

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ (19) BY (11) 24729



(13) C1

(45) 2025.11.05

(51) МПК

G 09B 23/28 (2006.01)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВНУТРИСУСТАВНОГО ПЕРЕЛОМА ДЛИННОЙ ТРУБЧАТОЙ КОСТИ У ЛАБОРАТОРНОГО ЖИВОТНОГО

(21) Номер заявки: а 20240210

(22) 2024.09.27

(71) Заявители: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (BY)

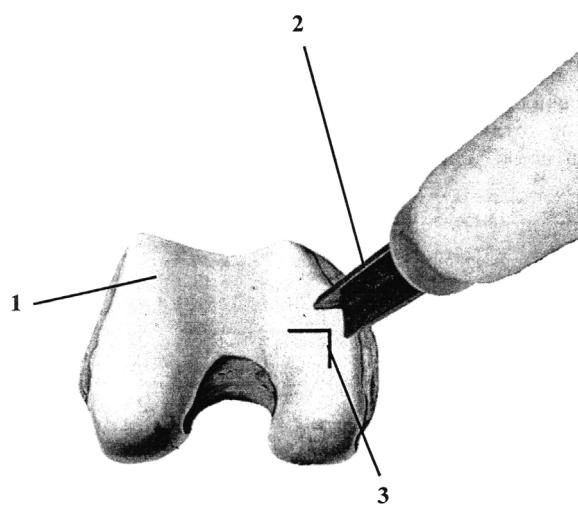
(72) Авторы: Игнатенко Павел Юрьевич; Малюков Вадим Валерьевич; Николаев Владимир Иванович; Зиновкин Дмитрий Александрович; Чуешова Наталья Владимировна; Зиновкина Екатерина Сергеевна; Веялкина Наталья Николаевна (BY)

(73) Патентообладатели: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (BY)

(56) ТРЕТЬЯКОВ А.А. и др. Способ экспериментального моделирования остеоартроза. Остеопороз и остеопатии, 2020, т. 23, № 2, с. 177-178.
RU 2669047 C1, 2018.
RU 2490721 C1, 2013.
SU 909675, 1982.
UA 21830 U, 2007.
RU 2531441 C1, 2014.

(57)

Способ моделирования внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости у лабораторного животного, при котором под ингаляционным наркозом в асептических условиях лабораторное животное фиксируют в положении на спине, выстригают волосяной



покров в области коленного сустава, проводят обработку операционного поля 5%-ным раствором йода, вскрывают коленный сустав путем послойного рассечения тканей по медиальной поверхности, экспонируют медиальный мыщелок бедренной кости и формируют перпендикулярно поверхности медиального мыщелка костно-хрящевой дефект, идентичный незавершенному перелому медиального мыщелка бедренной кости, инструментом с остроконечной Г-образной рабочей частью со сторонами $0,2 \times 0,2$ см, при этом по ходу вмешательства операционное поле орошают 0,02%-ным раствором хлоргексидина, по завершении - физиологическим раствором, после чего рану послойно ушивают наглухо.

Изобретение относится к области медицины, в частности к экспериментальной травматологии и ортопедии, и может быть использовано для моделирования внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости у лабораторных животных при изучении вопросов репарации хряща и кости.

Одной из важнейших проблем современной травматологии является лечение внутрисуставных переломов. Их доля составляет до 17,6 % от всех повреждений скелета. Традиционные методы лечения часто оказываются недостаточно эффективными, что приводит к хроническим болям, ограничению подвижности и развитию посттравматического остеоартрита. В зависимости от анатомического расположения переломов в 9,4-47,7 % случаев наблюдаются неудовлетворительные исходы лечения.

Внутрисуставной перелом характеризуется механическим разрушением всех элементов сустава: наравне с костью нарушаются целостность гиалинового хряща и повреждаются мягкотканые структуры сустава, вследствие чего кровь и костный мозг попадают в полость сустава, что существенно усложняет процесс заживления и восстановления функции сустава [1].

Исследование механизмов регенерации костной и хрящевой тканей при внутрисуставных переломах является одной из актуальных задач современной травматологии и ортопедии [2].

Несмотря на большое количество разноплановых способов моделирования внутрисуставных переломов длинных трубчатых костей у всех имеются недостатки, такие как: необходимость дополнительной фиксации металлоконструкциями, развитие асептического некроза кости, значительное повреждение мягких тканей. В соответствии с этим модель такого перелома и его заживление *in vivo* должны предоставлять возможность переносить вес лабораторному животному на оперированную конечность во время заживления перелома, позволять изучить влияние потери целостности сустава на заживление субхондральной кости, суставного хряща.

