

УДК: 576.8:611.018.46-092.4:616.71-008.817-07

© Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Костерін С.Б., Вишнякова І.В., Вельмінава В.В., 2012

ВИЗНАЧЕННЯ IN VITRO РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПАЦІЄНТІВ ТА ЙОГО ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ З МІНЕРАЛЬНОЮ ЩІЛЬНІСТЮ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Костерін С.Б., Вишнякова І.В., Вельмінава В.В.

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМНУ»

Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Костерін С.Б., Вишнякова І.В., Вельмінава В.В. Визначення in vitro регенераторного потенціалу пацієнтів та його взаємозв'язку з мінеральною щільністю кісткової тканини // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 69-74.

Регенераторний потенціал 10 пацієнтів з дегенеративними захворюваннями хребта оцінювали in vitro при культивуванні стромальних клітин кісткового мозку шурів у живильному середовищі DMEM, яке містить сироватку крові пацієнта. В контрольних культурах використали стандартну телячою ембріональну сироватку. Проведений аналіз взаємозв'язку регенераторного потенціалу пацієнтів з мінеральною щільністю їх кісткової тканини (BMD за даними остеоденситометра Explorer QDR W Hologic). Встановлений статистично значимий кореляційний зв'язок між мінеральною щільністю кісткової тканини та цитологічними характеристиками досліджених культур, що свідчить про непрямий взаємозв'язок між станом кістки та регенераторним потенціалом пацієнтів, який опосередкований через склад сироватки крові.

Ключові слова: культура стромальних клітин кісткового мозку щура, сироватка крові пацієнтів, остеоденситометрія поперекового відділу хребта.

Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Костерін С.Б., Вишнякова І.В., Вельмінава В.В. Определение in vitro регенераторного потенциала пациентов и его взаимосвязи с минеральной плотностью костной ткани // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 69-74.

Регенераторный потенциал 10 пациентов с дегенеративными заболеваниями позвоночника оценивали in vitro при культивировании стромальных клеток костного мозга крысы в питательной среде DMEM, содержащей сыворотку крови пациента. В контрольных культурах использовали стандартную телячью эмбриональную сыворотку. Проведен анализ взаимосвязи регенераторного потенциала пациентов с минеральной плотностью их костной ткани (BMD по данным остеоденситометра Explorer QDR W Hologic). Установлена статистически значимая корреляционная связь между минеральной плотностью костной ткани и цитологическими характеристиками исследованных культур, что свидетельствует о косвенной взаимосвязи между состоянием кости и регенераторным потенциалом пациентов, которая опосредована через состав сыворотки крови.

Ключевые слова: культура стромальных клеток костного мозга крысы, сыворотка крови пациентов, остеоденситометрия поясничного отдела позвоночника.

Malyshkina S.V., Nikolchenko O.A., Kosterin S.B., Vyshnyakova I.V., Velyaminova V.V. In vitro determination of regenerative potential of patient and its interrelation with bone mineral density // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 69-74.

The regenerative potential of 10 patients with spine degenerative diseases was evaluated in vitro by culturing rat bone marrow stromal cells in the DMEM with added the blood serum of these patients. The standard fetal bovine serum was used in control cultures. The analysis of the relationship between regenerative potential of patients and bone mineral density (BMD data from osteodensitometer Explorer QDR W Hologic) was carried. A statistically significant correlation between bone mineral density and cytological characteristics of the investigated cultures was found. The indirect relationship between the bone state and regenerative potential of patients, which was mediated through the blood serum composition, was observed.

Key words: culture of rat bone marrow stem cells, blood serum of patients, bone densitometry of lumbar spine.

Вступ. Проблема тривалого функціонування ендопротезів чи фіксаторів, а також їх інтеграція у кістку після виконання реконструктивно-відновлювальних операцій на хребті та при переломах кісток до теперішнього часу залишається невирішеною [2, 12, 15]. Саме важливість ролі фіксації ендопротезів у одержанні позитивних віддалених результатів реконструктивних та стабілізуючих операцій спонукала нас до виконання дослідження, котре спрямоване на визначення остеорепаративного потенціалу у пацієнтів поперед виконанням оперативних втручань із застосуванням фіксуючих засобів. Це дозволило б, у разі необхідності, провести стимуляцію остеорепаративної у ранньому післяопераційному періоді, тобто створити оптимальні умови для стійкої фіксації ендопротезів.

