

Клітинна та тканинна терапія в комплексному лікуванні хворих на панкреонекроз

А.Б.Кебкало, Г.С.Лобинцева, В.А.Шаблій

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика
(ректор — член-кор. НАМН України, професор Ю.В.Вороненко),
Інститут клітинної терапії (директор — С.І.Мартиненко)
Київ, Україна

Дослідження проведені у хворих на панкреонекроз, які отримували стандартне лікування (контрольна група — 35 пацієнтів) або терапію із застосуванням біомедичних технологій (основна група — 19 хворих) — пацієнти, яким внутрішньовенно вводили стовбурові клітини кордової крові та виконували парпанкреатичну трансплантацію кордової тканини. Отримані результати показали безпечність та ефективність використання препаратів кріоконсервованих клітин пуповинної крові та пуповини в схемі лікування хворих на некротичний панкреатит. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові та пуповини не викликає побічних ефектів та покращує місцевий імунітет та репаративні процеси в сполучній тканині навколо підшлункової залози.

Ключові слова: панкреонекроз, кордова кров, стовбурові клітини, кордова тканина, метаболізм сполучної тканини, місцевий імунітет.

Вступ

Актуальність проблеми лікування некротичного панкреатиту (НП) або панкреонекрозу зумовлена високою летальністю, яка становить, за даними різних авторів, від 30 до 60% та розвитком ускладнень, що зумовлюють високий відсоток інвалідизації населення працездатного віку [13]. Незважаючи на помітні успіхи в лікуванні НП, тенденції до зниження або стабілізації захворюваності не спостерігається [4, 16, 17]. Водночас залишаються невирішеними питання вибору адекватної консервативної терапії, термінів операційних втручань, способів їх здійснення, методів стимуляції процесів репаративної регенерації.

Останнім часом в лікуванні різноманітних захворювань людини застосовується кордова кров, яка містить більше стовбурових гемопоетичних клітин, ніж дорослий кістковий мозок [1], і є доступним джерелом стовбурових клітин, які мають високий проліферативний потенціал та ефективно використовуються для лікування ряду захворювань без підбору HLA-ідентичного донора [6]. Проте в лікуванні панкреонекрозу стовбурові клітини кордової крові (СККК) в комплексі з тканиною пуповини до цього часу не використовувались. Пуповина містить судини, оточуючу сполучну

тканину та Варнов студень, які містять велику кількість гіалуронової кислоти. Клітинні елементи представлені фібробластами, тучними клітинами, гістоцитами та ін. Обґрунтованням для використання пуповини є багаточисельні роботи, які говорять про високий вміст мезенхімальних мультипотентних стовбурових та ендотеліальних прогеніторних клітин. Їх можна виділяти ферментативним шляхом та вирощувати в культурі, при цьому автори спостерігали високий рівень стабільності фенотипу та позитивний ефект при трансплантації в ішемізований орган на експериментальних тваринах [19-21]. Враховуючи особливості патології, в нашому випадку доцільно використовувати не клітинну масу, а тканину для закриття області некроза та підвищення потенціалу репаративної регенерації пошкодженого органа в післяопераційний період.

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 виз-

начено наказом МОЗ України від 10.10. 2007 року № 630 «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань». Дослідження виконано в межах клінічних виробувань «Оцінка клінічної ефективності клітинних і тканинних трансплантатів у комплексному лікуванні хворих на панкреонекроз» та затвердженого Координаційним центром трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України.

Мета роботи — визначити вплив внутрішньовенного введення стовбурових клітин кордової крові та парапанкреатичної трансплантації пуповини на локальні зміни імунітету та репаративні процеси у хворих на панкреонекроз.

Матеріали та методи дослідження

Для класифікації панкреатиту використовували класифікацію Атланти (1992). Дослідження проведені у хворих на панкреонекроз, які отримували стандартне лікування (контрольна група — 35 пацієнтів) або терапію із застосуванням біомедичних технологій (основна група — 19 хворих) — пацієнти, яким внутрішньовенно вводили стовбурові клітини кордової крові та виконували парапанкреатичну трансплантацію кордової тканини.

