

А.Б. Кебкало

Обґрунтування використання озонованих стовбурових клітин кордової крові

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

Ключові слова: озон, стовбурові клітини, репаративні процеси.

Використання у комплексному лікуванні хворих на некротичний панкреатит озонованих фізіологічних розчинів не призвело до значної інтенсифікації репаративних процесів, а показники метаболізму сполучної тканини достовірно не відрізняються від групи хворих зі стандартним лікуванням. Активізація стовбурових клітин кордової крові озоном призводить до підвищення трансплантаційного потенціалу за рахунок збільшення колонійутворюючих одиниць в 1,66 ($p < 0,05$) рази при збереженні загальної кількості ядромістких клітин крові, мононуклеарів в ексфузаті та збереження їх життєздатності. Враховуючи зазначене та дані експериментальних досліджень, вважаємо за доцільне використання озонування стовбурових клітин кордової крові в клініці для ефективнішого їх впливу на репаративні процеси.

Обоснование использования озонированных стволовых клеток кордовой крови

А.Б. Кебкало

Использование в комплексном лечении больных некротическим панкреатитом озонированных физиологических растворов не привело к значительной интенсификации репаративных процессов, а показатели метаболизма соединительной ткани достоверно не отличаются от группы больных со стандартным лечением. Активация стволовых клеток кордовой крови озоном приводит к повышению трансплантационного потенциала за счет увеличения колониеобразующих единиц в 1,66 ($p < 0,05$) раза при сохранении общего количества ядросодержащих клеток крови, мононуклеаров в эксфузате и сохранения их жизнеспособности. Учитывая изложенное, а также данные экспериментальных исследований считаем целесообразным использование озонирования стволовых клеток кордовой крови в клинике для более эффективного их влияния на репаративные процессы.

Ключевые слова: озон, стволовые клетки, репаративные процессы.**Патология.** – 2013. – №1 (27). – С. 40–43

Substantiation of the ozonized cord blood stem cells use

А.В. Кебкало

The use of ozonized physiological solutions in complex treatment of patients with necrotizing pancreatitis did not lead to significant intensification of reparative processes, and rates of metabolism of the connective tissue do not significantly differ from the group of patients with standard treatment. Activation of cord blood stem cells by ozone increases transplantation potential because of increased colony-forming units by 1.66 ($p < 0.05$) times with the saving of total number of nucleated blood cells, mononuclear cells in exfusate and preserving their viability. Taking into account all above-mentioned and the results of experimental studies we consider using of ozonation of cord blood stem cells in the clinic to be advisable for more effective influence on the reparative processes.

Key words: ozone, stem cells, reparative processes.**Pathologia.** 2013; №1 (27): 40–43

Експериментальні дослідження з використанням стовбурових клітин кордової крові здійснено на статевозрілих морських свинках з моделлю панкреонекрозу. Результати викладено в статті «Зміни в системі регуляції агрегатного стану крові у морських свинок з моделлю панкреонекрозу» [2]. Вивчено вплив трансплантації озонованих стовбурових клітин кордової крові на інтенсивність плазматичного протеолізу та летальність у морських свинок з панкреонекрозом, результати наведено у відповідній статті [3]. Враховуючи результати здійснених експериментальних досліджень, дійшли до висновку, що найбільш показові результати отримано в групі тварин із використанням озонованих стовбурових клітин.

Мета роботи

Обґрунтувати доцільність використання озонування клітин кордової крові.

Матеріали і методи дослідження

Для визначення ефективності застосування озону з метою активації стовбурових клітин вивчали суспензію

клітин після 30 хвилин їх перебування в озонованому фізіологічному розчині. Озонацію суспензії стовбурових клітин кордової крові проводили шляхом змішування 1,0 мл озонованого (апарат «Озон УМ-80») стерильного 0,9% розчину натрію хлориду з 1,0 мл клітинної суспензії при концентрації озону в ізотонічному розчині натрію хлориду 20 мг/л мл.

