УДК: 576.8 : 611.018.46-092.4 : 616.71-008.817-07
© Побєл Є.А., Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Вишнякова І.В., 2013

ВИЗНАЧЕННЯ IN VITRO ОСТЕОРЕПАРАТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПАЦІЄНТІВ З ПЕРЕЛОМАМИ ДОВГИХ КІСТОК

Побєл Є.А., Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Вишнякова І.В.

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

Побєл Є.А., Малишкіна С.В., Нікольченко О.А., Вишнякова І.В. Визначення in vitro остеорепаративного потенціалу пацієнтів з переломами довгих кісток // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 80-86.

Оцінювали in vitro остеорепаративний потенціал 10 пацієнтів з переломами довгих кісток шляхом визначення кількості сформованих колоній фібробластів та кількості клітин у колоніях в умовах культивування стромальних клітин кісткового мозку (СККМ) щурів у живильному середовищі DMEM з сироваткою крові досліджуваних пацієнтів. Порівнювали кількісні показники дослідних культур з контрольною культурою, в якій використовували стандартну телячу ембріональну сироватку крові. Встановлено, що в дослідних культурах спостерігалась різна кількість клітинних колоній та клітин в них залежно від значень мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) та давності перелому. Зниження показників МЩКТ у досліджених пацієнтів та збільшення терміну від моменту травми супроводжувались у культурах СККМ зменшенням кількості клітинних колоній та клітин у них. Найменші показники остеорепаративного потенціалу спостерігались у пацієнтів з тривалими термінами незрощення перелому.

Ключові слова: культура стромальних клітин кісткового мозку щура, сироватка крові пацієнтів, мінеральна щільність кісткової тканини, переломи кісток.

Побєл Е.А., Малышкина С.В., Никольченко О.А., Вишнякова И.В. Определение in vitro остеорепаративного потенциала пациентов с переломами длинных костей // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 82-86.

Оценивали in vitro остеорепаративный потенциал 10 пациентов с переломами длинных костей путем определения количества сформировавшихся колоний фибробластов и количества клеток в колониях при культивировании стромальных клеток костного мозга (СККМ) крыс в питательной среде DMEM с сывороткой крови исследуемых пациентов. Сравнивали количественные показатели опытных культур с контрольной культурой, в которой использовали стандартную эмбриональную телячью сыворотку крови. Установлено, что в опытных культурах наблюдалось различное количество клеточных колоний и клеток в них в зависимости от значений минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и давности перелома. Снижение показателей МПКТ у исследованных пациентов и увеличение времени с момента травмы сопровождались в культурах СККМ уменьшением количества колоний и клеток в них. Самые низкие показатели остеорепаративного потенциала наблюдались у пациентов с длительными сроками несращения перелома.

Ключевые слова: культура стромальных клеток костного мозга крысы, сыворотка крови пациентов, минеральная плотность костной ткани, переломы костей.

Pobel Ye.A., Malyshkina S.V., Nikolchenko O.A., Vyshnyakova I.V. In vitro determination of osteoreparative potential of patients with long bone fractures // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 82-86.

The osteoreparative potential in 10 patients with long bone fractures was evaluated in vitro by determine the cytological characteristics of the cells, and the numbers of cell colonies and cells in colony after cultivating the rat bone marrow stromal cells (BMSCs) in the growth medium DMEM with added the blood serum of patients. The quantitative data were compared between experimental cultures and control culture with added the standard fetal calf serum. It was found that a various number of cell colonies and cells in them were observed in the experimental cultures depending on numerical value of bone mineral density (BMD) and period of time after fracture in the patient. The decrease of the BMD and increase of the time period after bone injuries in the patients were accompanied by a decrease the numbers of cell colonies and cells in them in BMSCs cultures. The lowest rates of the osteoreparative potential were observed in patients with long period of nonunion fracture.

Key words: culture of rat bone marrow stromal cells, blood serum of patient, bone mineral density, long bone fracture.

Вступ. Незважаючи на те, що при репаративному остеогенезі існують всі біологічні передумови до нормального загоєння перелому, відсоток уповільненого зрощення та різних ускладнень після травматичних ушкоджень довгих кісток до теперішнього часу залишається доволі високим – 10-15 % [3]. В структурі причин виходу пацієнтів на інвалідність серед всіх видів ушкоджень опорно-рухової системи на несправжні суглоби та незрощення переломів довгих кісток припадає 25,2 % [2]. Визначення остеорепаративного потенціалу у пацієнтів перед виконанням хірургічних втручань дозволило б, у разі необхідності, застосувати методи стимуляції остеорепарації у ранньому післяопераційному періоді для створення оптимальних умов для перебігу репаративного остеогенезу. У зв'язку з цим, прогнозування перебігу та результатів післяопераційного відновлення кісток є актуальним питанням в ортопедії і травматології для розробки тактики лікування пацієнтів.