Із 35 хворих контрольної групи 5 (14,3%) мали абсцес підшлункової залози, 4 (11,4%) асептичний панкреонекроз, 26 (74,3%) інфікований панкреонекроз. У 19 пацієнтів із основної групи абсцес підшлункової залози було діагностовано у 2 хворих (10,5%), асептичний панкреонекроз — у 2 (10,5%), інфікований панкреонекроз — у 15 хворих (79%). Ускладнення у вигляді гострого оментобурсита було у 44 (81,5%) хворих, ферментативний перитоніт у 37 (68,5%) хворих, некротичне ураження заочеревинної клітковини у 33 (61,1%) пацієнтів. Тяжкість стану оцінювали за шкалою APACHE II [10]. У хворих контрольної групи показник становив $15,90 \pm 0,47$ балів, а в основній групі — $15,60 \pm 0,62$ балів ($p > 0,7$). Хворим основної групи та контрольної групи використовували на першому етапі лікування малоінвазивні втручання (МІВ) під контролем ультразвука. МІВ виконували на апараті «Pro focus 2202» (BK medical). Використовували пункційну голку Chibo №18-20. Ексудат брали на дослідження.

Починаючи з 7-10 дня захворювання всім хворим було виконане черезшкірне дренирування рідинних утворень дренажем типа «pig tail» 14-16F із постійною санацією некротичних вог-

нищ та з використанням антисептичних розчинів. Після виконання МІВ хворим основної групи на 2-3 добу трансплантували стовбурові клітини кордової крові. Вивчали в динаміці вміст, який отримували при пункції рідинних утворів навколо підшлункової залози.

Усі хворі обстежені під час МІВ та на 2-3-ю, 4-7-у, 10-14-у доби після малоінвазивного втручання і на 2-3-ю, 4-7-у доби після відкритого оперативного втручання.

Для визначення ефективності використання клітинної терапії у хворих з некротичними ураженнями підшлункової залози проведено цитологічне дослідження із зони ураженої підшлункової залози, біохімічне дослідження ексудату черевної порожнини (баланс між католічними процесами в сполучній тканині визначали за вмістом вільного і білковозв'язаного оксипроліну, коефіцієнтом їх співвідношення, вмістом гексозамінів) [8], вивчена фагоцитарна активність та фагоцитарне число, перитонеальних макрофагів, базальна генерація інтерлейкіну-1 β , ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1 β .

Вміст у ексудаті вільного оксипроліну (ВОП) вимірювали за методикою Тетянець С.С. [15], білковозв'язаного оксипроліну (БЗОП) — за Осадчук М.А. [12], гексозамінів (ГА) — за П.Н.Шараєвим та співавт. [18]. Визначали в перитонеальній рідині фагоцитарний індекс (ФІ) та фагоцитарну активність (ФА) за А.В.Карауловим [5]. Аналіз вмісту цитокінів у перитонеальній рідині проводили на імуноферментному аналізаторі «УНИПЛАН-М» (Росія) наборами реагентів «ProCon IL-1 β » (ООО «ПРОТЕИНОВЫЙ КОНТУР», Росія), екстракцію цитокінів проводили на мікроколонках C₂ Amprep™ (Великобританія). Вивчення ранового ексудату проводили шляхом мікроскопічного дослідження мазків-відбитків ран за методом Д.М.Штейнберга (1948) [14].

СККК отримували на безкоштовній основі з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії» (директор — С.І.Мартиненко). Пуповинну кров збирали при нормальних пологах у жінок, що були обстежені на наявність вірусних та гемічних інфекцій (тестування на сифіліс, гепатит С, HbsAg, ВІЛ-інфекцію). Всі жінки підписували інформовану згоду.

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

Для кріоконсервування використовували 5% ДМСО, який приготували на збалансовано-

му соляному розчині Хенкса. До концентрату ядровмісних клітин, який містить СККК, додавали у пропорції 1:1 10% розчин ДМСО. Суспензію перемішували і за допомогою одноразових шприців розливали в кріоампули об'ємом по 4,5 мл та по 1 мл — в 4 контейнера-супутника, 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 1/2 і антигена вірусу гепатита В імуноферментним методом. Концентрацію клітин підраховували за допомогою клітинного аналізатора або візуально під мікроскопом в лічильній камері Горяєва.

Кріоконсервування клітин проводили за допомогою програмного заморожувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах кріоконсервування і виконувати ініціювання процесу кристалізації за певної температури, для усунення явища переохолодження в кріоампулах (контейнерах) за трьохетапною програмою (методика Г.С.Лобинцевої) [10]. Зберігали заморожені зразки в рідкому азоті при температурі -196°C в кріосховищі «38Kw/Крюс Controler». Тканину пуповини промивали в фізіологічному розчині з канаміцином, розрізали вздовж та попереку на фрагменти довжиною по 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 р. «Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів консервованого кісткового мозку, плазмозамінюючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі».

