. (2011) описват, че α -SMA+ клетки се появяват в МКВ още на третия ден след увредата и мигрират към центъра на лезията, докато относително ниски нива на експресия на α -SMA се наблюдават по време на оздравителния процес на ПКВ. Интересно е, че тази разлика в експресията на α -SMA се запазва до ден 21 след нараняването, когато оздравителния процес на МКВ е значително напреднал. Това несъответствие може поне отчасти да обясни разликата в оздравителния

процес между двата лигамента, с оглед на предишно проучване показващо, че миофибробластите допринасят за възстановяването на предишната дължина на МКВ (Faryniarz и съавт., 1996). Ниската плътност на миофибробластите в зарастващата ПКВ може да съответства на относително ограниченото количество прекурсорни клетки, налични в мястото на увредата (Kanaya и съавт., 2007). Авторите посочват, че инжектирането на мезенхимни стромални клетки в частично разкъсана ПКВ на плъх, ускорява и подобрява оздравителния процес (Kanaya и съавт., 2007).

Murray и Spector (1999) представят, че миофибробластни клетки, които съдържат α -SMA, се откриват в средна трета на интактна ПКВ. По-късно Murray и съавт. (1999) предполагат, че слой от експресиращи α -SMA клетки, а не отделни миофибробласти може да бъде отговорен за контракцията на двата края на ПКВ. Образуването на синовиален слой, включващ клетки с контрактилна актинова изоформа, върху ЕЛ тъкан може да обясни отчасти прибирането на остатъците, което оказва негативно влияние върху образуваната репаративна мостова тъкан (Murray и съавт., 2000).

Настоящите резултати показват положителна имонохистохимична реакция за α -SMA предимно в гладкомускулните клетки на tunica media на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ както на МКВ, така и на ПКВ. Трябва да се посочи, че в ЕЛ тъкан на двете връзки, α -SMA е по-силно експресиран в сравнение с VEGF и CD34. Представените резултати потвърждават резултатите на Murray и съавт. (2000) на положителна реакция за α -SMA в повърхностния слой на ЕЛ на ПКВ. Трябва да се посочи обаче, че тези автори приемат наличието на синовиален сплит в ЕЛ, който обгръща кръстните връзки по цялата им дължина и навлиза във

вътрешността им. ЕЛ на ПКВ е ясно дефиниран от Георгиев и съавт. (2018; 2022) и Георгиев (2021) като тъкан, морфологично еднаква при ПКВ и МКВ, която обхваща ставната връзка, по морфология е сходна със синовиалната тъкан и се счита за нейна специализирана форма.

На базата на становището на Nishikawa и съавт. (2018), че разликите в оздравителния потенциал на МКВ и ПКВ се дължат на различната експресия на ММП-2 и -9, би било уместно да се направи и кратък коментар относно настоящите резултати. Детайлно резултатите за имунохистохимичната реакция на тези молекули са разгледани по-горе, както и значението им за оздравителния процес на ставата връзка. Но какво представляват тези ензими и какво показват настоящите резултати?

ММП-зите, известни още като матриксини, са отговорни както за разграждането, така и за възстановяването на различни компоненти на ЕЦМ като колаген, еластин, желатин и казеин (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). Прекомерното производство и секреция на ММП-зи е отличителен белег на много патологични процеси: възпаление, метастазиране и ангиогенеза, които включват ремоделиране и разграждане на съединителната тъкан (Evrosimovska и съавт., 2011; Georgiev и съавт., 2012; Gaffney и съавт., 2015; Georgiev и съавт., 2017). ММП-зи също участват в процеса на ангиогенеза. Ендотелните клетки синтезират различни ММП-зи, които са важни за формирането на нови кръвоносни съдове, както при физиологични, така и при патологични процеси (Folgueras и съавт., 2004). ММП-зите имат важна роля при оздравителния процес, както и в процеса на ремоделиране, който изисква миграцията на различни клетки и образуването на нови кръвоносни съдове (Armstrong и Jude, 2004; Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015; Georgiev и съавт., 2017).

ММП-зите са класифицирани в групи според вида на протеолитичния субстрат, който те разграждат. Семейството на ММП-зите включва: колагенази (ММП-1,-8 и -13), желатинази (ММП-2 и -9), стромелизини (ММП-3,- 10,-11), матрилизини (ММП-7 и -26), тип-мембранни ММП-зи (ММП-14,-15,-16,-17 и ММП-23,-24,-25), енамелизини (ММП-20), металоеластази (ММП-12) и други ММП-зи (ММП-19,-21,-27,-28) (Nagase и съавт., 2006). Желатиназите включват ММП-2 и ММП-9 (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015).

Известно е, че ММП-2 (желатиназа А) и ММП-9 (желатиназа В) разграждат колаген тип I, IV, V, VII, X, XI и XIV, еластин, фибронектин и остеонектин (Aimes и съавт., 1995; Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). ММП-2 и -9 участват в ремоделирането и възстановяването на тъканите, както и в разграждането на базалните мембрани и по този начин участват в оздравителния процес на ставната връзка (Aimes и съавт., 1995). Желатиназите разграждат денатурирания колаген и интактния колаген тип IV в базалната мембрана (Aimes и съавт., 1995; Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). Zitka и съавт. (2010) съобщават, че ММП-2 се свързва с интактния колаген за да предотврати автолитичното му инактивиране. ММП-9 разграждат също и клаудин-1 и ZO-1 (Sufiawati и съавт., 2018).

Zhou и съавт. (2005) сравняват експресията на ММП-2 и -9 в МКВ и ПКВ и отчитат значително по-висока експресия в МКВ. Авторите заключават, че различните ММП-зи играят важна роля по време на възстановяването на ставните връзки след увреда и биха могли да обяснят различията в оздравителния процес на ПКВ и МКВ. Високите нива на ММП-2 нарушават баланса между отстраняването на увредените

компоненти на клетъчния матрикс и отлагането на ново синтезирани молекули (Georgiev и съавт., 2017).

Поради наличните литературни данни за значителната роля на тези МПП-зи в оздравителния процес на ставните връзки, бе изследвано разпределението им в ЕЛ и самата лигаментарна структура на МКВ и ПКВ. В заключение може да се обобщи, че експресията на ММП-2 и -9 е локализирана предимно в ЕЛ на МКВ. В ЕЛ на ПКВ тези ММП-зи се експресират, но в значително по-малка степен. Иммунохистохимичната реакция в областта на лигаментарната част на тези връзки е сравнително сходна. Тези данни потвърждават, но и доразширяват обяснението за разликите в оздравителния процес на МКВ и ПКВ по отношение на различната експресия на тези ММП-зи на Nishikawa и съавт. (2018), но и показват, че основно те се позитивират в ЕЛ на тези връзки, което е в съответствие с предложената епилигаментарна теория.

VI.2 Слабости на направените морфологични изследвания

Разбира се трябва да се посочат и слабостите на проведените проучвания, които трябва да бъдат подчертани. Обикновено възрастта на кадаврите, използвани за научни цели може да компрометира изследването поради настъпилите възрастови изменения в морфологията на структурите. По-специално, остеоартрозата на коляното може да доведе до ставна нестабилност, като по този начин да настъпят дегенеративни промени на връзковия апарат (Fishkin и съавт., 2002; Hill и съавт., 2005; Nur и съавт., 2018). В настоящето проучване са взети проби от кадаври със средна възраст 55 години, без предшестваща анамнеза за гонартроза или травма, което е с цел да се премахне влиянието на стареенето върху получените резултати. Това позволява да се заключи, че значението на артрозните

изменения върху изследваните лигаменти е минимално. Нещо повече, получените резултати кореспондират в малки вариации с тези на използваните експериментални животни.

Оценката на разликата в структурата на ЕЛ на МКВ и на ПКВ върху хистологичните препарати, оцветени рутинно с хематоксилин и еозин са дескриптивни по природа. В опит да се елиминират тези недостатъци бе извършен количествен анализ на броя на клетъчния състав на ЕЛ и лигаментарната тъкан и сравняване на получените данни за МКВ и ПКВ чрез непараметричен статистически анализ, а именно Sign test. Визуалната оценка на имунохистохимичната експресия се асоциира със значима разлика при наблюденията на отделните изследователи. За да се намали до минимум това се използва ИС Profiler ImageJ, който елиминира субективната оценка. Според Varghese и съавт. (2014) 88.6% от резултатите получени чрез тази система са еднакви с резултатите получени от експерти патолози ($P < 0.0001$, CI=95%).

VI.3 Лигаментарни увреди на коляното

Лигаментите са плътни снопове от фиброзно-компакна съединителна тъкан, която служи за свързване на две или повече кости. Те варират по размер, форма и ориентация на влакната при различните стави на човешкото тяло. В миналото те са били смятани за неактивни структури, но днес се възприемат, като сложна система, подложена на редица локални и системни въздействия (Lo и съавт., 2002a,b; Frank, 2004).

Целостта на лигамента е ключова за нормалното предаване на силите и за улесняването на ставната артикулация, най-вече в колянната и раменната стави (Hsu и съавт., 2010). Стабилността на коляното се

поддържа чрез общото действие на активни (невромускулни) и пасивни (лигаментарни) структури, ограничаващи ставното движение (Kiarour и Murray, 2014).

МКВ се характеризира като една комплексна структура дълга около 80 mm, която играе роля на основен статичен стабилизатор на колянната става при валгусно отнасяне (Liu и съавт., 2010; Kamawal и съавт., 2016; Andrews и съавт., 2017; Аçar и съавт., 2021). Тя е съставена от три компонента - повърхностен, дълбок и ligamentum popliteum obliquum (LPO) (LaPrade и съавт., 2007; Wijdicks и съавт., 2010; Аçar и съавт., 2021). Повърхностният слой на МКВ е най-голямата структура от медиалната страна на коляното и свързва медиалния фемур с медиалната тибия чрез една инсерция към фемура и две към тибията (Liu и съавт., 2010; Wijdicks и съавт., 2010). Дълбоката част на МКВ представлява удебелената медиална част на ставната капсула и е съставена от две части, мениско-фемурален и мениско-тибиален лигамент (Liu и съавт., 2010; Wijdicks и съавт., 2010; LaPrade и съавт., 2015; Аçar и съавт., 2021; LaPrade и съавт., 2022). LPO представлява фиброзно продължение на сухожилието на m. semimembranosus, което се захваща за задно-медиалната страна на ставната капсула, като я подсилва (LaPrade и съавт., 2007; Wijdicks и съавт., 2010; Аçar и съавт., 2021; LaPrade и съавт., 2022).

ПКВ започва от предната част на интеркондиларната еминенция на тибията и се простира до постеролатералната страна на интеркондиларната ямка на бедрената кост (Каданов и съавт., 1964; Василев и Василев, 2008; Овчаров и Ванков, 2012; Nguyen и съавт., 2014). Макар морфологично да се намира в ставата, ПКВ е заобиколена със синовиален слой. Тя се състои от две снопчета: антеромедиално (АМ) и постеролатерално (ПЛ) (Василев и Василев, 2008; Amis, 2012; Sonneroy-Cottet и съавт., 2014). ПКВ не позволява прекомерна вентрална трансляция и вътрешна ротация на

тибията спрямо фемура (Василев и съавт., 2003; Василев и Василев, 2008; Murray и Fleming, 2013; Kiarour и Murray, 2014; Nguyen и съавт., 2014). АМ сноп има главна роля за резистентността към вентрално изместване, докато ПЛ сноп играе роля при тибииалната ротация (Yagi и съавт. 2002; Amis, 2012; Murray и Fleming, 2013). Това анатомично разделение на снопчетата се основава на общия модел на изпъване на ПКВ при пасивно сгъване-разгъване на коляното, като АМ снопче е по-напрегнато при сгъване, а ПЛ снопче е по-напрегнато при разгъване (Girgis и съавт., 1975; Marieswaran и съавт., 2018). Наред със стабилизиращите си функции ПКВ представлява “гид на движенията” в ставата (Василев Ив. и Василев В., 2008). Василев Ив. и съавт. (2003) и Василев Ив. и Василев В. (2008) представят в детайли структурата на ПКВ. Те посочват, че основна структура на връзката са колагенните фибрили, които биват два типа - тънки (около 40 nm) и дебели (над 70 nm). Фибрилите формират паралелни снопове, които са свързани с тънки колагенни нишки. Между отделните колагенните снопове се разполагат миофибробласти. ПКВ има синовиално покритие, представено от граничен слой от клетки - синовиоцити, които са два типа - синовиални фибробласти, синтезиращи хиалуронова киселина и синовиални макрофаги - фагоцитиращи продуктите на износване от ставния хрущял (Василев Ив. и Василев В., 2008). Murray и Spector (1999) посочват, че ПКВ и ЗКВ са покрити от епилигаментарна обвивка, която се характеризира с хиперцелулитет в сравнение с лигаментарната тъкан и съдържа по-голям брой съдово-нерви структури от самите връзки. Под ЕЛ се появява типичната влакнеста архитектура на ПКВ и ЗКВ (Scheffler, 2012). Murray и Spector (1999) посочват, че синовиален сплит в ЕЛ обгръща кръстните връзки по цялата им дължина и навлиза във вътрешността им.

Травматичните увреждания на ставните връзки са сред най-честите причини за мускулно-скелетни заболявания. Тяхната увреда води до нарушаване на баланса между подвижността и стабилността на ставите. Този дисбаланс води до необичайно предаване на силата на натоварването върху ставата, което уврежда допълнително другите структури в и около ставата и би могло да доведе до артрозни изменения в последната.

В съвременната литература съществува голямо количество научна информация за структурата и функциите на ставните връзки. Проблемът при оздравяването идва от значителните физиологични и структурни промени, които ставната връзка претърпява след травма, както и от съвкупността от клетъчните процеси, които настъпват по време на самият оздравителен процес. Тези процеси предизвикват промени в биологията и биомеханиката на увредения лигамент, което води до непълното му възстановяване, като новосформираната тъкан е с по-лоши биологични качества. Неправилното оздравяване и нарушената цялост на тъканта прави ставната връзка по-лакситетна, което може да доведе до по-нататъшни увреждания на ставата. Увредите причиняват ставна нестабилност, което води до хронична болка, нарушена функция и остеоартроза на засегнатата става (Hauser и съавт., 2013).

