

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BARBILIAN ADRIAN

Student-doctorand:

BACIU CONSTANTIN COSMIN

BUCUREȘTI

2019

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

***RECONSTRUCȚIA LIGAMENTULUI ÎNCRUCIȘAT
ANTERIOR FOLOSIND GREFON MIXT SINTETIC-
BIOLOGIC – MODEL EXPERIMENTAL PE
ANIMALUL DE STUDIU***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BARBILIAN ADRIAN

Student-doctorand:

BACIU CONSTANTIN COSMIN

BUCUREȘTI

2019

CUPRINS

	Pagina
Lista lucrărilor științifice publicate	1
Lista cu abrevieri și simboluri	4
Introducere	5
Partea generală	
1. Elemente de anatomie și biomecanică a articulației genunchiului	11
1.1. Elementele osoase	11
I.1.1 Epifiza distală a femurului	11
I.1.2 Epifiza proximală a tibiei	12
I.1.3 Patela	13
I.2 Elementele intraarticulare	13
I.2.1 Meniscurile articulare	14
I.2.2 Vascularizația meniscurilor	16
I.3. Aparatul capsulo-ligamentar	18
I.3.1. Capsula articulară	18
I.3.2. Ligamentul rotulian	19
I.3.3. Ligamentele posterioare	19
I.3.4 Ligamentul colateral intern	19
I.3.5 Ligamentul colateral extern	20
I.3.6 Ligamentele încrucișate	21
I.4 Membrana sinovială	26
II. Biomecanica genunchiului	27
II.1 Alinierea tibio-femurală	28
II.2 Mișcarea de flexie și extensie	28
II.3 Mișcările de rotație	30
II.4 Mișcările de lateralitate	31
II.5 Deplasarea antero-posterioară	31
II.6 Biomecanica LIA	31
III. Fiziopatologia leziunilor LIA	32
IV. Evaluarea clinică a leziunii de LIA	34
IV.1 Anamneza	34

IV.2 Teste de stabilitate articulară	35
V. Diagnosticul imagistic al leziunii LIA	38
VI. Reconstrucția artroscopică a ligamentului încrucișat anterior	42
VI.1 Tipuri de grefe folosite	42
VI.2 Notchplastia	47
VI.4. Postoperator	50
Partea specială	53
Motivația și obiectivul lucrării	53
Material și metodă	54
I. Analiza biomaterialelor utilizate în ingineria tisulară de reconstrucție a ligamentelor	55
I.1 Elaborare cerințelor tehnice pentru caracterizarea mecanică (forțe, momente, deplasări, puncte de aplicare) pentru grefa sintetică utilizată în reconstrucția ligamentară	56
I.2. Corelarea tehnicilor de ligamentoplastie la animalele de studiu	61
I.3. Selectarea suporturilor sintetice pentru obținerea ligamentelor	62
I.4. Selectarea suporturilor naturale pentru obținerea ligamentelor	69
I.5. Proiectarea formulărilor pentru obținerea ligamentelor pe bază de collagen	71
I.6. Caracterizarea mecanică a materialelor utilizate în obținerea ligamentelor	72
II. Descrierea științifică și tehnică	75
II.1 Adaptarea tehnicilor de ligamento-plastie la particularitățile anatomice ale animalului de studiu	75
II.2. Elaborarea tehnologiei de laborator și obținere collagen tip I din ligament în forma de gel – model experimental	79
II.2.2 Elaborarea tehnologiei de laborator pentru obținere de ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I	81
II.2.3. Proiectare și execuție dispozitive necesare poziționării și fixării specimenelor pe mașinile de încercare	91
III. Obținere ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I – model experimental faza a II-a	100
III.1. Caracterizarea fizico-chimică, morfologică și structurală a suprafețelor funcționalizate cu collagen tip I din ligament	102
III.2 Caracterizarea mecanică prin testări statice și dinamice a modeleului experimental de ligament din polimer sintetic funcționalizat	110
IV. Testarea preclinică prin implantare ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I pe animal de studiu	123

V. Analiza postoperatorie a mobilității și funcționalității articulației cu ligament artificial	129
VI. Selectarea compozițiilor corespunzătoare a ligamentelor	131
VI.1 Realizare modelului funcțional ligament din polimeri sintetici acoperit cu colagen tip I	133
VI.2. Caracterizarea fizico-chimică și structurală a ligamentului din polimeri sintetici acoperit cu colagen tip I	135
IV.3. Testare preclinică model funcțional	138
VII. Indicațiile reconstrucției LIA și protocolul operator pentru implantare ligament artificial funcționalizat pe subiecți umani	143
III. Concluzii și contribuții personale	153
Bibliografie	156
Anexe	167

INTRODUCERE

Leziunile ligamentului încrucișat anterior (LIA) au devenit în ultimele decade o problemă globală de sănătate în rândul persoanelor tinere în plină activitate fizică, atât prin incidența sa, cât și prin implicațiile de ordin social, profesional și financiar.

Ligamentul care susține stabilitatea genunchiului, cea mai complexă articulație implicată în mobilitatea membrelor inferioare, este subiectul celor mai multe studii privind reconstrucția de ligament.

Ligamentul încrucișat anterior (LIA) este elementul anatomic de la nivelul articulației genunchiului care suferă cel mai frecvent leziuni traumatice parțiale sau complete. Acest ligament joacă un rol esențial în funcționalitatea genunchiului, fiind unul din stabilizatorii principali ai acestei articulații. Un genunchi instabil duce ulterior la degradarea celorlalte elemente intraarticulare printre care cel mai important este cartilajul de acoperire al suprafețelor articulare portante. Consecința acestor degradări a elementelor nobile intraarticulare este reprezentată de apariția precoce a bolii artrozice și compromiterea funcțională a articulației genunchiului.

În Statele Unite ale Americii sunt înregistrate între 100.000 și 200.000 de leziuni ligamentare de încrucișat anterior pe an, din care mai mult de jumătate necesită intervenții chirurgicale de reconstrucție. [1,2]

Severitatea unei leziuni de ligament necesită o abordare chirurgicală pentru a beneficia de repararea optimă a țesuturilor și o recuperare funcțională completă. Ingineria tisulară a condus la dezvoltarea de noi strategii de reparare a țesuturilor pentru a reduce morbiditatea înlocuind părți ale ligamentelor lezate.

În ultimii 30 de ani, reconstrucțiile ligamentului anterior cruciat (LIA) prin intervenții chirurgicale au utilizat autogrefele sau allogrefele, ce prezintă rezultate satisfăcătoare pe termen scurt, însă după o perioadă îndelungată se instalează instabilitatea articulară și durerea. În plus, utilizarea propriului țesut în reconstituirea LIA este însoțită de dureri ale genunchiului, instabilitate la nivelul situs-ului donor și mobilitate redusă. Țesutul de proveniență allogenică presupune un risc crescut de transmitere a unor boli, apariția de infecții și inducerea unui răspuns imun la pacient. O altă strategie curentă pentru reconstrucția ligamentului anterior cruciat o reprezintă utilizarea unor grefe sintetice, care inițial prezintă o rezistență bună, dar care, cu timpul,

suferă degradări și rupturi, predispunând la sinovită. Abordarea ingineriei tisulare implică implantul unor scaffold-uri degradabile, care să preia doar temporar tensiunile mecanice, până ce are loc regenerarea ACL.

Această problemă este supusă unor dezbateri intense la momentul actual încercând să găsim tipurile de grefe ideale folosite în intervenția de reconstrucție ligamentară. Autogrefele, allogrefele sau grefele sintetice, după cum bine știm toate au avantajele și dezavantajele bine cunoscute ce țin de sacrificarea zonei donoare, rezistența la uzură, timp de integrare, biocompatibilitate și nu în ultimul rând costurile financiare.

Astfel s-au dezvoltat suporturi sintetice, semi-sintetice sau naturale cu scopul de a stabili condiții optime pentru înlocuirea permanentă a ligamentului lezat.. La sfârșitul anilor '80 și începutul anilor '90 au început să capete un elan deosebit primele intervenții chirurgicale de reconstrucție a ligamentului încrucișat anterior cu grefe sintetice. Au fost primite cu foarte mult entuziasm deoarece nu se mai sacrifică zona donoare, aveau o rezistență foarte bună, iar pacientul avea un confort postoperator și o recuperare mult mai rapidă. Ulterior au apărut și efectele nefavorabile legate de fibrele sintetice din care au fost confecționate grefele și anume, infecții, reacții imunologice de intoleranță, sinovite reactive, epanșamente cornice, instabilități restante, rupturi precoce ale grefoanelor.

Tendința ultimilor ani au fost cercetări elaborate pentru o diminuare a disconfortului postoperator, o vindecare și o reintegrare în activitatea fizică și socială cât mai rapidă prin elaborarea unei multitudini de grefe sintetice. Este deja cunoscut faptul că reconstrucția ligamentului încrucișat anterior cu ajutorul grefelor sintetice aduc un beneficiu major al recuperării postoperatorii și rapidității reluării activității fizice, dar cu dezavantaje notabile la distanță în ceea ce privește osteointegrarea și biocompatibilitatea diferitelor fibre sintetice din care sunt confecționate.

Perspectivile viitorului sunt reprezentate de materiale de tip biologic: matrice și fibre de collagen naturale sau sintetice apropiate de structura și proprietățile histologice ale ligamentului nativ.

Ipoteza lucrării se înscrie în această perspectivă prin cercetarea posibilității de obținere a unui implant de collagen inert care poate fi colonizat de diferite tipuri de celule (osteoblaste în os, fibroblaste în articulație) permițând obținerea unui “neo – ligament” care să fie cât mai aproape de structura și proprietățile mecanice ale ligamentului nativ. În ciuda efortului numeroaselor centre de cercetare, până în prezent

nu s-au obținut substituenți micști pentru tendoane și ligamente cu proprietăți similare celor naturale. Mai mult, până la momentul actual, nu s-a realizat un model funcțional care, odată implantat să ducă la vindecare completă.

Pornind de la faptul că ligamentele sunt țesuturi conjunctive fibroase dense compuse în special din fibre de colagen compactate ordonat și de la neajunsurile create de ligamentele sintetice menționate anterior, ne propunem diminuarea sau chiar eliminarea acestor reacții secundare prin înglobarea fibrelor alinate din colagen de tip I (caracteristic ligamentelor) în structura fibrilară a acestor grefe, într-o pondere ce a urmat a fi determinată experimental prin analiza implantului în animalul de studiu și a unor eventuale reacții locale și generale ale acestuia.

Lucrarea își propune obținerea și testarea unui model experimental de ligament sintetic, care să îndeplinească toate criteriile de biocompatibilitate (stabilitatea compușilor chimici, absența de substanțe solubile în compoziție, minima absorbție a apei, etc) și caracteristicile mecanice (rezistența la tracțiune și torsiune, rigiditate, elasticitate și o microarhitectură poroasă), folosind ca substrat structural unei viitoare populări cu celule formatoare de colagen (un schelet care să fie populat cu fibroblaști) și pe baza căruia să se producă o refacere a ligamentului lezat, evitând astfel neajunsurile determinate de recoltarea unei autogrefe. Acest model experimental urmând a fi testat și urmărit prin implantarea într-un animal de studiu.

După studierea anatomiei comparate a elementelor intraarticulare, raporturilor anatomice și a dimensiunilor articulației genunchiului, am ajuns la concluzia că cel mai potrivit ca animal de studiu ar fi porcul domestic (*Sus Scrofa Domesticus*) care are multiple similitudini la nivel articular cu genunchiul uman.

În consecință cu ajutorul experienței acumulate în ultimii ani în efectuarea reconstrucțiilor ligamentare cu grefe sintetice și a cunoștințelor din literatură am ales un model experimental de ligament sintetic existent în piață, LARS (Ligament Advanced Reinforcement System) compus din fibre de polietilen tereftalat (PET) care cu ajutorul oferit de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Mecatronică și Tehnica Măsurării și de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Textile și Pielărie a fost testat din punct de vedere al rezistenței mecanice, comparativ cu autogrefele și funcționalizat cu o peliculă de gel hidrolizat de colagen extras din tendon de curcan sau piele bovină. Proba de ligament funcționalizat a fost analizată spectrofotometric și la microscopie electronică unde s-a constatat prezența unei pelicule de gel hidrolizat de colagen pe suprafața fibrelor sintetice de ligament.

Ulterior acesta a fost sterilizat cu raze X și pregătit pentru implantare în genunchiul animalului de studiu printr-o intervenție chirurgicală astrosopică. Pentru aceasta s-a pregătit turnul de artroscopie, pensele specifice intervenției artroscopice, cu trusa completă de ligamentoplastie, camera video pentru articulații mici de 1,9 mm, electroablator, shaver 3,5 mm, iar pentru fixarea grefei s-a folosit un sistem de suspensie cu lungime ajustabilă și șurub resorbabil.

Particularitățile și dificultatea studiului a fost realizarea intervenției chirurgicale pe o articulație subdimensionată genunchiului uman, la care nu s-a putut aplica banda hemostatică și pe un animal de studiu care a trebuit menținut în viață postoperator și căruia i s-au acordat îngrijirile, tratamentul și supravegherea postoperatorie aproape similar subiecților umani, cu antibioterapie orală, toaletă locală și pansamente sterile ale plăgilor operatorii. Intervenția chirurgicală s-a realizat după prealabila toaletare și aseptizare a membrului posterior și izolarea articulației genunchiului, sub anestezie generală cu intubație oro-traheală și suport ventilator. În timpul acesteia am întâmpinat ca dificultăți, efectuarea exactă a portalelor de abord, dimensiunile și spațiul de lucru reduse intraarticular, o membrană sinovială foarte bine reprezentată și bogat vascularizată care a trebuit electrocoagulată și apoi excizată, durata intervenției fiind aproximativ 90 de minute, fără incidente neprevăzute.

