

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL XV – IMAGISTICĂ MEDICALĂ,
ORTOPEDIE - TRAUMATOLOGIE ȘI UROLOGIE

TROCAN ILIE



TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI LEGATE DE RUPTURA
LIGAMENTULUI ÎNCRUCIȘAT ANTERIOR AL
GENUNCHIULUI ȘI SECHELELE APĂRUTE ÎN
URMA ACESTOR LEZIUNI

Conducător Științific
ACAD. PROF. DR. VERMEȘAN HORIA

Timișoara
2017

REZUMAT

CUPRINS

| | |
|---|----------|
| Lista lucrărilor publicate | VI |
| Lista abrevierilor | VII |
| Indexul Figurilor | VIII |
| Indexul Tabelelor | XII |
| Mulțumiri..... | XIII |
| INTRODUCERE | XIV |
| PARTEA GENERALĂ | 1 |
| 1. Ligamentul încrucișat anterior al genunchiului (LIA)..... | 1 |
| 1.1. Morfologia | 1 |
| 1.2. Funcția..... | 2 |
| 2. Ruptura LIA | 3 |
| 2.1. Prevalența și populația țintă | 3 |
| 2.2. Mecanism de producere | 3 |
| 2.3. Tipuri de rupturi | 3 |
| 3. Instabilitatea secundară insuficienței LIA | 5 |
| 3.1. Diagnostic | 5 |
| 3.1.1. Examenul clinic | 5 |
| 3.1.2. Imagistica..... | 5 |
| 3.1.3. Diagnosticul artroscopic al leziunilor de LIA | 7 |
| 3.2. Indicația operatorie | 11 |
| 4. Reconstrucția LIA | 13 |
| 4.1. Istoric..... | 13 |
| 4.2. Tehnica unifasciculară transtibială | 15 |
| 4.3. Tehnica unifasciculară anatomică (prin portalul anteromedial)..... | 17 |
| 4.4. Tehnica bifasciculară | 19 |
| 4.5. Reconstrucția individualizată..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6. Grefe | 24 |
| 4.6.1. Autologă din tendonul patelar | 24 |
| 4.6.2. Autologă din ischiogambieri | 25 |
| 4.6.3. Autologă din tendonul cvadricipital | 26 |
| 4.6.4. Alogrefe | 26 |
| 4.7. Sisteme de fixare | 26 |
| 4.7.1. Suspensorii (buton și bucla) | 26 |
| 4.7.2. Șurub de interferență | 27 |
| 5. Rezultatele după reconstrucția LIA | 28 |
| 5.1. Evaluarea pacientului cu reconstrucția LIA și reintegrarea sportivă...28 | |
| 5.2. Eșecul reconstrucției și revizia LIA.....30 | |
| PARTEA SPECIALĂ..... | 33 |
| 1. Scop | 33 |
| 2. Tehnica personală de reconstrucție a LIA..... | 35 |
| 3. Cazuistica proprie..... | 39 |
| 4. Partea experimentală | 43 |
| 4.1. Diferența de orientare a neoligamentului între tehnica transtibială și cea unifasciculară anatomică | 43 |
| 4.2. Diferența de formă a neoligamentului în funcție de autogrefonul folosit | 45 |
| 4.3. Potențialul reparator al bontului ligamentului încrucișat anterior..... | 49 |
| 4.4. Expresia proteinei S 100 și a NFAP în bontul LIA | 55 |
| 4.5. Expresia vimentinei și actinei | 56 |
| 5. Rezultate | 58 |
| 5.1. Oblicitatea neoligamentului prin cele 2 tehnici TT și trans AM..... | 58 |
| 5.2. Neoligamentul din tendon patelar are forma cea mai apropiată de LIA nativ | 61 |
| 5.3. Expresia și semnificația CD34 | 62 |
| 5.4. Expresia proteinei S100 și a NFAP: implicații terapeutice | 66 |
| 5.5. Expresia vimentinei și actinei semnalează implicarea miofibroblastelor în leziunile ligamentare | 69 |

| | |
|--|----|
| 6. Discuții | 76 |
| 6.1. Contribuție originală - evidențierea posibilităților de a crea un neoligament cât mai apropiat, atât structural (anatomic, histologic) cât și funcțional (prin efectele clinice) de LIA nativ | 76 |
| 6.2. Contribuție originală - avantajele reconstrucției LIA folosind autogrefon patelar prin tehnica unifasciculară anatomică cu orientarea fibrelor, încât să respecte structura de bandă a ligamentului nativ..... | 78 |
| 6.3. Contribuție originală - studiul histologic care a identificat prezența de fibrocite cu diferențierea vasculară (CD34+) în bonturile LIA cu potențial rol stimulant pentru vindecarea grefei..... | 81 |
| 6.4. Contribuție originală - resturile ligamentare prezintă și proprioceptori (evidențiați prin reacția la S-100 și NFAP) viabili pe termen lung ce ar putea contribui la restabilirea homeostaziei articulare | 83 |
| 6.5. Contribuție originală - Expresia vimentinei și actinei semnalează implicarea miofibroblastelor în leziunile ligamentare | 87 |
| 6.6. Continuarea cercetării..... | 88 |
| 6.7. Direcții de viitor | 89 |
| CONCLUZII | 93 |
| BIBLIOGRAFIE | 95 |
| ANEXE | I |

