



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123484** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 09897	(72) Винахідник(и): Вернигородський Сергій Вікторович (UA), Рибінський Максим Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.10.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.02.2018	(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.02.2018, Бюл.№ 4	

(54) СПОСІБ МІКРОСКОПІЧНОЇ ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ПОШКОДЖЕННІ СУБХОНДРАЛЬНОЇ ПЛАСТИНКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб мікроскопічної оцінки інтенсивності регенерації хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті включає гістологічну оцінку основних морфологічних критеріїв ураження хрящової тканини, а саме стану основної речовини та хондроцитів. Визначають клітинну морфологію, матрикс, регулярність поверхні, структурну цілісність, товщину, зв'язок з оточуючим хрящем, клітинний вміст, кластеризацію хондроцитів та дегенеративні зміни в оточуючому хрящі за допомогою гістохімічного забарвлення основним коричневим. При загальній кількості 0 балів встановлюють відсутність ознак відновлення хрящової тканини; 1-10 балів - слабкий регенераційний потенціал хрящової тканини; 11-23 бали - високий регенераційний потенціал; 24 бали - повне відновлення.

UA 123484 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до патологічної анатомії, а саме до способу мікроскопічної оцінки регенераційного потенціалу хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті. Може бути використана в комплексній діагностиці та прогнозу перебігу загоєння та регенерації хряща стегнової кістки в експерименті.

5 Відомо, що з метою діагностики новоутвореного регенерату в ділянці хрящового дефекту використовують різні методи та шкали, що базуються на оцінці кольору відновленої тканини, наявності кровоносних судин у відновленій тканині, поверхні відновленої тканини, заповнення хрящового дефекту, дегенерації прилягаючого суглобового хряща. Для цього застосовують морфологічні, гістохімічні та біохімічні методи досліджень, які відрізняються між собою за
10 точністю і складністю їх виконання.

Найбільш близьким серед них є відомий спосіб діагностики для прицільної оцінки регенерату, клітинної морфології, організації матриксу, структурної цілісності, регулярності поверхні, товщини регенерату, зв'язку з оточуючим хрящем, кількості клітин у регенераті, кластерування та ступеню забарвлення за шкалою O'Driscoll et al., 1986. Проте даний спосіб
15 гістологічного дослідження хряща має ряд недоліків. По-перше, відсутня ступінь дисрегенераторних змін. По-друге, що стосується клітинного вмісту регенерату, за цією шкалою важко визначити тип та стан клітин - рекомендується тільки звертати увагу на зниження або нормальний їх вміст, при цьому нівелюються ознаки надлишковою регенерації. По-третє, стан міжклітинного матриксу (основної речовини) оцінюється за допомогою Сафраніну-О, який не
20 завжди є доступним та більш коштовний в порівнянні з іншими барвниками. При цьому відсутні кількісні параметри діагностики та не враховується вираженість регенераційного потенціалу хрящової тканини.

Головною ознакою інтенсивності регенерації є наявність молодих мезенхімоподібних клітин, хондробластів та хондроцитів, які свідчать про її завершеність. При гістологічному дослідженні
25 біопсійного матеріалу такі зміни не завжди виявляються, що залежить від кількості взятого матеріалу для дослідження. Отже, головною відмінністю запропонованої корисної моделі є визначення завершеності цитохімічної диференціації хондроцитів, що здатні продукувати основну речовину, яка оцінюється за допомогою забарвлення основним коричневим.

В основу корисної моделі "Спосіб мікроскопічної оцінки інтенсивності регенерації хрящової
30 тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті" поставлена задача шляхом алгоритму оцінки основних морфологічних критеріїв ураження хрящової тканини, а саме патогістологічної оцінки стану основної речовини та хондроцитів за допомогою забарвлення основним коричневим, виявити ступінь регенераторного потенціалу відновленої тканини.

35 Поставлена задача здійснюється "способом мікроскопічної оцінки інтенсивності регенерації хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті", що передбачає гістологічне дослідження хрящової тканини, згідно з корисною моделлю при останньому визначають стан основної речовини та хондроцитів за допомогою додаткового гістохімічного забарвлення основним коричневим з урахуванням повноти диференціації та дозрівання
40 хондроцитів.