Evoluția postoperatorie a animalului de studiu a fost favorabilă, fără apariția semnelor de inflamație locală sau infecție, mersul șchiopătat s-a remis la aproximativ 3 săptămâni, ulterior constatându-se mobilitatea articulară completă și reluarea mersului normal.

După un interval de 6 luni de la intervenția chirurgicală de implantare a grefei sintetice funcționalizate, am reintervenit chirurgical pentru a vizualiza integrarea și aspectul grefei, reacția țesuturilor intraarticulare înconjurătoare și pentru a preleva fragmente de țesut pentru examen histopatologic. Macroscopic s-a observat grefa de ligament fără modificări de poziție sau tensiune, iar la suprafața fibrelor sintetice s-a constatat apariția unei membrane de țesut fibro-conjunctiv ce înconjoară țesătura de fibre sintetice. În urma analizei histopatologice a probelor recoltate din membrana sinovială și ligament s-a observat la nivel ligamentar o populație cu țesut fibro-tendinos cu țesut de granulație și celule gigante multinucleate în jurul țesăturii de material sintetic, numeroase fibroblaste activate ce pot fi considerate precursori ale unei proliferări tisulare. Fragmentul de membrană sinovială prezintă minimă hiperplazie a sinoviocitelor și discrete depozite de fibrină în suprafață.

Într-un final se propune realizarea unui model experimental eterogen de ligament sintetic, care să îndeplinească toate criteriile de biocompatibilitate (stabilitatea compușilor chimici, absența de substanțe solubile în compoziție, minimă absorbție a apei, etc) și caracteristicile mecanice (rezistența la tracțiune și torsiune, rigiditate, elasticitate și o microarhitectură poroasă) care să folosească drept substrat structural unei viitoare populări cu celule formatoare de colagen (un schelet care să fie populat cu fibroblaști) și pe baza căruia să se producă o refacerea a ligamentului lezat, evitând astfel complicațiile determinate de recoltarea unei grefe de la pacient și de reacțiile propriului organism la corpul străin reprezentat de grefa sintetică.

Considerăm că în urma cercetării științifice, împreună cu eforturile interdisciplinare depuse de cele două instituții partenere suntem pe cale de a propune debaterilor în domeniu o a treia categorie de ligament care este în curs de fundamentare și anume categoria substituenților micști, categorie de la care se așteaptă menținerea avantajelor celor două categorii și limitarea la maxim a dezavantajelor lor.

Lucrarea este constituită în 4 etape.

Etapa I - Analiza biomaterialelor utilizate în ingineria tisulară de reconstrucție a ligamentelor

I.1 Elaborare cerințe tehnice pentru caracterizarea mecanică (forțe, momente, deplasări, puncte de aplicare) pentru materialele utilizate în reconstrucția ligamentară

Principalul rol al ligamentului încrucișat anterior (LIA) este de a stabiliza anteroposterior articulația genunchiului.[40] Ca și structură, LIA are aproximativ 38 mm lungime și 10 mm grosime, fiind format dintr-o bandă de țesut conjunctiv dens, întins între femur și tibie, înconjurat de sinovială care este un fald mezo-sinovial cu originea în partea posterioară a compartimentului intercondilian.[41]

LIA este un țesut conjunctiv dens, foarte bine organizat, având ca principale elemente în compoziție apa (reprezintă 65-70% din compoziție), matrice organică și fibroblaste.

Matricea organică este formată la rândul ei în procent de 70-80% din fibre de colagen tip I și III, în raport de 9:1.[42] Colagenul de tip III crește în procesele de

dezvoltare și cicatrizare, dar este înlocuit pe parcursul fazei de remodelare de colagenul I.[43] Matricea organică mai conține, de asemenea, fibre de elastină și proteoglicani, reprezentând mai puțin de 5%, respectiv 1%.[42]

Toate ligamentele prezintă o organizare ierarhică bazată pe o matrice de colagen.[43] Privind structura întregului ligament se observă că acesta este înconjurat de epiligament, după care acesta se împarte în mănunchiuri de fascicule separate de un alt strat de țesut conjunctiv, endoligamentul. Fasciculele sunt compuse din fibre de colagen și celule ligamentare, fiind orientate longitudinal; acesta fiind locul unde fibrele de colagen interacționează cu componentele noncolagenice și celulare.[44]

1.2 Corelarea tehnicilor de ligamentoplastie la animalul de studiu.

Asemănarea dintre articulația genunchiului porcului cu cea umană a dus la alegerea acestuia ca animal de studiu. Din punct de vedere al adaptării tehnicii chirurgicale, principiile de fixare ale ligamentului rămân neschimbate, respectiv sistem de suspensie reglabil în fixarea grefei în canalul femural și șurub de interferență la nivel tibial, dimensiunile existente permițând utilizarea lor și într-o articulație de dimensiuni mai mici. În ceea ce privește adaptarea instrumentarului la particularitățile animalului de studiu, ar reprezenta utilizarea unei camere artroscopice pentru articulații de mici dimensiuni (1,7mm), considerând ca instrumentarul existent se poate utiliza fără modificări.

1.3 Selectarea suporturilor sintetice pentru obținerea ligamentelor

Implanturile sintetice propuse în reconstrucția LIA sunt de 3 tipuri: proteze, ce înlocuiesc complet ligamentul și preiau permanent funcția, dispozitive de augmentare, ce consolidează țesutul propriu, fără a-l înlocui, și scaffold-uri ce permit infiltrarea celulelor care vor determina generarea noului țesut, urmând a fi resorbite progresiv.[69]

Grefele sintetice testate în reconstrucția LIA utilizează materiale precum polietilen tereftalatul, PET (ligamentele Stryker-Dacron, Leeds-Keio, LARS, ABC Surgicraft), polipropilena (dispozitivul Kennedy de augmentare a ligamentului) și poli(tetrafluoroetilena), PTFE (Gore-Tex). Acestea au fost și parțial aprobate de FDA spre testare, însă nu mai sunt recomandate datorită rezultatelor nesatisfăcătoare.[69,70]

Proteza LARS (Ligament Advanced Reinforcement System) este realizată din PET și prezintă un fragment intraosos compus din fibre longitudinale legate la capete de

structuri transversale împletite, precum și un fragment intraarticular, compus din fibre longitudinale paralele, răsucite la 90° . [69] Avantajul acestui implant este acela că fibrele pot fi orientate spre stânga sau spre dreapta, în funcție de genunchiul omolog, ceea ce reduce forțele de forfecare asemeni ligamentului nativ. Deși studii pe termen lung (3-5 ani) au prezentat rezultate satisfăcătoare, cu o rată a complicațiilor de doar 5,7%, altele arată că pot avea loc ruperi ale implantului, ce reduc rezistența la rupere. [74]

I.4. Selectarea suporturilor naturale pentru obținerea ligamentelor

O condiție majoră în ingineria tisulară de succes este utilizarea unui scaffold biocompatibil. Până în prezent au fost evaluate o multe materiale suport, incluzând materialele biologice naturale cum ar fi colagenul sau mătasea, precum și polimerii biodegradabili și materialele compozite.

Materialele biologice naturale, cum este colagenul au fost de un real interes în studiile recente, deoarece aceasta este componenta naturală a țesutului nativ și produsele pe bază de colagen seamănă cel mai bine cu rețeaua structurală a ligamentului nativ.

I.5. Proiectarea formulărilor pentru obținerea ligamentelor pe bază de colagen

Materialele sintetice cât și cele naturale prezintă atât avantaje cât și dezavantaje. Pentru obținerea unor suporturi de înlocuire a ligamentului, s-a propus combinarea polimerilor sintetici, care conferă proprietăți mecanice superioare cu polimeri naturali care conferă proprietăți biologice excelente și care au structură apropiată de a LIA nativ.

Criteriile care au stat la baza selectării polimerilor din compoziția substituenților de ligament au urmărit ca aceștia să poată fi prelucrați într-o forma tridimensională și să aibă o rețea structurală, proprietăți mecanice, biodegradabilitate, biocompatibilitate similare cu LIA.

Polimerul natural selectat este colagenul tip I din piele / os de origine bovină sub forma de gel sau hidrolizat.

I.6. Caracterizarea mecanică a materialelor utilizate în obținerea ligamentelor

În cadrul etapei au fost analizate principalele tipuri de solicitări la care sunt supuse țesuturile osteoligamentare. De asemenea, a fost făcută încadrarea acestui tip de

țesuturi în clasificarea tipurilor de materiale ținând cont de comportarea lor după îndepărtarea sarcinilor. S-a realizat caracterizarea mecanică a ligamentelor naturale și sintetice pentru determinarea proprietăților mecanice ce au constituit datele de comparație pentru materialele ce s-au dezvoltat în cadrul prezentului proiect.

Țesuturile ligamentare naturale se încadrează în categoria materialelor elasto-plastice, anizotrope, iar tipul de solicitare reprezentativ este solicitarea la întindere.

Etapă II a lucrării

II.1. Elaborare tehnologie de laborator și modele experimentale de biomateriale utilizate în ingineria tisulară de reconstrucție a ligamentelor și a avut ca obiectiv elaborarea tehnologiei de laborator și modelele experimentale de biomateriale utilizate în ingineria tisulară de reconstrucție a ligamentelor.

Raport cu concluziile privind modificările necesare pentru adaptarea tehnicilor de ligamentoplastie la particularitățile animalului de

La animalul de studiu (sus scrofa domesticus), ligamentul încrucișat anterior este format din două fascicule distincte separate. La inserția fascicului anteromedial se găsește ligamentul menisco femural al meniscului medial.[68]

La fel ca și la om, fiecare genunchi are două meniscuri, medial și lateral. Meniscul medial are aceeași formă semilunară (35 mm diametru antero-posterior la oameni) și acoperă 60% din suprafața platoului tibial medial. Meniscul lateral are forma literei „C”, fiind mai mic ca suprafață și diametru decât cel medial. Superior meniscul este concav pentru a realiza o congruență cu suprafața de contact a condilului femural, în timp ce regiunea inferioară este plată permițând un contact intim cu platoul tibial. Cele două meniscuri sunt conectate prin ligamentul transvers prezent doar la câini și porci.[102]

Din punct de vedere al tehnicii chirurgicale, principiile de fixare ale ligamentului rămân neschimbate, respectiv sistem de suspensie ajustabil pentru fixarea grefei în canalul femural și șurub resorbabil sau metalic la nivel tibial, dimensiunile existente permițând utilizarea lor și într-o articulație de dimensiuni mai mici.

Adaptarea instrumentarului la particularitățile animalului de studiu, este reprezentată de utilizarea unei camere artroscopice pentru articulații de dimensiuni mici (1,9 mm), existentă la momentul actual în instrumentarele folosite pentru intervențiile

artroscopice ale articulațiilor mici umane (pumn, cot), dar și utilizarea unor burghie canulate de dimensiuni mai mici decât cele folosite în mod uzual pentru articulația genunchiului uman. Astfel instrumentarul existent se poate adapta fără modificări semnificative.

Pentru o bună vizualizare a celor trei compartimente intraarticulare și a spațiului intercondilian se utilizează o cameră de mici dimensiuni (1,9 mm diametru), fixată pe teaca specifică, acestea găsindu-se în trusele de artroscopie „small joints”.

După explorarea amănunțită a tuturor compartimentelor articulare și a structurilor ligamentare și meniscale cu ajutorul pensei exploratoare, se trece la excizia ligamentului nativ pentru care se folosește o pensă de secționare tip punch și un shaver de mici dimensiuni (2 mm).

În zonele de origine și inserție a ligamentului nativ identificate se fac orificiile viitoarelor tuneluri cu ajutorul dispozitivelor de țintire specifice.

La nivel femural se folosește ghidul de țintire femural specific sistemului de suspensie femural cu înălțime ajustabilă ales, cu un decalaj față de peretele posterior de 3-4 mm, în perspectiva unei grefe de ligament sintetic cu diametru maxim 6 mm, respectând faptul că articulația animalului de studiu coincide ca structură și arhitectură cu cea a omului, dar dimensiunea este mai redusă.

Folosind broșa ca ghid, se introduce primul burghiu, de 4,5mm. Se curăță canalul cu ajutorul shaver-ului și apoi se măsoară canalul femural cu ajutorul unei joje. În funcție de lungimea canalului femural, se efectuează tunelul femural cu un burghiu canulat cu diametrul de până în 6 mm, în funcție de diametrul grefei și distanța intercondiliană, astfel încât în tunelul femural să rămână minim 20 mm de grefon necesar osteointegrării ulterioare.

Ghidul tibial fixat la 45 de grade se inseră centrând vârful acestuia pe mijlocul amprenteii inserției tibiale a ligamentului nativ.

Se fixează ligamentul la sistemul de suspensie cu lungime ajustabilă, trecându-se transtibial și se fixează la nivel femural, urmând a se face probele de flexie-extensie pentru vizualizarea neoligamentului în diferite poziții în cadrul cursei de flexie-extensie complete.