Връзковият апарат на колянната става е сред най-често уврежданите структури. Честотата им е 2/1000 души годишно в цял свят (Miyasaka и съавт., 1991) и в много по-висок процент при хората, занимаващи се активно със спорт (Bruesch и Holzach, 1993). Деветдесет процента от травмите на коленни връзки са свързани с ПКВ и МКВ (Miyasaka и съавт., 1991; Tandogan и Kayaalp, 2017; Bayer и съавт., 2020). В САЩ лезиите на ПКВ са около 150 000 годишно, а извършваните артроскопии на колянната става по света са повече от 4 милиона (Hauser и съавт., 2013).

МКВ е лигамент на колянната става, който най-често подлежи на нараняване (Георгиев и Стоков, 2011; Wijdicks и съавт., 2010; Franchi и съавт., 2010; Amar и съавт., 2015; Andrews и съавт., 2017; Georgiev и съавт., 2017a). Повечето наранявания на тази структура са изолирани и най-често се наблюдават при млади атлети вследствие на външна ротация, валгусно отнасяне или смесен силов вектор при спортове като футбол, ски или хокей (Wijdicks и съавт., 2010). Руптурата на ПКВ е втората по честота увреда след дисторзията на глезена сред колежанските атлети, като честотата се увеличава с 1,3% годишно (Hootman и съавт., 2007). Според последните проучвания, травмите на ПКВ при жените са три пъти по-чести в сравнение с тези при мъжете (Arendt и Dick, 1995; Powell и Barber-Foss, 2000; Anderson и съавт., 2001). Същата тенденция се наблюдава и при децата, където руптурата на ПКВ представлява 36% от всички детски наранявания на коляното. Увредата на ПКВ е честа причина за колянна нестабилност, което повлиява и функцията на други структури на коляното и може да доведе до лезии на менискусите и дегенерация на ставния хрущял (Jia и съавт., 2017; Bayer и съавт., 2020).

Руптурата на ПКВ има ограничен потенциал да се излекува самостоятелно и може да доведе до хронична нестабилност на коляното и увреждане на вторичните стабилизатори (Василев и Василев, 2008). Възстановяването на ПКВ чрез шев е първия вид лечение описан в литературата през 1903 г. от Robson. Тази техника по-късно е проучена и документирана подробно при експериментални модели на куче (O'Donoghue и съавт., 1966 и 1971; Feagin, 1976; Cabaud и съавт., 1979; 1980). Впоследствие се появяват и първите съобщения за дългосрочни резултати след хирургичен шев на ПКВ. Feagin (1976) представя неуспех на процедурата при над 90% от пациентите при пет годишна проследяемост. Тези констатации са подкрепени допълнително и от

наблюденията на Sandberg и съавт. (1987), които също не откриват разлика в резултатите след първичното възстановяване спрямо консервативното лечение. Тези и много други резултати, както на лабораторни животни, така и след проведено оперативно лечение с шев на пациенти доказват невъзможността за възстановяване на тази връзка (40% до 100%) (Kaplan и съавт., 1990; Strand и съавт., 2005). Това води до отказ от първичния шев. В резултат на това, хирургичната реконструкция на ПКВ се превръща в основно лечение. Артроскопската пластична реконструкция на ПКВ е избран метод за лечението. Използва се различен алопластичен синтетичен и биологичен автопластичен материал, както и различни методи на фиксация. Като автотрансплантати могат да се използват: *lig. patellae*, сухожилията на *m. semitendinosus* или - *m. gracillis* и *m. quadriceps femoris* (Аспарухов и съавт., 1998; Аспарухов и Русев, 2000; Андреев и съавт., 2006; Аспарухов, 2006; Мазнейков, 2007; Василев и Василев, 2008; Андреев и Загорев, 2008; Стефанов и съавт., 2016; Филипов и Василев, 2016). Крайната цел на реконструкцията е да се възстанови функцията на коляното, като успехът на тази процедура зависи от редица хирургични, биомеханични и биологични фактори.

Василев Ив. и Василев В. (2008) описват промените които настъпват в графт от *lig. patellae* след реконструкцията на ПКВ. На третия месец вътреставната част се покрива с добре васкуларизирана синовиална мембрана, като е значително увеличен и броя на фибробластите. Наред с колагенни влакна над 100 nm, в сухожилието се наблюдават и тънки хаотично разположени фибрили, както и наличието на фибробласти. Авторите смятат, че екстраартикуларният сухожилен графт, претърпява промени, наподобяващи нормалната ултраструктура на ПКВ, като на тези преустройства се дължат добрите резултати след реконструкцията на ПКВ. Ако се приеме мнението на Kirizuki и съавт. (2018), че запазването на

остатъците на ПКВ при пластиката би осигурило по-голямо количество CD34+ клетки (маркер за стволови клетки, експресиран основно в ЕЛ) и би довело до по-добри клинични резултати, то също така би могло да се смята, че остатъците заедно с прилежащия ЕЛ, биха били един добър източник на фибрил-образуващи колагени, които да подпомогнат и процеса на лигаментизация след пластика на ПКВ.

VI.3.1 Оздравителен процес на МКВ

Оздравителният процес на увредените лигаменти най-често преминава през няколко припокриващи се етапа, които детайлно ще бъдат описани по долу. Процесът може да отнеме месеци и въпреки напредъка в терапевтичните възможности, увредените структури не възстановяват напълно нормалната си издръжливост на натоварване.

През годините са използвани различни стратегии в опит да се подобри лечението. Една от най-важните от тях се основава на разбирането, че ранното възобновяване на функцията стимулира възстановяването, а прекомерната имобилизация го компроментира.

МКВ ще бъде използвана като модел поради нейната еднаква площ на напречното сечение и склонност към зарастване.

Редица експериментални и клинични проучвания показват, че разкъсаната МКВ може да зарасне спонтанно (Frank и съавт., 1983; Indelicato, 1983; Jokl и съавт., 1984; Kannus, 1988). Морфологичните проучвания обаче показват, че нейната ултраструктура и биохимичен състав остават значително променени (Frank и съавт., 1983; Weiss и съавт., 1991; Niyibizi и съавт., 2000). Освен това, механичните им свойства остават значително по-ниски от тези на нормалните връзки дори след години (Ohland и съавт., 1991; Loitz-Ramage и съавт., 1997). От друга страна,

разкъсванията в средната част на ПКВ и на задната кръстна връзка не зарастват спонтанно и е необходима хирургична реконструкция с помощта на присадка (Kannus и Jarvinen, 1987; Hirshman и съавт., 1990). Докато повечето реконструкции на връзки дават добри краткосрочни клинични резултати, при 20-25% от пациентите има усложнения, включително нестабилност, която може постепенно да увреди и другите структури на коляното (Daniel и съавт., 1994; Shelbourne и съавт., 1995; Ritchie и Parker, 1996; Aglietti и съавт., 1997; Bach и съавт., 1998; Jomha и съавт., 1999; Yagi и съавт., 2002).

Лигаментите са изградени предимно от колаген тип I, който е отговорен за силата и здравината му. Въпреки това, след нараняване фибробластите синтезират предимно колаген тип III, а не колаген тип I. Анормалното кръстосано свързване на колагена и по-малките диаметри на колагеновите фибрили във възстановената лигаментарна тъкан причиняват слабост както в силата, така и в здравината на тъканите. Ремоделираните колагенови фибрили не са опаковани с такава плътност в сравнение със здравите и ремоделираната тъкан съдържа допълнителни съставки като: кръвоносни съдове, мастни клетки и възпалителни клетки, които също допринасят за слабостта на тъканта (Frank и съавт., 1999; Woo и съавт., 2006).

Поради по-лошите механичните свойства на МКВ след увреда, които изостават значително от тези на нормалните връзки дори години след травмата, както и невъзможността за регенерация на ПКВ има голям брой морфологични и клинични проучвания с цел да се разберат по-добре процесите на зарастването и ремоделирането на връзките. Целта е да се разработят нови и подобрени стратегии за лечение. Нуждата от постигането на тази цел стимулира изследователите да търсят нови и иновативни методи за лечение. Поради сложния биологичен процес новите

подходи трябва да се развиват в сътрудничество между различните дисциплини, а не индивидуалистичния подход в изследванията.

VI.3.1.1 Фази на оздравителния процес

Когато лигаментът е претоварен или подложен на тежки опъвания тъканта се уврежда, като се получават частични или пълни разкъсвания. Непрекъснатият процес на зарастване след разкъсване на МКВ може да се раздели на три припокриващи се фази от последователни клетъчни процеси: остра възпалителна фаза, пролиферативна или регенеративна фаза и фаза на ремоделиране на тъканта (Oakes, 1982; Frank и съавт., 1983; Weiss и съавт., 1991; Ng, 2002; Chamberlain и съавт., 2009; Hauser и съавт., 2013).

Острата възпалителна фаза започва минути след контузията и продължава от 48 до 72 часа. По време на тази фаза се образува хематом, тромбоцитите взаимодействат с компонентите на матрикса, което води до образуване на съсирек. В хеморагичната фаза настъпва каскада от клетъчни събития, което включва освобождаване на цитокини вътре в съсирека, последвано от появата на полимононуклеарни левкоцити и лимфоцити. Тези клетки отговарят на автокринни и паракринни сигнали за разширяване на възпалителния отговор и привличане на други видове клетки към раната. Богатият на тромбоцити фибринов съсирек отделя растежни фактори необходими за заздравяването и осигурява място, където могат да се извършват клетъчните процеси. Най-важните растежни фактори са: тромбоцитен растежен фактор, ендотелен растежен фактор, трансформиращ растежен фактор-В, фибробластен растежен фактор. Всеки от тях има специфична роля във възпалителния процес. Например – тромбоцитният растежен фактор и трансформацият растежен фактор-В

привличат клетки на имунната система в мястото на възпалението и ги стимулират към пролиферация. Ролята на ендотелния растежен фактор е изграждането на нови кръвоносни съдове за да се повиши кръвоснабдяването на наранената област. Фибробластният растежен фактор стимулира растежа и диференцирането на клетки, свързани с процесите на колагеногенезата. Стимулирани от растежните фактори, неутрофили, моноцити и други клетки на имунната система окупират мястото на наранената тъкан и унищожават загиналите клетки от възпалението, като по този начин подготвят матрикса за възстановяване (Oakes, 1982; Frank и съавт., 1983; Weiss и съавт., 1991; Ng, 2002; Chamberlain и съавт., 2009; Hauser и съавт., 2013).

Пролиферативна фаза следва през следващите няколко седмици до месеци. Тя започва тогава, когато имунните клетки започнат да отделят различни растежни фактори и цитокини. Това инициира сигнали за фибробластна пролиферация, необходима за възстановяване на матрикса на лигаментната тъкан. Първоначално формираната тъкан изглежда дезорганизирана, състояща се от кръвни клетки, мастни клетки, фибробласти и клетки на възпалението. В следващите няколко седмици фибробластните клетки започват да продуцират разнообразни типове колагени, протеогликани, гликопротеини и други протеини в матрикса. Новосинтезираните колагенни влакна обаче са абнормални - с по-малък диаметър от този на колагенните влакна в нормалната тъкан. По време на тази фаза придошлите фибробласти на мястото на нараняването започват да формират наново тъканта. Растежни фактори, включително трансформиращ растежен фактор-b (TGF-b) и изоформи на тромбоцитния растежен фактор (PDGF) участват в модулиране на процесите. В същото време повишената неоваскуларизация снабдява мястото с клетки и хранителни вещества необходими за процеса на оздравяване. Кръвният

съсирек бързо се превръща в новообразувана тъкан, съставена от агрегирани клетки заобиколени от матрикс. Въпреки това, неговият хистоморфологичен вид и биохимичен състав са различни от тези на нормалната тъкан. Трябва да се отбележи, че има хомогенно разпределение на колагеновите фибрили с по-малък диаметър, което е в рязък контраст с бимодалното разпределение на нормалния лигамент. Биохимично той съдържа повишени количества протеогликани. При репаративна фаза фибробластите пролиферират и произвеждат матрикс от протеогликан и колаген (особено колаген тип III) за свързване на разкъсаните краища. През следващите 6 седмици се появява все по-организиран матрикс (предимно колаген тип I и клетъчна пролиферация) (Oakes, 1982; Frank и съавт., 1983; Weiss и съавт., 1991; Ng, 2002; Chamberlain и съавт., 2009; Hauser и съавт., 2013).