Остеорепаративний потенціал пацієнтів з переломами кісток та незрощеннями вивчають різними методами. У літературі представлені роботи, в яких з цією метою оцінюють здатність до клонування культивованих стромальних клітин кісткового мозку (СККМ) чи досліджують окремі компоненти сироватки крові пацієнтів [4, 5, 6]. Визначення компонентів сироватки крові обумовлено результатами досліджень, які довели, що не тільки місцеве вивільнення факторів росту у ділянці перелому, але і системна реакція організму необхідна для запуску місцевої реакції [15, 18, 19, 23]. У разі недостатнього системного забезпечення факторами росту відбувається втрата кісткової тканини, зменшення диференціації остеобластів [14, 16]. Саме сироватка крові забезпечує системну регуляцію репаративного остеогенезу, тому що в ній присутні різні біологічно активні речовини (гормони, фактори росту, цитокіни та ін.), які здатні регулювати проліферацію, ріст, остеогенну диференціацію клітин-попередників кісткового мозку, а отже, позитивно впливати на перебіг регенерації

кістки [11, 12, 20]. В експериментах на тваринах при дослідженні процесу остеорепарації після моделювання остеотомій довгих кісток було зафіксовано одночасне місцеве та системне підвищення рівня факторів росту, яке свідчить, що локальні концентрації факторів росту відбиваються у циркулюючій крові [13].

Мета дослідження – визначити остеорепаративний потенціал пацієнтів з переломами довгих кісток, оцінити його взаємозв'язок із давністю перелому та мінеральною щільністю кісткової тканини.

Матеріал та методи дослідження. Остеорепаративний потенціал пацієнтів з переломами довгих кісток, які потребували реконструктивно-відновлювального хірургічного втручання, 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, насамперед від якості сироватки крові, яка є компонентом живильного середовища.

Перед хірургічним втручанням пацієнтам визначали мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) поперекового відділу хребта на остеоденситометрі *Explorer QDR W (Hologic)*. Оцінку результатів цього дослідження проводили за показником BMD (*англ. – bone mineral density*), а також Z-критерієм (стандартне відхилення від середнього показника вікової норми) та Т-критерієм (стандартне відхилення від середнього показника піка кісткової маси), які характеризують стан кісткової тканини пацієнта як референтна вікова норма (> -1,0 SD), або остеопенічні зміни (від -1,1 до -2,4 SD), або остеопоротичні порушення (< -2,5 SD).

Проведено визначення остеорепаративного потенціалу 10 пацієнтів, вік яких становив від 18 до 57 років, тривалість післятравматичного періоду – від 7 діб до 23 місяців (таблиця). Серед пацієнтів були представлені жінки та чоловіки з показниками МЩКТ, що відповідають нормі (чотири пацієнти), та зі зниженою МЩКТ, що характеризують остеопенічні та остеопоротичні порушення (шість пацієнтів).

Матеріалом для дослідження служили культури СККМ молодих (3-4-місячних) щурів із додаванням у живильне середовище сироватки крові пацієнтів. СККМ 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 патенті [7].

Кров для одержання сироватки відбирали у пацієнтів із вени перед виконанням реконструктивно-відновлювальних втручань (зранку, натще), що було обумовлено даними літератури про зміни складу сироватки крові щодо вмісту факторів росту та морфогенетичних білків у різні терміни після перелому [11].

Клітини кісткового мозку вилучали із довгих кісток щурів та готували їх до культивування за спеціальною методикою [10]. Висівали клітини у пластикові флакони для культивування адгезивних культур (Falcon) із розрахунку $5x10^5$ клітин на 1 $см^2$ і культивували **до 7 доби** в однакових умовах (температура 37°С, газова суміш із 5 % вмістом CO_2, вологість 95 %) з додаванням у живильне середовище *DMEM* стандартної сироватки крові ембріонів телят (20 %) та зміною живильного середовища через добу і наступні 3 доби (і для дослідних, і для контрольних культур СККМ).

Під час зміни середовища **на 7 добу** *у контрольну культуру СККМ* додавали стандартну сироватку крові ембріонів телят**,** а *у дослідну культуру СККМ* – сироватку крові досліджуваного пацієнта. Продовжували культивування клітин ще 10 діб, змінюючи через кожні 3 доби живильне середовище з відповідною сироваткою крові. При кожному дослідному та контрольному культивуванні клітин було поставлено 5 паралельних культур.

