



ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, ПРИ ТЯЖЕЛОМ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹, г. Минск,

ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии

и медицинских биотехнологий»², г. Минск,

Республика Беларусь

Цель. Определить влияние регионарного применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов на системные проявления тяжелого острого экспериментального панкреатита у крыс.

Материал и методы. Экспериментальные исследования были выполнены на 42 половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Острый экспериментальный панкреатит (ОЭП) моделировали путем введения 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в хвостовую часть поджелудочной железы. Животные случайным образом были разделены на 4 группы: I группа (n=6) – интактные животные, II группа (контрольная) (n=12) – крысы с ОЭП без лечения, III группа (n=12) – крысы с ОЭП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида (физраствора), IV группа (n=12) – крысы с ОЭП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии физраствора + регионарное введение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ). На 3-и и 7-е сутки от начала моделирования ОЭП оценивали гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (панкреатическая амилаза, АСАТ, АЛАТ, мочевины, креатинин), маркеры эндогенной интоксикации (активность перекисного окисления липидов, уровень оксида азота), маркеры системного воспалительного ответа (С-реактивный белок, фактор некроза опухолей альфа, интерлейкин-6).

Результаты. Применение ПОРФТ на ранних этапах тяжелого ОЭП положительно влияет на изменение количества и размеров тромбоцитов, способствует снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления, ферментемии и элементов эндогенной интоксикации, составляющие основу патогенеза тяжелого острого панкреатита. Выявлено цитопротекторное действие применения ПОРФТ на ранних стадиях ОЭП по предупреждению цитолиза печеночных и других клеток организма.

Заключение. Экспериментальные исследования выявили способность регионарного применения ПОРФТ на ранних этапах ОЭП у крыс оказывать системный положительный эффект, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективного средства для патогенетического лечения.

Ключевые слова: тяжелый острый панкреатит, плазма, растворимые факторы тромбоцитов, клеточная терапия, ПОРФТ, биопрепарат

Objective. To determine the effect of regional application of platelet-rich plasma on the systemic manifestations of severe acute experimental pancreatitis in rats.

Methods. This experimental study was carried out on 42 adults Wistar rats. Acute experimental pancreatitis (AEP) was induced by the introduction of a 0.3 ml of 5% solution of nonionic polyethylene glycol octylphenol ether detergent into the caudal part of the pancreas. The animals were randomly divided into 4 groups: Group I (n=6) - intact animals, Group II (control group) (n=12) – rats with AEP without treatment, Group III (n=12) - rats with AEP treated: anesthesia + infusions of 0.9% sodium chloride solution (saline), Group IV (n=12) - rats with AEP treated: anesthesia + infusions of saline + regional application of platelet-rich plasma (PRP). Animals were taken out of the experiment by euthanasia on the 3rd and 7th day. The hematological parameters, markers of systemic manifestation of the pathological process (pancreatic amylase, ASAT, ALAT, urea, creatinine), markers of endogenous intoxication (lipid peroxidation activity, nitric oxide level), markers of systemic inflammatory response (C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) have been evaluated.

Results. The application of PRP in the early stages of severe AEP favorably affects the change of the number and size of platelets, helps to reduce the content of free radical oxidation products, enzymes and endogenous intoxication elements, which are key links in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. The cytoprotective effect of using PRP in the early stages of AEP on the prevention of cytolysis of hepatic and other body cells was revealed.

Conclusion. Experimental studies have revealed the ability of regional application of PRP in the early stages of AEP in rats to have a systemic positive effect, which allows considering it as a promising agent for pathogenetic treatment.

Keywords: severe acute pancreatitis, plasma, soluble platelet factors, cell therapy, PRP, biological product



Научная новизна статьи

Впервые изучено влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), на системные показатели при тяжелом остром экспериментальном панкреатите. Установлено, что ПОРФТ при раннем использовании благоприятно влияет на изменение количества и размеров тромбоцитов, препятствует их секвестрации, может предупреждать развитие коагулопатии потребления, способствует снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления, ферментемии и элементов эндогенной интоксикации, которые являются ключевыми звеньями патогенеза тяжелого острого панкреатита.

What this paper adds

For the first time, the effect of platelet-rich plasma (PRP) on systemic parameters of acute experimental pancreatitis has been studied. It has been established that PRP, when used early, favorably affects the change in the number and size of platelets, prevents their sequestration, can prevent the development of consumption coagulopathy, helps to reduce the content of free radical oxidation products, enzymes and endogenous intoxication elements, which are considered to be the key links in the pathogenesis of acute pancreatitis.

Введение

Рост заболеваемости острым панкреатитом (ОП) и неудовлетворительные результаты оказания медицинской помощи при тяжелых формах этого заболевания свидетельствуют об актуальности разработки новых средств и методов лечения. Согласно современным представлениям, на ранних стадиях патогенетические механизмы ОП включают интраацинарную активацию трипсиногена с переходом его в трипсин с последующей активацией других энзимов [1]. Воздействие протеолитических ферментов на стенку кровеносных сосудов приводит к эндотелиальной дисфункции, активации свертывающей, противосвертывающей и калликреин-кининовой систем. В результате сначала развивается спазм, потом парез сосудов, приводящие к сладж-феномену, затем к нарушению проходимости микроциркуляторного русла, отёку и ишемии ткани поджелудочной железы (ПЖ) [2]. При тяжелом ОП наблюдается инфильтрация ПЖ лейкоцитами, включая макрофаги, нейтрофилы, дендритные, тучные клетки, естественные киллерные (ЕК) клетки, а также Т- и В-лимфоциты [2, 3, 4]. Их мобилизация в очаг воспаления в ПЖ сопровождается местным и системным накоплением в кровотоке цитокинов: интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора активации тромбоцитов (PAF), фактора некроза опухоли α (ФНО- α). При этом активированные нейтрофилы и макрофаги характеризуются избыточной продукцией активных форм кислорода (АФК), что вместе с угнетением антиоксидантной системы (АОС) формирует окислительный стресс. Это приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызывающему повреждение биологических мембран клеток, изменение мембранного потенциала митохондрий, истощение запасов

аденозинтрифосфата и некротическую гибель клеток [5]. Лавинообразное освобождение молекул, ассоциированных с повреждением тканей (damage-associated molecular patterns, DAMPs), и провоспалительных цитокинов приводит к формированию синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) с нарастающей эндогенной интоксикацией и полиорганной недостаточностью (ПОН), которая чаще всего и является непосредственной причиной смерти на ранних стадиях заболевания [3, 6, 7].