La nivel tibial se fixează cu ajutorul unui șurub resorbabil sau metalic specific.

Pentru desfășurarea etapei a treia a lucrării instrumentarul necesar constituit din:

- trusa completă ligamentoplastie în funcție de sistemul de fixare ales, la care se adaugă modificările în funcție de particularitățile animalului de studiu ales

- cameră artroscopică de 1,9 mm diametru, cu teaca și obturatorul aferent
- pensă exploratorie
- pensă tip punch – neutră; orientate dreaptă + stângă
- lame de shaver de 2mm
- curetă 1,5 mm
- ghid pentru tunelul femural – offset 3-4mm
- broșe kirschner 1,5mm
- burghiu canulat 4,5mm; 5 mm; 5,5 mm; 6 mm
- jojă
- sistem de suspensie cu lungime ajustabilă
- șurub resorbabil sau metalic

Din punct de vedere al adaptării tehnicii chirurgicale, principiile de fixare ale ligamentului rămân neschimbate, respectiv sistem de suspensie ajustabil pentru fixarea grefei în canalul femural și șurub resorbabil sau metalic la nivel tibial, dimensiunile existente permițând utilizarea lor și într-o articulație de dimensiuni mai mici.

II.2 Elaborarea tehnologiei de laborator și obținerea collagenului tip I din ligament în forma de gel – model experimental

Colagenul este principalul component al matricei extracelulare și conferă rezistență mecanică foarte mare țesuturilor, inclusiv ligamentelor.[103] Colagenul poate fi prelucrat în diferite forme, ca geluri/hidrogeluri, matrici poroase (bureți), membrane, tuburi, fibre [104] păstrându-și caracteristicile fizico-chimice și biologice, însă proprietățile mecanice sunt inferioare collagenului din țesutul viu. Din acest motiv procesarea collagenului cu fibre orientate și rezistente mecanic este încă o provocare. Reticularea este o metodă chimică / fizică ce joacă un rol semnificativ în realizarea structurilor cu proprietăți mecanice dorite. Prin reticulare fibrilele insolubile din collagen conferă o structură mai rezistentă din punct de vedere biomecanic.[105] Alte materiale naturale utilizate până în prezent pentru realizarea ligamentelor și tendoanelor au fost chitosanul, alginatul, hialuronanul și mătasea, dar și pentru acestea rezistența mecanică mai poate fi îmbunătățită.

În această etapă s-a obținut gel și hidrolizat de collagen din tendon de curcan. Până în prezent nu au fost prezentate în literatura de specialitate sau brevetate procedee de obținere a collagenului din ligamente. Obținerea collagenului sub forma de gel și de

hidrolizate constituie rezultate brevetabile și tehnologia de obținere a acestora este prezentată schematic în Figura 1.

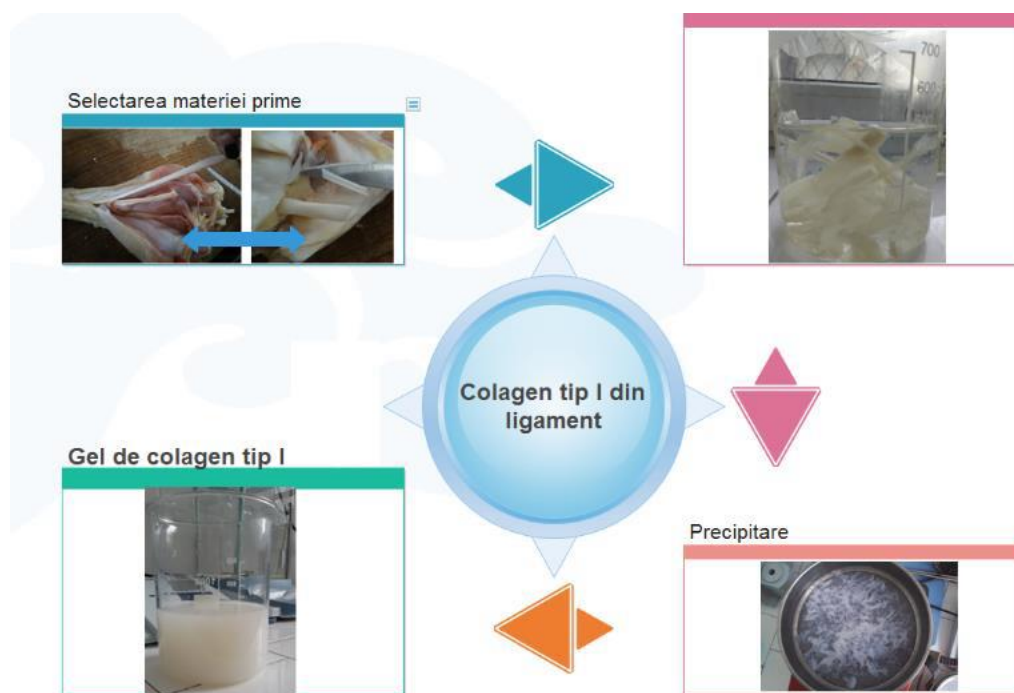


Figura 1. Prezentarea schematică a tehnologiei de obținere a colagenului din ligament

Prin hidroliza gelului de colagen din ligament la temperatura de 1000 C° timp de 4 ore s-a obținut hidrolizatului de colagen din ligament. Tehnologia de obținere a gelului și hidrolizatului de colagen din ligament de curcan sunt prezentate detaliat în cererea de brevet.

II.2.1. Caracterizarea fizico-chimică, morfologică și structurală a colagenului tip I din ligament în formă de gel

Gelurile și hidrolizatele de colagen din ligament de curcan au fost liofilizate și caracterizate fizico-chimic, morfologic și structural în comparație cu gel/hidrolizat din piele bovină. Gelurile/hidrolizatele au fost ajustate la concentrația de 0.5% colagen și pH-ul 7,2-7,4. O parte din acestea au fost reticulate cu 0,5% glutaraldehidă, o parte au rămas nereticulate.

Acestea au fost codificate după cum urmează:

Proba I.1. – gel de colagen din ligament, pH -7,4 c = 0,5%, nereticulat

Proba I.2. – gel de colagen din ligament, pH -7,4 c = 0,5%, reticulat

Proba II.1. – gel de colagen din piele, pH -7,4 c = 0,5%, nereticulat

Proba II.2. – gel de colagen din piele, pH -7,4 c = 0,5%, reticulat

Proba III.1. – hidrolizat de collagen din ligament, pH -7,4 c = 0,5%, nereticulat

Proba III.2. – hidrolizat de collagen din ligament, pH -7,4 c = 0,5%, reticulat

Proba IV.1. – hidrolizat de collagen din piele, pH -7,4, c = 0,5%, nereticulat

Proba IV.2. – hidrolizat de collagen din piele, pH -7,4 c = 0,5%, reticulat

În cadrul lucrării au fost prezentate rezultatele caracterizării comparative pe geluri (piele bovină/ligament curcan) și hidrolizate (piele bovină/ligament curcan), reticulate și nereticulate.

II.2.2 Elaborarea tehnologiei de laborator pentru obținere de ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I

Pentru stabilirea tehnologiei de funcționalizare a ligamentelor din polimer sintetic cu collagen tip I s-au utilizat gelurile și hidrolizatele obținute. S-a funcționalizat un ligament sintetic LARS din polietilen tereftalat (PET).

Ligamentul LARS a fost imersat în gelul/hidrolizatul de collagen (din ligament și piele) timp de 30 min, urmat de uscare la 300 C° în etuvă. După uscare probele au fost analizate prin Spectroscopia FTIR, în scopul analizei structurale a materialelor collagenice atât ca tendon cât și sub forma de gel sau hidrolizat de collagen.

Analiza a arătat următoarele:

- Tendonul de curcan este un material pe bază de collagen cu o integritate a structurii triplu-elicoidale bune, dovedit de raportul supraunitar al intensității benzilor de la 1240 și 1450cm⁻¹;
- Extragerea collagenului are loc cu degradarea avansată a acestuia, dovada fiind modificarea avansată a spectrului FTIR aferent gelului și respectiv hidrolizatului de collagen adică au loc numeroase scindări ale moleculei de collagen cu obținerea unor structuri peptidice cu mase moleculare mai mici;
- Probele de collagen extrase din tendon de curcan nu prezintă banda de la 1240 cm⁻¹ caracteristică amidei III ceea ce denotă lipsa structurii triplu-elicoidale caracteristică collagenului triplu-helix existente în tendonul de collagen sau în pielea bovină;
- Benzile de la 1405 și 1570 cm⁻¹ pot fi atribuite produșilor bogați în pirimidină rezultați iar reducerea severă a benzii de la 1650 (amida I) este o consecință a scindărilor grupelor amidice;

- Reticularea duce la apariția în spectru a unor benzi suplimentare (L.I.2: 1711, 1695, 1640 cm^{-1} sau o bandă mai largă centrată la $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ în cazul L.III.2) și intensificarea benzilor caracteristice vibrațiilor de întindere simetrice și asimetrice caracteristice grupării metilenice din agentul de reticulare.

În cazul gelului de collagen bovin, pe baza datelor de spectroscopie FTIR se pot deduce următoarele:

- Spectrul collagenului bovin este similar cu cel extras din tendonul de curcan ceea ce prezintă premisele posibilității utilizării collagenului bovin și pentru aplicații în ingineria tisulară a ligamentului;
- În cazul collagenului bovin, denaturarea indusă de extracție dar și de tratamentul fizico-chimic necesar obținerii hidrolizatului, este redusă; hidrolizatul de collagen astfel obținut încă prezintă banda de amida III (raportul intensității benzilor de la 1240 și 1450 este ~ 1), adică denaturarea moderată a configurației triplu-elicooidale a collagenului;
- În cazul hidrolizatelor de collagen bovin se observă o scindare a benzilor de la amida I și amida II (1650 și 1550 cm^{-1}) cel mai probabil datorită proceselor de hidroliză a grupărilor peptidice din collagen;
- Și în acest caz, reticularea poate fi dovedită prin creșterea intensității benzilor de vibrație caracteristice grupării metilenice din glutaraldehidă utilizată ca agent de reticulare.

Modificarea chimică a ligamentelor sintetice de tip LARS a dus la modificarea suprafeței cu gel și hidrolizat de collagen bovin sau extras din ligament de curcan.

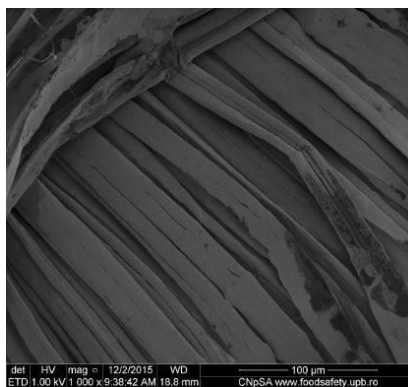
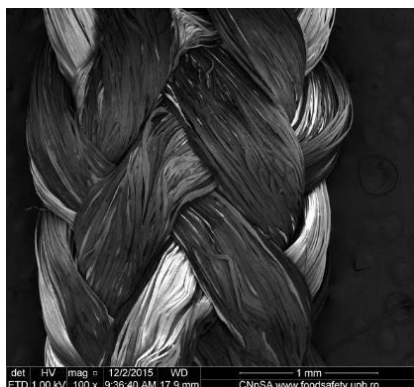
Spectrele FTIR au fost înregistrate pe cele 4 seturi de probe numite generic LARS_L.I-IV.1-2 utilizând gelurile și hidrolizatele de collagen sus menționate. Analizând rezultatele aferente analizelor de spectroscopie FTIR se pot deduce următoarele:

- Depunerile de collagen/gradul de funcționalizare a ligamentelor sintetice de tip LARS sunt dependente de natura agentului de funcționalizare atât din punct de vedere al naturii collagenului (bovin sau curcan) cât și al reticulării;
- Utilizarea gelului de collagen extras din ligament de curcan duce la o atașare foarte bună dacă se utilizează în forma nereticulată și moderată dacă se folosește în forma reticulată. Comparativ cu proba martor de ligament sintetic (LARS), în ambele cazuri se observă o depunere de collagen;

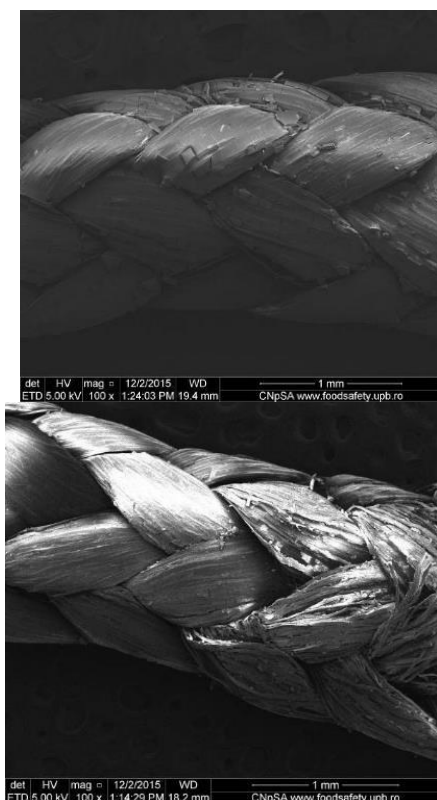
- Utilizarea gelului de collagen bovin reticulat nu este benefic deoarece reținerea pe fibrele de ligament sintetic este foarte mică; practic nu pot fi puse în evidență benzile caracteristice collagenului;
- În cazul utilizării hidrolizatelor de collagen, în ambele cazuri de hidrolizat, funcționalizarea este superioară gelului de collagen, indiferent dacă provine din piele bovină sau tendon de curcan.