Известен способ моделирования повреждений костей путем нарушения их целостности, когда по внутренней поверхности средней трети плеча кролика делают разрез мягких тканей и при помощи сверла формируют отверстие, в него вводят дистракционное устройство и осуществляют дистракцию в продольном и/или поперечном направлениях кости до образования трещин [3].

Однако известный способ не дает возможности исследовать механическое воздействие на суставные поверхности длинной кости.

Известен способ моделирования внутрисуставного импрессионного перелома проксимального отдела большеберцовой кости, заключающийся в том, что производят четырехсторонний распил большеберцовой кости кролика размером 8×7 мм в области медиального мыщелка алмазным металлическим отрезным диском диаметром 10 мм и толщиной 1,5 мм, отступая 3-5 мм от суставной поверхности в дистальном направлении таким образом, что образовавшийся прямоугольный участок извлекают, далее производят надлом и смещение части мыщелка в дистальном направлении в область костного дефекта.

та, в результате образуют импрессионный внутрисуставной перелом большеберцовой кости [4].

Однако этот способ является высокотравматичным и требует дополнительной фиксации металлоконструкциями из-за формирования импрессионного перелома мыщелка.

Известен способ моделирования субкапитального перелома бедренной кости, включающий обнажение поверхности кости на участке предполагаемого перелома и механическое нарушение ее целостности, отличающийся тем, что производят фиксацию шейки зажимом так, чтобы рабочая поверхность бранш одной стороной соприкасалась с большим вертелом, а другой располагалась на основании головки бедренной кости параллельно субкапитальной линии, перекрывая базальную и трансцервикальную, устанавливают второй зажим параллельно первому в противоположном направлении между головкой бедренной кости и первым зажимом так, чтобы бранши второго зажима одной стороной соприкасались с боковой поверхностью первого зажима, а другой - с головкой бедренной кости, и смыкают рабочие поверхности бранш второго зажима до создания субкапитального перелома [5].

Однако этот способ не соответствует картине истинного перелома, поскольку энергия, прикладываемая зажимом, отличается от осевой перегрузки, вызывающей перелом. Кроме того, способ высокотравматичен, так как двустороннее сдавление может привести к размозжению кости, а рассечение капсулы тазобедренного сустава может вызывать асептический некроз головки бедренной кости из-за нарушения кровоснабжения.

Известен способ моделирования остеоартрита коленных суставов у крыс, включающий рассечение кожи и фасции коленного сустава крысы под ингаляционным наркозом в асептических условиях, после чего в полость сустава вводили стерильную инъекционную иглу и механически наносили травму хрящевым структурам наружных мыщелков бедренных и большеберцовых костей режущей частью среза иглы, при этом диаметр иглы соответствовал суммарной толщине хрящевого слоя суставных поверхностей, затем на рассеченные ткани накладывали швы [6] (прототип).

Однако такое линейное нанесение травмы хрящевым структурам наружных мыщелков бедренных и большеберцовых костей не позволяет достичь костно-хрящевого дефекта, так как при этом глубина дефекта субхондральной кости недостаточна.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, заключается в разработке модели внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости у лабораторного животного, позволяющей комплексно оценить морфофункциональные параметры течения репарации хряща и кости.

Задача решается за счет того, что в соответствии со способом моделирования внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости у лабораторного животного под ингаляционным наркозом в асептических условиях лабораторное животное фиксируют в положении на спине, выстригают волосяной покров в области коленного сустава, проводят обработку операционного поля 5%-ным раствором йода, вскрывают коленный сустав путем послойного рассечения тканей по медиальной поверхности, экспонируют медиальный мыщелок бедренной кости и формируют перпендикулярно поверхности медиального мыщелка костно-хрящевой дефект, идентичный незавершенному перелому медиального мыщелка бедренной кости, инструментом с остроконечной Г-образной рабочей частью со сторонами $0,2 \times 0,2$ см, при этом по ходу вмешательства операционное поле орошают 0,02%-ным раствором хлоргексидина, по завершении - физиологическим раствором, после чего рану послойно ушивают наглухо.

Способ поясняется фигурой с изображением места формирования костного дефекта на медиальном мыщелке бедренной кости, где 1 - медиальный мыщелок бедренной кости, 2 - инструмент с остроконечной Г-образной рабочей частью, 3 - костно-хрящевой дефект.

Проведение исследования было одобрено комитетом по этике ГУ "Гомельский государственный медицинский университет" (протокол № 2 за 2023 г.). Эксперимент был про-

веден с соблюдением требований биоэтики и Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. В исследовании использовали 30 крыс обоего пола линии Wistar весом $284 \pm 14,6$ г. Животных содержали в клетках по 5 особей при режиме освещения 12/12 с беспрепятственным доступом к корму и воде на стандартном пищевом рационе. В помещениях вивария поддерживалась постоянная температура 21-23 °C, влажность воздуха была близка к 50 %.

