

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СОФИЯ

Катедра по ортопедия и травматология

---

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

Д-р Георги Петров Георгиев

## Автореферат

За присъждане на научна степен „Доктор на науките“ по научна  
специалност „Ортопедия и травматология“, шифър 03.01.40

София, 2021

## Съдържание

I. Въведение	4
II. Обобщение на данните от литературата	6
III. Цели задачи	7
IV. Материал и методи	9
V. Собствени резултати	16
VI. Обсъждане	56
VII. Изводи	86
VIII. Приноси	89
IX. Списък на публикации и съобщения	91

## **Използвани съкращения и означения:**

медиалната колатерална връзка – МКВ

предната кръстна връзка – ПКВ

епилигамент – ЕЛ

сканираща електронна микроскопия – СЕМ

трансмисионната електронна микроскопия – ТЕМ

матриксните металопротеинази – ММП

екстрацелуларния матрикс – ЕЦМ

невропептид Y – NPY

вазоактивен интестинален пептид – ВИП

комплекса бедрена кост-МКВ-тибия – КБМТ

инсулиноподобния растежен фактор-I – IGF-I

трансформация растежен фактор – TGF- $\beta$

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 металопротеази – 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 последствие 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 лигаментна. 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. ОБОБЩЕНИЕ НА ДАННИТЕ ОТ ЛИТЕРАТУРАТА

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; Kiarou и Murray, 2014; Vaishya и съавт., 2015; Andrews и съавт., 2017; Cai и съавт., 2017). 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 ММП-2 и -9 в ЕЛ при МКВ и ПКВ при плъх и 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 ЗАДЧИ**

#### **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. Установяване в ЕЛ на МКВ и ПКВ на матриксни металопротеинази 2 и -9 у плъх и човек, както и разликите в експресията им с помощта на ImageJ 1.52a.

5. Изучаване ролята на ЕЛ по време на ранния оздравителен процес на МКВ при експериментален модел на плъх, с помощта на гореизложените методики и софтуер.

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

### 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. 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).

#### 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 12 човешки стави (5 мъжки и 7 женски кадавъра), 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. 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%). Етанолът след това беше премахнат с помощта на кедрово масло, докато материалите не придобиха прозрачност. Последните бяха потопени в ксилен, след което в парафин.

#### *IV.2 Светлинна микроскопия*

За рутинното светлинно-микроскопско изследване бяха направени срезове на микротом с дебелина 5  $\mu\text{m}$ . Така получените срезове бяха поставени на предметни стъкла. Те бяха рутинно оцветени с хематоксилин и еозин, Малори и ван Гизон.

#### *IV.3 Имунохистохимия*

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

За имунохистохимичния анализ на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек срезовете бяха поставени на предметни стъкла с желатиново покритие и бяха инкубирани за 1 час в 5% серум от коза във фосфатен буфер. 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 антитела; миши моноклонални анти-проколаген тип III IgG антитела; миши моноклонални анти-колаген тип V IgG антитела; всички антитела бяха използвани в разреждане 1:500. След изплакване с фосфат буфериран физиологичен разтвор (PBS), бе направена инкубация в биотинилирани кози анти-миши IgG антитела в разреждане 1:500 за 2 часа. Срезозете бяха измити в PBS и инкубирани в авидин-биотин пероксидазен комплекс за 1 час. Последва изплакване в PBS, а след това в 0.05 M Tris-HCl буфер с pH 7.6. Последва

инкубация в 0.05% 3,3'-диаминобензидин тетрахидролорид (ДАВ) съдържащ 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:100) за визуализиране на реакцията. Срезове бяха за кратко измити в 0.05M Tris-HCl буфер, 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, изсушени на стайна температура и покрити с Entellan. 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.

#### *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 плъх бяха използвани слените първични антители: миши моноклонални антители срещу колаген тип I IgG; миши моноклонални антители срещу колаген тип III IgG; миши моноклонални антители срещу колаген тип V IgG. Всички антители бяха използвани в разреждане 1:500.

#### *IV.3.3 Имунохистохимичен протокол на MMP-2 и -9 при човек*

Срезове се депарафинираха, обработиха в низходяща редица с етанол (100%, 95%, 80%, 70%) и се промиваха с 0,1 M фосфатен буфер, рН 7,4, при стайна температура. Ендогенната пероксидазна активност се блокира с 3% водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в продължение на 10 минути при стайна температура. Срезове се изплакнаха във PBS и неспецифичните места за свързване се блокират със Super Block суТек за пет минути. Първичните заешки анти-човешки поликлонални антители срещу MMP-2 и MMP-9 (бяха добавени в разреждане 1:500, като се инкубираха за една нощ при 4°C. Последва изплакване на

срезове в PBS и инкубирани с биотинилиран кози анти заешки имуноглобулин G в продължение на 10 минути на стайна температура. След ново измиване на срезове и инкубирането им със стрептавидин-HRP в продължение на 10 минути при стайна температура последва инкубация в DAB за 10 минути за визуализиране на реакцията. Срезите бяха контраоцветени с хематоксилин, дехидратирани в повишаващи се концентрации на етанол и просветлени в ксилол. За включването им се използва специфична среда – канадски балсам. Срезове, използвани като контроли, се инкубираха по описания по-горе начин, но пропускайки първичното или вторичното анти тяло. Всички контроли бяха отрицателни.

За имунохистохимичния анализ на ЕЛ на МКВ и ПКВ на плъх, бяха използвани поликлонални антитела срещу ММП-2 и -9 при разреждане 1:1000, като срезове се инкубираха за една нощ при 4°C. Последва изплакване на срезове в PBS и инкубирането им с биотинилиран кози анти заешки имуноглобулин G за 10 минути при стайна температура. Срезове се изплакнаха отново и се инкубираха със стрептавидин-HRP за 10 минути при стайна температура. Свързването на антителата се визуализира с използване на DAB като хромоген за 10 минути. Срезове бяха контраоцветени с хематоксилин, дехидратирани в повишаващи се концентрации на етанол (70%, 80%, 95%, 100%), просветлени в ксилол, а за включването се използва специфична среда – канадски балсам. Всички контроли бяха отрицателни.

#### *IV.4 Полуколичествен анализ на имунохистохимичната 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, ендолигамента и лигаментарната тъкан бяха визуализирани на всеки срез. Срезове бяха оцветени с хематоксилин и еозин. Количествените данни бяха получени с компютризираната система за снимков анализ NIS-Elements Advanced Research, Ver. 2.30. Представящите интерес райони от всеки срез бяха случайно избрани от зони без руптури на лигамента 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 мм<sup>2</sup> 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 мм<sup>2</sup> 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 мм<sup>2</sup>.

Получените резултати бяха обобщени и анализирани чрез Microsoft Excel 2010. За статистическия анализ беше използван Statistica software. При оценката на количествените данни се използва Sign test, като непараметрична алтернатива на t-test за срезове. Нулевата хипотеза (H<sub>0</sub>) бе отхвърлена, а алтернативната хипотеза (H<sub>1</sub>) 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. Трасмисионна електронна микроскопия*

Фиксацията на материала се извърши в 3% разтвор на глутаралдехид за 2 часа. Последва многократно промиване на материала с 0.1M фосфатен буфер, pH 7,2 – 7,4, целящо да измие фиксатора. Извърши се допълнително фиксиране в 1% разтвор на OsO<sub>4</sub> във фосфатен буфер (pH 7,4) при стайна температура за 2 часа. Проме 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. След дехидратацията материалът бе поставен за 15 минути в пропилен оксид, 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, 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 азур II фуксинова 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 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 за 30 минути и разтвор на натриев цитрат (4,3%) и оловен нитрат (2,6%). Наблюдението на обектите бе извършено на електронен микроскоп Hitachi 500.

#### **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 лигамента след пълното му прекъсване (III степен увреда).

Тези периоди включват: острата репаративна фаза (до 3 седмици) 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 лигамента.

Чрез интраперитонеална апликация на комбинация от Ketamine 45mg/kg и Nylazine 5mg/kg плъховете бяха въведени в анестезия. Левият долен крайник на животното бе обръснат и обработен с Braunol. 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. При модела на хирургично лечение двата края на връзката бяха максимално репонирани с последващ шев на връзката с конец 5/0 Етхилон. 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. След настъпване на смъртта се инжектираше 10% формалин или 3% разтвор на глутаралдехид около връзката, с последващо внимателно отпрепарирание на МКВ на колянната става.

## **V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ**

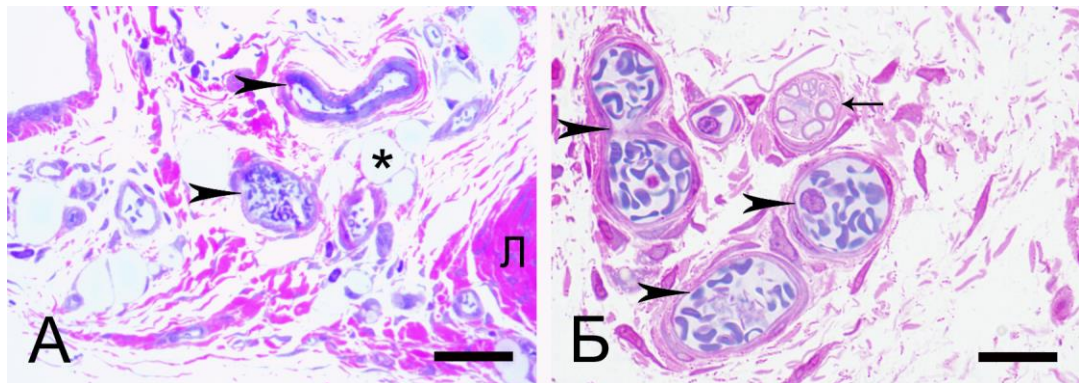
### **V. Нормална морфологична структура на ЕЛ при плъх и човек**

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

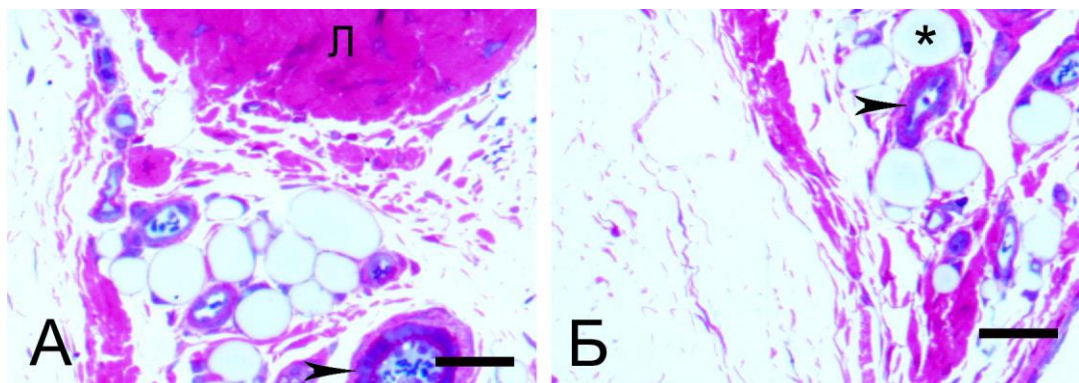
#### *V.1.1.1 Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх*

Нормалната структура на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх бе доста различна от морфологията на лигаментарната субстанция (Фигура V.1 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  $\mu\text{m}$ . Б) ЕЛ представен от фибробласти, фиброцити, колагенови влакна, нервни влакна (стрелка) и кръвоносни съдове (глави на стрелки). Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$ .



**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  $\mu\text{m}$ .

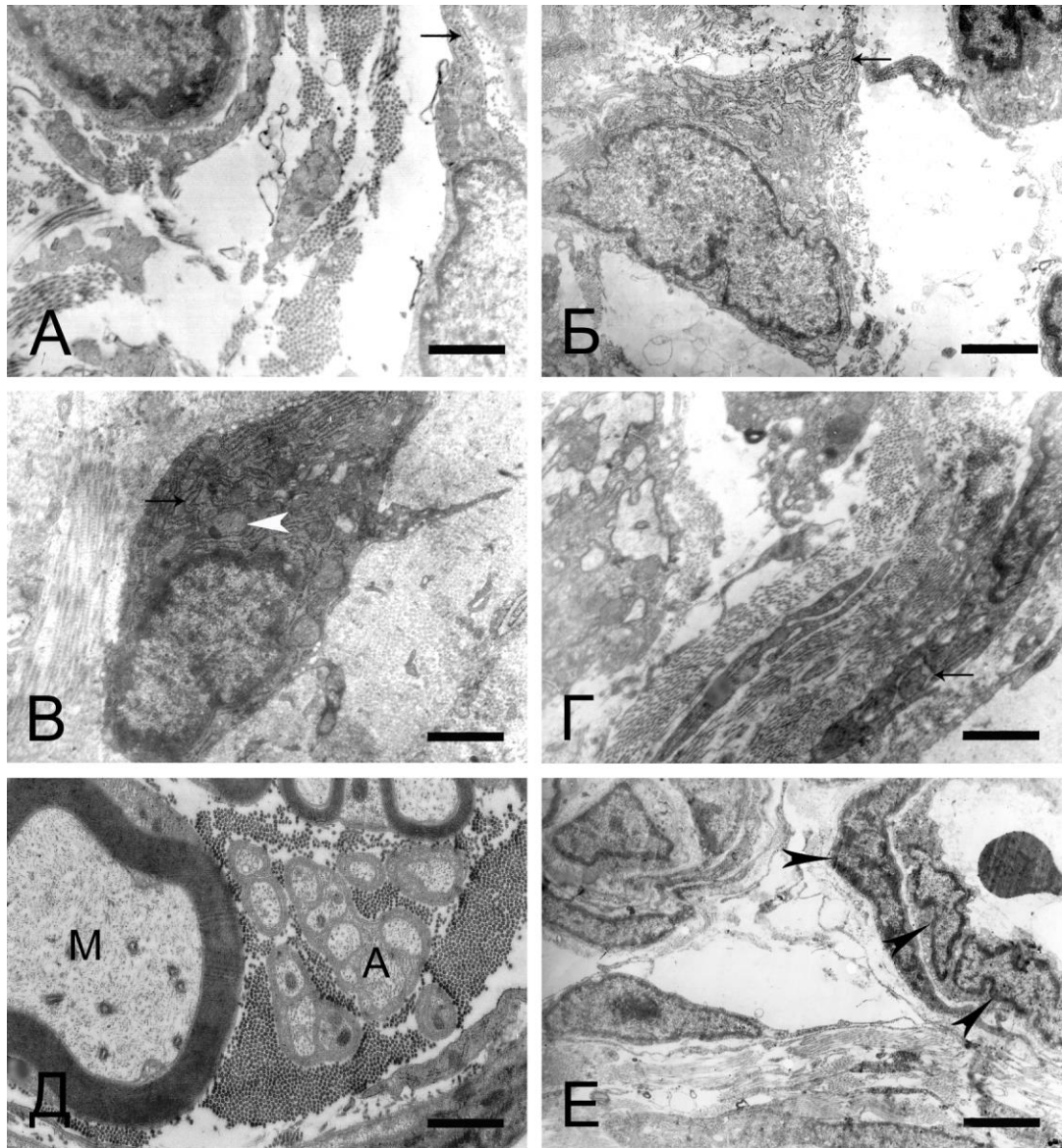
#### *V.1.1.2 Електронно-микроскопско изследване на МКВ и ПКВ при плъх*

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

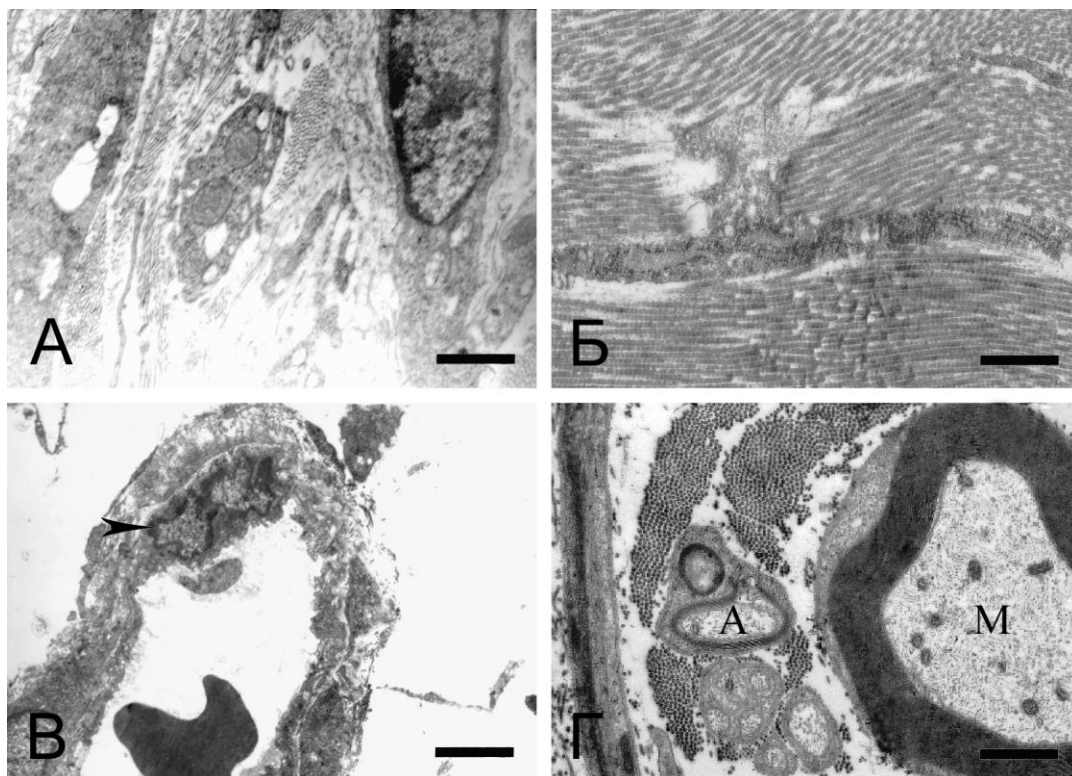
свободни рибозоми. Наблюдавах се и относително малко кръгли митохондрии, по вътрешната мембрана на които се образуваха митохондриални кристи. Гранулираният ендоплазмен ретикулум бе представен от единични или двойни ламели покрити с рибозоми. Наблюдаваше се и недобре оформен апарат на Голджи като отделни 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 перицити, 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 лигаментата. В лигаментата 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 лигаментата.