Спосіб здійснюється таким чином: у всіх тварин під комбінованою внутрішньовенною анестезією розчинами Кетаміну та Тіопенталу виконується розріз шкіри та підлеглої капсули медіальним парapatелярним доступом. За допомогою скальпеля формується повношаровий хрящовий дефект розміром 6 на 4 мм в міжвідростковій ділянці надколінкової поверхні стегнової
45 кістки. Після цього рану промивають фізіологічним розчином та пошарово ушивають м'які тканини. Зашита рана обробляється Стериліумом та накладається асептична пов'язка. Усі маніпуляції з тваринами проводять згідно закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 9.12.2015 року.

Для морфологічного дослідження здійснюється відбір дистального відділу стегнової кістки. Макропрепарат фіксується у 10 % розчині формаліну, надалі проводиться декальцинація препаратів у розчині азотної кислоти, знежирення та зневоднення у спиртах та ацетоні. Депарафіновані зрізи доводяться до 70 спирту та поміщаються в розчин барвника на 1-2 години (в більшості випадків достатньо 1 години). Розчин основного коричневого готується за наступним чином: основний коричневий 0,5 г, етиловий спирт 80 мл, 1 N соляна кислота 20 мл.
50 Перед першим застосуванням розчин необхідно профільтрувати. Після витягання з барвника препарат проводять через 3 зміни 70 спирту, по одній, дві хвилини в кожній, потім зневоднюють, просвітлюють та заключають у бальзам. За даною методикою основна речовина хрящу (кислі мукополісахариди, що містять сульфатну групу) забарвлюються у коричневий колір.

60 Якість новоутвореного регенерату в ділянці хрящового дефекту оцінюється за наступними показниками:

1. Клітинна морфологія: гіаліновий суглобовий хрящ (4 бали), неповністю диференційовані мезенхімальні клітини (2 бали), фіброзна тканина або кістка (0).
2. Забарвлення основним коричневим хрящового матриксу: нормальне чи біля нормального, помірне, незначне, відсутнє.
- 5 3. Регулярність поверхні: гладенька та інтактна, поверхневі горизонтальні розшарування, тріщини від 25 до 100 % від товщини великі пошкодження, включаючи фібриляції.
4. Структурна цілісність: нормальна, незначні порушення, включаючи кісти, важка дезінтеграція.
- 10 5. Товщина: 100 % від товщини нормального оточуючого хряща, 50-100 % від нормального оточуючого хряща, 0-50 % від нормального оточуючого хряща.
6. Зв'язок з оточуючим хрящем: прикріплений на обох кінцях регенерату, прикріплений на одному кінці чи частково на обох кінцях, не зв'язаний.
7. Клітинний вміст: нормальний клітинний вміст, незначне зниження клітинного вмісту, помірне зниження клітинного вмісту, значне зниження клітинного вмісту.
- 15 8. Кластеризація хондроцитів: кластери відсутні, < 25 % клітин, 25 - 100 % клітин.
9. Дегенеративні зміни в оточуючому хрящі: нормальний клітинний вміст, відсутність кластерів, нормальне забарвлення; нормальний клітинний вміст, помірна кластеризація, помірне забарвлення; помірне зниження клітинного вмісту, помірна кластеризація, помірне забарвлення; значне зниження клітинного вмісту, погане чи відсутнє забарвлення (табл.).
- 20 **Приклад № 1.** У випадках хрящового дефекту без пошкодження хрящової пластинки із застосуванням збагаченої тромбоцитами плазми гіаліновий хрящ не утворювався, а переважала фіброзна тканина, що оцінюється згідно запропонованому алгоритму у 0 балів.
- Забарвлення основним коричневим хрящового матриксу було помірне - 2 бали.
- Поверхня характеризувалася появою тріщин до 50 % товщини - 1 бал.
- 25 Дезінтеграція клітин була присутня у всіх випадках - 0 балів.
- Товщина була до 50 %.
- Зв'язок з оточуючим хрящем був частковим на обох кінцях регенерату - 1 бал.
- Клітинний вміст: значне зниження - 0 балів.
- Кластеризація хондроцитів спостерігалася в регенераті в 30 % - 0 балів.
- 30 Дегенеративні зміни в оточуючому хрящі характеризувалися помірним зниженням клітинного вмісту, помірною кластеризацією та забарвленням - 1 бал.
- Загальна кількість 4 бали, що відповідає слабкому регенераційному потенціалу хрящової тканини.
- Приклад № 2. Проте, у випадках хрящового дефекту з наявним пошкодженням хрящової пластинки із застосуванням збагаченої тромбоцитами плазми гіаліновий хрящ утворювався, що згідно запропонованому алгоритму оцінюється у 4 бали.
- 35 Забарвлення основним коричневим хрящового матриксу було незначне - 1 бал.
- Поверхня була гладенькою - 3 бали.
- Порушення структурної цілісності незначне - 1 бал.
- 40 Товщина була > 50 % від оточуючого хряща - 1 бал.
- Зв'язок з оточуючим хрящем був повним: прикріплений на обох кінцях регенерату - 2 бали.
- Клітинний вміст: незначне зниження - 2 бали.
- Кластеризація хондроцитів спостерігалася в регенераті < 25 % - 1 бал.
- 45 Дегенеративні зміни в оточуючому хрящі характеризувалися нормальним клітинним вміст, помірною кластеризацією, помірним забарвленням - 2 бали.
- Отже після проведеного мікроскопічного дослідження з урахуванням запропонованого алгоритму оцінки основних морфологічних критеріїв інтенсивності регенерації хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки загальна кількість балів 16 балів, що відповідає високому регенераційному потенціалу хрящової тканини.
- 50