CUVINTE CHEIE: genunchi, ligament încrucișat anterior, bont, cercetare, reconstrucție, sechele

INTRODUCERE

Ruptura ligamentului încrucișat anterior (LIA) este o leziune frecventă în populația adultă, tânără, activă fizic. Tehnicile de reconstrucție au avut o evoluție constantă în ultimele două decade. Creșterea numărului de intervenții a LIA (ligamentelor încrucișate anterioare) a condus la creșterea incidenței pacienților cu simptome postoperatorii care necesită investigații. Ne-am propus să investigăm utilitatea rezonanței magnetice nucleare (RMN) și a computer tomografului (CT) în determinarea mărimii canalului și orientării grefei în reconstrucția unifibrilară de LIA.

Tendințele actuale în reconstrucția LIA sunt de a reface nu numai poziția amprenteii LIA nativ dar și forma și comportamentul biomecanic. Cercetări anatomice recente au arătat că LIA la nivelul porțiunii mijlocii este plat și are forma unei panglici cu expansiuni largi dispersate pe inserțiile tibială și femurală. Acestea sunt studii cadaverice, care nu țin cont de potențiala remodelare care poate să apară pe parcursul vindecării și integrării grefei. Astfel, noi am dorit să verificăm dacă forma autogrefoanelor vindecate în vivo diferă de cea a LIA nativ în determinarea ariei și a raportului lățime-grosime pe RMN-urile postoperatorii.

Datorită în principal vascularizației precare, capacitatea de vindecare este scăzută și repararea directă are o rată de eșec foarte crescută. Astfel, modalitatea de tratament chirurgical principală este reconstrucția. Rezultatele pe termen lung sunt adesea grevate de complicații, în principal lipsa biointegrării grefei cu recurența instabilității. O posibilitate actuală de augmentare a integrării grefei și îmbunătățirea evoluției postoperatorii, pare a fi menținerea bontului tibial restant. Pe lângă potențialul regenerativ, în resturile ligamentului rupt s-au găsit terminații nervoase viabile, similare cu proprioceptorii periarticulari. Astfel, menținerea țesutului nefuncțional mecanic poate contribui la motricitate printr-o mai bună propriocepție după reconstrucția LIA.

Am considerat că o analiză a celularității și organizării microstructurii din jurul bontului restant după ruptură, poate aduce informații pertinente asupra potențialului reparator local. Cunoașterea detaliată a posibilităților native de vindecare, poate ajuta la înțelegerea beneficiilor pe care le are menținerea bontului restant după reconstrucție.

În plus, am dorit să evaluăm modificările morfologice în rupturile LIA complete și parțiale corelate cu expresia proteinei S 100 și a NFAP care pot să fie folosite ca factori predictorii pentru rezultatele funcționale. Un profil imunohistochimic al ligamentului încrucișat anterior rupt, comparat cu specișenele normale, ne poate ajuta să înțelegem mecanisșele moleculare care duc la apariția modificărilor posttraumatice întâlnite în țesuturile ligamentare afectate. Markerii care au un rol predictiv în rupturile LIA pot fi folosiți pentru a îmbunătăți abordul clinic și chirurgical al acestor cazuri pentru a asigura un management mai bun al pacienților.

METODE

Din baza noastră de date, am efectuat scanările RMN a 40 de cazuri cu reconstrucție de LIA cu tendon sau autogrefe patelare care au fost confirmate prin protocol operator de a fi fost efectuate prin tehnica AM(n=21) sau prin tehnica TT(n=19). Toate procedurile indexate au fost reconstrucții unifibrilare care au fost efectuate de diferiți chirurși care au utilizat diferite tipuri de metode de fixare, efectuate în medie cu 6.29 (4-10) ani în urmă pentru tehnica TT și 1.3 (0-3) ani pentru grupul AM.

Scanările RMN au fost date 'orb' din punct de vedere al tehnicii chirurgicale la doi examinatori experimentați: un chirurg de genunchi cu peste 150 de reconstrucții anuale de LIA și unui radiolog de la o clinică sportivă; au fost rugați să determine înclinația greșei față de tibie, utilizând softul Efilm DICOM.