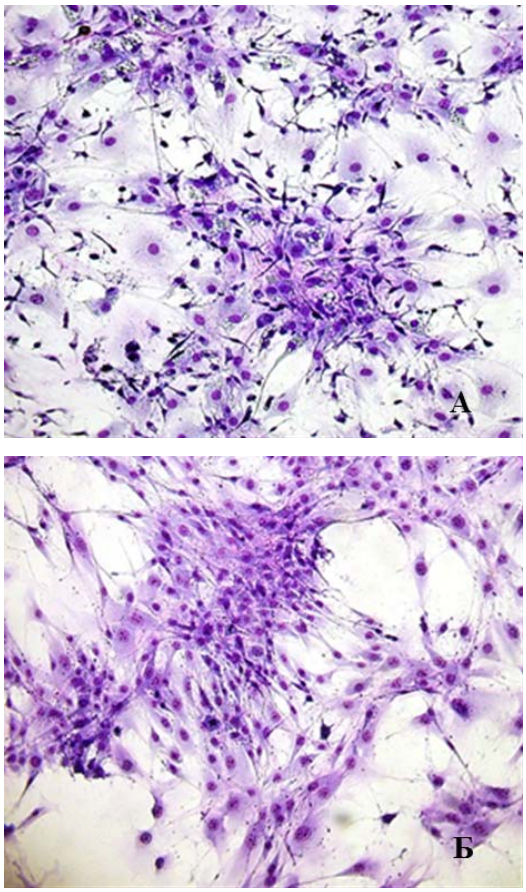

Рис. 1. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ. Крупні колонії клітин: а) контрольна культура, культивована з ембріональною сироваткою крові телят; б) дослідна культура, культивована з сироваткою крові пацієнтки Д. (Z-критерій = 0,2; МЩКТ відповідає нормі; 17 діб після травми). Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 100.

На 17 добу культивування клітин живильне середовище зливали, клітини у флаконах фіксували 96° етиловим спиртом, фарбували за Романовським-Гімза та проводили цитологічний аналіз стану культур за допомогою світлового мікроскопу

"Micros-50". Визначали кількість утворених клітинних колоній у препараті (збільшення об'єктиву ×4). У крупних колоніях (не менше 20 клітин у кожній колонії) підраховували кількість клітин (збільшення об'єктиву ×20). Вивчали цитологічну характеристику клітин у колоніях: форма клітин та ядра, щільність клітинної мембрани, стан цитоплазми та ядра (збільшення об'єктиву ×40). Кількість утворених клітинних колоній та їх цитологічні характеристики у дослідних культурах порівнювали із показниками контрольної культури. Вважали, що рівна або більша кількість клітинних колоній у дослідних культурах порівняно з контролем свідчить про високий остеорепаративний потенціал пацієнта. Показники кількості колоній у дослідних культурах менші, більш ніж на 10 %, відносно контролю вказують на знижений остеорепаративний потенціал. Всі цифрові показники були опрацьовані методами варіаційної статистики. Відмінності даних між парними вибірками оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати вважали статистично значущими за умови, що $P<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Через 17 діб культивування у контрольній і дослідних культурах спостерігалися колонії кістковомозкових фібробластів, які мали різні розміри. У контрольній та дослідних культурах із сироваткою крові пацієнтів з показниками МЩКТ, що відповідають нормі, клітини були зібрані переважно у крупні колонії, які містили від 20 до 50 клітин (рис. 1). Місцями зустрічались і менші колонії – від 7 до 18 клітин. У контрольній культурі кількість колоній становила 13,21±0,68, у дослідних культурах – їх кількість коливалась від поодиноких колоній до 15 у препараті.

В таблиці представлені зведені результати аналізу кількісних характеристик дослідних та контрольної культур. Аналіз кількісних характеристик виконано в залежності від показників МЩКТ пацієнта (норма та остеопенічні і остеопоротичні зміни), а також враховуючи період часу після перелому (давність травми).

При порівнянні кількості колоній у культурах не було встановлено статистично значущої різниці між показниками контролю та дослідними культурами, в яких використовували сироватку крові двох пацієнтів з нормальною МЩКТ (Z-критерій = -0,7 та 0,2) та невеликою давністю перелому (7 та 17 діб, відповідно).