След няколко седмици пролиферативната фаза преминава във фаза на ремоделиране, по време на която започва зреенето на колагена, обикновено продължаващо месеци до години след първоначалната травма. В тази фаза клетъчността и нивата на колаген тип III се намаляват и матрикса се прегрупира в отговор на натоваарването, приложено към тъканите. Неолигаментът съдържа увеличено количество протеогликани, по-високо съотношение на колаген тип V към колаген тип I, намален брой ковалентни връзки в зрелия колаген и фибрили с хомогенно малки диаметри (70 nm) (Shrive и съавт., 1995; Niyibizi и съавт., 2000; Plaas и съавт., 2000). Често се наблюдава увеличаване броя на колагенните фибрили на зарасналата връзка, но диаметрите на тези фибрили са по-малки от тези на нормална връзка (Frank и съавт., 1997). Диаметърът на колагеновите фибрили остава малък, а нивото на колаген тип V остава повишено години след увреждането. Доказано е, че колагенът от тип V има централна роля в регулирането на страничното агрегиране на по-малки

колагенови фибрили. По този начин повишеният колаген от тип V може да бъде свързан с по-ниските механични свойства на увреденият тъкан (Ng, 2002; Chamberlain и съавт., 2009; Hauser и съавт., 2013). С времето матриксът придобива нормален вид, но все пак остават белези на увредата (Hauser и съавт., 2013). Фазата на ремоделиране е белязана от подреждането на колагенните влакна, увеличеното съзряване на колагенния матрикс и може да продължи години наред (Frank и съавт., 1983). Така съставките на зарастващата връзка не се възстановяват в нормални граници дори след една година (Weiss и съавт., 1991). Въпреки настъпващият оздравителен процес след фазата на ремоделиране, ставната връзка е морфологично и биомеханично с по-лоши качества в сравнение с нативният лигамент. Това се отразява на степента на лакситет и води до нарушения във функциите на ставата и предразполага други меки тъкани във или около ставата също да бъдат увредени. В обобщение: някои от най-разпознаваемите разлики в матрикса на ремоделиран лигамент са качествените промени в протеогликаните и типовете колаген, недоузряване на колагена, малки диаметри на колагеновите фибрили, промени в свързванията между клетките, повече кръвоносни съдове, необичайна инервация и др. (Amiel и съавт., 1987; Frank и съавт., 1992; Frank и съавт., 1995; Plaas и съавт., 2000; Lo и съавт., 2002; Ng, 2002; Chamberlain и съавт., 2009; Hauser и съавт., 2013).

За разлика от МКВ, Murray и съавт. (2000) посочват хистологично четири фази, които се наблюдават след увреда на ПКВ при човек: 1) фаза на възпаление; 2) фаза на ЕЛ регенерация; 3) фаза на пролиферация и 4) фаза на ремоделиране.

През фазата на възпаление макроскопски се наблюдават едематозни краищата на руптурираната ПКВ, както и синовиалната и епилигаментарна обвивка. Между краищата на връзката е разположен кръвен съсирек, без

видим съединително-тъканен мост между тях. Хистологично в руптурираните краища на ПКВ се наблюдават фибробласти, полуморфонуклеарни неутрофили, лимфоцити и макрофаги. Артериолите в мястото на увредата са разширени с хиперплазия на интимата, както и значителна пролиферация на гладкомускулните клетки и задебеляване на стените. Венулите са дилатирани със значително по-малка хиперплазия на клетките. Между 3-та и 8-ма седмица след увредата, Murray и съавт. (2000) описват разрастването на нова епилигаментарна и синовиална тъкан над руптурираните краища. Хистологично епилигаментарната фаза се характеризира със същата клетъчна и съдова плътност, както фазата на възпаление, но клетъчният състав е представен предимно от фибробласти. Не се наблюдава и процес на неоваскуларизация в лигаментарните фасцикули. Най-големи промени се наблюдават в ЕЛ, при който авторите отчитат нарастване броя на фибробластите и съдовете. Васкуларизираната ЕЛ тъкан обвива руптурираните краища на връзката. Ясно се наблюдава задебеляването ѝ, както и отчетлива фибробластна пролиферация. През фазата на пролиферация към 8-та седмица след увредата макроскопски краищата на ПКВ са покрити със синовиална тъкан, но без мекотъканен мост между тях. Хистологично в периода между 8-та и 20-та седмица в остатъчните части на връзката се наблюдава нарастване на броя на клетките, най-вече за сметка на фибробластите, които са хаотично разположени. Отчита се и нарастване на броя на кръвоносните съдове. Между 8-та и 20-та седмица се наблюдава продължителен слой от синовиална тъкан над краищата на руптурираната ПКВ с изобилие от клетки експресиращи α -гладко мускулен актин. На места тези клетки са ясно разграничими от съдовите гладкомускулни клетки и перицитите в подлежащата ЕЛ тъкан, на други места обаче ЕЛ не може да се разграничи от синовията и формира синцитиум с експресия на α -гладко мускулен

актин от клетките. Между първата и втората година, Murray и съавт. (2000) наблюдават процеси на ремоделация в краищата на връзката, като макроскопски не се наблюдава мекотъканен мост между тях. Микроскопски фибробластите се разполагат по надлъжната ос на връзката. Наблюдава се намалено количество на кръвоносни съдове. ЕЛ тъкан намалява на дебелина, като синовиалния слой остава. Според Lo и съавт. (2002) ЕЛ има общ произход със синовията и е един вид специализирана синовия. Ето защо, тази съединителнотъканна обвивка на МКВ и ПКВ, която е с приблизително сходни характеристики се възприема да се нарича ЕЛ, който продължава в ендолигамента между отделните фасцикули. Murray и Spector (1999) посочват още, че кръвоснабдяването на ПКВ е основно от перилигаментарни или ЕЛ плексуси.

VI.3.1.2 Експериментални данни на оздравителния процес на МКВ

В литературата има редица експериментални модели относно оздравителния процес на МКВ и ПКВ, като се посочва и различния потенциал на възстановяване на двете връзки (Kim и съавт., 2003; Wijdicks и съавт., 2010; Kiarou и Murray, 2014; Vaishya и съавт., 2015; Andrews и съавт., 2017; Cai и съавт., 2017). С цел да се изучат по-добре възстановителните процеси на МКВ, както и за подобряване на терапевтичните алгоритми, експерименталните животински модели на заек, овца, куче, плъх и др. продължават и понастоящем.

Възстановителният процес на МКВ следва описаните по горе фази. Така той служи като добър модел за изследване на хистологичните, биохимичните и биомеханичните промени във времето. Тъй като увредата на МКВ на коляното може да зарасне спонтанно, тя е била използвана като

отличен експериментален модел в много изследвания (Weiss и съавт., 1991; Woo и съавт., 1987). Тези проучвания са помогнали да се разбере, че скоростта, качеството и съставът на зарастващите МКВ зависят от метода на лечение. Консервативното лечение на изолирана травма на МКВ дава по-добри резултати в сравнение с тези на хирургично възстановяване с или без обездвижване (Woo и съавт., 1987; Weiss и съавт., 1991; Boorman и съавт., 1998). Доказано е, че обездвижването след травма води до по-голям процент неорганизиран колагенни фибрили, понижени структурни свойства, понижени механични свойства на връзката и по-бавно възстановяване на резорбираните инсерционни места (Woo и съавт., 1987; Георгиев и съавт., 2012). Клиничните проучвания съобщават, че пациентите с пълно разкъсване на МКВ се повлияват добре от консервативното лечение без обездвижване чрез гипс (Fetto and Marshall, 1978). В резултат на това, парадигмата на клиничното лечение се измества от хирургично възстановяване с обездвижване към неоперативно лечение с ранно контролирано движение (Reider и съавт., 1994; Indelicato, 1995).

Въпреки добрите резултати, трябва да се посочи, че ремоделираните МКВ са изложени на риск от трайно удължаване, тъй като не могат да възвърнат началната си дължина. Това може да доведе до механична нестабилност на колянната става, което затруднява механиката на ставата. Когато коляното е нестабилно, плъзгането между ставните повърхности се увеличава, а ефикасността на мускулите около ставата намалява. Това причинява промени в разпределението на товара върху ставата, което води до допълнителни увреди на хрущяла (Fleming и съавт., 2005).

Редица проучвания показват, че след травматична увреда на МКВ здравината ѝ е по-слаба, в сравнение с тази на нативната структура. Консервативно лекуваните увреди на МКВ обикновено възстановяват от 40% до 80% от здравината си. Различните лигаментарни увреди (МКВ и

ПКВ) имат различна прогноза, като комбинираните травми се лекуват по-продължително от изолираните и регенериралата тъкан е с по-лоши биомеханични характеристики. При едновременна увреда на ПКВ и МКВ, при МКВ се отчитат по-ниски биомеханични свойства в сравнение с изолираните увреди на МКВ (Bray и съавт., 1992; Frank и съавт., 1992; Scheffler и съавт., 2001; Abramowitch и съавт., 2003). Структурните характеристики на зарастващия комплекс бедрена кост-МКВ-тибия (КБМТ) са по-лоши от тези на контролите на 12-тата седмица след травмата (Weiss и съавт., 1991). Въпреки това, 52 седмици след травмата устойчивостта на разтягане на увредения КБМТ се възстановява, но варус-валгус изместването на коляното остава повишено, а максималното натоварване на КБМТ остава по-ниско от това при симулирано оперирани МКВ. Механичните свойства на зарастващата средна част на МКВ винаги остават средностатистически по-ниски от тези на нормалната връзка и не се променят с времето до една година (Inoue и съавт., 1990; Weiss и съавт., 1991; Ohland и съавт., 1991; Ohno и съавт., 1995; Loitz-Ramage и съавт., 1997). Едновременно с това, площта на напречното сечение на зарастващата връзка е $2\frac{1}{2}$ пъти по-голямо от нейния нормален размер до 52-рата седмица (Ohno и съавт., 1995). По този начин възстановяването на устойчивостта на разтягане на КБМТ е до голяма степен резултат от увеличаване количеството на тъканта. По отношение на вискоеластичните свойства на зарастващата МКВ има повишено вискозно поведение, което се изразява в увеличена релаксация на натоварването или пластична деформация през първите 3 месеца след травмата. Някои проучвания обаче предполагат, че тези стойности се връщат до нормалните нива след този период от време (Woo и съавт., 1987; Chimich и съавт., 1991), докато други предполагат, че те остават повишени (Newton и съавт., 1990).

VI.3.1.3 Експериментални данни на оздравителния процес на ЕЛ на МКВ

Съгласно описаната в детайли морфология на ЕЛ в раздел резултати на настоящият труд и доказателствата за възможната роля на ЕЛ на базата на морфологичните му характеристики да участва в оздравителния процес на МКВ се предприе и направата на представения в материал и методи модел на увреда III степен при плъх.

Поради литературните данни за лошите капацитивни възможности на ПКВ при сатура, както и поради изключителната грацилност на тази структура при плъх не бе проведен експеримент с нейното първично възстановяване. За по-голяма прецизност на изследването на ЕЛ след увреда на МКВ се направи и модел на възстановяването му след шев.

Времеви периоди на експерименталния модел за изследване бяха съответно 8, 16 и 30 ден след увредата, с цел да се извърши точен морфологичен анализ на ранните промени на оздравителния процес. Тези периоди включват острата репаративна фаза (до 3-та седмица) и началото на хроничния репаративен период (след 3-та седмица) (Encinas-Ullán и Rodríguez-Merchán, 2018). Възстановяването на МКВ, както бе описано по-горе се състои от три фази. Осмият ден бе избран за представителна фаза на възпалението с образуване на изобилна гранулираща тъкан. Шестнадесетият ден представлява фазата на пролиферация с повишена синтеза на колаген от фибробластите. Тридесетият ден представлява края на ранния оздравителен процес с пролиферация и първоначално ремоделиране на лигаментата.

Резултатите от светлинно-микроскопското изследване показаха, че на 8-ия ден в областта на увредата ЕЛ на МКВ се характеризира с интензивна ангиогенеза и богата клетъчност, представена за сметка на

фибробласти и прогениторни клетки, а в междуклетъчното пространство се наблюдаваха колагенови влакна, които заедно с горепосочените клетки навлизаха в ендолигамента. При животните лекувани с шев на МКВ се наблюдаваха сходни морфологични промени, както и слой от грануляционна тъкан около шевния материал. Фибробластите по отношение на ултраструктурната си клетъчна морфология показваха биологична активност, която се потвърди и от имунохистохимичните изследвания.

На шестнадесетия ден след увредата на МКВ възстановителният процес следва добре установените норми на регенерация на съединителната тъкан, а именно намалена ангиогенеза в сравнение с предишния период. Грануляционната тъкан все по-слабо се различава на фона на увеличения брой колагенови влакна и намаляването на броя на клетките. Наблюденията корелираха с ултраструктурните и имунохистохимичните изследвания за горепосочените колагени. Не се наблюдаваха и съществени преимуществва при оперираните с шев на МКВ животни.

На тридесетия ден след травмата ЕЛ, макар и непълно е възстановил своята структура, както светлинно-микроскопски, така и на ултраструктурно ниво. Имунохистохимично се наблюдаваше и експресия на горепосочените колагени.

Имунохистохимичните реакции за колаген тип I, III и V локализирани в ЕЛ в областта на увредата, както и навлизането на тази богата на клетки тъкан в областта на увредата представлява една добра база за определяне на неговата роля по време на ранния оздравителен процес на МКВ.

Гореописаните резултати представят накратко, най-важните промени в ЕЛ, описани в детайли в частта резултати. По отношение на

лигаментарната тъкан процесите следват добре познатата морфологична картина и корелират с литературните данни. В обобщение може да се заключи, че посочените оригинални светлинномикроскопски, имунохистохимични и ултраструктурни резултати представят, че ЕЛ играе ключова роля по време на ранния оздравителен процес на МКВ, като навлиза и запълва областта на лезията. Нещо повече, той е основният донор на клетки, участващи в синтеза на най-важните колагени по време на ранния оздравителен процес.

Трябва да се отчете също, че няма значителна разлика в морфологичната компонента на комплекса ЕЛ-лигамент по време на ранният оздравителен процес с и без шев. При настоящето изследване ясно се наблюдава наличието на клетките на ЕЛ в новообразуваната гранулоционна тъкан, както и навлизането именно на ЕЛ в областта на новообразуваната неолигаментарна тъкан. Добрата корелация с експресията на колаген тип III, както и колаген тип V по време на ранния оздравителен процес, тяхното разположение предимно в клетъчната компонента ЕЛ, както при нормалната морфология на тази структура, така и при експерименталния модел подкрепя хипотезата за ключовата роля на ЕЛ по време на ранният оздравителния процес на МКВ.

А какво знаем за значението на гореспоменатите колагени и защо именно те се използват за доказването на епилигаментарната теория по отношение на оздравителния процес на МКВ?

