



**URAŠTANJE TETIVNOG PRESATKA PRILIKOM REKONSTRUKCIJE PREDNJE UKRIŽENE SVEZE
KOD OVACA UZ PRIMJENU BMP-7 (OP-1)**

INCORPORATION OF THE TENDON GRAFT INTO THE BONE TUNNEL AFTER ANTERIOR CRUCIATE
LIGAMENT RECONSTRUCTION WITH BMP-7 (OP-1)

Mihelić R¹, Pećina M², Jelić M^{2,5}, Zoričić S³, Kušec V⁴, Šimić P⁵, Bobinac D³, Lah B¹, Legović D¹, Vukičević S⁵

¹Klinika za ortopediju Lovran

²Klinika za ortopediju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

³Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

⁴Klinički institut za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar, Zagreb

⁵Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

SAŽETAK

Nakon puknuća prednje ukrižene sveze (LCA), fiksacija tetivnog presatka u koštanom tunelu je najšire korištena metoda rekonstrukcije LCA-a. Hipoteza ovih istraživanja bila je da primjena BMP-7 na spoju kosti i tetive omogućuje bolju integraciju slobodnog tetivnog presatka u okolnu kost. U tu svrhu provedena je kontrolirana laboratorijska studija.

LCA je rekonstruiran na stražnjem koljenu 30 ovnova starih godinu dana upotrebom slobodnog tetivnog presatka. Rekombinantni humani BMP-7 (25 µg) je nanesen u koštanom tunelu na spoj kosti i tetive kod 15 životinja metodom slučajnog odabira, te otapalo kod 15 kontrolnih životinja. Nakon 3. tjedna žrtvovano je 10 životinja iz svake skupine, a ostatak ovnova je žrtvovano 6 tjedana nakon operacije. Provedene su histološke analize i mehaničko testiranje. U još jednoj skupini od 20 ovnova proveden je isti postupak, ali je mehaničko testiranje provedeno nakon 3 tjedna.

Mehanička testiranja su pokazala veću otpornost na silu (368 N) kod uzoraka tretiranih BMP-7, nego kod kontrolnih uzoraka (214 N). Nije bilo razlike između uzoraka mehanički testiranih 3 i 6 tjedana nakon operacije. Kod svakog koljena tretiranog BMP-7 formiralo se više kosti na spoju kosti i tetive nego kod histološki uspoređenih sličnih područja kod kontrolnih životinja, gdje su se stvorila područja guste trabekularne mreže s izrazito dubljim prodiranjem tetivnog vlaknastog tkiva u područje moždine.

BMP-7 potiče potpunu integraciju tetivnog presatka u okolnu novo formiranu trabekularnu kost prilikom rekonstrukcije LCA-a u koljenu ovce i sigurno je da bi mogao biti uspješno korišten u rekonstruktivnoj kirurgiji ukriženih sveza koljena u ljudi.

Ključne riječi: rekonstrukcija prednje ukrižene sveze, tetive hamstringsa, BMP-7, urastanje tetive u koštanom tunelu

SUMMARY

After anterior cruciate ligament (ACL) rupture, tendon graft fixation into a bone tunnel is a widely used method for ACL reconstruction. The hypothesis of the research was that BMP-7 applied to the bone tendon interface enables better integration of a free tendon graft into the surrounding bone. To test the hypothesis we have conducted controlled laboratory study.

ACL was reconstructed in right rear knees of 30, one-year old, male sheep using a free tendon graft. Recombinant human BMP-7 (25 µg) was applied randomly to the bone tendon interface in 15 animals, and vehicle in 15 control animals. At 3 weeks 10 animals from each group were killed, and the remaining sheep were killed at 6 weeks following surgery. Subsequently histological analysis and mechanical testing were performed. In another group of 20 sheep the same procedure was used and mechanical testing was performed after 3 weeks.

Mechanical testing showed greater strain resistance to force (368 N) in the BMP-7 treated, than in control specimens (214 N). There was no difference between mechanical testing of samples from 3 and 6 weeks following surgery. In all BMP-7 treated knees more new bone was formed at the bone-tendon interface as compared histologically to similar areas in control animals, creating areas of dense trabecular network with significantly greater invasion of the tendon fibrous tissue into the bone marrow space.

BMP-7 promotes complete tendon graft integration into the newly formed surrounding trabecular bone in the reconstruction of the ACL in the knee of the sheep and it certain that it could be successfully used in reconstructive surgery of ligaments in the human knees.

Key words: anterior cruciate ligament reconstruction, hamstrings tendons, BMP-7, tendon incorporation into the bone tunnel

UVOD

Slobodni tetivni presadak je standardni postupak u rekonstrukciji prednje ukrižene sveze (LCA) prilikom kojeg se najčešće koristi patelarna sveza ili tetivna hamstringsa¹. Integracija tetivnog presatka korištenog za zamjenu LCA je još uvijek nezadovoljavajuća u oko 13 % slučajeva¹ i može se povezati s postoperativnom labavošću i propadanjem (19, 20). U slučaju patelarne tetive s komadom kosti sa svake strane presatka dolazi do zacjeljenja kosti za kost, dok kod koljene tetive (dvostruko, trostruko ili četverostruko savijanje) dolazi do zacjeljenja tetiva za kost. U nekoliko izvještaja se spominje da proces inkorporacije tetive uključuje prodiranje Sharpeyevih vlakana iz koštanog tunela (10,14,28,34).

