

АНАЛІЗ КОНЦЕНТРАЦІЇ TGF- β 1 У СИРОВАЦІ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ЗАКРИТИМИ ДІАФІЗАРНИМИ ПЕРЕЛОМАМИ ДОВГИХ КІСТОК ЗАЛЕЖНО ВІД СПОСОБУ ЛІКУВАННЯ

Н. О. Гнатейко¹, Г. В. Макух², А. В. Калашиников³

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

² ДУ "Інститут спадкової патології НАМН України", м. Львів

³ ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України", м. Київ

ANALYSIS OF TGF- β 1 CONCENTRATION IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CLOSED DIAPHYSEAL FRACTURES OF LONG BONES DEPENDING ON SELECTED TREATMENT TECHNIQUE

N. O. Gnateyko, G. V. Makukh, A. V. Kalashnikov

The paper presents the results of TGF- β 1 studies of the level that regulates cellular proliferation and differentiation in patients with fractures that get different treatment in comparison with the control group. Increase of TGF levels was observed in patients with surgery intervention. As a result of TGF- β 1 level analysis by means of gender distribution we have revealed significantly lower values of TGF- β 1 in female as compared with male patients. In all studied groups cytokine levels were lower in women in comparison with men that can be attributed to differences of their hormonal balance.

The highest level of TGF- β 1 in blood serum was noted in patients that got conservative treatment and had closed external fixator, in this case the haematoma remained on the fracture site. Obtained data demonstrate that retention of haematoma on the fracture site with available growth factor promotes higher intensity of TGF- β 1 synthesis in treatment process. The data obtained in carried out studies can be applied for development of therapeutic techniques for treatment of patients with bone fractures.

Key words: diaphyseal fracture, reparative regeneration, growth factor TGF- β 1.

АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ TGF- β 1 В СЫВОРТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЗАКРЫТЫМИ ДИАФИЗАРНЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ

Н. О. Гнатейко, Г. В. Макух, А. В. Калашиников

Представлены результаты исследования уровня TGF- β 1, регулятора пролиферации и дифференциации клеток у пациентов с переломами и различными подходами к лечению и у лиц контрольной группы. Установлено повышение уровня TGF- β 1 у пациентов с переломами в сравнении с контролем. Достоверно более высокие значения TGF- β 1 установлены у пациентов, леченных консервативно, в сравнении с контролем, и незначительное повышение по сравнению с лицами, которым произведено оперативное вмешательство. В результате проведенного анализа уровня TGF- β 1 в зависимости от распределения по полу выявлены достоверно более низкие значения TGF- β 1 у лиц женского, нежели мужского пола. Во всех исследуемых группах наблюдали более низкий уровень цитокинов у женщин по сравнению с пациентами мужского пола, что можно объяснить различным гормональным фоном организма.

Наиболее высокий уровень TGF- β 1 в сыворотке крови отмечали при консервативном лечении и при закрытом наложении аппарата внешней фиксации, то есть при сохранении гематомы на месте перелома кости. Полученные данные указывают, что сохранение гематомы в месте перелома с имеющимися факторами роста способствуют более активному синтезу TGF- β 1 в процессе лечения. Полученные в работе результаты могут быть использованы для разработки методов терапевтического сопровождения пациентов с переломами костей.

Ключевые слова: диафизарный перелом, репаративная регенерация, фактор роста TGF- β .

Вступ

Діагностика та прогнозування перебігу репаративного остеогенезу при переломах кісток є важливою складовою запобігання його розладів.

На сьогодні більшість фахівців розглядає проблему репаративної регенерації як таку, що потребує комплексних досліджень, із об'єднанням зусиль клініцистів та теоретиків [1]. При цьому важливим є розгляд

репаративного процесу в кістковій тканині як динамічного, так і пов'язаного зі станом усього організму.

Методи дослідження розладів зрощення уламків кісток, що використовуються нині, не дають змоги ефективно діагностувати стан репаративних процесів у зоні ушкодження та прогнозувати його перебіг [2]. Поряд із використанням традиційних способів променевої діагностики на сьогодні повинні враховуватися метаболічні фактори, що впливають на інтенсивність репаративних процесів при переломах кісток, фактори альтерації та стан гомеостазу в момент травми, а також перебіг травматичної хвороби. Складність процесу загоєння перелому була очевидна і для лікарів, і для вчених, починаючи з його першого гістологічного опису, але механізми його регуляції залишаються до кінця нез'ясованими.