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 співавт. [2]. Фенотипування гемопоетичних клітин, які несуть на своїй поверхні маркери CD34+ CD 45+ і CD117+ CD 45+, проводили за методом проточної цитофлуориметрії за міжнародним протоколом ISHAGE на цитофлуориметрі Dako [23].

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 мар-

кери CD34+ CD 45+ і CD117+CD 45+, були, відповідно, $0,85 \pm 0,20\%$ та $1,52 \pm 0,39\%$. Життєздатність клітин — $80 \pm 10\%$.

СККК вводили внутрішньовенно повільно один раз на добу впродовж 3-5 діб, починаючи з другої доби після малоінвазивного втручання або операції. Загальна кількість введеної кордової крові становила 50 ± 5 мл. Підбирали сумісні по групі крові та резус фактору СККК, які були виділені із зразків кордової крові.

У хворих, яким виконували відкрите оперативне втручання, виконували тимчасову трансплантацію кордової тканини навколо підшлункової залози та в парапанкреатичну клітковину. Після виконання широкого доступу до сальникової сумки через lig. gastrocolica видаляли некротичні тканини з парапанкреатичного простору та вільно лежачих секвестрів з підшлункової залози. Абдомінацію підшлункової залози робили за стандартною методикою. Видаляли тільки вільно розташовані секвестри методом дигітоклазії. Розморожували 3-4 зразка кордової тканини. За допомогою ниток вивертали пуповинний канатик внутрішньою стороною назовні. Нитки не зрізували. Товщина кордової тканини — до 1 см. Трансплантацію кріоконсервованої тканини пуповинного канатика проводили на залишкову тканину підшлункової залози з усіх боків та в парапанкреатичний простір через люмботомний розтин. Нитки виводили назовні. Фіксували кордову тканину марлевими тампонами в сальниковій сумці. За допомогою ниток, якими прошивали канатик, через 2-3 дні видаляли трансплантат кордової тканини. Під час етапної санації тимчасову трансплантацію кордової тканини повторювали знову по методиці зазначеній вище. Таким чином виконано до 3 процедур.

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

Результати дослідження та їх обговорення

Показанням для введення СККК було підвищення місцевого розпаду сполучної тканини та зниження місцевого імунітету. Показаннями до відкритого оперативного втручання у хворих з некротичним панкреатитом були наявність вільно розташованих секвестрів в проекції підшлункової залози та парапанкреатичної ділянки, підвищені показники прокальцитонінового тесту (більше 2 нг/мл) та С-реактивного білку (більше 192 мг/мл) без тенденції до зниження.

Результати дослідження метаболізму сполучної тканини у пацієнтів контрольної групи та у

Таблиця 1

Динаміка змін показників тканинного метаболізму сполучної тканини у хворих на панкреонекроз, яким внутрішньовенно вводили стовбурові клітини кордової крові ($x \pm Sx$)

Групи хворих	Етапи дослідження	Вільний оксипролін, мкмоль/л	Білковозв'язаний оксипролін, мкмоль/л	Б/В оксипролін, од.	Гексозаміни, ммоль/л
Контрольна	МІВ	10,21±1,25	42,12±3,18	4,12±0,27	6,84±0,87
	через 2-3 доби після МІВ (n=35)	17,12±1,89 p<0,01	40,96±3,98 p>0,4	2,39±0,25 p<0,01	9,95±0,91 p<0,001
	через 7 діб після МІВ (n=35)	19,28±1,91 p<0,01	34,06±2,82 p<0,01	1,76±0,22 p<0,001	11,94±0,82 p<0,001
	через 14 діб після МІВ (n=35)	21,19±1,7 p<0,01	30,98±3,2 p<0,01	1,46±0,18 p<0,001	14,24±0,4 p<0,001
Основна	МІВ	11,25±1,19	41,75±3,91	3,71±0,20	6,49±0,67
	через 2-3 доби після МІВ (n=19)	16,14±1,43 p<0,01	43,10±5,06 p>0,4	2,67±0,36 p<0,01	8,48±0,74 p<0,05
	через 7 діб після МІВ (n=19)	14,53±0,67 p<0,05	57,80±5,81 p<0,01	3,98±0,53 p>0,5	7,78±0,41 p<0,05
	через 14 діб після МІВ (n=19)	10,83±0,97 p>0,9	67,80±6,93 p<0,001	6,28±0,73 p<0,001	6,08±0,51 p>0,7

Примітки: Б/В оксипролін — коефіцієнт співвідношення білковозв'язаної та вільної фракцій оксипроліну, од., p — ступінь достовірності різниць показників відносно даних в день операції; n — кількість хворих в групі.