Водночас у двох інших пацієнтів з нормальними значеннями МЩКТ (Z-критерій = -0,3 та -0,5), але збільшеними термінами післятравматичного періоду (давність 4 та 4,5 міс, відповідно), спостерігались статистично значущі відмінності, а саме менша на 20,4 та 16,4 % кількість колоній у дослідних культурах порівняно з контролем, що свідчить про знижений остеорепаративний потенціал цих пацієнтів (див. табл.). Одержані результати вказують на те, що у пацієнтів з нормальними показниками МЩКТ остеорепаративний потенціал виявляє залежність від давності перелому, а отже, терміни незрощення кісток впливають на склад сироватки крові. Ці результати узгоджуються з даними літератури про те, що у сироватці крові пацієнтів з різними термінами уповільненого загоєння перелому (4 та 7 міс) концентрація кісткового морфогенетичного білка була меншою саме у пацієнтів із більшим терміном незрощення [15].

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

№ п/п	Пацієнт	Вік, роки	Стать	Давність перелому	Показники остеоденситометричного обстеження			Досліджувані показники культури СККМ (M±m, n=5)	
					BMD, г/см²	Z- (T-) критерії, SD	Оцінка МЩКТ	кількість колоній	кількість клітин у колоніях
1	Пацієнтка Д.	21	Ж	17 діб	1,074	0,2	**Норма**	11,84±0,78	45,36±1,65
2	Пацієнт Д.	40	М	7 діб	0,997	-0,7 (-0,9)		12,51±0,81	40,75±1,16
3	Пацієнт С.	30	М	4 міс	1,054	-0,3 (-0,3)		10,52±0,82 *P<0,05*	35,31±1,36 *P<0,01*
4	Пацієнтка К.	34	Ж	4,5 міс	0,983	-0,5 (-0,6)		11,04±0,69 *P<0,05*	37,45±1,45 *P<0,05*
5	Пацієнтка Б.	42	Ж	4 міс	0,867	-1,3 (-1,6)	**Остеопенія**	11,95±0,71 *P<0,05*	35,41±1,23 *P<0,01*
6	Пацієнт Ш.	30	М	17 міс	0,863	-2,1 (-2,1)		5,15±0,54 *P<0,001*	30,55±1,26 *P<0,001*
7	Пацієнт Ш.	35	М	14 міс	0,830	-2,4 (-2,4)		7,45±0,53 *P<0,001*	32,25±1,47 *P<0,01*
8	Пацієнт Т.	18	М	17 міс	0,792	-2,4		6,55±0,56 *P<0,001*	33,65±1,21 *P<0,01*
9	Пацієнт Г.	57	М	23 міс	0,751	2,3 (-2,9)	**Остеопороз**	3,41±0,39 *P<0,001*	26,65±1,54 *P<0,001*
10	Пацієнт Л.	43	М	20 міс	0,751	-2,9 (-3,1)		3,95±0,37 *P<0,001*	23,25±0,98 *P<0,001*
Контрольна культура СККМ								**13,21±0,68**	**42,95±2,16**

Примітка. P – статистично значуща різниця з показником контрольної культури.

У пацієнтів зі зниженими показниками МЩКТ, які трактують як остеопенічні та остеопоротичні, та збільшеними термінами у від моменту перелому спостерігалась значно менша кількість клітинних коло-

ній у дослідних культурах СККМ, культивованих з сироваткою крові цих пацієнтів. Так, у дослідних культурах із сироваткою крові пацієнтів, у яких значення Z- або T-критерію та терміни незрощення становили -1,3 (давність 4 міс); -2,1 (давність 17 міс); -2,4 (давність 14 міс); -2,4 (давність 17 міс); -2,9 (давність 23 міс) та -2,9 (давність 20 міс), кількість колоній була меншою порівняно з контролем на 9,5 %; 61,1 %; 43,6 %; 50,4 %; 74,2 % та 70,1 %, відповідно (див. табл.). Отже, у всіх цих пацієнтів були тривалі терміни незрощення, а показники кількості клітинних колоній у дослідних культурах із сироваткою крові пацієнтів з остеопенічними та остеопоротичними змінами були статистично значуще менші не тільки від показника контрольної культури, але і від показників у дослідних культурах із застосовуванням сироватки крові пацієнтів з нормальними значеннями МІЦКТ та нетривалими термінами незрощення (див. табл.).

Одержані дані вказують на низький остеорепаративний потенціал цієї групи пацієнтів. Найнижчі показники кількості колоній у дослідних культурах (3,41±0,39 та 3,95±0,37) були при використанні сироватки крові пацієнтів з найбільшими терміном незрощення (давність 23 та 20 міс, відповідно) та найнижчими показниками МІЦКТ (T-критерій = -2,9 та -3,1, відповідно). Це також свідчить про значний вплив (опосередковано через склад сироватки крові) МІЦКТ та термінів незрощення кісток на остеорепаративний потенціал.