Использование биопродуктов клеточного происхождения в медицине в настоящее время постоянно расширяется. За последние 20 лет одним из них стала плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ, аналог PRP – platelet-rich plasma). В состав ПОРФТ входит до 300 биологически активных белков, характеризующихся каскадным действием и наблюдаемым пролонгированным клиническим эффектом [8]. Благоприятное лечебное воздействие ПОРФТ зависит от факторов, обладающих противовоспалительным, обезболивающим и антикатаболическим действием. Противовоспалительное влияние ПОРФТ связывают с фактором роста гепатоцитов (HGF), трансформирующим ростовым фактором бета (TGF-1), инсулиноподобным ростовым фактором (IGF-1), тромбоцитарным ростовым фактором (PDGF-BB) и белками плазмы – альбумином, альфа-1-антитрипсином, альфа-2-макроглобулином, активированным протеином С, а также антагонистом рецептора интерлейкина-1 типа I/IL-1 Ra [9]. ПОРФТ вызывает локальное накопление макрофагов M2, обладающих противовоспалительным действием [10]. Отмечают также обезболивающий эффект ПОРФТ, который связан с его противовоспалительным влиянием, снижающим локальный отек тканей и уровень молекул поврежденных тканей (DAMPs). В хирургической

практике ПОРФТ уже применяется для лечения поверхностных язв кожи, остеоартрита и другой патологии костно-мышечной системы [8, 11].

С учетом вышеизложенного представляют научный и практический интерес исследования возможности использования ПОРФТ оказывать лечебный эффект на ранних стадиях тяжелого ОП.

Цель работы – определить влияние регионарного применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, на системные проявления тяжелого острого экспериментального панкреатита у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводились в виварии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (УО «БГМУ»). Протокол исследований утвержден на заседании этической комиссии УО «БГМУ» (α 8 от 01.02.2022). Все работы проводились в соответствии с международными правилами и принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью» (Страсбург, 18.03.1986), а также в соответствии с «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете» (Минск, 2006). Перед началом эксперимента животные выдерживались в выделенном боксе в течение одной недели для адаптации к новым условиям. В течение эксперимента животные содержались в клетках индивидуально. Перед проведением исследования все животные взвешивались, тщательно осматривались на наличие видимой патологии и признаков болезней. Животные с выявленной патологией выбраковывались.

Дизайн эксперимента. Экспериментальное исследование проводилось на 42 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275-380 г. Животные содержались в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Световой режим соответствовал естественному уровню освещенности в течение суток на географической широте г. Минска (53°54'N). Температура воздуха поддерживалась в пределах 20-22°C, относительная влажность – 45-50%.

Острый экспериментальный панкреатит (ОЭП) моделировали путем введения 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в желудочно-селезеночную часть поджелудочной железы. Животные случайным образом были разделены на 4

группы: I группа (n=6) – интактные животные, II группа (контрольная) (n=12) – крысы с ОЭП без лечения, III группа (n=12) – крысы с ОЭП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида (физраствор), IV группа (n=12) – крысы с ОЭП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии физраствора + регионарное введение ПОРФТ. На 3-и и 7-е сутки от начала моделирования ОЭП оценивали гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (панкреатическая альфа-амилаза, аспартат-аминотрансфераза/АсАТ, аланинаминотрансфераза/АлАТ, мочевины, креатинин), маркеры эндогенной интоксикации (активность ПОЛ, уровень оксида азота/NO), маркеры системного воспалительного ответа (С-реактивный белок/СРБ, ФНО-α, ИЛ-6).

До начала основного эксперимента случайным образом было изъято 6 крыс для предварительной оценки лабораторных показателей и анатомии внутренних органов. Полученные данные не отличались от нормальных физиологических показателей у представителей используемых лабораторных животных, поэтому данные этой группы животных были приняты за норму.

Моделирование тяжелого ОЭП. Все манипуляции выполнялись у животных, подвергнутых анестезии тиопенталом натрия (производитель ОАО «Синтез», г. Курган, Российская Федерация) из расчета 45 мг/кг массы животного. Для воспроизведения ОЭП выполняли лапаротомию и в хвостовую (желудочно-селезеночную) часть ПЖ инсулиновым шприцем вводили 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира (тритон X-100, производитель Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия) стандартно всем животным.

Способ регионарного (локального) введения ПОРФТ при лечении ОЭП. Животным IV группы после завершения этапа моделирования ОП через контрапертуру на передней брюшной стенке в левом нижнем квадранте в брюшную полость вводили катетер из прозрачного термопластичного имплантационно-нетоксичного поливинилхлорида диаметром 6 СН, обрезали его до нужной длины и делали боковое отверстие. Проксимальный конец катетера укладывали между желудочно-селезеночной частью ПЖ (место введения неионного детергента) и селезенкой так, чтобы боковое отверстие было направлено в сторону ПЖ. Проксимальный конец катетера фиксировали к желудку погружным П-образным швом таким образом, чтобы заглушить проксимальное выводное отверстие

и обеспечить поступление вводимой ПОРФТ только по боковому отверстию непосредственно к ПЖ. После завершения манипуляции ПЖ аккуратно погружали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку ушивали наглухо однорядными узловыми швами (заявка на изобретение а20202312 от 08.12.2022).

Хирургические процедуры выполнялись в стерильных условиях. В послеоперационном периоде всем животным проводили обезболивание внутримышечным введением кеторолака из расчета 4,8 мг/кг/сут массы животного, антибиотикопрофилактика не проводилась.

Лечение ОЭП. Для оценки влияния ПОРФТ на ранние патологические системные изменения при тяжелом ОП лечение начинали через 24 часа от начала эксперимента. Животным III группы, кроме обезболивания, лечение ОЭП проводилось внутривенным введением 0,9% раствора NaCl в объеме 2 мл 1 раз в сутки. У животных IV группы вышеуказанное лечение дополнялось регионарным введением ПОРФТ в 1-е сутки после моделирования в объеме 150 мкл двукратно через 6 часов через ранее установленный катетер.