Остеорепаративні потенції у пацієнтів із переломами кісток та незрощеннями вивчають різними методами. Є роботи, де з цією метою досліджують окремі компоненти сироватки крові чи вивчають здатність до клонування культивованих стромальних клітин кісткового мозку (СККМ) [4, 5, 6]. Відомо, що сироватка крові забезпечує системну регуляцію репа-

ративного остеогенезу, бо в ній присутні різні біологічно активні речовини (гормони, фактори росту, цитокіни та ін.), які здатні регулювати проліферацію, ріст, диференціацію остеогенних клітин-попередників кісткового мозку та позитивно впливати на перебіг регенерації кістки [11, 14, 22]. Підвищення рівня факторів росту у сироватці крові призводить до збільшення мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ), що було показано у експериментах на старих мишах та мишах зі змодельованою остеопенією [20]. Порушення метаболічного стану організму в умовах травми, захворювань та старіння супроводжується зміною вмісту вказаних регуляторних факторів у сироватці крові [7], що може провокувати розлад репаративного остеогенезу на різних його стадіях та зумовлювати асептичну нестабільність фіксуючих засобів.

Мета дослідження – визначити регенераторний потенціал пацієнтів з дегенеративними захворюваннями хребта та оцінити його взаємозв'язок з мінеральною щільністю кісткової тканини як показника якості кістки.

Матеріал та методи дослідження. Регенерато-

рний потенціал пацієнтів визначали *in vitro* в умовах культивування СККМ. Використали особливості цих клітин утворювати в процесі культивування колонії, кількість та розміри котрих залежать як від характеристики самих клітин, так і від складу живильного середовища, тобто від якості сироватки крові, котра є складовою частиною живильного середовища.

Матеріалом для дослідження служили культури СККМ молодих (3-4 місяці) щурів з додаванням у живильне середовище сироватки крові пацієнтів з дегенеративними захворюваннями хребта, котрі планувались до реконструктивно-відновлювального хірургічного втручання з використанням фіксуючих засобів. СККМ молодих щурів були використані, виходячи з того, що взяття клітин кісткового мозку у пацієнтів (із крила клубової кістки або інш.) супроводжується додатковим травмуванням та болісністю. Заміна клітин кісткового мозку людини на клітини тварин (щура) була апробована нами при відпрацюванні методики, а результати викладено у заявці на патент.

Перед оперативним втручанням пацієнтам визначали МЩКТ поперекового відділу хребта на кістковому денситометрі *Explorer QDR W (Hologic)*. Аналіз результатів проводили за діагностичними критеріями, які розроблені ВООЗ для людей європейської раси [13]: 1) ВМД (англ. – *bone mineral density*) – абсолютний показник (г/см²); 2) Т-критерій (стандартне відхилення вище та нижче середнього показника тіка кісткової маси). МЩКТ, що відповідає віковій нормі, має значення Т-критерію > -1,0. Значення Т-критерію від -1,1 до -2,4 характеризують остеопенічні зміни, а Т-критерій < -2,5 свідчить про остеопоротичні порушення кісткової тканини.

Аналізували регенераторний потенціал 10 пацієнтів, вік яких становив від 49 до 73 років. Серед пацієнтів були представлені жінки та чоловіки з показниками МЩКТ, що відповідають нормі (п'ять пацієнтів), та зі зниженою МЩКТ, що характеризують остеопенічні (чотири пацієнта) та остеопоротичні (один пацієнт) порушення. Перелік досліджуваних пацієнтів за віком, статтю та показниками МЩКТ (ВМД, Т-критерій) представлений у табл. 1.

В експерименті *in vitro* були вивчені *дослідні культури*, де СККМ щурів культивували у живильному середовищі ДМЕМ в присутності сироватки крові досліджуваних пацієнтів, та *контрольні культури* СККМ щурів, які культивували у живильному середовищі з використанням стандартної ембріональної сироватки телят. При кожному дослідному та контрольному культивуванні клітин було поставлено 5 паралельних культур. Кількість утворених клітинних колоній та їх цитологічні характеристики у дослідних культурах порівнювалась із показниками контрольної культури. Вважали, що рівна або більша кількість клітинних колоній у дослідних культурах при порівнянні з контролем свідчить про високий регенераторний потенціал пацієнта. Показники кількості колоній у дослідних культурах менші за показники в контрольних групах на 10 % та більше вказують на знижені репаративні потенції пацієнта.

Кров для одержання сироватки відбирали у пацієнтів із вени перед виконанням реконструктивно-відновлювальних втручань, бо в літературі є дані щодо зміни складу сироватки крові стосовно факторів росту та морфогенетичних білків у різні терміни піс-

ля перелому [11]. Перед використанням сироватки крові пацієнтів для культивування клітин її інактивували нагріванням до 56 °С впродовж 30 хв.

Клітини кісткового мозку вилучали із довгих кісток щурів та готували клітини до культивування за спеціальною методикою [10]. Висівали клітини у пластикові флакони для культивування адгезивних культур (Falcon) із розрахунку 5x10⁵ клітин на 1см² і культивували до 7 доби в однакових умовах (температура 37 °С, газова суміш із 5 % вмістом СО₂, вологість 95 %) з додаванням у живильне середовище дослідних та контрольних культур 20 % сироватки крові ембріонів телят та змінюючи живильного середовища через добу і наступні 3 доби.