Таблиця

Алгоритм оцінки основних морфологічних критеріїв інтенсивності регенерації хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті

Характер домінуючої тканини	
Клітинна морфологія	
Паліновий суглобовий хрящ	4
Неповністю диференційовані мезенхімальні клітини	2
Фібозна тканина або кістка	0
Забарвлення основним коричневим хрящового матриксу	
Нормальне чи біля нормального	3
Помірно	2
Незначне	1
Відсутнє	0
Структурні характеристики	
Регулярність поверхні	
Гладенька та інтактна	3
Поверхневі горизонтальні розшарування	2
Тріщини від 25 до 100 % від товщини	1
Великі пошкодження, включаючи фібриляції	0
Структурна цілісність	
Нормальна	2
Незначні порушення, включаючи кісти	1
Важка дезінтеграція	0
Товщина	
100 % від товщини нормального оточуючого хряща	2
50-100 % від нормального оточуючого хряща	1
0-50 % від нормального оточуючого хряща	0
Зв'язок з оточуючим хрящем	
Прикріплений на обох кінцях регенерату	2
Прикріплений на одному кінці чи частково на обох кінцях	1
Незв'язаний	0
Клітинні зміни чи дегенерація	
Клітинний вміст	
Нормальний клітинний вміст	3
Незначне зниження клітинного вмісту	2
Помірне зниження клітинного вмісту	1
Значне зниження клітинного вмісту	0
Кластеризація хондроцитів	
Кластери відсутні	2
< 25 % клітин	1
25-100 % клітин	0
Дегенеративні зміни в оточуючому хрящі	
Нормальний клітинний вміст, відсутність кластерів, нормальне забарвлення	3
Нормальний клітинний вміст, помірна кластеризація, помірне забарвлення	2
Помірне зниження клітинного вмісту, помірна кластеризація, помірне забарвлення	1
Значне зниження клітинного вмісту, погане чи відсутнє забарвлення	0

5 Загальна кількість балів цієї шкали коливається від 0 (відсутні ознаки відновлення хрящової тканини) до 24 (повне відновлення):

- 0 балів - відсутні ознаки відновлення хрящової тканини;
- 1-10 балів - слабкий регенераційний потенціал хрящової тканини;
- 11-23 бали - високий регенераційний потенціал.

24 бали - повне відновлення.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб мікроскопічної оцінки інтенсивності регенерації хрящової тканини при пошкодженні субхондральної пластинки в експерименті, що включає гістологічну оцінку основних морфологічних критеріїв ураження хрящової тканини, а саме стану основної речовини та хондроцитів, який **відрізняється** тим, що визначають клітинну морфологію, матрикс, регулярність поверхні, структурну цілісність, товщину, зв'язок з оточуючим хрящем, клітинний
- 10 вміст, кластеризацію хондроцитів та дегенеративні зміни в оточуючому хрящі за допомогою гістохімічного забарвлення основним коричневим, і при загальній кількості 0 балів встановлюють відсутність ознак відновлення хрящової тканини; 1-10 балів - слабкий регенераційний потенціал хрящової тканини; 11-23 бали - високий регенераційний потенціал; 24 бали - повне відновлення.
- 15

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601