În plus, am comparat retrospectiv 29 de pacienți simptomatici postreconstrucție anatomică unifibrilară de LIA prin AM și prin TT care au atât

scanări RMN cât și CT la o medie de 1.3 ani postoperator (2 luni-5.7 ani). Am analizat corelațiile dintre valorile mărimii canalului pe CT și orientării grefei utilizând corelația persoanelor și t-testul comparativ cu RMN-ul (T2).

În următorul studiu am efectuat examinări RMN bilaterale pentru 12 pacienți simptomatici (3 femei) cu reconstrucție unifibrilară de LIA. Șase pacienți aveau neoligament din tendon cvadricipital și 6 aveau reconstrucții cu autogrefe ipsilaterale de BTB după o medie de 2.66 de ani (interval 1-5) și respectiv 3.33 de ani (interval 1-5).

Achiziția imaginilor s-a făcut pe un Aparat Electric General cu un câmp de forță de 1.5T utilizând secvența T2 FSE la o spațiere de 2mm. Am exportat 6 imagini DICOM corespunzătoare corpului LIA pentru fiecare secvență axială oblică utilizând RadiaAnt (Medixant, Poland) DICOM Viewer 1.9.16 (64-bit Windows). Apoi, am efectuat media raportului grosime-lățime maxim cât și a ariei de suprafață în pixeli, utilizând "ImageJ" (64bit for Windows, Institutul National de Sănătate, USA) și l-am comparat cu LIA native utilizând testul-t pereche (GraphPad/ QuickCalcs).

În cadrul unui proiect mai extins au fost biopsiați 31 de genunchi (31 pacienți). Toți pacienții prezentau ruptură a ligamentului anterior al genunchiului (LIA). Aceasta a fost decelată clinic și imagistic (RMN) preoperator și certificată prin explorare directă artroscopică. Intraoperator s-au prelevat cu ștanța câte 2 biopsii din bontul restant pe tibie, una de la capătul liber și una de la nivelul inserției (bază). Astfel, au rezultat 54 de probe care au reprezentat lotul de studiu. Aleator s-au recoltat 10 probe (una femurală și una tibială) de la 5 cazuri cu LIA normal (fără semne de ruptură, inflamație sau insuficiență) la care s-a efectuat artroscopie de debridare pe fond degenerativ. Aceștia au constituit lotul martor.

REZULTATE

Poziția canalelor și orientarea grefelor s-a descoperit a fi diferită pe imaginile în plan coronal cât și în cel sagital (Tab 1 și 2). Media orientării grefei în plan coronal este 72.38° (variind de la 69° la 76°) utilizând tehnica AM și 75.47° (variind de la 72° la 78°) cu tehnica TT. În plan sagital unghiul de înclinație al grefei a fost 54.5 (51-58.5) și respectiv 63.68 (59-69.5). Statistic, am determinat o diferență semnificativă în orientarea grefei și unghiurilor canalelor cu o poziție anatomică mai favorabilă în tehnica AM și în rezultatele pentru tehnica TT în plan vertical. Măsurătorile radiologice au arătat o variație mai mică între cele două grupuri.

Măsurătorile în plan axial al mărimei canalului și a nivelului deschiderii au fost comparate între RMN și CT. Rezultatele nu au arătat nici o corelație ($R^2=0.795$ și 0.630 pentru femur și respectiv tibie). 3D VRT CT s-a descoperit a fi o metodă sigură în determinarea plasării canalului până la 5.7 ani după indicația operatorie. Pe de altă parte, RMN-ul a fost o metodă consistentă și sigură pentru a determina statusul ligamentului nou (ruptură nouă sau integrare) și de asemenea potențialele leziuni asociate ale meniscului și cartilajului.

Atât pentru grefa ischiogambieră cvadriplăturată cât și pentru cea os tendon patelar os (B-PT-B), porțiunea mijlocie a neoligamentelor avea o arie semnificativ mai mare ($p<0.001$), comparativ cu LIA contralaterale : $41.82/31.39 \text{ mm}^2$ și respectiv $37.05/32.08 \text{ mm}^2$. Aria suprafeței porțiunii mijlocii a neoligamentelor a fost în medie cu 33,23 % mai mare decât cea a LIA nativ pentru autogrefonul ischiogambier și 15,49% pentru B-PT-B.

LIA contralateral nativ a fost de asemenea semnificativ mai subțire pe întreaga porțiune mijlocie ($p<0.001$) decât neoligamentele din B-PT-B și autogrefonul ischiogambier, cu un raport lățime-grosime de 2,57 vs 1,97 și respectiv 2,57 vs 1,39. Pentru autogrefonul ischiogambier neoligamentul a fost de asemenea semnificativ mai subțire decât determinarea intraoperatorie : 6,74 vs 7,21 mm (t-test pereche $p<0.001$).