Ligamentul de curcan a fost de asemenea analizat prin microscopie FTIR. Analiza relevă faptul că materialul (ligamentul de curcan) este omogen. Dacă se analizează, spre exemplu, benzile caracteristice CH₂ și CH₃ din ligament se poate lesne observa o foarte bună corespondență a intensităților acestor benzi și, mai mult, cu benzile caracteristice lipidelor 1734, 1675 cm⁻¹. Benzile caracteristice collagenului sunt puțin diferite de cele ale CH₂/CH₃ însă diferențele nu sunt consistente.

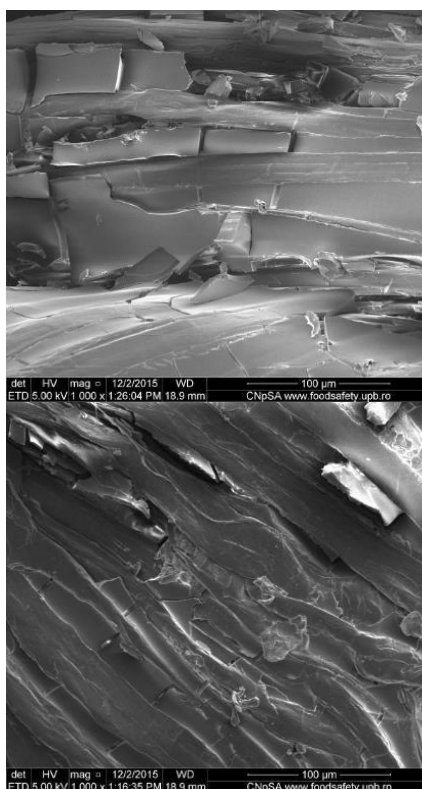
De asemenea, probele obținute prin funcționalizarea ligamentelor LARS au fost analizate prin microscopie FTIR. S-a observat o foarte bună depunere pe probele tratate cu hidrolizat, indiferent de natura hidrolizatului și de reticulare și o decalare a benzilor caracteristice collagenului și respectiv a ligamentului sintetic ceea ce înseamnă că depunerea collagenului se realizează cu precădere interfibrilar unde adeziunea este favorizată. Imaginile de microscopie electronică au relevat morfologia specială a ligamentului sintetic LARS precum și a celor derivate din acesta. Probele LARS-L.IV.1 și 2 prezintă un conținut ridicat de hidrolizat de collagen și prin urmare prezintă premisele unui răspuns pozitiv din partea organismului gazdă.



LARS



LARS_L.IV.2



LARS_L.IV.1

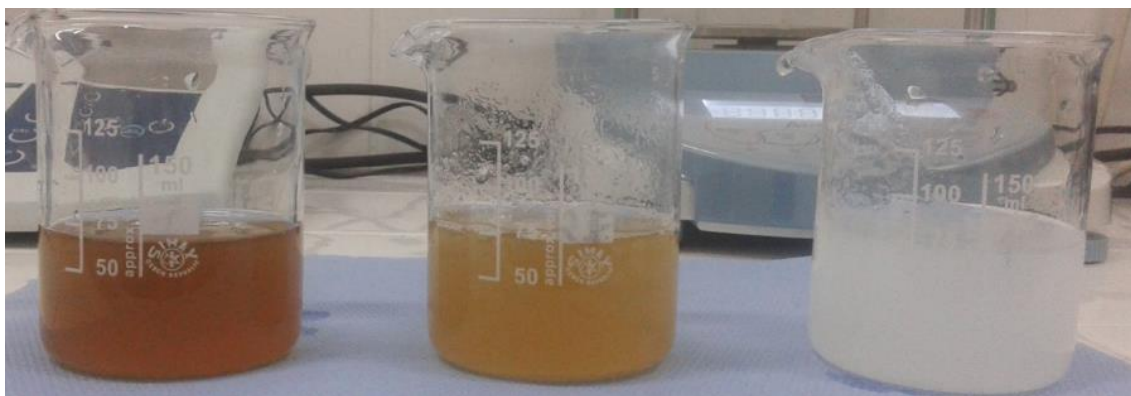
Figura 2. IMAGINI SEM relevante pentru probele LARS-L.IV 1 și 2

Etapa III a lucrării. Studiu preclinic. Realizare ligament model experimental și testare a avut ca obiectiv obținerea unui model experimental de ligament funcționalizat și testarea lui preclinică.

III. Obținere ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I – model experimental faza a II-a

Ținând cont de rezultatele din etapa 2 privind abilitățile de depunere pe ligamentul LARS, în etapa a 3 a s-au utilizat numai collagen de origine bovină. Rezultatele cele mai bune din punct de vedere al abilității de depunere pe ligamentul LARS a revenit hidrolizatului de collagen și respectiv ligamentelor funcționalizate LARS-L.IV.1 și 2. Totuși, hidrolizatul de collagen este forma denaturată a collagenului, un amestec de aminoacizi și peptide care poate fi recunoscut mai greu de organism. Din acest motiv, în această etapă a fost utilizat collagenul sub forma de hidrolizat, gel și amestec al acestora, la pH-ul 7,4, urmate de reticulare cu 0,005% glutaraldehidă.

Trei ligamente LARS au fost furnizate în vederea funcționalizării. Ligamentele LARS a fost imersate în gelul/hidrolizatului de collagen timp de 30 min, urmat de uscare la 300 C° în etuvă. După uscare probele au fost sterilizate cu raze X.



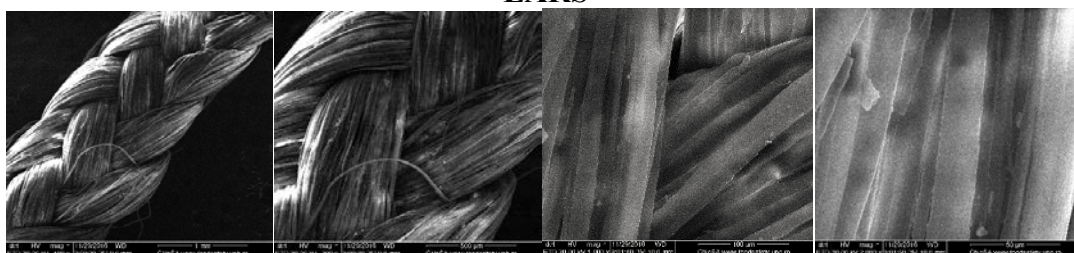
Colagen hidrolizat Colagen gel + hidrolizat Colagen gel

Figura 3. Compoziții de funcționalizare

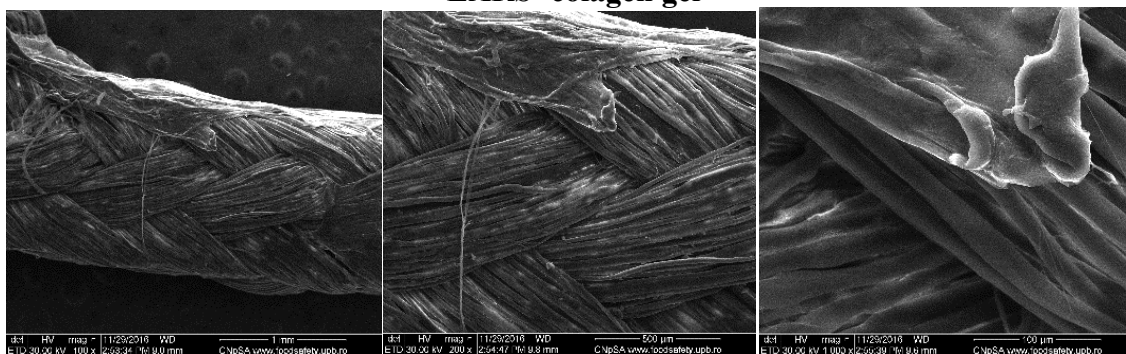
III.1 Caracterizarea fizico-chimică, morfologică și structurală a suprafețelor funcționalizate cu colagen tip I din ligament

Imaginile SEM înregistrate pe ligamentele LARS nefuncționalizate pun în evidență morfologia fibrilar-împletită a ligamentului sintetic obținut pornind de la fibrile de (20-30) μm care, împletite duc la formarea unor structuri de ordinul a 1mm, care de altfel reprezintă elementul de bază al acestor ligamente. Această structurare permite alungirea ligamentului și implicit preluarea solicitării mecanice, fără să implice ruperea ligamentului și, mai mult, protejează țesutul osos de care este ancorat.

LARS



LARS+colagen gel



LARS+colagen gel+hidrolizat de colagen

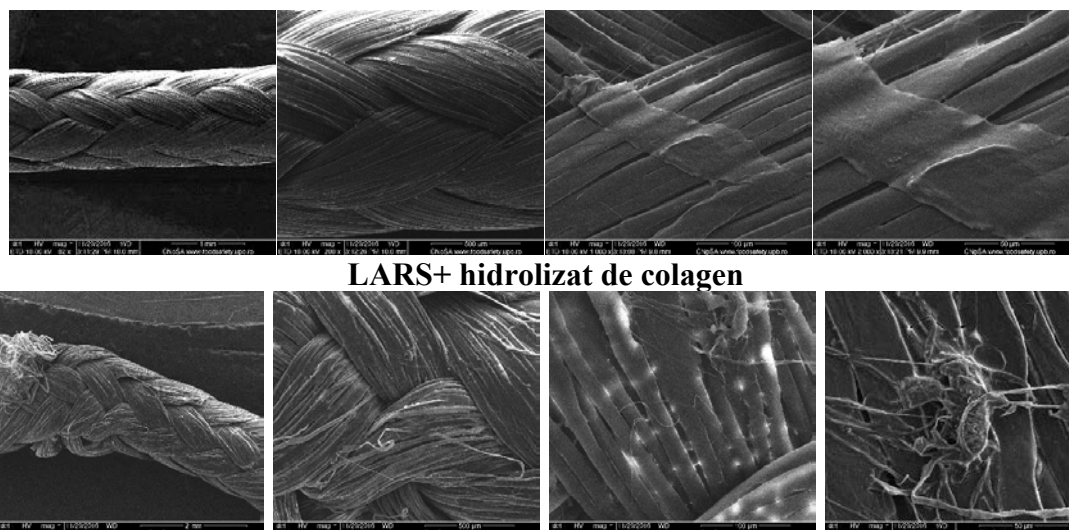


Figura 4. Imaginile SEM caracterice ligamentului sintetic nefuncționalizat și funcționalizat cu material colagenic

Probele LARS funcționalizate cu gel de collagen prezintă depuneri vizibile de collagen care, pe alocuri chiar acoperă zone însemnate de ligament, grosimea acestor straturi fiind de ordinul zecilor de micrometri. Funcționalizarea cu amestec de gel de collagen și hidrolizat de collagen duce la apariția unor zone integral acoperite de un strat colagenic, însă aceste structuri pot fi vizualizate localizat și nu sunt foarte răspândite. Funcționalizarea cu hidrolizat de collagen duce la obținerea unor suprafețe netede, fără a se putea vizualiza straturi colagenice care să acopere parțial sau integral fibrilele și fibrele ce alcătuiesc ligamentul sintetic. Acest lucru se datorează, cel mai probabil, vâscozității scăzute a hidrolizatului ceea ce face ca excesul de material colagenic să se scurgă de pe ligament.

Probele LARS nefuncționalizate și respectiv funcționalizate au fost caracterizate și prin spectroscopie și microscopie FTIR precum și prin microscopie electronică de baleiaj urmărind modificările morfologice și compoziționale de la suprafața ligamentului sintetic și distribuția agentului cu care se face funcționalizare pe suprafața acestuia. Ligamentul LARS luat în considerare, conform bazei de date FTIR, este pe bază de polietilenă de înaltă densitate parțial oxidată așa cum reiese din spectrul FTIR, în special datorită prezenței benzilor de intensitate scăzută (concentrație mică) de la 1110, 1540, 1576 și 1645 cm^{-1} . Pornind de la ligamentul sintetic LARS, prin funcționalizare cu agenți pe bază de collagen se obțin cele trei modele experimentale funcționalizate ce se vor testa *in vivo*. Funcționalizarea cu collagen a dus la modificarea cea mai însemnată a suprafeței, cantitatea de collagen imobilizat pe suprafața ligamentului sintetic fiind maximă, cel mai probabil datorită vâscozității maxime a

gelului de collagen comparativ cu amestecul de collagen + hidrolizat și respectiv a hidrolizatului de collagen. În cazul modificării cu hidrolizat de collagen sau amestec collagen + hidrolizat de collagen, cantitatea de agent de funcționalizare reținut pe suprafața ligamentului este similară.

Prezența gelului de collagen și respectiv a hidrolizatului de collagen se poate evidenția pe baza benzilor specifice acestuia și anume: 2913, 2846, 1650, 1550, 1470, 1461, 1400, 1338, 1239, 1081 cm⁻¹. Dintre acestea, cel mai important peak este cel de la 1650 cm⁻¹ deoarece are intensitate suficient de mare și este independentă de celelalte benzi ale materialului polietilenic caracteristic ligamentului. De asemenea este de remarcat faptul că hidroliza collagenului duce la scăderea intensității benzii la 1240 cm⁻¹.