Potpuno zacjeljenje tetivnog presatka nastupa nakon nekoliko mjeseci, ali rehabilitacija počinje odmah nakon operacije, kao što se preporučuje u studijama Shelbourne et al (32). U ranim stadijima rehabilitacije može doći do nepoželjnih posljedica kao što su efekt elastične gume (bungee) ili efekt vjetrobranskog brisača (whiper) (5,30). To je značajno i zbog toga što se profesionalni sportaši jako žele vratiti u igru što prije moguće. Uzevši sve u obzir, važno je pronaći metodu koja bi poboljšala integraciju tetivnog presatka.

Koštani morfogenetski proteini (BMP) su faktori rasta i diferencijacije koji imaju veliki osteoinduktivni i osteogeni kapacitet (21). Oni su članovi TGF- β superobitelji i izvorno su dobili ime, kao dijelovi demineralizirane koštane matrice, prema svojoj sposobnosti da potiču endohondralno stvaranje kosti na izvanskeletnim mjestima. Oni se najčešće izražavaju kao područja epitelialno- mezenhimalne interakcije i imaju ulogu signalnih molekula tijekom embriogeneze i morfogeneze sisavaca (13, 37) iz čega proizlazi da imaju sposobnost diferencijacije mezenhimalnih stanica u hondrocyte i osteoblaste (26, 35, 36, 38, 42). Studije kultura organa i knock-out studije pokazuju da BMP-7 ima ključnu ulogu tijekom razvoja skeleta. BMP-i su do sada s uspjehom korišteni u regeneraciji koštanih defekata (7, 9, 12, 25), poticanju uraštavanja kosti u meko tkivo ili metalne implantate, te regeneraciji defekata zglobne hrskavice kod većih eksperimentalnih životinja (15, 16, 18, 24). Ostali članovi obitelji BMP proteina, faktor diferencijacije rasta 5 (GDF 5, BMP-14) i GDF 6 (BMP-13), su uspješno primjenjivani za poticanje zarastanja tetive (8). Zabilježeno je da bi ligamenti mogli osificirati nakon izloženosti BMP-ima (11,33). Štoviše, pokazano je na životinjskom modelu da BMP-2 potiče uraštavanje transplantirane tetive uz pomoć procesa nastajanja nove kosti na spoju kosti i tetive u koštanom tunelu (20,27,39,40).

U ovoj smo studiji ispitali sposobnost BMP-7 da potiče integraciju slobodnog tetivnog presatka u okolnu novonastalu trabekularnu kost u koštanom tunelu nakon rekonstrukcije LCA. I histološki i biomehanički dokazi pokazuju da BMP-7 primijenjen lokalno postiže potpunu integraciju tetivnog presatka s kosti u koštanom tunelu prilikom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze kod ovaca 3 tjedna nakon operacije (22).

MATERIJALI I METODE

Protokol istraživanja

Protokol za studiju je uključivao 2 skupine ovaca. Prva skupina se sastojala od 30 jednu godinu starih životinja, prosječne težine 38 kg, dok se druga skupina

sastojala od 20 jednu godinu starih ovaca, prosječne težine 36 kg. Sve su ovce podvrgnute operaciji desnog koljena, pri čemu im je odstranjen LCA i rekonstruiran slobodnim tetivnim presatkom uzetim od peroneus tertius mišića istog koljena. Prva skupina od 30 životinja je podijeljena u 2 podskupine od po 15 životinja: (1) 15 životinja je primalo 25 μ g BMP-7 preko upijajuće kola-genske spužve zajedno s tetivnim presatkom u koštanim tunelima između femura i tibije, dok je ostalih (2) 15 životinja primalo upijajuću kolagensku spužvu natopljenu acetatinim puferom kao otapalom. Po deset životinja iz svake podskupine je žrtvovano nakon 3 tjedna, dok je preostalih 5 životinja iz svake podskupine žrtvovano 6 tjedana nakon operacije. Uzorci dobiveni nakon 3. tjedna su upotrijebljeni za histološku analizu, dok su uzorci od 6. tjedna upotrijebljeni za mehaničko testiranje. Druga skupina od 20 ovaca je također podijeljena u 2 podskupine od po 10 životinja. Jedna je uz presadak u koštanom tunelu dobila BMP-7 u istoj dozi i prema istom postupku kao i kod prve skupine, a druga je dobila samo acetatni pufer. Te su životinje žrtvovane nakon 3 tjedna, a koljena su upotrijebljena za mehaničko ispitivanje. Vremenski period od 3 tjedna je izabran na temelju prethodnih studija iz kojih proizlazi da BMP-7 ubrzano potiče stvaranje trabekularne kosti u pretkliničkim studijama (6).