Всем лабораторным животным под ингаляционным наркозом в асептических условиях обеспечивали фиксацию в положении на спине, выстригали волосяной покров в области коленного сустава, обрабатывали операционное поле 5%-ным раствором йода, вскрывали коленный сустав послойным рассечением тканей по медиальной поверхности, экспонировали медиальный мыщелок бедренной кости и травмировали его механическим путем незначительным однократным мускульным воздействием инструментом (например, долотом) с остроконечной Г-образной рабочей частью со сторонами $0,2 \times 0,2$ см, перпендикулярно поверхности медиального мыщелка формировали костно-хрящевой дефект, идентичный незавершенному перелому медиального мыщелка бедренной кости.

Таким образом, в отличие от прототипа формируют равномерный щелевидный костно-хрящевой дефект медиального мыщелка бедренной кости, что соответствует понятию внутрисуставного перелома, суставная поверхность остается конгруэнтной, нет дополнительной травматизации хряща, субхондральной кости и близлежащих тканей. Механическое воздействие при этом является низкотравматичным и, несмотря на разрушение не только костных, но и хрящевых структур коленного сустава, двигательная функция в данном сегменте опорно-двигательного аппарата лабораторного животного сохраняется. По ходу вмешательства операционное поле орошили 0,02%-ным раствором хлоргексидина, по завершении - физиологическим раствором, затем рану послойно ушивали наглухо.

При выведении из эксперимента у животных проводили забор венозной крови для определения уровня N-остеокальцина (маркера остеопороза), уровня костных морфогенетических белков BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7) крови и проводили рентгенологическое исследование прооперированного коленного сустава с использованием рентгеновской установки для облучения биологического назначения X-RAD 320 с системой визуализации OptiMAX (Precision X-RayInc., США) (кВт = 40, мА = 3). Гистологическую оценку изменений суставного хряща выполняли на основании шкалы полукаличественной гистохимической оценки состояния хряща по Н. Mankin (1971). Сравнение групп проводилось с использованием теста Краскела-Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Животных выводили из эксперимента на 7, 14 и 30 сутки, группами по 10 животных, производили забор мыщелков бедра для гистологического исследования. Материал фиксировали в забуференном по Лилли 10%-ном растворе формалина в течение 48 ч, после чего проводили декальцинацию в 20%-ном растворе муравьиной кислоты на протяжении 5-7 суток. Декальцинированные биоптаты помещали в гистологические кассеты и подвергали гистологической проводке по стандартной методике в гистопроцессоре STP-120 (ThermoScientific, Германия), после чего ткани заливали в парафиновые блоки. На микротоме Microm HM 450 (ThermoScientific, Германия) изготавливали серии срезов толщиной 5 мкм. Полученные срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали сафранином О по стандартной методике и заключали под покровные стекла монтирующей средой Витрогель (Биовитрум, РФ).

Морфометрический анализ суставного хряща проводили с применением микроскопа Nikon ECLIPSE 50i (Nikon, Япония). Оценку гиалинового хряща вокруг места его повреждения проводили в 3 неперекрывающихся полях зрения. Оценку степени выраженности морфологических изменений хряща коленного сустава проводили с использованием модифицированной F.M.D. Henson и соавт. балльной шкалы Mankin [7].

В ходе выведения из эксперимента у животных производили забор венозной крови для определения в последующем маркеров костного метаболизма методом ИФА с использованием диагностических наборов компании Elabscience (Китай): BMP7 (группы факторов роста), N-остеокальцина. Измерения оптической плотности выполнены на микропланшетном ридере Tecan Safire 2 (Tecan Ltd., Swiss).

Статистический анализ выполнили с помощью пакета программ GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software, США). Был проведен тест на нормальность Шапиро-Уилка, который установил, что распределение отличалось от нормального, в связи с этим данные были представлены как медиана (25-, 75- процентиля). Сравнение групп провели с использованием теста Краскела-Уоллиса с поправкой по Данну. Статистически значимыми различия принимали при $p < 0,05$.

При сравнении групп по Mankin отмечали статистически значимые различия ($p < 0,0001$). Post-hoc-тест выявил статистически значимые различия по баллам Mankin между 7 и 14 сутками ($p = 0,014$), а также 7 и 30 сутками ($p < 0,0001$). Уровень остеокальцина крови не имел статистически значимых различий ($p = 0,518$) при сравнениях групп. В то же время отмечались статистически значимые различия ($p = 0,0028$) между исследуемыми группами в уровне BMP7 крови. Post-hoc-тест выявил статистически значимые по уровню BMP7 в крови между 7 и 14 сутками ($p = 0,048$), а также 14 и 30 сутками ($p = 0,0195$).