Из эксперимента животных выводили путем эвтаназии на 3-и и 7-е сутки от начала моделирования ОП. У всех животных в контрольные сроки производили забор крови и органов для лабораторных и патоморфологических исследований соответственно. Вначале выполнялась наркотизация внутрибрюшинной инъекцией тиопентала натрия в дозе 45 мг/кг веса животного. Осуществлялось вскрытие грудной клетки и взятие крови из сердца посредством пункции для биохимических, гематологических, серологических исследований в объеме 4,5 мл. После получения крови животному дополнительно производили внутрибрюшинную инъекцию тиопентала натрия в дозе 200 мг/кг для эвтаназии.

Получение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов. Для получения ПОРФТ крыс использовали здоровых животных весом 250–300 г, содержащихся в виварии УО «БГМУ». ПОРФТ получали модифицированным методом Yamaguchi R. с соавт. [12]. Непосредственно после стандартной эвтаназии у животных шприцем забирали из сердца около 5 мл крови, которую немедленно переносили в пробирку с 3,8% цитратом натрия (lot 190975, Merck, Германия). Содержимое пробирок перемешивали, центрифугировали 1000 об/мин. в течение 20 минут. Собирали плазму и лейко-тромбоцитарный слой, объединяли из различных пробирок и центрифугировали повторно 1500 об/мин. в течение 20 минут. После центрифугирования отбирали верхний слой плазмы

так, чтобы количество тромбоцитов в нижней части составило около 2×10^{12} /л при подсчете на гематологическом анализаторе Sysmex KX-21N (Sysmex, Япония). Полученный концентрат тромбоцитов ($\times 3,0$ по сравнению с исходным уровнем) замораживали при -70°C . Через 1–3 дня пробирку с замороженным концентратом тромбоцитов в плазме размораживали, центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15 минут. Супернатант отбирали, стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, расфасовывали по 0,5 мл в пробирки Эппендорфа и хранили при -70°C до использования в экспериментах.

Гематологические исследования были выполнены на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе IVet-5, Norma Instruments Zrt. (Венгрия). Для калибровки анализатора были использованы контрольные материалы, произведенные изготовителем. Были исследованы следующие гематологические показатели: количество эритроцитов, гемоглобин (Hb), гематокрит (HCT), количество тромбоцитов и их средний объем (MPV), количество лейкоцитов.

Биохимические исследования выполнены с использованием биохимического анализатора А-25, BioSystems (Испания) и наборов реактивов для него (Fenox Medical Solutions, Республика Беларусь). Исследуемые биохимические показатели сыворотки крови животных: креатинин, мочевины, глюкоза, СРБ, АЛТ, АсАТ, альфа-амилаза.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию ИЛ-6 в образцах крови определяли с использованием набора реагентов Fine Test RAT IL-6 Elisa Kit (КНР). Содержание в сыворотке крови ФНО- α определяли с использованием набора реагентов Fine Test RAT TNF- α Elisa Kit (КНР). Содержание оксида азота (NO) определяли с использованием набора реагентов RAT Nitric Oxide BT- LAB Kit (КНР) в соответствии с инструкциями производителя.

Оценка перекисного окисления липидов. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню накопления вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА в гемолизатах крови определяли по методу T. Asakava и S. Matsshita [13].

Статистика

Статистическая обработка полученных результатов производилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 23, с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых перемен-

ных нормальному распределению по критерию Колмогорова-Смирнова. Количественные признаки представлены как средняя арифметическая вариационного ряда и ее стандартная ошибка ($M \pm m$) при нормальном распределении или медиана и интерквартильный размах ($Me[Q25;Q75]$) при распределении, отличном от нормального. Для количественных, имеющих нормальное распределение признаков, оценку статистической значимости различий между группами проводили при помощи критерия Стьюдента (t). При отличном от нормального распределении признаков использовали непараметрический U -критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U -test). Непараметрической альтернативой t -критерию для зависимых выборок являлся критерий Вилкоксона (Wilcoxon signed-rank test). Для описания взаимосвязи двух количественных признаков использовали коэффициенты корреляции Пирсона (r) при нормальном распределении и Спирмена (r_s) при распределении, отличном от нормального. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По результатам предварительных исследований нами было установлено, что модель ОЭП, созданная введением 0,3 мл 5% раствора тритона X-100 в ткань ПЖ, позволяет воспроизвести у животных тяжелую форму заболевания с гистологической картиной некроза ткани железы и патоморфологическими изменениями в сердце, легких, печени и почках, а также с существенными изменениями системных показателей (повышением уровня провос-

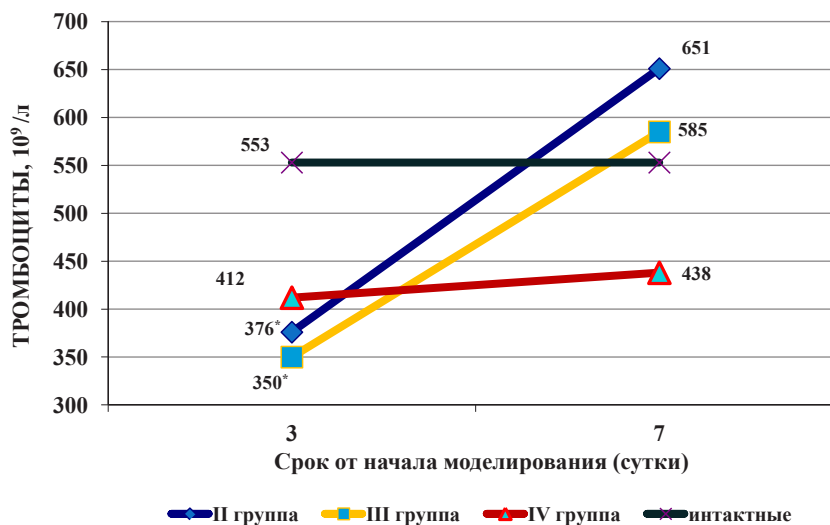
палительных цитокинов, СРБ, накоплением продуктов ПОЛ, NO) и развитием эндогенной интоксикации [14].