Doza od 25 μ g BMP-7 (Stryker Biotech, Hopkinton MA) je rastopljena u 0,2 mL 20mM acetatnog pufera na pH 4,5 i natopljena u kolagensku spužvu kao nosač (Helistat Integra LifeSciences, New Jersey, USA).

Kirurški postupak

Sve su životinje operirane pod općom anestezijom (Kethalar, Ketamin hydrochloride; 5 mg/ml) prema standardnom postupku u Klinici za kirurgiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Desno koljeno je otvoreno medijalnim parapatelarnim rezom. Masni jastučić i prednja ukrižena sveza su izrezani. Presadak dugačak 6 cm je uzet s mišića peroneus tertius i umetnut u područje anatomske plazišta i hvatišta LCA. Presadak je učvršćen duplim Vycril 0 šavovima na obje strane. Izdubeni su tuneli (4,5 mm u promjeru) u tibiji i femuru na anatomskim hvatištima izrezane sveze. Presadak je umetnut u tunel i fiksiran šavovima i privezan oko ekstra-artikularno smještenih kortikalnih vijaka. Kad je presadak namješten, razmak između kortikalne strane koštanog tunela kod femura ili tibije i početka ili kraja tetivnog presatka u koštanom tunelu je bio 5-6 mm. Kod prve (n=15) i druge eksperimentalne skupine (n=10) taj je prostor popunjen sa 25 μ g rekombinantnog humanog BMP-7 na Helistat spužvi pripremljenoj prema uputama proizvođača (Integra LifeSciences, New Jersey, USA). Kod prve (n=15) i druge kontrolne skupine (n=10) Helistat spužva je natopljena samo acetatnim puferom (Slika 1). Kortikalni krajevi oba tunela su zapečaćeni koštanim voskom. Utisnuta tetiva je sprječavala curenje BMP-7 ili kontrolnog acetatnog pufera. Rana je zatvorena Vycrilom i previjena.

Životinje svake skupine po završetku pokusa su žrtvovane smrtonosnom dozom natrij-pentobarbitala.

Biomehaničko testiranje

Kako bi brzina istrgnuća bila kontrolirana i neprekidna korišten je jednoosovinski stroj na vijak za ispitivanje vučne čvrstoće (uniaxial tensile testing machine - UTM) Messphysik BETA 50-5 (Messphysik,

Altenmarkt, Austria). Biomehaničko testiranje je provedeno na 10 desnih koljena ovaca, 5 iz svake grupe 6 tjedana nakon operacije, te na 20 dodatno operiranih desnih koljena ovaca, 10 iz svake grupe 3 tjedna nakon operacije, primjenjujući isti postupak. Tijekom operacije je izmjerena dužina koštanog tunela i dužina tetivnog dijela umetnutog u koštani tunel kako bi se standardiziralo područje spoja kosti i tetive. Nakon što su životinje žrtvovane, svo meko tkivo, uz izuzetak rekonstruiranog ACL-a, je odstranjeno. Koljena iz oba vremenska perioda su zamrznuta na -80°C do trenutka testiranja. U vrijeme biomehaničkog testiranja udovi su odmrznuti i fiksirani na stroj prikladnim klinovima koji su proksimalno umetnuti u femur i distalnu tibiju. Tijekom biomehaničkog testiranja koljena su postavljena u ispruženi položaj i zabilježena su opterećenja i trganje ligamenata kroz vrijeme. Vučna sila je primjenjivana u omjeru od 0,1 N svake sekunde, počevši od sile od 0 N. Kod svakog koljena je ispitivanje završeno kada je tetiva iščupana iz koštanog tunela, ili kada je opterećenje rezultiralo puknućem tetive. Ni kod jednog ispitnog koljena klinovi nisu iščupani iz kosti, niti su se slomili kost ili klinovi. Tijekom cijelog ispitivanja za svaki je uzorak zabilježeno ukupno opterećenje koje je izazvalo istrgnuće i snaga, a maksimalna sila je uključena u statističku analizu. Rezultati su analizirani Wilcoxon testom, a stupanj važnosti je bio $p < 0.05$.

Histološka i histomorfometrijska analiza

Operirana koljena su izvađena, obrađena, fiksirana i nedekalcificirana umetnuta u smjesu metil-metakrilata (38). Izrezani su blokovi koji prikazuju cijelu dužinu koštanog tunela s tetivnim presatkom i obojani toluidin plavilom i van Kossa bojenjem. Napravljeni su presjeci debeli 5 mikrometara u koronalnoj ravni kroz koštani tunel.