Колагенът е най-разпространената структурна съставка на екстрацелуларния матрикс, като формира основната компонента на съединителната тъкан (Frank и съавт., 1999; Wan и съавт., 2013). Колаген тип I е основният тип колаген, който се открива в лигаментите и на който се дължи издръжливостта им на опън (Woo и съавт., 2006). Тип III и V са другите основни компоненти на лигаментите (Wan и съавт., 2013). Тяхната

синтеза се повишава след нараняване, и както се доказва въз основа на описаните в резултатите данни, те са основно експресирани в ЕЛ на връзката.

Според литературните данни, в ранните фази на възстановяване, продукцията на колаген тип III е по-висока от тази на колаген тип I и се връща до нормалните си нива след 52-рата седмица (Inoue и съавт., 1990; Ohland и съавт., 1991; Loitz-Ramage и съавт., 1997; Abramowitch и съавт., 2003; Costa и съавт., 2017). Според Yang и съавт. (1999) колаген тип III е отговорен за формирането на междуклетъчното вещество, феталния матрикс и образуването на цикатрициалната тъкан. Тези автори смятат, че способността на колаген тип III да се свързва напречно чрез дисулфидни мостове играе важна роля за по-добрата регенерация на тъканите. Amiel и съавт. (1986) посочват, че колаген тип III се експресира значително и по време на лигаментизацията на сухожилен графт. Колаген тип V е друг член на субфамилията на колагените. Той се свързва с организацията и регулацията на диаметъра на отделните фибрили (Liu и съавт., 1995; Breuls и съавт., 2009; Georgiev и съавт., 2010a, 2015a, b). Колаген тип V също повлиява клетъчната морфология, кинетиката на растежа, синтеза на протеини, миграцията на клетките, процесите на възпаление, както и регенерацията на тъканите (Liu и съавт., 1995; Breuls и съавт., 2009). Според Breuls и съавт. (2009) колаген тип V може би има важна регулаторна роля при формирането на новите колагенови влакна, както и при процесите на формирането и ремоделирането на екстрацелуларния матрикс. В допълнение, Andresen и съавт. (2000) смятат, че повишените нива на този тип колаген може да променят целостта на екстрацелуларния матрикс, чрез промяна на подреждането на колагеновите влакна. По-горе представените данни обясняват защо именно тези колагени са използвани при създаването на епилигаментарната теория.

В обобщение, за да се премахне субективността при оценката на ролята на ЕЛ по време на оздравителния процес се проведе и сравнителен статистически анализ на броя клетки в двата експериментални модела. Резултатите от анализа показваха, че няма статистически значима разлика между неоперативното и оперативното лечение на МКВ въз основа на сравнението на броя клетки. Приемайки, че ЕЛ играе основна роля за оздравителния процес на МКВ, броят и функцията на основните му клетки (фибробласти), не се променя от намаленото разстояние между двата края на разкъсания лигамент, което се осигурява от шевния материал. Извършената оценка на описания в детайли в раздел материал и методи модел представя за първи път ясно ролята на ЕЛ при оздравителния процес, което подкрепя добре познатите от литературата данни, че хирургичното лечение на увредената МКВ няма предимства, тъй като лечебните процеси, протичащи на клетъчно ниво следват идентичен модел и при двата типа на лечение.

VI.4 Слабости на направените морфологични изследвания

Ограниченията на представения експериментален модел съществуват и трябва да бъдат посочени.

1) Всички наранявания са извършени чрез скалпел, който не е идеална симулация на често срещаните клинични наранявания (Provenzano и съавт., 2001; Chamberlain и съавт., 2009).

2) Изследва се само лезия в областта на средна трета на ЕЛ на МКВ, но не и в областта на инсерциите ѝ. Има проучвания които показват, че мястото на увреда оказва влияние върху заздравяването на ставните връзки (Frank и съавт., 1995).

3) Разстоянието между двата края на увредата е не повече от 1,5 мм.

4) Статистическият анализ се основава на непараметрични тестове, които обикновено имат по-ниска доказателствена стойност. За да се придаде по-голяма статистическа достоверност се използваха два различни типа тестове, Kruskal-Wallis H test H и Mood's median test.

В заключение, резултатите от настоящата работа представят нови данни, свързани с една доскоро пренебрегвана структура като ЕЛ. Детайлните морфологични изследвания показаха, че тя е с по-богата клетъчност, инервация и кръвоснабдяване в сравнение със ставната връзка. ЕЛ навлиза и продължава като ендологамент, обвивайки отделните групи от колагенни снопове на лигамента. Нещо повече, клетките на ЕЛ са активни и синтезират изключително важни молекули по отношение на ранният оздравителен процес. На базата на експерименталния модел ясно се вижда, как ЕЛ с неговата богата клетъчност навлиза в областта на увредата и секретират от него молекули се експресират в нея. На основата на тези изследвания се доказва основната роля на ЕЛ по време на ранният оздравителния процес на МКВ и създаването на т. нар епилигаментарна теория.

Литературните данни за неуспех на зарастването на ПКВ и изключителната ѝ актуалност в ортопедичните среди насочи по-нататъшните изследвания към нея. Поради значителните разлики в ЕЛ на двете връзки, а именно значително по-малкия клетъчен състав и по-малката секреция на важни молекули при ПКВ, се стигна до създаването на ново обяснение за компрометирания оздравителен процес на ПКВ и за разширяването на епилигаментарната теория.

VII. Изводи

На базата на направената литературна справка и представените детайлни светлинно-микроскопски, имунохистохимични и електронно-микроскопски изследвания върху МКВ и ПКВ, както и анализа на получените резултати, могат да се направят следните изводи в отговор на поставените задачи:

1. Ставните връзки са хипоцелуларни и хиповаскуларни структури изградени от плътно организирани снопове от колагенови влакна, ориентирани успоредно, като по този начин те осигуряват стабилност на ставите в опорно-двигателната система. На базата на морфологията на ставната връзка се основават експериментални модели, използвани за изучаване на оздравителния процес, както и за начините той да бъде подобрен.

2. ЕЛ на МКВ и ПКВ е съединително-тъканен слой, който обгражда ставната връзка и показва съществени разлики от лигаментарната тъкан: при ЕЛ колагенните влакна са разположени в снопове с различна ориентация или по единично хаотично разположени, което се отличава от характерната им подредба при лигамента; ЕЛ се характеризира с хиперцелуларитет в сравнение с лигамента; съдово-нервните структури на МКВ и ПКВ са локализирани предимно в ЕЛ. В литературата съществуват твърде оскъдни данни за ЕЛ на МКВ и ПКВ и неговата роля, както за функцията на нативната връзка, така и по време на оздравителния процес.

3. Разпределението на клетъчния състав и съдово-нервните снопове в ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек са сходни; ето защо

експерименталният модел на плъх е един добър модел за изследване на промените, които настъпват в ЕЛ по време на ранният оздравителен процес на МКВ.

4. Връзковият апарат на колянната става е сред най-често уврежданите структури, най-вече при хората занимаващи се активно със спортна дейност. Деветдесет процента от увредите след травма на колянната става засягат ПКВ и МКВ. Поради голямата честота и социално-икономическо значение на тези увреди, както и с оглед на подобряване на клиничните резултати, те са обект на редица експериментални модели.

5. В съвременната литература съществува значително количество научна информация за структурата, функцията и оздравителните процеси на ставните връзки на колянната става. Редица експериментални и клинични проучвания показват, че след увреда МКВ може да зарастне спонтанно. Морфологичните проучвания, обаче показват, че нейната ултраструктура и биохимичен състав остават значително променени. Освен това, механичните ѝ свойства остават по-ниски от тези на нормалните връзки дори след години. Основният проблем при оздравителния процес се дължи на значителните физиологични и структурни промени, които ставната връзка претърпява след травма, както и на съвкупността от клетъчните процеси, които настъпват по време на самият оздравителен процес. Тези процеси предизвикват промени в биологията и биомеханиката на увредения лигамент, което води до непълното му оздравяване, като новосформираната тъкан е с по-лоши биологични качества. Неправилното оздравяване и нарушената цялост на тъканта прави ставната връзка по-лакситетна, което може да доведе до по-нататъшни увреждания на ставата. Поради това се извършват голям брой морфологични и клинични проучвания с цел да се изяснят, както по-добре процесите на зарастването и ремоделирането на връзките, така и да се

разработят нови и подобрени стратегии за лечение. Поради сложния биологичен процес новите подходи трябва да се развиват в сътрудничеството между различни дисциплини, а не с индивидуалистичен подход в изследванията.

6. Непрекъснатият процес на зарастване след увреда на МКВ може се раздели на три припокриващи се фази от последователни клетъчни процеси: остра възпалителна фаза, пролиферативна или регенеративна фаза и фаза на ремоделиране на тъканта. За разлика от него при ПКВ се посочват хистологично четири фази: фаза на възпаление, фаза на ЕЛ регенерация, фаза на пролиферация и фаза на ремоделиране.

7. За разлика от МКВ, руптурата на ПКВ има ограничен потенциал за възстановяване и може да доведе до хронична нестабилност на коляното и увреждане на вторичните стабилизатори. Ето защо е необходима хирургична реконструкция с помощта на присадка. Всички теории относно ограниченият оздравителен потенциал на ПКВ са изцяло морфологични.

8. Съществуват статистически значими разлики в клетъчния състав на ЕЛ на МКВ и ПКВ. Разпределението на фибрил-образуващите колагени, MMP-2 и -9, CD34+, α -SMA и VEGF които имат ключова роля, както по отношение на нормалната функция на ставните връзки, така и по време на ранния оздравителен процес, е локализирано основно в ЕЛ на МКВ и ПКВ.

9. На базата на експериментален модел на увреда на МКВ у плъх е установено, че ЕЛ има ключова роля по време на ранния оздравителен процес; не се откриват статистически значими разлики в броя на клетки на ЕЛ при оценка на зарастването на МКВ без или след наложен хирургичен шев.

10. Наличните данни в литературата и представените в настоящият труд резултати за морфологията на ЕЛ са една добра основа за създаване на нова теория за оздравителния процес на МКВ, която да обясни и невъзможността на първичен оздравителен процес на ПКВ.

VIII. Приноси

1. За първи път определяне на морфологията, разпределението на клетъчния състав и съдово-нервните снопове в ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек, както и неговото значение за ортопедичната практика.

2. За първи път се представя сравнението на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек с лигаментарната им част, като се посочва ключовата роля на тази съединително-тъканна структура в комплекса ЕЛ-лигамент.

3. За първи път установяване на статистически значими разлики в клетъчния състав на ЕЛ на МКВ и ПКВ при проведените изследвания върху плъх и човек, както и тяхното клинично значение за нормалната функция и оздравителния процес на тези връзки.

4. За първи път установяване в ЕЛ на МКВ и ПКВ на фибрил-образуващите колагени у плъх и човек, както и определяне на разликите в експресията им с помощта на ImageJ 1.52a анализ, чрез който се елиминира субективната оценка при наблюденията на отделните изследователи. Представяне на ключовата роля на тези колагени по време на оздравителния процес на ставната връзка.

5. За първи път установяване в ЕЛ на двете връзки, експресията на MMP-2 и -9, CD34, α -SMA и VEGF у човек, както и определяне на разликите в нея с помощта на ImageJ 1.52a анализ. Въз основа на разликите в експресията на MMP-2 и -9 в ЕЛ се дава обяснение за различния оздравителен потенциал на МКВ и ПКВ. На базата на експресията на CD34+ в ЕЛ се посочва неговата роля като основен резервоар на стволови/прогениторни клетки по време на оздравителния процес. Запазването на остатъците след руптура на ПКВ заедно с прилежащия ЕЛ, би осигурило по-голямо количество CD34+ клетки и по-добри клинични

резултати при пластика на връзката. Експресията на α -SMA в ЕЛ, обяснява отчасти ретрахирането на остатъците на ПКВ, което оказва негативно влияние за образуването на репаративна мостова тъкан. Наличието на VEGF в ЕЛ на МКВ и ПКВ показва, че именно ЕЛ е основният резервоар на този растежен фактор, който играе важна роля както за нормалната функция на ставната връзка, така и по време на оздравителния процес на МКВ и процеса на инкорпориране графта след реконструкция на ПКВ.

6. За първи път определяне на основната роля на ЕЛ по време на ранния оздравителен процес на МКВ при експериментален модел на плъх. Сравняване на промените, които настъпват в комплекса ЕЛ-лигамент на светлинно-микроскопско и ултраструктурно ниво, с и без шев на МКВ, както и статистически анализ на резултатите при двата експериментални модела.

7. Представено е за първи път разпределението на фибрил-образуващите колагени в комплекса ЕЛ-лигамент при експериментален модел на увреда на МКВ при плъх и е оценена експресията им с помощта на ImageJ 1.52a анализ. Експресията им основно в ЕЛ, води до заключението, че именно той е основния донор на клетки, синтезиращи тези колагени по време на ранният оздравителен процес на МКВ. Запазването на остатъците след руптура на ПКВ заедно с прилежащия ЕЛ, би осигурило по-голямо количество фибрил-образуващи колагени по време на лигаментизацията на графта след реконструкция на ПКВ.

8. На базата на наблюденията в настоящия труд и използваните за тази цел светлинно-микроскопски, ултраструктурни и имунохистохимични техники, както и проведеният статистически анализ се предлага нова **«епилигаментарна теория»** относно оздравителния процес на МКВ, както и невъзможността за такъв при ПКВ.