хворих, яким внутрішньовенно вводили стовбурові клітини кордової крові після МІВ з приводу некротичного панкреатиту наведені в табл. 1.

Через 2-3 доби після операції у хворих контрольної групи рівень в грануляційній тканині вільного оксипроліну збільшувався на 67,7% (p<0,01) порівнянно з інтрапункційними показниками. Тканинна концентрація білковозв'язаного оксипроліну достовірних змін не зазнавала, тоді як коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін знижувався на 72,4% (p<0,01). Вміст у крові гексозамінів збільшувався на 31,3% (p<0,001). У хворих основної групи на 2-3 добу після МІВ під контролем ультразвуку відбувалися такі зміни, як і в контрольній групі, тобто переважав розпад колагенових волокон та основної речовини сполучної тканини. На 2-3-ю добу після дренивання парапанкреатичного простору в підключичну вену вводили стовбурові клітини кордової крові.

За цих умов, через 7 та 14 діб після призначення хворим контрольної групи стандартного комплексу лікування не зменшувався рівень вільного оксипроліну в тканині і наприкінці спостереження вільна фракція оксипроліну була в 1,89 (p<0,01) та в 2,14 (p<0,01) раз більшою, ніж вихідні дані. У пацієнтів основної групи тканинна концентрація вільного оксипроліну через 14 діб після МІВ зменшувалась і відповідала вихідному рівню (p>0,9).

У хворих контрольної групи рівень в тканині білковозв'язаного оксипроліну впродовж 14 діб післяпункційного лікування знижувався і був меншим за вихідні величини на 26,6% (p<0,01).

У хворих основної групи на 7-у та 14 добу після МІВ спостерігалось перманентне підвищення тканинної концентрації білковозв'язаного оксипроліну на 38,6% (p<0,01) та на 62,5 % (p<0,001) від початкового показника.

Коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін при стандартному лікуванні виявився нижчим за вихідні дані в 2,8 раз (p<0,001) наприкінці спостереження. Проте у разі використання в комплексному лікуванні трансплантації стовбурових клітин кордової крові співвідношення вільної і білковозв'язаної фракцій оксипроліну через 14 діб після операції перевищувало вихідні показники в 1,69 рази (p<0,001).

Динаміка змін тканинної концентрації гексозамінів у хворих контрольної групи характеризувалась її поступовим збільшенням через 7 та 14 діб після дренивання в 1,75 раз (p<0,001) та в 2,08 (p<0,001) відповідно до вихідного рівня, тоді як у пацієнтів основної групи рівень в тканині гексозамінів знижувався і на 14-у добу після МІВ його величина не відрізняється від вихідних даних (p>0,7).

Таким чином, зазначені зміни біохімічних маркерів метаболізму сполучнотканинного матриксу свідчать про високу ефективність застосування клітинної і тканинної терапії у хворих на некротичний панкреатит та характеризується активацією процесів ресинтезу колагену та зменшенням концентрацій маркерів розпаду компонентів сполучної тканини.

Отже, отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення стовбурових клітин кордової крові щодо

Динамика показників функціональної активності перитонеальних макрофагів у хворих на панкреонекроз (n=35) контрольної групи (x±Sx)

Показники, що досліджувались	Період спостереження			
	1 (МІВ)	2-3 доба після МІВ	4-7 доба після МІВ	10-12 доба після МІВ
Фагоцитарна активність, %	76,13±4,51	51,98±3,90 p<0,05	70,69±4,66 p>0,4	57,16±4,10 p<0,05
Фагоцитарне число, од.	5,07±0,47	4,12±0,49 p<0,05	4,83±0,43 p>0,3	4,12±0,49 p<0,05
Базальна генерація інтерлейкіну-1β, пг/ 1 мл за 1 год	113,78±9,55	98,66±7,19 p<0,05	115,40±10,73 p>0,1	105,40±8,73 p>0,1
Ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1β, пг/ 1 мл за 1 год	186,00±8,98	161,16±7,48 p<0,05	191,58±9,55 p>0,6	178,58±7,55 p>0,6

Примітки: p — ступінь достовірності різниць показників відносно даних в день операції; n — кількість хворих в групі.

стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при панкреонекрозі.

У хворих на панкреонекроз ми вважали за доцільне дослідити зміни функціональної активності резидентних клітин, що забезпечують захист організму на локальному рівні, у даному випадку — перитонеальних макрофагів. Оскільки адекватний контроль в цьому разі отримати практично неможливо, було вивчено динаміку змін параметрів, що характеризують функцію перитонеальних макрофагів, у ті періоди, коли забір ексудату черевної порожнини був показаний за стандартами ведення післяопераційного періоду після дренування навколопанкреатичного простору. У хворих на панкреонекроз контрольної групи (табл. 2) на 2-3-ю добу після МІВ в ексудаті фагоцитарна активність та фагоцитарне число перитонеальних макрофагів зменшувались на 31,8% (p<0,05) та на 18% (p<0,05) відповідно початкового рівня. Базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β та ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1β на 2-3 добу після дренування парапанкреатичних утво-

рень зменшувалась на 13,2% (p<0,05) та на 13,3 (p<0,05) відносно показників отриманих при початковій пункції.

На 4-7-у добу після дренування рідинних утворень навколо підшлункової залози такі показники, як фагоцитарна активність, фагоцитарне число, базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β, ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1β не відрізнялись від початкового рівня. На 10-12 добу дослідження рівень фагоцитарної активності та фагоцитарне число зменшувались на 24,9% (p<0,05) та на 14% (p<0,05), а показники базальної генерації перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β та ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1β достовірно не відрізнялись від показників початкового рівня.

В разі застосування в комплексному лікуванні трансплантації нативних стовбурових клітин кордової крові на 4-7-у добу після дренування рідинних утворень навколо підшлункової залози фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів підвищувалась на 27,5% (p<0,01), фагоцитарне число — на 42,7% (p<0,01), базальна

Таблиця 3

Динамика показників функціональної активності перитонеальних макрофагів у хворих на панкреонекроз (n=19) після введення нативних стовбурових клітин кордової крові (x±Sx)

Показники, що досліджувались	Період спостереження			
	1 (МІВ)	2-3 доба після МІВ	4-7 доба після МІВ	10-12 доба після МІВ
Фагоцитарна активність, %	72,98±3,25	79,77±3,72 p>0,1	93,05±4,10 p<0,01	103,15±4,21 p<0,01
Фагоцитарне число, од.	4,89±0,38	5,50±0,36 p>0,2	6,98±0,42 p<0,01	7,71±0,32 p<0,01
Базальна генерація інтерлейкіну-1β, пг/ 1 мл за 1 год	109,36±4,97	123,21±5,28 p>0,07	131,68±5,79 p<0,01	184,28±6,19 p<0,01
Ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1β, пг/ 1 мл за 1 год	177,43±6,45	190,21±8,95 p>0,2	224,09±10,81 p<0,01	319,89±11,14 p<0,01

Примітки: p — ступінь достовірності різниць показників відносно даних в день операції; n — кількість хворих в групі.

Таблиця 4
Результати вивчення мазків-відбитків

Типцитограм	Контрольна група		Основна група	
	3 доба	7 доба	3 доба	7 доба
Некротичний	19	6		
Запальний	10	18	6	2
Регенераторний		5	7	11

генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1 β — на 20,4% ($p < 0,01$), ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1 β — на 26,3% ($p < 0,01$). Через 10-12 діб фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів підвищувалась на 41,4% ($p < 0,01$), фагоцитарне число — на 57,7% ($p < 0,01$), базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1 β — на 68,5% ($p < 0,01$), ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1 β — на 80,2%. ($p < 0,01$) (табл. 3).

У 52 прооперованих хворих з некротичним панкреатитом вивчали мазки-відбитки з зони ураженої підшлункової залози на 3 та 7 добу. У 13 хворих з панкреонекрозом використовували клітинну терапію у вигляді трансплантації стовбурових клітин кордової крові та тимчасову трансплантацію кордової тканини. У контрольній групі було 29 хворих, яким проводилось стандартне консервативне лікування в післяопераційному періоді.