CD34 este un marker nespecific al celulei endoteliale, exprimat într-o varietate relativ mare de tipuri celulare. Printre acestea se numără anumite varietăți de fibroblaste și fibrocite, de interes în acest studiu. Reacția a fost

constant pozitivă în vasele sanguine mici ale sinovialei, cu intensitate mare în endoteliu. Intima vaselor sanguine mici a fost considerată control pozitiv intern al acestei reacții. Pe lângă vasele sanguine, reacția a fost pozitivă în sinovială, în celulele perivascularare ale adventiceii, cu model granular, cu semnal discontinuu și intensitate moderată.

Zona de ligament din specimen a inclus celule CD34 pozitive, cu aspect fusiform, care morfologic sunt similare fibrocitelor. Acestea au reprezentat o minoritate a populației celulare ligamentare observate în zona periferică din vecinătatea sinovialei. Ariile de cartilaj fibros incluse în biopsie au prezentat doar ocazional reacție pozitivă la nivelul capsulei pericelulare, cu aspect discontinuu și intensitate moderată. Distingem două grupe de cazuri, respectiv cu și fără leziuni microscopice documentate. Cazurile cu leziuni au demonstrat existența celulelor CD34 pozitive printre fibrele ligamentului. Fibrocitele interfibrilare au prezentat reacție pozitivă pentru CD34 în special atunci când au fost dispuse în grupe bi- și cvadrigeminate, după modelul tendonului.

Un aspect particular l-am constatat la vasele sanguine, a căror densitate a variat mult de la un caz la altul, dar cu diferențe semnificative între ligamentele cu și fără leziuni microscopice pregnante. Microdensitatea vasculară medie a fost de 43 pe câmp microscopic x200 la cazurile cu leziuni, cu variații între 28.3 și 52.6. Microdensitatea vasculară la speciemenle fără leziuni ligamentare a fost de 15.2 pe câmp x200. În sinovială, vasele de neoformație se concentrează predominant în vecinătatea epiteliului de acoperire și sunt asociate frecvent cu fibroblaste CD34 pozitive. Vasele sanguine ale sinovialei prezintă marcate diferențe de mărime, formă și grosime a peretelui, ceea ce semnalează un marcat proces de angiogeneză la cazurile cu leziuni ale ligamentului încrucișat.

La 26 dintre cazurile din acest grup, pe lângă proliferarea vaselor sanguine, am observat hiperplazia marcată a celulelor stromale stelate și

fusiforme, CD34 pozitive. La aceste cazuri epiteliul de suprafață al sinovialei are tendință la stratificare și dezorganizare. La 22.4% dintre cazuri am observat dezvoltarea de microvase în interiorul ligamentului lezat. Toate au fost de tip capilar, de dimensiuni mici și cu lumen îngust. La 11% dintre cazuri vasele de neoformație care invadează ligamentul au fost de tip imatur, mici, neregulate și fără lumen vizibil. Aceste vase au tendința de a forma rețele neregulate care disociază fasciculele de fibre colagene ale ligamentului. La 33% dintre aceste cazuri cele două tipuri de vase (imature și intermediare) au coexistat, ceea ce semnalează un proces de angiogeneză în evoluție.

Marea majoritate a mostrelor de rupturi de ligamente încrucișate anterioare au fost clasificate în faza de remodelare\maturare. Mostrele conținând rupturi LIA au imitat morfologia unui țesut conectiv dens neregulat și au fost frecvent asociate cu prezența de țesut ligamentar adiacent cvasi-normal. Expresiile proteinelor S100 și NFAP au fost identificate atât în țesutul sinovial cât și în ligamentele încrucișate anterioare care au prezentat ruptură. Extensia expresiei celor doi markeri a fost slab reprezentată. Totuși, s-a observat o expresie mai pronunțată în cazul proteinei S100 comparativ cu proteina NFAP. Proteina S 100 a fost identificată ca lipsind în 14 din cele 56 de cazuri examinate în timp ce, NFAP a fost negativă în 17 din cele 46 de cazuri examinate. Proteina S100 a fost descoperită în cantități mari în fibrele nervoase de dimensiuni mici de la nivelul țesutului sinovial cu intensitate puternică și medie spre scăzută. Patern-ul expresiei a fost omogen și restricționat la nivelul citoplasmei celulelor Schwann, deși o mică heterogenitate a fost evidențiată în cadrul structurilor nervoase de dimensiuni mici. De asemenea, am observat o intensitate medie spre scăzută a proteinei S100 în cadrul terminațiilor nervoase libere, ocazional localizate în imediata apropiere a vaselor mici de sânge din cadrul țesutului sinovial.