Histomorfometrijska analiza je provedena za svaki uzorak na 2 presjeka u razmaku od po 50 mikrometara na optimalnoj ravni koja prikazuje cijeli koštani tunel. Statički histomorfometrijski parametri su izmjereni na trabekularnoj kosti duž cijelog područja spoja kost-tetiva koštanog tunela, te također na ekvivalentnom području najudaljenijeg mjesta trabekularne kosti presjeka. Namjera ovakvog pristupa je da se usporede trabekularna kost na području zacjeljenja formiranja kosti, tj. koštanog tunela, i trabekularna kost podvrgnuta uobičajenom remodeliranju kosti. Izračunati su slijedeći histomorfometrijski parametri: volumen kosti (BV/TV, %), trabekularna debljina (Tb.Th, μm), trabekularni broj (Tb.N, mm^{-1}), i trabekularna separacija (Tb.S, μm), prema preporukama Odbora za histomorfometrijsku nomenklaturu Američkog društva za istraživanje kosti i minerala (American Society of Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee²³). Integracija tetivnih vlakana je utvrđena mjerenjem perpendikularne razdaljine (μm) prodiranja vlaknastog tkiva s ruba koštanog tunela na 6-10 jednako udaljenih mjesta duž obje strane zavisno o duljini tunela. Sva mjerenja je obavio jedan od autora (V.K.) i srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti za svaki uzorak je korištena u daljnjim izračunima. Histomorfometrijska analiza je izvedena uz pomoć poluautomatskog sistema za analizu prikaza (Vamstec, Zagreb, Croatia) s povećanjem od 40 x.

Tablica 1. Histomorfometrijski parametri za koštano tkivo na spoju kosti i tetive i područja dalje normalne kosti kod uzoraka tretiranih BMP-7 ($n=10$) i kontrolnih uzoraka ($n=10$). Podaci su izneseni u obliku srednje vrijednosti i krajnjih vrijednosti. Prikazani su rezultati testa Wilcoxon uparivanja za svaki histomorfometrijski parametar između spoja kosti i tetive i dalje normalne kosti.

Grupe	BV/TV (%)	TbTh (μm)	TbN (/mm)	TbS (μm)
KONTROLA ($n=10$)				
Zona 1	$30,6 \pm 7$	$119,5 \pm 18$	$2,6 \pm 0,3$	$277,4 \pm 54$
Zona 2	$19,5 \pm 7^+$	$84,0 \pm 17$	$2,3 \pm 0,5$	$379,0 \pm 125$
BMP-7 ($n=10$)				
Zona 1	$41,5 \pm 5^*$	$131,6 \pm 19$	$3,2 \pm 0,7^*$	$189,0 \pm 43^*$
Zona 2	$21,0 \pm 5^{\#}$	$91,0 \pm 14$	$2,3 \pm 0,3$	$349,0 \pm 53$

BV/TV = volumen kosti, Tb.Th = gustoća kosti,

Tb.N = trabekularni broj,

Tb.S = trabekularna separacija

Zona 1 = spoj tetive i kosti

Zona 2 = periferna kost

* $P < 0.05$ vs kontrola

⁺ $P < 0.05$ vs kontrolna zona 1

[#] $P < 0.01$ vs BMP-7 zona 1 REZULTATI

Mehaničko testiranje

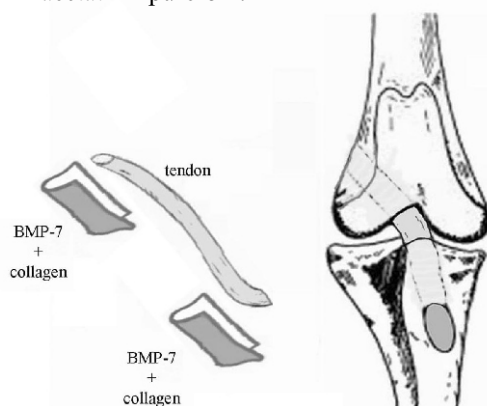
Biomehaničko testiranje je pokazalo višu snagu istrgnuća na područjima tretiranim BMP-7 u svim vremenskim periodima. Uzorci uzeti radi mehaničkog testiranja tri i šest tjedana nakon operacije su pokazali da se način puknuća presatka razlikuje kod kontrolnih uzoraka i onih tretiranih BMP-7. Kod uzoraka tretiranih BMP-7 tetiva je puknula na sredini, izvan koštanog tunela, dok je kod kontrolne skupine iščupana iz koštanog tunela, većinom iz tibije (Tablica 2). Otpor je, dakle, bio veći na femoralnoj strani presatka. Prosječna sila loma u bilo kom vremenskom periodu kod uzoraka tretiranih BMP-7 je bila 368 ± 37 N, a kod kontrolnih 214 ± 36 N (Tablica 2). Nije bilo razlike između životinja žrtvovanih tri ili šest tjedana nakon operacije, što pokazuje da se presadak uspješno usadio u koštani tunel već tri tjedna nakon operacije (Tablica 2).