Під час зміни середовища на 7 добу у **контрольну культуру додавали сироватку крові ембріонів телят, а у дослідну культуру – сироватку крові досліджуваного пацієнта**. Продовжували культивування клітин ще 10 діб, змінюючи через кожні 3 доби живильне середовище з відповідною сироваткою крові.

На 17 добу культивування клітин живильне середовище зливали, клітини у флаконах фіксували 96° етиловим спиртом і фарбували за Романовським-Гімза та досліджували стан культур. Визначали такі показники:

- 1) кількість утворених клітинних колоній у полі зору мікроскопа (збільшення об'єктиву ×4). Аналізували п'ять полів зору у кожному цитологічному препараті. Підраховували крупні колонії (не менше 25 клітин у кожній колонії);
- 2) середню кількість клітин у колонії (збільшення об'єктиву ×20);
- 3) цитологічну характеристику клітин у колоніях – форма клітин та ядра, цілісність клітинної мембрани, стан цитоплазми та ядра (збільшення об'єктиву ×40);
- 4) кількість малодиференційованих і диференційованих клітин у колоніях та за їх межами, а також співвідношення цих клітин (М/Д). Збільшення кількості малодиференційованих клітин у культурах свідчить про затримку процесу їх диференціювання.

Морфологічний аналіз клітин у культурах було проведено за допомогою світлового мікроскопу "Micros-50". Всі цифрові показники були опрацьовані методами варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням прикладного пакету STATISTICA 5.11 for Windows. Статистично значимо вважали різницю при p<0,05.

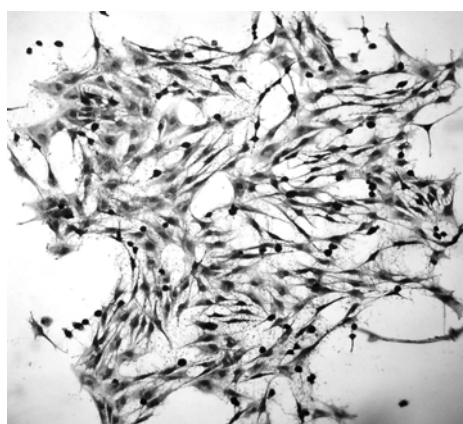
Результати та їх обговорення. Аналіз клітинних культур на 17 добу культивування показав, що як у контролі, так і досліді, спостерігалися різних розмірів колонії кістковомозгових фібробластів. У контрольних та дослідних культурах із сироваткою крові пацієнтів з показниками МЩКТ, що відповідають нормі, клітини були зібрані переважно у крупні колонії, які містили від 30 до 60 клітин (рис. 1). Місцями зустрічались і менші колонії – від 6 до 25 клітин (рис. 2 а, 3 а).

Колонії були представлені клітинами, які відрізнялися за формою, розмірами, ядерно-цитоплазматичним відношенням. Це вказує на те, що клітини у колоніях знаходяться на різних стадіях диференціювання. При цьому у клітинних колоніях різних пацієнтів співвідношення клітин за відміченими вище показниками коливалось.

Таблиця 1. Показники мінеральної щільності кісткової тканини та кількісні дані, що характеризують стан культивованих СККМ пацієнтів

№ п/п	Пацієнт	Вік, роки	Стать	BMD, г/см ²	T-критерій	Оцінка МЩКТ	Характеристика клітинної культури (n=5)				
							кількість колоній	кількість клітин у великих колоніях	кількість мало-диференційованих (М) клітин у колоніях	кількість диференційованих (Δ) клітин у колоніях	кф співвідношення М/Δ клітин
1	Пацієнтка Г.	59	ж	1,088	1,0	Норма	12,2±1,2	40,1±2,7	16,7±1,2	24,1±1,5	0,69
2	Пацієнтка Л.	50	ж	1,143	0,9		13,3±1,4	41,7±3,4	16,7±1,3	24,6±1,6	0,68
3	Пацієнтка С.	65	ж	1,075	0,5		13,7±1,4	37,8±2,6	14,8±0,9	23,0±1,4	0,64
4	Пацієнт С.	56	ч	1,059	-0,3		13,1±1,2	39,8±1,9	15,2±1,1	24,6±1,6	0,62
5	Пацієнтка К.	56	ж	0,953	-0,9		12,9±1,3	41,8±2,5	16,1±1,3	25,8±1,7	0,62
6	Пацієнтка К.	49	ж	0,923	-1,1	Остеопенія	I ст. 10,2±0,8 <i>P</i>	34,7±2,5 <i>P</i>	18,1±1,4	16,6±1,3 <i>P</i>	1,09
7	Пацієнтка П.	66	ж	0,844	-1,8		II ст. 9,7±0,9 <i>P, P1</i>	30,2±2,1 <i>P, P1</i>	19,9±1,4 <i>P1</i>	10,3±1,1 <i>P, P1</i>	1,93
8	Пацієнт Х.	64	ч	0,857	-2,1		III ст. 8,7±0,6 <i>P, P1</i>	30,7±1,8 <i>P, P1</i>	19,4±1,3 <i>P1</i>	11,3±0,8 <i>P, P1</i>	1,72
9	Пацієнт Л.	73	ч	0,823	-2,4		8,2±0,7 <i>P, P1</i>	29,1±1,6 <i>P, P1</i>	20,9±1,5 <i>P1</i>	8,9±0,5 <i>P, P1</i>	2,3
10	Пацієнт І.	62	ж	0,655	-3,6	Остеопороз	9,1±0,8 <i>P, P1</i>	29,8±2,1 <i>P, P1</i>	20,2±1,4 <i>P1</i>	9,0±1,1 <i>P, P1</i>	2,2
Контрольна культура СККМ							14,5±1,3	44,6±3,2	16,1±1,2	27,4±2,1	0,59