Țesutul ligamentar a exprimat o reacție pozitivă pentru proteina S 100 în structurile nervoase mici și mari deși numărul lor s-a dovedit a fi destul de mic (aproximativ 2-3 structuri nervoase/câmp microscopic magnificat cu 400x în cazul fibrelor nervoase de dimensiuni mici și 1-2 structuri nervoase\câmp microscopic magnificat cu 400x în cazul celor de dimensiuni mari). Expresia

proteinei S 100 a fost cuantificată ca fiind intensă în cazul fibrelor nervoase de dimensiuni mari și medie-ridică în cazul celor de dimensiuni mici. Patern-ul expresiei a fost mai degrabă omogen și restricționat la nivelul citoplasmei celulelor Schwann, deși o mică heterogenitate a fost evidențiată în cadrul structurilor nervoase de dimensiuni mici. Atât intensitatea cât și distribuția proteinei S 100 au fost aproximativ similare în ligamentele rupte și în cele adiacente cvasi-normale. Totuși o expresie mai pronunțată a fost identificată în ligamentul cvasi-normal, dar nu au fost evidențiate diferențe semnificate în comparație cu ariile de ruptură.

Expresia NFAP a fost de asemenea observată la nivelul structurilor nervoase mici și la nivelul terminațiilor libere nervoase din cadrul țesutului sinovial. În comparație cu expresia proteinei S100, expresia NFAP a fost mult mai puțin reprezentată. În ariile în care a fost prezent țesut ligamentos am observat o creștere a numărului de terminații nervoase libere pozitive pentru NFAP (3-4 terminații nervoase pozitive \câmp microscopic cu magnificare de 400x sau arii care conțin terminații nervoase libere și fibre nervoase de calibru mic organizate în ciorchine).

Expresia NFAP în fibrele nervoase de calibru mare a fost mai mică comparativ cu expresia proteinei S100 și de cele mai multe ori limitată doar la nivelul citoplasmei celulelor Schwann cu o intensitate medie-ridică. Am observat că aceste arii care conțin ligament cvasi-normal sunt caracterizate prin prezența unui număr mai mare de fibre nervoase pozitive (terminații nervoase libere și fibre nervoase de calibru mic) comparativ cu ariile care conțin țesut ligamentos întrerupt și țesut sinovial.

DISCUȚII

RMN-ul se dovedește a fi cea mai utilă metodă imagistică în determinarea rezultatelor din reconstrucția LIA. Totuși, pentru revizia de reconstrucție a LIA, CT-ul ar putea oferi imagini mai clare a canalelor și

rezervei osoase. Tehnica unifibrilară de reconstrucție s-a descoperit că reproduce mai exact amprenta femurală și orientarea grefei în comparație cu tehnica TT, unde poziționarea mai apropiată a canalului tibial are ca rezultat o grefă mai verticalizată.

Studiul nostru a aratat că, după reconstrucția LIA unifasciculară folosind autogrefe ipsilaterale ischiogambiere sau B-PT-B, forma și aria secțiunii transversale în porțiunea mijlocie nu sunt restaurate anatomic comparativ cu genunchiul contralateral neaccidentat. Aceasta este prima analiză a formei porțiunii mijlocii a neoligamentului încrucișat anterior comparativ cu anatomia nativă efectuată pe subiecți umani în vivo după terminarea perioadei de vindecare și integrare a grefei.

Am efectuat un studiu histologic care a identificat prezența de fibrocite cu diferențiere vasculară (CD34+) în bonturile LIA cu potențial rol stimulant pentru vindecarea grefei. În plus, resturile ligamentare prezintă și proprioceptori (evidențiați prin reacția la S-100 și NFAP) viabili pe termen lung ce ar putea contribui la restabilirea homeostaziei articulare. Prin aceste rezultate s-au adus argumente histologice suportive pentru reconstrucția cu preservarea bontului restant.

Studiul nostru confirmă parțial datele anterioare din literatură cu privire la expresia proteinei S100 și NFAP la LIA rupte. Se pare că, numărul fibrelor nervoase de dimensiuni mici și mari scade, în cazul ligamentelor rupte comparativ cu zonele ce conțin țesut cvasi-normal. Totuși, fibrele nervoase mari și mici împreună cu terminațiile nervoase libere au fost morfologic normale. Se pare că, remodelarea post-ruptură nu duce la modificarea componenței structurilor nervoase, însă determină în schimb, micșorarea numărului lor. Am concluzionat că, preservarea structurilor nervoase în bonturile rămase ale LIA rupte a fost posibilă dar nu necesară, mostrele incluse în studiul nostru nu au prezentat o distribuție marcată pentru expresia proteinei S100 și a NFAP. Aceste aspecte pot să explice dificultățile care apar în a asigura o funcție similară a ligamentului așa cum acesta a avut-o înainte de injurie. Aplicațiile chirurgicale cu privire la preservarea fibrelor nervoase în bonturile rămase ale LIA rupte ar trebui să nu fie considerate ca fiind o stare absolută a ligamentului

rupt, necesitând cercetări ulterioare. La momentul actual foarte puține studii s-au concentrat pe expresia proteinei S100 și a NFAP în mostrele de LIA rupte. Luând în considerare frecvența mare a rupturilor de ligament încrucișat anterior care apar în cadrul populației active, susținem că un studiu mai amănunțit al numărului și morfologiei structurilor nervoase persistente, prezente la nivelul bonturilor, poate îmbunătăți abordul terapeutic chirurgical al reconstrucțiilor de ligament încrucișat anterior.