У літературі є дані про прямий кореляційний зв'язок показників МІЦКТ з остеогенним потенціалом, який визначали за активністю лужної фосфатази та експресії остеобласт-специфічного гена RT-PCR у культивованих СККМ пацієнтів з виконаним артродезом хребців [22]. Автори встановили, що зниження показників МІЦКТ до остеопоротичних супроводжувалось статистично значущим зниженням показників остеогенного потенціалу.

Вік пацієнтів з остеопенічними та остеопоротичними порушеннями складав від 18 до 57 років. У даній групі пацієнтів не було встановлено залежності показників МІЦКТ та кількості клітинних колоній у культурах від віку пацієнтів. Проте це може бути пов'язано з невеликою кількістю пацієнтів. У раніше проведеній нами роботі був досліджений взаємозв'язок МІЦКТ пацієнтів з дегенеративними захворюваннями хребта з їх віком та кількістю клітинних колоній у культурах з сироваткою крові цих пацієнтів і була доведена пряма залежність зниження показників МІЦКТ пацієнтів зі збільшенням їх віку [1]. Зниження показників МІЦКТ пацієнтів супроводжувалось і зниженням кількості клітинних колоній у культурах із використанням сироватки крові даних пацієнтів. Одержані результати можуть вказувати на те, що у дослідженні пацієнтів з переломами, які обтяжені тривалим незрощенням, більший вплив на кількість клітинних колоній у культурах з сироваткою крові пацієнтів, чинить не стільки вік пацієнта, скільки МІЦКТ та ситуація з переломом, тобто зміни складових сироватки, які безпосередньо впливають на остеорепарацію в умовах тривалого терміну зрощення перелому.

Як у контролі, так і у дослідних культурах колонії були представлені клітинами, які відрізнялися за формою, розмірами та ядерно-цитоплазматичним відношенням, що свідчить про їх різну ступінь диференціації. При цьому у клітинних колоніях різних пацієнтів співвідношення клітин за вказаними вище показниками коливалось. Частина клітин у колоніях та за їх межами мали виражено витягнуту форму з довгими цитоплазматичними відростками, за допомогою яких клітини контактували між собою. Центрально 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.

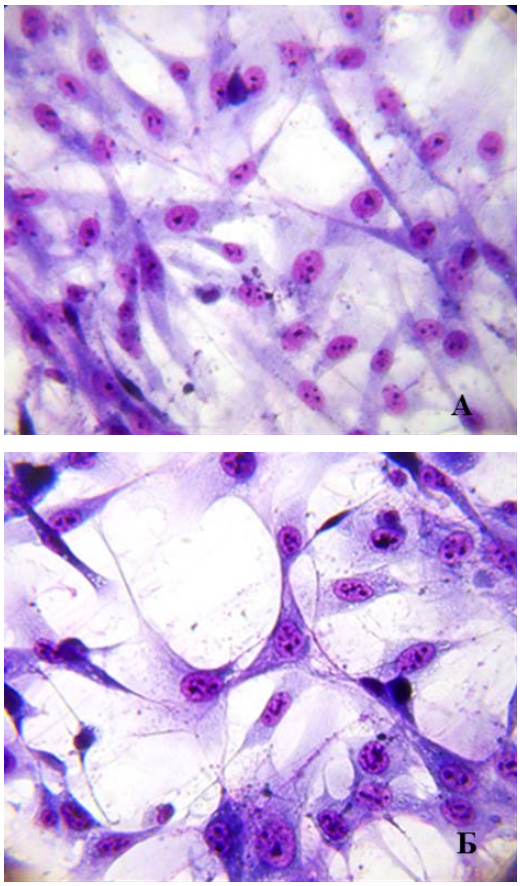

Рис. 2. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ. Кістковомозкові фібробласти: а) контрольна культура з ембріональною сироваткою крові телят; б) дослідна культура з сироваткою крові пацієнта С. (Z-критерій = -0,3; МІЦКТ відповідає нормі; 4 місяці після травми). Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 400.

Інша частина клітин у колоніях мала полігональну форму (ромбоподібну, овальну, округлу та інш.). Ядра таких клітин також розташовувались центрально, були крупними, переважно округлими та, на відміну від попередньо описаних клітин, були гіпохромними. У ядрах цих клітин виявлялись декілька щільних ядерець. Це – молоді незрілі клітини (рис. 3).