Imaginile de microscopie FTIR înregistrate pe ligamentul artificial LARS nemodificat pun în evidență structura împletită a unei fibre de PE-PEO și omogenitatea bună a acestor materialele, diferențele ce apar în imaginile FTIR fiind datorate doar diferențelor de înălțime. Astfel, imaginile FTIR înregistrate la 1470 și 723 cm⁻¹ sunt practic identice ceea ce denotă o bună omogenitate a materialului.

Imaginile de microscopie FTIR înregistrate pe ligamentul artificial LARS modificat cu gel de collagen pun în evidență structura împletită a unei fibre de PE-PEO acoperite cu gel de collagen. Mai mult, pe baza imaginilor FTIR înregistrate la lungimea de undă caracteristică ligamentului LARS (adică 1470 cm⁻¹) și cel caracteristic collagenului (1650 cm⁻¹) se poate deduce că depunerea de collagen este relativ uniformă pe toată suprafața ligamentului sintetic deși există zone izolate care nu prezintă collagen.

Imaginile de microscopie FTIR înregistrate pe ligamentul artificial LARS modificat cu gel de collagen și hidrolizat de collagen pun în evidență structura împletită a unei fibre de PE-PEO acoperite cu gel și hidrolizat de collagen. Mai mult, pe baza imaginilor FTIR înregistrate la lungimea de undă caracteristică ligamentului LARS (adică 1470 cm⁻¹) și cel caracteristic collagenului (1650 cm⁻¹) se poate deduce că depunerea de collagen este uniformă pe toată suprafața ligamentului sintetic.

Imaginile de microscopie FTIR înregistrate pe ligamentul artificial LARS modificat cu gel de collagen și hidrolizat de collagen pun în evidență structura împletită a unei fibre de PE-PEO acoperite cu hidrolizat de collagen. Mai mult, pe baza imaginilor FTIR înregistrate la lungimea de undă caracteristică ligamentului LARS (adică 1470 cm⁻¹) și cel caracteristic collagenului (1650 cm⁻¹) se poate deduce că depunerea de hidrolizat de collagen este neuniformă. Mai mult, utilizarea hidrolizatului de collagen, mult mai

fluid decât gelul de collagen și amestecul gel + hidrolizat de collagen permite o depunere uniformă pe suprafață și o depunere masivă, interfibrilar.

Analiza prin microscopie FTIR pune în evidență, de asemenea, o hidrofilie bună a suprafețelor tratate cu gel, hidrolizat sau amestec gel + hidrolizat de collagen datorită startului peptidic care prezintă o hidrofilicitate crescută. Totuși, și ligamentul nefuncționalizat prezintă peak-urile caracteristice apei fizice atașate datorită, cel mai probabil, componentei oxidate a polietilenei.

III.2 Caracterizarea mecanică prin testări statice și dinamice a modeleului experimental de ligament din polimer sintetic funcționalizat

Cercetările în domeniul ligamentelor artificiale demonstrează că cea mai importantă caracteristică necesară pentru materialele din care se realizează ligamentele artificiale este biocompatibilitatea (stabilitate chimică, gradul de polimerizare, absența aditivilor solubili, prezența porilor pentru creșterea fibroblastelor).

Pe lângă această caracteristică, proprietățile mecanice (rezistența la tracțiune, rigiditate, alungire, torsiune și rezistență la abraziune) trebuie să fie cât mai asemănătoare cu cele ale ligamentelor naturale. S-au realizat încercări statice pe modelul experimental al ligamentului artificial funcționalizat pentru determinarea rezistenței la tracțiune, deformației și alungirii specifice pe ligamente artificiale funcționalizate cu collagen, realizate.

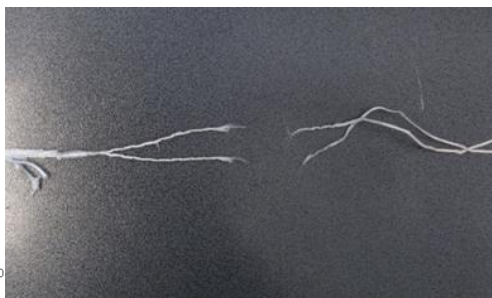
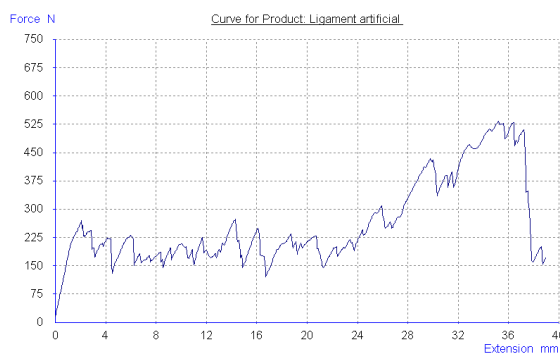
Testele statice

Pentru încercările statice în vederea determinării rezistenței la tracțiune, deformației și a alungirii s-a utilizat un echipament universal de încercare. Echipamentul folosit este HOUNSFIELD de tip H10KT

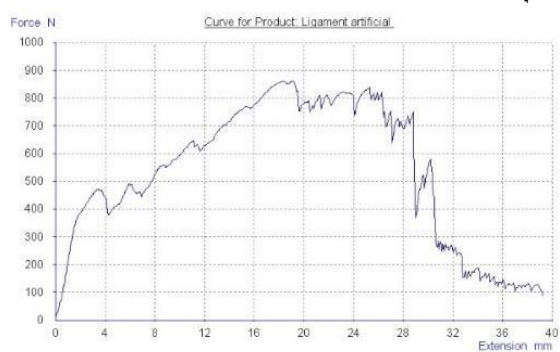
În figura 5 sunt prezentate graficele de variație al forței la în zonele ligamentului și se ilustrează modul de rupere al acestor zone.

Din studiul curbelor caracteristice se constată o variație neuniformă a forței, neuniformitate care se datorează ruperii treptate a fibrelor ligamentului artificial, orice rupere de fibră determinând o scădere a valorii forței de tracțiune. Se remarcă faptul că pentru zona activă ruperea nu s-a produs în porțiunea de lucru, ci puțin mai sus, iar cele două fragmente nu s-au separat total, oprirea încercării fiind determinată de scăderea

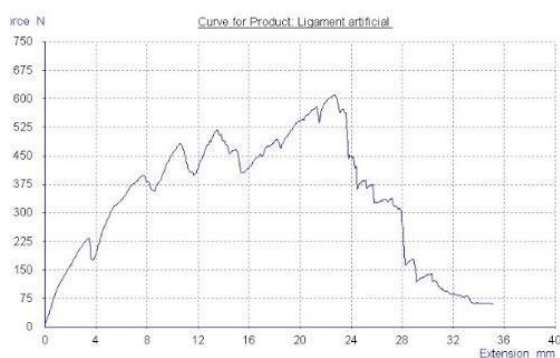
masivă a forței de tracțiune datorită ruperii unui număr mare de fibre componente. Rezultatele încercărilor sunt centralizate în tabelul 4.



Curba caracteristică și ruperea la capătul de fixare



Curba caracteristică și ruperea în zona de legătură



Curba caracteristică și ruperea în zona activă

Figura 5 Curba caracteristice

Tabelul 4- Rezultatul testelor statice

Zona testată a ligamentului	Forța la rupere [N]	Rezistența la tracțiune [N]	Lungime Inițială [mm]	Deformație [mm]	Alungire [%]
Capăt fixare	169,5	527	75	39	51
Zona de legătură	87,1	862	42	39,23	93
Zona activă	59,3	611	46	35,2	76,5

Rezultatele rezistenței la tracțiune relevă valori ale forței de rupere mai mici decât cele găsite pentru ligamentele naturale în literatura de specialitate studiată, dar similare cu a altor autori. Pentru toate cele trei zone ale ligamentului se constată aspectul neliniar al curbelor caracteristice, din cauza ruperii progresive a fibrelor ce compun ligamentul. Toate zonele testate au prezentat deformații similare, reliefând un comportament elastic prin alungirea procentuală ridicată.

Testele dinamice

Încercarea la anduranță a ligamentelor artificiale în laboratorul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare pentru Mecatronica și Tehnica Măsurării s-a realizat cu un echipament universal de testare INSTRON 8872. Ligamentul artificial a fost testat la oboseală numai în zona activă, iar prinderea pe mașină s-a realizat cu ajutorul aceluiași dispozitiv utilizat și pentru încercările statice.

Pentru încercare s-a avut în vedere rezistența la rupere determinată prin încercările statice și s-a utilizat o valoare a forței de sollicitare mai mică, respectiv au fost aplicate 3 paliere de sollicitare de 100, 200 respectiv 300N. Efectul sollicitării ciclice a fost studiat numai pe porțiunea activă a ligamentului, la diferite rate/frecvențe de încărcare, iar forma curbei de încărcare a fost sinusoidală. A fost studiată comportarea la frecvențe de 0,5; 1; și 2Hz, acestea fiind frecvențele posibile a fi atinse in vivo. Pentru a asigura tensionarea ligamentului artificial pe toată durata încercării, s-a prevăzut o forță minimă de sollicitare având 10% din valoarea forței maxime, respectiv la forța maximă de 100 N, forța minimă a fost de 10 N. Pentru a asigura oprirea automată a echipamentului de încercare în cazul ruperii probei, s-au activat limite de control atât pentru forță cât și pentru deplasare.

S-a observat că frecvența de testare de 0,5Hz produce neuniformități ale curbelor și după încercări de scurtă durată (1000 cicluri) cu fiecare frecvență, pentru reducerea timpului de încercare s-a adoptat ca frecvență de lucru valoarea de 2Hz. În figura 6 este prezentat modul de rupere al zonei active a ligamentului după testarea la oboseală, iar rezultatele încercărilor dinamice sunt în Tabelul 5.

Tabelul 5- Rezultatul testelor dinamice

Nr. crt.	Forța de încărcare [N]	Deplasare [mm]	Număr de cicluri [-]	Durata încercării [zile-ore]
1	100	0,37	1.000.000	5z 18h
2	200	0,51	1.000.000	5z 18h
3	300	0,64	768.155	5z 0,5h



Figura 6. Ruperea la oboseală în zona activă

Curbele de histerezis ilustrează modul de disipare al energiei în ligamentul artificial, funcție de forța aplicată și de frecvența de lucru. Practic deformarea ligamentului artificial rămâne în urmă față de tensiunea mecanică aplicată datorită elasticității sale. Suprafața din interiorul curbei este proporțională cu lucrul mecanic ce s-a transformat în căldură. Se remarcă ușoarele neuniformități ale curbei de histerezis pentru forța de 100N, precum și aspectul ușor curbat al diagramei. Trebuie subliniat faptul că ligamentul testat a fost unul funcționalizat cu collagen și că acest comportament se poate modifica după implantare, în sensul scăderii/creșterii valorilor maxime.

III.3 Testarea preclinică prin implantarea de ligament sintetic ligament din polimer sintetic funcționalizat cu collagen tip I pe animalul de studiu



Figura 7. Izolarea câmpului operator cu material textile steril

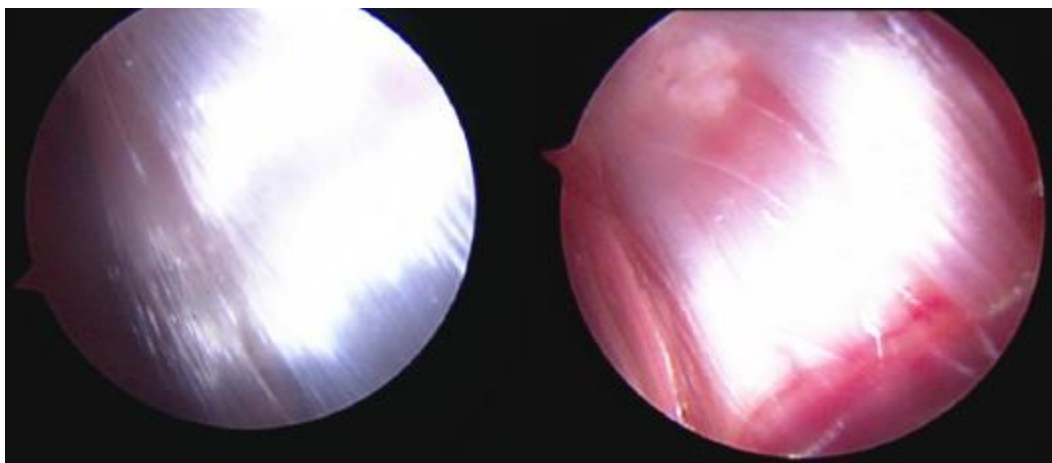


Figura 8. Imaginea grefei de ligament încrucișat anterior intraarticular.

Etapa IV a lucrării. Realizare model funcțional ligament a avut ca obiectiv realizarea unui model funcțional de ligament funcționalizat cu collagen tip I și realizarea unui protocol chirurgical adaptat pentru subiecții umani.

IV. Analiza postoperatorie a mobilității și funcționalității articulației cu ligament artificial

S-au analizat rezultatele obținute pe animalul de testare și au verificat gradul de mobilitate al articulației operate față de cea neoperată.