Для лікування хворих клітинна суспензія повинна мати такі параметри: вміст клітин з ядрами, кількість мононуклеарів, кількість колонійутворюючих одиниць для гранулоцитів і моноцитів (КУО-ГМ). Кількість КУО визначають шляхом культивування в напіврідкому агарі протягом 7–9 діб за методом Пайк і Робінсон у модифікації В.І. Грищенка та співавт. [1]. Вміст живих клітин після кріоконсервування становив не менше $80 \pm 10\%$ від початкової. Наявність міграції та росту колоній клітин у зразках і формування моношару спеціалізованих клітин свідчить про збереження властивостей клітин й, у такий спосіб, забезпечення їх трансплантаційного потенціалу.

У спеціалізованій літературі не виявлено даних щодо впливу озону на метаболізм сполучної тканини, тому здійснено дослідження у хворих, яким до комплексного лікування некротичного панкреатиту включено введення озонованих фізіологічних розчинів протягом 5 діб. Визначали вміст у крові вільного і білковозв'язаного оксипроліну [4], гексозамінів, гексуринових кислот, фукози, не зв'язаної з білками [6], сіалових кислот [5], а також колагенолітичну активність плазми крові [7].

Дослідження виконано в групі хворих на некротичний панкреатит. Хворих розподілено на 2 групи: пацієнти першої отримували стандартне лікування (20 осіб), другу групу склали 20 хворих, яким у післяопераційному періоді внутрішньовенно вводили озонований фізіологічний розчин. Крім того, для контролю обстежено 25 практично здорових осіб (донори крові). Усі хворі обстежені до операційного втручання та на третю і сьому доби після операції.

Результати та їх обговорення

У таблиці 1 наведено дані параметрів клітинних суспензій без озонування та з активацією клітин озоном. Як бачимо з результатів дослідження, загальна кількість ядромістких клітин крові та загальна кількість мононуклеарів у ексфузаті достовірно не відрізняються ($p > 0,9$). Вміст живих клітин суттєво не відрізняється у двох клітинних суспензіях. Кількість КУО-ГМ у 1,66 ($p < 0,05$) рази більше у зразках кордової крові, де використовували озонований фізіологічний розчин.

Отже, можна сказати, що обробка озоном стовбурових клітин кордової крові призводить до підвищення трансплантаційного потенціалу за рахунок збільшення КУО при збереженні загальної кількості ядромістких клітин крові, мононуклеарів в ексфузаті та збереження їх життєздатності.

Результати дослідження впливу внутрішньовенного введення озонованого фізіологічного розчину на метаболізм сполучної тканини у хворих на некротичний панкреатит наведено в таблиці 2.

До початку лікування концентрація в крові вільного оксипроліну у пацієнтів 1 і 2 груп перевищувала контроль відповідно в 2,0 ($p < 0,001$) і 2,4 ($p < 0,001$) рази, білковозв'язаного оксипроліну не відрізнялась від такого у практично здорових осіб. Коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін був у 1,7 ($p < 0,001$) і 2,3 ($p < 0,001$) рази меншим за контрольні величини. Водночас підвищувався вміст у крові маркерів деструкції протеогліканів і глікопротеїнів: гексозамінів – у 2,1

($p < 0,001$) і 2,5 ($p < 0,001$) рази, гексуринових кислот – у 2,4 ($p < 0,001$) і 3,7 ($p < 0,001$) рази, фукози, не зв'язаної з білками, – у 2,1 ($p < 0,001$) і 2,1 ($p < 0,001$) рази на фоні підвищення сироваткової концентрації сіалових кислот на 47,9 ($p < 0,001$) і 52,1% ($p < 0,001$). Зазначені зміни показників метаболізму сполучної тканини супроводжувались збільшенням колагенолітичної активності плазми крові відповідно в 3,4 ($p < 0,001$) і 4,6 ($p < 0,001$) рази.

Отже, у хворих на панкреонекроз 1 і 2 груп з введенням озонованих розчинів до початку лікування катаболізм сполучної тканини значно переважає інтенсивність ресинтезу колагену, протеогліканів і глікопротеїнів, що відбувається на фоні суттєвого підвищення плазматичного колагенолізу.