У контрольних і дослідних культурах спостерігалась фігури мітозу, тобто клітини знаходились у різних стадіях мітотичного поділу (рис. 4), що свідчить

про їх проліферативну активність. Водночас визначались поодинокі клітини з пікнотичними ядрами або вакуолізованою цитоплазмою. Кількість деструктивних клітин не була значною і не було встановлено статистично значущої різниці у їх кількості між дослідними та контрольною культурами.

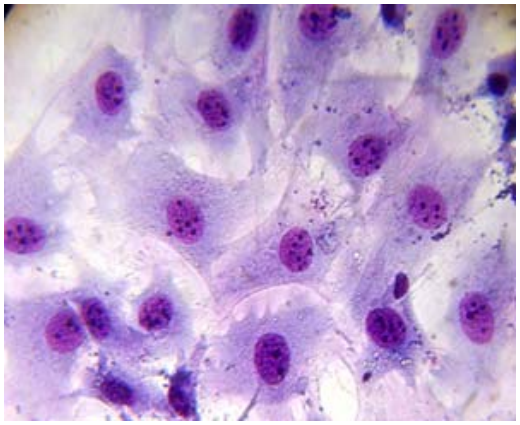

Рис. 3. Фотовідбиток цитопрепарату культивованих СККМ з сироваткою крові пацієнтки К. (Z-критерій = -0,5; МЦКТ відповідає нормі; 4,5 місяці після травми). Крупні клітини полігональної форми. Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 400.

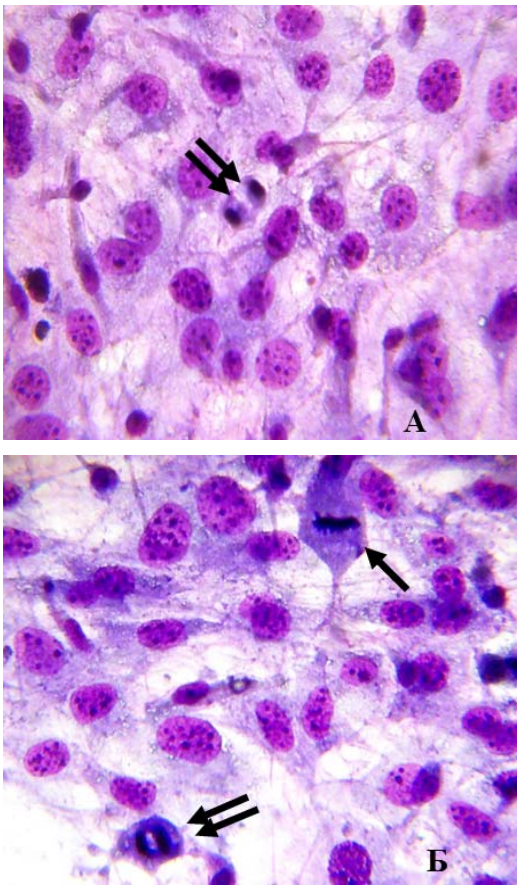

Рис. 4. Фотовідбитки цитопрепаратів культивованих СККМ. Клітини з фігурами мітозу: а) контрольна культура, культивована з ембріональною сироваткою крові телят; б) дослідна культура, культивована з сироваткою крові пацієнта Д. (Z-критерій = -0,7; МЦКТ відповідає нормі; 7 діб після травми). ↑ – клітина на стадії метафази, ↑↑ – клітина на стадії анафази. Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 400.

За результатами аналізу кількості клітин у колоніях встановлено, що їх кількість була високою у контрольній культурі СККМ (42,95±2,16) та дослідних культурах СККМ із використанням сироватки крові пацієнтів з нормальними значеннями МЦКТ та давністю перелому до 4,5 міс (більше 35 клітин). Так, не встановлено статистично значущих відмінностей за цим показником між контрольною культурою та дослідними культурами з сироваткою крові пацієнтів, у яких були нормальна МЦКТ та невеликі терміни давності перелому (7 та 17 діб), тоді як у дослідних культурах з сироваткою крові пацієнтів з нормальною МЦКТ, але значною давністю перелому – 4 та 4,5 міс, кількість клітин у колоніях порівняно з контрольною культурою була статистично значуще меншою на 17,8 та 12,8 %, відповідно.

Найбільша кількість клітин у колоніях спостерігалась у дослідній культурі СККМ, культивованих з сироваткою крові молодого пацієнта (21 рік), у якого була нормальна МЦКТ і давністю перелому 17 становила діб (див. табл.). Показники кількості клітин у колоніях інших дослідних культур (пацієнтів з нормальною МЦКТ) статистично значуще відрізнялись від показника цієї дослідної культури і були нижчими на 10,2 %, 22,2 % та 17,4 % відповідно до термінів давності травми 7 діб, 4 міс та 4,5 міс.