**Фигура V.3.** Нормална морфология на външната повърхност на ЕЛ на МКВ у плъх. А) Електронोगрама на фибробласти с голямо ядро, добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка) и колагенови влакна; Размерна линия – 1.5  $\mu\text{m}$ ; Б) Електронोगрама на фибробласт с голямо ядро и добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка). Размерна линия - 2.3  $\mu\text{m}$ ; В) Електронोगрама 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  $\mu\text{m}$ ; Г) Електронोगрама на фибробласти в междуклетъчното пространство с голямо ядро, добре представен гранулиран ендоплазмен ретикулум (стрелка) и колагенови влакна; Размерна линия - 2.3  $\mu\text{m}$ ; Д) Електронोगрама на миелинизирани (М) и амиелинизирани влакна (А) в ЕЛ; Размерна линия - 1,1  $\mu\text{m}$ . Е) Електронोगрама на фибробласт с триангуларна фотма и фиброцити с вретеновидна форма, както и перицити около кръвоносен съд. Размерна линия - 1,5  $\mu\text{m}$ .



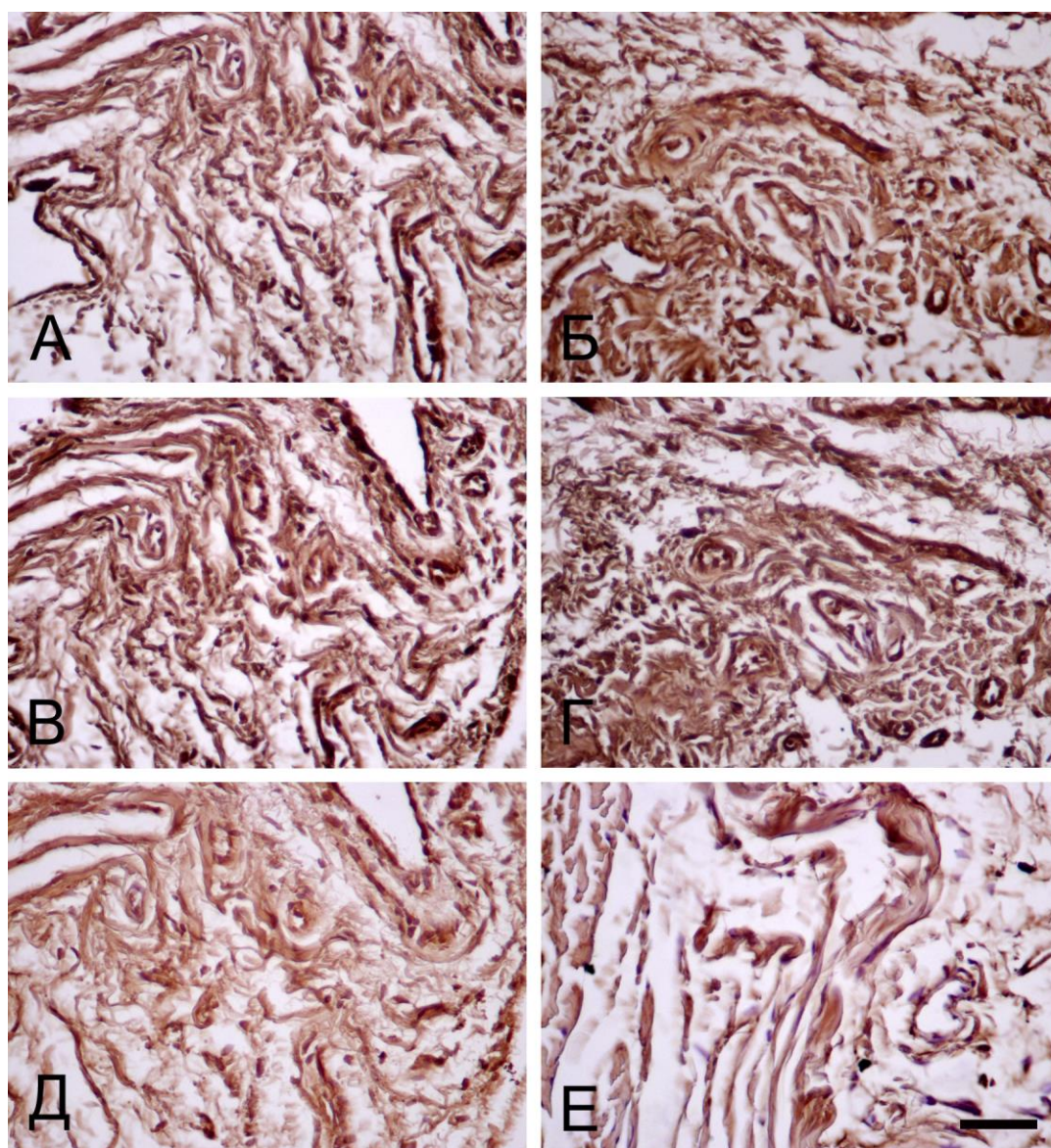
**Фигура V.4.** Нормална морфология на външната повърхност на ЕЛ на ПКВ у плъх. А) Електронограма на фибробласт с голямо ядро, слабо представен гранулиран ендоплазмен ретикулум и колагенови влакна; Размерна линия – 1.5  $\mu\text{m}$ ; Б) Електронограма на междуклетъчно вещество с колагенови влакна. Размерна линия - 2.3  $\mu\text{m}$ ; В) Електронограма на кръвоносен съд и перипцити (глава на стрелка). Размерна линия - 1,5  $\mu\text{m}$ ; Г) Електронограма на миелинизирани (М) и амиелинизирани влакна (А) в ЕЛ; Размерна линия - 1,1  $\mu\text{m}$ .

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.

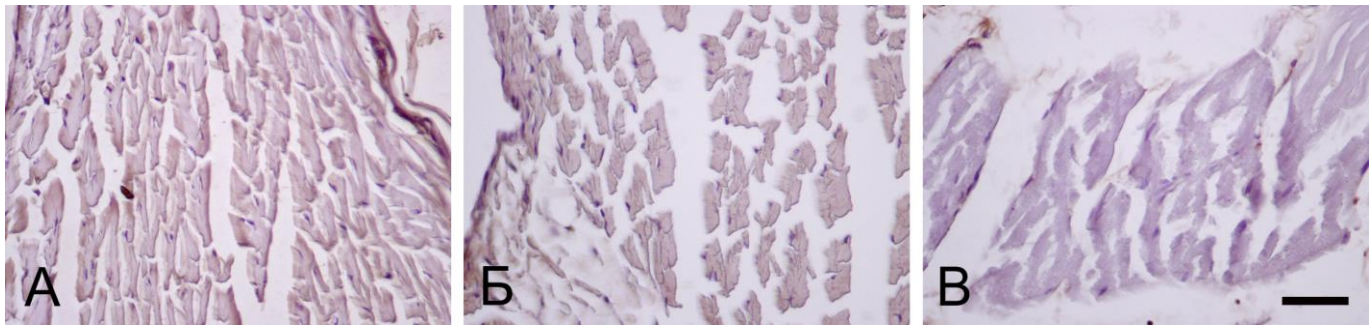
#### *V.1.1.3 Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ у плъх*

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

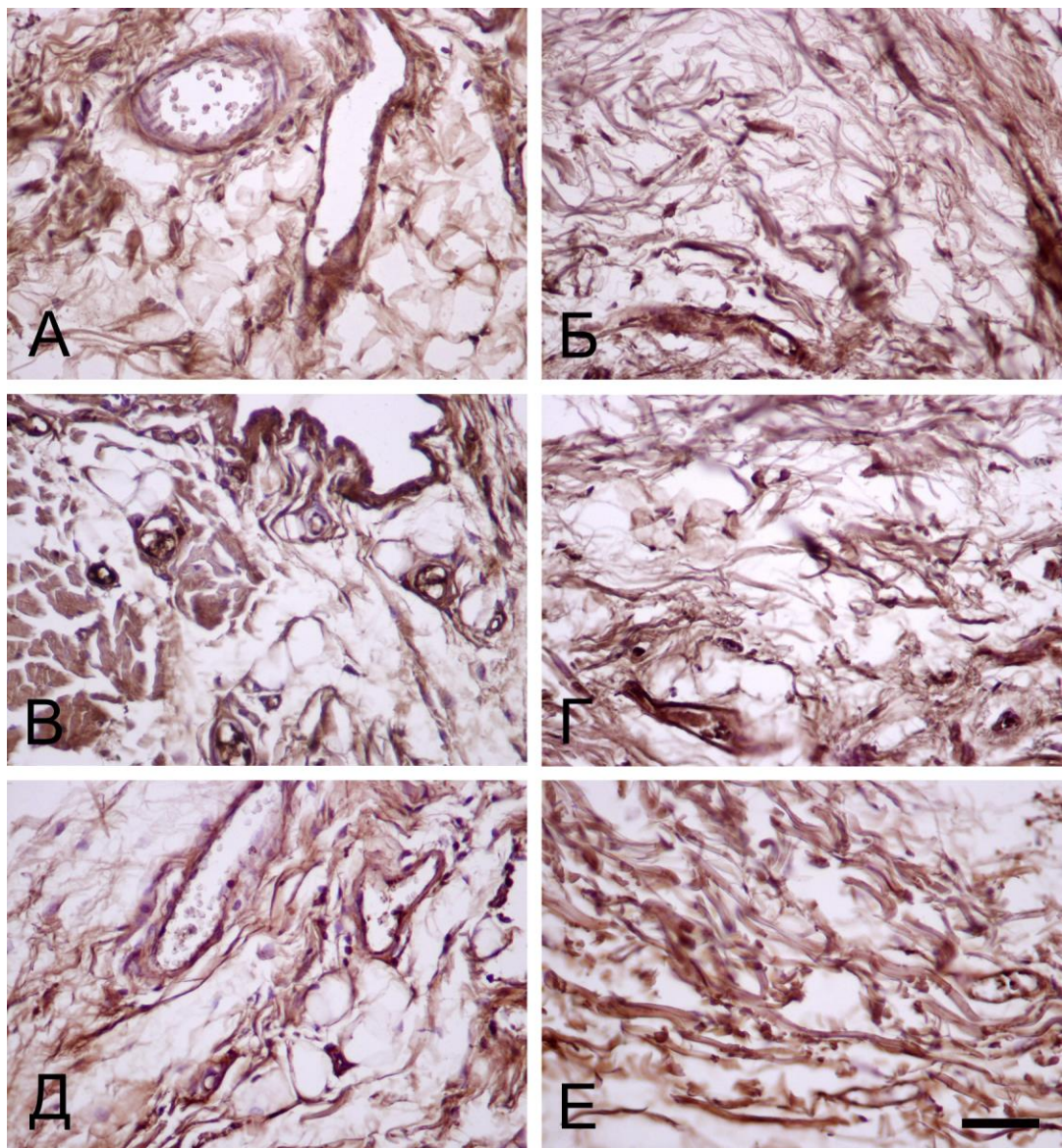
(Фигури V.6 А и V.8 А). В стените на кръвоносните съдове, в периферията на адипоцитите и в периферния слой на ЕЛ се наблюдаваше имунореактивност за проколаген тип III (Фигура V.5 В, Г и Фигура V.7 В, Г). Експресията на този колаген в лигаментата при МКВ и ПКВ и бе слаба до липсваща (Фигури V.6 Б и V.8 Б). Имунохистохимичната реакция за колаген тип V се отчете най-вече в адвентицията на кръвоносните съдове, в повърхностния слой на ЕЛ и при двата лигаментата (Фигура V.5 Д, Е и Фигура V.7 Д, Е). Експресията му в лигаментата при МКВ и ПКВ бе слаба до липсваща (Фигури V.6 В и V.8 В).



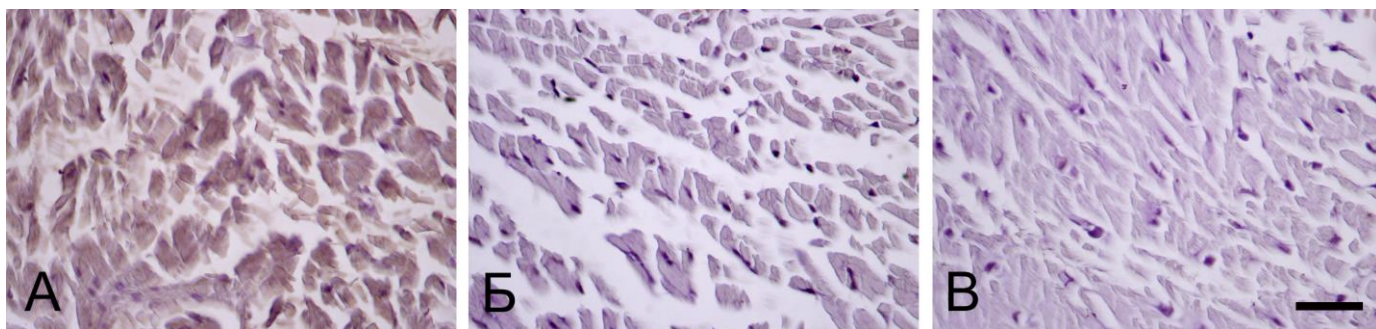
**Фигура V.5.** Имунохистохимична реакция (ИХР) за колаген тип I, III и V в епилигаментата на МКВ на плъх. А, Б) ИХР за колаген тип I; В, Г – ИХР за колаген тип III; Д, Е – ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 50  $\mu$ m.



**Фигура V.6.** ИХР за колаген тип I, III и V в лигаментарната част на МКВ на плъх. А) ИХР за колаген тип I; Б) ИХР за колаген тип III; В) ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 50  $\mu$ m.



**Фигура V.7.** ИХР за колаген тип I, III и V в епилигамента на ПКВ на плъх. А, Б) ИХР за колаген тип I; В, Г – ИХР за колаген тип III; Д, Е – ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 50  $\mu$ m.



**Фигура V.8.** ИХР в ЕЛ на ПКВ на плъх. А, Б) ИХР за колаген тип I; В, Г – ИХР за колаген тип III; Д, Е – ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$ .

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	<p><u>Силно позитивна (3+)</u> (6%)</p> <p><u>Позитивна (2+)</u> (58%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (19%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (17%)</p>	<p><u>Позитивна (2+)</u> (22%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (42%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (36%)</p>	<p><u>Позитивна (2+)</u> (25%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (56%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (19%)</p>	<p><u>Позитивна (2+)</u> (27%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (39%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (34%)</p>
Проколаген тип III	<p><u>Силно позитивна (3+)</u> (56%)</p> <p><u>Позитивна (2+)</u> (22%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (13%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (9%)</p>	<p><u>Позитивна (2+)</u> (3%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (50%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (47%)</p>	<p><u>Позитивна (2+)</u> (49%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (30%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (21%)</p>	<p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (31%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (69%)</p>
Колаген тип V	<p><u>Силно позитивна (3+)</u> (39%)</p> <p><u>Позитивна (2+)</u> (35%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (20%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (6%)</p>	<p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (12%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (88%)</p>	<p><u>Позитивна (1+)</u> (44%)</p> <p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (31%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (25%)</p>	<p><u>Слабо позитивна (1+)</u> (17%)</p> <p><u>Негативна (0)</u> (83%)</p>

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

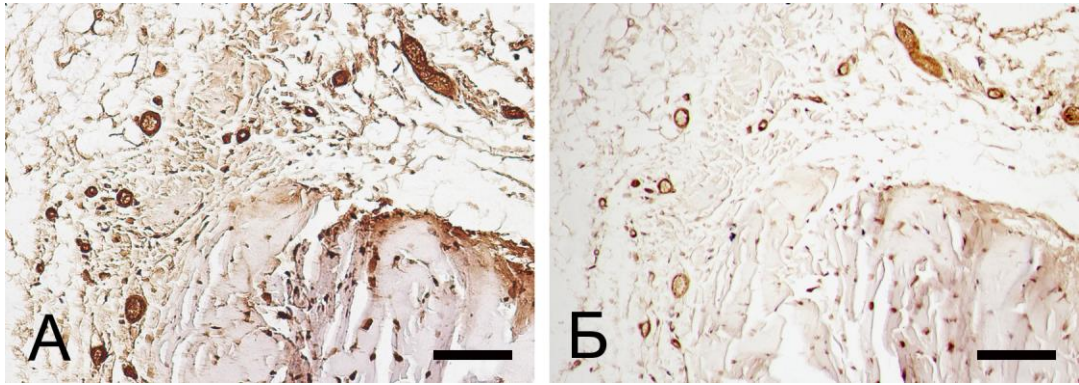
Установиха се разлики в ЕЛ при МКВ и ПКВ, както и вариации в експресията на изследваните молекули.

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.1.1.4 Експресия на ММП-2 и -9 в ЕЛ на МКВ и ПКВ на плъх*

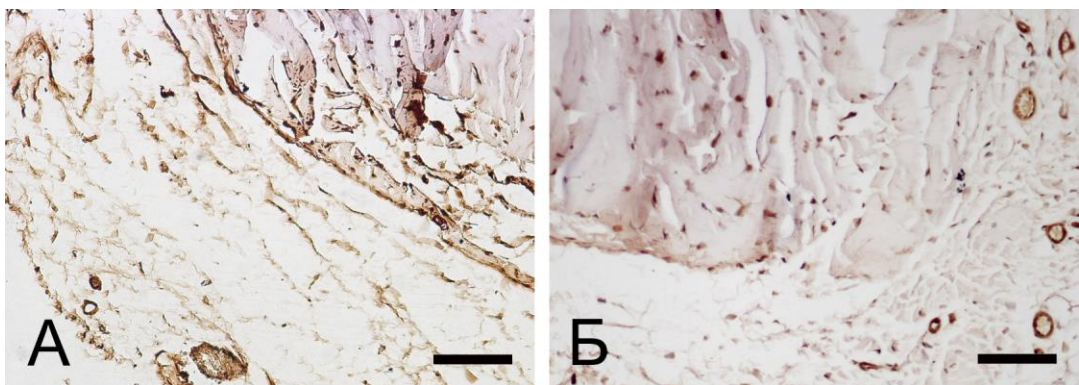
Положителната реакция за ММП-2 бе отчетена предимно в ЕЛ в сравнение с лигаментарната тъкан. Адвентицията на кръвоносните съдове в ЕЛ също показва положителна експресия за ММП-2. Фибробластите в лигамента експресират ММП-2. (Фигура V.11)

Получените данни за ММП-2 и -9 при МКВ може да се обобщят по следния начин: положителна (2+) експресия в 80% и слабо позитивна (1+) експресия в останалите 20% от полетата. В лигамента се отчита предимно отрицателна реакция (0) в 80% от зрителните полета и като слабо положителна (1+) в останалите 20%. Ензимната активност на ММП-9 в ЕЛ е слабо положителна (1+) в 65% от зрителните полета, положителна (2+) в 25% и отрицателна (0) в 10% от зрителните полета. В лигаментарната тъкан експресията на ММП-9 е отрицателна (0) в 90% от зрителните полета и слабо положителна (1+) в 10% от зрителните полета.