Tablica 2. Izrast tetivnih vlakana i mehaničko ispitivanje presatka u koštanom tunelu

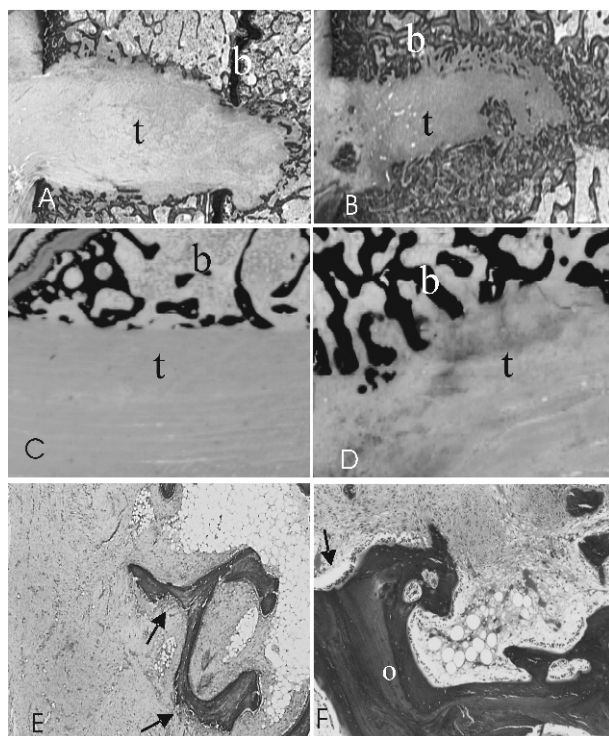
GRUPE	KONTROLA	BMP-7 (OP-1)
Izrast tetivnih vlakana (m)		
($n=30$) Srednja vrijednost (m)	486	995*
Krajnje vrijednosti (m)	364-832	621-1813
Sila istrgnuća (N)		
3 tjedna ($n=20$)	212 ± 28	$350 \pm 40^*$
6 tjedana ($n=10$)	215 ± 44	$380 \pm 33^*$

* $P < 0.01$ vs kontrola

Slika 1. Tehnika rekonstrukcije ACL-a. Presadak je bio umetnut u femoralni i tibijalni tunel, a prostor između presatka i tunela je ispunjen Helistat spužvom i BMP-7 ili Helistat spužvom i acetatnim puferom.



Slika 2 Histologija pri manjem povećanju (x10) otkriva razliku u izgledu između kosti (b) i tetive (t) na spoju kosti i tetive kod kontrolnih uzoraka (A) i onih tretiranih BMP-7 (B) (toluidin plavo bojenje), s gustom trabekularnom mrežom oko koštanog tunela kod B. Manje nove kosti je pronađeno kod kontrolne skupine (C) pri većem povećanju (x40) a gušće trabekule s manjim prostorom za moždinu su pronađene na spoju kosti i tetive kod BMP-7 skupine (D) (van Kossa bojenje). Resorpcija kosti (strelice) i endostealna područja sa slabijim formiranjem kosti su prisutna kod kontrolne skupine (E). Izrazito remodeliranje kosti, većinom s nastankom kosti, široki osteoidni šavovi (o) i nizovi osteoblata (strelica) su bili karakteristični za BMP-7 skupinu (F), povećanje x200.



Histološka i histomorfometrijska analiza

Stvaranje i remodeliranje kosti oko koštanog tunela su značajno potaknuti kod životinja tretiranih BMP-7 (Slika 2A-F). Histološki pregled je pokazao da je oko tetive kod kojih je nova kost dodana bliže tetivi pojačano stvaranje kosti kod koljena tretiranih BMP-7 za razliku od kontrolnih koljena. Sloj staničnog vlaknastog tkiva je nastao između tetive i kosti duž koštanog tunela. Taj bi se sloj trebao razviti i reorganizirati tijekom procesa regeneracije. Endostealna površina na spoju kosti i tetive i najbliža trabekularna kost su bile prekrivene osteoidima i osteoblastima, a imale su brojne erozivne šupljine s osteoklastima što ukazuje na pojačano remodeliranje kosti. Trabekule su na tom području bile gušće, a prostor za moždinu manji u usporedbi s daljom normalnom kosti, koja je pokazivala skoro nikakav proces remodeliranja. Nova kost nastala na spoju kosti i tetive je stvorila gustu trabekularnu mrežu (Slika 2B, 1D) koja je bila značajno manje izražena kod kontrolnih uzoraka. Nepostojanje hrskavice ili njenih kalcificiranih dijelova je pokazivalo da je nova kost nastala izravnom intramembranoznom osifikacijom. Kod životinja tretiranih s BMP-7 se gusto vlaknasto tkivo povezano s tetivom protezalo duboko u prostor koštane moždine između dvije trabekule (Slike 2B, 1D). Presadak u koštanom tunelu je imao normalan histološki izgled bez očitih koštanih formacija unutar same tetive. Pronađeni su i rastrkani otočići mišićnih vlakana i periferne zone ispunjene masnim stanicama i krvnim žilama. Spojni dio, dio između tetive i koštanog tunela, je bio ispunjen vlaknastim tkivom koje je sadržavalo brojne krvne žile i kolagenska vlakna koji su izlazili iz tetive (Slika 2F).