INTRODUCTION

The introduction of the anatomic ACL (anterior cruciate ligament of the knee) reconstruction technique changed the way surgeons drill the femoral tunnel, by using an anteromedial portal drilling technique (AM) instead of the traditional transtibial technique (TT). This subsequently changed the positioning of the tunnels and the resulting obliquity of the graft, positioning it in a more anatomical fashion. Given these premises we aimed to investigate the utility of different imaging techniques (MRI, CT) in determining tunnel size, graft obliquity and complications after ACL reconstructions in the setting of preoperative planning of a single bundle anatomic revision.

The techniques for reconstruction have constantly evolved over the last two decades. The current trends aim not only to restore the position and footprint of the native ACL, but also the shape and biomechanical function. Recent anatomical research found the shape of the ACL mid-substance to be flat, with a ribbon like appearance and broad, fan like expansions on both tibial and femoral insertions. These are cadaveric studies that do not account for the potential remodeling that may occur during healing. We therefore questioned whether the in vivo shape of the healed graft will also significantly differ from the native ACL as determined by cross-sectional area and width-thickness ratio on postoperative MRIs.

Mainly due to poor vascularisation, the healing potential of the ACL is diminished and thus, direct repair has a very high failure rate. As a consequence, the principal treatment method is reconstruction. Biological failure of the graft is a main reason for revision. One way to augment the graft integration and improve clinical outcomes appears to be the preservation of the remnant stump. In addition to the regenerative potential, this structure also has viable nerve endings, very similar to periarticular proprioceptors. This way, maintaining biomechanically insufficient tissue from the torn ACL could actually improve postoperative function.

We therefore aimed to analyze the microstructural architecture and cellular differentiation of the remnants as they appear in different stages of remodeling after the injury. A better understanding of the regenerative potential of the torn ACL could improve our knowledge of the potential use of remnant stump preservation in graft healing.

Furthermore, we evaluated whether the morphologic changes in complete and partial ACL ruptures correlate with the expression of protein S100 and NFAP that may be useful as predictors of the patients' outcome. An immunohistochemical profile of the injured ACL compared to normal specimens may help understand the molecular mechanisms that lead to the occurrence of posttraumatic changes in the affected ligamentous tissue. Markers that have a predictive role in ACL ruptures may be useful in order to improve the clinical and surgical approach of these cases and to ensure a better management of the patients.

METHODS

From our database, we selected MRI scanings of 40 ACL reconstructed knees with hamstrings or patellar autogenous graft that were confirmed by operative protocol as either AM technique (n=21) or TT technique (n=19). All index procedures were single bundle reconstructions that have been performed by different surgeons using various fixation devices with an average of 6.29 (4-10) years ago for the TT group and 1.3 (0-3) for the AM.

The MRI scans were given blinded regarding the surgical technique to two experienced examiners: a knee surgeon with over 150 ACL reconstructions per year and a radiologist from a knee and sports clinic; they were asked to determine the graft inclination relative to the tibia using Efilm DICOM viewer software.

In addition, we retrospectively compared 29 symptomatic knees after anatomic single bundle (trans AM) and transtibial ACL reconstructions that had both MRI and CT scans at an average of 1.3 years postoperatively (2 months-5.7 years). We analyzed correlation of CT tunnel size and graft obliquity estimates using Pearson correlation and t-test compared to MRI (T2

In the second study we performed bilateral MRI examinations on 12 asymptomatic patients (3 females) with unilateral ACL reconstruction. Six patients had quadrupled hamstrings neoligaments and 6 had reconstructions using B-PT-B ipsilateral autografts for an average of 2.66 (range 1-5) and 3.33 (range 1-5) years respectively.

The imaging acquisitions were performed on a General Electric machine with 1.5T field strength using T2 FSE sequence at 2mm spacing. We exported 6 DICOM images corresponding to the body of the ACL from each axial oblique sequence using RadiaAnt (Medixant, Poland) DICOM Viewer 1.9.16 (64-bit Windows). We then averaged the ratio between the maximum width and thickness as well as the surface area in pixels using ImageJ (64bit for Windows, National Institutes for Health, USA) and compared it with the native ACLs using the paired t-test (GraphPad/ QuickCalcs).