**Фигура V. 11.** А, Б) ИХР за ММП-2 и -9 в ЕЛ и лигамент на МКВ на плъх.  
Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ .

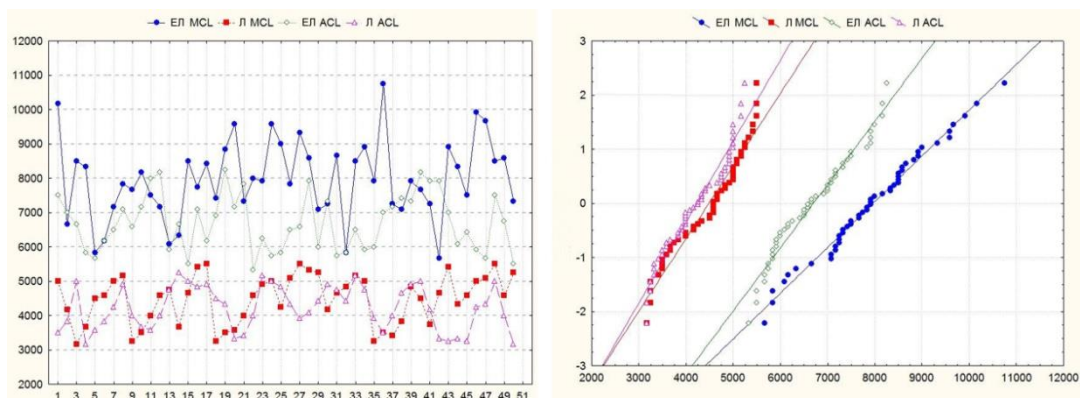
Получените данни за ММП-2 и -9 при ПКВ може да бъдат обобщени така: в ЕЛ на ПКВ при 75% от зрителните полета имунореактивността е ниско положителна (1+), докато в останалите 25% тя се изчислява като положителна (2+); в лигаментарната тъкан ензимната активност е предимно отрицателна (93% от зрителните полета) или ниско положителна (1+) (7% от зрителните полета). Разпределението на имунореактивността на ММП-9 в ЕЛ е слабо положителна (1+) в 85% от зрителните полета и отрицателна (0) в 15% от зрителните полета. В лигаментарната тъкан ензимната активност е отрицателна (0) в 92% от зрителните полета и ниско положителна (1+) в останалите 8% от зрителните полета.



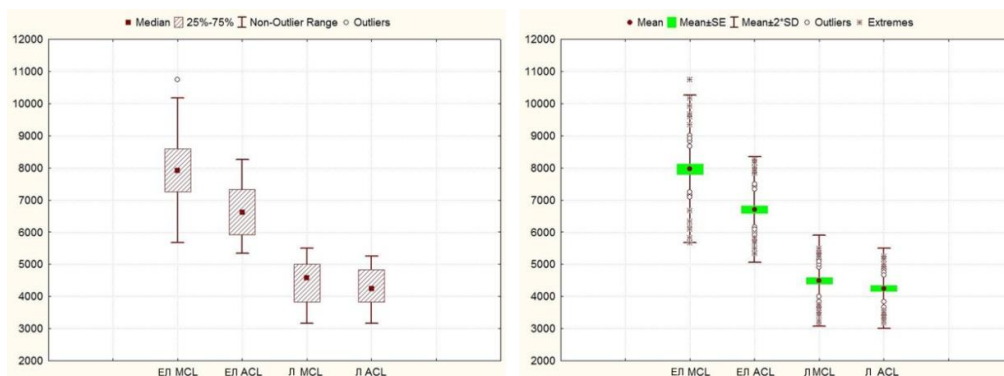
**Фигура V. 12.** А, Б) ИХР за ММП-2 и -9 в ЕЛ и лигамент на ПКВ на плъх.  
А) Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ ; Б) Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$

## V.2 Количествен анализ на ЕЛ и лигаментта при плъх

Броя на клетките е оценен на площ от  $0,012 \text{ mm}^2$  в 50 области от препаратата, както на ЕЛ така и на самия лигамент, след което се изчислява пропорционално на площ от  $1 \text{ mm}^2$ . 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  $\text{mm}^2$  бе тествана със Student T-test. Статистически значима разлика ( $p < 0,05$ ) е отчетена между средните стойности за брой клетки на  $\text{mm}^2$  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.10А.** Графика показваща обхвата на получените стойности за броя клетки на  $\text{mm}^2$  в ЕЛ и лигаментта (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.10Б.** 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). 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). Отсечките под и над правоъгълника показват средната стойност, коригирана с две стандарти отклонения (2SD).

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

Таблица 2. Таблица представяща дескриптивния статистически анализ на данните за броя на клетките на  $\text{mm}^2$  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
<b>ЕЛ МКВ с/у ЕЛ ПКВ</b>	7963.33	6701.67	1261.66	1148.44	822.22	0.000
<b>Л МКВ с/у Л ПКВ</b>	4483.33	4230	253.33	708.11	636.11	0.063

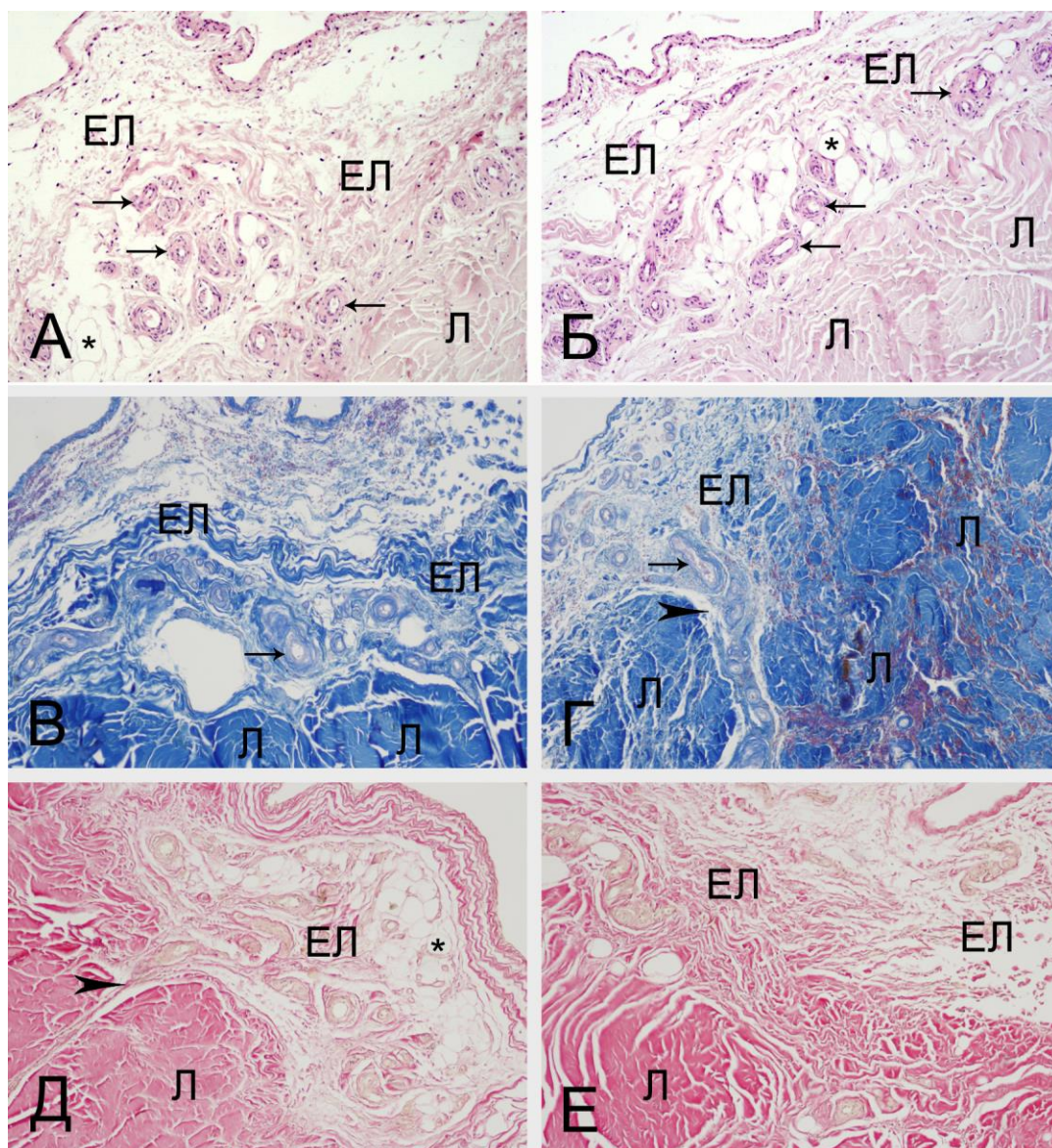
Таблица 3. Таблица представяща разликите между средните стойности на данните за броя на клетките на  $\text{mm}^2$  в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. SD - стандартни отклонения.

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

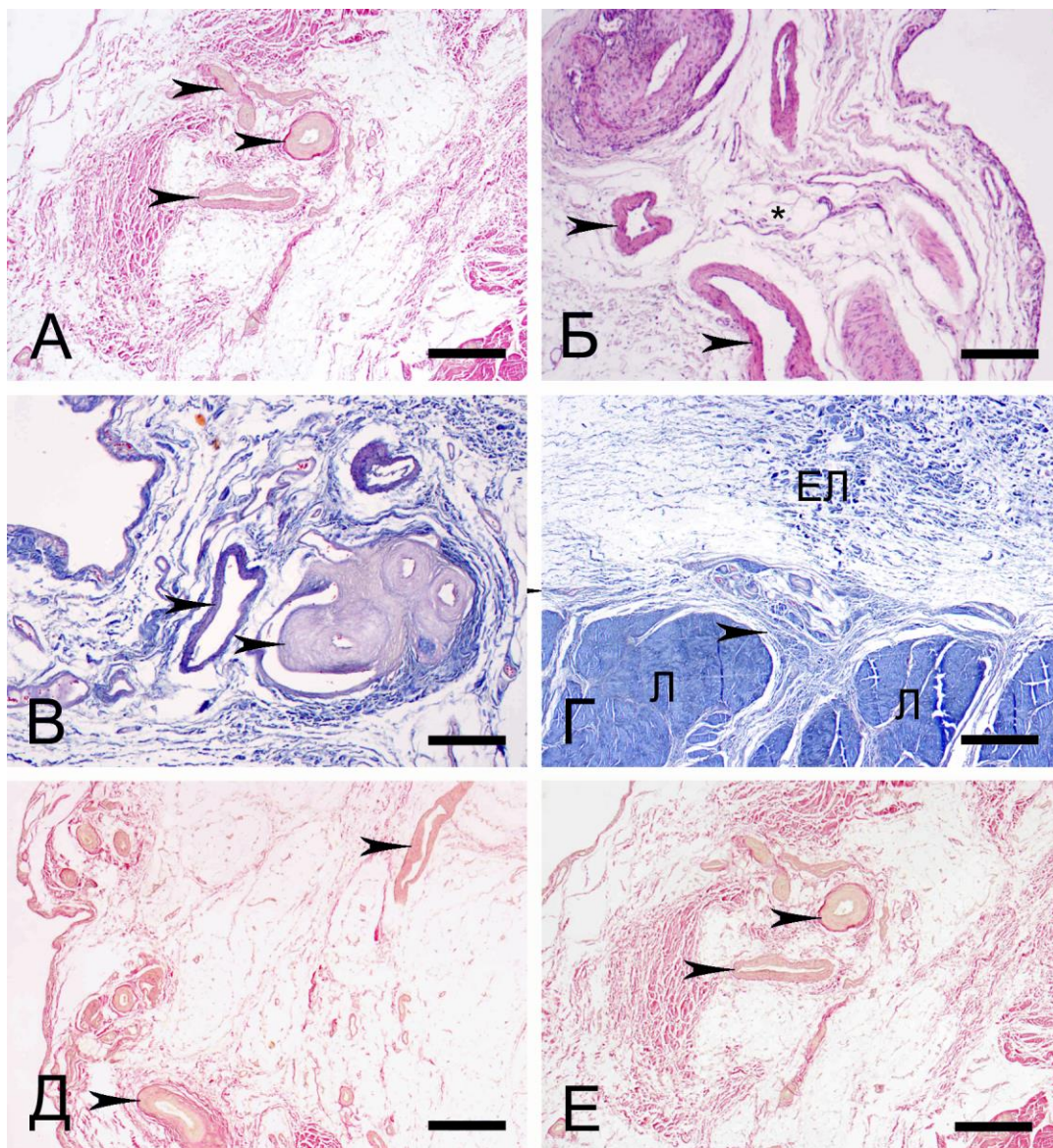
#### *V.3.1 Светлинно микроскопски наблюдения на ЕЛ на МКВ и ПКВ на човек.*

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.13). 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. 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.13.** 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  $\mu\text{m}$ . В, Г) Оцветяване по Малори . Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$  . Д, Е) Оцветяване по ван Гизон. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ .



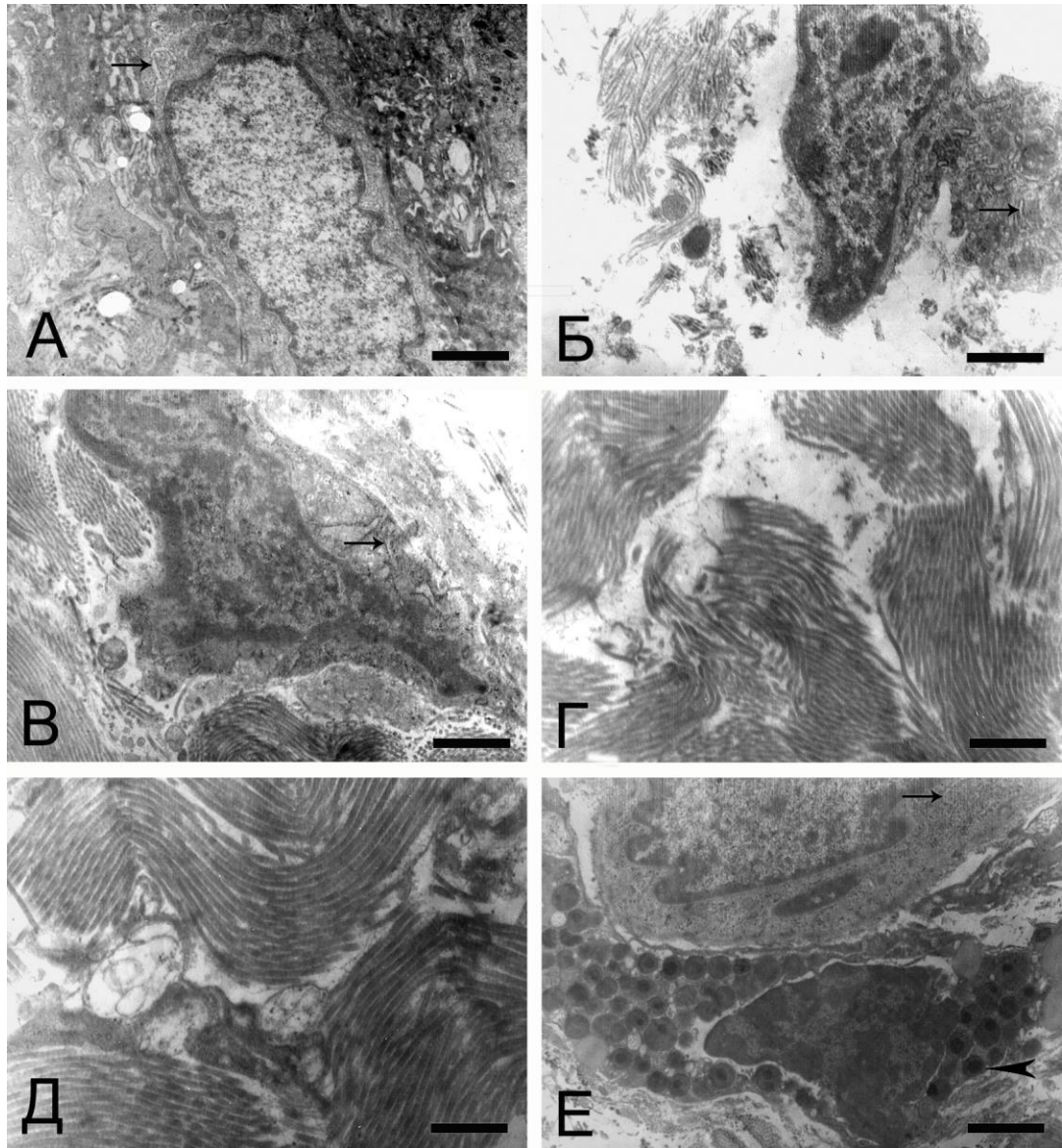
**Фигура V.14.** Нормална морфология на ЕЛ и лигаментарната тъкан на ПКВ при човек. ЕЛ – епилигамент; Л – лигамент; стрелки – кръвоносни съдове в ЕЛ; звездички – адипоцити. А) Хематоксилин еозин. Скала – А) 100  $\mu\text{m}$ , Б) 50  $\mu\text{m}$ . В, Г) Оцветяване по Малори . Скала – 50  $\mu\text{m}$  . Д, Е) Оцветяване по ван Гизон. Д) Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ , Е) Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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