Postoperator după analiza mișcărilor de flexie-extensie efectuate pasiv sub anestezie generală nu se constată nicio limitare mecanică, acestea putând fi realizate la amplitudine maximă.

La interval de o săptămână postoperator aspectul plăgilor operatorii au fost favorabile, mersul animalului de studiu era șchiopătat fără sprijin până la aproximativ 3 săptămâni când acesta a început sprijinul parțial pe membrul operat păstrând mersul șchiopătat până la aproximativ 6 săptămâni după care s-a observat o mobilizare normală a acestuia.

IV.2 Selectarea compozițiilor corespunzătoare a ligamentelor

În etapa anterioară s-au selectat 3 compoziții de collagen tip I din piele bovină sub formă de 1) gel, 2) hidrolizat de collagen și 3) amestec de gel și hidrolizat de collagen.

Imaginea de microscopie a unei secțiuni prin grefa ligament mixt sintetic-biologic 100 X este prezentată în figura 9 .

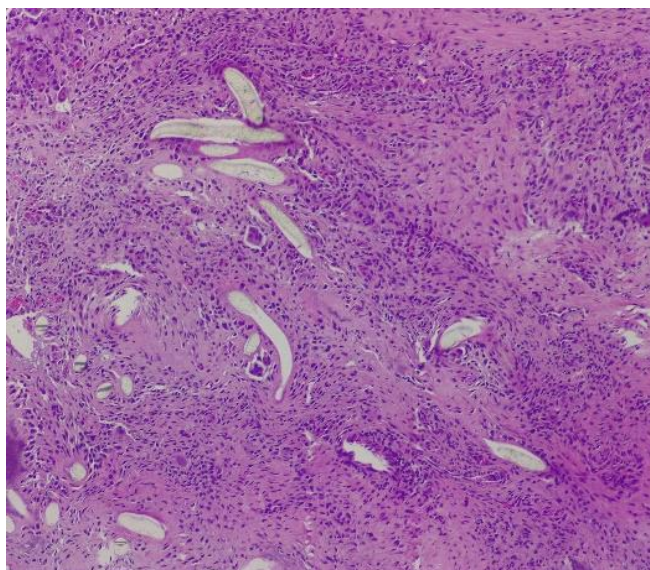


Figura 9 Secțiune prin LIA mixt sintetic biologic

Se observă fragment de țesut fibro-tendinos (dreapta sus) cu țesut de granulație cu celule gigante multinucleate în jurul fragmentelor de material sintetic. Numeroase fibroblaste activate ce pot fi considerate precursori ale unei proliferări tisulare.

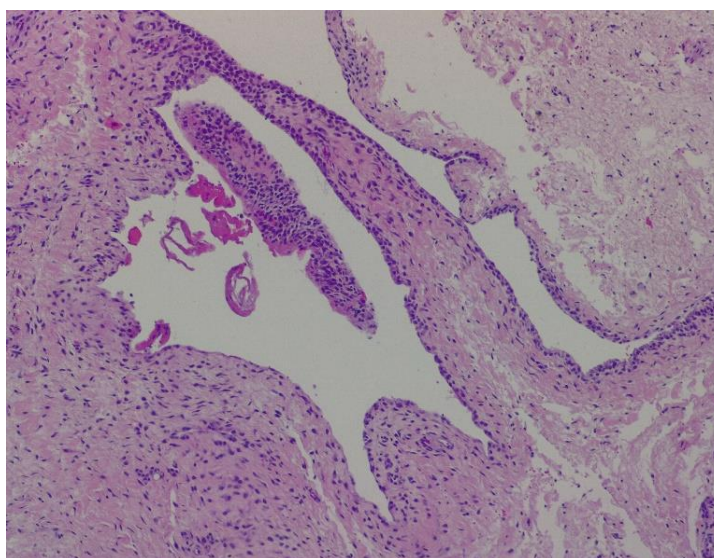


Figura 10. Imagine microscopie optica (100x) membrana sinoviala grefa mixta sintetic biologic

Fragmentul de membrană sinovială prezintă minimă hiperplazie a sinoviocitelor și discrete depozite de fibrină în suprafață.

În imaginea cu genunchiul implantat cu grefa de ligament mixt sintetic biologic (fig.11) se observă formarea unei membrane de țesut fibro-tendinos în jurul țesăturii de fibre sintetice, depunere observată și la analiza microscopică a secțiunilor de ligament.

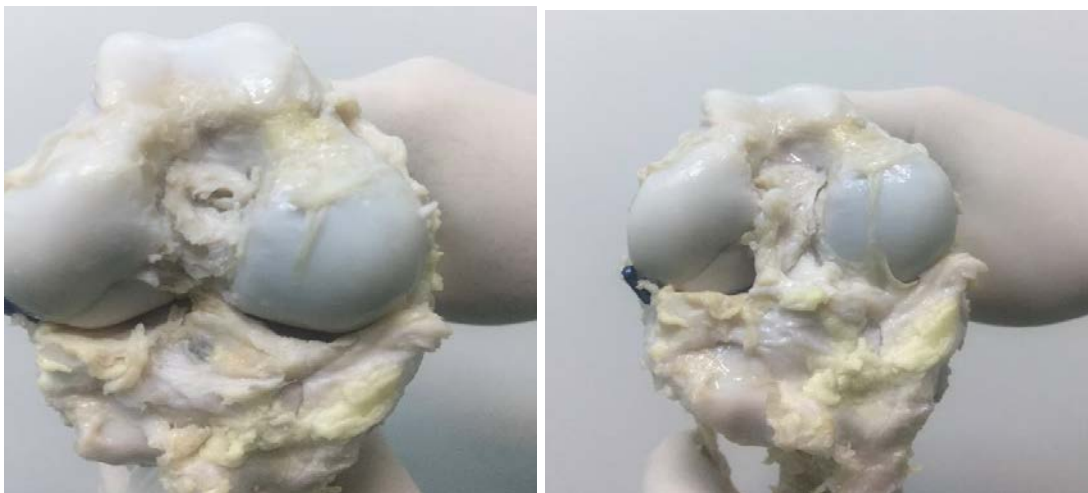


Figura 11.

În urma testelor fizico-chimice, morfologice, mecanice și testelor pe animale, a fost selectată ca fiind compoziție optimă de acoperire amestecul din hidrolizat de collagen și gel de collagen în proporție 50:50 reticulate cu glutaraldehidă. Este de menționat că această compoziție asigură lucrabilitate maximă și o funcționalizare omogenă a ligamentului LARS, inclusiv în interiorul acestuia deoarece hidrolizatul de collagen este mai puțin vâscos și are, de asemenea, o solubilitate mai bună. Luând în considerare această compoziție optimă, în continuare este descris procedeul de realizare a modelului funcțional de ligament din polimeri sintetici acoperit cu collagen tip I.

VI.1. Realizare model funcțional ligament din polimeri sintetici acoperit cu collagen tip I

Ținând cont de rezultate anterioare, din punct de vedere al abilității de depunere pe ligamentul LARS, în această etapă s-au utilizat doar compoziția: gel de collagen + collagen hidrolizat din dermă bovină, pH -7,4 c = 0,5%, reticulată cu glutaraldehidă. Ligamentul LARS a fost imersat în amestecul gel + hidrolizatul de collagen timp de 30 min, urmat de uscare la 30°C în etuvă. După uscare probele au fost sterilizate cu raze X.

VI.2. Caracterizarea fizico-chimică și structurală a ligamentului din polimeri sintetici acoperit cu collagen tip I

Analiza FTIR este concludentă și pune în evidență prezența structurilor collagenice de pe suprafața ligamentului sintetic, în special prin benzile din domeniul

1400 – 1650 cm^{-1} benzi aferente grupărilor amidice specifice doar collagenului (polimerul sintetic nu absoarbe în această zonă).

Analiza FTIR a fost înregistrată în 3 zone distincte, spectrele rezultate fiind practic identice s-a considerat faptul că depunerea a fost omogenă la scală macro și s-a recurs la analiza prin microscopie FTIR pentru evidențierea omogenității la scala micrometrică. Omogenitatea depunerii a fost analizată prin microscopie FTIR (Figura 12).

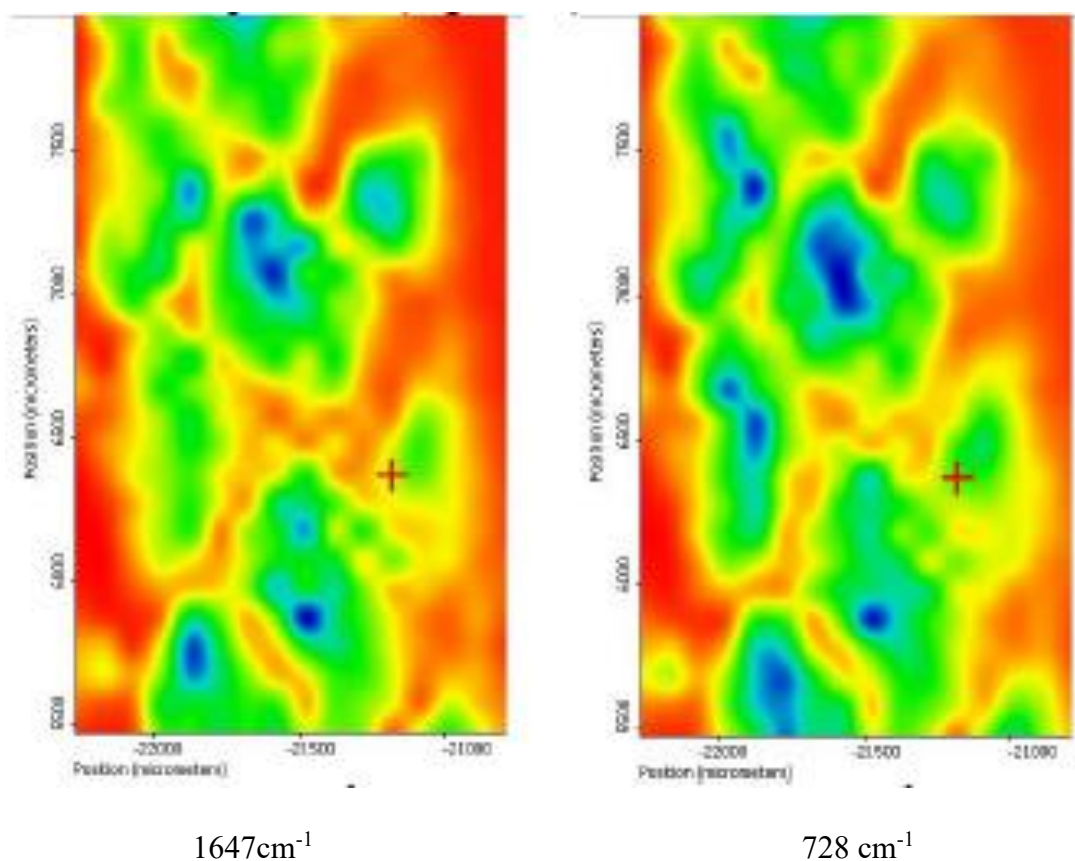


Figura 12. Imaginile de microscopie FTIR corespunzătoare ligamentului funcționalizat înregistrate la 1647 și 728 cm^{-1}

Astfel, depunerea structurilor colagenice a fost evidențiată prin înregistrarea imaginilor FTIR la 728 cm^{-1} (aferentă ligamentului sintetic utilizat) și respectiv la 1647 cm^{-1} (aferentă structurilor colagenice utilizate pentru modificarea suprafeței). Analiza comparativă a celor două imagini de microscopie FTIR evidențiază o omogenitate foarte bună chiar și la scală milimetrică.

Imaginile de microscopie electronică (Figura 17) au fost înregistrate pe proba funcționalizată conform procedurii descris în etapa anterioară. În scopul analizei, au fost analizate două zone caracteristice ligamentului și anume zona activă, centrală,

neîmpietită a ligamentului precum și o zonă împietită. În ambele zone se poate observa că fibrilele de PET au un diametru de $\sim 20\mu\text{m}$ și că acestea sunt extrem de netede ceea ce, coroborat cu analiza FTIR confirmă omogenitatea depunerii structurii colagenice.

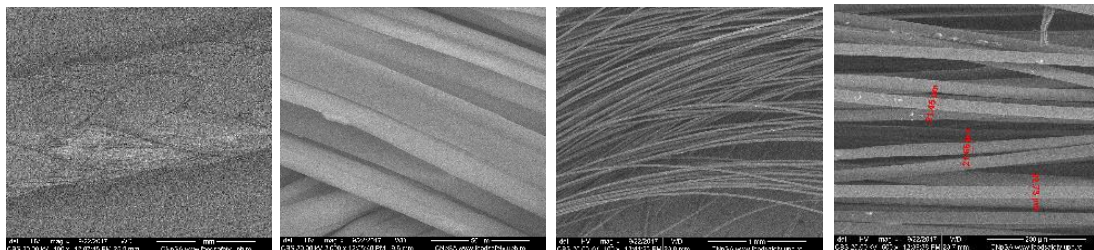


Figura 13. Imagini SEM relevante caracteristice ligamentului sintetic funcționalizat

VI.3. Testarea preclinică model funcțional

În cadrul etapei, s-au realizat încercări statice pentru determinarea rezistenței la tracțiune, deformației și alungirii specifice pe modelul funcțional al ligamentului artificial funcționalizat cu colagen.