Як бачимо з табл. 4, на третю добу після оперативного втручання в контрольній групі переважає некротичний тип цитограми, який складає 65,5%, а кількість цитограм запального типу — 34,5%. Не виявлено жодної цитограми регенеративного типу. В групі хворих, яким вводили стовбурові клітини кордової крові та трансплантували кордову тканину, через 3 доби не виявлено ні одного відбитка з цитограмою некротичного типу. Запальний тип відмічався у 46,1% випадків, регенераторний — у 53,9%.

На 7 добу післяопераційного періоду в контрольній групі хворих переважає запальний тип цитограми (62,1%), а некротичний тип відбитків складає 20,6%. Регенераторний тип цитограми в контрольній групі хворих, що отримували стандартне консервативне лікування, займає третю сходинку і становить всього 17,3%. В основній групі хворих з використанням клітинної та тканинної терапії переважає регенераторний тип цитограми відбитків із зон ураженої підшлункової залози і дорівнює 84,6%, а запальний складає 15,4%. У той же час некротичного типу цитограм на 7-у добу в основній групі не виявлено.

Таким чином, протягом тижня у хворих контрольної групи переважає перша фаза раньового процесу (фаза запалення) в ділянці ураженої

підшлункової залози. Тільки у 17,3% випадків є перехід в фазу регенерації раньового процесу. У 84,6% хворих, які отримували стовбурові клітини кордової крові та трансплантування кордової тканини, згідно даних відбитків з зони ураженої підшлункової залози, виявлено перехід раньового процесу в другу фазу — регенерації, утворення та дозрівання грануляційної тканини.

У 6 (31,5%) хворих після трансплантації СКК не було відмічено прогресу захворювання і вони виписувались із стаціонару на 19 ± 3 день захворювання. У 13 (68,5%) хворих на другому етапі лікування через 30 ± 4 днів після початку захворювання було виконане відкрите оперативне втручання.

Оперативне втручання виконувалось через серединний доступ. Як правило проводилась некрсеквестректомія підшлункової залози та заочеревинної клітковини з „відкритими» (у 13 хворих) дренажними операціями. У 8 хворих була виконана одна відкрита операція, у 3 — два оперативних втручання, у 2 — три релапаротомії. У трьох із дев'ятнадцяти хворих трансплантацію СКК виконували вдруге на 2-3 добу після операції. Показанням до повторної трансплантації було збільшення показників катаболізму сполучної тканини та зменшення імунологічної реактивності організму після оперативного втручання. Введення СКК проводили не менше ніж через 14 діб після першої трансплантації. Термін перебування хворих після другого етапу оперативного втручання становив 14 ± 3 днів. В основній групі померло 2 хворих від поліорганної недостатності, показник летальності становив 10,5%. Середній вік померлих хворих — 72 ± 7 роки.

В контрольній групі у 6 (17,1%) хворих після МІВ під контролем ультразвуку не відмічалось прогресування хвороби і вони були виписані з стаціонару на 26 ± 4 добу захворювання. У 29 (82,9%) хворих на другому етапі лікування через 23 ± 3 доби було виконане відкрите оперативне втручання. Термін перебування хворих після другого етапу оперативного втручання становив 25 ± 5 діб. В контрольній групі померло 7 хворих, летальність склала 20%. П'ятеро хворих померло від поліорганної недостатності, двоє хворих від панкреатогенного сепсису. Середній вік померлих хворих — 45 ± 10 років.

Отже, отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення СКК та парапанкреатичної трансплантації кордової тканин щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при некротичному панкреатиті.

Виходячи з вищесказаного показанням для трансплантації стовбурових клітин кордової

крові та кордової тканини є пригнічення процесів проліферативної репарації в ділянці підшлункової залози та місцевого імунітету при некротичному панкреатиті.

Механізм дії кріоконсервованих СКК слід вважати результатом гуморальної стимуляції репаративних процесів та зниження лімфоцитотоксичності, що викликано унікальною властивістю неонатальних клітин, цитокінів та факторів росту в препараті [3, 9, 11], а також результатом можливого тимчасового приживлення донорських клітин. Відсутність у реципієнтів пуповинної крові після трансфузійних реакцій — результат відносної толерантності її імунокомпетентних клітин, а також вірогідний критерій біологічної повноцінності кріоконсервованого матеріалу

Проте найбільш важливим для проблеми гострого деструктивного панкреатиту є те, що СККК, адаптуючись до умов мікрооточення та відповідаючи на місцеві органо- і тканинносцифічні регуляторні сигнали, можуть виступати в ролі продуцента аутокринних стовбурових регуляторних медіаторів. Водночас, за тих самих умов стовбурові попередники можуть реалізувати потенціал «пластичного будівельного» матеріалу, здатного до відновлення структур пошкоджених ділянок органів і тканин [22].