У дослідних культурах СККМ, культивованих з сироваткою крові пацієнтів зі зниженими показниками МЦКТ (остеопенічні та остеопоротичні порушення), переважали клітині колонії невеликих розмірів (рис. 5). Їх кількісні характеристики відрізнялись як від контрольної культури, так і від дослідних культур пацієнтів зі значеннями МЦКТ, що відповідають нормі. Так, кількість клітин у колоніях дослідних культур з сироваткою крові пацієнтів, які мали показники Z- або T-критерію -1,3 (давність 4 міс); -2,1 (давність 17 міс); -2,4 (давність 14 міс); -2,4 (давність 17 міс); -2,9 (давність 23 міс) та -2,9 (давність 20 міс), була меншою ніж у контрольній культурі на 17,6 %; 28,9 %; 24,9 %; 21,7 %; 38,0 % та 45,9 %, відповідно. Статистично значущими були відмінності показників кількості клітин у колоніях культур цих пацієнтів порівняно з дослідними культурами пацієнтів з нормальними значеннями МЦКТ та невеликими термінами від моменту перелому, а саме давністю 7 та 17 діб (див. табл.).

Низькі показники кількості клітинних колоній та кількості клітин у колоніях дослідних культур пацієнтів зі зниженими показниками МЦКТ (остеопенічні та остеопоротичні зміни) вказують на низький остеорепаративний потенціал, що може бути пов'язано зі зміною у цих пацієнтів складу сироватки крові. Подібні дані наведені і в літературі [8, 9, 19, 21]. Так, у експериментах на мишах зі змодельованою остеопенією та старих за віком було встановлено, що підвищення рівня факторів росту у сироватці

крові призводить до збільшення мінеральної щільності кісткової тканини [19].

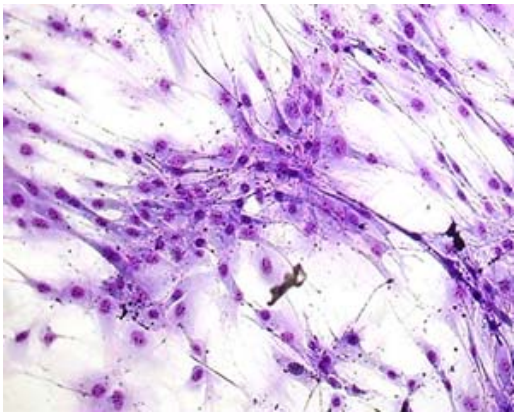

Рис. 5. Фотовідбиток цитопрепарату культивованих СККМ з сироваткою крові пацієнта Л. (Z-критерій = -2,9; МЩКТ відповідає остеопоротичним порушенням; 20 місяців після травми). Невелика колонія кістковомозкових фібробластів. Забарвлення за Романовським-Гімза. Зб. 100.

Доведено також, що порушення метаболічного стану організму в умовах травми, захворювань та старіння супроводжується зміною вмісту ТФР-β та фракційного складу глікозаміногліканів, білків та ліпопротеїдів у сироватці крові [8, 21], що може провокувати розлад репаративного остеогенезу на різних його стадіях. На культурі СККМ щурів було доведено, що остеопенічні порушення кісткової тканини (змодельована гіпокінезія) призводять до зниження (порівняно з контрольною культурою) кількості клітинних колоній та клітин у колоніях [9]. 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. Це узгоджується з даними *R.O. Oreffo et al. (1997)*, які у дослідженнях щодо модуляції остеогенезу сироваткою крові людини у культурі клітин кісткового мозку показали, що сироватка крові людини має у своєму складі фактори, котрі виявляють ключову дію на диференціацію клітин кісткового мозку у остеогенному напрямку [17]. *G. Zimmermann et al. (2009)* було встановлено, що у пацієнтів з переломами кісток, особливо з уповільненим зрощенням, рівень ТФР-β1, КМБ-2 та КМБ-4 у сироватці крові були статистично значуще нижчими за їх рівень у пацієнтів контрольної групи [11]. 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 [14, 16].