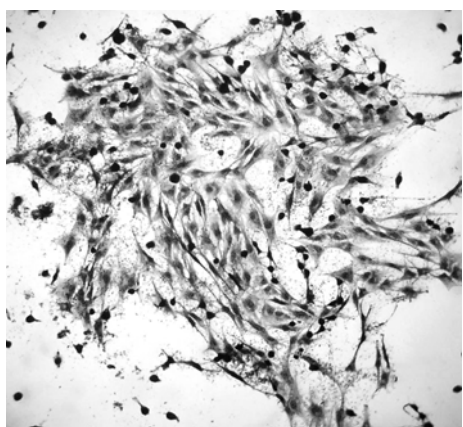
Примітки: P – статистично значима різниця при порівнянні з показниками контрольної культури; P1 – статистично значима різниця при порівнянні з показниками культур пацієнтів із показниками норми МЩКТ.



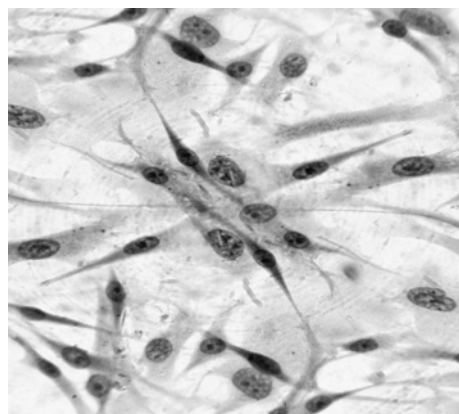
а



а



б



б

Рис. 1. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ. Крупні колонії: а) контрольна культура – клітини, культивовані з ембріональною сироваткою телят; б) дослідна культура – клітини, культивовані з сироваткою крові пацієнтки Л. (T-критерій = 0,9, МЩКТ відповідає нормі). Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 100.

Рис. 2. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ з сироваткою крові пацієнтки К. (T-критерій = -1,1, МЩКТ відповідає остеопенії I ст.): а) колонії різних розмірів. Зб. 100; б) диференційовані кісткомозгові фібробласти видовженої форми з овальними щільними ядрами та ядерцями. Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 400.

Частина клітин у колоніях та за їх межами мали виражено витягнуту форму з довгими відростками, за допомогою котрих клітини контактували між собою. Центральні розташовані ядра таких клітин були невеликих розмірів, переважно овальної форми зі щільним (гетеро-) хроматином. У ядрі визначали одне або два щільних ядерця (рис. 2). Такі клітини ми відносили до диференційованих, це – типові кістковомозкові фібробласти.

Інша частина клітин у колоніях мала полігональну форму (ромбоподібну, овальну, трикутну та інші). Ядра таких клітин також розташовувались центрально, були крупними, переважно округлими з еухроматином. У ядрах цих клітин відмічали декілька щільних ядерць. Такі клітини ми відносили до клітин, що диференціюються (малодиференційовані клітини) (рис. 3).

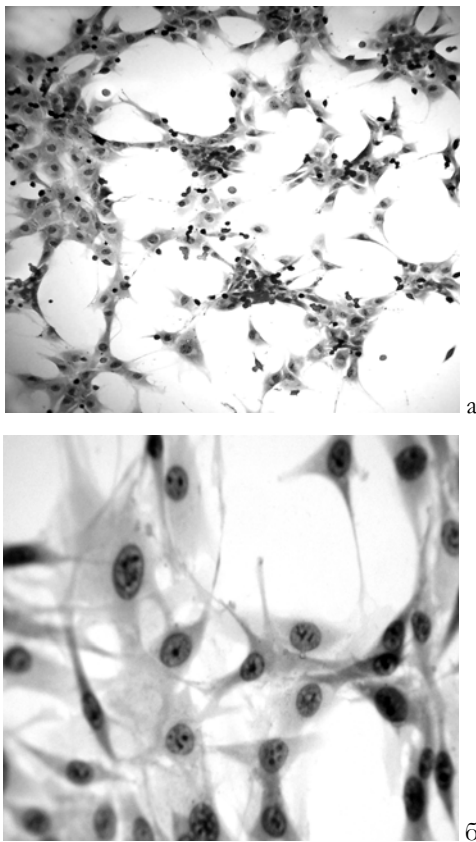


Рис. 3. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ з сироваткою крові пацієнта Х. (Т-критерій = -2,1, МЩКТ відповідає остеопенії ІІІ ст.): а) колонії невеликих розмірів. Зб.100; б) малодиференційовані клітини полігональної форми з крупним округлим ядром та ядерцями. Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 400.