Histomorfometrijska analiza (Tablica 1) je pokazala da su volumen kosti i trabekularni brojevi na spoju kosti i tetive veći ($P < 0.05$) kod BMP-7 grupe nego kod kontrolnih životinja. Razlika u statičkim histomorfometrijskim parametrima između spoja kosti i tetive i normalne kosti je bila veća kod grupe tretirane BMP-7 ($P < 0.01$) nego kod kontrolne grupe ($P < 0.05$). Prodiranje tetivnog vlaknastog tkiva u prostor moždine je bio veći ($P < 0.01$) kod grupe tretirane BMP-7 nego kod kontrolne grupe ovaca.

RASPRAVA

Rezultati ove studije pokazuju da je LCA rekonstruiran tetivnim presatkom u koštanom tunelu ispunjenom BMP-7 bolji od standardnog postupka na eksperimentalnom modelu ovce. Kod svih koljena tretiranih BMP-7 nastalo je više nove kosti na spoju kosti i tetive, uz nastanak područja guste trabekularne mreže sa značajno većim prodiranjem tetivnog vlaknastog tkiva u prostor moždine. Mehaničko testiranje je pokazalo veću otpornost na silu (368 N) kod uzoraka tretiranih BMP-7 nego kod kontrolnih uzoraka (214 N). To je prvi dokaz da mala doza BMP-7 povećava nastanak trabekularne kosti i integraciju tetivnog presatka u koštanom tunelu. Za razliku od ove studije bilo je demonstrirano da u zatvorenoj koštanoj mikro-sredini poput koštane komore i koštanog rova BMP-7 u većim dozama može izazvati povećanu vaskularizaciju i resorpciju kosti (17).

Životinje su žrtvovane nakon 3 tjedna kako bi se dokazalo hoće li BMP-7 potaknuti integraciju tetive u ranijem vremenskom periodu u usporedbi s kontrolnim životinjama, kako bi se opravdala njegova potencijalna uporaba kod bolesnika s puknutim LCA, a posebice kod

profesionalnih sportaša. Period od 6 tjedana je izabran kako bi se biomehanički ispitalo hoće li u kasnijem vremenskom periodu početno poboljšanje biti kompenzirano kod kontrolnih životinja.

Sličnim modelom rekonstrukcije ACL-a kod ovaca je već prije ustanovljen normalan tijek zacjeljenja i transformacije tetive (31). 6 tjedana nakon operacije na presjecima koštanoog tunela su postojali znakovi široke zone novo formirane matrice koja je podsjećala na hondroosteoid s vlaknima sličnim Sharpeyevim formiranim na spoju kosti i tetive. Nakon 12 tjedana bili su prisutni hondrociti, a nova kolagenska vlakna su bila postavljena u smjeru pritiska, dok je nakon 26 tjedana presadak imao izgled normalne ukrižene sveze. Ovakav proces može trajati čak do 12 mjeseci (2, 28). Upotreba BMP-2 u liječenju tetive je već opisana na modelu pasa (27). Tetiva nije postavljena intra-artikularno, već kroz koštani tunel u tibiju. Navedeno je da do izlječenja dolazi putem uraštavanja kosti u fibrovaskularno tkivo između presatka i koštanoog tunela, slično procesu već opisanom u ovom izvještaju. Nakon progresivne mineralizacije fibrovaskularnog tkiva, došlo je do uraštavanja kosti u presadak, a kolagenska su vlakna povezala tetivu i okolnu kost, što je rezultiralo čvrstom integracijom presatka (28). Autori navode da je neophodno barem 8 tjedana zaštite prije nego što se operirano koljeno može izložiti stresu.

U komparativnoj studiji na psima o unutar-koštanom zalječenju patelarne tetive i fleksorne tetive/tetive mišića aductora kod rekonstrukcije ACL-a, također je proizašlo da vlakna slična Sharpeyevima učvršćuju fleksornu tetivu/tetivu mišića aductora nakon 12 tjedana, dok se koštani čep presatka patelarne tetive fiksira za kost domaćina unutar 6 tjedana. Biomehanički test je pokazao da je na fleksornoj tetivi/tetivi mišića adductora najslabija točka površinski dio presatka na izlazu iz tunela, dok je to kod patelarne tetive bio koštani čep i svježe tkivo koje je okruživalo presadak. Konačno opterećenje koje su izdržale fleksorne tetive/tetive mišića je bilo značajno manje nego kod patelarnih tetiva nakon 3 tjedna (34), što potvrđuje koštano-patelarno ligamentni-koštani presadak kao «zlatni standard» kod ljudi. Doduše, neki kirurzi preferiraju presadak tetive hamstringsa, budući da ona nema patelarni morbiditet i bolja je simetrija presatka. Kao što je navedeno u našim rezultatima, male količine BMP-7 ubrzavaju inkorporaciju tetivnog presatka i mogle bi u konačnici biti jednako korisne kao i kod stimuliranja zarastanja kost na kost, što bi moglo biti od posebnog značaja i za profesionalne sportaše. Doza od 25 µg BMP-7 je mala u usporedbi s dozama od stotinu mikrograma do nekoliko miligrama koje su se koristile u predkliničkim i kliničkim studijama (6, 9).