IX. Библиография

- Андреев А, Ангелелов Б, Иванов В, Цачев Н, Тренчева Н, Шарова Е. Осем случая на реконструкция на предна кръстна връзка с алографт продукти. *God. EATA*. 2006;94-96.
- Андреев А, Загорев М. Проблеми на Trans-fix фиксацията по време на реконструкцията на предната кръстна връзка. *Ортоп травматол*. 2008; 45(3):135-138.
- Аспарухов А, Русев Р. Исторически преглед на оперативните методи за реконструкция на предната кръстосана връзка на коляното. *Ортоп травматол*. 2000; 36(3):520-530.
- Аспарухов А, Хайвазов И, Евтимов К. Артроскопска реконструкция на предна кръстосана връзка с присадък от пателарното сухожилие. Оперативна техника и резултати - една до три години след реконструкцията. *Ортоп травматол*. 1998; 34(1):19-24.
- Аспарухов А. Реконструкция на предната кръстосана връзка на коляното с автоприсадък от пателарния лигамент и RigidFix. *Мед спорт*. 2006; 2:6-11.
- Василев И, Василев В. Клинико-анатомични изследвания върху предната кръстна връзка на коляното след руптура и пластика. *Мед спорт*. 2008; 2:4-8.
- Василев Ив, Василев В, Андреев Д, Кюнел В. Електронно микроскопски изследвания върху предната кръстна връзка. *Ортоп Травматол*. 2003; 3:107-111.
- Георгиев ГП, Видинов НК, Цанков И. Експериментални проучвания върху оздравителния процес при пресни връзкови увреди на глезенната става при зайци. *Здраве и Наука*. 2012;1:27-29.
- Георгиев ГП, Стоков Л. Пресни увреди на медиалната странична връзка и свързаните с нея структури по медиалната страна на колянната става: съвременни концепции. *Ортоп Травматол*. 2011; 48(1):7-12.
- Каданов Д, Балан М, Станишев Д. *Анатомия на човека*. Том 1. София, Медицина и Физкултура, 1964, 1-735.
- Калниев М, Кръстев Д. Дегенеративни изменения в менискусите на колянната става при увреда на страничните връзки на коляното. *Здраве и Наука*. 2011; 1(3):17-20.
- Калниев М. Начални изменения в менискусите на коляното настъпващи при руптура на кръстосаните връзки на колянната става - експериментално проучване. *Ортоп травматол*. 2011; 48(2):75-82.

- Мазнейков Хр. Анатомична реконструкция на предна кръстна връзка. Мед спорт. 2007; 2:18-20.
- Овчаров В, Такева Ц. Цитология, обща хистология и обща ембриология. Медицинско издателство Арсо, 2012.
- Овчаров Вл, Ванков В. Анатомия на човека. 12 издание. София, Медицинско издателство Арсо, 2012; 1-936.
- Стефанов В, Георгиев Ав, Цачев Н. Ревизионна хирургия на предната кръстна връзка. Мед спорт. 2016; 3-4:6-10.
- Филипов Н, Василев И. Реконструкция на предна кръстна връзка с автотрансплантат от сухожилието на м. квадрицепс феморис. Мед спорт. 2016; 3-4: 4-5.
- AbiEzzi SS, Foulk RA, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D. Decrease in fibronectin occurs with the increased expression of its integrin receptor $\alpha 5\beta 1$ in stress-deprived ligaments. Iowa Orthop J. 1997; 17:102-109.
- Abramowitch SD, Papageorgiou CD, Debski RE, Clineff TD, Woo SL. A biomechanical and histological evaluation of the structure and function of the healing medial collateral ligament in a goat model. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2003; 11(3): 155-62.
- Açar Hİ, Güngör Y, Bozkurt M. Functional Anatomy of Knee. In: Bozkurt M., Açar H.İ. (eds) Clinical Anatomy of the Knee. 2021. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57578-6_1
- Ackermann PW, Li J, Finn A, Ahmed M, Kreicbergs A. Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat. J Orthop Res. 2001; 19(3):372-8.
- Amar E, Snir N, Sher O, et al. Platelet-rich plasma did not improve early healing of medial collateral ligament in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 2015;135(11):1571-1577.
- Amiel D, Akeson WH, Harwood FL, Frank CB. Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization. Clin Orthop Relat Res. 1983; 172:265-70.
- Amiel D, Frank CB, Harwood FL, Akeson WH, Kleiner JB. Collagen alteration in medial collateral ligament healing in a rabbit model. Connect Tissue Res. 1987; 16: 357-66.
- Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. J Orthop Res. 1986;4:162-172.

- Amiel D, Nagineni CN, Choi SH, Lee J. Intrinsic properties of ACL and MCL cells and their responses to growth factors. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27:844-851.
- Amis AA. The functions of the fibre bundles of the anterior cruciate ligament in anterior drawer, rotational laxity and the pivot shift. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20:613-620.
- Andresen JL, Ledet T, Hager H, Josephsen K, Ehlers N. The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2000; 71:33-43.
- Andrews K, Lu A, Mckean L, Ebraheim N. Review: Medial collateral ligament injuries. *J Orthop.* 2017; 14:550-554.
- Andrish J, Holmes R. Effects of synovial fluid on fibroblasts in tissue culture. *Clin Orthop Relat Res.* 1979; 138:279-283.
- Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2002; 92:12-18.
- Arnoczky SP, Matyas JR, Buckwalter JA, Amiel D. Anatomy of the anterior cruciate ligament. In the anterior cruciate ligament: current and future concepts (ed. Jackson DW). New York: Raven Press. 1993, pp. 5-22.
- Asou Y, Nifuji A, Tsuji K, Shinomiya K, Olson EN, Koopman P, Noda M. Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J Orthop Res.* 2002; 20(4):827-33.
- Badylak SF, S. Arnoczky, P. Plouhar et al., "Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair," *Clin Orthop Rel Res.* 1999; 367:333-343.
- Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A. Changes in the nature of the collagen during development and resorption of granulation tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1973; 328(2):383-90.
- Bastow ER, Lamb KJ, Lewthwaite JC, Osborne AC, Kavanagh E, Wheeler-Jones CP, Pitsillides AA. Selective activation of the MEK-ERK pathway is regulated by mechanical stimuli in forming joints and promotes pericellular matrix formation. *J Biol Chem.* 2005; 280(12):11749-58.
- Bayer S, Meredith SJ, Wilson K, et al. Knee Morphological Risk Factors for Anterior Cruciate Ligament Injury: A Systematic Review. *J Bone Joint Surg Am.* 2020;102(8):703-718.
- Benjamin M, Ralphs JR. Tendons and ligaments-an overview. *Histol Histopathol.* 1997; 12(4):1135-44.

- Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* 2006; 208:471-90.
- Binkley JM, Peat M. The effects of immobilization on the ultrastructure and mechanical properties of the medial collateral ligament of rats. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 203:301-8.
- Bland YS, Ashhurst DE. Changes in the distribution of fibrillar collagens in the collateral and cruciate ligaments of the rabbit knee joint during fetal and postnatal development. *Histochem J.* 1996; 28(5):325-34.
- Blázquez-Prieto J, López-Alonso I, Amado-Rodríguez L, et al. Impaired lung repair during neutropenia can be reverted by matrix metalloproteinase-9. *Thorax.* 2018;73(4):321-330.
- Boyer MI, Watson JT, Lou J, Manske PR, Gelberman RH, Cai SR. Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. *J Orthop Res.* 2001;19(5):869-872.
- Bradshaw A, Sage E. Regulation of cell behaviour by matricellular proteins. In: Principles of tissue engineering. Lanza R, Langer R, Vacanti J (eds). San Diego: Academic Press. 2000, pp. 119-127.
- Bray DF, Bray RC, Frank CB. Ultrastructural immunolocalization of type-VI collagen and chondroitin sulphate in ligament. *J Orthop Res.* 1993; 11(5):677-85.
- Bray RC, Butterwick DJ, Doschak MR, Tyberg JVa. Coloured microsphere assessment of blood flow to knee ligaments in adult rabbits: effects of injury. *J Orthop Res.* 1996; 14(4):618-25.
- Bray RC, Doschak MR, Gross TS, Zernicke RF. Physiological and mechanical adaptations of rabbit medial collateral ligament after anterior cruciate ligament transection. *J Orthop Res.* 1997; 15(6):830-6.
- Bray RC, Fisher AW, Frank CB. Fine vascular anatomy of adult rabbit knee ligaments. *J Anat.* 1990; 172:69-79.
- Bray RC, Fisher AW, Frank CB. Fine vascular anatomy of adult rabbit knee ligaments. *J Anat.* 1990; 172:69-79.

- Bray RC, Leonard CA, Salo PT. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res.* 2003; 21:1118-1123.
- Bray RC, Rangayyan RM, Frank CB. Normal and healing ligament vascularity: a quantitative histological assessment in the adult rabbit medial collateral ligament. *J Anat.* 1996; 188 (Pt 1):87-95.
- Bray RC, Salo PT, Lo IK, Ackermann P, Rattner JB, Hart DA. Normal ligament, physiology and function. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2005 13(3):127-35.
- Bray RC, Shrive NG, Frank CB, Chimich DD. The early effects of joint immobilization on medial collateral ligament healing in an ACL-deficient knee: a gross anatomic and biomechanical investigation in the adult rabbit model. *J Orthop Res.* 1992; 10(2):157-66.
- Bray RC. Blood supply of ligaments: a brief overview. *Orthop Int.* 1995 3(1):39-48.
- Breuls RG, Klumpers DD, Everts V, Smit TH. Collagen type V modulates fibroblast behavior dependent on substrate stiffness. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380:425-429.
- Cabaud HE, Feagin JA, Rodkey WG. Acute anterior cruciate ligament injury and augmented repair: experimental studies. *Am J Sports Med.* 1980; 8:395-401.
- Cabaud HE, Rodkey WG, Feagin JA. Experimental studies of acute anterior cruciate ligament injury and repair. *Am J Sports Med.* 1979;7:18-22.
- Cai J, Wan F, Ai C, Jin W, Sheng D, Liu X, et al. The effect of remnant preservation on tibial tunnel enlargement in anterior cruciate ligament reconstruction with polyethylene terephthalate artificial ligament in a large animal model. *J Knee Surg.* 2019;32(11):1094-101.
- Cai L, An S, Liao J, et al. Influences of Tumor Necrosis Factor- α on Lysyl Oxidases and Matrix Metalloproteinases of Injured Anterior Cruciate Ligament and Medial Collateral Ligament Fibroblasts. *J Knee Surg.* 2017;30(1):78-87.
- Cao M, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Fu FH, Evans CH. Does nitric oxide help explain the differential healing capacity of the anterior cruciate, posterior cruciate, and medial collateral ligaments? *Am J Sports Med.* 2000; 28(2):176-82.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(9):1418-1428.

- Chamberlain C.S., Vanderby R. (2016) Chapter B3 Ligament and Tendon. In: Murphy W., Black J., Hastings G. (eds) Handbook of Biomaterial Properties. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3305-1_6
- Chamberlain CS, Crowley E, Vanderby R. The spatio-temporal dynamics of ligament healing. *Wound Repair Regen.* 2009; 17(2):206-15.
- Chamberlain CS, Crowley EM, Kobayashi H, Eliceiri KW, Vanderby R. Quantification of collagen organization and extracellular matrix factors within the healing ligament. 2011; *Microsc Microanal.* 2011; 17(5):779-87.
- Chen CH. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*, 2009;1(1):21.
- Chi SS, Rattner JB, Sciore P, Boorman R, Lo IK. Gap junctions of the medial collateral ligament: structure, distribution, associations and function. *J Anat.* 2005; 207(2):145-54.
- Chimich D, Frank C, Shrive N, Dougall H, Bray R. The effects of initial end contact on medial collateral ligament healing: a morphological and biomechanical study in a rabbit model. *J Orthop Res*, 1991; 9(1):37-47.
- Chimutengwende-Gordon M, Khan WS. (2013) Stem Cells in Ligament Tissue Engineering. In: Danquah M., Mahato R. (eds) Emerging Trends in Cell and Gene Therapy. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-417-3_22
- Chowdhury P, Matyas JR, Frank CB. The "epiligament" of the rabbit medial collateral ligament: a quantitative morphological study. *Connect Tissue Res.* 1991;27(1):33-50.
- Chu D, LeBlanc R, D'Ambrosia P, D'Ambrosia R, Baratta RV, Solomonow M. Neuromuscular disorder in response to anterior cruciate ligament creep. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2003; 18(3):222-30.
- Cohen IK, Diegelman RF, Linblad WJ. Wound healing: Biochemical and clinical aspects. Philadelphia: Sanders. 1992, pp 341-357.
- Cool SM, Snyman CP, Nurcombe V, Forwood M. Temporal expression of fibroblast growth factor receptors during primary ligament repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2004; 12(5):490-6.
- Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999; 134(2):200-205.

- Costa, Eduardo Louzada da, Teixeira, Luiz Eduardo Moreira, Pádua, Bruno Jannotti, Araújo, Ivana Duval de, Vasconcellos, Leonardo de Souza, & Dias, Luide Scalioni Borges. Biomechanical study of the effect of platelet rich plasma on the treatment of medial collateral ligament lesion in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2017; 32(10), 827-835.
- Creighton RA, Spang JT, Dahners LE. Basic Science of Ligament Healing: Medial Collateral Ligament Healing With and Without Treatment. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2005; 13(3):145-150.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(3):301-313.
- Delgado-Baeza E, Utrilla-Mainz V, Contreras-Porta J, Santos-Alvarez I, Martos-Rodríguez A. Mechanoreceptors in collateral knee ligaments: an animal experiment. *Int Orthop*. 1999; 23(3):168-71.
- Dhafer YY, Tsoumanis AD, Houle TT, Rymer WZ. Neuromuscular reflexes contribute to knee stiffness during valgus loading. *J Neurophysiol*. 2005; 93(5):2698-709.
- Doroski DM, Brink KS, Temenoff JS. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials*. 2007; 28(2):187-202.
- Dunn GA. Mechanism of fibroblast locomotion. In: *Cell adhesion and motility*. Curtis ASG, Pitts JD (eds). London: Cambridge University Press. 1980, pp. 409-424.
- Dwyer KW, Provenzano PP, Muir P, Valhmu WB, Vanderby R Jr. Blockade of the sympathetic nervous system degrades ligament in a rat MCL model. *J Appl Physiol*. 2004; 96(2):711-8.
- Eng K, Rangayyan RM, Bray RC, Frank CB, Anscomb L, Veale P. Quantitative analysis of the fine vascular anatomy of articular ligaments. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1992; 39(3):296-306.
- Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res*. 2002; 20(6):1352-7.
- Evrosimovska B, Velickovski B, Dimova C, Veleska-Stefkovska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *J Cell Anim Biol*. 2011, 5:113-120.
- Faryniarz DA, Chaponnier C, Gabbiani G, Yannas IV, Spector M. Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction. *J Orthop Res*. 1996; 14(2):228-237.