Снижение уровня костных морфогенетических белков BMP7 в крови лабораторных животных на 14 сутки, возможно, связано с изменением соотношения данного белка в крови и активно регенерирующей костной ткани.

На рентгенограммах на 7 сутки у всех животных определялся перелом медиального мыщелка левой бедренной кости, без видимого смещения отломков.

Микроскопически в гиалиновом хряще наблюдалось умеренная потеря окраски, единичные пустые лакуны, увеличение клеточности с появлением кластеров клеток и участков прерывистости пограничной линии.

На 14 сутки определялся отек мягких тканей. Перелом медиального мыщелка левой бедренной кости, стояние отломков было удовлетворительное, костная мозоль умеренно выражена. В суставной щели определялись единичные уплотнения округлой формы с четким контуром костной плотности.

При гистологическом исследовании наблюдалась выраженные изменения гиалинового хряща, проявлявшиеся появлением участков утраты верхних слоев, резким снижением окраски хрящевой ткани, потерей клеточности с выявляемым большим количеством пустых лакун и прерывистой неровной пограничной линией хряща.

На 30 сутки наблюдался консолидирующийся перелом медиального мыщелка левой бедренной кости, стояние отломков было удовлетворительное.

Микроскопически отмечалась шероховатая поверхность хряща за счет замещения поверхностных слоев грубой волокнистой соединительной тканью, хрящ имел выраженные дистрофические изменения с очаговой потерей окраски, наблюдались участки оссификации, пограничная линия четко не определялась, имелись участки разволокнения хрящевой ткани.

Таким образом, предлагаемый способ моделирования внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости с формированием костно-хрящевого щелевидного дефекта позволяет получить дегенеративные изменения, характерные для посттравматического остеоартрита. Патоморфологическое исследование выявило дегенеративные изменения с потерей протеогликанов в суставном хряще, прогрессирующие в течение 4 недель после выполнения внутрисуставного перелома, при этом изменения хряща наблюдались не только в месте перелома суставной поверхности, но и на противоположной суставной поверхности, что является характерным морфологическим признаком посттравматического остеоартрита у лабораторных животных [8]. А повышение уровня костных морфогенети-

ческих белков BMP7 на 30 сутки может быть связано с регенеративными процессами, происходящими в кости и гиалиновом хряще [9].

Предлагаемый способ моделирования внутрисуставного перелома длинных трубчатых костей у лабораторных крыс продемонстрировал высокую воспроизводимость и надежность, не требует дополнительной фиксации металлоконструкциями, позволяет переносить вес на оперированную конечность в процессе заживления, малотравматичен, при этом не нарушается кровоснабжение окружающих тканей, что не приводит к асептическому некрозу кости. Он позволяет адекватно исследовать динамику заживления костной и хрящевой тканей в условиях, близких к клиническим.

Разработанный способ моделирования может быть использован для дальнейшего изучения различных факторов, влияющих на регенерацию тканей, включая генетические, молекулярные и фармакологические аспекты, позволяет комплексно оценить репаративные процессы хрящевой и костной ткани и приблизить модель к реальному патофизиологическому механизму внутрисуставного перелома длинной трубчатой кости лабораторного животного.

Изобретение будет способствовать открытию новых горизонтов для разработки инновационных методов лечения травм опорно-двигательного аппарата.

Источники информации:

1. ГИЛЕВ М.В. Хирургическое лечение внутрисуставных переломов проксимального отдела большеберцовой кости. Гений ортопедии, 2014, № 1, с. 75-81.
2. ТИХИЛОВ Р.М. и др. Современные аспекты лечения последствий переломов костей заднего отдела стопы. Травматология и ортопедия России, 2009, т. 52, № 2, с. 144-149.
3. SU 909675 A1, 1982.
4. RU 2669047 С1, 2018.
5. RU 2490721 С1, 2013.
6. ТРЕТЬЯКОВ А.А. и др. Способ экспериментального моделирования остеоартроза. Остеопороз и остеопатии, 2020, т. 23, № 2, с. 177-178.
7. HENSON F.M.D et al. Promotion of the intrinsic damage - repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor-2. Osteoarthritis and Cartilage, 2005, № 13(6), p. 537-544.
8. КОРНЕВА Ю.С. и др. Значение инфрапателлярной жировой ткани в патогенезе остеоартрита коленного сустава: обзор зарубежной литературы. Травматология и ортопедия России, 2023, № 29(4), с. 147-155.
9. BOZHOKIN M.S. et al. Experimental Replacement of the Surface Defect of Rat Hyaline Cartilage by a Cell-Engineered Construct. Regen. Eng. Transl. Med, 2021, № 7, p. 184-193.