

er, and secondary neuroprotection influencing mainly on regenerative-reparative processes in neurocytes and neuroglia, was investigated experimentally. The brain trauma was carried out by the free falling load on the fixed head of animal.

Four experimental series were executed in all: without treatment, with the use of primary neuroprotection, secondary neuroprotection and its combinations. The common amount of animals in the experiment was 200 white rats. The best results was obtained in the forth group with the complex treatment.

Mortality was in the 1st group — 74%, second series — 18%, in the 3rd — 24% and in the fourth mortality was 16,6%.

Надійшла до редакції 24.02.2012 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасєва, 2012
УДК 616.37 — 002 — 02: 616 — 002.1

Використання пуповинної крові та пуповинного канатика в комплексному лікуванні хворих на некротичний панкреатит

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

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика, Інститут клітинної терапії, КЗ КОР «Київська обласна клінічна лікарня»
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 пуповинної крові та виконували парапанкреатичну трансплантацію пуповинної тканини. 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 третьої 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 пуповинної крові та трансплантування пуповинної тканини, згідно з даними відбитків із зони ураженої підшлункової залози, виявлено через 7 діб перехід раньового 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 пуповинної крові в комплексному лікуванні хворих на панкреонекроз сприяє підвищенню відносної кількості функціонально активних нейтрофілів та збільшує їх фагоцитуючу спроможність. Базальна та ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1 перитонеальними макрофагами через 14 діб збільшувалась на 68,5% та 80,2% відповідно до контрольного рівня. Отже, трансплантація стовбурових клітин пуповинної крові та пуповини не викликає побічних ефектів та покращує місцевий імунітет і репаративні процеси в сполучній тканині навколо підшлункової залози.

Ключові слова: некротичний панкреатит, пуповинна кров, стовбурові клітини, пуповинний канатик, 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 у лікуванні різноманітних захворювань людини застосовується пуповинна 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 пуповинної крові (СКПК) в комплексі з тканиною пуповинного канатика до цього часу не використовувались. Пуповина містить судини, оточуючу сполучну тканину та Варнов студень, які містять велику кількість гіалуронової кислоти. Клітинні елементи представлені фібробластими, тучними клітинами, гістоцитами та ін. Обґрунтуванням для використання пуповинного канатика є багаточисленні 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 некрозу та підвищення потенціалу репаративної регенерації пошкодженого органа в післяопераційному періоді.

В Україні застосування стовбурових клітин дозволено Законом «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини» та регламентовано на рівні клінічних випробувань постановою КМУ від 5 вересня 2007 р. №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 р. №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 дослідження було визначити вплив внутрішньовенного введення стовбурових клітин пуповинної крові та парапанкреатичної трансплантації пуповинного канатика на локальні зміни імунітету та репаративні процеси у хворих на некротичний панкреатит.

Матеріали та методи дослідження

Для класифікації НП 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 СКПК та виконували парапанкреатичну трансплантацію пуповинного канатика.

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 основної групи абсцес підшлункової залози був діагностований у 2 (10,5%) хворих, асептичний панкреонекроз — у 2 (10,5%), інфікований панкреонекроз — у 15 (79%) хворих. Ускладнення у вигляді гострого оментобурситу 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 $15,90 \pm 0,47$ бала, а в основній групі — $15,60 \pm 0,62$ бала ($p_k > 0,7$). Хворим основної та контрольної груп 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. Екседат брали на дослідження.

Починаючи з 7-10 дня захворювання всім хворим було виконане черезшкірне дренирування рідинних утворень дренажем типу «pig tail» 14-16F із постійною санацією некротичних вогнищ та з використанням антисептичних

розчинів. Після виконання МІВ хворим основної групи на 2-3 добу трансплантували СКПК. Вивчали в динаміці вміст, який отримували при пункції рідинних утворів навколо підшлункової залози.