- Feagin JA Jr, Curl WW. Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. *Am J Sports Med* 1976;4:95–100.
- Ferber R, Osternig LR, Woollacott MH, Wasielewski NJ, Lee JH. Gait perturbation response in chronic anterior cruciate ligament deficiency and repair. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2003; 18(2):132-41.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997; 18(1):4-25.
- Fetto JF, Marshall JL. Medial collateral ligament injuries of the knee: a rationale for treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 1978; 132:206-18.
- Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol*. 1995; 171(2):399-414.
- Fleming BC, Hulstyn MJ, Oksendahl HL, Fadale PD. Ligament injury, reconstruction, and osteoarthritis. *Curr Opin Orthop* 2005; 16 (5): 354-62.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004;48:411-424.
- Forrester KR, Tulip J, Leonard C, Stewart C, Bray RC. A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004; 51(11):2074-84.
- Franchi M, Quaranta M, Macciocca M, et al. Collagen fibre arrangement and functional crimping pattern of the medial collateral ligament in the rat knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(12):1671-1678.
- Frank C, Amiel D, Akeson WHa. Healing of the medial collateral ligament of the knee. A morphological and biochemical assessment in rabbits. *Acta Orthop Scand*.1983; 54(6):917-23.
- Frank C, McDonald D, Bray D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D, Shrive N. Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connect Tissue Res*. 1992; 27(4):251-63.
- Frank C, McDonald D, Shrive N. Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connect Tissue Res*. 1997; 36(3):261-9.

- Frank C, McDonald D, Wilson J, Eyre D, Shrive N. Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res.* 1995; 13:157-65.
- Frank C, Schachar N, Dittrich Dc. Natural history of healing in the repaired medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 1983; 1(2):179-88.
- Frank C, Shrive N, Bray R. Ligament healing: a review of some current clinical and experimental concepts. *Iowa Orthop J.* 1992; 12: 21-8.
- Frank C, Shrive N, Hiraoka H, Nakamura N, Kaneda Y, Hart D. Optimization of the biology of soft tissue repair. *J Sci Med Sport.* 1999; 2(3): 190-210.
- Frank C, Shrive N, Hiraoka H, Nakamura N, Kaneda Y, Hart Db. Optimisation of the biology of soft tissue repair. *J Sci Med Sport.* 1999; 2(3):190-210.
- Frank C, Woo SL, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson Wb. Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med.* 1983; 11(6):379-89.
- Frank CB, Bray RC, Hart DA, Shrive NG, Loitz NG, Matyas JR, Wilson JE. Soft tissue healing. In: *Knee Surgery.* Harner CD, Vince KG (eds). Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, pp. 189-230.
- Frank CB, Hart DA, Shrive NGa. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments-a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7(1):130-40.
- Frank CB, Loitz BJ, Shrive NG. Injury location affects ligament healing. morphologic and mechanical study of the healing rabbit medial collateral ligament. *Acta Orthop Scand.* 1995; 66(5):455-62.
- Frank CB. Ligament structure, physiology and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004; 4(2): 199-201.
- Furumatsu T, Hachioji M, Saiga K, Takata N, Yokoyama Y, Ozaki T. Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391:1142-1147.
- Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44-46:191-199.

- Georgiev GP, Telang M, Landzhov B, Olewnik Ł, Slavchev SA, LaPrade RF, Ruzik K, Tubbs RS. The novel epiligament theory: differences in healing failure between the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Exp Orthop*. 2022;9(1):10.
- Georgiev GP, Iliev A, Kotov G, Kinov P, Slavchev S, Landzhov B. Light and electron microscopic study of the medial collateral ligament epiligament tissue in human knees. *World J Orthop* 2017; 8(5):372-378.
- Georgiev GP, Iliev A, Kotov G, Nedialkova VK, Kirkov V, Landzhov V. Epiligament tissue of the medial collateral ligament in rat knee joint: Ultrastructural Study. *Cureus*. 2019 11(1): e3812.
- Georgiev GP, Iliev A, Landzhov B, Dimitrova IN, Kotov G, Malinova L, Ovtsharoff W. Localization of matrix metalloproteinase-2 in injured medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 2017;70(2):273-278.
- Georgiev GP, Kinov P, Rashev P, Sapundzhiev E, Vidinov NK. Changes in the distribution of fibrillar collagens during early healing of the lateral collateral ligament epiligament tissue in rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 2010;63(5):761-766.
- Georgiev GP, Kotov G, Iliev A, Kinov P, Angelova J, Landzhov B. Comparison between operative and non-operative treatment of the medial collateral ligament: histological and ultrastructural findings during early healing in the epiligament tissue in a rat knee model. *Cells Tissues Organs*, 2018;206(3):165-182.
- Georgiev GP, Kotov G, Iliev A, Slavchev S, Landzhov B, Ovtsharoff W. A comparative study of the epiligament of the medial collateral and the anterior cruciate ligament in the human knee. Immunohistochemical analysis of collagen type I and V and procollagen type III. *Ann Anat* 2019;224:88-96.
- Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Malinova L, Ovtsharoff W. Expression of fibronectin during early healing of the medial collateral ligament epiligament in rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 2016; 69(5): 639-644.
- Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Slavchev S, Malinova L, Kartelov Y, Ankova D, Ovtsharoff W. Light microscopic and immunohistochemical study of the medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 2015;68(1): 95-100.

- Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Slavchev S, Malinova L, Ovtscharoff W. Immunohistochemical study during early healing of the medial collateral ligament epiligament in rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 2015;68(5):655-660.
- Georgiev GP, Landzhov B, Kotov G, Slavchev SA, Iliev. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in the epiligament of the medial collateral and anterior cruciate ligament in human knees: A comparative study. *Cureus*. 2018 10(11): e3550.
- Georgiev GP, Landzhov B, Slavchev S, Rashev P, Stokov L, Ovtscharoff W. Localization of matrix metalloproteinase-2 in giant cell tumor of bone. *Compt Rend Acad Bulg Sci*. 2012;65(9):1285-1288.
- Georgiev GP, Vidinov NK, Kinov PS. Histological and ultrastructural evaluation of the early healing of the lateral collateral ligament epiligament tissue in a rat knee model. *BMC Musculoskelet. Disord*. 2010; 11:117.
- Georgiev GP, Vidinov NK. Electron and light microscopic study of the epiligament of the lateral collateral ligament in a rat knee joint during early postnatal development. *J Biomed Clin Res*, 2009a; 2:166-168.
- Georgiev GP, Vidinov NK. Electron and light microscopic study of the epiligament of the lateral collateral ligament in a rat knee joint during early postnatal development. *J Biomed Clin Res*. 2009;2(1):166-168.
- Georgiev GP, Vidinov NK. Epiligament changes after injury of the knee lateral collateral ligament in rat. *J Biomed Clin Res*. 2009b; 2:96-98.
- Georgiev GP, Vidinov NK. Investigation of the epiligament morphology of the lateral collateral ligament during postnatal development in a rat knee model. *Compt Rend Acad Bulg Sci*. 2009c; 62:1473-1478.
- Georgiev GP. Epiligament or paratenon is more appropriate for describing the enveloping tissue of the cruciate ligaments of the human knee? *Folia Morphol (Warsz)*. 2021. doi: 10.5603/FM.a2021.0021.
- Gomez MA, Woo SL, Amiel D, Harwood F, Kitabayashi L, Matyas JR. The effects of increased tension on healing medial collateral ligaments. *Am J Sports Med*. 1991; 19(4):347-54.
- Hanhan S, Ejzenberg A, Goren K, et al. Skeletal ligament healing using the recombinant human amelogenin protein. *J Cell Mol Med*. 2016;20(5):815-824.
- Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*, 1992; 6(3):861-70.

- Hart DP, Dahners LE. Healing of the medial collateral ligament in rats. The effects of repair, motion, and secondary stabilizing ligaments. *J Bone Joint Surg Am.* 1987; 69(8):1194-9.
- Hartmann C, Tabin CJ. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell.* 2001; 104(3):341-51.
- Hauser RA, Dolan EE, Phillips HJ, Newlin AC, Moore RE, Woldin BA. Ligament injury and healing: a review of current clinical diagnostics and therapeutics. *Open Rehab J.* 2013; 6: 1-20.
- Hervé JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D. Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1662(1-2):22-41.
- Hildebrand C, Oqvist G, Brax L, Tuisku F. Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec.* 1991;229(4):545-55.
- Hildebrand KA, Frank CB. Scar formation and ligament healing. *Can J Surg.* 1998; 41(6):425-9.
- Hill CL, Seo GS, Gale D, Totterman S, Gale M, Felson DT. Cruciate ligament integrity in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:794-799.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(9):2730-2741.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3):526-537.
- Holden DL, Eggert AW, Butler JE. The nonoperative treatment of grade I and II medial collateral ligament injuries to the knee. *Am J Sports Med.* 1983; 11(5):340-4.
- Hootman JM, Dick R, Agel J. Epidemiology of collegiate injuries for 15 sports: summary and recommendations for injury prevention initiatives. *J Athl Train* 2007; 42(2): 311-9.
- Howson KM, Aplin AC, Gelati M, Alessandri G, Parati EA, Nicosia RF. The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(6):C1396-1407
- Hsu SL, Liang R, Woo SL. Functional tissue engineering of ligament healing. *Sports Med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol.* 2010;2, 12. <https://doi.org/10.1186/1758-2555-2-12>.

- Илев А, Георгиев ГП, Димитрова ИН, Котов Г, Малинова Л, Рашев П, Ландзхов В. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Acad Anatom Int*, 2016;2(2):44-48.
- Илев А, Георгиев ГП, Котов Г, Димитрова ИН, Малинова Л, Рашев П, Тсанков Л, Карабинов В, Ландзхов В. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-9 in medial collateral ligament epiligament in rat knee after grade III injury. *Acad Anat Int* (2017), 3(1):20-25.
- Илев А, Котов Г, Стаменов Н, Ландзхов В, Ангелова Y, Георгиев ГП. (2021) A comparative immunohistochemical and quantitative study of the epiligament of the medial collateral and anterior cruciate ligament in rat knee. *Int J Morphol*, 39(1): 151-159.
- Indelicato PA. Non-operative treatment of complete tears of the medial collateral ligament of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1983; 65(3):323-9.
- Inoue M, Woo SL, Gomez MA, Amiel D, Ohland KJ, Kitabayashi LR. Effects of surgical treatment and immobilization on the healing of the medial collateral ligament: a long-term multidisciplinary study. *Connect Tissue Res*. 1990; 25(1):13-26.
- Ishiguro N, Shimizu T, Ito T, Kojima T, Iwahori Y, Iwata H. The expression of matrix metalloproteinases and inhibitors in acute rupture of the anterior cruciate ligament. *Mod Rheumatol*. 2000, 10:95-102.
- Ivie TJ, Bray RC, Salo PT. Denervation impairs healing of the rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res*. 2002; 20(5):990-5.
- Jackson JR, Minton JA, Ho ML, Wei N, Winkler JD. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J Rheumatol*. 1997; 24(7):1253-1259.
- Jia F, Shimomura T, Niyibizi C, Woo SL. Downregulation of human type III collagen gene expression by antisense oligodeoxynucleotide. *Tissue Eng*. 2005; 9-10:1429-35.
- Jia ZY, Zhang C, Cao SQ, Xue CC, Liu TZ, Huang X, Xu WD. Comparison of artificial graft versus autograft in anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017 18:309.
- Jiang D, Yang S, Gao P, et al. Combined effect of ligament stem cells and umbilical-cord-blood-derived CD34+ cells on ligament healing. *Cell Tissue Res*. 2015;362(3):587-595.

- Jin W, Cai J, Sheng D, Liu X, Chen J, Chen S. Establishment of near and non isometric anterior cruciate ligament reconstruction with artificial ligament in a rabbit model. *J Orthop Translat.* 2021;29:78-88.
- Johansson H, Sjölander P, Sojka P. Receptors in the knee joint ligaments and their role in the biomechanics of the joint. *Crit Rev Biomed Eng.* 1991; 18(5):341-68.
- Jones RE, Henley MB, Francis P. Nonoperative management of isolated grade III collateral ligament injury in high school football players. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 213:137-40.
- Juan TK, Liu KC, Kuo CL, et al. Tetrandrine suppresses adhesion, migration and invasion of human colon cancer SW620 cells via inhibition of nuclear factor- κ B, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 signaling pathways. *Oncol Lett.* 2018;15(5):7716-7724.
- Jung HJ, Fisher MB, Woo SL. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2009; 1(1):9.
- Jung HJ, Fisher MB, Woo SL. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2009;1(1):9.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology. In: *Connective tissue.* New York-Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill. 1998, pp. 89-120.
- Kalniev M, Vidinov N. Advanced ultrastructural changes of the knee joint menisci after rupture of the cruciate ligaments. *Dokladi BAN,* 2012; 65(11):1603-1612.
- Kanamori A, Sakane M, Zeminski J, Rudy TW, Woo SL. In-situ force in the medial and lateral structures of intact and ACL-deficient knees. *J Orthop Sci.* 2000; 5(6):567-71.
- Kanaya A, Deie M, Adachi N, Nishimori M, Yanada S, Ochi M. Intra-articular injection of mesenchymal stromal cells in partially torn anterior cruciate ligaments in a rat model. *Arthroscopy.* 2007; 23:610-617.
- Kannus P. Long-term results of conservatively treated medial collateral ligament injuries of the knee joint. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 226:103-12.
- Kaplan N, Wickiewicz TL, Warren RF. Primary surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures: a long-term follow-up study. *Am J Sports Med.* 1990;18:354–358.