As part of a broader study, we took biopsies from the ACL remnants of 27 knees (27 patients) that had arthroscopic surgery. All had torn ACLs determined by clinical examination and MRI scans, confirmed by direct exploration during arthroscopy. Intraoperatively we used the punch to harvest 2 biopsies from the tibial remnant: one from the free end and one from the base. The 54 samples formed the study group. We compared the histological appearance to 10 biopsies from 5 normal ACLs harvested in the same manner from patients who had knee arthroscopy for traumatic meniscal tears – the control group.

RESULTS

The position of the tunnels and graft obliquity were found to differ on images in both coronal and sagittal planes. Coronal graft obliquity averaged

72.38° (ranging from 69° to 76°) using the AM technique and 75.47° (ranging from 72° to 78°) with TT technique. Sagittal graft inclination angle was 54.5 (51-58.5) and 63.68 (59-69.5) respectively. We determined a statistically significant difference in graft obliquity and tunnel angles with a more anatomical position in favor of the AM technique and more vertical results for the TT. The radiologist measurements showed less variance between the two groups.

Axial measurements of the tunnel size at the level of the aperture were compared between MRI and CT. They were found to have strong correlation ($R^2=0.795$ and 0.630 for the femur and tibia respectively). The 3D VRT CT was found to be a reliable way to determine tunnel placement as far as 5.7 years after the index surgery. On the other hand, MRI was a consistent and reliable method to determine the status of the neoligament (rerupture or integration) as well as potential meniscal and cartilage associated lesions.

For both quadrupled hamstrings and B-PT-B neoligaments the mid-portion area was significantly higher (paired t-test $p<0.001$) than the native contralateral ACL: $41.82/31.39 \text{ mm}^2$ and $37.05/32.08 \text{ mm}^2$ respectively. The surface area of the neoligaments mid-portion was on average 33.23% higher than the native ACL for the quadrupled hamstrings and 15.49% for the B-PT-B respectively.

The native contralateral ACL was also significantly thinner throughout the mid-portion (paired t-test $p<0.001$) than both B-PT-B as well as quadrupled hamstrings neoligaments, with a width-thickness ratio of $2.57\text{vs}1.97$ and $2.57\text{vs}1.39$ respectively. For the hamstrings autograft, the measured neoligament was also significantly smaller than the intraoperative size; $6.74\text{vs}7.21 \text{ mm}$ (paired t-test $p<0.001$).

CD34 is a nonspecific marker of the endothelial cell, additionally expressed in a wide variety of cell types. These also include fibroblasts and fibrocytes for interest in our study. The reaction was constantly positive in the

small synovial vessels, with high intensity in the endothelium. The intima of the small blood vessels was used as positive control for this reaction. In addition to blood vessels, the reaction was positive in the perivascular synovial cells of the adventitia, with a granular pattern, discontinuous signal of moderate intensity.

The ligamentous tissue within the specimens included CD34 positive cells with fusiform appearance, morphologically similar to the fibrocytes. These cells formed a minority of the ligament cell population, observed in the ligament's periphery, adjacent to the synovia. Areas of fibrous cartilage included in the biopsy only occasionally presented positive reaction of the pericellular capsule, with discontinuous aspect and moderate intensity. From this aspect we can distinguish two groups, with and without documented microlesions. On a constant basis, samples with lesions exhibited CD34 positive cells among the collagen fibers of the ligament. Interfibrillar fibrocytes exhibit a positive CD34 reaction, especially when grouped in bundles of two and four, as in the classic model of tendon structure.

A particular aspect was encountered in blood vessels, whose density varied very much between cases, but with significant differences between ligaments with and without important microscopic lesions. Mean vascular microdensity was 43 per x200 microscopic field in specimens with lesions, range between 28.3 and 52.6. By comparison, vascular microdensity in specimens without ligament injury was only 15.2 per x200 field. In the synovia, neoformation vessels are predominantly concentrated in the vicinity of the covering epithelia and are frequently associated with CD34 positive fibroblasts. Synovial blood vessels exhibited marked differences in size, shape and thickness of the wall, which signals an intense angiogenesis in samples from torn ACLs.

In 26 samples from the study group, in addition to blood vessel proliferation we noticed an important hyperplasia of the stellate and fusiform stromal cells, CD34 positive. In these specimens, the surface synovial epithelia showed a tendency for stratification and disorganization. In 22.4% biopsies we observed the development of microvessels inside the injured ligament. All were capillary, small sized and with narrow lumen. In 11% of specimens, the

neof ormation vessels invading the ligament were immature, small, irregular and without a visible lumen. These vessels have a tendency to form irregular networks which dissociate the ligament collagen fiber bundles. In 33% of the study samples, the two types of vessels (immature and intermediate) have coexisted, which signals an ongoing process of angiogenesis.