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

Для визначення ефективності використання клітинної терапії у хворих з некротичними ураженнями підшлункової залози нами проведено: цитологічне дослідження із зони ураженої підшлункової залози, біохімічне дослідження ексудату черевної порожнини (баланс між католічними і анаболічними процесами в сполучній тканині визначали за вмістом вільного і білковозв'язаного оксипроліну, коефіцієнтом їх співвідношення, вмістом гексозамінів) [8], вивчення фагоцитарної активності та фагоцитарного числа, перитонеальних макрофагів, базальної генерації інтерлейкіну-1 β , ендотоксиніндукованої продукції інтерлейкіну-1 β .

Вміст в ексудаті вільного оксипроліну (ВОП) вимірювали за методикою С.С.Тетянець [15], білковозв'язаного оксипроліну (БЗОП) — за М.А.Осадчук [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 » (ТОВ «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].

СКПК отримували на безкоштовній основі з банку пуповинної крові ТОВ «Институт 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). Усі жінки підписували інформовану згоду.

Пуповинну кров сепарували шляхом 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, який приготували на збалансованому соляному розчині Хенкса. До концентрату ядровмісних клітин, який містить СКПК, до-

давали в пропорції 1:1 10% розчин ДМСО. Суспензію перемішували і за допомогою одноразових шприців розливали в кріоампулы об'ємом по 4,5 мл та по 1 мл в 4 контейнера-супутника, герметизували, маркували.

Крім того, 2 мл клітинної суспензії надавали на бактеріологічний контроль, 1 мл — для визначення вірусної контамінації методом полімеразної ланцюгової реакції, 2 мл — для визначення антитіл гепатиту С, трепанеми, ВІЛ 1/2 і антигену вірусу гепатиту В імуноферментним методом. Концентрацію клітин підраховували за допомогою клітинного аналізатора або візуально під мікроскопом у 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 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/Kryos Controler».

Тканину пуповини промивали у фізіологічному розчині з канаміцином, розрізали вздовж та поперек 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 05.07.1999 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 в 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 Daiko [23].

Для лікування хворих використовували клітинну суспензію з наступними параметрами: вміст ядровмісних клітин — від 0,11*10⁹ до 3,7*10⁹, кількість мононуклеарів — 15-60%, КУО-ГМ — 50±10*10³/мл, вміст гемопоетичних клітин, що несуть на своїй поверхні мар-

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

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

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

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

СКПК вводили внутрішньовенно повільно один раз на добу впродовж 3-5 діб починаючи з другої доби після МІВ або операції. Загальна кількість введеної пуповинної крові становила 50±5 мл. Підбирали сумісні за групою крові та резус-фактором СКПК, які були виділені із зразків пуповинної крові.

У хворих, яким виконували відкрите оперативне втручання, виконували тимчасову трансплантацію пуповини навколо підшлункової залози та в парапанкреатичну клітковину. Після виконання широкого доступу до сальникової сумки через lig. gastocolica видаляли некротичні тканини з парапанкреатичного простору та вільно лежачих секвестрів з підшлункової залози. Абдомінізацію підшлункової залози робили за стандартною методикою. Видаляли тільки вільно розташовані секвестри методом дигітоклазії. Розморожували 3-4 зразки пуповинного канатика. За допомогою ниток вивертали його внутрішньою стороною назовні. Нитки не зрізували. Товщина пуповинного канатика — 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 пуповину марлевими тампонами в сальниковій сумці. За допомогою ниток, якими прошивали канатик, через 2-3 дні видаляли трансплантат пуповинного канатика. Під час етапної санації тимчасову трансплантацію пуповини повторювали знову за методикою, зазначеною вище. Таким чином виконано до трьох процедур.

Статистичну обробку отриманих даних проведено за Ст'юдентом з визначенням t-критерію за програмою «BioStat».

Результати дослідження та їх обговорення

Показаннями для введення СКПК були підвищення місцевого розпаду сполучної тканини та зниження місцевого імунітету.

Показаннями до відкритого оперативного втручання у хворих з НП були: наявність вільно розташованих секвестрів у проекції підшлункової залози та парапанкреатичної ділянки, підвищені показники прокальцитонінового тесту (більше 2 нг/мл) та С-реактивного білка (більше 192 мг/мл) без тенденції до зниження.

Результати дослідження метаболізму сполучної тканини у пацієнтів контрольної групи та у хворих, яким внутрішньовенно вводили СКПК після МІВ з приводу НП наведені в табл. 1.