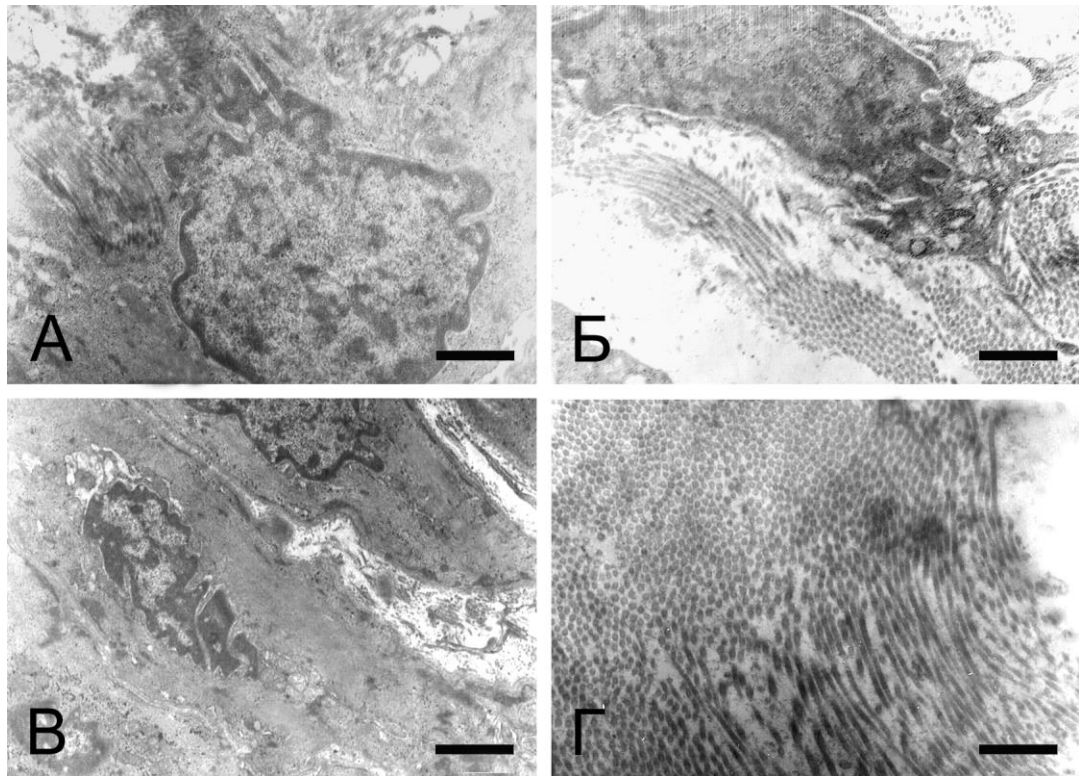
ТЕМ представи наличието на различни по форма фибробласти в ЕЛ: с удължена или вретеновидна форма, с множество спинозни израстъци и такива с неправилна форма. Те имаха големи ядра, добре развит гранулиран ендоплазмен ретикулум, множество рибозоми, слабо развит апарат на Голджи, единични

митохондрии и лизозоми с овална форма (Фигура V.15 А-В, V.16 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.15 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.15 Г, Д, V.16 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 преваляраха 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 лигаментната 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.15.** Нормална морфология на ЕЛ на МКВ при човека. А-В) електронограма на фибробласт с добре представено голямо неговото ядро. В цитоплазмата се наблюдават митохондриите, лизозомите и гранулитан ендоплазмен ретикулум (стрелка); в извънклетъчното пространство има наличие на множество колагенови влакна x 7000. Г, Д) електронограма на колагенови влакна извънклетъчното пространство на ЕЛ, ориентирани в различни посоки X 7000, X 9000. Е) електронна микрография на фибробласт и мастоцит (Mc) с многобройни гранули (глава на стрелка) и неговото ядро. X 9000.



**Фигура V.16.** Нормална морфология на ЕЛ на ACL при човека. 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.*

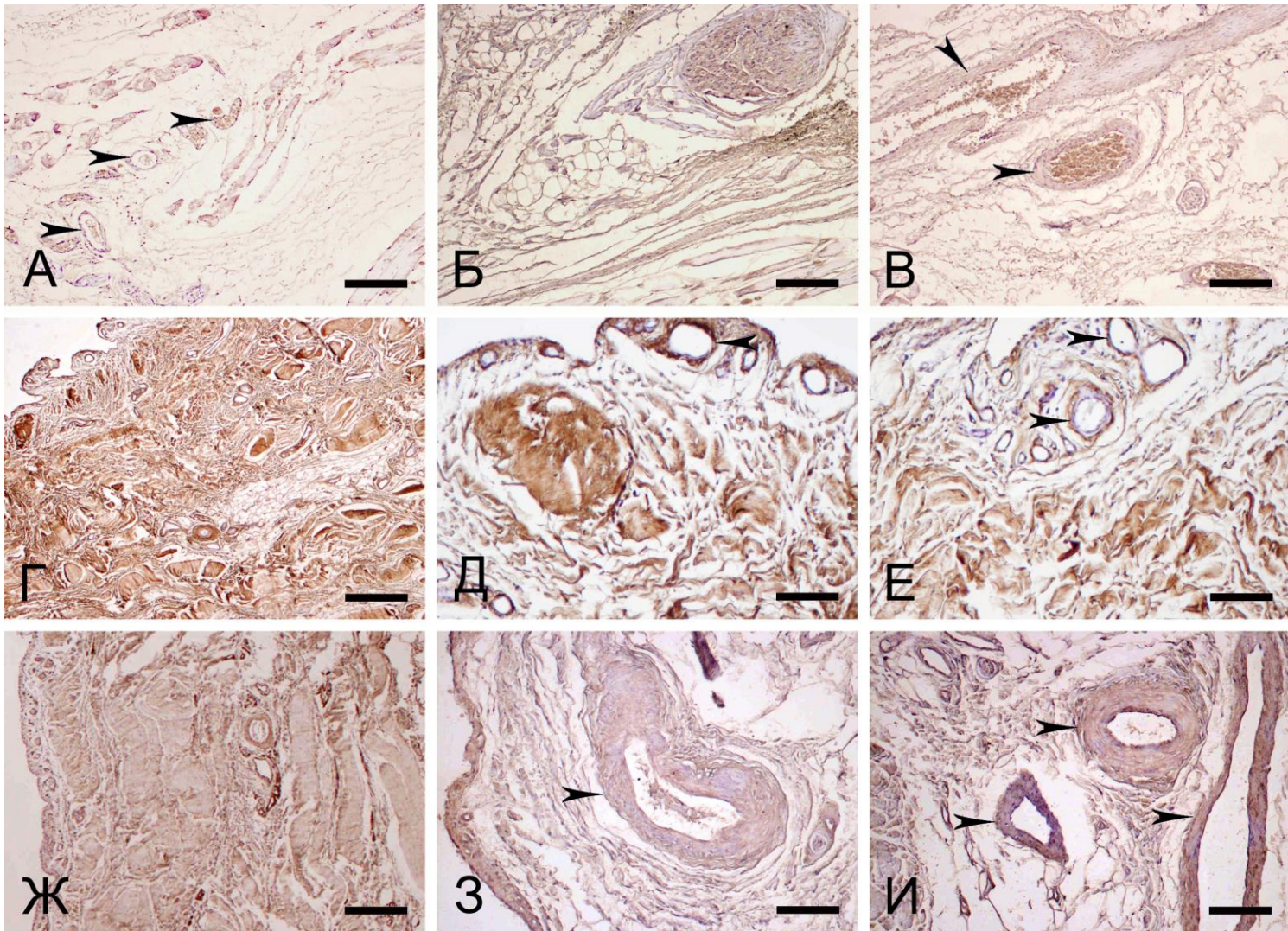
#### *V.3.3.1. Експресия на колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ и ПКВ при човек*

В ЕЛ имунологична експресия за колаген тип I се наблюдава основно в tunica media на кръвоносните съдове (Фигура V.17 В). В лигаментарната тъкан на МКВ и на ПКВ имунореактивността е проявена на целия препарат (Фигура V.19 А, Фигура V.20 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.17 Г-Е; Фигура V.18 Г-Е). В лигаментарната тъкан на МКВ експресията е силно изразена навсякъде. (Фигура V.19 Б). В

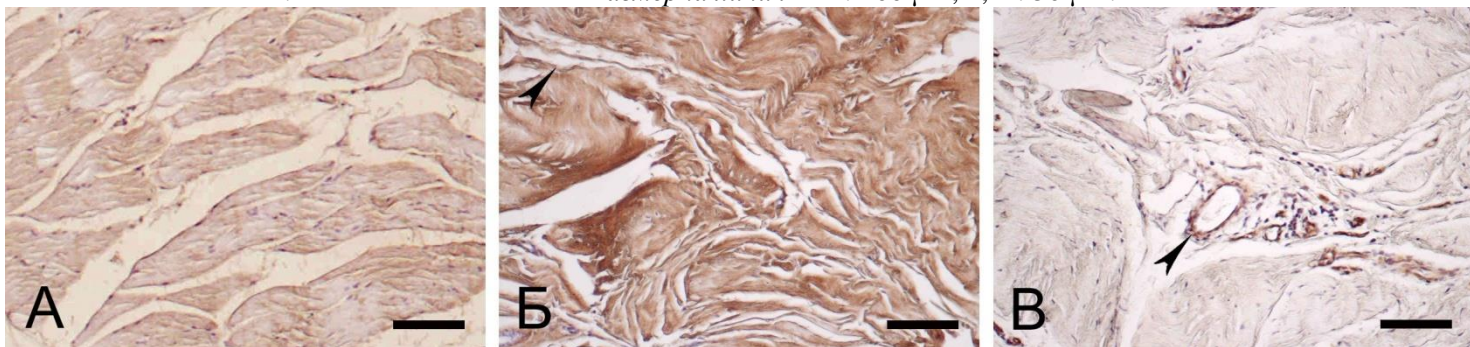
лигаментарната тъкан на ПКВ имунореактивността е слабо представена до липсваща (Фигура V.20 Б). Колаген тип V се експресира основно в tunica media на кръвоносните съдове и в повърхностния слой на ЕЛ на двата лигамента (Фигура V.17 Ж-И; Фигура V.18 Ж-И). В лигаментарната тъкан експресията му бе слаба до липсваща (Фигура V.19 В; Фигура V.20 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%)

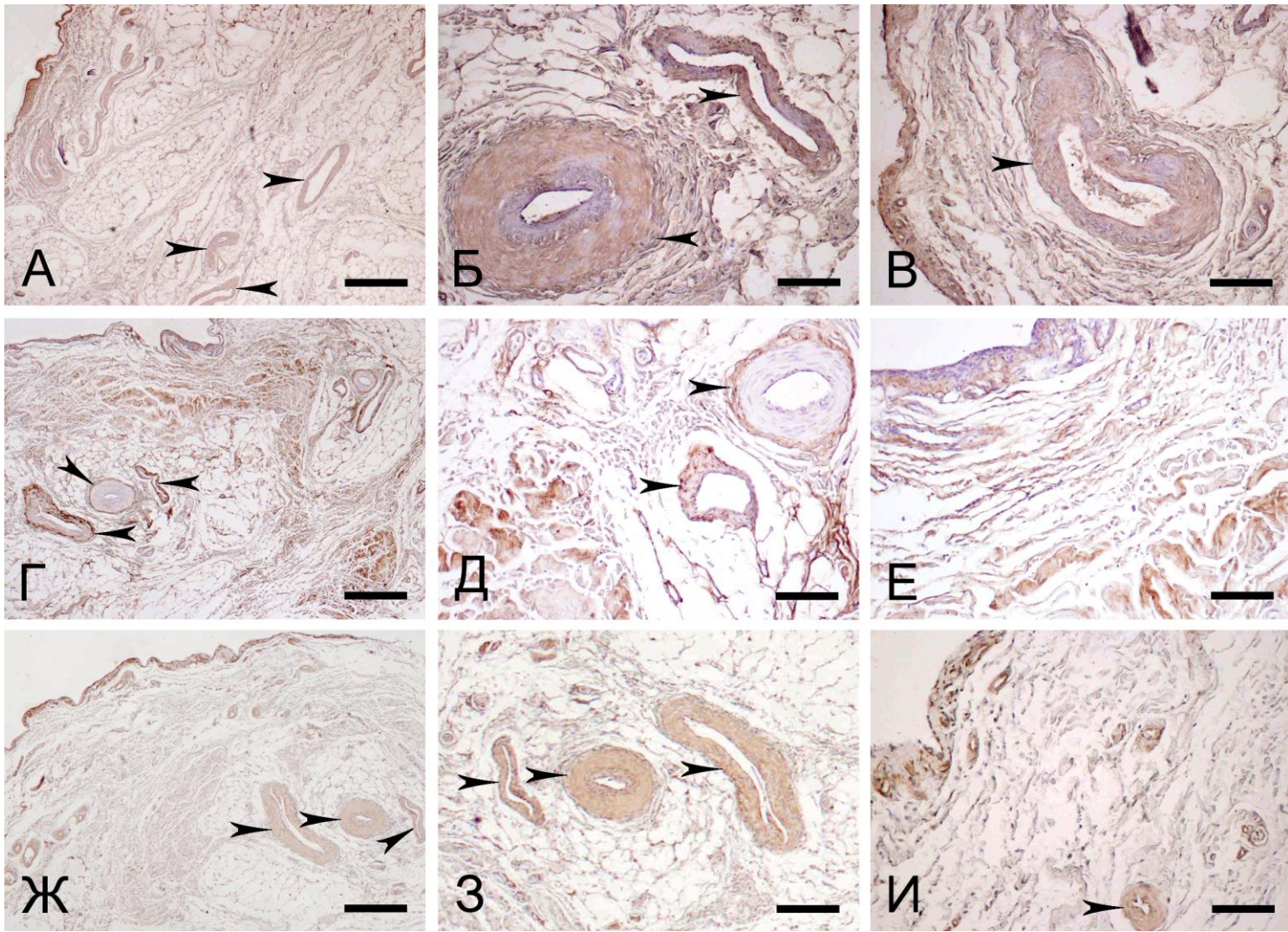
Таблица 4 представяща интензитетът на имунохистохимичната реакция на колаген тип I, и V и проколаген III изчислен полуколичествено използвайки ИНС Profiler.



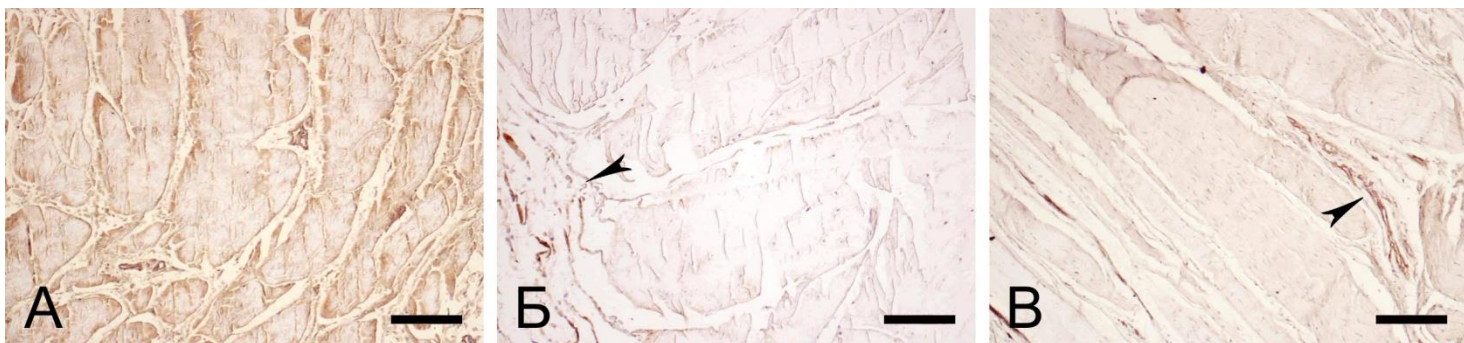
**Фигура V.17.** ИХР за колаген тип I и V и проколаген тип III в ЕЛ на МКВ при човек. Стрелки – означаващи имунореактивният продукт в tunica adventicia и tunica media на кръвоносните съдове. А-В. ИХР за колаген тип I. *Размерна линия*-100  $\mu\text{m}$ . Г-Е. ИХР за проколаген тип III. *Размерна линия* - Г: 200  $\mu\text{m}$ ; Д, Е: 50  $\mu\text{m}$ . Ж-И. ИХР за колаген тип V. *Размерна линия* - Ж: 200  $\mu\text{m}$ ; З, И: 50  $\mu\text{m}$ .



**Фигура V.18.** ИХР за колаген тип I и V и проколаген тип III в лигаментарната част на МКВ при човек. Стрелки – ендוליгамент, обвиващ отделните колагенови снопове в лигаментарната тъкан. А) ИХР за колаген тип I. *Размерна линия* - 50  $\mu\text{m}$ . Б) ИХР за проколаген тип III. *Размерна линия* - 50  $\mu\text{m}$ . В) ИХР за колаген тип V. *Размерна линия* - 50  $\mu\text{m}$ .



**Фигура V.19.** ИХР за 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. ИХР за колаген тип I. *Размерна линия* – А) 200  $\mu\text{m}$ ; Б, В) 50  $\mu\text{m}$ . Г-Е. ИХР за проколаген тип III. *Размерна линия* - Г: 200  $\mu\text{m}$  ; Д, Е: 50  $\mu\text{m}$ . Ж-И ИХР за колаген тип V. *Размерна линия* - Ж: 200  $\mu\text{m}$ ; З, И: 50  $\mu\text{m}$ .

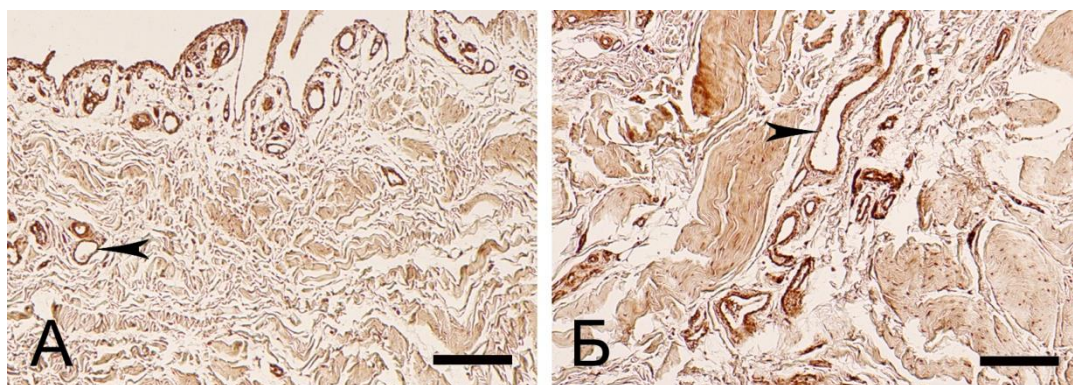


**Фигура V.20.** ИХР за колаген тип I и V и проколаген тип III в лигаментарната част на ПКВ при човек. Стрелки – ендолигамент, обвиващ отделните колагенови снопове. А). ИХР за колаген тип I. *Размерна линия* - 100  $\mu\text{m}$ . Б) ИХР за проколаген тип III. *Размерна линия* - 200  $\mu\text{m}$ . В) ИХР за колаген тип V. *Размерна линия* - 100  $\mu\text{m}$ .