Pentru încercările statice în vederea determinării rezistenței la tracțiune, deformației și a alungirii s-a utilizat un echipament universal de încercare HOUNSFIELD de tip H10KT, seria 0034, dotat cu o celulă de forță nr.:0198107, cu domeniul 1-10.000N, în clasa 0,5 producător Hounsfield Anglia.

Din studiul curbelor caracteristice se constată o variație neuniformă a forței, neuniformitate care se datorează ruperii treptate a fibrelor ligamentului artificial, orice rupere de fibră determinând o scădere a valorii forței de tracțiune. Valoarea maximă a forței a fost de 1203N, iar alungirea procentuală a fost de 44,6% valori înregistrate pentru porțiunea de inferioară de legătură.

Analizând curba caracteristică a deformării modelului funcțional față de modelul experimental în zona de legătură se observă o comportare mai bună a modelului funcțional prin o deformare mai uniformă și o rezistență la rupere mai mare. De asemenea modelul funcțional este mai rigid în zonele de legătură decât modelul experimental având o deformație procentuală mai mică.

În figura 14 sunt prezentate curba caracteristică a porțiunii active a modelului funcțional de ligament funcționalizat și modalitatea de rupere a acestuia.

Se remarcă faptul că pentru zona activă ruperea nu s-a produs în porțiunea de lucru, ci puțin mai jos, iar cele două fragmente nu s-au separat total, oprirea încercării

fiind determinată de scăderea masivă a forței de tracțiune datorită ruperii unui număr mare de fibre componente.

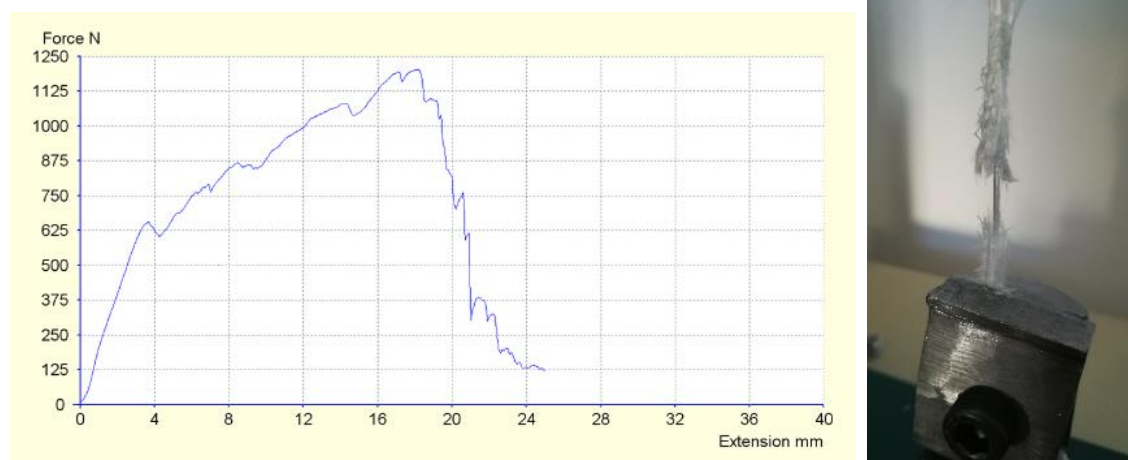


Figura 14. Curba caracteristică și ruperea în zona activă a modelului funcțional de ligament

Analizând curba caracteristică a deformării modelului funcțional față de modelul experimental, în zona activă se observă o comportare mai bună a modelului funcțional prin o deformare mai uniformă și o rezistență la rupere mai mare. De asemenea modelul funcțional este mai elastic decât modelul experimental având o deformație procentuală mai mare în zona activă.

Rezultatele încercărilor sunt centralizate în tabelul 6.

Zona testată	Forța la rupere [N]	Rezistența la tracțiune [N]	Lungime inițială [mm]	Deformație [mm]	Alungire [%]
Modelul funcțional de ligament funcționalizat					
Zona de legătură superioară	280	892	30	17,5	58,3
Zona de legătură inferioară	315	1203	46	20,5	44,6
Zona activă	375	1011,3	30	19,5	65
Modelul experimental de ligament funcționalizat					
Zona de legătură	280	862	42	31,5	75
Zona activă	300	611	46	28	60,9

Rezultatele rezistenței la tracțiune relevă o îmbunătățire a caracteristicilor modelului funcțional față de modelul experimental. Pentru cele două zone ale

ligamentului se constată aspectul neliniar al curbelor caracteristice, din cauza ruperii progresive a fibrelor ce compun ligamentul. Toate zonele testate au prezentat deformații similare, reliefând un comportament elastic prin alungirea procentuală ridicată.

VII. Realizare protocol operator pentru implantare ligament artificial pe subiecți umani

S-a realizat un protocolul operator cu grefa sintetica funcționalizată cu collagen pentru subiecți umani. Acesta cuprinde etapele de pregătire a intervenției, intervenția propriu-zisă și urmărirea postoperatorie a subiecților umani.

Prima etapă după admiterea pacientului în sala de operație este poziționarea și stabilizarea acestuia pe masa de operație, astfel încât să avem o mobilitate completă a articulației genunchiului în cauză, cu extensie completă și flexia mai mult de 120 de grade, pe toată durata intervenției chirurgicale.

Poziția pacientului pe masa chirurgicală se face în decubit dorsal, aplicarea unui suport stabilizator lateral la nivelul coapsei și un suport la nivelul piciorului montat în flexie peste 90 de grade. Aplicarea de ciorap compresiv antitrombotic pe membrul inferior controlateral și suport protectiv de silicon la nivel calcanean.

Efectuarea corectă a celor 2 portale cât și efectuarea unui portal accesoriu sunt cruciale în buna vizualizare și desfășurare a reconstrucției ligamentului încrucișat anterior.

Portalul antero-lateral (AL) este destinat vizualizării întregii cavități articulare și stabilirii exacte a diagnosticului intraoperator cât și tratamentului chirurgical al meniscurilor. Portalul anteromedial (AM) este considerat în general abord de lucru, dar în anumite situații are și rol în vizualizare.

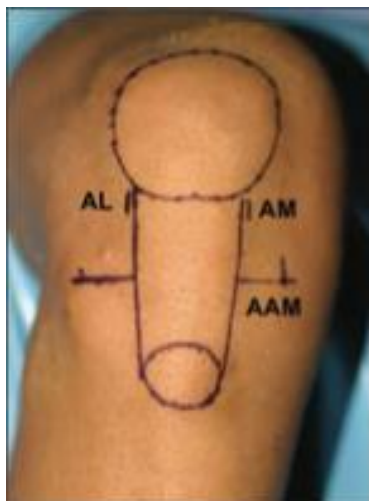


Figura 15

Portalul accesoriu antero-medial este folosit ca abord de lucru în spațiul intercondilian (notch), cât și pentru efectuarea tunelului femural.

Pentru alegerea poziției portalului antero-lateral se ia ca reper polul inferior al rotulei, iar incizia se realizează în apropierea marginii laterale a tendonului rotulian. Introducerea opticului în genunchi prin acest portal oferă o bună vizualizare a spațiului intercondilian când genunchiul este în hiperflexie cât și o bună vizualizare inferior a inserției tibiale a ligamentului încrucișat anterior.

Poziționarea corectă a portalului antero-medial este foarte importantă în desfășurarea cu succes a intervenției chirurgicale, astfel se introduce artroscopul pe portalul antero-lateral cu genunchiul în flexie între 70-90 de grade și cu ajutorul unui ac de seringă introdus cât mai aproape de marginea medială, direcționat oblic extern către spațiul intercondilian ajustând poziția superior și inferior astfel încât să fie paralel cu plafonul notch-ului intercondilian. Apoi se introduce lama de abrazor acționată rotațional electric la 1500 de rotații pe minut cu care se îndepărtează ligamentul mucos și bontul de ligament încrucișat anterior rupt

După efectuarea notch-plastiei și abrazare a fațetei interne a condilului lateral se identifică amprenta inserției LIA nativ și creasta intercondilară (Fig 16).

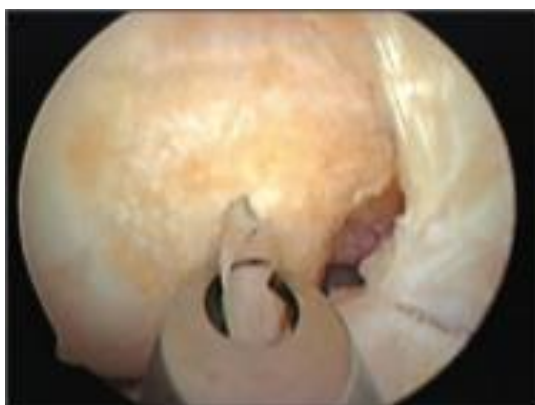


Fig. 16



Fig. 17

Apoi cu ajutorul ghidului femural se introduce broșa ghid cu diametrul de 2.7mm simultan cu creșterea flexiei genunchiului la aproximativ 120 de grade. Se perforează ambele corticale osoase după care se realizează tunelul primar cu burghiul de diametru 4,5 mm în ambele corticale pentru a permite trecerea completă a butonului de fixare pe corticală externă a femurului, acesta având un diametru de 1,5 mm și lungime 10 mm.[118]

Lungimea ideală a tunelului femural este de aproximativ 40 mm și un minim de 35 mm, pentru a permite o inserție a ligamentului în tunelul osos de minim 20 mm și maxim 35 mm. Diametrul tunelului de inserție se stabilește în funcție de lungimea și diametrul grefei, având în dotare burghie cu mărimi între 6,5 mm și 13 mm crescătoare din 0,5 mm în 0,5 mm (Fig.18,19). După forarea tunelului se măsoară lungimea exactă a tunelului din orificiul de intrare până la suprafața corticalei osoase cu ajutorul jojei și se marchează reperele lungimii pe grefa de ligament și introducerea prin tunel până la suprafața tegumentară cu ajutorul broșei ghid al firului de tracțiune a grefei, păstrând bucla firului în interiorul tunelului.



Figura 18



Figura 19

Pregătirea inserției tibiale se face după o inspecție atentă a originii ligamentului, apoi abrazarea bontului cu păstrarea parțială a acesteia [119] (Fig.20).

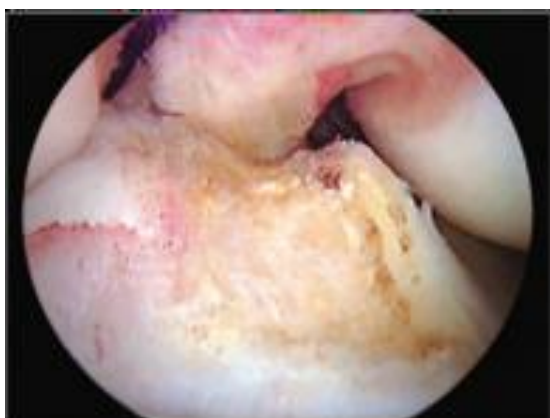


Figura 20



Figura 21

Se introduce rigla și se măsoară dimensiunea inserției tibiale (Fig. 21), cunoscând faptul că aceasta se află între marginea anterioară și posterioară a inserției cornului anterior al meniscului lateral.

Punctul ideal de inserție a grefei este situat imediat posterior de ligamentul intermeniscal. Poziția și traiectoria tunelului tibial este stabilită după poziționarea genunchiului în flexie 70-90 de grade și introducerea ghidului tibial prin portalul antero-medial orientat la 55 de grade cu vârful țintitorului la 2-3 mm anterior de marginea posterioara a inserției cornului anterior al meniscului lateral (Fig. 22).



Figura .22

După stabilirea finală a poziției ghidului tibial se introduce broșa transtibial până la vizualizarea acesteia în interiorul articulației genunchiului (Fig.23). Poziția finală a broșei putând fi verificată intraoperator imagic prin fluoroscopie [120] (Fig.24).



Figura 23



Figura 24

După confirmarea poziției potrivite a broșei ghid se practică tunelul tibial cu burghiul canulat având diametrul egal cu cel al grefei ligamentare. Mici ajustări ale grosimii tunelului pot fi făcute cu un burghiu de 5 mm.

Având ambele tuneluri forate se desface steril grefa de ligament mixt sintetic-biologic se verifică diametrele și lungimea acesteia după care se poate iniția introducerea grefei ligamentare montată pe sistemul de fixare ajustabil, tractat în tunelul femural cu ajutorul buclei firului tractor. După așezarea butonului pe suprafața corticalei femurale se tracționează treptat grefa ligamentară până când în spațiul articular intercondilian rămâne doar porțiunea centrală fibrilară.(Fig.25,26)



Figura 25



Figura 26

Fixarea grefei în tunelul tibial se realizează cu șurub resorbabil după tensionarea grefei între 40-80 N cu ajutorul unui dinamometru cu genunchiul în flexie între 20 și 30 de grade. După finalizarea fixării grefei se introduce artroscopul pe ambele portale pentru inspecția întregii cavități articulare în special al peretelui posterior al condilului femural extern și a plafonului acestuia să nu existe contact cu grefa ligamentară pentru a evita fricțiunea în timpul mișcărilor de flexie extensie, de asemenea se mai verifică cu ajutorul palpatorului tensiunea ligamentului în extensie completă.[121]

CONCLUZII

Patologia traumatică a genunchiului soldată cu leziuni de ligament încrucișat a devenit foarte frecventă în țara noastră în rândul populației tinere, datorită trendului crescător spre activitățile fizice recreative și de performanță. Totodată și tehnicile de tratament au devenit din ce în ce mai performante cu invazivitate mai mică și timp de recuperare mai scurt, ca de altfel și pretențiile pacienților de a se recupera repede și complet.