У контрольних і дослідних культурах спостерігались поодинокі клітини з пікнотичними ядрами або вакуолізованою цитоплазмою, проте кількість таких клітин не була значною і їх кількість у досліді не відрізнялась від контролю. В табл. 1 представлені зведені результати аналізу кількісних характеристик контрольної та дослідних культур.

Аналіз кількісних характеристик клітинних культур виконано в залежності від показників МЩКТ пацієнта (норма та остеопенічні зміни), а також враховуючи вік пацієнта.

При визначенні кількості та розмірів колоній у культурах було встановлено, що у контрольній куль-

турі переважали крупні колонії. Середні значення їх кількості у полі зору мікроскопа становили $14,5 \pm 1,3$ колоній.

При порівнянні кількості колоній, клітин у крупних колоніях, кількості малодиференційованих та диференційованих клітин і показника співвідношення цих клітин у контрольній культурі та дослідних культурах з сироваткою крові пацієнтів, у яких МЩКТ відповідає нормі, не було відмічено вірогідних відмінностей для жодного з цих показників (див. табл. 1). Такий результат дозволяє стверджувати, що регенераторний потенціал пацієнтів даної групи є високим.

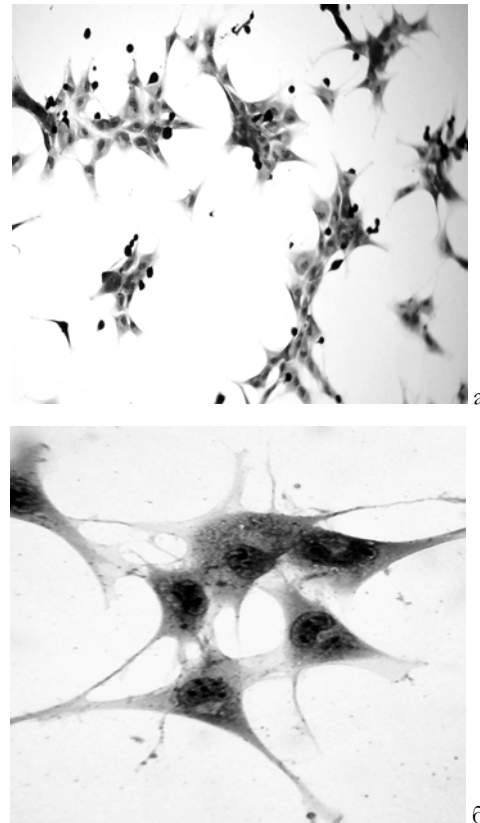


Рис. 4. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ з сироваткою крові пацієнта Л. (Т-критерій = -2,4, МЩКТ відповідає остеопенії ІІІ ст.). Дрібні клітинні колонії з переважно малодиференційованими клітинами. Забарвлення за Романовським-Гімза: а) зб. 100; б) зб. 400.

Пацієнти зі знизженими показниками МЩКТ мали різну вираженість остеопенічних та остеопоротичних порушень (Т-критерій від -1,1 до -3,6) та належали до різних вікових груп (від 49 до 73 років). При аналізі кількісних характеристик дослідних культур, культивованих із сироваткою крові пацієнтів даної групи, були зафіксовані відмінності як від контрольних культур, так і від дослідних культур пацієнтів зі значеннями МЩКТ, що відповідають нормі. У культурах клітин із сироваткою крові пацієнтів із вираженим знизженням МЩКТ та старших за віком (Т-критерій: -1,8 (66 р.), -2,1 (64 р.), -2,4 (73 р.), -3,6 (63 р.) зафіксовані вірогідні відмінності за всіма показниками, що досліджувались. Так, кількість крупних клітинних колоній була вірогідно меншою в 1,49; 1,77; 1,67 та 1,59 разів (відповідно до вказаних значень Т-критерію) при порівнянні з даним показником в контрольній культурі. Відповідно меншою по відно-

пенню до контрольних культур була у пацієнтів даної групи і кількість клітин у колоніях – у 1,47; 1,45; 1,49 та 1,53 разів (див. табл. 1). Також встановлена вірогідна різниця і в кількості диференційованих клітин та у співвідношенні малодиференційованих клітин до диференційованих (М/Д). Так, кількість диференційованих клітин була меншою порівняно з контролем у 2,67; 2,42; 3,07 та 3,73 разів, а співвідношення М/Д клітин – було більшим у 3,27; 2,91; 3,89 та 3,72 разів, відповідно.