- Karamchedu NP, Murray MM, Sieker JT, Proffen BL, Portilla G, Costa MQ, Molino J, Fleming BC. Bridge-enhanced anterior cruciate ligament repair leads to greater limb asymmetry and less cartilage damage than untreated ACL transection or ACL reconstruction in the porcine model. *Am J Sports Med.* 2021;49(3):667-674.
- Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development.* 1998; 125(20):4019-32.
- Kavanagh E, Ashhurst DE. Distribution of biglycan and decorin in collateral and cruciate ligaments and menisci of the rabbit knee joint. *J Histochem Cytochem.* 2001; 49(7):877-85.
- Key JA. The reformation of synovial membrane in the knees of rabbits after synovectomy. *J Bone Joint Surg. (N.S.);* 7: 793.
- Khan WS, Longo UG, Adesida A, Denaro V. Stem cell and tissue engineering applications in orthopaedics and musculoskeletal medicine. *Stem Cells Int.* 2012;2012:403170.
- Khatod M., Amiel D. Ligament biochemistry and physiology. In: Daniel's knee Injuries. Pedowitz RA., O'Connor JJ., Akeson WH. (eds). Philadelphia: PA: Lippincott Williams and Wilkins. 2003, pp. 31–42.
- Kiapour AM, Murray MM. Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair. *Bone Joint Res.* 2014; 3: 20-31.
- Kim HS, Seon JK, Jo AR. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Relat Res.* 2013; 25:165-173.
- Kinneberg KRC, Nirmalanandhan VS, Juncosa-Melvin N et al. Chondroitin-6-sulfate incorporation and mechanical stimulation increase MSC-collagen sponge construct stiffness. *Journal of Orthopaedic Research,* 2010; 28(8): 1092–1099.
- Kirizuki S, Matsumoto T, Ueha T, Uefuji A, Inokuchi T, Takayama K, et al. The influence of ruptured scar pattern on the healing potential of anterior cruciate ligament remnant cells. *Am J Sports Med.* 2018; 46(6):1382-1388.
- Koob TJ, Plaas AH, Hernandez DJ, Wong S, Marchuk L, Frank C. Proteoglycan metabolism in the healing medial collateral ligament. *Trans Orthop Res Soc* 1994; 19:404.
- Kuhn K. Classical collagens: types I, II, and III. In: Structure and function of collagen types. Mayne R, Burgeson R (eds). Orlando: Academic Press. 1987, pp. 1-42.
- Landzhov B, Georgiev GP, Brainova I. The epiligament – the main donor of cells and vessels during healing of the collateral ligaments of the knee. *Anat. Physiol.* 2015; 5:006.

- LaPrade MD, Kennedy MI, Wijdicks CA, LaPrade RF. Anatomy and biomechanics of the medial side of the knee and their surgical implications. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2015;23(2):63-70.
- LaPrade RF, Engebretsen AH, Ly TV, Johansen S, Wentorf FA, Engebretsen L. The anatomy of the medial part of the knee. *J. Bone Joint Surg Am.* 2007; 89:2000-2010.
- LaPrade RF, Floyd ER, Carlson GB, Moatshe G, Chahla J, Monson JK. Multiple ligament anatomic-based reconstructions of the knee: State of the art. *J Arthrosc Surg Sports Med* 2022;3:18-33.
- Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials.* 2005; 26(36):7530-6.
- Lee JK, Jo S, Lee YL, Park H, Song JS, Sung IH, et al. Anterior cruciate ligament remnant cells have different potentials for cell differentiation based on their location. *Sci Rep.* 2020; 10(1):3097.
- Lee KJ, Clegg PD, Comerford EJ, Canty-Laird EG. Ligament-Derived Stem Cells: Identification, Characterisation, and Therapeutic Application. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1919845.
- Lee SH, Cho HG, Song JS, Chun KC, Chun CH. Quantitative assessment of neural elements in a rat model using nerve growth factor after remnant-preserving anterior cruciate ligament reconstruction: a histological and immunofluorescence pilot study. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):277.
- Letson AK, Dahners LE. The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(308):207-212.
- Li H, Jiang F, Ge Y, Wan F, Li H, Chen S. Differences in artificial ligament graft osseointegration of the anterior cruciate ligament in a sheep model: a comparison between interference screw and cortical suspensory fixation. *Ann Transl Med.* 2021;9(17):1370.
- Liang R, Woo SLY, Nguyen TD, Liu PC, Almarza A. Effects of a bioscaffold on collagen fibrillogenesis in healing medial collateral ligament in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research.* 2008; 26(8):1098–1104.
- Liang R, Woo SLY, Takakura Y, Moon DK, Jia F, Abramowitch SD. Long-term effects of porcine small intestine submucosa on the healing of medial collateral ligament: a functional tissue engineering study. *J Orthop Res.* 2006; 24(4): 811–819.

- Limbert G, Taylor M. On the constitutive modelling of biological soft connective tissues. A general theoretical framework and explicit forms of the tensors of elasticity for strongly anisotropic continuum fiber-reinforced composites at finite strain. *Int J Solid Struct.* 2002; 39(8):2343–2358.
- Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech.* 2004; 37(6):865-77.
- Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, Birk DE. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 1993; 121(5):1181-9.
- Liu F, Yue B, Gadikota HR, Kozanek M, Liu W, Gill TJ, Rubash HE, Li G. Morphology of the medial collateral ligament of the knee. *J. Orthop Surg Res.* 2010; 5: 69.
- Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 318: 265-278.
- Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 318:265-78.
- Lo IK, Chi S, Ivie T, Frank CB, Rattner JB. The cellular matrix: a feature of tensile bearing dense soft connective tissues. *Histol Histopathol.* 2002; 17(2):523-37.
- Lo IK, Marchuk L, Majima T, Frank CB, Hart DA. Medial collateral ligament and partial anterior cruciate ligament transection: mRNA changes in uninjured ligaments of the sheep knee. *J Orthop Sci.* 2003; 8(5):707-13.
- Lo IK, Ou Y, Rattner JP, et al. The cellular networks of normal ovine medial collateral and anterior cruciate ligaments are not accurately recapitulated in scar tissue. *J Anat.* 2002; 200: 283-96.
- Lo IK, Ou Y, Rattner JP, Hart DA, Marchuk LL, Frank CB, Rattner JB. The cellular networks of normal ovine medial collateral and anterior cruciate ligaments are not accurately recapitulated in scar tissue. *J Anat.* 2002; 200(3):283-96.
- Loitz-Ramage BJ, Frank CB, Shrive NG. Injury size affects long-term strength of the rabbit medial collateral ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1997; 337:272-80.
- Lovinescu I, Koyama E, Pacifici M. Roles of FGF-10 on the development of diarthrodial limb joints. *Penn Dent J (Phila).* 2003; 103:5-9.

- Lyon RM, Akeson WH, Amiel D, Kitabayashi LR, Woo SL. Ultrastructural differences between the cells of the medial collateral and the anterior cruciate ligaments. *Clin Orthop Relat Res.* 1991; 272:279-86.
- Majima T, Lo IK, Marchuk LL, Shrive NG, Frank CB. Effects of ligament repair on laxity and creep behavior of an early healing ligament scar. *J Orthop Sci.* 2006; 11(3):272-7.
- Marieswaran M, Jain I, Garg B, Sharma V, Kalyanasundaram D. A Review on Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament and Materials for Reconstruction. *Appl Bionics Biomech.* 2018;2018:4657824.
- Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276(5309): 75-81.
- Martin R, Burr D, Sharkey N. Mechanical properties of ligament and tendon. In: *Skeletal tissue mechanics.* New York: Springer. 1998, pp. 309-46.
- Matsumoto T, Ingham SM, Mifune Y, Osawa A, Logar A, Usas A, et al. Isolation and characterization of human anterior cruciate ligament-derived vascular stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(6):859-872.
- Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol.* 2006; 169(4):1440-1457
- Matsumoto T, Kubo S, Sasaki K, Kawakami Y, Oka S, Sasaki H, et al. Acceleration of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament graft using autologous ruptured tissue. *Am J Sports Med.* 2012; 40(6):1296-1302.
- Matyas JR, Bodie D, Andersen M, Frank CB. The developmental morphology of a "periosteal" ligament insertion: growth and maturation of the tibial insertion of the rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 1990; 8(3):412-24.
- Maurice E, Godineau T, Pichard D, El Hafci H, Autret G, Bensidhoum M, Migonney V, Manassero M, Viateau V. Remnants-preserving ACL reconstruction using direct tendinous graft fixation: a new rat model. *J Orthop Surg Res.* 2022;17(1):7.
- McDougall JJ, Bray RC, Sharkey KA. Morphological and immunohistochemical examination of nerves in normal and injured collateral ligaments of rat, rabbit, and human knee joints. *Anat Rec.* 1997; 248(1):29-39.
- McDougall JJ, Bray RC. Animal models of ligament repair. In: *Animal models in orthopaedic research.* An YH, Friedman RD. Boca Raton, CRC Press LLC (eds). 1999, pp. 461-476.

- McDougall JJ, Bray RC. Vascular volume determination of articular tissues in normal and anterior cruciate ligament-deficient rabbit knees. *Anat Rec.* 1998 Jun;251(2):207-13.
- McDougall JJ, Yeung G, Leonard CA, Sutherland C, Bray RC. Adaptation of post-traumatic angiogenesis in the rabbit knee by apposition of torn ligament ends. *J Orthop Res.* 2000; 18(4):663-70.
- Menetrey J, Laumonier T, Garavaglia G, et al. α -Smooth muscle actin and TGF- β receptor I expression in the healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Injury.* 2011;42(8):735-741.
- Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fifteenth Edition 15th Edition*, McGraw-Hill Education, 2018.
- Mifune Y, Matsumoto T, Ota S, Nishimori M, Usas A, Kopf S, et al. Therapeutic potential of anterior cruciate ligament-derived stem cells for anterior cruciate ligament reconstruction. *Cell Transplant.* 2012; 21(8):1651-1665.
- Mifune Y, Matsumoto T, Takayama K, Terada S, Sekiya N, Kuroda R, et al. Tendon graft revitalization using adult anterior cruciate ligament (ACL)-derived CD34+ cell sheets for ACL reconstruction. *Biomaterials.* 2013; 34(22):5476-5487.
- Miyamoto RG, Bosco JA, Sherman OH. Treatment of medial collateral ligament injuries. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009; 17(3):152-61.
- Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003;33(5):381-394.
- Murphy PG, Frank CB, Hart DA. Cell biology of ligaments and ligament healing. In: *The anterior cruciate ligament: Current and Future concepts*. Jackson DW, Arnoczky SP, Frank CB, Woo SL-Y, Simon TM (eds). New York: Raven Press. 1993, pp 165-178.
- Murray MM, Fleming BC. (2013) The biology of the normal ACL. In: Murray M., Vavken P., Fleming B. (eds) *The ACL Handbook*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0760-7_5
- Murray MM, Spindler KP, Devin C et al. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res.* 2006; 24(4):820–830.
- Murray MM, Martin SD, Martin TL, Spector M. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am.* 2000; 82(10):1387-1397.

- Murray MM, Spector M. Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *J Orthop Res.* 1999;17(1):18-27.
- Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, et al. The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament--a functional tissue engineering study in rabbits. *J Orthop Res.* 2004;22(1):214-220.
- Nagai K., Nakanishi Y., Kamada K., Hoshino Y., Kuroda R. Anatomy and Biomechanics of the Collateral Ligaments of the Knee. 2021. In: Koh J., Zaffagnini S., Kuroda R., Longo U.G., Amirouche F. (eds) *Orthopaedic Biomechanics in Sports Medicine*. Springer, Cham.
- Nakano N, Matsumoto T, Takayama K, Matsushita T, Araki D, Uefuji A, et al. Age-dependent healing potential of anterior cruciate ligament remnant-derived cells. *Am J Sports Med.* 2015; 43(3):700-708.
- Natsuume T, Nakamura N, Shino K, Toritsuka Y, Horibe S, Ochi T. Temporal and spatial expression of transforming growth factor-beta in the healing patellar ligament of the rat. *J Orthop Res.* 1997;15(6):837-843.
- Ng GYF. Ligament Injury and Repair: Current Concepts. *Hong Kong Physiother J.* 2002; 20(1): 22-29.
- Nguyen DT, Ramwadhoebe TH, van der Hart, Blankevoort CP, Tak PP, van Dijk CN. Intrinsic healing response of the human anterior cruciate ligament: an histological study of reattached ACL remnants. *J Orthop Res.* 2014; 32, 296-301.
- Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, Qian X. Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol.* 1997; 151(5):1379-1386.
- Nishikawa Y, Kokubun T, Kanemura N, Takahashi T, Matsumoto M, Maruyama H, Takayanagi K. Effects of controlled abnormal joint movement on the molecular biological response in intra-articular tissues during the acute phase of anterior cruciate ligament injury in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord* 2018; 19:175.
- Nishimori M, Matsumoto T, Ota S, et al. Role of angiogenesis after muscle derived stem cell transplantation in injured medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 2012;30(4):627-633.
- Niyibizi C, Eyre DR. Structural analysis of the extension peptides on matrix forms of type V collagen in fetal calf bone and skin. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1203(2):304-9.