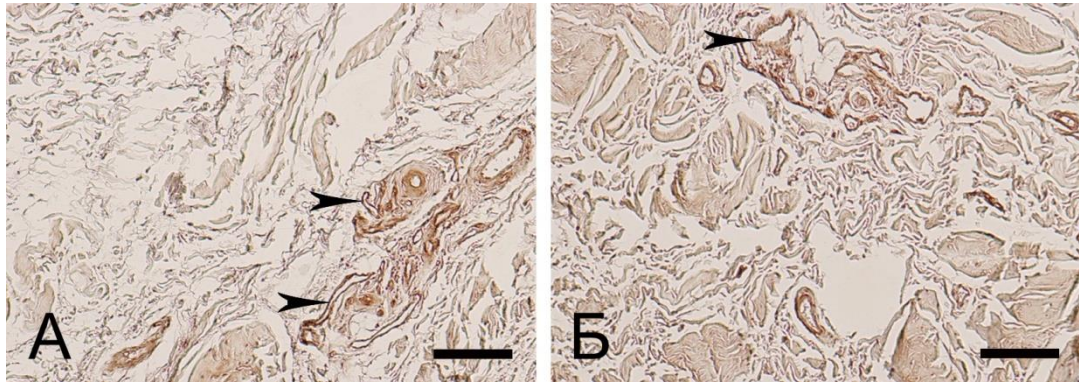
В настоящето изследване бяха установени някои разлики в ЕЛ при МКВ и ПКВ на човек, както и вариации в експресията на изследваните колагени. Експресията на колаген тип I бе отчетена, като слабо позитивна (1+) в ЕЛ и позитивна (2+) в лигаментарната тъкан и на двата лигамента. Експресията на проколаген 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.21). Имунопозитивната реакция за ММП-9 бе слабо представена най-вече в адвентицията на съдовете и периваскуларно (Фигура V.22).



**Фигура V.21** А, Б) ИХР за ММП-2 в ЕЛ и лигамента на МКВ на човек. Стрелка – кръвоносен съд. А) Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ . В) Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$ .



**Фигура V.22** А, Б) ИХР за ММП-9 в ЕЛ и лигамент на МКВ на човек. Стрелка – кръвоносен съд. А) Размерна линия - 100 µm. В) Размерна линия - 50 µm.

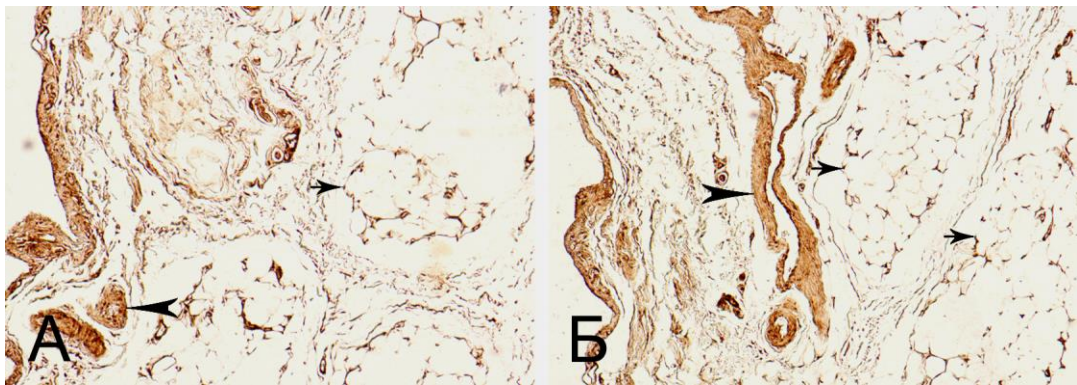
Полуколичественият анализ за ММП-2 представи положителна (2+) експресия в ЕЛ при 70% от визуалните полета и слабо позитивна (1+) в останалите 30%. Трябва да се отбележи, че някои фибробласти в лигаментарната тъкан също показваха положителна експресия за ММП-2. Имунореактивността бе отчетена, като отрицателна (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*

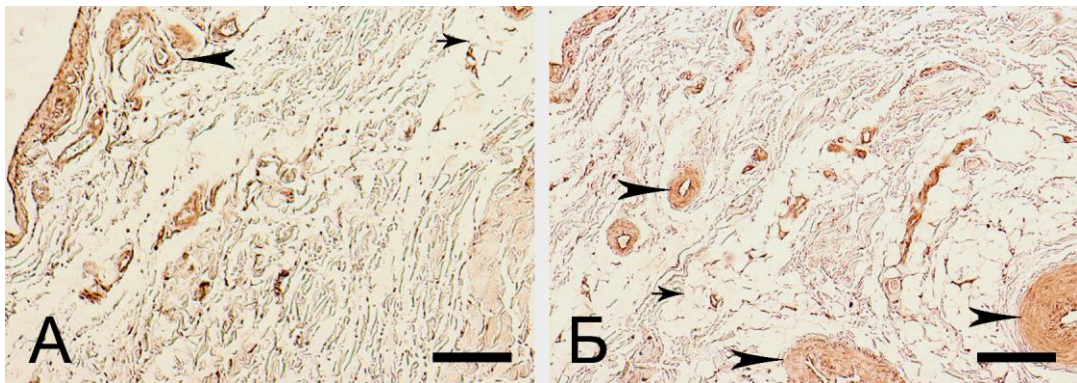
В ЕЛ на ПКВ експресията на ММП-2 бе локализирана във фибробластите, клетките на мастната тъкан и адвентицията на кръвоносните съдове (Фигура V.23). В 74% от зрителните полета имунореактивността бе отчетена, като ниско положителна (1+), докато в останалите 26% тя бе изчислена като положителна (2+). В 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.24). 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.



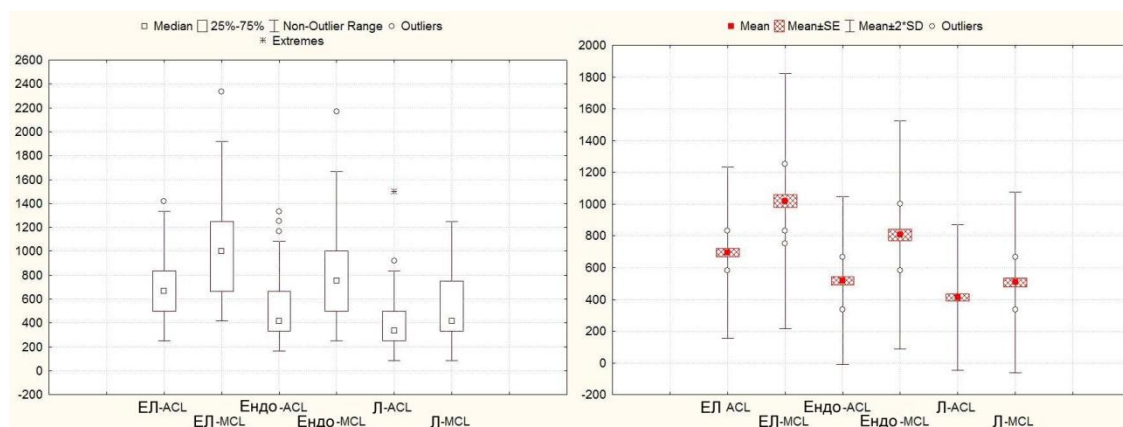
**Фигура V.23.** А, Б) ИХР за ММП-2 в ЕЛ и лигамента на ПКВ на човек. Глава на стрелка – кръвоносен съд; стрелка – група от мастни клетки. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ .



**Фигура V.24.** А, Б) ИХР за ММП-9 в ЕЛ и лигамента на ПКВ на човек. Глава на стрелка – кръвоносен съд; стрелка – група от мастни клетки. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ .

## 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.25; Таблица 5).



**Фигура V.25** 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. 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 SE Отсечките под и над правоъгълника показват средната стойност коригирана с 2SD.

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

Таблица 5. Таблица представяща разликите между средните стойности на данните за броя на клетките на  $\text{mm}^2$  в ЕЛ и лигаментарната част (Л) на ПКВ и МКВ. SD - стандартни 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 отхвърлена - разликата между медианата на броя на клетките в лигаментарната тъкан на МКВ и ПКВ не бе статистически значима.

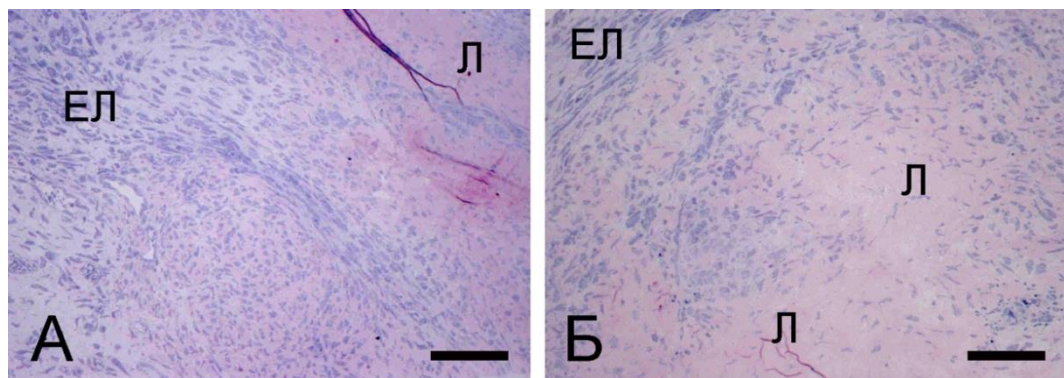
## **V.5 Експериментален модел на увреда на МКВ на колянна става у плъх**

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*

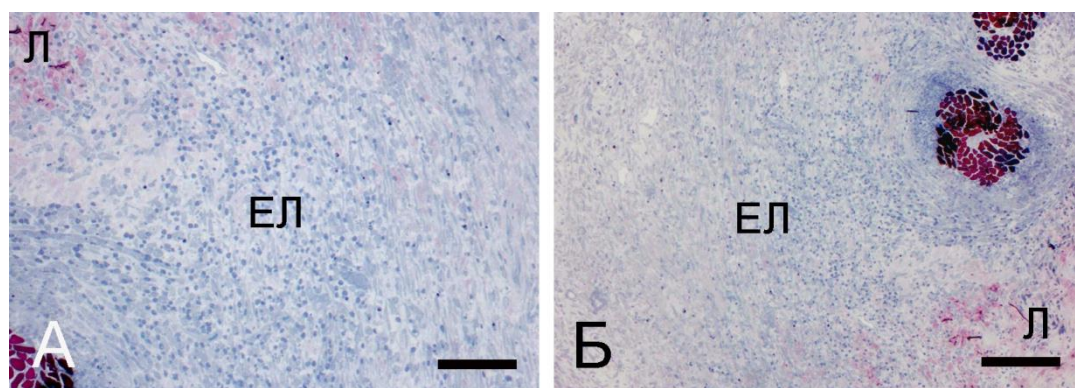
Резултатите от светлинно-микроскопското изследване показаха, че на 8-я ден след увредата съществува добре представена грануляционна тъкан между прерязаните краища на ставната връзка. Новообразуваната гранулоционна тъкан се отличава с добре различими граници и навлизаше към неувредените части на лигамента. 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 V26). Наблюдавах 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 капилляри от по-големите съдове в региона, както и единични кръвоносни съдове. Лумените на тези съдове бяха изпълнени с множество кръвни клетки.



**Фигура V26.** Светлинно-микроскопско изследване (СМИ) на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда на МКВ. ЕЛ, епилигамент; Л, лигаментарна част. А, В) 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  $\mu$ m.

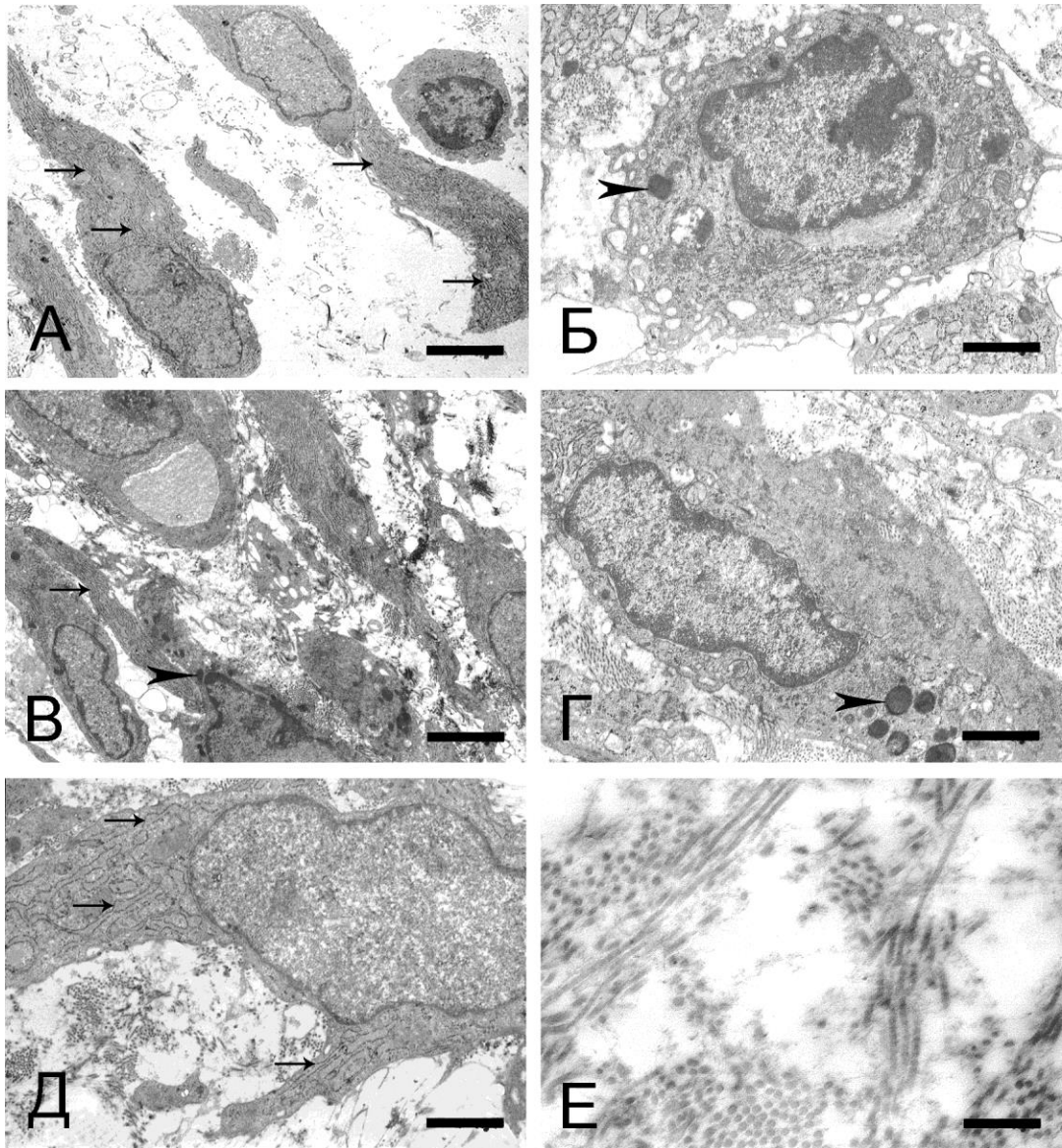
При животните лекувани с шев на МКВ се наблюдаваха сходни морфологични промени, като в допълнение бе отчетен добре представен слой от грануляционна тъкан около шевния материал. (Фигура V27)



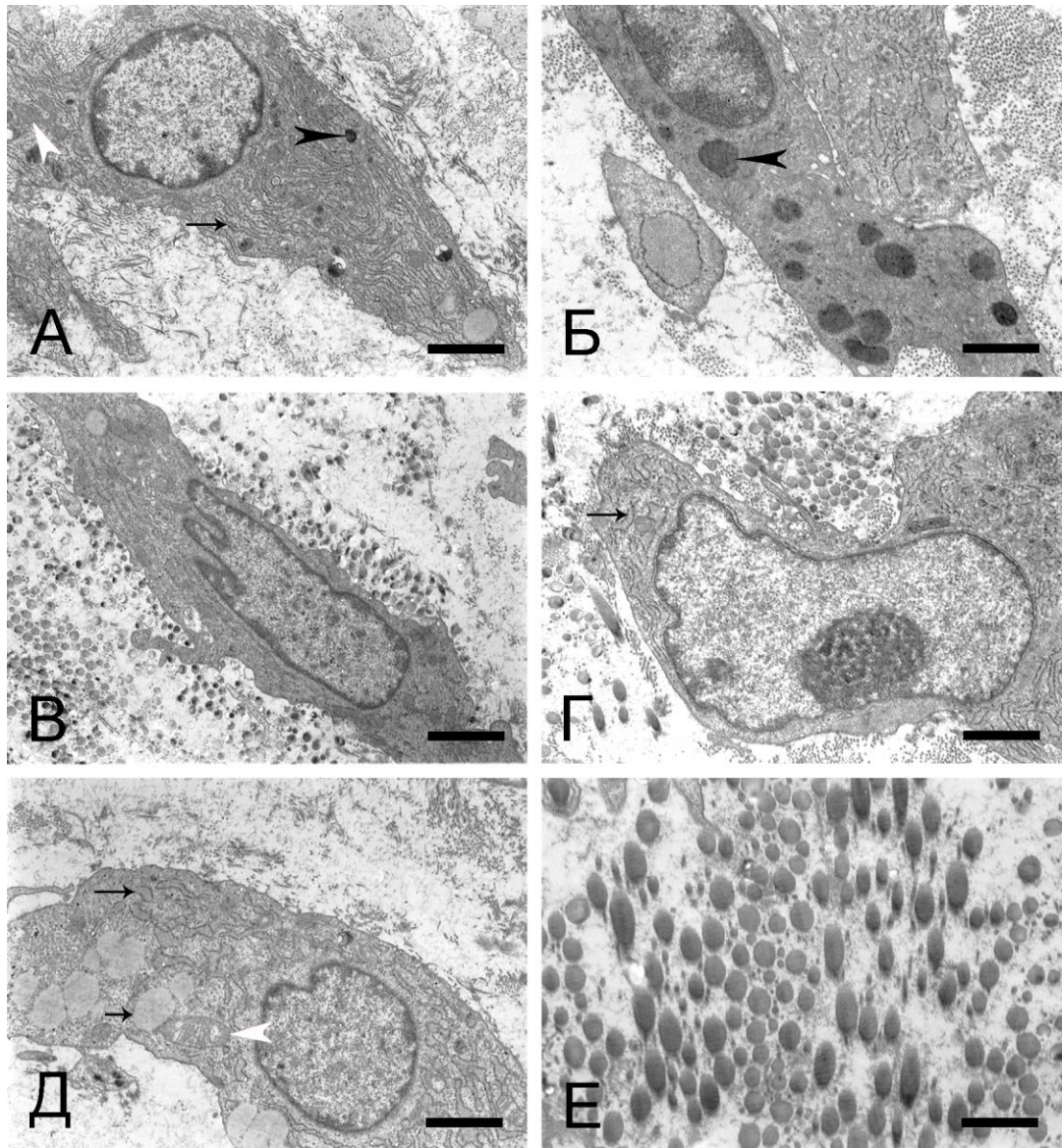
**Фигура V27.** СМИ на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда и шев на МКВ. А, Б) комплекс ЕЛ-лигамент -гранулоционна тъкан, съставена от значителни по размери фибробласти (в синьо) и дезорганизиран екстрацелуларен матрикс с колагенови влакна (в червено) и наличие на шевен материал обхванат от гранулоционна тъкан. Размерна линия, 100  $\mu\text{m}$ .