Через 2-3 доби після операції у хворих контрольної групи рівень у грануляційній тканині вільного оксипроліну збільшувався на 67,7% (p<0,01) порівняно з інтрапункційними показниками. Тканинна концентрація БЗОП 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 ультразвука відбувалися також зміни, як і в контрольній групі, тобто переважав розпад колагенових волокон та основної речовини сполучної тканини. На 2-3 добу після дренивання парапанкреатичного простору в підключичну вену вводили СКПК.

За цих умов через 7 та 14 діб після призначення хворим контрольної групи стандартно-

Динамика показників функціональної активності перитонеальних макрофагів у хворих на некротичний панкреатит (n=35) контрольної групи ($\bar{x} \pm Sx$)

Показники, що досліджувались	Період спостереження			
	1 доба (МІВ)	2-3 доба після МІВ	4-7 доба після МІВ	10-12 доба після МІВ
ФА, %	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
ФЧ, 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-1 β , 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-1 β , 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 у день операції; n — кількість хворих у групі.

го комплексу лікування не зменшувався рівень вільного оксипроліну в тканині, і наприкінці спостереження вільна фракція оксипроліну була в 1,89 (p<0,01) та 2,14 рази (p<0,01) 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 у тканині БЗОП впродовж 14 діб після пункційного лікування знижувався і був меншим за вихідні величини на 26,6% (p<0,01). У хворих основної групи на 7 та 14 добу після МІВ спостерігалось перманентне підвищення тканинної концентрації БЗОП на 38,6% (p<0,01) та на 62,5% (p<0,001) від початкового показника.

За результатами порівняльного аналізу, коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін при стандартному лікуванні виявився нижчим за вихідні дані в 2,8 рази (p<0,001) наприкінці спостереження. Проте у разі використання в комплексному лікуванні трансплантації СКПК 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 (p<0,001) та 2,08 (p<0,001) рази відповідно до вихідного рівня, тоді як у пацієнтів основної групи рівень у тканині гексозамінів знижувався і на 14 добу після МІВ не відрізнявся 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 НП та характеризується активацією процесів ресинтезу колагену та зменшенням

концентрацій маркерів розпаду компонентів сполучної тканини.

Отже, отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення СКПК щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при панкреонекрозі.

У хворих на НП 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 у 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 дренивання навколопанкреатичного простору. У хворих на панкреонекроз контрольної групи (табл. 2) на 2-3 добу після МІВ в ексудаті фагоцитарна активність та фагоцитарне число перитонеальних макрофагів зменшувались на 31,8% (p<0,05) та 18% (p<0,05) відповідно початкового рівня. Базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1 β та ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1 β на 2-3 добу після дренивання парапанкреатичних утворень зменшувались на 13,2% (p<0,05) та 13,3% (p<0,05) відносно показників, отриманих при початковій пункції.

На 4-7 добу після дренивання рідинних утворень навколо підшлункової залози такі показники, як ФА, ФЧ, базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1 β , ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1 β , не відрізнялись від початкового рівня. На 10-12 добу дослідження рівень ФА та ФЧ зменшувались на 24,9% (p<0,05) та 14% (p<0,05), а показники базальної генерація пе-

Динаміка показників функціональної активності перитонеальних макрофагів у хворих на некротичний панкреатит (n=19) після введення нативних стовбурових клітин пуповинної крові (x±Sx)

Показники, що досліджувались	Період спостереження			
	1 доба (МІВ)	2-3 доба після МІВ	4-7 доба після МІВ	10-12 доба після МІВ
ФА, %	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
ФЧ, 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 у день операції; n — кількість хворих у групі.

ритонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β та ендотоксиніндукована продукція інтерлейкіну-1β достовірно не відрізнялись від показників початкового рівня.

У разі застосування в комплексному лікуванні трансплантації нативних СКПК на 4-7 добу після дренування рідинних утворень навколо підшлункової залози ФА перитонеальних макрофагів підвищувалась на 27,5% (p<0,01), ФЧ — на 42,7% (p<0,01), базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β — на 20,4% (p<0,01), ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1β — на 26,3% (p<0,01). Через 10-12 діб ФА перитонеальних макрофагів підвищувалась на 41,4% (p<0,01), ФЧ — на 57,7% (p<0,01), базальна генерація перитонеальними макрофагами інтерлейкіну-1β — на 68,5% (p<0,01), ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1β — на 80,2%. (p<0,01) (табл. 3).

У 52 прооперованих хворих з НП вивчали мазки-відбитки із зони ураженої підшлункової залози на 3 та 7 добу. У 13 хворих з панкреонекрозом використовували клітинну терапію у вигляді трансплантації СКПК та тимчасову трансплантацію пуповинного канатика. У контрольній групі було 29 хворих, яким проводилось стандартне консервативне лікування в післяопераційному періоді.

На 3 добу після оперативного втручання в контрольній групі переважає некротичний тип цитограми, який складає 65,5%, а кількість цитогам запального типу — 34,5%. Ми бачимо, що не виявлено жодної цитограми регенеративного типу. У групі хворих, яким вводили СКПК та трансплантували пуповинну тканину, через 3 доби не виявлено жодного 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 час коли некротичного типу цитогам на 7 добу в основній групі не виявлено.

Таким чином, протягом тижня у хворих контрольної групи переважає перша фаза ранового процесу (фаза запалення) в ділянці ураженої підшлункової залози. Тільки у 17,3% випадків є перехід у фазу регенерації ранового процесу. У 84,6% хворих, які отримували СКПК та трансплантування пуповини, згідно з даними відбитків із зони ураженої підшлункової залози, виявлено перехід ранового процесу в другу фазу — регенерації, утворення та дозрівання грануляційної тканини.

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

Оперативне втручання виконувалось через серединний доступ. Як правило, проводилась некресквестректомія підшлункової залози та заочеревинної клітковини з «відкритими» (у 13 хворих) дренуючими операціями. У 8 хворих була виконана одна відкрита операція, у 3 — два оперативних втручання, у 2 — три релапаротомії. У 3 із 19 хворих трансплантацію СКПК 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 СКПК проводили не менш ніж через 14 діб після першої трансплантації. Термін перебування хворих після другого етапу оперативного втручання становив 14 ± 3 дні. В основній групі померло 2 хворих від поліорганної недостатності, показник летальності становив 10,5%. Середній вік померлих хворих — 72 ± 7 років.

У контрольній групі у 6 (17,1%) хворих після МІВ під контролем ультразвука не відмічалось прогресування хвороби, і вони були виписані зі 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. У контрольній групі померло 7 хворих, летальність склала 20%. 5 хворих померли від поліорганної недостатності, 2 хворих — від панкреатогенного сепсису. Середній вік померлих хворих — 45 ± 10 років.

Отже, отримані результати свідчать про високу ефективність внутрішньовенного введення СКПК та парапанкреатичної трансплантації пуповинного канатика щодо стимуляції сполучнотканинних процесів проліферативної репарації при НП.

Виходячи з вищесказаного, показанням для трансплантації СКПК та пуповини є пригнічення процесів проліферативної репарації в ділянці підшлункової залози та місцевого імунітету при НП.

Механізм дії кріоконсервованих СКПК слід вважати результатом гуморальної стимуляції репаративних процесів та зниження лімфоцитотоксичності, що викликано унікальною властивістю неонатальних клітин, цитокинів 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 СКПК, 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 імуотропна дія СКПК [7]. Вже продемонстровано здатність СКПК до спрямованої модифікації морфофункціонального статусу різних типів клітин.

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

Висновки

Отримані результати показали безпечність та ефективність використання препаратів кріоконсервованих клітин пуповинної крові та пуповини в схемі лікування хворих на некротичний панкреатит. Достовірно зростання тканинної концентрації вільного оксипроліну, гексозамінів та зменшення вмісту білковозв'язаного оксипроліну вказує на активацію місцевого запального процесу в підшлунковій залозі починаючи з третьої 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 пуповинної крові та трансплантування пуповинного канатика, згідно з даними відбитків із зони ураженої підшлункової залози, виявлено через 7 діб перехід раньового 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 пуповинної крові в комплексному лікуванні хворих на некротичний панкреатит сприяє помірному підвищенню відносної кількості функціонально активних нейтрофілів та збільшує їх фагоцитуючу спроможність. Базальна та ендотоксиніндукована генерація інтерлейкіну-1 перитонеальними макрофагами через 14 діб збільшувалась на 68,5% та 80,2% відповідно до контрольного рівня. Отже, показанням для трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові та пуповини є пригнічення процесів проліферативної репарації в ділянці підшлункової залози та місцевого імунітету при некротичному панкреатиті.

Література

1. Абдулкадыров К.М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / К.М.Абдулкадыров, Н.А.Романенко // Трансфузиология. — 2003. — Т.4, №1. — С. 15-33.
2. Гемопоетичні клітини ембріональної печінки (ембріогенез, трансплантація, криоконсервування) / В.І.Грищенко, Г.С.Лобинцева, А.І.Вотякова [та ін.]. — Київ, 1988. — 34 с.
3. Демчук М.П. Імунорегуляторний вплив стовбурових клітин в хворих на ревматоїдний артрит / М.П.Демчук, О.І.Смикодуб // Трансплантологія. — 2007. — Т.9, №1. — С. 69-71.
4. Иванов Ю.В. Современные аспекты диагностики и лечения панкреонекроза / Ю.В.Иванов, А.В.Алехнович // Анналы хирургии. — 2004. — №2. — С. 48-52.
5. Караулов А.В. Клиническая иммунология / А.В.Караулов. — М.: Медицинское информационное агентство, 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 / Е.М.Климова, И.А.Вотякова, Л.А.Шакина // Журнал АМН України. — 2010. — Т.16 (додаток). — С. 81-82.
8. Коломоець М.Ю. Клінічне значення показників стану сполучної тканини при захворюваннях внутрішніх органів: навч. посібник / М.Ю.Коломоець, О.І.Федін. — Чернівці, 1997. — 95 с.
9. Кухарчук А.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А.Л.Кухарчук, В.В.Радченко, В.М.Сирман. — Черновцы: Золоті лаври, 2004. — 505 с.
10. Лобинцева Г.С. Патент (11) 46673 А, Україна. Спосіб консервування гемопоетичних клітин людини. — Бюл. №5 15.05.2002. Г.С.Лобинцева Патент №2233589, Россия. Способ криоконсервирования гемопоэтических клеток человека, 2004.
11. Застосування препарату гемокорд у терапії хронічного гепатиту / І.І.Ломакін, В.Г.Бабійчук, О.В.Гайовий, О.В.Сідоренко // Трансплантологія. — 2004. — Т.7, №3. — С. 311-313.
12. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче / М.А.Осадчук // Лабор. дело. — 1979. — №8. — С. 456-458.
13. Острый панкреатит. Патопизиология и лечение / В.В.Бойко, И.Л.Криворучко, Р.С.Шевченко [и др.]. — Харьков: Триада, 2002. — 258 с.
14. Теория и практика местного лечения гнойных ран / Е.П.Безуглая, С.Г.Белов, В.Г.Гуныко [и др.]; под ред. Б.М.Даценко. — Киев: Здоровье, 1995. — 384 с.
15. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С.С.Тетянец // Лаборатор. дело. — 1985. — №1. — С. 61-62.
16. Филін В.И. Неотложная панкреатология / В.И.Филін, А.Л.Костюченко. — СПб.: Деан, 2000. — 480 с.
17. Шалімов О.О. Лікування гострого панкреатиту / О.О.Шалімов, У.В.Кричевський, М.Ю.Ничитайло // Клінічна хірургія. — 2000. — №4. — С. 5-9.
18. Метод определения фукозы, не связанной с белками / П.Н.Шараев, Н.С.Стрелков, Р.Р.Кильдиярова [и др.] // Клин. лаборатор. диагност. — 1997. — №4. — С. 17-18.
19. Abdallah B.M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications / B.M.Abdallah, M.Kassem // Gene Therapy. — 2008. — Vol. 15. — №2. — 109-116 p.
20. Alp Can M.D. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells / M.D.Alp Can, Sercin Karahuseyinoglu // 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 // Chinese Medical Journal. — 2009 — Vol. 122 (2) — P. 225-231.
22. High harvest yield, high expansion and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue // B.M.Deasy, R.C.Schugar, S.M.Chirieleison [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. — 2009. — Vol. 6. — 11 p.
23. Loss of CD 34⁺ hemathopoietic cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocytes lysing reagents / J.W.Gratama, P.Menendez, J.Kraan, A.Orfao // J. Immunol. Methods. — 2000. — Vol. 239. — P. 13-23.

А.Б.Кебкало, Г.С.Лобынцев, В.И.Семиног, В.А.Шаблій. Использование пуповинной крови и пуповинного канатика в комплексном лечении больных с некротическим панкреатитом. Киев, Украина.

Ключевые слова: некротический панкреатит, пуповинная кровь, стволовые клетки, пуповинный канатик, метаболизм соединительной ткани, местный иммунитет.

Исследования проведены у больных панкреонекрозом, получавших стандартное лечение (контрольная группа — 35 пациентов) или терапию с применением биомедицинских технологий (основная группа — 19 больных) — пациенты, которым внутривенно вводили стволовые клетки кордовой крови и выполняли парапанкреатическую трансплантацию кордовой ткани. Полученные результаты показали безопасность и эффективность использования препаратов криоконсервированных клеток пуповинной крови и пуповины в схеме лечения больных некротическим панкреатитом. Достоверный рост тканевой концентрации свободного оксипролина, гексозаминов и изменения белковосвязанного оксипролина указывают на активацию местно-

го воспалительного процесса в поджелудочной железе начиная с третьих суток. Снижение показателей свободного оксипролина, гексозаминов и увеличение белковосвязанного оксипролина на 14 сутки говорит о нормализации деструктивных процессов и активации репаративной регенерации. У 84,6% больных, которые получали стволовые клетки кордовой крови и трансплантацию кордовой ткани, согласно данным отпечатков из зоны пораженной поджелудочной железы, выявлен через 7 суток переход раневого процесса во вторую фазу — регенерации, образования и созревания грануляционной ткани. Реакция клеточного звена системы неспецифической резистентности на воспаление брюшной полости у больных панкреонекрозом контрольной группы является подавленной. Применение трансплантации нативных стволовых клеток кордовой крови в комплексном лечении больных панкреонекрозом способствует повышению относительного количества функционально активных нейтрофилов и увеличивает их фагоцитирующую способность. Базальная и эндотоксининдуцированная генерация интерлейкина-1 β перитонеальными макрофагами через 14 суток увеличилась на 68,5% и 80,2% соответственно контрольного уровня. Итак, трансплантация стволовых клеток кордовой крови 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.I.Seminog, V.A.Shabliy. The cord blood and umbilical cord use in the complex treatment of patients with pancreatic necrosis. Kyiv, Ukraine.

Key words: *pancreonecrosis, 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. The meaningful increase of the tissue concentrations of free oxyprolyn, hexosamines and reduce of the content of bound protein oxyprolyn indicates the activation of local inflammation in the lungs from the 3rd day. The free oxyprolyn and hexosamines decline, increase of the bound protein oxyprolyn on the 14th day means the normalization of the destructive processes and activation of reparative regeneration. In 84,6% of patients who received the stem cells of cord blood and the transplantation of the cord tissue, according to the reflections from the zone of destruction of the pancreas, detected after 7 days of main transition process in the second phase — recovery, maturation and formation of granulation tissue. The reaction of cellular link system of nonspecific resistance to inflammation of the abdominal cavity in patients with pancreatonecrosis in control group is suppressed. The application of transplantation of the native stem cells of cord blood in treatment of patients with pancreatonecrosis, helps to increase the relative number of functionally active neutrophils and increases their ability phagocytosing. Basal and endotoxininduced generation of interleukin-1 β peritoneal macrophages after 14 days was increased on 68,5% and 80,2% respectively to the control level. 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 30.01.2012 р.