- Niyibizi C, Eyre DR. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem.* 1994; 224(3):943-50.
- Niyibizi C, Kavalkovich K, Yamaji T, Woo SL. Type V collagen is increased during rabbit medial collateral ligament healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2000; 8(5):281-5.
- O'Donoghue DH, Frank GR, Jeter GL, et al. Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament in dogs: factors influencing long-term results. *J Bone Joint Surg [Am]* 1971;53-A:710-718.
- O'Donoghue DH, Rockwood CA Jr, Frank GR, Jack SC, Kenyon R. Repair of the anterior cruciate ligament in dogs. *J Bone Joint Surg [Am]* 1966;48-A:503-519.
- O'Donoghue DH, Rockwood CA, Zaricznyj B, Kenyon R. Repair of Knee Ligaments in Dogs. I. The Lateral Collateral Ligament. *J Bone Joint Surg.* 1961; 43:1167-1178.
- Ohland KJM, Woo SL-Y, Weiss JM, Takai SM, Shelley FJM. Healing of combined injuries of the rabbit medial collateral ligament and its insertions: a long term study on the effects of conservative vs. surgical treatment. *ASME* 1991; 20: 447-448.
- Osternig LR, Caster BL, James CR. Contralateral hamstring (biceps femoris) coactivation patterns and anterior cruciate ligament dysfunction. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27(6):805-8.
- Padgett LR, Dahners LE. Rigid immobilization alters matrix organization in the injured rat medial collateral ligament. *J Orthop Res.* 1992; 10(6):895-900.
- Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo.* 1994; 8(6):961-965.
- Plaas AH, Wong-Palms S, Koob T, Hernandez D, Marchuk L, Frank CB. Proteoglycan metabolism during repair of the ruptured medial collateral ligament in skeletally mature rabbits. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 374(1):35-41.
- Probstmeier R, Pesheva P. Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent cell adhesion and neurite outgrowth on fibronectin by a disialoganglioside-mediated signaling mechanism. *Glycobiology.* 1999; 9(2):101-14.

- Provenzano PP, Hayashi K, Kunz DN, Markel MD, Vanderby R Jr. Healing of subfailure ligament injury: comparison between immature and mature ligaments in a rat model. *J Orthop Res.* 2002; 20(5):975-83.
- Reider B, Sathy MR, Talkington J, Blyznak N, Kollias S. Treatment of isolated medial collateral ligament injuries in athletes with early functional rehabilitation. A five-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 1994; 22(4):470-7.
- Riechert K, Labs K, Lindenhayn K, Sinha P. Semiquantitative analysis of types I and III collagen from tendons and ligaments in a rabbit model. *J Orthop Sci.* 2001; 6(1):68-74.
- Robson AW. VI: ruptured crucial ligaments and their repair by operation. *Ann Surg* 1903;37:716–718.
- Romanic AM, Adachi E, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Copolymerization of pNcollagen III and collagen I. pNcollagen III decreases the rate of incorporation of collagen I into fibrils, the amount of collagen I incorporated, and the diameter of the fibrils formed. *J Biol Chem.* 1991; 266(19):12703-9.
- Ryu DJ, Kwon KB, Hong DH, Park SJ, Park JS, Wang JH. Anterior cruciate ligament remnant-preserving and re-tensioning reconstruction: a biomechanical comparison study of three different re-tensioning methods in a porcine model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2021;22(1):132.
- Saether EE, Chamberlain CS, Leiferman EM, et al. Enhanced medial collateral ligament healing using mesenchymal stem cells: dosage effects on cellular response and cytokine profile. *Stem Cell Rev Rep.* 2014;10(1):86-96.
- Saiga K, Furumatsu T, Yoshida A, et al. Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402(2):329-334.
- Sakti M, Nakasa T, Shoji T, et al. Acceleration of healing of the medial collateral ligament of the knee by local administration of synthetic microRNA-210 in a rat model. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol.* 2015;2(4):129-136.
- Salo PT, Beye JA, Seerattan RA, Leonard CA, Ivie TJ, Bray RC. Plasticity of peptidergic innervation in healing rabbit medial collateral ligament. *Can J Surg.* 2008; 51(3):167-72.
- Salo PT, Theriault E. Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. *J Anat.* 1997; 190(4):515-22.

- Sandberg R, Balkfors B, Nilsson B, Westlin N. Operative versus non-operative treatment of recent injuries to the ligaments of the knee: a prospective randomized study. *J Bone Joint Surg [Am]* 1987;69-A:1120–1126.
- Scheffler S. The cruciate ligaments: Anatomy, biology, and biomechanics. In: *The Knee Joint*. Springer, 2012, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-287-99353-4_2
- Scheffler SU, Clineff TD, Papageorgiou CD, Debski RE, Ma CB, Woo SL. Structure and function of the healing medial collateral ligament in a goat model. *Ann Biomed Eng* 2001; 29(2): 173-80.
- Schepelmann K, Messlinger K, Schaible HG, Schmidt RF. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I₂. *Neuroscience*. 1992; 50(1):237-47.
- Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J*. 1998 Jun;30(6):413-9.
- Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*. 2001; 128(19):3855-66.
- Sciore P, Boykiw R, Hart DA. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. *J Orthop Res*. 1998;16(4):429-437.
- Scott-Burden T. Extracellular matrix: the cellular environment. *News Physiol Sci*. 1994; 9:110-15.
- Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1662(1-2):3-21.
- Settle SH Jr, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol*. 2003; 254(1):116-30.
- Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*. 2004; 62(2):228-32.
- Sojka P, Johansson H, Sjölander P, Lorentzon R, Djupsjöbacka M. Fusimotor neurones can be reflexly influenced by activity in receptor afferents from the posterior cruciate ligament. *Brain Res*. 1989; 483(1):177-83.

- Sonnery-Cottet, B., Bazille, C., Hulet, C., Colombet, P., Cucurulo, T., Panisset, J.C., Potel, J.F., Servien, E., Trojani, C., Djian, P., Graveleau, N., Pujol, N., French Arthroscopic Society, 2014. Histological features of the ACL remnant in partial tears. *Knee*. 2014; 21, 1009-1013.
- Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature*. 1994; 368(6472):639-43.
- Sufiawati I, Tugizov SM: HIV-induced matrix metalloproteinase-9 activation through mitogen-activated protein kinase signalling promotes HSV-1 cell-to-cell spread in oral epithelial cells. *J Gen Virol*. 2018; 99:937-947.
- Sung KL, Whittemore DE, Yang L, Amiel D, Akeson WH. Signal pathways and ligament cell adhesiveness. *J Orthop Res*. 1996; 14(5):729-35.
- Takeyama N, Sakai H, Ohtake H, Mashitori H, Tamai K, Saotome K. Effects of hyperbaric oxygen on gene expressions of procollagen, matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in injured medial collateral ligament and anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2007; 15(4):443-52.
- Tandogan NR, Kayaalp A. Surgical treatment of medial knee ligament injuries: current indications and techniques. *EFORT Open Rev*. 2017;1(2):27-33.
- Tang Z, Yang L, Xue R, Zhang J, Wang Y, Chen PC, Sung KL. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after a mechanical injury: Involvement of the p65 subunit of NF-kappaB. *Wound Repair Regen*. 2009, 17:709-716
- Tanzer M. Cross-linking. In: *Biochemistry of collagen*. Ramachandran G, Reddi A (eds). New York: Plenum Press. 1976, pp. 137-62.
- Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y, Ohnuki T, Suzuki R, Ochi T, Nakamura K, Fukui N. Effect of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res*. 2006; 24(1):71-9.
- Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, et al. Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. 2008; 26(3):819-830.
- Tozer S, Duprez D. Tendon and ligament: development, repair and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005; 75(3):226-36.

- Vailas AC, Tipton CM, Matthes RD, Gart M. Physical activity and its influence on the repair process of medial collateral ligaments. *Connect Tissue Res.* 1981; 9(1):25-31.
- Vaishya R, Agarwal AK, Ingole S, Vijay V. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction: a review. *Cureus.* 2015; 7:e378.
- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One.* 2014; 9:e96801.
- Vavken P, Murray MM. The potential for primary repair of the ACL. *Sports Med. Arthrosc. Rev.* 2011; 19:44-49.
- Viidik A. Interdependence between structure and function in collagenous tissues. In: Viidik A, Vuust J (eds). *Biology of collagen.* London: Academic Press. 1980, pp. 257-280.
- Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004; 6:131-56.
- Walsh S, Frank C, Hart D. Immobilization alters cell metabolism in an immature ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1992; 277:277-88.
- Walsh S, Frank C, Shrive N, Hart D. Knee immobilization inhibits biomechanical maturation of the rabbit medial collateral ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1993; 297:253-61.
- Wan C, Hao Z, Wen S. A quantitative comparison of morphological and histological characteristics of collagen in the rabbit medial collateral ligament. *Ann. Anat.* 2013; 195:562-569.
- Wang H, Liu Z, Li Y, Peng Y, Xu W, Hu N, et al. Is remnant preservation in anterior cruciate ligament reconstruction superior to the standard technique? A systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2019;2019:1652901.
- Wang HD, Wang TR, Sui Y, Wang J, Chen W, Zhang YZ. An autograft for anterior cruciate ligament reconstruction results in better biomechanical performance and tendon-bone incorporation than does a hybrid graft in a rat model. *Am J Sports Med.* 2020;48(14):3515-3524.
- Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech.* 2006; 39(9):1563-82.
- Weiss JA, Woo SL, Ohland KJ, Horibe S, Newton PO. Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: primary repair versus nonoperative treatment. *J Orthop Res.* 1991; 9(4):516-28.

- Wijdicks CA, Griffith CJ, Johansen S, Engebretsen L, LaPrade RF. Injuries to the medial collateral ligament and associated medial structures of the knee. *J. Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 1266-1280.
- Witkowski J, Yang L, Wood DJ, Sung KL. Migration and healing of ligament cells under inflammatory conditions. *J Orthop Res.* 1997; 15(2):269-77.
- Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest.* 1997; 100(2):321-30.
- Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 2006; 39:1-20.
- Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech.* 2006; 39(1):1-20.
- Woo SL, Gomez MA, Sites TJ, Newton PO, Orlando CA, Akeson WH. The biomechanical and morphological changes in the medial collateral ligament of the rabbit after immobilization and remobilization. *J Bone Joint Surg Am.* 1987; 69(8):1200-11.
- Woo SL, Jia F, Zou L, Gabriel MT. Functional tissue engineering for ligament healing: potential of antisense gene therapy. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32(3):342-51.
- Woo SL, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000; 8(6):364-72.
- Woo SLY, An KN, Arnoczky SP, Wayne JS, Fithian DC, Myers BS. Anatomy, biology and biomechanics of tendon, ligament and meniscus. In: *Orthopaedic Basic Science* (Simon SR eds). Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1994, pp. 45-88.
- Woo SLY, Horibe S, Ohland KJ, Amiel D. The response of ligaments to injury: Healing of collateral ligaments. In: *Knee ligaments: Structure, function, injury and repair*. Daniel DM, Akeson WH, O'Connor JJ (eds). New York: Raven Press. 1990, pp 351-364.
- Woo SLY, Takakura Y, Liang R, Jia F, Moon DK. Treatment with bioscaffold enhances the the fibril morphology and the collagen composition of healing medial collateral ligament in rabbits. *Tissue Engineering.* 2006; 12(1):159–166.
- Woo SL-Y., Lee TQ, Abramowitch SD, and Gilbert T. Structure and Function of Ligaments and Tendons. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechanobiology* (3rd Edition). Mow VC, Hulskes R (eds). Philadelphia: Lippincott Williams. 2005, pp. 301-304.

- Wright RW, Allen T, El-Zawawy HB, et al. Medial collateral ligament healing in macrophage metalloelastase (MMP-12)-deficient mice. *J Orthop Res.* 2006;24(11):2106-2113.
- Xie J, Jiang J, Huang W, et al. TNF- α induced down-regulation of lysyl oxidase family in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts. *Knee.* 2014;21(1):47-53.
- Xu B, Yang M, Li Z, et al. Thymosin β 4 enhances the healing of medial collateral ligament injury in rat. *Regul Pept.* 2013;184:1-5.
- Xue R, Yang L, Tang Z, Zhang J, Wang Y, Sung KLP. MMPs and TIMPs Expression and the Anterior Cruciate Ligament Repair, 2009 3rd Int Conf Bioinform Biomed Engin, Beijing, 2009, pp. 1-4
- Yamaji T, Levine RE, Woo SL, Niyibizi C, Kavalkovich KW, Weaver-Green CM. Medial collateral ligament healing one year after a concurrent medial collateral ligament and anterior cruciate ligament injury: an interdisciplinary study in rabbits. *J Orthop Res.* 1996; 14(2):223-7.
- Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn.* 1993; 43(6):283-93.
- Yang L, Tsai CM, Hsieh AH, Lin VS, Akeson WH, Sung KL. Adhesion strength differential of human ligament fibroblasts to collagen types I and III. *J Orthop Res.* 1999; 17:755-762.
- Yilgor C, Yilgor Huri P, Huri G. Tissue engineering strategies in ligament regeneration. *Stem Cells Int.* 2012; 2012:374676.
- Yoshida M, Fujii K. Differences in cellular properties and responses to growth factors between human ACL and MCL cells. *J Orthop Sci.* 1999; 4: 293-298.
- Yoshioka T, Kanamori A, Washio T, et al. The effects of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) on healing of medial collateral ligament of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21(8):1763-1769.
- Yu H, Fu F, Yao S, Luo H, Xu T, Jin H, Tong P, Chen D, Wu C, Ruan H. Biomechanical, histologic, and molecular characteristics of graft-tunnel healing in a murine modified ACL reconstruction model. *J Orthop Translat.* 2020;24:103-111.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development.* 2006; 133(8):1543-1551.

- Zhang J, Pan T, Im HJ, Fu FH, Wang JH. Differential properties of human ACL and MCL stem cells may be responsible for their differential healing capacity. *BMC Med.* 2011; 9:68.
- Zhang J, Yang L, Tang Z, et al. Expression of MMPs and TIMPs family in human ACL and MCL fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 2009; 50:7-13.
- Zhou D, Lee HS, Villarreal F, et al.: Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts. *J Orthop Res.* 2005, 23:949-957.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res.* 1990; 40(2):264-78.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, et al.:Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem.* 2010, 17:3751-3768.
- Zumstein MA, Rumian A, Lesbats V, Schaer M, Boileau P. Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF): a prospective randomized controlled pilot trial. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014; 23(1):3-12.