Подібні, проте менш виражені, відмінності за досліджуваними показниками стану культур були вста-

Таблиця 2. Вірогідні відмінності досліджуваних показників стану культур пацієнтів із остеопенією (Т-критерій < -1,0) по відношенню до показників стану культур пацієнтів із МЩКТ, що відповідає нормі (Т-критерій > -1,0)

№ п/п	Характеристика клітинної культури	МЩКТ пацієнтів за Т-критерієм				
		-1,1	-1,8	-2,1	-2,4	-3,6
1	Кількість колоній клітин	відсутні	↓ (1,38)	↓ (1,63)	↓ (1,54)	↓ (1,47)
2	Кількість клітин у великих колоніях	відсутні	↓ (1,5)	↓ (1,32)	↓ (1,34)	↓ (1,36)
3	Кількість диференційованих (Δ) клітин у колоніях	↓ (1,45)	↓↓ (2,41)	↓↓ (2,20)	↓↓ (2,71)	↓↓ (2,68)
4	Кф співвідношення М/Д клітин	↓ (1,68)	↓↓ (2,97)	↓↓ (2,97)	↓↓↓ (3,54)	↓↓↓ (3,38)

Порівняння одержаних результатів у контролі та у дослідних культурах пацієнтів з різними значеннями МЩКТ, дають підставу для припущення про негативну дію остеопенічних та остеопоротичних порушень у кістковій тканині досліджуваних пацієнтів на складові характеристики їхньої сироватки крові, що опосередковано впливає на стан СККМ, культивованих з цієї сироваткою крові.

Найбільш виражені зміни у стані культур спостерігаються при поєднанні зниження МЩКТ та вікових змін. Так, найменші показники кількості клітинних колоній, клітин у колоніях та високі значення співвідношення малодиференційованих клітин до диференційованих спостерігались у найстаршого пацієнта (73 р.) з низькими показниками МЩКТ (BMD=0,648 г/см², Т-критерій = -2,4).

При порівнянні показників, що характеризують стан клітинних колоній, у пацієнтів однакового віку 64 та 62 р., але з різними значеннями МЩКТ (Т-критерій = -2,1 та -3,6) встановлено, що у пацієнта з більш вираженими зниженням МЩКТ (Т-критерій = -3,6) індекс співвідношення клітин був вищим при порівнянні з показниками, що характеризують культуру клітин пацієнта з менш вираженими остеопенічними змінами у кістковій тканині (Т-критерій = -2,1) (див. табл. 1). Підвищення показників співвідношення малодиференційованих клітин до диференційованих у культурах пацієнтів старшого віку зі зниженими значеннями МЩКТ свідчить про гальмування у клітин потенцій до диференціювання. Про подібні дані повідомляли В.І. Березовская (1998) та Н.В. Родінова (2006) при вивченні культивованих СККМ щурів при опорному розвантаженні їх задніх кінцівок, тобто в умовах розвитку остеопенічних порушень [1, 9].

Відомо, що зниження МЩКТ може бути пов'язаним із різними причинами (медикаментозна терапія кортикостероїдами або цитостатиками, порушення ендокринного балансу організму, супутні захворювання, дія небезпечних екологічних факторів та інш.) [3]. Такий комплекс ймовірних причин може чинити негативну дію на склад сироватки крові людини, що опосередковано підтверджується виконаними нами дослідженнями, а також результатами досліджень Е.Г. Петренко (2007), яка встановила, що з віком у жінок змінюється склад сироватки крові за

новлені і при порівняльному аналізі культивованих клітин з сироваткою крові пацієнтів із остеопенічними та остеопоротичними змінами по відношенню до пацієнтів зі значеннями МЩКТ, що відповідають нормі. У пацієнтів зі значним зниженням МЩКТ (Т=-2,1 та Т=-3,6) спостерігалась переважно дрібні клітинні колонії (рис. 4), значне зниження кількості клітинних колоній (в середньому більш, ніж на 30 %) та підвищення співвідношення кількості малодиференційованих клітин до диференційованих (табл. 1, 2), що свідчить про низький регенераторний потенціал пацієнтів даної групи.

фракційним складом глікозаміногліканів, білків та ліпопротеїдів [7]. На культурі СККМ щурів було доведено, що остеопенічні порушення кісткової тканини (змодельована гіпокінезія) призводять до зниження (при порівнянні з контрольною культурою) кількості клітинних колоній та клітин у колоніях [8].

У нашому дослідженні ми одержали аналогічні результати: саме у культурах клітин, культивованих з сироваткою крові пацієнтів з остеопенічними змінами, спостерігалось не тільки зменшення кількості колоній, але й зменшення загальної кількості клітин у колоніях та збільшення кількості малодиференційованих клітин при порівнянні з контрольними культурами. Це може свідчити про зниження остеорепаративних потенцій сироватки крові таких пацієнтів.