O problemă îndelung dezbătută, dar neelucidată momentan care lasă multe întrebări fără răspuns, este cea legată de tipul de grefă folosită, cunoscând faptul că toate au avantaje dar în egală măsură și o multitudine de dezavantaje.

A fost făcut un pas important prin cercetările de inginerie tisulară și biomateriale care au avut ca rezultat descoperirea unei game largi de substituenți sintetici de ligament care s-au folosit cu mult entuziasm în trecutul apropiat, dar din diferite motive, n-au avut rezultatul așteptat pentru a înlocui în totalitate folosirea grefelor de origine biologică. Dezavantajele țin de biocompatibilitatea și reacția locală a țesuturilor din interiorul genunchiului la materialul sintetic folosit, de comportamentul lor la uzură și nu în ultimul rând de aspectul financiar.

Următorul pas în evoluția cercetării acestei patologii și a tipurilor de grefă l-am inițiat prin aceasta lucrare în care am încercat elaborarea unui model hibrid de ligament sintetic-biologic prin care să îmbinăm calitățile fizice de rezistență a unei grefe sintetice cu partea organică centrală a structurii ligamentare, și anume colagenul de tip I.

S-a realizat împreună cu Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Mecatronica și Tehnica Măsurării caracterizarea mecanică a ligamentelor naturale și sintetice pentru determinarea proprietăților mecanice care vor constitui date de comparație pentru materialele ce se vor dezvolta în cadrul cercetării. După stabilirea

proprietăților mecanice necesare, cu ajutorul colaborării cu Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Textile și Pielărie s-a realizat dezvoltarea de tehnologii de obținere a gelului de colagen precum și a hidrolizatului de colagen, și mai mult, aceste extrase colagenice au fost utilizate în obținerea ligamente sintetice funcționalizate pornind de la grefa sintetică aleasă pentru funcționalizare, și anume LARS.

Metodele de caracterizare propuse și realizate au permis identificarea prezenței colagenului pe suprafața ligamentului sintetic, cuantificarea conținutului de colagen pe ligament dar și analiza morfologică a ligamentului LARS funcționalizat și nefuncționalizat.

Rezultatele cele mai bune din punct de vedere al abilității de depunere pe ligamentul LARS au revenit hidrolizatului de colagen motiv pentru care ligamentele funcționalizate LARS-L.IV.1 și 2 au fost prezentate în detaliu.

După obținerea modelelor experimentale s-au ales modelele de LARS cu cea mai mare rată de acoperire cu colagen, s-au pregătit pentru implantare fiind sterilizate cu ajutorul razelor gamma.

Intervenția chirurgicală de reconstrucție ligamentară pe animalul de studiu s-a realizat în cadrul UMF Carol Davila în sala de disecție a Catedrei de Anatomie.

Particularitatea și dificultatea studiului o face colaborarea multidisciplinară cu cele două institute de cercetare, medic anestezist veterinar, Catedra de Anatomie, translocarea întregii logistici pentru realizarea unei intervenții chirurgicale artroscopice în condiții și cu aparatură similare celor efectuate pe subiecți umani și poate cel mai important, necesitatea ca acest animal să fie menținut și analizat în viață la distanță postoperator.

Intervenția chirurgicală s-a realizat cu dificultate datorită particularităților anatomice ale animalului de studiu. Primul obstacol a fost identificarea exactă a spațiului articular al genunchiului și reperelor anatomice pentru efectuarea celor două portaluri artroscopice. După introducerea camerei video în articulație, am constatat numeroase vilozități sinoviale și o sângerare abundentă care obstruționau vizualizarea clară a spațiului articular, deoarece anatomia membrului posterior nu ne-a permis montarea benzii hemostatice la baza acestuia. Cu toate aceste inconveniente am reușit realizarea reconstrucției ligamentare cu o grefă sintetică funcționalizată cu gel hidrolizat de colagen fixată femural cu sistem de suspensie ajustabil și tibial cu șurub de interferență.

La analiza postoperatorie a animalului de studiu în care a fost implantat modelul experimental de ligament funcționalizat cu collagen de tip I s-a constatat că mișcările de flexie-extensie efectuate sub anestezie generală nu au prezentat nicio limitare mecanică, acestea fiind realizate la amplitudinea maximă.

După două săptămâni postoperator aspectul plăgilor era favorabil, mersul animalului de studiu era șchiopătat fără sprijin, iar după aproximativ 3 săptămâni acesta a început sprijinul parțial pe membrul operat păstrând mersul șchiopătat până la aproximativ 6 săptămâni după care s-a observat o mobilizare normală.

La analiza intraoperatorie, la 3 luni după implantarea grefei sintetice funcționalizate, aspectul intraoperator al genunchiului se evidențiază macroscopic o peliculă de țesut fibro-conjunctiv de acoperire la suprafața fibrelor sintetice, care conferă acestora un aspect mai aproape de ligamentul nativ, absența fenomenelor locale inflamatorii de sinovită reactivă, degradări ale grefei sau ale cartilajului intrarticular.

Esențial în contribuția personală și obiectivul studiului este ca la examenul histologic al fragmentelor de membrană sinovială și grefa ligamentară nu s-a evidențiat la nivelul membranei sinoviale o celularitate care să indice o reacție inflamatorie locală sau de rejet al grefei, iar la analiza fragmentelor de ligament se observă fragment de țesut fibro-tendinos cu țesut de granulație cu celule gigante multinucleate în jurul fragmentelor de material sintetic și numeroase fibroblaste activate ce pot fi considerate precursori ale unei proliferări tisulare.

Ca urmare a rezultatelor testelor fizico-chimice, morfologice, mecanice și a analizei postoperatorie a animalului de studiu, a fost selectat amestecul din hidrolizat de collagen și gel de collagen în proporție 50:50 reticulate cu glutaraldehidă, ca fiind compoziția optimă de acoperire a ligamentului artificial.

Cu această compoziție a fost realizat modelul funcțional de ligament funcționalizat cu collagen, ce a fost supus testării preclinice care a constatat în caracterizarea fizico-chimică și structurală și testarea la solicitări statice în vederea determinării rezistenței la rupere a zonei active și de legătură. Rezultatele rezistenței la tracțiune au arătat o îmbunătățire a caracteristicilor modelului funcțional față de modelul experimental. Pentru cele două zone ale ligamentului se constată aspectul neliniar al curbelor caracteristice, din cauza ruperii progresive a fibrelor ce compun ligamentul. Toate zonele testate au prezentat deformații similare, reliefând un comportament elastic prin alungirea procentuală ridicată.

Pe baza rezultatelor obținute care reliefează posibilitatea realizării unor prototipuri de ligamente funcționalizate cu collagen care accelerează recuperarea, am realizat un protocol operator pentru intervenții pe subiecți umani.

Ca urmare a elementelor constatate în decursul studiului, putem susține reliefaarea unui nou concept deschis cercetărilor ulterioare în tratamentul regenerativ al leziunilor ligamentare. Dacă analiza histopatologică susține prezența populațiilor de fibroците aderente la suprafața fibrelor sintetice, cercetări ulterioare în domeniul ingineriei tisulare și biomaterialelor pot iniția dezvoltarea unei generații noi de structuri ligamentare sintetice care să reprezinte un schelet care doar să susțină o viitoare populare a acesteia cu fibroците, celule precursorare structurii ligamentare. Astfel că, pe un schelet care trasează orientarea și dimensiunile ligamentului nativ, să reușim crearea unei grefe aproape integral biologice, care să se clădească pe o structură sintetică minimală, introdusă artroscopic, cu rol doar de susținere și direcționare a celulelor.

O altă temă de discuție, rezervată următoarelor cercetări este durata în care această structură biologică de neoligament se formează, rezistența, osteointegrarea și / sau posibilitatea augmentării acestor populații celulare cu terapii regenerative de tipul PRP sau celule stem din aspirat de măduvă osoasă sau fracție stromală vasculară din țesutul adipos.

Bibliografie selectivă

1. Gordon MD, Steiner ME. Anterior cruciate ligament injuries. In: Orthopaedic Knowledge Update Sports Medicine III, Garrick JG (Ed), American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont 2004. p.169.
2. Albright JC, Carpenter JE, Graf BK, et al. Knee and leg: soft tissue trauma. In: Orthopaedic Knowledge Update 6, Beaty JH (Ed), American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont 1999. p.533.
40. Cuccurullo, S. J., 2004, Physical Medicine and Rehabilitation Board Review, Demos Medical Publishing, New York.
- 41 Amy, E., and Micheo, W., 2008, "Musculoskeletal disorders: Knee and lower leg," Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation. Musculoskeletal Disorders, Pain, and Rehabilitation, W. R. Frontera, J. K. Silver, and J. Thomas D. Rizzo, eds., Elsevier, Philadelphia, PA, p. 307

42. Kirkendall, D. T., and W. E. Garrett, J., 2002, "Muscle, tendon, and ligament: Structure, function, and physiology," Orthopaedics, R. H. Fitzgerald, H. Kaufer, and A. L. Malkani, eds., Elsevier, St. Louis, MO, pp. 177-178.
43. Woo, S. L.-Y., Abramowitch, S. D., Loh, J. C., Musahl, V., and Wang, J. H.-C., 2003, "Ligament healing: Present status and the future of functional tissue engineering," Functional Tissue Engineering, F. Guilak, D. L. Butler, S. A. Goldstein, and D. J. Mooney, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 17-20.
44. Lo, I. K. Y., Thornton, G., Miniaci, A., Frank, C. B., Rattner, J. B., and Bray, R. C., 2003, "Structure and function of diarthrodial joints," Operative Arthroscopy, J. B. McGinty, S. S. Burkhart, R. W. Jackson, D. H. Johnson, and J. C. Richmond, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 59-68.
68. Franz K. Fuss, Anatomy and Function of the cruciate ligaments of the domestic pig (*sus scrofa domestica*): a comparison with human cruciates; J.Anat (1991), 178, pp 11-20.
69. Laflamme, M., J. Lamontagne, and R. Guidoin, 20 - Anterior cruciate ligament prostheses using biotextiles, in Biotextiles As Medical Implants, M.W.K.S.G. Guidoin, Editor 2013, Woodhead Publishing. p. 590-639.
70. Ambrosio, L., A. Gloria, and F. Causa, 10 - Composite materials for replacement of ligaments and tendons, in Biomedical Composites, L. Ambrosio, Editor 2010, Woodhead Publishing. p. 234-254.
74. Gao, K., et al., Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With LARS Artificial Ligament: A Multicenter Study With 3- to 5-Year Follow-up. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2010. 26(4): p. 515-523.
102. Nickel R. The anatomy of the domestic animals: The locomotor system of the domestic mammals. Berlin: Verlag Paul Parey, 1986. 499p.
103. Kew SJ, Gwynne JH, Enea D, Abu-Rub M, Pandit A, Zeugolis D, et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. Acta Biomaterialia 2011;7:3237-3247.
104. Albu MG. Collagen gels and matrices for biomedical applications. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2011.
105. Miller K, Hsu JE, Soslowsky LJ, editors. Materials in Tendon and Ligament Repair, 2011.

118. Shino K, Suzuki T, Iwahashi T, Mae T, et al. The resident's ridge as an arthroscopic landmark or anatomical femoral tunnel drilling in ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18(9):1164-1168
119. Siebold, R. The concept of complete footprint restoration with guidelines for single - and double- bundle ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011; 19(5):699-706.
- 120.. Bernard M, Hertel P, Hornung H, Cierpinski Th. Femoral insertion of the ACL. Radiographic quadrant method. *Am J Knee Surg.* 1997; 10:14-22.
121. Amis A, Jakob R. Anterior cruciate ligament graft positioning, tensioning and twisting. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998; 6:S2-S12 (Suppl 1)

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE REZULTATE DIN ACEASTĂ LUCRARE

- **Baciu Cosmin Constantin**, Soare Gabriela, Vișoianu Andrei, Popescu Gheorghe Ion & Barbilian Gheorghe Adrian. (2019). Future perspectives in synthetic grafts used in anterior cruciate ligament reconstruction, *Merit Res. J. Med. Med. Sci.* 2019 7(1):024-030, ISSN:2354-323X, DOI: 10.5281/zenodo.2551723, **ISI** Impact Factor 2017-2018 = 1.325
- **Baciu C.C.**, Soare G., Vișoianu A., Păun M.A., Stănciulescu E.L., Popescu Gh.I., Barbilian Gh.A. (2019). Anterior Cruciate Ligament Reconstruction using mixed synthetic and biological graft – experimental model on study animal, *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology*, vol XXII (1): 5-8, ISSN: 2066-0170, **B+**
- **C.C.Baciu**, G.I.Popescu, G.Soare, B.I.Andrei, R.C.Apostolescu, A.Vișoianu, „Mixed Synthetic and Biological Grafts in Cruciate Ligament Reconstruction”, **Al XVII-lea Congres Național de Ortopedie și Traumatologie (SOROT 2017)**, *ASORIS Orthopaedics and Traumatology Journal*, Nr.1/ 2017, ISSN 1454-6213