Utjecaj BMP-a na izolirano zacjeljenje tetive je već ispitano umetanjem malih doza (5-10 µg) BMP-7, BMP-13, CDMP-2 (3) u oštećenje Ahilove tetive kod štakora (8). Nakon 14 dana hiperstanično svježe tkivo se pojavilo kod životinja tretiranih (8) BMP-13 i CDMP-2, dok je kod tetiva tretiranih BMP-7 nastala kost. U ovoj studiji

nismo primijetili nastanak kosti unutar tetivnog presatka, koji bi inače mogao smanjiti mehanička svojstva presatka. Tetivno zadebljanje koje je nastalo pod utjecajem CDMP-2 nakon 14 dana je bilo čvršće i kruće nego izvorna tetiva, a rendgenska snimka nije pokazala znakove osifikacije. Iz ovih otkrića proizlazi da bi CDMP-i mogli poticati proliferaciju tetivnih vlakana i regeneraciju kod rekonstrukcije LCA-a. Ako ih se upotrijebi zajedno s BMP-ima, inkorporacija ligamenta i mehanička otpornost na stres bi mogli biti maksimalni. U slučaju implantacije presatka kost-ligament-kost, dolazi do izravne osifikacije koštanoog čepa u koštanom tunelu. Mnogi kirurzi preferiraju presadak tetive hamstringsa, budući da on ima neke prednosti. Tetivni presadak se učvršćuje u koštanom tunelu preko Sharpeyevih vlakana, ali taj proces uobičajeno traje između 6 i 12 tjedana. Nepoželjne nuspojave, kao što su efekt elastične gume (bunge) ili efekt vjetrobranskog brisača (screen wiper), produžuju zacjeljenje ili čak dovode do propadanja presatka (5, 30). Zbog toga je vrlo važno bolje i sigurnije fiksiranje presatka. Rehabilitacija počinje drugi dan nakon operacije, a neki autori se zalažu za intenzivnu, čak i agresivnu rehabilitaciju (32). Tijekom prvih 6 tjedana nakon operacije presadak je izložen jakom naprezanju. Nove tehnike operacije jamče bolju položenost tunela za točnu izometriju, dok uređaji za fiksiranje jamče čvrstu fiksaciju koja je što je bliže moguće otvoru zgloba. U ovom slučaju BMP-7 ne samo što je poticao nastanak nove kosti oko presatka, već su Sharpeyeva vlakna bila duža kod koljena tretiranih BMP-7.

U komparativnoj studiji dobro fiksiranje tetive u koštanom tunelu je postignuto upotrebom 90-360 µg BMP-2 (27). Značajno manja doza BMP-7 upotrijebljena u ovoj studiji je bila dovoljna da izazove čvrsto fiksiranje tetive u koštanom tunelu, i dovede do dobrog fiksiranja nakon 3 tjedna i solidne mehaničke stabilnosti 3 i 6 tjedana nakon operacije. Srednje vrijeme vezanja BMP-7 na kolagenski nosač je u prosjeku 3-5 dana, što je utvrđeno jodiranim preparatima BMP-7 (29). Taj je rezultat postignut unatoč tome što su životinje počele izlagati koljena punom opterećenju odmah nakon operacije, jer je ova bila izvedena tek jednostrano. I precizna histomorfometrijska analiza i biomehaničko testiranje, koje nije bilo provedeno u ranijim radovima s BMP-2, su pokazali bolje fiksiranje kod životinja tretiranih BMP-7, bez značajnih razlika 3 ili 6 tjedana nakon operacije. Zajedno, ti rezultati potvrđuju da BMP-i, osobito u manjim dozama, mogu biti uspješno korišteni kod rekonstrukcije LCA-a u postupku presađivanja u koštani tunel, i tako skratiti vrijeme potrebno za rehabilitaciju. Smatramo da manje doze BMP-7 poboljšavaju integraciju transplantiranog tetivnog presatka u koštani tunel nakon rekonstrukcije LCA-a kod ovaca te bi stoga mogle biti korisne za poticanje inkorporacije presatka kod pacijenata koji su podvrgnuti rekonstrukciji LCA-a, osobito što se tiče profesionalnih sportaša koji se mogu ranije vratiti na teren.