Через три доби після операції у хворих 1 групи рівень у крові вільного оксипроліну зменшувався на 22,8%, але різниця показників недостовірна ($p > 0,01$), однак залишався вищим за контроль на 53,2% ($p < 0,01$). Сироваткова концентрація білковозв'язаного оксипроліну достовірних змін не зазнавала, тоді як коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін знизювався на 28,7% ($p < 0,01$). Вміст у крові гексозамінів збільшувався на 65,0% ($p < 0,001$), фукози, не зв'язаної з білками, – на 93,6% ($p < 0,001$). Сироваткові концентрації гексуринових кислот і сіалових кислот підвищувались відповідно в 2,1 ($p < 0,001$) і 1,4 ($p < 0,001$) рази на фоні збереження високої колагенолітичної активності плазми крові, яка, хоч і зменшувалась на 21,7% ($p < 0,01$), залишалась у 2,6 ($p < 0,001$) рази більшою за таку у практично здорових осіб.

У ті ж строки спостереження у пацієнтів, яким внутрішньовенно вводили озонований фізіологічний розчин, інтенсивність деградації елементів сполучної тканини майже не змінювалась: рівень у крові вільного оксипроліну залишався більшим за контроль в 2,4 ($p < 0,001$) рази, гексозамінів – в 2,5 ($p < 0,001$) рази, гексуринових кислот – в 3,4 ($p < 0,001$) рази, сіалових кислот – в 2,1 рази ($p < 0,001$), фукози, не зв'язаної з білками, – у двічі ($p < 0,001$). Колагенолітична активність крові дещо зменшувалась, проте залишалась у 3,5 ($p < 0,001$) рази більшою за контроль.

Не відрізнялись від контрольних величин тільки сироваткові концентрації білковозв'язаного оксипроліну ($p > 0,6$), однак при цьому коефіцієнт співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін був у 2,1 ($p < 0,001$) рази меншим, ніж у практично здорових осіб. Отже, інтенсивність катаболізму сполучної тканини залишалась високою.

Таблиця 1

Середні показники пуповинної крові, нативної та озонованої

Зразки кордової крові	Об'єм ексфузату, мл	Загальна кількість ядромістких клітин крові в ексфузаті, $\times 10^9$	Загальна кількість мононуклеарів в ексфузаті, $\times 10^9$	Кількість КУО-ГМ, $\times 10^3$ /мл	Вміст живих клітин, %
Нативні стовбурові клітини (n=30)	49,1 \pm 9,2	1,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,02	50 \pm 10	80 \pm 10
Озоновані стовбурові клітини (n=30)	48,5 \pm 10,5 $p > 0,1$	1,0 \pm 0,3 $p > 0,9$	0,3 \pm 0,01 $p > 0,6$	83 \pm 12 $p < 0,05$	82 \pm 5 $p > 0,8$

Динаміка змін показників метаболізму сполучної тканини у хворих на некротичний панкреатит із використанням озонованого розчину ($x \pm Sx$)

Досліджувані показники	Контроль (практично здорові особи) n=25	Група хворих без використання озонованих розчинів			Група хворих з використанням озонованих розчинів		
		до початку лікування n=20	через 3 доби після початку лікування, n=20	через 7 діб після початку лікування, n=15	до початку лікування n=20	через 3 доби після початку лікування, n=20	через 7 діб після початку лікування, n=18
Вільний оксипролін, мкмоль/л	12,09±0,98	23,98±2,56 p<0,001	18,52±1,99 p<0,01	17,88±1,90 p<0,01	29,41±1,88 p<0,001 p ₁ <0,001	26,53±2,19 p<0,001 p ₁ <0,001	21,38±2,36 p<0,001 p ₁ <0,001
Білковозв'язаний оксипролін, мкмоль/л	37,45±1,98	44,35±4,16 p>0,1	40,96±3,98 p>0,4	37,16±3,82 p>0,9	40,26±3,57 p>0,4 p ₁ <0,002	38,92±2,60 p>0,6 p ₁ >0,06	41,93±2,25 p>0,1 p ₁ <0,001
Коефіцієнт співвідношення білковозв'язаної та вільної фракції оксипроліну, од.	3,10±0,17	1,85±0,20 p<0,001	2,21±0,23 p<0,01	2,08±0,21 p<0,001	1,37±0,19 p<0,001 p ₁ <0,001	1,47±0,12 p<0,001 p ₁ <0,001	1,96±0,20 p<0,001 p ₁ <0,001
Гексозаміни, ммоль/л	5,97±0,31	12,39±1,09 p<0,001	9,85±0,97 p<0,001	11,54±0,93 p<0,001	14,81±1,16 p<0,001 p ₁ <0,001	12,65±1,29 p<0,001 p ₁ <0,001	13,08±1,19 p<0,001 p ₁ <0,001
Гексуронови кислоти, ммоль/л	1,44±0,09	3,46±0,17 p<0,001	3,03±0,15 p<0,001	3,29±0,19 p<0,001	5,27±0,29 p<0,001 p ₁ >0,1	4,95±0,33 p<0,001 p ₁ <0,001	4,72±0,30 p<0,001 p ₁ <0,001
Сіалові кислоти, ммоль/л	2,82±0,19	4,17±0,23 p<0,001	3,95±0,19 p<0,001	3,79±0,18 p<0,01	6,82±0,35 p<0,001 p ₁ <0,001	5,79±0,31 p<0,001 p ₁ <0,001	6,10±0,33 p<0,001 p ₁ <0,001
Фукоза, не зв'язана з білками, мкмоль/л	123,51±5,06	256,03±11,74 p<0,001	239,17±12,46 p<0,001	244,10±13,62 p<0,001	298,51±15,13 p<0,001 p ₁ <0,001	250,74±13,29 p<0,001 p ₁ >0,7	272,98±14,57 p<0,001 p ₁ <0,001
Колагенолітична активність плазми крові, мкмоль/л за 1 год	3,69±0,33	12,41±1,08 p<0,001	9,72±0,38 p<0,001	8,59±0,54 p<0,001	16,93±1,52 p<0,001 p ₁ <0,001	13,05±1,14 p<0,001 p ₁ <0,001	15,55±1,37 p<0,001 p ₁ <0,001

Примітки: p – ступінь достовірності різниць показників щодо контролю; p₁ – ступінь достовірності різниць показників у 1 та 2 групах у відповідні періоди спостереження; n – кількість спостережень.

За результатами порівняльного аналізу, через 3 доби після операції в групі хворих, яким у комплексному лікуванні внутрішньовенно вводили озонований фізіологічний розчин, показники деструкції сполучної тканини були збільшені: концентрація в крові вільного оксипроліну – в 1,43 (p<0,001) рази, гексозамінів – в 1,28 (p<0,001) рази, гексуронових кислот – в 1,63 (p<0,001) рази, сіалових кислот – в 1,47 (p<0,001) рази, колагенолітичної активності плазми крові – на 34,3% (p<0,001). Проте рівень білковозв'язаного оксипроліну та фукози, не зв'язаної з білками, достовірно не відрізнявся.

Через 7 діб після операції у хворих 1 групи (табл. 2) відносно до відповідних показників у практично здорових осіб залишались підвищеними сироваткова концентрація вільного оксипроліну – на 47,9% (p<0,001), гексозамінів – на 93,3% (p<0,001), гексуронових кислот – у 2,3 (p<0,001) рази, сіалових кислот – на 34,4% (p<0,001), фукози, не зв'язаної з білками, – на 97,6% (p<0,001). Колагенолітична активність крові перевищувала контрольні величини в 2,3 (p<0,001) рази.

Через 7 діб після операції у хворих 2 групи (табл. 2) спостерігали зменшення сироваткової концентрації вільного оксипроліну, тоді як його білковозв'язана

фракція не змінювалась, що призводило до підвищення коефіцієнта співвідношення білковозв'язаний/вільний оксипролін на 43,1%, який, тим не менш, залишався на 36,8% (p<0,001) меншим за контрольні показники. Рівень у крові гексозамінів залишався сталим і перевищував контроль в 2,2 (p<0,001) рази. Сироватковий вміст гексуронових і сіалових кислот і фукози, не зв'язаної з білками, переважав такий у практично здорових осіб в 3,3 (p<0,001), 2,2 (p<0,001) і 2,2 (p<0,001) рази відповідно. Колагенолітична активність плазми крові була в 4,2 (p<0,001) рази більшою за контрольний рівень. Отже, у хворих, які отримували стандартне лікування та лікування з використанням озонованих розчинів, через 7 діб після операції баланс між інтенсивністю колагенолізу та синтезом колагену не відновлюється, так само як і деградація протеогліканів і глікопротеїнів, що залишається підвищеною на фоні високої колагенолітичної активності плазми крові.

Порівнюючи результати у двох групах, можна сказати, що рівень вільного оксипроліну зменшувався однаково: у першій групі – в 1,34 рази, у другій – в 1,38 рази, різниця недостовірна. Вміст гексозамінів зменшувався в 1,07 рази в першій групі, в другій – в 1,13 рази, різниця недо-

стовірна. Рівень гексуронових і сіалових кислот, фукози, не зв'язаної з білками, колагенолітичної активності плазми крові в 1 і 2 групах повільно зменшувався відповідно в 1,05 і 1,11 рази, в 1,11 і 1,12 рази, в 1,05 і 1,09 рази; в 1,44 і 1,08 рази. Водночас рівень білковозв'язаного оксипроліну в першій групі хворих зменшувався в 1,19 рази, а в групі хворих, яким у комплексному лікуванні внутрішньовенно вводили озонований розчин, рівень цього маркера незначно збільшився в 1,04 рази.

Зазначені зміни біохімічних маркерів метаболізму сполучнотканинного матриксу свідчать про низьку ефективність внутрішньовенного введення озонованих розчинів на зниження інтенсивності розпаду компонентів сполучної тканини. Проте в обох випадках повної нормалізації показників метаболізму сполучної тканини не відбувалось.

Висновки

1. Використання у комплексному лікуванні хворих на некротичний панкреатит озонованих фізіологічних розчинів не призвело до значної інтенсифікації репаративних процесів, а показники метаболізму сполучної тканини достовірно не відрізняються від групи хворих зі стандартним лікуванням.

2. Активація стовбурових клітин кордової крові озоном призводить до підвищення трансплантаційного потенціалу за рахунок збільшення колонійутворюючих одиниць в 1,66 ($p < 0,05$) рази при збереженні загальної кількості

ядромістких клітин крові, моноклеарів в експузаті та збереження їх життєздатності.

3. Враховуючи зазначене та дані експериментальних досліджень, вважаємо за доцільне використання озонування стовбурових клітин кордової крові в клініці для їх ефективнішого впливу на репаративні процеси.

Список літератури

1. Гемопоетичні клітини ембріональної печінки (ембріогенез, трансплантація, кріоконсервування // [В.І. Грищенко, Г.С. Лобинцева, А.І. Вотякова та ін.]. – К., 1988. – 34 с.
2. Кебало А.Б. Зміни в системі регуляції агрегатного стану крові у морських свинок з моделлю панкреонекрозу / А.Б. Кебало // Шпитальна хірургія. – 2005. – №3. – С. 101–103.
3. Кухарчук О.Л. Вплив трансплантації стовбурових клітин кордової крові на інтенсивність плазмового протеолізу у морських свинок з панкреонекрозом / О.Л. Кухарчук, А.Б. Кебало // Експериментальна і клінічна медицина. – 2009. – №4. – С. 39–46.
4. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче / М.А. Осадчук // Лабор. дело. – 1979. – №8. – С. 456–458.
5. Муравьева Л.А. Некоторые факторы слизистой защиты гастродуоденальной системы в различные сроки после ушивания прободных язв / Л.А. Муравьева, Е.Ю. Волков // Вопр. мед. химии. – 1988. – №6. – С. 20–23.
6. Шараев П.Н. Метод определения фукозы, не связанной с белками / П.Н. Шараев, Н.С. Стрелков, Р.Р. Кильдиярова // Клин. лаборатор. диагност. – 1997. – №4. – С. 17–18.
7. Шараев П.Н. Определение коллагенолитической активности плазмы крови / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.Г. Зворыгина // Лаборатор. дело. – 1987. – №1. – С. 60–62.

Відомості про автора:

Кебало А.Б., професор каф. хірургії та проктології НМАПО ім. П.Л. Шупика.

Надійшла в редакцію 13.02.2013 р.