От ТЕМ през този период в ЕЛ се наблюдаваха добре оформени фибробласти (Фигури V28 А, В-Д; V29 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. Правеше впечатление в отделни клетки и обилното количество на вторични лизозоми в цитоплазмата им. Вторичните лизозоми бяха представени като електронноплътни 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 V28 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 V28 Е; V29 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 стриираност.



**Фигура V28.** ТЕМ на 8 ден след увредата на МКВ. А) Фб с големи ядра и преобладаващ ГЕР (стрелки). Размерна линия, 2.3  $\mu\text{m}$ . Б) Макрофаг с митохондрии с добре представени кристи (бяла стрелка) и лизозоми (черна глава на стрелка). Размерна линия, 1.4  $\mu\text{m}$ . В) Фб с големи ядра, преобладащ ГЕР (стрелки) и ясно видими лизозоми (черни стрелки). Размерна линия, 2,8  $\mu\text{m}$ . Г, Д) Фб с големи ядра, преобладащ ГЕР (стрелки), лизозоми (черна стрелка) и сферични митохондрии (бяла стрелка). Размерна линия, 1.4  $\mu\text{m}$ . Е) Хаотично разположени или ориентирани в малки снопове колагенови влакна в ЕЛ. Размерна линия, 0.6  $\mu\text{m}$ .

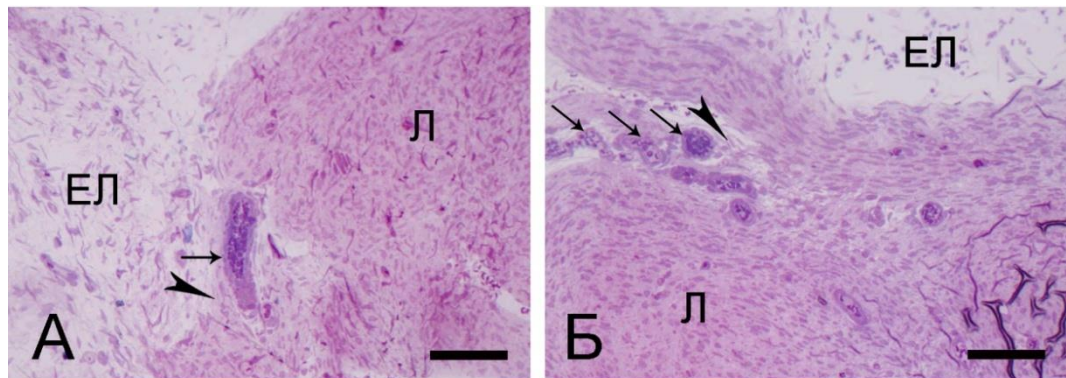


**Фигура V29.** ТЕМ на 8 ден след увредата на МКВ и последващ оперативен шев. А-Д) Фб с големи ядра, лизозоми (черна глава на стрелка), ГЕР (стрелки), митохондрии (бяла стрелка), вакуоли (къса стрелка) и колагенови влакна в ЕЦМ. Размерна линия, 2.3  $\mu\text{m}$  (А, В, Д), 1.4  $\mu\text{m}$  (Б), 1.5  $\mu\text{m}$  (Г). Е) Колагенни влакна. Размерна линия, 0,8  $\mu\text{m}$ .

#### *V.5.1.2 Шестнадесети ден след увреда на МКВ*

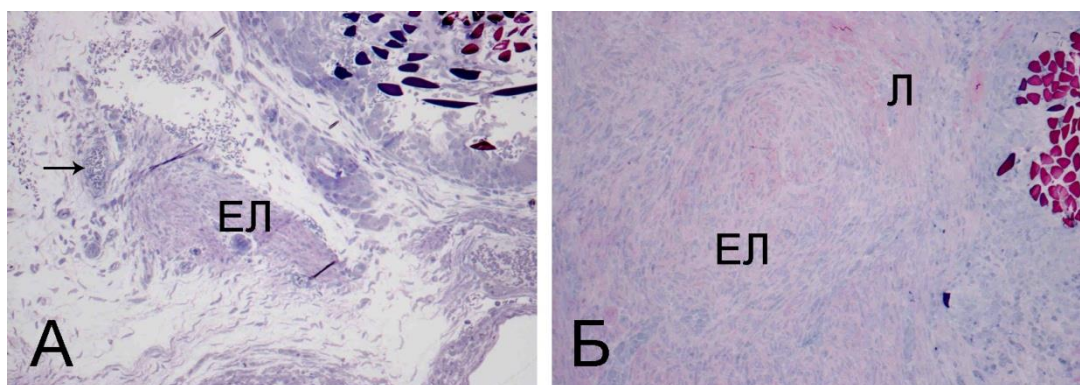
На шестнадесетия ден след увредата грануляционната тъкан все по-слабо се различаваше поради увеличени брой новообразувани колагенни влакна, смесващи се с тези на неувредената тъкан. Наблюдаваните в голямо количество фибробласти и прогениторни клетки в областта на ЕЛ бяха по-малко в сравнение с предишния период (Фиг. V30). Фибробластите локализираните в ЕЛ бяха

значително по организирани и компактни в сравнение с осмия ден от травмата и отново се ориентираха по посока към ендолигамента (Фиг. V30). 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, метакроматично оцветени гранули. Броят на кръвоносните съдове постепенно намаляваше.



**Фигура V30.** СМИ 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 Фб (в синьо), колагенови влакна (в червено) и кръвоносни съдове (стрелки), които навлизат към ендолигамента (стрелките). Размерна линия, 100  $\mu\text{m}$ .

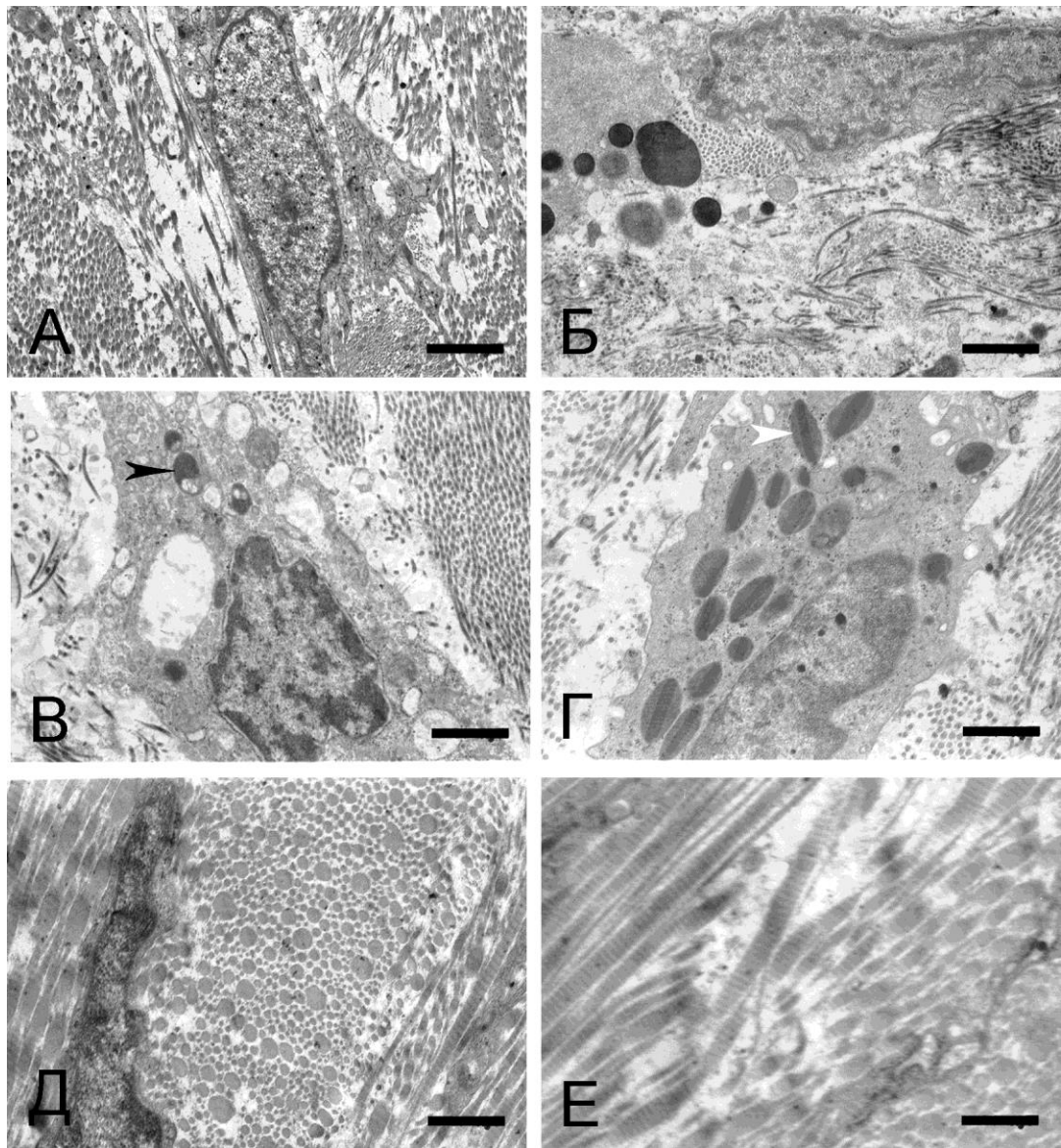
При животните лекувани с шев на МКВ се наблюдаваха сходни морфологични промени, като е необходимо да се отбележи, че слойт от грануляционна тъкан около шевния материал е значително намален. (Фиг. V31).



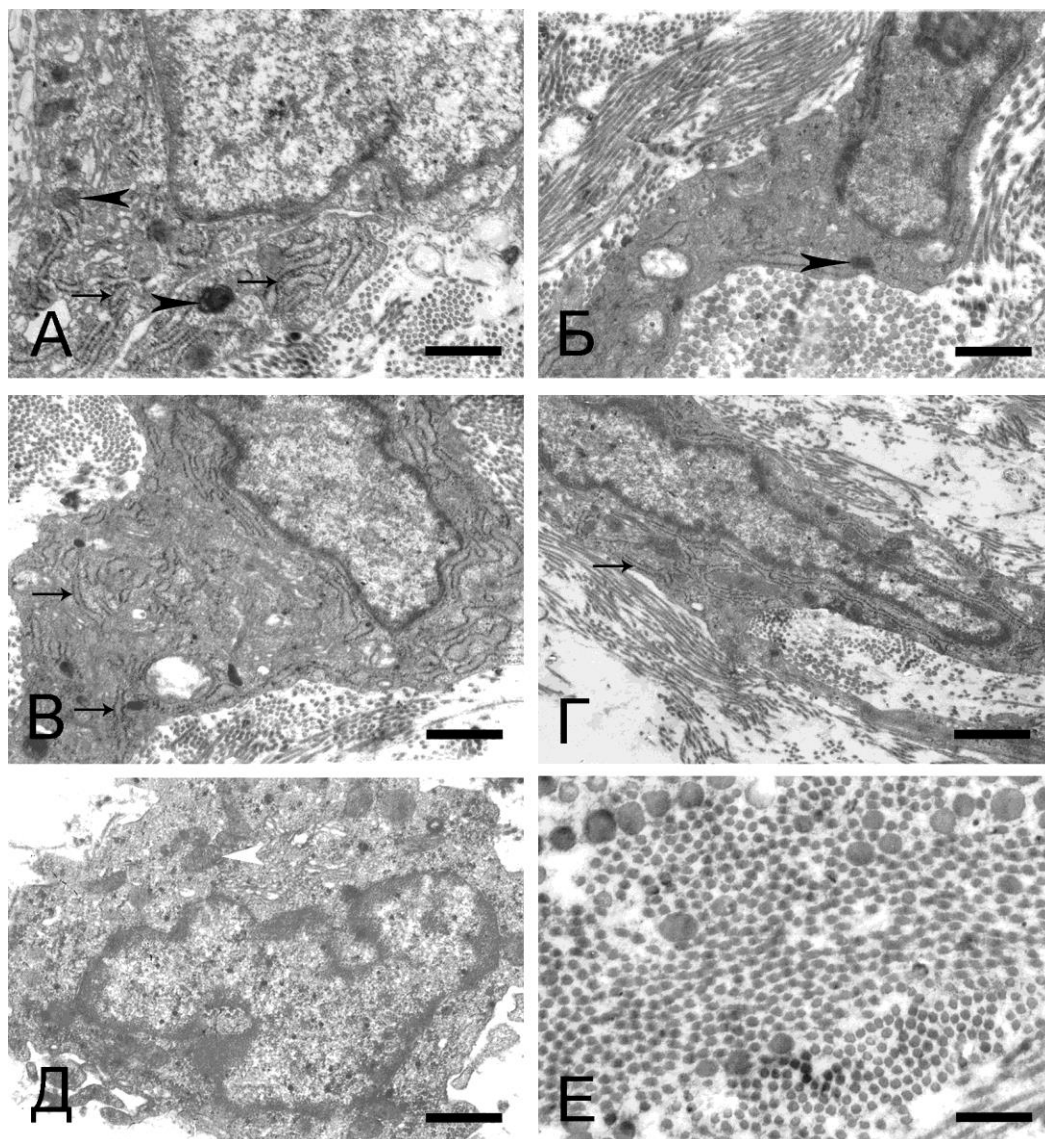
**Фигура V31.** СМИ на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда и шев на МКВ. А,Б) комплекса ЕЛ-лигамент в областта на увредата, съставен от Фб (в синьо), колагенови влакна (в червено), кръвоносни съдове (стрелка) и наличие на шевен материал заобиколен от гранулоционна тъкан. Размерна линия, 100  $\mu\text{m}$ .

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 V32 А-В; V33 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 V32 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 V33 Д). В междуклетъчното пространство броя на колагенните влакна групирани в снопове се увеличаваше в сравнение с предишния период (Фигури V32 Д,Е; V33 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 ендолигаментата се наблюдаваха и ориентирани по дължината на лигаментата

колагенни влакна с различен диаметър (големи и малки), характерни за лигамента.



**Фигура V32.** TEM на 16 ден след увредата на МКВ. А-В) Фибробласти с големи ядра, лизозоми (черна стрелка), ГЕР, митохондрии и колагенови влакна в извънклетъчния матрикс. *Размерна линия, 2.3  $\mu\text{m}$  (А), 1.4  $\mu\text{m}$  (Б), 1.3  $\mu\text{m}$  (В).* Г) Еозинофил с многобройни гранули (бяла стрелка). *Размерна линия, 0,8  $\mu\text{m}$ .* Д, Е) Колагенови влакна. *Размерна линия, 0.6  $\mu\text{m}$ .*

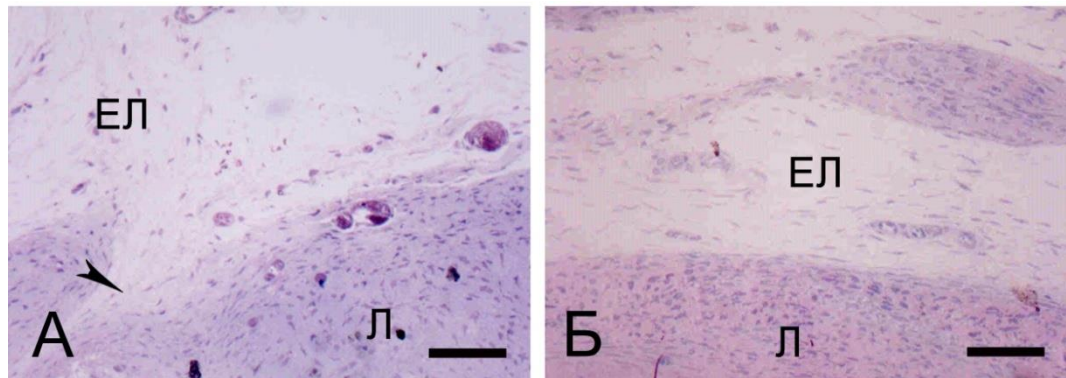


**Фигура V33.** ТЕМ на 16 ден след увредата на МКВ и последващ шев. А –Г) Фб с големи ядра, лизозоми (черни стрелки), ГЕР (стрелки), митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в извънклетъчния матрикс. *Размерна линия*, 0,8  $\mu\text{m}$  (А-В), 1,3  $\mu\text{m}$  (Г). Д) Макрофаг с многобройни псевдоподи и изявени митохондрии (бяла стрелка). *Размерна линия*, 0,8  $\mu\text{m}$ . Е) Колагенни влакна. *Размерна линия*, 0,2  $\mu\text{m}$ .

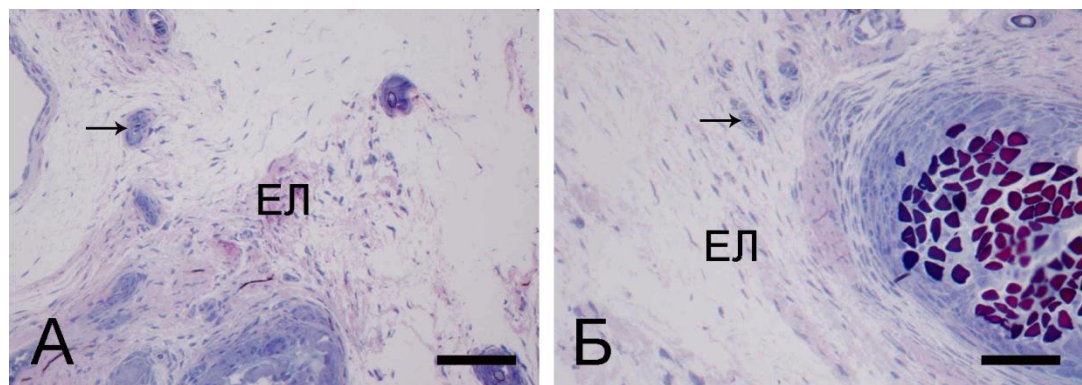
#### *V.5.1.3 Тридесети ден след увреда на МКВ*

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 V34 и 35).