Це підтверджується даними R.O. Oreffo (1997), який у дослідженнях щодо модуляції остеогенезу сироваткою корови людини у культурі клітин кісткової мозку показав, що сироватка крові людини має у своєму складі фактори, котрі виявляють ключову дію на диференціювання клітин кісткової мозку у остеогенному напрямку [19]. G. Zimmermann et al. (2009) було встановлено, що у пацієнтів з переломами кісток, особливо з уповільненим згоєнням, рівень ТФР-β1, КМБ-2 та КМБ-4 у сироватці крові були вірогідно нижчими за їх рівень у пацієнтів контрольної групи [11]. У науковій літературі є дані про те, що не тільки місцеве вивільнення факторів росту у ділянці перелому, але й системна реакція необхідна для запуску і нормального перебігу репаративного процесу у кістці [17, 21, 23]. При вивченні перебігу остеорепарації в експериментах на щурах (в умовах оваріоектомії) було також показано, що недостатнє системне забезпечення факторами росту призводить до втрати кісткової тканини і уповільнення диференціації остеобластів [16, 18].

Нами була зроблена спроба оцінити в даній вибірці пацієнтів силу кореляційного зв'язку між віком, МЩКТ та всіма характеристиками стану досліджених культур. Результати кореляційного аналізу не виявили статистично значимого взаємозв'язку між віком пацієнтів і показником BMD ($r = -0,47$; $s_r = 0,31$; $t_{\text{факт}} = 1,5$; $t_{\text{табл}} = 2,3$) та між віком і кількістю колоній в культурі СККМ ($r = -0,52$; $s_r = 0,30$; $t_{\text{факт}} = 1,7$; $t_{\text{табл}} = 2,3$). Ймовірно, отриманий результат обумовлений

вузькими віковими межами даної вибірки (від 47 до 73 років) та невеликою кількістю пацієнтів (n=10). Водночас спостерігається статистично значимий кореляційний зв'язок між показником ВМД та характеристиками стану досліджуваних культур, а саме: кількістю клітинних колоній ($r = 0,85$; $s_r = 0,19$; $t_{\text{факт}} = 4,5$; $t_{\text{табл}} = 2,3$); кількістю клітин у великих колоніях ($r = 0,86$; $s_r = 0,18$; $t_{\text{факт}} = 4,8$; $t_{\text{табл}} = 2,3$); співвідношенням кількості малодиференційованих клітин до диференційованих (М/Д) ($r = -0,89$; $s_r = 0,16$; $t_{\text{факт}} = 5,6$; $t_{\text{табл}} = 2,3$). Це підтверджує наше припущення про залежність мінеральної щільності кісткової тканини та складу сироватки крові пацієнтів в опосередкований дії на регенераторний потенціал.

Виконане дослідження щодо визначення взаємозв'язку регенераторного потенціалу пацієнтів з показниками МПЦКТ показало, що у культурах СККМ, культивованих із сироваткою крові пацієнтів спостерігається різна кількість клітинних колоній та клітин в них залежно від значень МПЦКТ. Зниження показників МПЦКТ у досліджених пацієнтів супроводжується у культурі СККМ зменшенням кількості клітинних колоній та клітин у колоніях, а також збільшенням співвідношення малодиференційованих клітин до диференційованих. Одержані дані можуть свідчити про зміну у цих пацієнтів складу сироватки крові, а саме зниження вмісту компонентів, котрі впливають на остеогенні потенції організму – факторів росту, морфогенетичних білків та інш., і, як наслідок, ця сироватка справляє «негативну» дію на проліферацію та диференціацію культивованих СККМ та досліджувані показники стану культур.

Висновок: Стан якості кістки, зокрема, МПЦКТ, опосередковано через склад сироватки крові пацієнтів пов'язана з регенераторним потенціалом людини. Проте незначна кількість досліджених пацієнтів не дозволяє з вірогідністю стверджувати про негативний вплив низької МПЦКТ на остеорепаративний потенціал людини.