Важливу роль у загоєнні переломів кісток відіграють ультраструктурні регулятори кісткового метаболізму — кісткові морфогенетичні білки (*bone morphogenetic proteins, BMP*), інсуліноподібні фактори росту (I-LGF), трансформуючий фактор росту — бета (TGF- β 1), тромбоцитарний фактор росту (PDGF) і фактор росту фібробластів (FGF), які секретуються остеобластами і беруть участь у загоєнні кістки [3, 4].

Суперродина TGF- β 1 — група цитокінів, яка включає TGF- β , актини (*activins*), кісткові морфогенетичні білки (BMP), фактори диференціації росту (GDFS) і має функцію регуляції росту і диференціації остеобластів. TGF- β є позаклітинним білком, який виробляється в основному остеобластами та тромбоцитами і має у савців три ізоформи: TGF- β 1, TGF- β 2, і TGF- β 3. Ці цитокіни беруть участь у регуляції проліферації і диференціації клітин і є супресорами імунної відповіді [3, 5].

Білок TGF- β 1 синтезується відповідним геном (TGF- β 1; 190180), який локалізований у локусі 19q13 і складається із 7 екзонів [6]. M. Dickinson et al. виявили високий рівень TGF- β 1 матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК) та білка у тканинах хряща, кісток і шкіри, що вказує на роль цього цитокіну в рості і диференціюванні цих тканин [5, 7].

Процес загоєння кістки, як було показано вище, є складним, багатостадійним, у якому задіяна велика кількість метаболітів. Доведеним регулятором росту і диференціації остеобластів є TGF- β . Також, TGF- β бере участь у формуванні кісткової і хрящової тканини, які є визначальними процесами при загоєнні перелому. Слід відзначити роль TGF- β як важливого регулятора синтезу позаклітинного матриксу. Тому дослідження рівня цього метаболіту має як теоретичне, так і практичне значення.

Поряд із синтезом TGF- β остеобластами основна його кількість в організмі синтезується тромбоцитами, які мають значення у підтримці метаболізму кісткової тканини, покращуючи загоєння перелому шляхом регуляції диференціації кісткових клітин [9]. Тому рівень TGF- β у крові є показником нормального перебігу процесів проліферації і диференціації клітин організму.

Зважаючи, на завдання дослідження — вивчити можливі чинники сповільненої консолідації кісток у людини, доцільним є дослідження рівня TGF- β у пацієнтів з різними підходами до терапевтичного супроводу порушення цілісності кісткової тканини.

Матеріали і методи

Нами обстежено 80 хворих із закритими діафізарними переломами довгих кісток та 10 здорових осіб як контролю рівня TGF- β 1, які відповідно становили *основну* та *контрольну* групи.

Визначали рівень концентрації в сироватці крові TGF- β 1 методом ELISA із використанням набору Human TGF-1 Immunoassay, кат. номер DB100B (R&D Systems, США) на апараті MULTISKAN PLUS version 2.03 absorbance mode.

Дослідження проводили на 10 добу з моменту отримання травми.

Серед хворих із переломами довгих кісток у 52 пацієнтів із 80 (30 — із переломами стегнової кістки, 15 — із переломами кісток гомілки, 7 — із переломами плечової кістки) виконано хірургічне лікування, інші 28 хворих (із переломами гомілки) проліковані методом скелетного витягнення. Хірургічне лікування у 26 випадках виконували із використанням металоостеосинтезу (МОС) накладною пластиною, ще у 26 — апаратами зовнішньої фіксації (АЗФ): 16 — шпичевими, 10 стержневими. Закрито, без втручання в зону зламу, АЗФ були накладені у 16 випадках, відкрито — у 10.

Середній вік хворих, пролікованих хірургічно (18 жінок та 34 чоловіки), становив $34,9 \pm 5,62$ роки, консервативно (12 жінок та 16 чоловіків) — $38,9 \pm 7,46$ років; здорових осіб (5 жінок та 5 чоловіків) — $21,5 \pm 1,71$ років.

Результати та їх обговорення

Отримані результати імуноферментного аналізу рівня TGF- β 1 у плазмі крові пацієнтів загальної дослідної групи та групи контролю наведені в табл. 1.

Таблиця 1
Рівень TGF- β 1, *pg/ml*, в обстежених групах пацієнтів

Значення TGF- β 1	Основна група, n=80	Контрольна група, n=10
Середнє значення, M \pm m	424,8 \pm 36,9	303,1 \pm 27,5
Варіабельність, min — max	33,2–1594,4	155,6–447,4

У результаті імуноферментного аналізу рівня TGF- β 1 у пацієнтів із переломами кісток виявлено вірогідне збільшення середнього значення TGF- β 1 порівняно із контролем, $p=0,008$ (див. табл. 1). Середнє значення TGF- β 1 серед пацієнтів із переломами кісток становило 424,8 *pg/ml* при 303,1 *pg/ml* у здорових осіб. Отримані результати є логічними, оскільки експресія TGF- β 1 може зростати у зв'язку із активним ростом та поділом клітин, який має місце при загоєнні травми. Слід звернути увагу на отримані значні відмінності щодо меж установлених показників TGF- β 1. Так, у здорових осіб рівень TGF- β 1 установлений у межах 155,6–447,4 *pg/ml*, при значно ширших значеннях в основній групі. Вірогідно, експресія TGF- β 1 тромбоцитами під час загоєння травми може як значно підвищуватися, так і знижуватися.

Аналіз розкиду показників TGF-β1 у пацієнтів основної та контрольної групи наведено на рис. 1.

Установлено, що у 90% здорових осіб контрольної групи рівень TGF-β1 був не більше 400 і не менше 100 pg/ml. На противагу — в основній групі пацієнтів із травмою у цих межах рівень TGF-β1 виявлений лише у 38% осіб. Майже у половини пацієнтів із основної групи показники TGF-β1 перевищували максимальне значення — 447,4 pg/ml, установлене у здорових осіб. Причому, ми виявили поодинокі випадки рівня TGF-β1, який перевищив 1000 pg/ml. Також у частини пацієнтів виявлено дуже низькі значення TGF-β1, які становили менше 100 pg/ml або були на нижній межі чутливості цього аналітичного методу визначення TGF-β1, яка становить 31,2 pg/ml. При аналізі отриманих даних ми не виявили достовірного зв'язку між рівнем TGF-β1, тяжкістю та локалізацією переломів (стегнова кістка, кістки гомілки, плечова кістка). На нашу думку, це пов'язано із генетично детермінованою регуляцією синтезу факторів росту.

Рівень TGF-β1 залежно від статі

Зважаючи на літературні дані про існування зв'язку між експресією TGF-β1 та загальним рівнем естрогенів, ми вважали за доцільне проаналізувати рівні цього метаболіту залежно від статі (табл. 2).

У результаті проведеного аналізу рівня TGF-β1 залежно від гендерного розподілу, спостерігається достовірна різниця щодо нижчого рівня TGF-β1 в осіб жіночої статі, ніж у чоловічої, $p=0,048$ (див. табл. 2). Також достовірно ($p<0,05$) виявлене підвищення рівня TGF-β1 у хворих із переломами кісток порівняно із контролем. Виявлені у роботі відмінності щодо рівня TGF-β1 залежно від статі обстежених осіб можна пояснити різним гормональним фоном.

Таким чином, рівень TGF-β1 є важливим метаболітом, який бере участь у загоєнні травми, проте його показники можуть змінюватися — як збільшуватися (у 48% пацієнтів), так і зменшуватися (12% пацієнтів).

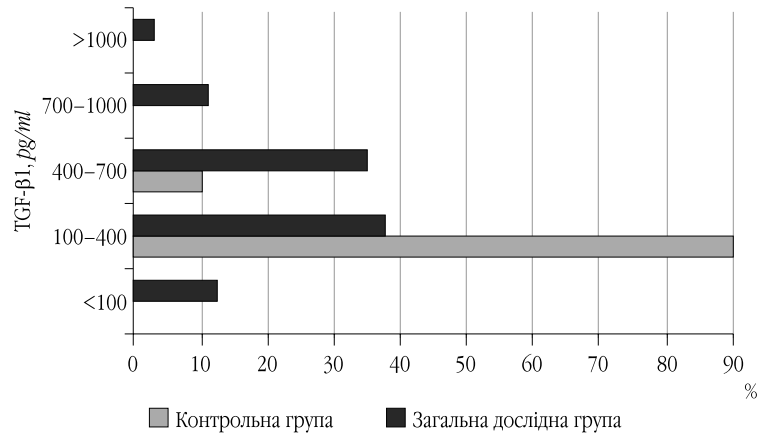


Рис. 1. Аналіз розкиду показників TGF-β1 у пацієнтів основної та контрольної групи

Таблиця 2

Рівень TGF-β1, pg/ml, залежно від статі обстежених осіб

Значення TGF-β1	Основна група		Контрольна група	
	жін., n=30	чол., n=50	жін., n=5	чол., n=5
Середнє значення, M±m	344,7±44,0	467,0±49,9	288,2±32,4	332,6±45,5
Варіабельність, min – max	36,5–700,6	31,1–1564,4	155,6–387,3	291,8–447,4

Виявлено, що рівень TGF-β1 залежить від статі і відрізняється у пацієнтів із переломами кісток порівняно до контролю.

Рівень TGF-β1 залежно від типу та способу лікування

Для з'ясування чинників, що впливають на репаративний остеогенез, нами проаналізовано рівень TGF-β1 залежно від типу та способу застосованого лікування (табл. 3).

Аналіз результатів свідчить про зниження рівня TGF-β1 у пацієнтів пролікованих хірургічно, проте ця відмінність не виявилася вірогідною.

Аналізуючи дані щодо вмісту TGF-β1 залежно від способу лікування, виявлено, що при застосуванні методів лікування із відкритою репозицією уламків кісток рівень TGF-β1 був достовірно нижчим, ніж при застосуванні скелетного витягнення та при закритому накладанні АЗФ (див. табл. 3). Це може бути пов'язано з евакуацією гематоми, яка багата факторами росту у випадках відкриття зони перелому при виконанні хірургічного втручання.

Слід відмітити виявлений вірогідно вищий рівень TGF-β1 у пацієнтів, пролікованих консервативно (459,8±75,0), порівняно з контролем (303,1±27,5 pg/ml, див. табл. 1). Такі результати вказують, що механізм

Таблиця 3

Рівень TGF-β1, pg/ml, у пацієнтів із переломами кісток залежно від типу та способу лікування

Значення TGF-β1	Тип лікування		Спосіб лікування			
	консервативне*, n=28	хірургічне*, n=52	Скелетне витягнення, n=28	МОС пластиною, n=26	Накладання АЗФ	
					закрите, n=16	відкрите, n=10
Середнє значення, M±m	459,8±75,0	390,8±42,1	459,8±75,0	365,3±22,1	436,0±65,0	376,8±24,1
Варіабельність, min – max	40,8–1319,7	31,0–1594,4	40,8–1319,7	31,0–624,4	86,0–1594,6	36,7–725,0

* $p=0,417$.

TGF-β1 опосередкованої регуляції відбудови кісткової тканини найбільше виявляється при відсутності хірургічних втручань у процесі загоєння перелому.

Рівень TGF-β1 залежно від типу лікування та статі пацієнтів

Зважаючи на встановлені нами відмінності рівня TGF-β1 залежно від статі обстеженої особи, ми провели аналіз отриманих показників TGF-β1 залежно від типу проведеного лікування з урахуванням статі пацієнта. Отримані результати наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Рівень TGF-β1, pg/ml, залежно від характеру лікування та статі пацієнтів

Значення TGF-β1	Консервативне лікування		Хірургічне лікування	
	жін., n=12	чол., n=16	жін., n=18	чол., n=34
Середнє значення, M±m	394,5±92,9	486,4±102,6	311,1±52,4	433,1±57,9
Варіабельність, min – max	183,5–688,8	40,8–1319,7	36,5–700,1	31,1–1594,4

Як видно з табл. 4, в осіб жіночої статі спостерігали нижчі рівні досліджуваного цитокіну як у групі консервативно пролікованих пацієнтів, так і у тих, хто лікувався хірургічно. Також виявлені відмінності у пацієнтів жіночої статі залежно від типу лікування.

Слід відмітити, що отримані результати аналізу підтверджують дві, попередньо виявлені нами, закономірності.

1) у жінок спостерігаються нижчі рівні TGF-β1 порівняно з чоловіками;

2) у пацієнтів, пролікованих консервативно, вищий рівень TGF-β1 порівняно з тими, хто лікувався хірургічно.

Зважаючи на виявлені широкі межі значень TGF-β1, проаналізовано розподіл результатів пацієнтів у групі консервативно пролікованих порівняно з тими, хто лікувався хірургічно.

Результати наведено на рис. 2.

Аналіз установлених показників TGF-β1 у пацієнтів основної групи залежно від типу лікування не виявив значних відмінностей у розподілі рівня TGF-β1. Слід відмітити, що у 21% пацієнтів, пролікованих хірургічно, виявляли рівень TGF-β1 менше 100 pg/ml порівняно з 6% пацієнтів, пролікованих консервативно. Такі результати можуть бути

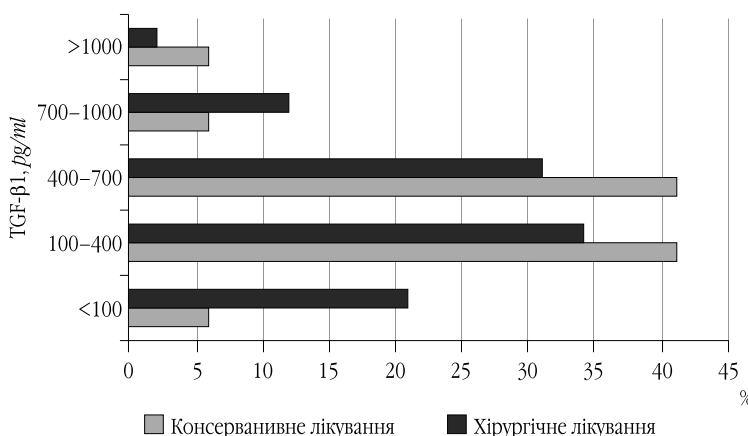


Рис. 2. Аналіз розкиду показників TGF-β1 у пацієнтів основної групи залежно від типу лікування

пояснені також впливом самого хірургічного втручання та супутньої медикаментозної терапії.

У результаті проведеної роботи вперше в Україні вивчено рівень відомого регулятора проліферації і диференціації клітин TGF-β1 у пацієнтів із переломами та різними типами лікування та в осіб контрольної групи. Отримані результати виявили підвищення рівня TGF-β1 у пацієнтів із переломами порівняно з контролем. Вірогідно вища частота TGF-β1 установлена у пацієнтів, пролікованих консервативно, порівняно з контролем та незначне підвищення порівняно з тими, хто лікувався хірургічно.

Слід відмітити встановлені відмінності у рівні TGF-β1 залежно від статі. В усіх досліджуваних групах ми спостерігали нижчі рівні цитокіну у жінок порівняно з чоловіками, що можна пояснити різним гормональним фоном.

При інтерпретації отриманих результатів слід зважати й на міжтканинну варіабельність рівня TGF-β1, оскільки високий рівень TGF-β1 виявлено в попередніх дослідженнях у кісткових мозолях, які утворюються при загоєнні переломів [9].

Отримані результати можуть бути використані для розробки методів терапевтичного супроводу пацієнтів із переломами кісток. Так, отримані дані вказують на знижену експресію білка у пацієнтів, пролікованих хірургічно, порівняно з тими, хто лікувався консервативно, що потребує подальшого вивчення щодо можливості медикаментозної стимуляції синтезу TGF-β1 в окремих категоріях хворих.

Висновки

Існують достовірні розбіжності в концентрації TGF-β1 у сироватці крові хворих з діафізарними переломами довгих кісток залежно від способу лікування.

Найвищий рівень TGF-β1 у сироватці крові відмічали при консервативному лікуванні та при закритому накладанні АЗФ, тобто при збереженні гематоми на місці зламу кістки.

Збереження гематоми в місці перелому з наявними факторами росту сприяло більш активному синтезу TGF-β1 у процесі лікування.

Література

1. Корж А.А. Повреждения костей и суставов у детей / Корж А.А., Бондаренко Н.С. — Х. : Прапор, 1994. — 455 с.

2. Травматология и ортопедия : под ред. Ю.Г. Шапошникова : в 3-х т. — М. : Медицина, 1996. — Т. 1. — С. 432–434.
3. BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system / *Ruschke K., Niepen C., Becker J., Knaus P.* // *Cell. Tissue Res.* — 2012. — Vol. 347, № 3. — P. 521–544.
4. *Chen G.* TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation / *Chen G., Deng C., Li Y. P.* // *Int. J. Biol. Sci.* — 2012, — Vol. 8, № 2. — P. 272–288.
5. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF- β superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci / *Dickinson M. E., Kobrin M. S., Silan M. S.* [et al.] // *Genomics.* — 1990. — № 6. — P. 505–520.
6. Elevated transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing / *Sarabradi K., Thomas A., Mousavi M.* [et al.] // *Injury.* — 2011. — Vol. 42, № 8. — P. 833–837.
7. Growth factor release in extra- and intramedullary osteosynthesis following tibial fracture / *Sarabradi K., Thomas A., Heinz T.* [et al.] // *Injury.* — 2011. — Vol. 42, № 8. — P. 772–777.
8. Immunological measurement of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in blood ; assay development and comparison / *Kropf J., Schurek J. O., Wollmer A., Gressner A. M.* // *Clin. Chem.* — 1997. — Vol. 43, № 10. — P. 1965–1974.
9. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene / *Derynck R., Rhee L., Chen E. Y., Van Tilburg A.* // *Nucleic. Acids. Res.* — 1987. — Vol. 15. — P. 3188–3189.

УДК 616-079.4-009.7:617.559:616.728.2:053.2/67

КЛІНІЧНА ДИФЕРЕНЦІЙНА ДІАГНОСТИКА БОЛЮ ПОПЕРЕКОВО-КУЛЬШОВОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ У ДЕБЮТІ ЗАХВОРЮВАННЯ

В. В. Філіпчук, Я. В. Фищенко

ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”, м. Київ

THE CLINICAL DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN HIP AND LUMBAR PAIN IN CHILDREN AND ADOLESCENTS IN THE ONSET OF THE DISEASE

V. V. Filipchuk, Ya. V. Fishchenko

We analyzed the data of 76 patients aged 7 to 18 years, who turned to the clinic with complaints of pain in the lumbar spine and/or hip. We defined an algorithm of the clinical examination of the patient.

The result of our study showed that 87% of cases to determine the exact diagnosis of the clinical examination of patients is sufficient, and there is no need for a wide range of costly examination procedures. The combination of spinal pathology and hip disease is not common (7% of our observations), and usually occurs in systemic diseases of the musculoskeletal system (Marfan syndrome or subclinical form of spondyloepiphyseal dysplasia).

Key words: back pain, hip pain, differential diagnostics, Marfan syndrome.

КЛИНИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЙ ПОЯСНИЧНО-ТАЗОБЕДРЕННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В. В. Филиппчук, Я. В. Фищенко

Представлен анализ данных 76 пациентов в возрасте от 7 до 18 лет, обратившихся в клинику с жалобами на боли в области поясничного отдела позвоночника и/или тазобедренного сустава, которым нами определен алгоритм клинического обследования.

Результат нашего исследования показал, что в 87% случаев для определения точного диагноза достаточно клинического обследования больного, и нет необходимости в проведении широкого спектра дорогостоящих исследований. Комбинация патологии позвоночника и тазобедренного сустава в дебюте заболевания встречается не часто (7% по нашим наблюдениям) и, как правило, возникает при системных заболеваниях опорно-двигательного аппарата (синдром Марфана или стертая форма спондило-эпифизарной дисплазии).

Ключевые слова: боль, поясница, тазобедренный сустав, дифференциальная диагностика, синдром Марфана.