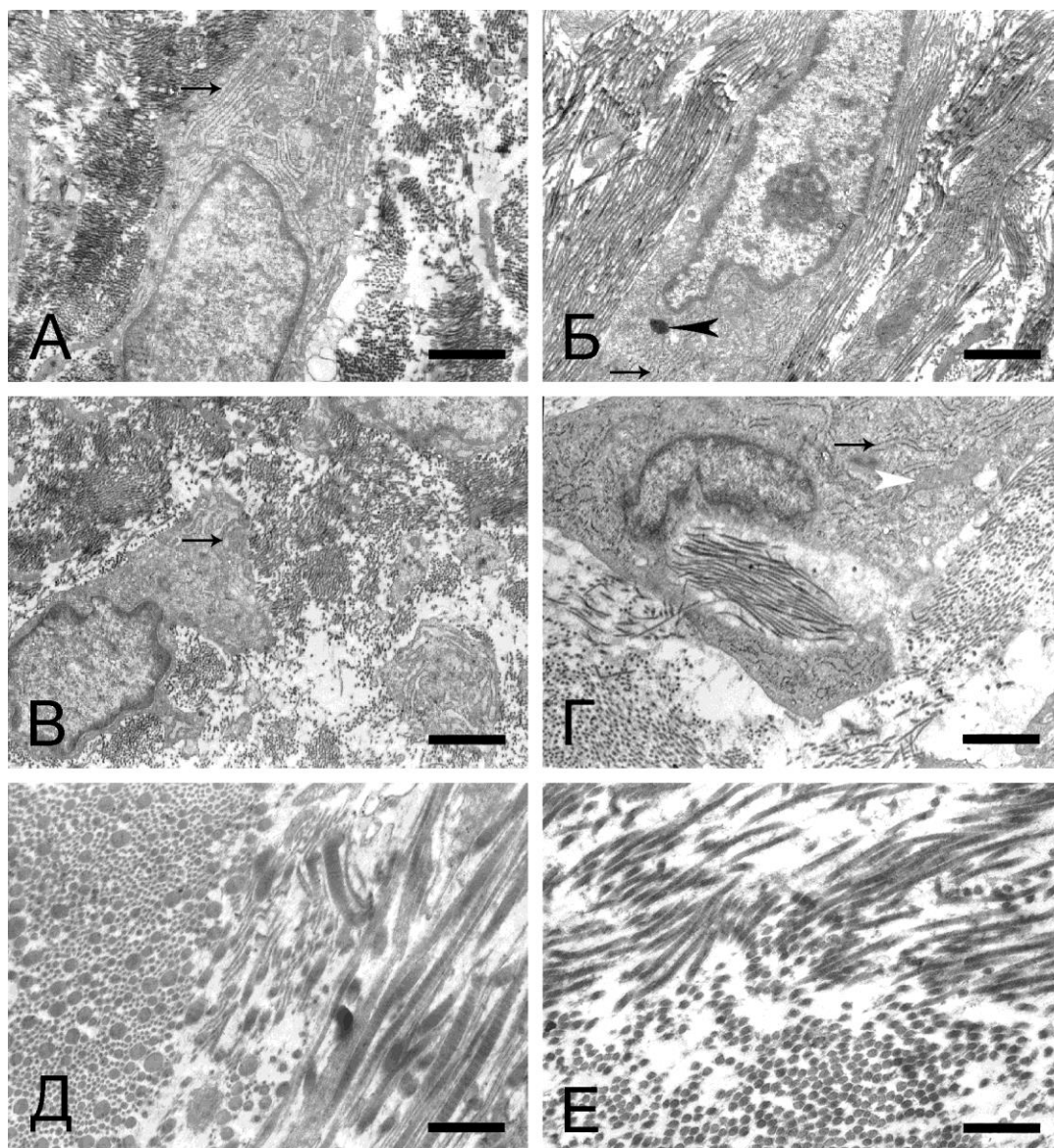
**Фигура V34.** СМИ на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увреда. А) ЕЛ-лигамент комплекс съставен от Фб (в синьо) и колагенови влакна (в червено), който продължава в ендолигамента (глава на стрелка). Размерна линия, 100  $\mu\text{m}$



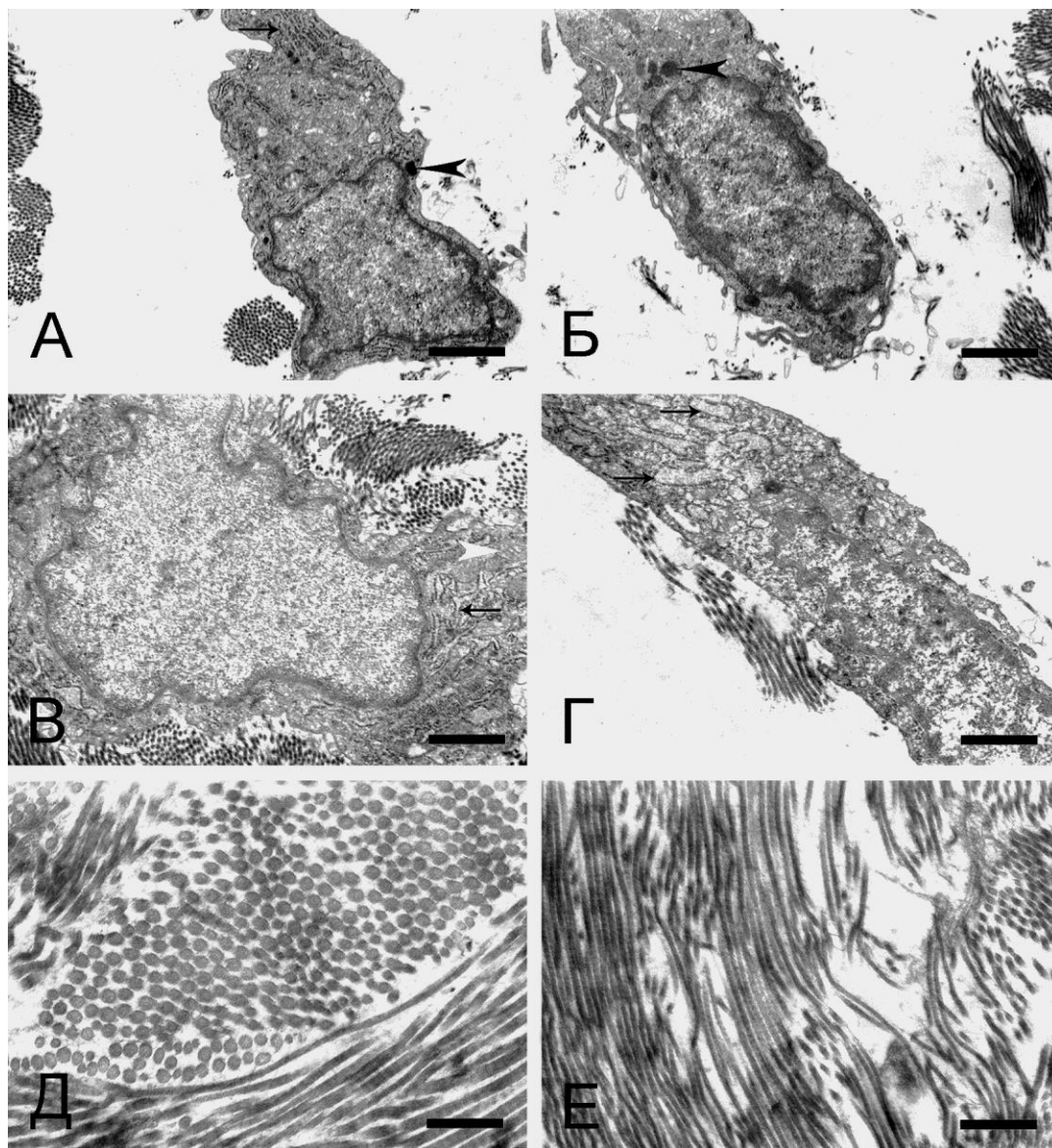
**Фигура V35.** СМИ на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увредата и шев на МКВ. А, Б) Комплекс ЕЛ-лигамент съставен от Фб (в синьо), колагенови влакна (в червено), кръвоносни съдове (стрелка) и наличие на шевен материал. Размерна линия, 100  $\mu\text{m}$ .

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 ендоплазмен ретикулум, единични лизозоми и митохондрии (Фиг. V36 А-Г; V36 А-Г). Наблюдаваха се и единични фибробласти с голямо количество вторични лизозоми в цитоплазмата. Клетките в дълбоките слоеве на ЕЛ показваха силно развит гранулиран ендоплазмен ретикулум и единични лизозоми. Те притежаваха дълги цитоплазмени израстъци, обвиващи отделните колагенни

снопове в периферните части на лигамента. В ЕЦМ на ЕЛ колагенните влакна се групираха в снопове с различна ориентация и изпълваха пространството между отделните фибробласти. Наблюдавах се и единични колагенни влакна разположени хаотично, както между колагенните влакна, така и поотделно (Фиг. V36 Д, Е; V36 Д, Е). Рядко се наблюдавах 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.

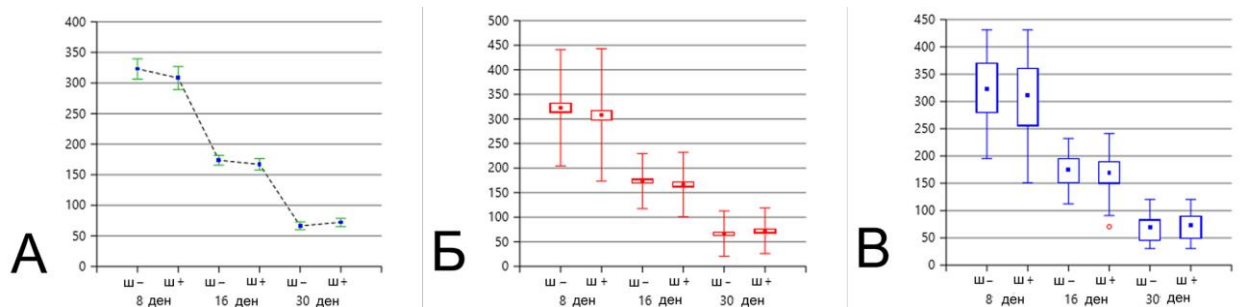


**Фигура V36.** ТЕМ на 30 ден след увредата на МКВ. А-Г) Фб с добре представени ядра, лизозоми (черна стрелка), ГЕР (стрелки) и сферични митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в ЕЦМ. *Размерна линия*, 1.4  $\mu\text{m}$  (А, Б), 1.5  $\mu\text{m}$  (В), 1.3  $\mu\text{m}$  (Г). Д, Е) Колагенови влакна в ЕЛ. *Размерна линия* 0.7  $\mu\text{m}$  (Д), 0.5  $\mu\text{m}$  (Е).



**Фигура V37.** TEM на 30 ден след увреда и шев на МКВ. А-Г Фб с големи ядра, лизозоми (черни стрелки), ГЕР (стрелки), сферични митохондрии (бяла стрелка) и колагенови влакна в ЕЦМ. *Размерна линия*, 1,5  $\mu\text{m}$  (А, Б), 0,8  $\mu\text{m}$  (В), 1,0  $\mu\text{m}$  (Г). Д, Е) Колагенови влакна в ЕЛ. *Размерна линия*, 0,5  $\mu\text{m}$  (Д), 0,7  $\mu\text{m}$  (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. (Фиг. V38)

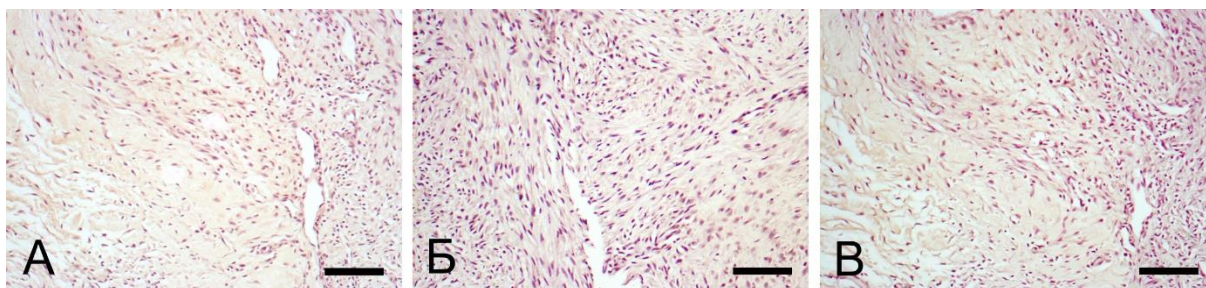


**Фигура V38.** Графично представяне на статистическия анализ на данните в групата със спонтанно оздравяване, без хирургически шев (ш-) и в групата лекувана с хирургически шев (ш+) на 8, 16 и 30 ден след увредата на МКВ. А) Сравнение на средните стойности (сини квадрати). Б) хистограма показваща средната стойност (червен кръг). В) Квартилна диаграма, показваща средната стойност (син квадрат).

## V.6. Имунохистохимично изследване (колаген тип I, III, V; MMP-2 и -9) на ранните промени настъпващи в ЕЛ след увреда МКВ на колянна става у плъх.

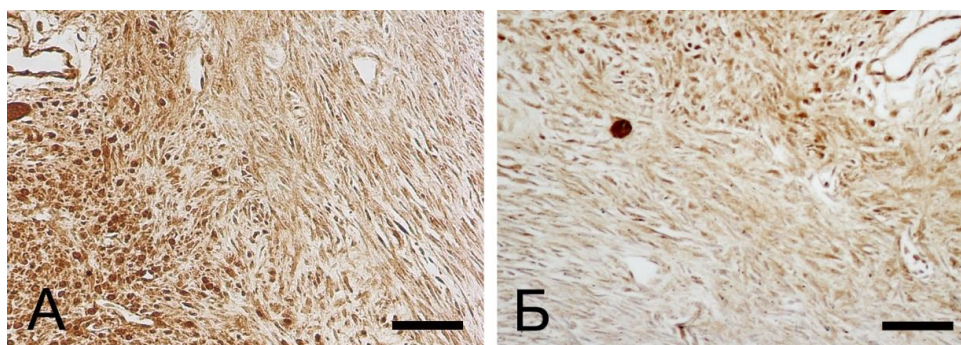
### V.6.1 Осми ден след увреда на МКВ

Резултатите от имунохистохимичното изследване показаха, че на 8-я ден след увредата в областта на ЕЛ има наличие на имунохистохимична реакция за колаген тип I (Фиг. V39 А), тип III (Фиг. V39 Б) и колаген тип V (Фиг. V39 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 V39.** ИХР на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда на МКВ. А). ИХР на колаген тип I; Б) ИХР за колаген тип III; В) ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 100 μm

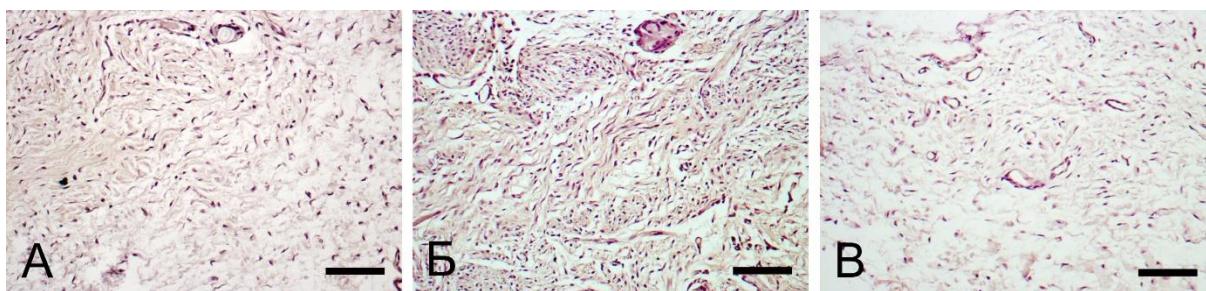
В комплекса ЕЛ-лигамент на 8-ят ден след увредата на МКВ, експресията на ММП-2 се отчете като силно (3+) до позитивна (2+) и слабо позитивна (1+) за ММП- 9.



**Фигура V40.** ИХР на комплекса ЕЛ-лигамент на 8 ден след увреда. А) ИХР за ММП-2; Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$ ; Б) ИХР за ММП-9. Размерна линия - 50  $\mu\text{m}$

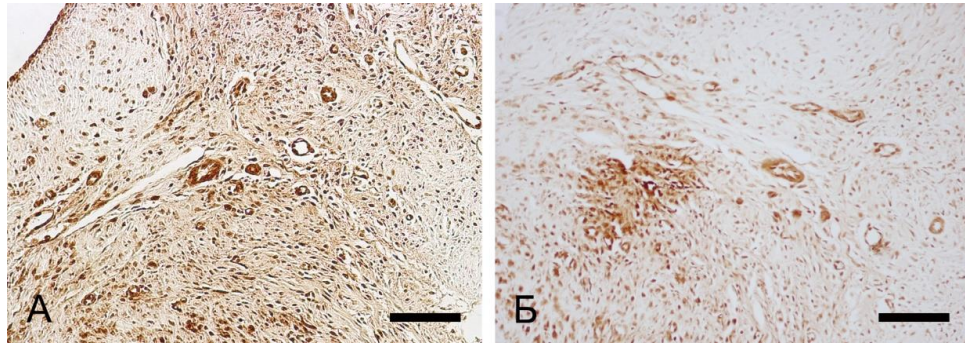
#### *V.6.2 Шестнадесети ден след увредата на МКВ*

На шестнадесетия ден след травмата отново се наблюдаваше позитивна реакция за колаген тип I (Фигура V41 А), тип III (Фигура 41 Б) и колаген тип V (Фигура V41 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 V41.** Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда. А) ИХР за колаген тип I; Б) ИХР за колаген тип III; В) ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$

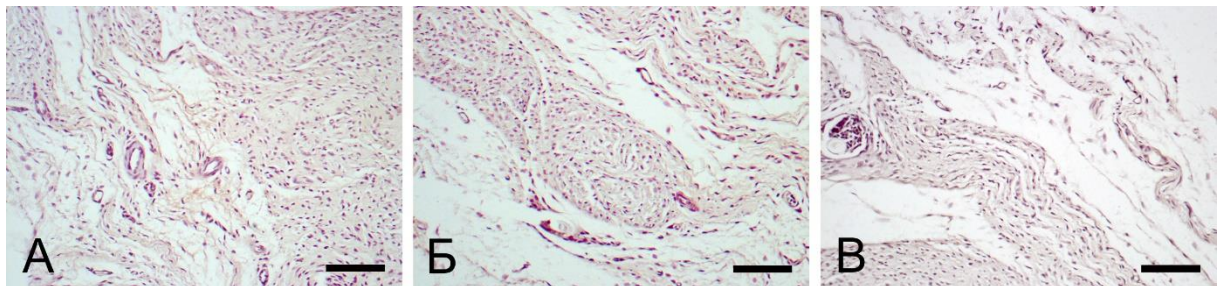
В комплекса ЕЛ-лигамент на 16-я ден след увредата на МКВ, експресията на ММП-2 бе отчетена, като силно (3+) до позитивна (2+) (Фигура V42А) и слабо позитивна (1+) за ММП- 9 (Фигура V42Б).