Таким чином, виконане дослідження щодо визначення взаємозв'язку остеорепаративного потенціалу пацієнтів з показниками МЩКТ та давністю травми показало, що у культурах СККМ, культивованих із сироваткою крові пацієнтів, спостерігається різна кількість клітинних колоній та клітин в них залежно від значень МЩКТ та давності перелому. Зниження показників МЩКТ у досліджених пацієнтів та збільшення терміну від моменту перелому супроводжується у культурах СККМ зменшенням кількості клітинних колоній та клітин у колоніях. Більш виражені зміни спостерігаються у пацієнтів з найбільшою давністю незрощення перелому. Одержані дані можуть свідчити про зміну у цих пацієнтів складу сироватки крові, а саме зниження вмісту компонентів, які впливають на остеогенні потенції організму – факторів росту, морфогенетичних білків та інш., і, як наслідок, склад сироватки крові не забезпечує достатню проліферацію та диференціацію культивованих СККМ.

Висновок: Стан якості кістки, зокрема її мінеральна щільність, а також процес зрощення кісткового перелому, опосередковано через склад сироватки крові пацієнтів, пов'язані з регенераторним потенціалом людини. *В перспективі* визначення МЩКТ може забезпечити додаткові дані для оцінки остеорепаративного потенціалу пацієнтів у клініці.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Визначення in vitro регенераторного потенціалу пацієнтів та його взаємозв'язку з мінеральною щільністю кісткової тканини / С.В. Малишкіна, О.А. Нікольченко, С.Б. Костерін [та інш.] // Укр. морфологічний альманах. – 2012. – Том. 10, № 4. – С. 69-74.
2. Гюльназарова С.В. Современные методы лечения ложных суставов / С.В. Гюльназарова // Травматология и ортопедия России. – 2000. – № 1. – С. 78 – 84.
3. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости / Н.А. Корж, К.К. Романенко, Л.Д. Горидова // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 84-90.
4. Мироманов А.М. Способ прогнозирования нарушения регенерации костной ткани при переломах длинных костей конечностей в послеоперационном периоде / А.М. Мироманов, С.А. Усков // Гений ортопедии. – 2011. – № 4. – С. 26-30.
5. Пат. SU 1103851 A, МПК A 61/B 10/00. Способ прогнозирования течения регенерации костной ткани при дистракционном 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 A, МПК G01N 1/28, A 61/B 10/00. Способ определения интенсивности костеобразования / Илизаров Г.А., Палиенко Л.А., Шрейнер А.А.; заявитель Курганский научно-исследовательский институт экспери-

ментальной и клинической ортопедии и травматологии. – № 3597013/28-14; заявл. 27.05.1983; опубл. 30.08.1985, Бюл. № 32.
7. Пат. UA 79708, МПК A 61B 10/02, G01N 33/483 Спосіб прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини / Корж М.О., Радченко В.О., Дедух Н.В. та інш.; Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМНУ». – № 2012 13453; заявл. 26.11.2012; опубл. 25.04.2013, Бюл. № 9.
8. 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.
9. Родіонова Н.В. Особливості колонієутворення та диференціювання стромальних клітин кісткового мозку щурів за умов in vitro при модельованій гіпокінезії / Н.В. Родіонова, О.М. Нестеренко, Н.В. Дзюбенко // Укр. морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 3. – С. 122-124.
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. Микулинський, О.А. Омельченко [та інш.]. – 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. 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.
13. Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis / J. Lammens, Z. Liu, J. Aerssens, J. Dequeker // J. Bone Miner. Res. – 1998. – Vol. 13. – P. 279 – 286.
14. Early period of fracture healing in ovariectomised / S.W. Xu, R. Yu, G.F. Zhao, J.W. Wang // Chin. J. Traumatol. – 2003. – Vol. 6. – P. 160-166.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells / I. Bab, D. Gazit, A. Muhlard, A. Shteyner // Endocrinology. – 1988. – Vol. 123. – P. 345-352.
19. Regenerative marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis / D. Gazit, M. Karmish, L. Holzman, I. Bab // Endocrinology. – 1990. – Vol. 126. – P. 2607-2613.
20. 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.
21. The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly / T.J. Street, J.H. Wang, Q.D. Wu, E. Ai // J. Orthop. Res. – 2011. – Vol. 19. – P.1057-1066.
22. The effectiveness of bone mineral density as supplementary tool for evalution of the osteogenic potential in patients with spinal fusion / Byung-Hak Kim, Heun-Guyn Jung, Kyung-Ho Park [et al.] // Asian Spine Journal. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 1-9.
23. The osteogenic response to distant skeletal injury / N.A. Einhorn, G. Simon, V.J. Devlin [et al.] // Bone Joint Surg. – 1990. – Vol. 72-A, № 9. – P. 1374-1378.

Надійшла 22.01.2013 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін