

УДК 616.37-002-02:616-002.1

**ВПЛИВ ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
КОРДОВОЇ КРОВІ НА МЕТАБОЛІЗМ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ
НА НЕКРОТИЧНИЙ ПАНКРЕАТИТ**

Кебкало А.Б., Лобинцева Г.С., Марухно Ю.І., Шаблій В.А.

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Київ

Інститут клітинної терапії, Україна, Київ

КЗ КОР „Київська обласна клінічна лікарня”, Київ .

Вступ

Частота захворюваності на гострий панкреатит варіює від 20 до 120 на 100000 населення. В Україні цей показник дорівнює 102 на 100000 населення [4]. Важкий гострий панкреатит складає близько 15% всіх випадків на гострий панкреатит. При некротичному панкреатиті (НП) летальність досягає 20-40% [3]. Висока летальність при НП пов'язана з надмірною активацією протеолізу, тяжким ендотоксикозом і гнійно-некротичними ускладненнями, пов'язаними, як з ураженням самої підшлункової залози, так і парапанкреатичної клітковини. [3, 8]. Сучасні методи лікування панкреонекрозу дещо покращили результати, однак і нині їх не можна вважати задовільними [8]. Генералізація некротичного процесу при важкому панкреатиті призводить до ураження великого масиву заочеревинної клітковини. Репаративні процеси при такій патології будуть пригнічені.

Останнім часом в лікуванні різноманітних захворювань людини застосовуються гемопоетичні стовбурові клітини кордової крові (СКК), котра містить набагато більшу частину стовбурових гемопоетичних клітин, ніж дорослий кістковий мозок, є доступним джерелом стовбурових клітин, які володіють високим проліферативним потенціалом та ефективно використовуються для лікування ряду захворювань без підбору HLA-ідентичного донора [1, 2]. В теперішній час у світі проведено близько 5000 трансплантацій кордової крові [11, 14, 19]. Пуповинна кров є безпечним, технічно легко отриманим джерелом стовбурових клітин, які володіють більшим потенціалом проліферації та експансії, ніж їх аналоги з дорослого

кісткового мозку та ефективно використовуються для лікування ряду захворювань [9]. Проте, в лікуванні некротичного панкреатиту СКК для стимуляції репаративних процесів в тканинах досі не використовувались.

Вище перераховані проблеми обумовлюють актуальність теми і свідчать про доцільність використання стовбурових клітин кордової крові в лікуванні некротичного панкреатиту.

В Україні застосування стовбурових клітин дозволено Законом «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людині» та регламентовано на рівні клінічних випробувань постановою КМУ від 5 вересня 2007 року №1100 «Про заходи щодо організації діяльності закладів охорони здоров'я та наукових установ, пов'язаної з трансплантацією органів, тканин і клітин». Порядок клінічних випробувань визначений наказом МОЗ України від 10.10. 2007 року, № 630 «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань».

Робота виконана в межах клінічних випробувань “Оцінка клінічної ефективності клітинних і тканинних трансплантатів у комплексному лікуванні хворих на панкреонекроз” (код 13.2008, версія № НМАПО КК-1: 13.2008, протокол № Р-007/08, код протокола Р-001.08, затверджений Координаційним центром трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України 27 червня 2008 року, протокол № 6).

Мета роботи: визначити ефективність застосування стовбурових клітин кордової крові в комплексному лікуванні хворих на НП шляхом дослідження їх впливу на метаболізм сполучної тканини.

Матеріали і методи

Обстежено 40 хворих на некротичний панкреатит. Для аналізу метаболізму сполучної тканини визначали вміст у крові вільного і білковозв'язаного оксипроліну, гексозамінів, гексуронових кислот, фукози, незв'язаної з білками, сіалових кислот, а також колагенолітичну активність плазми крові. При цьому баланс між като- і анаболічними процесами в

сполучній тканині визначали за вмістом у крові гексозамінів, вільного і білковозв'язаного оксипроліну. Інтенсивність деградації протеогліканів аналізували за рівнем у крові гексуронових кислот, а ступінь деструкції глікопротеїнів – за сироватковою концентрацією сіалових кислот та фукози, не в'язаної з білками [7, 12].

Дослідження проведені у хворих на НП, які отримували стандартне лікування (контрольна група – 20 пацієнтів) або терапію із застосуванням біомедичних технологій (основна група – 20 хворих) – пацієнти, яким у післяопераційному періоді внутрішньовенно вводили нативні стовбурові клітини кордової крові. Крім того, для контролю обстежено 25 практично здорових осіб (донори крові). Усі хворі обстежені до операційного втручання та на 3-ю, 7-у доби після операції.

Вміст у крові вільного оксипроліну (ВОП) вимірювали за методикою Тетянець С.С. [15], білковозв'язаного оксипроліну (БЗОП) - за Осадчук М.А. [13], гексозамінів (ГА), глюкуронових кислот (ГК), фукози, що не зв'язана з білками (ФНЗБ) - за Шараєвим П.Н. та співавт. [18], сіалових кислот (СК) - за Муравйовою Л.А., Волковим Е.Ю. [12], колагенолітичну активність плазми (КАП) - за Шараєвим П.Н. та співавторами [17].

СКК отримували на безкоштовній основі з банку пуповинної крові ТОВ “Институт клітинної терапії” (директор – С.І. Мартиненко). Пуповинну кров збирали при нормальних пологах з інформативної згоди жінок, що були обстежені на наявність вірусних та гемічних інфекцій (тестування на сифіліс, гепатит С, HbsAg, ВІЛ-інфекцію).

Пуповинну кров сепарували шлях спонтанної седиментації з 3 % р-ну желатину, фракцію ядровмісних клітин відокремлювали від еритроцитів та центрифугували для видалення плазми (1200 об/хв., 10 хв).

Для кріоконсервування використовували 5 % ДМСО приготований на збалансованому соляному розчині Хенкса. До концентрату ядровмісних клітин, який містить СКК, додавали у пропорції 1:1 10% розчин ДМСО. Суспензію перемішували і за допомогою одноразових шприців розливали в кріоампулы об'ємом 4,5 мл, та по 1 мл - в 4 контейнера-спутника, герметизували, маркували.

Крім того, 2 мл клітинної суспензії передавали на бактеріологічний контроль, 1 мл – для визначення вірусної контамінації методом полімеразної ланцюгової реакції, 2 мл – для визначення антитіл гепатита С, трепанеми, ВІЛ ½ и антигена віруса гепатита В імуноферментним методом. Концентрацію клітин підраховували за допомогою клітинного аналізатора, чи візуально під мікроскопом в лічильній камері Горяєва.

Кріоконсервування клітин проводили за допомогою програмного заморозувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах кріоконсервування і виконувати ініціювання процесу кристалізації (сідінг) за певної температури, для усунення явища переохолодження в кріоампулах (контейнерах) за трьохетапною програмою за методикою Г.С. Лобинцевої [10]. Зберігали заморожені зразки в в рідкому азоті при температурі -196°C в кріосховищі “38Kw/Kryos Controler”.

Тканину пуповини промивали в фізіологічному розчині з канаміцином, розрізали вздовж та поперек на фрагменти довжиною 4 см та поміщали на 20 хв в кріоконсервуючий розчин з 10 % ДМСО, потім переносили в кріоампули та заморожували [10],

Кріоконсервовану клітинну суспензію та тканину досліджували на стерильність у відповідності до Інструкції, затвердженої наказом МОЗ України № 164 від 05.07.99. “Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозамінюючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі”. За зазначеним наказом МОЗ України препарати донорської крові на наявність сифілісу, ВІЛ-1 та ВІЛ-2, гепатитів В та С перевіряють імуноферментним методом.

ToRCH інфекції (Toxoplasma gondii, вірус краснухи, цитомегаловірус, вірус простого герпесу 1 та 2 типів), сифілісу, ВІЛ-1 та ВІЛ-2, гепатитів В і С, токсоплазмозу та мікоплазми виконували у відповідності до затверджених інструкцій про застосування комерційних діагностичних препаратів для полімеразної ланцюгової реакції.

Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) визначали шляхом

культивування в напіврідкому агарі протягом 7-9 діб за методом Пайка і Робінсона у модифікації В.І. Грищенко та співавторів [5].

Фенотипування гемопоетичних клітин, що несуть на своїй поверхні маркери CD34+ CD 45+ і CD117+ CD 45+, проводили за методом проточної цитофлуориметрії по міжнародному протоколу ISHAGE на цитофлуориметрі Daко [22].

Для лікування хворих використовували клітинну суспензію з наступними параметрами: вміст ядровмісних клітин - від $0,11 \times 10^9$ до $3,7 \times 10^9$, кількість мононуклеарів 15-60%, КУО-ГМ - $50 \pm 10 \times 10^3$ /мл, вміст гемопоетичних клітин, що несуть на своїй поверхні маркери CD34+ CD 45+ і CD117+CD 45+ були, відповідно, $0,85 \pm 0,20\%$ та $1,52 \pm 0,39\%$. Життєздатність клітин – $80 \pm 10\%$.

СКК вводили внутрішньовенно повільно один раз на добу впродовж 5 діб, починаючи з другої доби після операції. Загальна кількість введеної кордової крові становила 50 ± 5 мл. Підбирали сумісні по групі крові та резус фактору СКК, які були виделені із зразків кордової крові.

Статистичну обробку отриманих даних проведено за Стьюдентом з визначенням t-критерію за програмою "BioStat".

Результати та їх обговорення

Результати дослідження впливу внутрішньовенного введення нативних стовбурових клітин кордової крові на метаболізм сполучної тканини у хворих з некротичним панкреатитом (основна група) наведені в таблиці.

До початку лікування концентрація в крові вільного оксипроліну у пацієнтів контрольної і основної груп перевищувала контроль відповідно в 2,0 і 2,1 разу, білковозв'язаного оксипроліну – на 18,4 і 26,9%, а коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін був на 40,3 і 38,1% меншим за контрольні величини. Водночас підвищувався вміст у крові маркерів деструкції протеогліканів і глікопротеїнів – відповідно: гексозамінів – в 2,1 і 2,3 разу, гексуронових кислот – в 2,4 і 2,5 разу, фукози, не зв'язаної з білками, – в 2,1 і 2,1 разу на тлі підвищення сироваткової концентрації сіалових кислот на 47,9 і 52,1%. Зазначені вище зміни показників метаболізму

сполучної тканини супроводжувались збільшенням колагенолітичної активності плазми крові відповідно в 3,4 і 3,6 рази.

Отже, у хворих на панкреонекроз контрольної і основної групи до початку лікування катаболізм сполучної тканини значно переважає інтенсивність ресинтезу колагену, протеогліканів і глікопротеїнів, що відбувається на тлі суттєвого підвищення плазмового колагенолізу.

Через 3 доби після операції у хворих контрольної групи рівень у крові вільного оксипроліну зменшувався на 22,8%, однак залишався вищим за контроль на 53,2%. Сироваткова концентрація білковозв'язаного оксипроліну достовірних змін не зазнавала, тоді як коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін знижувався на 28,7%. Вміст у крові гексозамінів збільшувався на 65,0%, фукози, незв'язаної з білками – на 93,6%. Сироваткові концентрації гексуронових кислот і сіалових кислот підвищувались відповідно в 2,1 і 1,4 рази на тлі збереження високої колагенолітичної активності плазми крові, яка, хоча і зменшувалась на 21,7%, залишалась в 2,6 рази вищою за таку у практично здорових осіб.

У ті самі строки спостереження у пацієнтів, яким внутрішньовенно вводили нативні стовбурові клітини кордової крові, рівень у крові вільного оксипроліну знижувався на 32,5% і був більшим за контрольні показники лише на 38,5%, тоді як вміст білковозв'язаного оксипроліну перевищував такі на 41,8%. Коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін збільшувався в 1,7 рази та відповідав контролю. Інтенсифікація процесів синтезу колагену супроводжувалась зменшенням сироваткових концентрацій маркерів розпаду сполучної тканини: гексозамінів – на 44,1%, гексуронових кислот – на 24,9%, фукози, не зв'язаної з білками – на 42,8%. Вміст у крові гексуронових кислот залишався на 88,25 вищим за контрольний рівень, сіалових кислот – нормалізувався, а колагенолітична активність плазми крові знижувалась в 2,5 рази і була більшою за контроль на 43,1%.

За результатами порівняльного аналізу, через 3 доби після операції в

зазначених групах хворих показники білковозв'язаного і вільного оксипроліну, коефіцієнта їх співвідношення та концентрацій в крові гексозамінів і гексурунових кислот практично не відрізнялись (рис. 1). Проте в разі застосування комплексного лікування з використанням нативних стовбурових клітин кордової крові вміст у плазмі крові сіалових кислот, фукози, незв'язаної з білками та колагенолітична активність плазми крові були відповідно в 1,5, 1,6 і 1,8 разу меншими (рис. 2), ніж у хворих контрольної групи.

Зазначені зміни біохімічних маркерів метаболізму сполучнотканинного матриксу свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення нативних стовбурових клітин кордової крові стосовно зниження інтенсивності розпаду компонентів сполучної тканини. Тим не менш, в обох випадках повної нормалізації показників метаболізму сполучної тканини не відбувалось, за винятком концентрації в крові сіалових кислот, яка й до початку лікування відповідала контролю. У хворих основної групи, крім того, досягали контрольного рівня такі показники, як коефіцієнт співвідношення білковозв'язаного і вільного оксипроліну та плазмова концентрація гексозамінів.

Через 7 діб після операції у хворих контрольної групи (див. табл.) відносно відповідних показників у практично здорових осіб залишались підвищеними сироваткові концентрації вільного оксипроліну – на 47,9%, гексозамінів – на 93,3%, гексурунових кислот – в 2,3 разу, сіалових кислот – на 34,4%, фукози, незв'язаної з білками, – на 97,6%. Колагенолітична активність крові перевищувала контрольні величини в 2,3 разу. Водночас у пацієнтів, яким внутрішньовенно вводили нативні стовбурові клітини кордової крові, вміст у крові вільного оксипроліну, гексозамінів, гексурунових кислот і колагенолітична активність плазми крові відповідали контролю, тоді як сироваткова концентрація білковозв'язаного оксипроліну і коефіцієнт співвідношення білковозв'язаного і вільного оксипроліну перевищували контрольні величини відповідно на 81,0 і 83,2%, а

концентрації в крові сіалових кислот і фукози, не зв'язаної з білками, виявились нижчими за такі у практично здорових осіб відповідно на 29,8 і 17,1%.

Для всіх біохімічних параметрів обміну сполучної тканини через 7 діб після операції характерною була суттєва міжгрупова різниця: у хворих на некротичний панкреатит, яким вводили нативні стовбурові клітини кордової крові, вміст у крові вільного оксипроліну, гексозамінів, гексуранових і сіалових кислот, фукози, незв'язаної з білками, та колагенолітична активність плазми крові були відповідно на 33,3, 46,4, 61,7, 47,8, 58,1 і 59,6% меншими за відповідні показники у пацієнтів, яким призначали стандартний комплекс лікувальних засобів, а сироватковий рівень білковозв'язаного оксипроліну і коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін, навпаки, в 1,8 і 2,7 разу більшими (рис. 3, 4).

Отже, отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення нативних стовбурових клітин кордової крові щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при некротичному панкреатиті.

Механізм дії кріоконсервованих стовбурових клітин пуповинної крові слід вважати результатом гуморальної стимуляції кровотворення реципієнтів, викликаній унікальною властивістю неонатальних клітин до аутокринної продукції гемопоетичних факторів росту, а також результатом тимчасового приживлення донорських клітин (як доказ – достовірне підвищення вмісту фетального гемоглобіну периферичної крові реципієнтів на 7-15 добу після трансфузії в порівнянні з вихідними даними) [6, 16]. Відсутність у реципієнтів пуповинної крові після трансфузійних реакцій – результат відносної толерантності її імунокомпетентних клітин, а також вірогідний критерій біологічної повноцінності кріоконсервування матеріалу [21, 24].

Порівняно з кістковим мозком в кордовій крові виявлено значне переважання клітин з фенотиповим профілем $CD34^+HLA-DR^-$. Відомо, що клітини крові з імунологічними маркерами $CD34^+HLA-DR^-$ проліферують

активніше, ніж клітини з імунофенотипом $CD34^+HLA-DR^+$, що підтверджено в експериментальних дослідженнях довгострокової гемопоетичної культури клітин *in vitro* [20, 23, 26]. Примітивні клітинні попередники з фенотипом $CD34^+CD38^-$ містяться як в пуповинній крові, так і в кістковому мозку [20, 25]. Однак, клітини кордової крові з маркерним набором $CD34^+CD38^-$ володіють більш високою клоногенною активністю, ніж кровотворні клітини того ж фенотипу, виділеного з кісткового мозку дорослих донорів. Крім того, клітини пуповинної крові з імунофенотипом $CD34^+CD38^-$ швидше проліферують у відповідь на стимуляцію цитокінами (IL-3, IL-6, G-CSF) і відтворюють в 7 раз більше колоній в довгострокових культурах, ніж клітини кісткового мозку [9].

При внутрішньовенному введенню стовбурових клітин кордової крові у 7 хворих відмічалася короткочасна температурна реакція на протязі трьох діб. При чому, температура тіла досягала $39^{\circ}C$ і після закінчення курсу введення стовбурових клітин нормалізувалася на протязі тижня. У одного хворого відмічалася гіперемія шкіряних покривів, яка проходила по закінченню введення стовбурових клітин.

З 20 пацієнтів контрольної група, які отримували стандартне лікування, померло 5 хворих, отже летальність досягала 25,0%. З 20 хворих, котрим трансплантували нативні стовбурові клітини кордової крові (основна група) померло 2, летальність становила 10%.

Проте найбільш важливим для проблеми гострого некротичного панкреатиту є те, що стовбурові клітини кордової крові, адаптуючись до умов мікрооточення та відповідаючи на місцеві органо- і тканинноспецифічні регуляторні сигнали, можуть виступати в ролі продуцента аутокринних стовбурових регуляторних медіаторів. Водночас, за тих самих умов стовбурові попередники можуть реалізовувати потенціал «пластичного будівельного» матеріалу, здатного до відновлення структур пошкоджених ділянок органів і тканин. Вже продемонструвано здатність стовбурових клітин кордової крові до спрямованої модифікації морфо-функціонального

статусу різних типів клітин [6, 24].

ВИСНОВКИ

1. У хворих на панкреонекроз до початку лікування катаболізм сполучної тканини значно переважає інтенсивність ресинтезу колагену, протеогліканів і глікопротеїнів, що відбувається на тлі суттєвого підвищення плазмового колагенолізу.

2. Отримані результати показали безпечність використання препаратів кріоконсервованих клітин пуповинної крові в схемі лікування хворих на некротичний панкреатит.

2. Через 3 доби в разі застосування комплексного лікування з використанням нативних стовбурових клітин кордової крові вміст у плазмі крові сіалових кислот, фукози, не зв'язаної з білками та колагенолітична активність плазми крові є відповідно в 1,5, 1,6 і 1,8 разу меншими, ніж у хворих контрольної групи. Через 7 діб після операції у хворих на панкреатит, яким вводили нативні стовбурові клітини кордової крові, вміст у крові вільного оксипроліну, гексозамінів, гексуранових і сіалових кислот, фукози, не зв'язаної з білками, та колагенолітична активність плазми крові є відповідно на 33,3, 46,4, 61,7, 47,8, 58,1 і 59,6% меншим за відповідні показники в пацієнтів, яким призначали стандартний комплекс лікувальних засобів, а сироватковий рівень білковозв'язаного оксипроліну і коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін, навпаки, в 1,8 і 2,7 разу більшими.

3. Отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення нативних стовбурових клітин кордової крові щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при некротичному панкреатиті. Летальність в контрольній групі досягала 25,0%, а в групі хворих, котрим трансплантували нативні стовбурові клітини кордової крові летальність становила 10%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопозитического потенциала // Трансфузиология.- 2003.- Т.4, №1.- С.15-33.
2. Бабійчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубова О.Л., Зубов П.М. Гемопозитические стволовые клетки кордовой крови: новые методы выделения и криоконсервирования // Трансплантологія. - 2007. - Т. 9, № 1. - С.13-15.
3. Бурневич С.З., Игнатенко Ю.Н., Кирсанов К.В. Прогноз и исходы хирургического лечения больных панкреонекрозом в свете современных представлений о патогенезе заболевания (сообщение 1) // Анналы хирургии. – 2004. – № 3. – С.30-32.
4. Велигоцкий Н.Н. Некоторые нерешенные вопросы классификации и лечебно-диагностической тактики при остром панкреатите / Н.Н.Велигоцкий, Б.С.Федак, А.Н.Велигоцкий [и др.] // Вестник клуба панкреатологов, 2010. - №3. – С. 36-38.
5. Грищенко В.І. Гемопозитичні клітини ембріональної печінки (ембріогенез, транспластація, криоконсервування / Грищенко В.І., Лобинцева Г.С., Вотякова А.І. [та ін.]. – Київ, 1988. – 34 с.
6. Климова Е.М. Использование гемопозитических прогенеторных клеток для иммунокоррекции у больных с острым панкреонекрозом / Е.М.Климова, И.А.Вотякова, Л.А.Шакина // «Журн. АМН України» – 2010. Т.16, додаток – С.81-82.
7. Коломоець М.Ю. Клінічне значення показників стану сполучної тканини при захворюваннях внутрішніх органів [навчальний посібник] / М.Ю.Коломоець, О.І.Федін. – Чернівці, 1997. – 95 с.
8. Криворучко И.А., Бойко В.В., Шевченко Р.С. и др. Патологические механизмы возникновения местных и системных осложнений острого панкреатита. – Клінічна хірургія. – 2003. – № 3. – С.58-62.
9. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопозитические стволовые клетки. – Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
10. Лобинцева Г.С. Патент (11) 46673 А, Україна, Спосіб консервування гемопозитичних клітин людини. - Бюл. №5 15.05.2002. Лобинцева Г.С. Патент №2233589, Россия. Способ криоконсервирования гемопозитических клеток человека, 2004.
11. Ломакін І.І., Бабійчук В.Г., Гайовий О.В., Сідоренко О.В. Застосування препарату гемокорд у терапії хронічного гепатиту. // Трансплантологія.- 2004.- №3, Т.7.- с.311-313.
12. Муравьева Л.А., Волков Е.Ю. Некоторые факторы слизистой защиты гастродуоденальной системы в различные сроки после ушивания прободных язв // Вопр. Мед. химии. - 1988. - №6. - С. 20-23.

13. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче // Лабор. дело. - 1979. - № 8. - С. 456 - 458.
14. Румянцев А.Л., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. / Руководство для врачей.- Москва: Мед. Инф. Агентство.- 2003.- 911 с.
15. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лаборатор. дело. - 1985. - №1. - С. 61-62.
16. Фомін П.Д., Шепетько Є.М., Смікодуб О.О. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин із метою корекції постгеморагічних анемії при виразкових кровотечах // Харківська хірургічна школа. – 2009. – Т. 33, №2.1. – С.175-177.
17. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Зворыгина Н.Г., Шинкарева Л.Ф. и др. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // Лаборатор. дело. - 1987. - №1. - С. 60-62.
18. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р., Сахабутдинова Е.П. и др. Метод определения фукозы, не связанной с белками // Клини. лаборатор. диагност. - 1997. - №4. - С. 17-18.
19. Almici C., Carbo-Stella C., Mangoni L. et al. Biologic and phenotypic analysis of early haematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P.339b.
20. Berardi A.C., Meffre E., Pflumio F. et al. Individual CD34⁺CD38^{low} CD19 CD10-progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes // Blood. – 1997. – Vol. 89. – P.3554-3564.
21. Broxmeyer H.E., Gordon G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable haematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P.3828-3832.
22. Gratama J.W., Menendez P., Kraan J., Orfao A. Loss of CD 34⁺ hemathopoietic cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocytes lysing reagents // J. Immunol. Methods. – 2000. – Vol. 239. – P.13-23.
23. Hao O.L., Shah A.J., Thiemam F.T. et al. A functional comparison of CD34⁺CD34⁻ cells in cord blood and bone marrow // Blood. – 1995. – Vol. 86, № 10. – P.3745-3753.
24. Ikuta K. Cord blood stem cell transplantation and cord blood bank // Nippon Rinsho. – 1998. – Vol. 56. – P.521-530.
25. Lu L.S., Wang S.J., Auerbach R. In vitro and in vivo differentiation into B cells, T cell, and myeloid cells of primitive yolk sac haematopoietic precursor cells expanded > 100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1996. – Vol. 93, № 25. – P.14782-14787.
26. Traynor A., Burt R.K. Haematopoietic stem cell transplantation for active systemic lupus erythaematosus // Rheumatology (Oxford). – 1999. – Vol. 38, № 8. – P.767-772.

РЕЗЮМЕ

КЕБКАЛО А.Б.

ВПЛИВ ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ НА

МЕТАБОЛІЗМ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ПАНКРЕОНЕКРОЗ

З метою визначення ефективності застосування стовбурових клітин кордової крові в комплексному лікуванні хворих на ПН обстежено 40 хворих з дослідженням метаболізму сполучної тканини. Встановлено, що у хворих на панкреонекроз до початку лікування катаболізм сполучної тканини значно переважає інтенсивність ресинтезу колагену, протеогліканів і глікопротеїдів, що відбувається на тлі суттєвого підвищення плазматичного колагенолізу. Через 3 доби в разі застосування комплексного лікування з використанням нативних стовбурових клітин кордової крові вміст у плазмі крові сіалових кислот, фукози, незв'язаної з білками та колагенолітична активність плазми крові є відповідно в 1,5, 1,6 і 1,8 разу меншими, ніж у хворих контрольної групи. Через 7 діб після операції у хворих на панкреатит, яким вводили нативні стовбурові клітини кордової крові, вміст у крові вільного оксипроліну, гексозамінів, гексуринових і сіалових кислот, фукози, не зв'язаної з білками, та колагенолітична активність плазми крові є відповідно на 33,3, 46,4, 61,7, 47,8, 58,1 і 59,6% меншим за відповідні показники в пацієнтів, яким призначали стандартний комплекс лікувальних засобів, а сироватковий рівень білковозв'язаного оксипроліну і коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін, навпаки, в 1,8 і 2,7 разу більшими. Отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення нативних стовбурових клітин кордової крові щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при некротичному панкреатиті. Летальність в контрольній групі досягала 25,0%, а в групі хворих, яким трансплантували нативні стовбурові клітини кордової крові, летальність становила 10%.

Ключові слова: панкреонекроз, кордова кров, стовбурові клітини, метаболізм сполучної тканини

РЕЗЮМЕ

КЕБКАЛО А. Б.

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ НА МЕТАБОЛИЗМ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ПАНКРЕОНЕКРОЗОМ

С целью определения эффективности применения стволовых клеток кордовой крови в комплексном лечении больных панкреонекрозом обследовано 40 больных, у которых изучался метаболизм соединительной ткани. Установлено, что у больных панкреонекрозом до начала лечения катаболизм соединительной ткани значительно преобладает интенсивность ресинтеза коллагена, протеогликанов и гликопротеидов, что происходит на фоне существенного повышения плазменного колагенолізу. Через 3 суток при применении комплексного лечения с использованием нативных стволовых клеток кордовой крови содержание в плазме крови сиаловых кислот, фукозы, несвязанной с белками и колагенолитической активности плазмы крови соответственно в 1,5, 1,6 и 1,8 раза меньше, чем у больных контрольной группы. Через 7 суток после операции у больных панкреатитом, которым вводили нативные стволовые клетки кордовой крови, содержание в крови свободного оксипролина, гексозаминов, гексуриновых и сиаловых кислот, фукозы, несвязанной с белками и колагенолитической активности плазмы крови соответственно на 33,3, 46,4, 61,7, 47,8, 58,1 и 59,6% меньше соответствующих показателей у пациентов, которым назначали стандартный комплекс лечебных средств, а сывороточный уровень белковосвязанного оксипролина и коэффициент соотношения белковосвязанный/свободный оксипролин, наоборот, в 1,8 и 2,7 раза больше. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности введения нативных стволовых клеток кордовой крови на стимуляцию соединительнотканых процессов пролиферативной репарации при панкреонекрозе. Летальность в контрольной группе составляла 25,0%, а в группе больных, которым трансплантировали

стволовые клетки кордовой крови, летальность составляла 10%.

Ключевые слова: панкреонекроз, кордовая кровь, стволовые клетки, метаболизм соединительной ткани.

SUMMARY

КЕВКАЛО АВ

EFFECT INTRAVENOUS STEM CELLS OF CORD BLOOD METABOLISM CONNECTIVE TISSUE IN PATIENTS WITH NECROTIC PANCREATITIS.

To determine the efficacy of cord blood stem cells in treatment of patients with necrotic pancreatitis were examined 40 patients with the study of metabolism of connective tissue. Found that in patients before treatment necrotic pancreatitis catabolism of connective tissue far outstrips intensity resynthesis of collagen, proteoglycans and glycoproteins, which occurs against the backdrop of the significantly increased plasma collagenolizum. After 3 days in the case of complex treatment using native cord blood stem cell content in blood plasma sialovyh acids, fukozy, not bound to proteins and collagenolitychna activity of blood plasma are respectively 1,5, 1,6 and 1,8 times lower than control group patients. After 7 days after surgery in patients with necrotic pancreatitis, which was injected native cord blood stem cells, blood content of free oxyprolyn, heksozaminiv, heksuronovyh and sialovyh acids, fukozy, not bound to proteins and collagenolitychna activity of blood plasma are respectively 33.3, 46.4, 61.7, 47.8, 58.1 and 59.6% lower than in the patients who were prescribed normal range of medicines, and serum level bound to proteins oxyprolyn and ratio bound to proteins/free oxyproline contrast, 1,8 and 2.7 times larger. The results show the high efficiency of intravenous injection of native cord blood stem cells for stimulation of connective tissue proliferative processes in pancreatic reparations.

Keywords: necrotic pancreatitis, cord blood, stem cells, connective tissue metabolism.

NATIONAL MEDICAL ACADEMY OF POSTGRADUATE EDUCATION (KIEV)

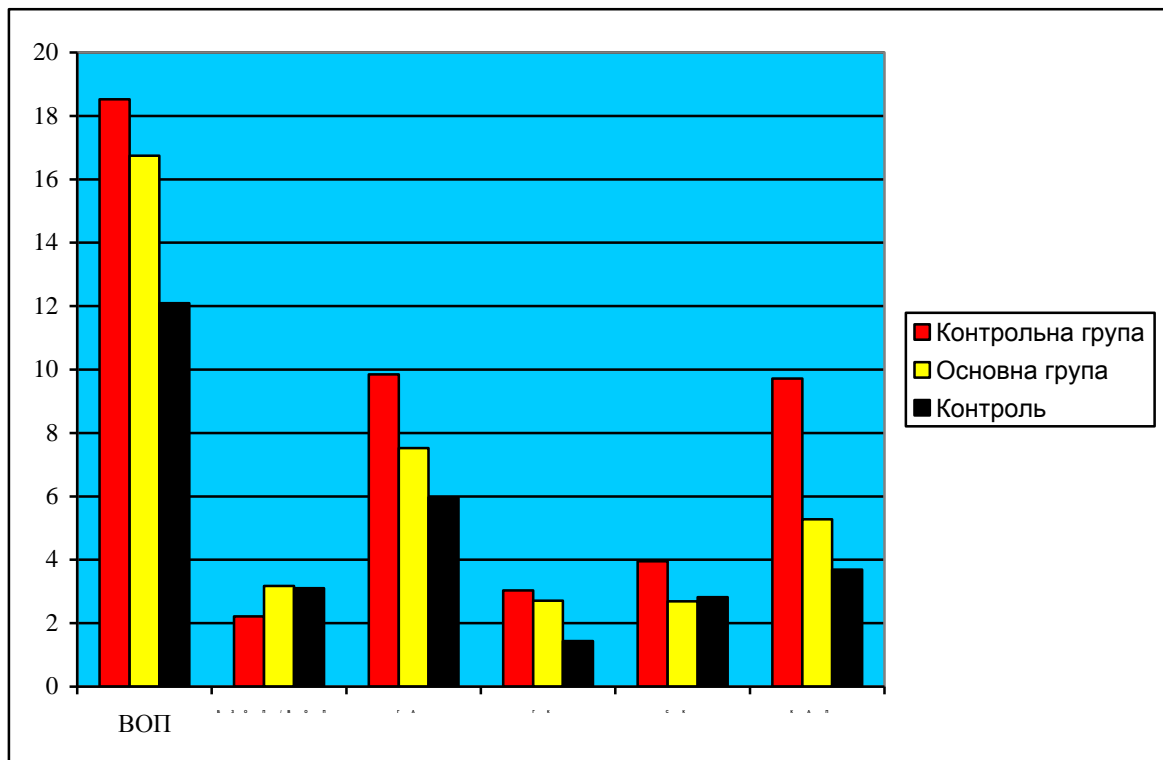


Рис 1. Зміни показників метаболізму сполучної тканини через 3 доби після операції у хворих на панкреатит контрольної і основної групи (% від контролю)

Примітки: ВОП – вільний оксипролін, БЗОП/ВОП – коефіцієнт співвідношення білковозв'язаного і вільного оксипроліну, ГА – гексозаміни, ГК – гексуронові кислоти, СК – сіалові кислоти, КАП – колагенолітична активність плазми крові

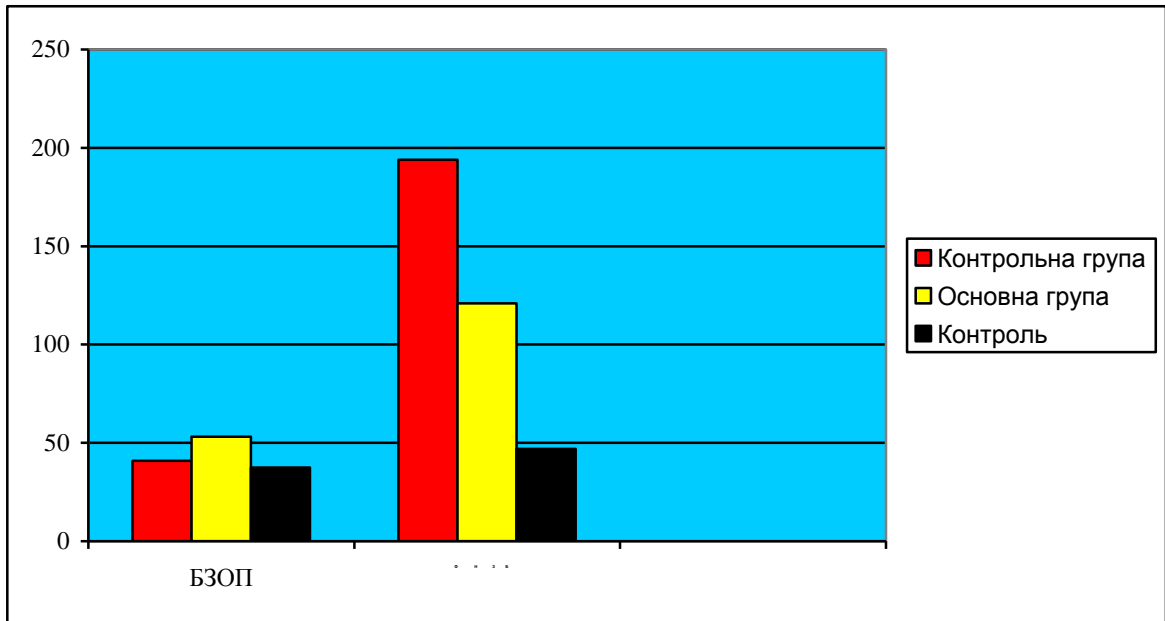


Рис 2. Зміни показників метаболізму сполучної тканини і колагенолітичної активності плазми крові через 3 доби після операції у хворих на панкреатит контрольної і основної групи (% від контролю)

Примітки: БЗОП – білковозв’язаний оксипролін ФНЗБ – фукоза, незв’язана з білками,

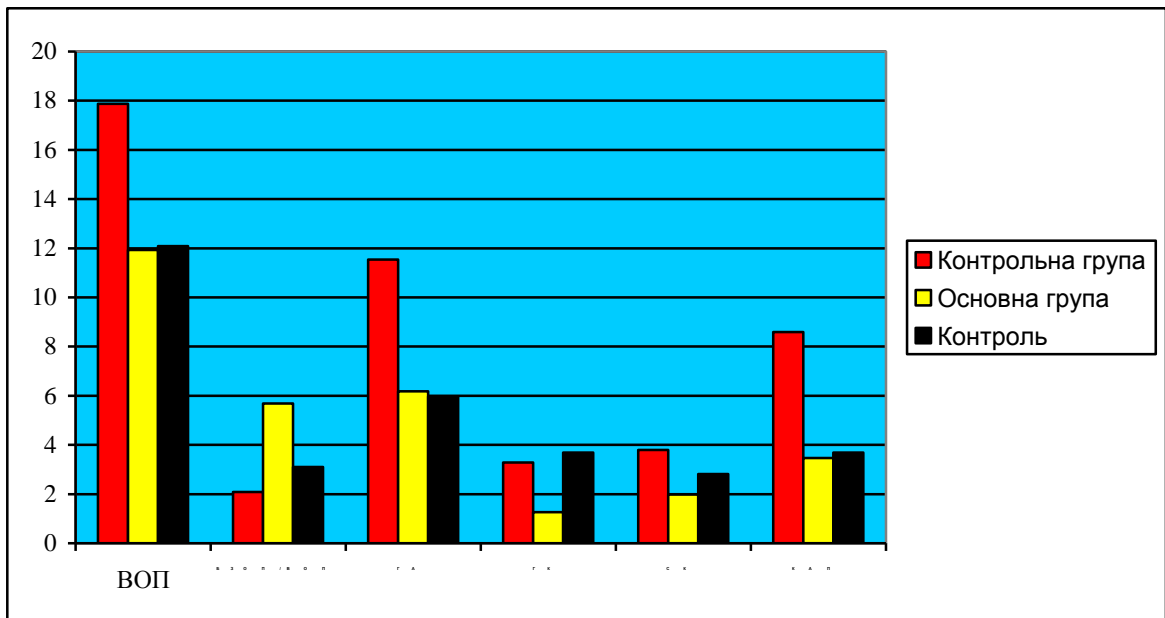


Рис 3. Зміни показників метаболізму сполучної тканини через 7 днів після операції у хворих на панкреатит контрольної і основної групи (% від контролю)

Примітки: ВОП – вільний оксипролін, БЗОП/ВОП – коефіцієнт співвідношення білковозв’язаного і вільного оксипроліну, ГА – гексозаміни, GK – гексуронові кислоти

СК – сіалові кислоти, КАП – колагенолітична активність плазми крові

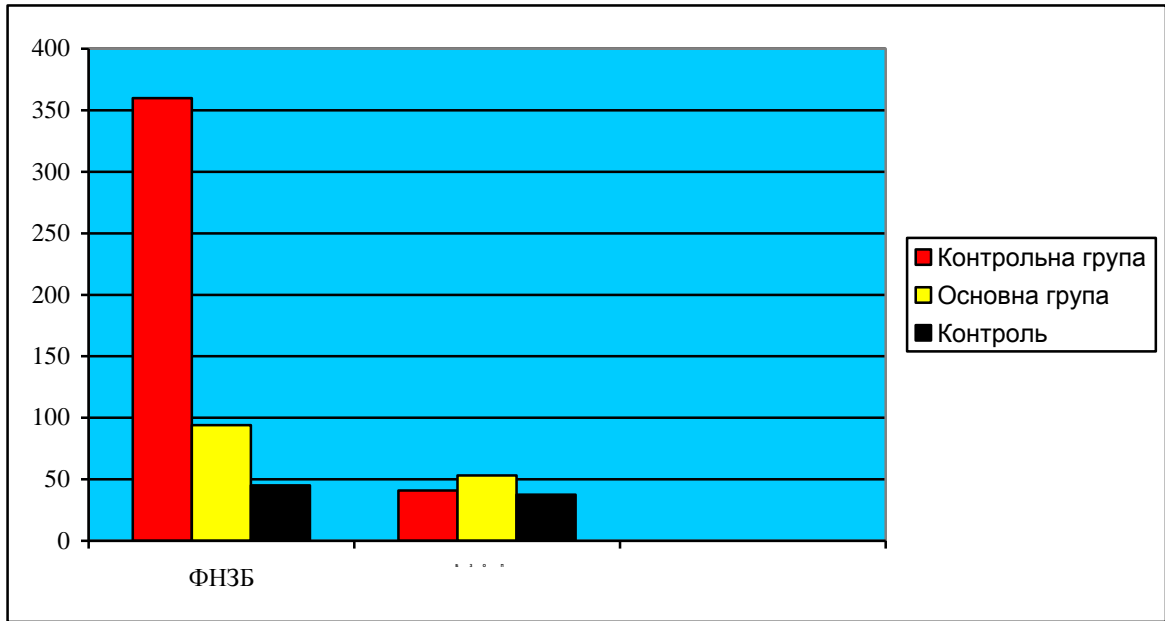


Рис 4. Зміни показників метаболізму сполучної тканини і колагенолітичної активності плазми крові через 7 днів після операції у хворих на панкреатит контрольної і основної групи (% від контролю)

Примітки: ФНЗБ – фукоза, не зв'язана з білками, БЗОП – білковозв'язаний оксипролін,

Динаміка змін показників метаболізму сполучної тканини у хворих на некротичний панкреатит, яким внутрішньовенно вводили нативні стовбурові клітини кордової крові ($\bar{x} \pm Sx$)

Групи хворих	Контроль (практично здорові люди) n=25	Контрольна група			Основна група		
		до операції n=20	через 3 доби після операції n=15	через 7 діб після операції n=15	до операції n=20	через 3 доби після операції n=20	через 7 діб після операції n=18
Вільний оксипролін, мкмоль/л	12,09±0,98	23,98±2,56 p<0,001	18,52±1,99 p<0,01 p ₁ >0,1	17,88±1,90 p<0,01 p ₁ >0,08	24,79±2,65 p<0,001 p _{K-O} >0,8	16,74±1,41 p<0,01 p ₂ <0,02 p _{K-O} >0,4	11,93±0,98 p>0,9 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,01
Білковозв'язаний оксипролін, мкмоль/л	37,45±1,98	44,35±4,16 p>0,1	40,96±3,98 p>0,4 p ₁ >0,5	37,16±3,82 p>0,9 p ₁ >0,2	47,51±4,30 p<0,05 p _{K-O} >0,5	53,10±5,06 p<0,01 p ₂ >0,4 p _{K-O} >0,08	67,80±6,93 p<0,001 p ₂ <0,02 p _{K-O} <0,01
Коефіцієнт співвідношення білково-зв'язаної та вільної фракцій оксипроліну, од.	3,10±0,17	1,85±0,20 p<0,001	2,21±0,23 p<0,01 p ₁ >0,2	2,08±0,21 p<0,001 p ₁ >0,4	1,92±0,18 p<0,001 p _{K-O} >0,7	3,17±0,36 p>0,8 p ₂ <0,01 p _{K-O} >0,05	5,68±0,53 p<0,001 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001
Гексозаміни, ммоль/л	5,97±0,31	12,39±1,09 p<0,001	9,85±0,97 p<0,001 p ₁ >0,1	11,54±0,93 p<0,001 p ₁ >0,5	13,45±1,26 p<0,001 p _{K-O} >0,5	7,52±0,80 p>0,05 p ₂ <0,001 p _{K-O} >0,07	6,18±0,58 p>0,7 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001
Гексуронові кислоти, ммоль/л	1,44±0,09	3,46±0,17 p<0,001	3,03±0,15 p<0,001 p ₁ >0,07	3,29±0,19 p<0,001 p ₁ >0,5	3,61±0,20 p<0,001 p _{K-O} >0,5	2,71±0,16 p<0,001 p ₂ <0,01 p _{K-O} >0,1	1,26±0,11 p>0,2 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001
Сіалові кислоти, ммоль/л	2,82±0,19	4,17±0,23 p<0,001	3,95±0,19 p<0,001 p ₁ >0,4	3,79±0,18 p<0,01 p ₁ >0,2	4,29±0,31 p<0,001 p _{K-O} >0,7	2,69±0,15 p>0,6 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001	1,98±0,10 p<0,001 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001
Фукоза, незв'язана з білками, мкмоль/л	123,51±5,06	256,03±11,74 p<0,001	239,17±12,46 p<0,001 p ₁ >0,3	244,10±13,62 p<0,001 p ₁ >0,5	261,92±12,00 p<0,001 p _{K-O} >0,7	149,83±6,55 p<0,01 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001	102,39±4,81 p<0,01 p ₂ <0,001 p _{K-O} <0,001

Продовження

Групи хворих Показники, що досліджувались	Контроль (практично здорові люди) n=25	Контрольна група			Основна група		
		до операції n=20	через 3 доби після операції n=15	через 7 діб після операції n=15	до операції n=20	через 3 доби після операції n=20	через 7 діб після операції n=18
Колагенолітична активність плаз- ми крові, мкмоль/ 1 за 1 год	3,69±0,33	12,41±1,08 p<0,001	9,72±0,38 p<0,001 p1<0,05	8,59±0,54 p<0,001 p1<0,01	13,15±1,26 p<0,001 pK-O>0,6	5,28±0,36 p<0,01 p2<0,001 pK-O<0,001	3,47±0,25 p>0,6 p2<0,001 pK-O<0,001

Примітки:

p – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; p₁ – ступінь достовірності різниць показників до та після операції у хворих контрольної групи; p₂ – ступінь достовірності різниць показників до та після операції у хворих основної групи; p_{K-O} – ступінь достовірності різниць показників у контрольній та основній групах у відповідні періоди спостереження; n – число спостережень.