Как следует из полученных данных, у животных всех групп за весь период наблюдения не отмечалось значимых изменений гематологических показателей, за исключением снижения количества тромбоцитов. На 3-и сутки в крови животных II и III групп, где ПОРФТ не применялась, тромбоцитопения была выраженной – количество тромбоцитов было достоверно меньше, чем в крови интактных животных (Mann-Whitney U Test, $p < 0,05$) (рис. 1).

Как известно, тромбоциты поддерживают физиологическую резистентность и функцию эндотелиоцитов, осуществляя их питание [15]. При тромбоцитопении нарушается трофика эндотелиальных клеток, и они начинают пропускать эритроциты, таким образом формируются микрокровоизлияния, что макроскопически определяется как геморрагический панкреонекроз. У животных IV группы, где для лечения применялась ПОРФТ, уровень содержания тромбоцитов на 3-и сутки был наиболее высоким и значимо не отличался от данного показателя у интактных животных (412,0 [359,50; 446,50] и 553,0 [428,25; 751,0] $\times 10^9$ /л. соответственно; Mann-Whitney U Test, $p = 0,054$). В дальнейшем на протяжении эксперимента в крови всех животных отмечалось нарастание уровня тромбоцитов, и на 7-е сутки этот показатель значимо не отличался от такового у интактных животных (Mann-Whitney U Test, $p > 0,05$).

Микротромбообразование при тяжелом ОП приводит к заметной разнице в среднем объеме тромбоцитов, к появлению молодых, более

Рис. 1. Динамика уровня тромбоцитов в крови экспериментальных животных ($n=12$ в каждой группе; * – достоверно в сравнении с интактными животными).



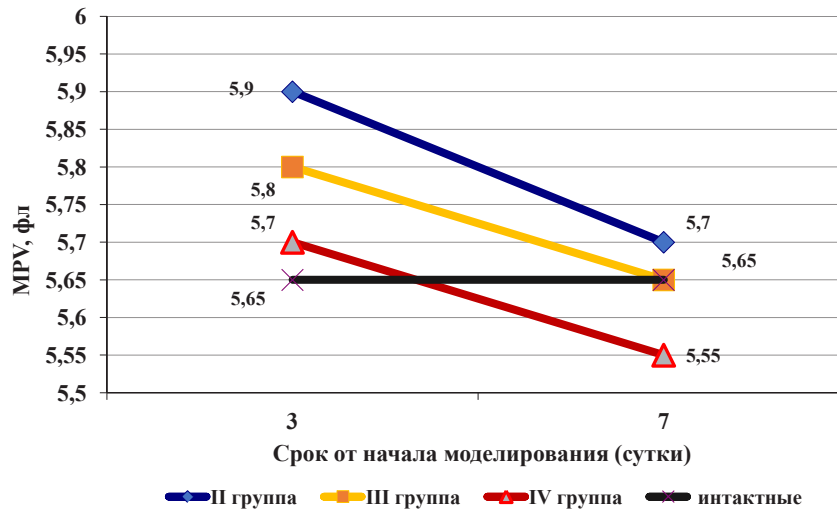


Рис. 2. Динамика уровня среднего объема тромбоцитов (MPV) в крови экспериментальных животных (n=12 в каждой группе).

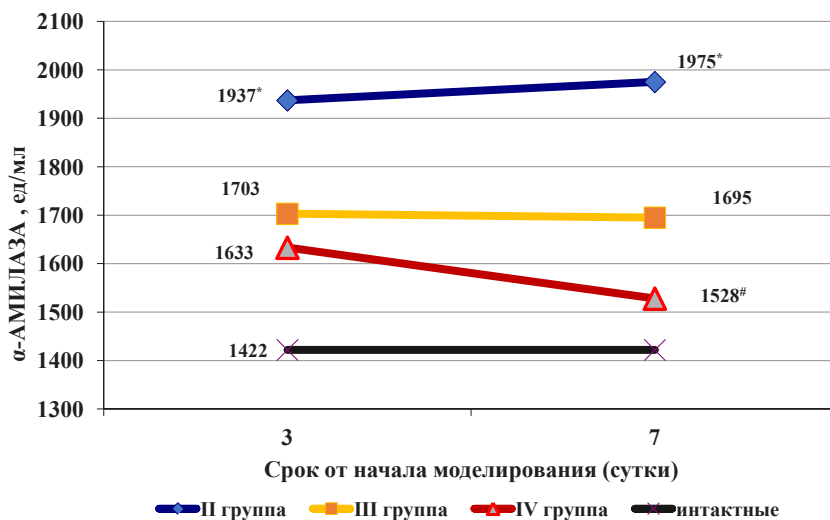
крупных тромбоцитов, богатых гранулами и прокоагулянтами. Ранее было показано, что при тяжелом ОП у пациентов с летальным исходом объем тромбоцитов прослеживался заметно большим, чем у выживших [16]. На 3-и сутки после моделирования тяжелой формы ОП во всех группах отмечалось увеличение среднего объема тромбоцитов (MPV). Из данных, приведенных на рисунке 2, следует, что отклонение этого показателя от нормы было наименьшим в группе животных, где для лечения применялась ПОРФТ.

Так, во II группе наблюдалось увеличение MPV на 4,4% (5,90 [5,55; 6,25] фл.), в III – на 2,7% (5,80 [5,80; 5,95] фл.), а в IV группе животных увеличение среднего объема тромбоцитов составило только 0,9% (5,70 [5,70; 5,90] фл.)

по сравнению с его значением у интактных животных (5,65 [5,43; 6,05] фл.). К 7-м суткам эксперимента во всех опытных группах животных MPV снизился по сравнению с 3-ми сутками, однако в IV группе животных после введения ПОРФТ наблюдалось более интенсивное уменьшение MPV (с 5,70 [5,70; 5,90] до 5,55 [5,45; 5,80] фл.; критерий Wilcoxon, p=0,168). Полученные данные позволяют заключить, что динамика выраженности тромбоцитопении и увеличения среднего объема тромбоцитов при тяжелом ОП может отражать эффективность терапевтического действия ПОРФТ при регионарном применении.

Как известно, преждевременная активация ферментов ПЖ и их попадание в системный кровоток являются важными ранними звеньями

Рис. 3. Динамика уровня альфа-амилазы в крови экспериментальных животных (n=12 в каждой группе; * – достоверно в сравнении с интактными животными; # – достоверно в сравнении с 7-ми сутками животных II группы).



патогенеза ОП. Из рисунка 3 следует, что на 3-и сутки от начала моделирования тяжелого ОП во II группе животных (без лечения) отмечалась наиболее высокая активность α -амилазы, которая значимо отличалась от данного показателя у интактных животных (1937,0 [1567,0; 2493,0] и 1422,0 [1373,0; 1764,50] ед/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,037$). В III группе в эти же сроки активность α -амилазы тоже была высокой и составила 1703,0 [1507,0; 2333,25] ед/мл, а в IV группе животных, где для лечения использовалась ПОРФТ, активность α -амилазы была наименьшей, она составила 1633,50 [1393,75; 1750,0] ед/мл (без достоверных отличий от нормальных значений (1422,0 [1373,0; 1764,50] ед/мл) (Mann-Whitney U Test, $p=0,748$)).

В дальнейшем на протяжении эксперимента в группе животных без лечения отмечался рост этого показателя и на 7-е сутки уровень α -амилазы превышал значения интактных животных в 1,4 раза (Mann-Whitney U Test, $p=0,025$). В III и IV группах животных, напротив, отмечалось снижение активности данного показателя и к концу эксперимента его значения достоверно не отличались от таковых у интактных животных (Mann-Whitney U Test, $p<0,05$). Между тем, после применения ПОРФТ у животных IV группы на 7-е сутки активность амилазы сыворотки крови была наименьшей (1528,0 [1433,0; 1648,75] ед/мл).

С целью изучения влияния ПОРФТ на цитолиз гепатоцитов при тяжелом ОП, проведено сравнительное исследование динамики основных внутриклеточных ферментов (АсАТ и АлАТ), которые служат индикаторами повреждения печеночной ткани. Установлено, что на 3-и сутки у животных II и III групп

уровень АсАТ в сыворотке крови был выше, чем у интактных животных ($p>0,05$), а у животных IV группы в эти сроки значения АсАТ не отличались от нормы (128,50 [108,0; 218,50] и 124,50 [96,25; 156,0] ед./л соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,522$) (рис. 4).

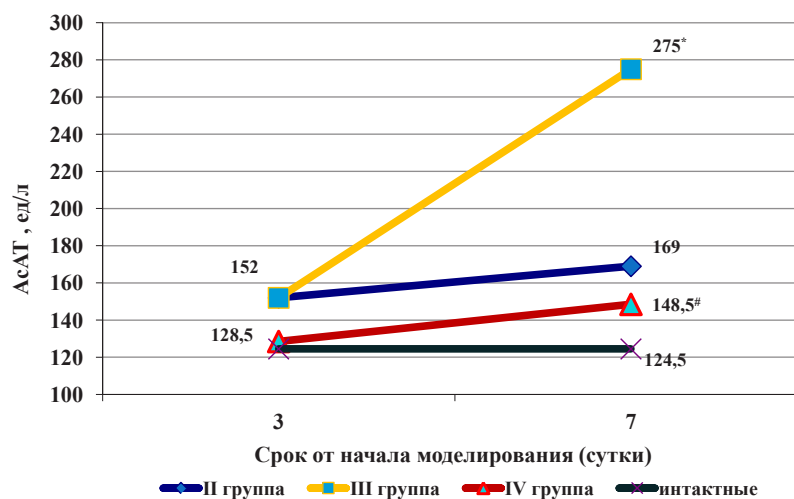
В дальнейшем наблюдалось повышение этого показателя у животных всех опытных групп, однако в III группе животных, где для лечения применялся физраствор, уровень АсАТ возрастал наиболее интенсивно (критерий Wilcoxon, $p=0,028$) и на 7-е сутки он в 2,2 раза превышал данный показатель у интактных животных (275,0 [228,25; 311,50] и 124,50 [96,25; 156,0] ед./л соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,004$). В IV группе животных, где применялась ПОРФТ, на 7-е сутки показатель АсАТ оказался наиболее низким и достоверно не отличался от исходных данных (148,50 [127,25; 163,25] ед./л; Mann-Whitney U Test, $p=0,337$). При исследовании уровня АлАТ в сыворотке крови животных всех групп было установлено, что активность этого фермента изменялась разнонаправленно и достоверно не отличалась от контрольных показателей (Mann-Whitney U Test, $p>0,05$).

Значимых изменений показателей азото-выделительной функции выявлено не было, лишь на 7-е сутки в III группе животных зафиксировано повышение уровня мочевины в 1,3 раза относительно физиологической нормы (8,0 [7,25; 8,0] и 6,0 [5,0; 6,25] ммоль/л соответственно).

Влияние ПОРФТ на динамику показателей окислительного стресса при тяжелом ОП отражено на рисунке 5.

Как известно, при тяжелом ОП поврежденная ацинарная клетка выделяет АФК и продукты ПОЛ, которые способны активировать нейтро-

Рис. 4. Динамика уровня АсАТ в крови экспериментальных животных ($n=12$ в каждой группе; * – достоверно в сравнении с интактными животными; # – достоверно в сравнении с 7 сутками животных III группы).



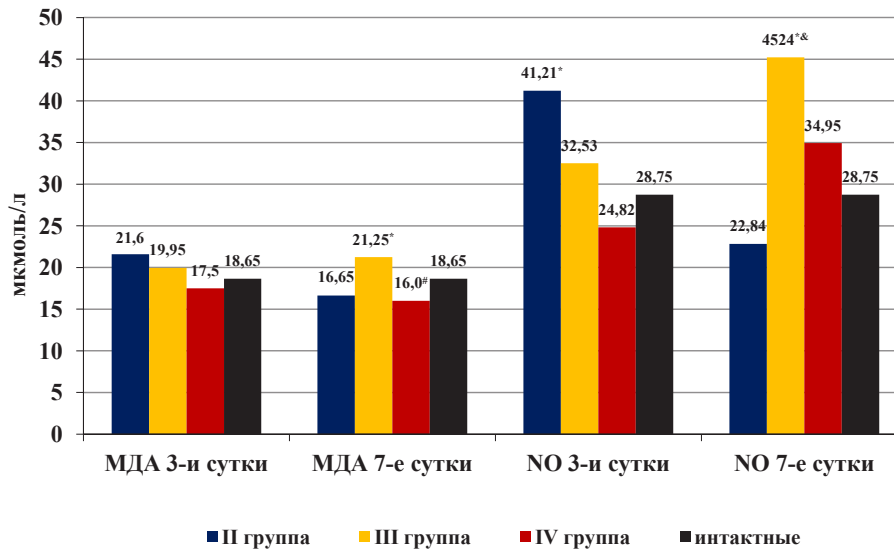


Рис. 5. Динамика уровня МДА и NO в крови экспериментальных животных (n=12 в каждой группе; * - достоверно в сравнении с интактными животными; # - достоверно в сравнении с 7 сутками животных III группы; & - достоверно в сравнении с 3 сутками в группе).

фины с последующим иницированием ССВО и развитием микроциркуляторных расстройств. Отображают интенсивность ПОЛ концентрации промежуточных (диеновых конъюгатов) и конечных (МДА – малонового диальдегида) продуктов окисления. Из рисунка 5 следует, что содержание МДА в крови животных II группы на 3-и сутки после создания модели ОЭП было выше, чем у интактных животных (21,60 [19,40; 22,45] и 18,65 [16,50; 19,53] мкмоль/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,109$). Последнее указывает на увеличение интенсивности свободнорадикального окисления, что и привело к накоплению в крови животных МДА. В III группе животных, несмотря на проводимое лечение, на 3-и сутки отмечалось увеличение содержания в крови МДА до 19,95 [18,10; 21,80] мкмоль/мл, далее на протяжении всего эксперимента показатель МДА в крови продолжал повышаться, и содержание его к 7-м суткам достигло максимальных значений (21,25 [19,68; 22,38] мкмоль/мл). В IV группе животных, где для лечения применялась ПОРФТ, на протяжении эксперимента значения МДА были самыми низкими и на 7-е сутки оказались достоверно ниже, чем в III группе 16,0 [15,13; 22,88] и 21,25 [19,68; 22,38] мкмоль/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,046$). Последнее свидетельствует о положительном влиянии ПОРФТ на интенсивность ПОЛ при тяжелом ОЭП.

Согласно полученным данным на 3-и сутки после создания тяжелой формы ОП концентрация NO в сыворотке крови животных II группы достоверно (на 43%) превышала значения у интактных животных (41,21 [40,30; 41,79] и 28,71 [21,70; 30,98] мкмоль/мл соот-

ветственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,004$). Применение для лечения обезболивания и физиологического раствора на 3-и сутки не препятствовало росту концентрации NO в сыворотке крови у животных III группы до 32,53 [25,59; 41,05] мкмоль/мл, в дальнейшем также наблюдалось повышение этого показателя, и на 7-е сутки его значение в 1,6 раза превышало нормальные показатели (45,24 [40,76; 46,64] и 28,71 [21,70; 30,98] мкмоль/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,01$). Применение ПОРФТ способствовало снижению содержания NO в сыворотке крови животных, и через 72 часа от начала эксперимента концентрация NO у животных IV группы была ниже таковой у интактных животных (24,82 [20,89; 30,11] и 28,71 [21,70; 30,98] мкмоль/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,423$). В дальнейшем отмечено некоторое повышение данного показателя, но все же на 7-е сутки концентрация NO в крови животных этой группы была ниже, чем у животных III группы (34,95 [21,47; 50,21] и 45,24 [40,76; 46,64] мкмоль/мл соответственно; Mann-Whitney U Test, $p=0,042$).

Полученные данные имеют важное значение, т.к. в результате взаимодействия оксида азота с АФК происходит образование пероксинитрита, который является крайне цитотоксичным продуктом, способным повреждать эндотелий. Он вызывает вазодилатацию, нарушает транспорт кислорода и приводит к ухудшению кислородного статуса организма. NO также стимулирует секвестрацию тромбоцитов, увеличивает проницаемость клеточных мембран, вызывает метаболические и структурные повреждения клеток эндотелия, обладает

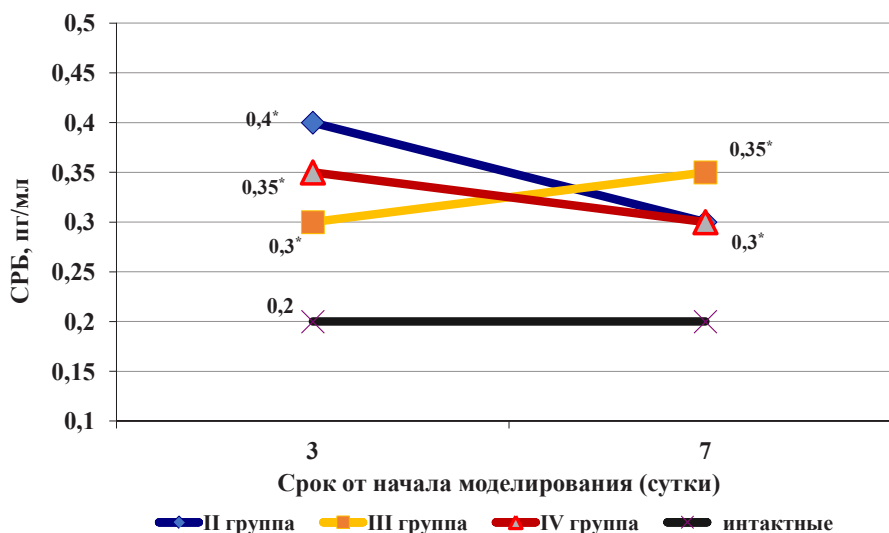


Рис. 6. Динамика уровня СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных (n=12 в каждой группе; * - достоверно в сравнении с интактными животными).

цитотоксическим эффектом [17]. Как было ранее установлено, взаимодействие между АФК и NO играет одну из ключевых ролей в развитии тяжелых форм панкреатита [5]. Таким образом, уменьшение интенсивности процессов ПОЛ и элементов эндогенной интоксикации после регионарного применения ПОРФТ подтверждает ее терапевтическую эффективность при ОЭП.

С целью оценки влияния ПОРФТ на иницирование ССВО при тяжелом ОЭП в динамике определяли уровни провоспалительных интерлейкинов и СРБ (рис. 6).

Согласно полученным данным, концентрация ФНО- α и Ил-6 в сыворотке крови животных II, III и IV групп через 72 часа от начала эксперимента не имела значимых различий, а содержание СРБ достоверно превышало исходный уровень (Mann-Whitney U Test; $p < 0,05$) и оставалось высоким на протяжении всего эксперимента (Mann-Whitney U Test; $p < 0,05$), без значимых различий этого показателя между группами. К концу эксперимента содержание СРБ в сыворотке крови животных IV группы было ниже, чем у животных III группы (0,30 [0,0; 0,30] и 0,35 [0,30; 0,48] пг/мл соответственно; Mann-Whitney U Test; $p = 0,273$).

Таким образом, регионарное применение ПОРФТ положительно влияет на основные патогенетические звенья при ранних стадиях тяжелого острого экспериментального панкреатита. Как показали исследования, использование ПОРФТ в ранние сроки снижает патологическую тромбоцитарную реакцию, у животных на 3-и сутки после применения ПОРФТ количество тромбоцитов в крови становилось наиболее высоким, а изменения их среднего объема были наименьшими. Использование ПОРФТ также уменьшало

системный воспалительный ответ и интенсивность процессов ПОЛ, что продемонстрировала динамика значений СРБ и МДА. Применение ПОРФТ препятствовало накоплению такого элемента эндогенной интоксикации, как оксид азота, а также росту активности альфа-амилазы и АсАТ в сыворотке крови животных, что может свидетельствовать о системном антиферментном, опосредованном через цитопротекторное, действии ПОРФТ в отношении клеточных структур поджелудочной железы.

Заключение

Использование различных схем терапии ОЭП показало, что ПОРФТ при раннем использовании благоприятно влияет на патологические изменения количества тромбоцитов, способствует снижению содержания элементов эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа, которые являются ключевыми звеньями патогенеза тяжелого ОП. Полученные данные также свидетельствуют о цитопротекторном действии ПОРФТ, применение которой может способствовать предупреждению цитолиза панкреоцитов, печеночных и других клеток организма на ранних стадиях тяжелого острого панкреатита.

Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов

Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь (государственная регистрация α 2020363).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов.

Этические аспекты.

Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено этическим комитетом УО «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол α 8 от 01.02.2022).

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh P, Garg PK. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J Gastroenterol*. 2016 May;35(3):153-66. doi: 10.1007/s12664-016-0647-y
2. Kotan R, Peto K, Deak A, Szentkereszty Z, Nemeth N. Hemorheological and Microcirculatory Relations of Acute Pancreatitis. *Metabolites*. 2022 Dec 20;13(1):4. doi: 10.3390/metabo13010004
3. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Mol Med*. 2014 Oct 29;20(1):466-77. doi: 10.2119/molmed.2014.00117
4. Minkov GA, Halacheva KS, Yovtchev YP, Gulubova MV. Pathophysiological mechanisms of acute pancreatitis define inflammatory markers of clinical prognosis. *Pancreas*. 2015 Jul;44(5):713-17. doi: 10.1097/MPA.0000000000000329
5. Pdureanu V, Florescu DN, Pdureanu R, Ghenea AE, Gheonea DI, Oancea CN. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*. 2022 Mar;23(3):197. doi: 10.3892/etm.2022.11120
6. Потапнев МП. Цитокиновый шторм: причины и последствия. *Иммунология*. 2021;42(2):175-88. doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-175-188
7. Куделич ОА, Кондратенко ГГ, Юдина ОА, Мотылянец ПМ. Мультивариантный анализ факторов, ассоциированных с непосредственными причинами смерти при тяжелом остром панкреатите. *Новости Хирургии*. 2014;22(4):416-27. doi: 10.18484/2305-0047.2014.4.416
8. Потапнев МП, Загородный ГМ, Кривенко СИ, Богдан ВГ, Свирский АО, Ясюкевич АС, Асаевич ВИ, Букач ДВ, Эйсмонт ОЛ. Современные аспекты применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, в лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата. *Спортивная Медицина: Наука и Практика*. 2019;9(4):33-45. doi: 10.17238/ISSN2223-2524.2019.4.33
9. Renn TY, Kao YH, Wang CC, Burnouf T. Anti-inflammatory effects of platelet biomaterials in a macrophage cellular model. *Vox Sang*. 2015 Aug;109(2):138-47. doi: 10.1111/vox.12264
10. Lana JF, Huber SC, Purita J, Tambeli CH, Santos GS, Paulus C, Annichino-Bizzacchi JM. Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP - The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade. *J Clin Orthop Trauma*. 2019 Oct;10(Suppl 1):S7-S12. doi: 10.1016/j.jcot.2019.05.008
11. Потапнев МП, Арабей АА, Кондратенко ГГ, Троянов АА, Космачева СМ, Игнатенко СИ, Кох-

- но ЕА, Данилкович НН, Кривенко СИ, Назарова ЕА, Левандовская ОВ, Копецкий ИС, Логинов ВВ. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина. *Здравоохранение*. 2014;9:32-40. <https://www.zdrav.by/category/nomera-zhurnalov/9-sentyabr-2014/>
12. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res*. 2012 Apr;173(2):258-66. doi: 10.1016/j.jss.2010.10.001
13. Asakawa T, Matsushita S. Coloring Condition of Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Hydroperoxides. *Lipids*. 1980;15(3):137-40. doi: 10.1007/BF02540959
14. Куделич ОА, Кондратенко ГГ, Летковская ТА, Потапнев МП, Неровня АМ, Степура ОА. Патоморфологическое обоснование модели тяжелого острого панкреатита. *Хирургия. Восточная Европа*. 2022;11(4):490-502. doi: 10.34883/PI.2022.11.4.014
15. Ho-Tin-Noi B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9(Suppl 1):56-65. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x
16. Шляхова МА, Марийко ВА, Казаков МС. Особенности изменения тромбоцитарного ростка кроветворения при тяжелом остром панкреатите. *Вестн Новых Мед Технологий*. 2019;13(6):75-79. doi:10.24411/2075-4094-2019-16582
17. Стародубцева МН. Двойственная роль пероксинитрита в организме. *Проблемы Здоровья и Экологии*. 2004;1(1):35-41. <https://journal.gsmu.by/jour/article/view/2228/1952>

REFERENCES

1. Singh P, Garg PK. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J Gastroenterol*. 2016 May;35(3):153-66. doi: 10.1007/s12664-016-0647-y
2. Kotan R, Peto K, Deak A, Szentkereszty Z, Nemeth N. Hemorheological and Microcirculatory Relations of Acute Pancreatitis. *Metabolites*. 2022 Dec 20;13(1):4. doi: 10.3390/metabo13010004
3. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Mol Med*. 2014 Oct 29;20(1):466-77. doi: 10.2119/molmed.2014.00117
4. Minkov GA, Halacheva KS, Yovtchev YP, Gulubova MV. Pathophysiological mechanisms of acute pancreatitis define inflammatory markers of clinical prognosis. *Pancreas*. 2015 Jul;44(5):713-17. doi: 10.1097/MPA.0000000000000329
5. Pdureanu V, Florescu DN, Pdureanu R, Ghenea AE, Gheonea DI, Oancea CN. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*. 2022 Mar;23(3):197. doi: 10.3892/etm.2022.11120
6. Potapnev MP. Cytokine storm: causes and consequences. *Immunologia*. 2021;42(2):175-88. (In Russ.)
7. Kudelich OA, Kondratenko GG, Yudina OA, Motolyanets PM. Multivariate analysis of factors associated with immediate causes of death in severe acute pancreatitis *Novosti Khirurgii*. 2014;22(4):416-27. doi: 10.18484/2305-0047.2014.4.416 (In Russ)
8. Potapnev MP, Zagorodny GM, Krivenko SI, Bogdan VG, Svirsky AO, Yasyukevich AS, Asaevich VI, Bukach DV, Eismont O.L. Modern aspects of the

use of plasma enriched in soluble platelet factors in the treatment of injuries and diseases of the musculoskeletal system. *Sports Medicine: Research and Practice*. 2019;9(4):33-45. <https://doi.org/10.17238/ISSN2223-2524.2019.4.33> (In Russ.)

9. Renn TY, Kao YH, Wang CC, Burnouf T. Anti-inflammatory effects of platelet biomaterials in a macrophage cellular model. *Vox Sang*. 2015 Aug;109(2):138-47. doi: 10.1111/vox.12264

10. Lana JF, Huber SC, Purita J, Tambeli CH, Santos GS, Paulus C, Annichino-Bizzacchi JM. Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP - The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade. *J Clin Orthop Trauma*. 2019 Oct;10(Suppl 1):S7-S12. doi: 10.1016/j.jcot.2019.05.008

11. Potapnev MP, Arabey AA, Kondratenko GG, Troyanov AA, Kosmacheva SM, Ihnatsenko SI, Kakhno AA, Danilkovich NN, Krivenko SI, Nazarova EA, Levandovskaya OV, Kopetski IS, Loginov VV. Soluble preparations of platelet growth factors and their medical implementation *Zdravookhranenie*. 2014;9:32-40. <https://www.zdrav.by/category/nomera-zhurnalov/9-sentyabr-2014> (In Russ.)

12. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich

plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res*. 2012 Apr;173(2):258-66. doi: 10.1016/j.jss.2010.10.001

13. Asakawa T, Matsushita S. Coloring Condition of Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Hydroperoxides. *Lipids*. 1980;15(3):137-40. <https://doi.org/10.1007/BF02540959>

14. Kudelich OA, Kondratenko GG, Letkovskaya TA, Potapnev MP, Nerovnya AM, Stepuro OA. Morphological Substantiation of Severe Acute Pancreatitis Model. *Khirurgiia. Vostochnaia Evropa*. 2022;11(4):490-502 (In Russ.)

15. Ho-Tin-Noï B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9(Suppl 1):56-65. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x

16. Schlyakhova MA, Marijko VA, Kazakov MS. Features of changes in platelet growth of hematopoiesis in severe acute pancreatitis. *Vestn Novykh Med Tekhnologii*. 2019;13(6):75-79. doi:10.24411/2075-4094-2019-16582 (In Russ.)

17. Starodubtseva MN. Dual role of peroxynitrite in organism. *Problemy Zdorov'ia i Ekologii*. 2004;1(1):35-41. <https://journal.gsmu.by/jour/article/view/2228/1952> (In Russ)

Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Дзержинского, 83,
Белорусский государственный медицинский
университет, кафедра хирургии
и трансплантологии,
тел. моб.: +375 29 1280783,
e-mail: kudelichsurg@gmail.com,
Куделич Олег Аркадьевич

Address for correspondence

220116, Republic of Belarus,
Minsk, Dzerzhinsky Ave. 83,
Belarusian State Medical University,
Department of Surgery and Transplantation,
tel. mob.: +375 29 1280783,
e-mail: kudelichsurg@gmail.com,
Kudelich Oleg Arkadievich

Сведения об авторах

Куделич Олег Аркадьевич, к.м.н., доцент кафедры хирургии и трансплантологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь. <https://orcid.org/0000-0003-0569-3427>

Кондратенко Геннадий Георгиевич, д.м.н., профессор кафедры хирургии и трансплантологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь. <https://orcid.org/0000-0001-5295-1068>

Потапнев Михаил Петрович, д.м.н., зав. отделом клеточных биотехнологий и медицинских биотехнологий ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь. <https://orcid.org/0000-0002-6805-1782>

Information about the authors

Kudelich Oleg A., PhD, Associate Professor of the Department of Surgery and Transplantation, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0003-0569-3427>

Kondratenko Gennady G., MD, Professor, Department of Surgery and Transplantation, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0001-5295-1068>

Potapnev Mikhail P., MD, Head of the Department of Cellular Biotechnologies and Medical Biotechnologies, Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0002-6805-1782>

Информация о статье

Поступила 8 февраля 2023 г.
Принята в печать 24 февраля 2023 г.
Доступна на сайте 27 февраля 2023 г.

Article history

Arrived: 8 February 2023
Accepted for publication: 24 February 2023
Available online: 27 February 2023