The majority of the examined specimens of ruptured ACL were classified in the remodeling/maturation phase. Specimens containing injured ACL mimicked a dense irregular connective tissue morphology and were frequently associated with the presence of an adjacent quasi-normal ligamentous tissue. The expressions of protein S100 and NFAP were identified in both the synovial tissue and in the ruptured ligamentous tissue. The extension of the expression for both markers was poorly represented. However, we noticed a more intense expression in case of protein S100 compared to NFAP in the examined specimens. Protein S100 was negative in 14 out of 56 examined cases and NFAP was negative in 17 out of 46 examined cases. Protein S100 was detected in the large and small nervous fibers of the synovial tissue with a strong and mild to low intensity. The large nervous fibers exhibited a predominantly homogeneous expression pattern which was restricted to the cytoplasm of the Schwann cells while the nervous fibers of small caliber presented a heterogeneous cytoplasmic distribution that ranged from mild to low. We also noticed a mild-low expression for protein S100 in the free nerve endings, occasionally located in the immediate vicinity of the small vessels from the synovial tissue.

The ligamentous tissue exhibited a positive reaction for protein S100 in the large and small nervous structures, although their number has proved to be quite low (approximately 2-3 nervous structures/microscopic field at 400x magnification in case of small nervous fibers and 1-2 nervous structures/microscopic field at 400x magnification in case of the large ones). The expression of protein S100 was quantified as being intense in case of the

large nervous fibers and mild to strong in case of the small ones. The pattern of expression was rather homogeneous and restricted to the cytoplasm of the Schwann cells, although a slight heterogeneity was evidenced in case of the small nervous structures. Both the intensity and distribution of protein S100 were quite similar in the disrupted ligament and in the adjacent quasi-normal one. However, a more intense expression was noticed in the quasi-normal ligament, but no striking differences were evidenced in comparison to the disrupted areas.

NFAP expression was also noticed in the small nervous structures and free nerve endings of the synovial tissue. In comparison to the expression of protein S100, NFAP expression was poorly represented. In the areas that contained ligamentous tissue we noticed a greater number of free nerve endings that were positive for NFAP (3-4 positive free nerve endings/microscopic field at 400x magnification or areas containing clusters of free nerve endings and small caliber nervous fibers).

NFAP expression in the large nervous fibers was lower compared to protein S100, and was mostly restricted to the cytoplasm of a few Schwann cells with a mild-low intensity. We noticed that the areas containing quasi-normal ligament were characterized by the presence of a greater number of positive nervous structures (free nerve endings and small nervous fibers) compared to the areas containing disrupted ligamentous tissue and synovial tissue.

DISCUSSIONS

We conclude that in present, MRI proves to be the most useful imaging method in determining outcome after ACL reconstruction. However, for revision ACL reconstructions, CT can offer a clearer image of tunnels and bone stock. The anatomic single bundle reconstruction technique has been found to more accurately reproduce the femoral footprint and the orientation of the graft compared to the TT technique where the appropriate tibial tunnel placement resulted in a more vertical graft.

Our study showed that several years after trans AM (anteromedial portal) single bundle ACL reconstruction using an ipsilateral hamstrings or B-PT-B autograft, the mid-portion shape and cross-sectional area are not anatomically restored compared to the uninjured contralateral knee. This is the first analysis of the anterior cruciate neoligament mid-portion shape compared to the native anatomy performed on human subjects, in vivo, after complete healing and integration.

We performed a histological study which identified the presence of fibrocytes with vascular (CD34+) differentiation in the remnants of torn ACLs with potentially stimulating role for graft healing. In addition, the stump exhibits viable proprioceptors which may contribute to restoration of joint homeostasis. Through these findings, we brought histological basis to support remnant preserving ACL reconstruction.

Our study partially confirms the previous data available in literature regarding the expressions of protein S100 and NFAP in the ruptured ACL. It appears that the number of large and small nervous fibers decreases in the disrupted ligament compared to the areas containing quasi-normal tissue. However, the large and small nervous fibers along with the free nerve endings were morphologically normal. It seems that, remodeling post-rupture does not lead to a disruption of the nervous structures, instead it determines their numerical loss. We conclude that the preservation of nervous structures in the remnant stumps of ruptured ACL is a possible but not a necessary fact, as the specimens included in our study did not present a spectacular distribution for the expressions of protein S100 and NFAP. These aspects may explain the difficulties that occur in ensuring a similar function of the ligament as it has possessed before rupture. The surgical applicability regarding the preservation of the nervous fibers in the remnant stumps of ruptured ACL should not be considered an 'absolute' status of the injured ligament and is in need of further research studies. At the time being, very few studies have focused on the

expressions of protein S100 and NFAP in specimens of ruptured ACL. Considering the frequent ACL injuries that mostly occur in the active population we believe that a close study of the number and morphology of the persistent nervous structures present in the remnants may improve the surgical approach of ACL reconstruction.