**Фигура V42.** Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 16 ден след увреда. А). ИХР за ММП-2; Б) ИХР за ММП-9. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$

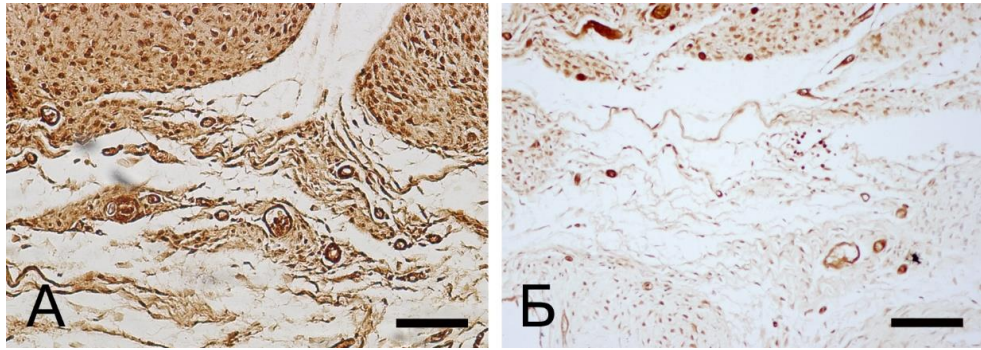
### V.6.3 Тридесети ден след увреда на МКВ

Резултатите от имунохистохимичното изследване показаха, че на 30-я ден след увредата на МКВ в областта 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). ИХР за колаген тип I; Б) ИХР за колаген тип III; В) ИХР за колаген тип V. Размерна линия - 100  $\mu\text{m}$

В комплекса ЕЛ-лигамент на 30-я ден след увредата на МКВ експресията на ММП-2 бе отчетена като силна (3+) до позитивна (2+) (Фигура V44А) и слабо позитивна за ММП- 9 (1+) (Фигура V44Б).



**Фигура V44.** Светлинно-микроскопско изследване на комплекса ЕЛ-лигамент на 30 ден след увреда. А). ИХР за ММП-2; Размерна линия - 50 µm. Б) ИХР за ММП-9. 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 лигаментата 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 предизвиква 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 разрехавява и не може да поддържа ставата, което от своя страна води до нестабилност и болка. (Khatod and Amiel, 2003; Jung и съавт., 2012)

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; Mescher и съавт., 2018; Hsu и съавт., 2010) 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 IV 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 линейния 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.

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. 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.

ММП-зи са сложна група от калций и цинк-зависими ендопептидази, които притежават свойствата да се прикрепват и участват в разграждането на компоненти на екстрацелуларния матрикс (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; Iliev 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 et al., 2012; Blázquez-Prieto и съавт., 2018; Juan 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 еветуалната 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 хипотеза, 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” (Brau 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 лигамента (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: 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 последствие 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.

Изследвани бяха и МПП-зи, които имат значителна роля според изложените литературни данни в оздравителния процес на ставните връзки. Направена бе и съпоставка с експресията им в самата лигаментарна структура. Получените данни за ММП-2 и -9 при МКВ на плъх са представени в детайли в частта резултати и накратко могат да се обобщят така: експресията на ММП-2 бе

положителна (2+) в 80% от полетата; ензимната активност на MMP-9 в ЕЛ бе отчетена като слабо положителна (+) или положителна (2+) в 90% от зрителните полета; в лигаментарната част на експресията на MMP-2 и -9 бе отчетена предимно отрицателна. Получените данни за MMP-2 и -9 при ПКВ на плъх, също представени в детайли в частта резултати, накратко могат да се обобщят така: експресията на MMP-2 в ЕЛ на ПКВ при 75% от зрителните полета имунореактивността бе ниско положителна (1+), а ензимната активност на MMP-9 в ЕЛ бе отчетена като слабо положителна (1+) в 85% от зрителните полета; в лигаментарната част на експресията на MMP-2 и -9 бе отчетена предимно отрицателна.

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, V, както и за MMP-2 и -9. Представените данни от имунохистохимичното изследване показват, че по-горе изброените колагени и MMP-зи 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 епилигаментарна 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 на МКВ, слабо позитивна (1+) в ЕЛ и негативна (0) в лигаментарната тъкан 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 е основно в ЕЛ, което води до заключението, че именно той е освен основния донор на клетки 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.

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.

*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.

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 на МКВ, като имунореактивността бе основно позитивна (2+) (48%), докато в лигаментарната тъкан 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 имунохистохимични изследвания на ЕЛ на МКВ и ПКВ при плъх и човек 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 съдово-нервни 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 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 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.

***Накратно: 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 в ЕЛ 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 дезорганизирани, 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 (Wijdsicks 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 протеоглигани (Сао и съавт., 2000); по-добър капацитет на МКВ да увеличи кръвоснабдяването чрез ангиогенеза и повишен приток на кръв (Braу и съавт.,

2003); характерни специфични за лигаментна 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  $\alpha$ -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 and 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.

## **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 статиститически 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 ИНС 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 (Kiarou и Murray, 2014).

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 and 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; Andrews и съавт., 2017; Georgiev и съавт., 2017a; Amag и съавт., 2015). 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; Anderson и съавт., 2001; Powell и Barber-Foss, 2000). 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.

### **VI.3.1 Оздравителният 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 and 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).

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 клетъчния 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  $\alpha$ -гладко мускулен актин. На места тези клетки са ясно разграничени 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  $\alpha$ -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 неорганизирани 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 регенерираната 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 представления 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 лигамента.

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 преимущества 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 ултраструктурния 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 синтезата 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 етилигаментарната 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; Loitz-Ramage и съавт., 1997; Ohland и съавт., 1991; 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.

Несъмнената роля която имат MMP-зите по време на оздравителния процес, както и хипотезата относно тяхната роля по отношение на невъзможността на зарастване на ПКВ породила идеята те да се изследват по време на ранният възстановителен процес на МКВ след увреда. Но какво представляват тези ензими?

MMP-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 MMP-зи е отличителен белег на много патологични процеси: възпаление, метастазирание и ангиогенеза, които включват ремоделиране и разграждане на съединителната тъкан (Evrosimovska и съавт., 2011; Gaffney и съавт., 2015). MMP-зи също участват в процеса на ангиогенеза. Ендотелните клетки синтезират различни MMP-зи, които са важни за формирането на нови кръвоносни съдове, както при физиологични, така и при патологични процеси (Folgueras и съавт., 2004). MMP-

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).

По време на увредата и възстановяване на МКВ, увредените молекули в 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) (Хуе и съавт., 2009).

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 остеоонектин (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).

Поради тези литературни данни изследването на ЕЛ бе насочено към ММП-2 и -9. Представените детайлно в частта резултати за експресията на ММП-2 и -9 в ЕЛ при експериментален модел представят по-интензивна реакция на ММП-2 в сравнение с ММП-9 при контролите. Получените резултати показват, че в ЕЛ нормално се експресира ММП-2, като след нараняване и особено през ранните периоди тази експресия се засилва значително. По време на ранният оздравителен процес високите нива на ММП-2 са изразени и се запазват до 30 ден. За разлика от тях експресията на ММП-9 намалява. В представените резултати се отчита експресията на ММП-9 предимно в ЕЛ на МКВ. На 8-ия и 16-ия ден след увредата се наблюдават високи нива на ММП-9. С напредването на оздравителния процес експресията намалява и на 30-ия ден е

предимно на границата между ЕЛ и МКВ и периваскуларните зони в ЕЛ на МКВ.

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 оздравителния процес 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).

С оглед описаните резултати може да се обобщи следното: експресията на основните фибрил-образуващи типове колагени, както и ММП-2 и -9 е локализирана предимно в ЕЛ при контролите, а при експерименталната увреда на МКВ експресията е основно в областта на гранулоционна тъкан, която морфологично прилича на ЕЛ.

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 показаха, 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 секретираниите 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 нова хипотеза 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.

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 литература съществуват твърде оскъдни данни за ЕЛ на МКВ и ПКВ, както и за неговата роля при нативната връзка или 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.

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 травмите на колянната става са свързани с ПКВ и МКВ.

5. В съвременната литература съществува голямо 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 им 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 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 оздравяване, като новосформираната тъкан е с по-лоши биологични качества. Неправилното оздравяване и нарушената цялост на тъканта прави ставната връзка поласкитетна, 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 да се излекува самостоятелно и може да доведе до хронична нестабилност на коляното и увреждане на вторичните стабилизатори. Ето защо е необходима хирургична реконструкция с помощта на присадка.

8. Съществуват статистически значими разлики в клетъчния състав на ЕЛ на МКВ и ПКВ. Разпределението на фибрил-образуващите колагени, ММП-2

и -9, които имат ключова роля 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 е установено, че ЕЛ има ключова роля по време на ранния оздравителен процес при експериментален модел на плъх; 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 е 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.** Представяне на ЕЛ на МКВ и ПКВ, като хиперцелуларна, добре кръвоснабдена тъкан с богата инервация в структурата на ставната връзка и нейното значение за нормалната функция на ставната връзка.

**2.** 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 тяхното значение в ортопедичната практика.

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

**4.** 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.

**5.** 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. На базата на разликите в експресията на тези молекули в МКВ и ПКВ се дава обяснение за разликите в оздравителния процес на МКВ и ПКВ.

**6.** За първи път установяване в ЕЛ на МКВ и ПКВ на ММП-2 и -9 у плъх и човек, както и определяне на разликите в експресията им с помощта на ImageJ 1.52a. Представя се важната роля на тези ММП-зи при оздравителния процес, както и в процеса на ремоделиране, който изисква миграцията на различни клетки и образуването на нови кръвоносни съдове.

**7.** 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.

**8.** Представено е за първи път разпределението на фибрил-образуващите колагени, на MMP-2 и -9 при експериментален модел на увреда на МКВ при плъх, както и тяхното ключово участие в ранния оздравителния процес на ставната връзка.

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

## **IX. Списък на научните публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд:**

### ***Публикации:***

1. 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.
2. Georgiev GP, Vidinov NK, Kinov PS (2010) Histological and ultrastructural evaluation of the early healing of the lateral collateral ligament epiligament tissue in a rat knee model. *BMC Musculoskel Disord* 11:117. **IF: 1.941**
3. Georgiev GP, G Kotov, A. Iliev, P. Kinov, J. Angelova, B. Landzhov. (2019) 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. **IF: 1.275**
4. 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. **IF: 2.241**
5. Iliev A, Kotov G, Stamenov N, Landzhov B, Kirkov V, Georgiev GP. (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. **IF: 0.499**
6. Georgiev GP, Kinov P, Rashev P, Sapundzhiev E, Vidinov NK (2010) 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*, 63(5):761-766. **IF: 0.219**
7. Георгиев ГП, Стоков Л (2011) Пресни увреди на медиалната странична връзка и свързаните с нея структури по медиалната страна на колянната става: съвременни концепции. *Ортоп Травматол*, 48(1): 7-12.
8. Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Slavchev S, Malinova L, Kartelov Y, Ankova D, Ovtsharoff W. (2015) Light microscopic and immunohistochemical study of the medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Compt Rendus Acad Bulg Sci*, 68(1): 95-100. **IF: 0.233**
9. Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Slavchev S, Malinova L, Ovtsharoff W. (2015) Immunohistochemical study during early healing of the medial collateral ligament epiligament in rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci*, 68(5): 655-660. **IF: 0.233**
10. Georgiev GP, Landzhov B, Dimitrova IN, Malinova L, Ovtsharoff W. (2016) Expression of fibronectin during early healing of the medial collateral ligament epiligament in rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci*, 69(5): 639-644. **IF: 0.251**
11. Georgiev GP, Iliev A, Landzhov B, Dimitrova IN, Kotov G, Malinova L, Ovtsharoff W. (2017) Localization of matrix metalloproteinase-2 in injured

- medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Compt Rendus Acad Bulg Sci*, 70(2): 273-278. **IF: 0.251**
12. Landzhov B, Georgiev GP, Brainova I. (2015) The Epiligament-the main donor of cells and vessels during healing of the collateral ligaments of the knee. *Anat Physiol S4*:006.
  13. Iliev A, Georgiev GP, Dimitrova IN, Kotov G, Malinova L, Rashev P, Landzhov B. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. *Acad Anatom Int*, 2016;2(2):44-48.
  14. Iliev A, Georgiev GP, Kotov G, Dimitrova IN, Malinova L, Rashev P, Tsankov L, Karabinov V, Landzhov B. (2017) Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-9 in medial collateral ligament epiligament in rat knee after grade III injury. *Acad Anat Int*, 3(1):20-25.
  15. Georgiev GP, Vidinov NK (2009) Investigation of the epiligament morphology of the lateral collateral ligament during postnatal development in a rat knee model. *Compt Rendus Acad Bulg Sci* 62 (11): 1473-1478. **IF: 0.204**
  16. Georgiev GP, Vidinov NK (2009) Epiligament changes after injury of the knee lateral collateral ligament in rat. *J Biomed Clin Res* 2 (2):96-98.
  17. Georgiev GP, Vidinov NK (2009) 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* 2 (1):166-168.
  18. Georgiev GP, Iliev A, Kotov G, Nedialkova VK, Kirkov V, Landzhov V. (2019) Epiligament tissue of the medial collateral ligament in rat knee joint: Ultrastructural Study. *Cureus* 11(1): e3812.
  19. Georgiev GP, Landzhov B, Kotov G, Slavchev SA, Iliev. (2018) Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in the epiligament of the medial collateral and anterior cruciate ligament in human knees: A comparative study. *Cureus* 10(11): e3550.
  20. G.P. Georgiev. (2021) Epiligament or paratenon is more appropriate for describing the enveloping tissue of the cruciate ligaments of the human knee? *Folia Morphol (Warsz)*, in press. **IF 0.941**

***Научни съобщения във връзка с дисертационния труд:***

1. Georgiev GP, Vidinov NK, Kinov P. Epiligament tissue as the main donor of cells and vessels during early ligament healing: experimental model for grade III injuries of knee lateral collateral ligament. Light and transmission electron microscopic study. XI National Congress of the Bulgarian Orthopaedic and Traumatologic Assosiation with International Participation, 6 - 10 October 2010, Melia Grand Hermitage Hotel, Golden Sands. Program, p. 45.
2. Georgiev GP, Vidinov NK, Rashev P, Sapundzhiev E, Kinov P. Immunohistochemical study for type I, III and V collagens during the early healing of the isolated injury of the lateral collateral ligament epiligament tissue in rat knee model. XI National Congress of the Bulgarian Orthopaedic and Traumatologic Assosiation with International Participation, 6 - 10 October 2010, Melia Grand Hermitage Hotel, Golden Sands. Program, p. 46.

3. Georgiev GP, Kinov P. Elastic fibers in the epiligament tissue of the collateral ligaments of the knee in human. IVth Koprivshitsa Morphological Days. VIIIth National Conference of Anthropology, 4-6 June 2010, Koprivshitsa. Program, p. 8.
4. Georgiev G, Iliev A, Landzhov B, Dimitrova I, Kotov G, Slavchev S, Malinova L, Ovtscharoff W. Morphological study of the medial collateral ligament epiligament tissue in human. *Scripta Scientifica Medica*, 48 (suppl 2), 2016, p. 46
5. Landzhov B, Georgiev GP, Dimitrova IN, Slavchev SA, Malinova I, Ovtscharoff W. Experimental model for grade III injuries of knee medial collateral ligament epiligament tissue in rat knee model: immunohistochemical study for type I and V collagens. *Folia Medica* 2015; 57; Suppl. 2, p. 31
6. Georgiev GP, Vidinov N. Structure of the epiligament of the lateral collateral ligament during early postnatal development in rat. XIX National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, 29-31 May 2009, Pleven. Abstracts, p. 96.
7. Brainova-Michich I, Dimitrova IN, Georgiev GP, Slavchev S, Malinova L, Landzhov B. Expression of collagen type III and fibronectin in grade III injuries of knee medial collateral ligament epiligament in rat. XV International Congress of Medical Sciences, 12-15 May 2016, Sofia. Abstracts, p. 64.
8. Tsenov S, Georgiev GP, Iliev A, Kinov P, Dimitrova IN, Malinova L, Landzhov B. Histological study of the epiligament of the medial collateral ligament after injury in rats' knee. XV International Congress of Medical Sciences, 12-15 May 2016, Sofia. Abstracts, p. 66.
9. Dimitrov D, Landzhov B, Iliev A, Dimitrova IN, Malinova L, Kinov P, Georgiev GP. Transmission electron microscopy of the epiligament of the medial collateral ligament after injury in rat knee. XV International Congress of Medical Sciences, 12-15 May 2016, Sofia. Abstracts, p. 67.
10. Iliev A, Georgiev G, Landzhov B, Dimitrova I, Kotov G, Rashev P, Malinova L, Ovtscharoff W. Localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. X International Symposium of Clinical Anatomy, *Scripta Scientifica Medica*, vol. 48, 2016, supplement 2, p. 45
11. Georgiev GP, Vidinov N. Morphological changes in the epiligament of the lateral collateral ligament in a rat knee joint after rupture. XIX National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Pleven, 29-31 May 2009. Abstracts, p. 75.