Literatura

- Barrett GR, Treacy SH: The effect of intraoperative isometric measurement on the outcome of anterior cruciate ligament reconstruction: a clinical analysis. *Arthroscopy* 12: 645-51, 1996
- Cain EL Jr, Clancy WG Jr: Anatomic endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction with patella tendon autograft. *Orthop Clin North Am* 33: 717-25, 2002
- Chang SC, Hoang B, Thomas JT, et al: Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominately expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269: 28227-34, 1994
- Chiroff RT: Experimental replacement of the anterior cruciate ligament: A histological and microradiographic study. *J Bone Joint Surg Am* 57:1124-1127, 1975
- Clatworthy MG, Annear P, Bulow JU, et al: Tunnel widening in anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective evaluation of hamstring and patella tendon grafts. *Knee Surg Traumatol Arthrosc* 7: 138-45, 1999
- Cook SD, Rueger DC: Preclinical models of recombinant BMP induced healing of orthopedic defects. in Vukicevic S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. Basel, Birkhauser Verlag, 2002, pp 121-145
- Djapić T, Kušec V, Jelić M, et al: Compressed homologous cancellous bone and bone morphogenetic protein (BMP)-7 or bone marrow accelerate healing of long-bone critical defects. *Int Orthop*, 27: 326-330, 2003
- Forslund C, Aspenberg P: Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage - derived morphogenetic protein-2. *Am J Sports Med* 31: 555-9, 2003
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83: S151-8, 2001
- Grana WA, Egle DM, Mahnken R, et al: An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* 22: 344-351, 1994
- Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K, et al: Expression and localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 21: 23-30, 1997
- Heistein JB, Cook PA: Factors affecting composite graft survival in digital tip amputations. *Ann Plast Surg* 50: 299-303, 2003
- Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, et al: Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 43: 1035-44, 1995
- Hoffmann F, Haegele U: Transplantat-Knochen Verbindung nach Augmentation des vorderen Kreuzbandes durch die autologe Semitendinosussehne. Histologische Befunde an 4 Faellen. *Arthroscopie* 6: 164-168, 1993
- Jelić M, Pećina M, Hašpl M et al: BMPs in articular cartilage repair, in Vukičević S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. Basel, Birkhauser Verlag, 2002, pp 249-262
- Jelić M, Pećina M, Hašpl M, et al: Regeneration of articular chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Factors* 19:101-113, 2001
- Jensen TB, Overgaard S, Lind M, et al: Osteogenic protein 1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants. *Acta Orthop Scand* 73: 31-9, 2002
- Katić V, Majstorović L, Maticić D et al: Biological repair of thyroid cartilage defects by osteogenic protein-1 (Bone morphogenetic Protein-7) in dog. *Growth Factors* 17: 221-232, 2000
- Martinek V, Imhoff AB: Revision of failed anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthopade* 31: 778-84, 2002
- Martinek V, Latterman C, Usas A, et al: Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer, histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1123-31, 2002
- Martinović S, Borovečki F, Sampath KT, et al: Biology of bone morphogenetic proteins, in Vukičević S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. Basel, Birkhauser Verlag, 2002, pp 87-119
- Mihelić R, Pećina M, Jelić M, et al: BMP-7 (OP-1) promotes tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Am J Sports Med*, in press, 2004
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610, 1987
- Pećina M, Jelić M, Martinović S, et al: Articular cartilage repair: the role of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop* 26: 131-6, 2002
- Pećina M, Giltaj LR, Vukičević S: Ortopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). *Int Orthop* 25: 203-8, 2001
- Reddi AH: Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnol* 16:247-252, 1998
- Rodeo S, Suzuki K, Deng X-H, et al: Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med*. 27: 476-488, 1999
- Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzillo PA, et al: Tendon-healing in a bone tunnel. *J Bone Joint Surg* 75-A: 1795-1804, 1993
- Sampath TK, personal communication
- Schulz MS, Russe K, Weiler A, et al: Epidemiology of posterior cruciate ligament injuries. *Acta Orthop Trauma Surg* 123: 186-91, 2003
- Scranton PE Jr, Lanzer WL, Ferguson MS, et al: Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy* 14: 702-16, 1998
- Shelbourne KD, Carr DR: Combined anterior and posterior cruciate and medial collateral ligament injury: nonsurgical and delayed surgical treatment. *Inst Course Lect* 52: 413-8, 2003

33. Tanaka H, Nagai E, Murata H, et al: Involvement of bone morphogenic protein-2 (BMP-2) in the pathological ossification process of the spinal ligament. *Rheumatology* 40: 1163-8, 2001
34. Tomita F, Kazunori Y, Mikami S, et al: Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and bone-patellar ligament tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 17: 461-476, 2001
35. Urist MR. The first three decades of bone morphogenetic protein research. *Osteologie* 4: 207-223, 1995
36. Vukičević S, Stavljenić A, Pećina M: Discovery and clinical application of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 661-671, 1995
37. Vukičević S, Latin V, Chen P, et al: Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 693-700, 1994
38. Vukičević S, Luyten FP, Reddi AH: Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8793-7, 1989
39. Vukičević S, Krempien B, Stavljenić A: Effects of 1 alpha,25- and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on aluminium-induced rickets in growing uremic rats. *J Bone Miner Res* 2: 533-45, 1987
40. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, et al: Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6 and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 100: 321-30, 1997
41. Woo BH, Fink BF, Page R, et al: Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 18: 1747-53, 2001
42. Wozney JM, Rosen V: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop* 346: 26-37, 1998