Авторами показана імунотропна дія СККК [7]. Вже продемонстровано здатність СККК до спрямованої модифікації морфофункціонального статусу різних типів клітин.

При трансплантації кордової тканини ефект досягається через місцеву дію в результаті можливої міграції стовбурових ендотеліальних та мезенхімальних клітин, які в великій кількості знаходяться на внутрішній поверхні пуповини, а також за рахунок гемостатичної дії в результаті виділення факторів фібриногенезу. Висока вірогідність того, що СККК стимулюють облітерацію панкреатичних протоків, попереджують утворення постнекротичних підшлункових норичь та кіст.

Література

1. Абдулкадыров К.М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А. // Трансфузиология. — 2003. — Т.4, №1. — С.15-33.
2. Грищенко В.І. Гемопоетичні клітини ембріональної печінки (ембріогенез, транспластація, кріоконсервування / Грищенко В.І., Лобинцева Г.С., Вотякова А.І. [та ін.]. — Київ, 1988. — 34 с.
3. Демчук М.П. Імунорегуляторний вплив стовбурових клітин в хворих на ревматоїдний артрит / Демчук М.П., Смикодуб О.І. // Трансплантологія. — 2007. — Т. 9, № 1. — С.69-71.
4. Иванов Ю.В. Современные аспекты диагностики и лечения панкреонекроза / Иванов Ю.В., Алехнович А.В. // *Анналы хирургии*. — 2004. — № 2. — С.48-52.
5. Караулов А.В. Клиническая иммунология / А.В. Караулов. — М.: Медицинское информационное агенство, 1999. — 604 с.
6. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. Тема выпуска: пуповинная кровь. — 2006. — Т.3, №1. — 111 с.
7. Климова Е.М. Использование гемопоэтических прогениторных клеток для иммунокоррекции у больных с острым панкреонекрозом / Климова Е.М., Вотякова И.А., Шакина Л.А. // *Журн. АМН України*. — 2010. — Т.16, додаток. — С.81-82.

Висновки

Отримані результати показали безпечність та ефективність використання препаратів кріоконсервованих клітин пуповинної крові та пуповини в схемі лікування хворих на некротичний панкреатит. Достовірне зростання тканинної концентрації вільного оксипроліну, гексозамінів та зменшення вмісту білковозв'язаного оксипроліну вказує на активацію місцевого запального процесу в підшлунковій залозі починаючи з 3-ї доби. Зниження показників вільного оксипроліну, гексозамінів та збільшення білковозв'язаного оксипроліну на 14 добу говорить про нормалізацію деструктивних процесів та активацію репаративної регенерації. У 84,6% хворих, які отримували стовбурові клітини кордової крові та трансплантування кордової тканини, згідно даних відбитків з зони ураженої підшлункової залози, виявлено через 7 діб перехід раннього процесу в другу фазу — регенерації, утворення та дозрівання грануляційної тканини. Реакція клітинної ланки системи неспецифічної резистентності на запалення черевної порожнини у хворих на панкреонекроз контрольної групи є пригніченою. Застосування трансплантації нативних стовбурових клітин кордової крові в комплексному лікуванні хворих на панкреонекроз сприяє помірному підвищенню відносної кількості функціонально активних нейтрофілів та збільшує їх фагоцитуючу спроможність. Базальна та ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1 β перитонеальними макрофагами через 14 діб збільшувалась на 68,5% та 80,2% відповідно до контрольного рівня. Отже, показанням для трансплантації стовбурових клітин кордової крові та кордової тканини є пригнічення процесів проліферативної репарації в ділянці підшлункової залози та місцевого імунітету при некротичному панкреатиті.

8. Коломоєць М.Ю. Клінічне значення показників стану сполучної тканини при захворюваннях внутрішніх органів [навчальний посібник] / Коломоєць М.Ю., Федін О.І. — Чернівці, 1997. — 95 с.
9. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. — Черновцы: Золоті литаври, 2004. — 505 с.
10. Лобинцева Г.С. Патент (11) 46673 А, Україна, Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини. — Бюл. №5 15.05.2002. Лобинцева Г.С. Патент №2233589, Россия. Способ криоконсервирования гемопоэтических клеток человека, 2004.
11. Ломакін І.І. Застосування препарату гемокорд у терапії хронічного гепатиту / Ломакін І.І., Бабійчук В.Г., Гайовий О.В., Сідоренко О.В. // Трансплантологія. — 2004. — №3, Т.7. — С.311-313.
12. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче / Осадчук М.А. // Лабор. дело. — 1979. — №8. — С. 456-458.
13. Острый панкреатит. Патологическая физиология и лечение / Бойко В.В., Криворучко И.Л., Шевченко Р.С. [и др.] — Харьков: Триада, 2002. — 258 с.
14. Теория и практика местного лечения гнойных ран / Безуглая Е.П., Белов С.Г., Гунько В.Г. [и др.]; под редакцией Б.М. Даценко. — Киев: Здоровья, 1995. — 384 с.
15. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / Тетянец С.С. // Лаборатор. дело. — 1985. — №1. — С. 61-62.
16. Филин В.И. Неотложная панкреатология / Филин В.И., Костюченко А.Л. // СПб.: Деан, 2000. — 480 с.
17. Шалімов О.О. Лікування гострого панкреатиту / Шалімов О.О., Кричевський У.В., Ничитайло М.Ю. // Клінічна хірургія. — 2000. — № 4. — С. 5-9.
18. Шараев П.Н. Метод определения фукозы, не связанной с белками / Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р. [и др.] // Клини. лаборатор. диагност. — 1997. — №4. — С. 17-18.
19. Abdallah B.M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications / Abdallah B.M., Kassem M. // Gene Therapy. — 2008. — Vol. 15, № 2. — P. 109-116.
20. Alp C. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells / Alp C., Karahuseyinoglu S. // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25. — №11. — P. 2886-2895.
21. Cao Fu-jiang. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury / Cao Fu-jiang, Feng Shi-qing // Chin. Med. J. — 2009. — Vol. 122. — P. 225-231.
22. Deasy B.M. High harvest yield, high expansion and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue // Deasy B.M., Schugar R.C., Chirieleison S.M. [et al.]. // J. Biomed. Biotech. — 2009. — Vol. 2009, Article ID 789526, 11 p.
23. 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.

А.Б.Кебкало, Г.С.Лобинцева, В.А.Шаблій. Кордова кров'я і пуповина в комплексному ліченні больних с панкреонекрозом. Киев, Україна.

Ключевые слова: панкреонекроз, кордовая кров'я, стволовые клетки, кордовая ткани, метаболізм соединительной ткани, местный иммунитет.

Исследования проведены у больнх панкреонекрозом, получавших стандартное лечение (контрольная группа — 35 пациентов) или терапию с применением биомедицинских технологий (основная группа — 19 больнх) — пациенты, которым внутривенно вводили стволовые клетки кордовой кров'я и выполняли паранкреатическую трансплантацию кордовой ткани. Полученные результаты показали безопасность и эффективность использования препаратов криоконсервированных клеток пуповинной кров'я и пуповины в схеме лечения больнх некротическим панкреатитом. Таким образом, трансплантация стволовых клеток кордовой кров'я и пуповины не вызывает побочных эффектов и улучшает местный иммунитет и репаративные процессы в соединительной ткани вокруг поджелудочной железы.

A.B.Kebkalo, G.S.Lobintseva, V.A.Shabliy. Cord blood and umbilicum in the complex treatment of patients with pancreatic necrosis. Kyiv, Ukraine.

Key words: pancreatonecrosis, cord blood stem cells, cord tissue, connective tissue metabolism, local immunity.

The studies were performed in patients with pancreatonecrosis, who received the standard treatment (control group 35 patients) or treatment with the use of biomedical technologies (main group 19 patients) — the patients, who had intravenously injected stem cells of cord blood and performed the parapancreatic transplantation of the cord tissue. The results showed the safety and efficacy of using the drugs of cryopreserved cells of umbilical blood and umbilical in the scheme of treatment of necrotic pancreatitis patients. Thus, transplantation of stem cells and umbilical cord blood does not cause side effects and improves the local immunity and reparative processes in the connective tissue around the pancreas. Thus, the transplantation of stem cells of cord blood and of umbilical no side effects and improves the local immunity and reparative processes in the connective tissue around the pancreas.

Надійшла до редакції 11.12.2010 р.