В перспективі потрібні подальші дослідження з більшою кількістю пацієнтів – жінок та чоловіків, різного віку та з різними показниками МПЦКТ, для обґрунтування можливості використання даного методу в прогнозуванні остеорепаративного потенціалу.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Березовская В.П. Влияние микрогравитации на остеогенных клеток *in vitro*. Ультраструктурные исследования / В.П. Березовская, Н.В. Родионова // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 4. – С.3-8.
2. Дедух Н.В. Остеоинтеграция кісткової тканини з титановими імплантатами / Н.В. Дедух, С.В. Малишкіна // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2010. – № 1. – С. 45-49.
3. Корж Н.А. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение / Н.А.Корж, В.В.Поворознюк, Н.В.Дедух, И.А.Зупанец. – Харьков: Золотые страницы, 2002. – 646 с.
4. Мироманов А.М. Способ прогнозирования нарушения регенерации костной ткани при переломах длинных костей конечностей в послеоперационном периоде / А.М. Мироманов, С.А. Усков // Генний ортопедии. – 2011. – № 4. – С. 26-30.
5. Пат. SU 1103851 А, МПК А 61/В 10/00. Способ прогнозирования течения регенерации костной ткани при distractionном остеосинтезе / Гюльназарова С.В., Никитенко Е.Т., Гольдберг С.И.; заявитель Свердловский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии. – № 3523141/28-13; заявл. 16.09.1982; опубл. 23.07.1984, Бюл. № 27.
6. Пат. SU 1176207 А, МПК G01N 1/28, А 61/В 10/00.

Способ определения интенсивности костеобразования / Илизаров Г.А., Паличенко Л.А., Шрейнер А.А.; заявитель Курганский научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической ортопедии и травматологии. – № 3597013/28-14; заявл. 27.05.1983; опубл. 30.08.1985, Бюл. № 32.

7. Петренко Е.Г. Оценка биологического возраста человека на основе анализа динамики содержания биополимеров в коже и сыворотке крови : автореф. дис. на стиск. науч. степ. канд. биол. наук : спец. 03.00.04 «Биохимия» / Е.Г. Петренко. – М., 2007. – 24 с.
8. Родионова Н.В. Особенности колониеобразования та дифференцирования стромальных клітин кісткового мозку шурів за умов *in vitro* при модельованій гіпокінезії / Н.В. Родионова, О.М. Нестеренко, Н.В. Дзюбенко // Укр. морфологічний альманах. – 2010. – Т.8, № 3. – С. 122-124.
9. Родионова Н.В. Цитологічні механізми перебувань у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації. – К.: Наукова думка, 2006. – 236 с.
10. Технології виділення клітин строми кісткового мозку людини, розмноження *in vitro* та індукція в нервові клітини та остеобласти : методичні рекомендації / [О.А. Щегельська, Ю.Ю. Микунинський, О.А. Омельченко та ін.]. – Харків, 2004. – 16 с.
11. Трансформирующий фактор роста (ТФР)-β1 как маркер замедленного сращения переломов / G. Zimmermann, P. Henle, M. Kusswetter [et al.], пер. с нем. М.Г. Романюка // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2009. – № 1. – С. 57-65.
12. Экспериментальное исследование процессов остеointеграции имплантатов для наружного чрескостного остеосинтеза с различными биоконпозиционными покрытиями / О.В. Бейдик, К.Г. Бутовский, В.Н. Ляшников [и др.] // Генний ортопедии. – 2002. – № 4. – С. 80-88.
13. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. – Geneva: World Health Organization, 1994. – WHO Technical Report Series, No. 843.
14. Baylink D.J. Growth factors to stimulate bone formation / D.J. Baylink, R.D. Finkelman, S. Mohan // J. Bone Miner. Res. – 1993. – Suppl. 2. – P. 565-572.
15. Biological and biomechanical evaluation of interface reaction at conical screw-type implants / A. Büchter, U. Joos, H. Wiesmann [et al.] // Head & Face Medicine. – 2006. – Vol. 2, № 5. – P. 1-9.
16. Early period of fracture healing in ovariectomized rats / S.W. Xu, R.Yu, G.F. Zhao, J.W. Wang // Chin. J. Traumatol. – 2003. – Vol. 6. – P. 160-166.
17. Groeneveld E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration / E.H. Groeneveld, E.H. Burger // Eur. J. Endocrinol. – 2000. – Vol. 142. – P. 9-21.
18. Manolagas S.C. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis / S.C. Manolagas, R.L. Jilka // N. Engl. J. Med. – 1995. – Vol. 332. – P. 305-311.
19. Oreffo R.O. Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures / R.O. Oreffo, A.S. Virdi, J.T. Triffitt // Eur. J. Cell Biol. – 1997. – Vol. 74. – P. 251-261.
20. Recombinant TGF-beta1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice / D. Gazit, Y. Zilberman, G. Turgeman [et al.] // J. Cell Biochem. – 1999. – Vol. 73. – P. 379-389.
21. Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis / D. Gazit, M. Karmish, L. Holzman, I. Bab // Endocrinology. – 1990. – Vol. 126. – P. 2607-2613.
22. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration: distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing / S. Weiss, G. Zimmermann, R. Baumgart [et al.] // Bone. – 2005. – Vol. 37, № 6. – P. 781-790.
23. The osteogenic response to distant skeletal injury / T.A. Einhorn, G. Simon, V.J. Devlin [et al.] // J. Bone Joint Surg. – 1990. – Vol. 72-A, № 9. – P. 1374-1378.

Надійшла: 07.09.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін