

Регионарное использование внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток при остром некротизирующем панкреатите в эксперименте

О.А. Куделич^{✉1}, Г.Г. Кондратенко¹, М.П. Потапнев², О.В. Клименкова², Н.В. Гончарова²

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
220083, Беларусь, Минск, пр-т Дзержинского, д. 83;

² ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ,
220053, Беларусь, Минск, Долгиновский тракт, д. 160

✉ Автор, ответственный за переписку: Олег Аркадьевич Куделич, канд. мед. наук, доцент кафедры хирургии и трансплантологии Белорусского государственного медицинского университета, kudelichsurg@gmail.com

Аннотация

Актуальность. Актуальность проблемы лечения острого панкреатита обусловлена увеличением заболеваемости с ростом числа некротизирующих форм, сопровождающихся большой частотой развития тяжелых осложнений и высокой летальностью.

Цель. Выявить воздействие на показатели эндогенной интоксикации при остром некротизирующем панкреатите регионарного использования внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток в эксперименте.

Материал и методы. Модель острого некротизирующего панкреатита создавали стандартно введением 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в хвостовую часть поджелудочной железы крыс. Исследования выполнены на 42 половозрелых крысах-самцах линии Wistar, которые случайным образом были разделены на четыре группы. В I группу (n=6) вошли интактные животные, II группу (контрольная) (n=12) составили животные с острым панкреатитом без лечения, III группу (n=12) – животные с острым панкреатитом, лечение которых проводилось обезболиванием и инфузией 0,9% раствора натрия хлорида, в IV группе животных (n=12) лечение острого панкреатита осуществлялось обезболиванием, инфузией 0,9% раствора натрия хлорида и дополнялось регионарным введением микровезикул мезенхимальных стромальных клеток. Клетки получали из костного мозга здоровых животных, микровезикулы – методом их дифференциального центрифугирования в стерильных условиях. Микровезикулы вводили через сутки после моделирования панкреатита через установленный катетер к патологически измененной части поджелудочной железы. Дозу микровезикул рассчитывали как эквивалентную (полученную из) 1 млн мезенхимальных стромальных клеток. На 3-и и 7-е сутки от начала моделирования заболевания оценивали гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (альфа-амилаза, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза), маркеры эндогенной интоксикации (активность перекисного окисления липидов, уровень оксида азота), маркеры системного воспалительного ответа (фактор некроза опухоли-α, интерлейкин-6).

Результаты. Регионарное использование внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток при лечении острого экспериментального некротизирующего панкреатита на ранней стадии способствует нормализации уровня тромбоцитов крови, снижению ферментемии, элементов эндогенной интоксикации (интерлейкин-6, фактор некроза опухоли-α) и уровня оксида азота.

Заключение. Раннее применение внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток при лечении острого некротизирующего панкреатита в эксперименте положительно влияет на показатели, которые являются ключевыми звеньями патогенеза и ведущими маркерами тяжести данного заболевания.

Ключевые слова: внеклеточные микровезикулы, мезенхимальные стромальные клетки, острый панкреатит, синдром системного воспалительного ответа, поджелудочная железа

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь (государственная регистрация № 2020363)

Одобрение комитета по этике Исследование одобрено этическим комитетом УО «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 8 от 01.02.2022)

Для цитирования: Куделич О.А., Кондратенко Г.Г., Потапнев М.П., Клименкова О.В., Гончарова Н.В. Регионарное использование внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток при остром некротизирующем панкреатите в эксперименте. Трансплантология. 2024;16(3):313–327. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-3-313-327>

Regional use of extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells in acute necrotizing pancreatitis in an experiment

O.A. Kudelich^{✉1}, G.G. Kondratenko¹, M.P. Potapnev², O.V. Klimenkova², N.V. Goncharova²

¹ Belarusian State Medical University,
83 Dzerzhinsky Ave., Minsk 220083 Belarus;

² Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies,
160 Dolginovsky Tract, Minsk 220053 Belarus

✉Corresponding author: Oleg A. Kudelich, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Surgery and Transplantology, Belarusian State Medical University, kudelichsurg@gmail.com

Abstract

Background. The significance of the problem of treatment of acute pancreatitis is due to an increase in the incidence with an increase in the number of necrotizing forms, accompanied by a high incidence of severe complications and high mortality.

Objective. To identify the impact of regionally used extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells on the endogenous intoxication markers in acute necrotizing pancreatitis in the experiment.

Material and methods. Acute pancreatitis was induced by the introduction of a 0.3 ml of 5% solution of non-ionic polyethylene glycol octylphenol ether detergent into the caudal part of the rat pancreas. The study was conducted on 42 adult Wistar rats, which were randomly divided into 4 groups. Group I (n=6) included intact animals, Group II (control group) (n=12) included rats with pancreatitis without treatment, Group III (n=12) consisted of rats with pancreatitis treated with analgesia + infusions of 0.9% sodium chloride solution (saline), Group IV (n=12) included rats with pancreatitis treated with analgesia+ saline infusions + regional application of extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells. Cells were obtained from the bone marrow of healthy animals. Microvesicles were obtained by differential centrifugation under sterile conditions. Microvesicles were administered one day after the pancreatitis induction through the catheter installed into the pathologically altered part of the pancreas. The dose of microvesicles was calculated as equivalent to (derived from) 1 million mesenchymal stromal cells. The hematological parameters, markers of the systemic manifestation of the pathological process (alpha-amylase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase), the endogenous intoxication markers (lipid peroxidation activity, nitric oxide level), the systemic inflammatory response markers (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) were studied on the 3rd and 7th day from the start of disease modeling.

Results. Regional use of extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute experimental necrotizing pancreatitis at an early stage helped to normalize the level of blood platelets, reduce enzymeemia, elements of endogenous intoxication (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha), and the nitric oxide level.

Conclusion. The early application of extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute necrotizing pancreatitis in an experiment has a positive effect on parameters, which are key links of pathogenesis and leading markers of this disease severity.

Keywords: extracellular microvesicles, mesenchymal stem cells, acute pancreatitis, systemic inflammatory response syndrome, pancreas

CONFLICT OF INTERESTS Authors declare no conflict of interest

FINANCING The study was carried out thanks to the financial support of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (State Registration No. 2020363)

ETHICS COMMITTEE The study was approved by the Ethics Committee of the Belarusian State Medical University (protocol No. 8 of 02.01.2022)

For citation: Kudelich OA, Kondratenko GG, Potapnev MP, Klimenkova OV, Goncharova NV. Regional use of extracellular microvesicles of mesenchymal stromal cells in acute necrotizing pancreatitis in an experiment. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2024;16(3):313–327. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-3-313-327>

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АФК – активная форма кислорода
ИЛ – интерлейкин
МДА – малоновый диальдегид
МВ – внеклеточные микровезикулы
МСК – мезенхимальные стромальные клетки
ОНП – острый некротизирующий панкреатит
ОП – острый панкреатит

ОЭП – острый экспериментальный панкреатит
ПЖ – поджелудочная железа
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПОН – полиорганная недостаточность
ССВО – синдром системного воспалительного ответа
ФНО-α – фактор некроза опухоли альфа
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦШ – цитокиновый шторм
NO – оксид азота

Введение

Заболеваемость острым панкреатитом (ОП) за последнее десятилетие остается на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению [1]. В 15–30% наблюдений заболевание отличается тяжелым течением с высокой летальностью – от 15 до 40% [2]. Столь высокая частота неблагоприятных исходов, особенно на ранних стадиях острого тяжелого панкреатита, во многом обусловлена выраженной эндогенной интоксикацией, неэффективная и несвоевременная коррекция которой лежит в основе развития полиорганной недостаточности [1, 2].

Клеточная терапия с применением мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК) при различных заболеваниях рассматривается как новое перспективное направление в экспериментальной и клинической медицине. Биологическая и терапевтическая активность МСК связана с доступностью источника получения (костный мозг, жировая ткань, пуповина и др.), а также доказанным противовоспалительным, иммуномодулирующим и регенеративным действием при целом перечне патологических состояний [3]. Использование биотерапевтических препаратов на основе МСК в медицине в настоящее время расширяется; МСК сегодня уже стали предметом сотен клинических испытаний. Клеточная терапия при остром панкреатите в эксперименте впервые была описана К.Н. Jung et al. в 2011 году [4]. Использование МСК при экспериментальном ОП имеет своей целью оказать противовоспалительное действие за счет повышения устойчивости клеток к пироптозу (клеточной смерти, связанной с воспалительным процессом) и снижению выраженности воспаления. В экспериментальных условиях установлено, что применение МСК у крыс при ОП приводит к уменьшению отека поджелудочной железы и кровоизлияний, снижает уровень некроза клеток и подавляет признаки системного воспаления [5].

Между тем использование МСК имеет свои ограничения, в том числе потому, что они плохо хранятся и требуют введения в течение 2–4 часов после получения *in vivo*. При введении пациентам большинство клеток погибает в течение 2–5 суток, в результате разрушения клеток могут возникать нежелательные респираторные и воспалительные реакции у пациентов, при системном внутривенном введении большинство стволовых клеток оседает в легких [6]. Механизм действия МСК до настоящего времени является предметом обсу-

ждений. Предполагается, что МСК оказывают контактное действие, секреторируют внеклеточные микровезикулы (МВ) или растворимые факторы, посредством чего проявляют свою терапевтическую эффективность. В настоящее время некоторые препараты на основе внеклеточных микровезикул, полученных из МСК, уже проходят клинические исследования как новое направление по применению биопродуктов клеточного происхождения при различных патологических состояниях [7]. Проведенные исследования показали, что образующиеся микровезикулы влияют на ключевые моменты биологических процессов, включая мембранный перенос и горизонтальный перенос генетического материала (различные протеины, рибонуклеиновая кислота). Согласно минимальным критериям, термин «внеклеточные микровезикулы» – общий для частиц, естественным образом высвобождаемых из клеток, ограниченных двойным липидным слоем и не способных реплицироваться, так как они не содержат функционального ядра [8]. Внеклеточные микровезикулы получают из культуральной среды при поддержании МСК *in vitro* в условиях легкого клеточного стресса, не вызывающего гибели клеток. При этом МВ отщипываются от клеток и несут на себе участки внешней мембраны МСК, они стабильны и могут храниться в замороженном виде в течение 1 года без потери физиологической активности. МВ обладают биологической активностью, присущей МСК – стимулируют ангиогенез, модулируют иммунные реакции, подавляют апоптоз, усиливают клеточную пролиферацию [7–9]. Использование МВ МСК оказалось благоприятным при лечении поражения суставов (остеоартрите) у мышей [10], травматического повреждения и моделированной болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда у крыс [11, 12], моделированной аллергической астмы, легочной артериальной гипертензии, индуцированного фиброза печени и острого пиелонефрита у мышей [13–16], ожогах кожи у крыс [17]. Эффективность МВ МСК при остром панкреатите не изучалась.

Таким образом, наряду с МСК для противовоспалительной и регенеративной терапии при остром экспериментальном панкреатите целесообразно с научной точки зрения изучить результаты использования МВ, полученных из МСК. Широкая распространенность ОП и неудовлетворительные результаты оказания медицинской помощи пациентам с данной патологией свидетельствуют об актуальности предлагаемой разработки с целью последующего внедрения в

клиническую практику в качестве нового более эффективного средства и способа лечения.

Цель. Выявить воздействие на показатели эндогенной интоксикации при остром некротизирующем панкреатите регионарного использования внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток в эксперименте.

Материал и методы

На базе vivария Белорусского государственного медицинского университета выполнены экспериментальные исследования, которые 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». Животных выдерживали в выделенном боксе в течение одной недели для адаптации к новым условиям, перед началом исследования взвешивали и осматривали на наличие признаков болезней.

Дизайн эксперимента. На 42 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275–380 г проведено экспериментальное исследование, во время которого животные случайным образом были разделены на четыре группы: I группа (n=6) – интактные, II группа (контрольная) (n=12) – крысы с острым некротизирующим панкреатитом (ОНП) без лечения, III группа (n=12) – крысы с ОНП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида, IV группа (n=12) – крысы с ОНП, получавшие лечение: обезболивание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + регионарное введение МВ МСК. Определяли на 3-и и 7-е сутки гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (активность альфа-амилазы, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), маркеры системного воспалительного ответа (ФНО- α , ИЛ-6) и эндогенной интоксикации (активность перекисного окисления липидов – ПОЛ, уровень оксида азота – NO).

Случайным образом до начала эксперимента было изъято 6 крыс для предварительной оценки лабораторных показателей. Полученные данные не отличались от нормальных физиологических

показателей у представителей используемых лабораторных животных и поэтому были приняты за норму.

Моделирование острого некротизирующего панкреатита

Для выполнения манипуляций животных подвергали анестезии тиопенталом натрия (производитель ОАО «Синтез», Курган, Российская Федерация) из расчета 45 мг/кг массы животного. С целью моделирования некротизирующей формы ОП стандартно всем животным выполняли лапаротомию и в хвостовую (желудочно-селезеночную) часть поджелудочной железы (ПЖ) инсулиновым шприцем вводили 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира (тритон X-100, производитель Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия).

Метод регионарного введения внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток при лечении острого некротизирующего панкреатита

После создания модели ОП животным IV группы через контрапертуру на передней брюшной стенке в левом нижнем квадранте в брюшную полость вводили катетер из прозрачного термопластичного имплантационно-нетоксичного поливинилхлорида по разработанной нами методике (рис. 1). 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 вводимого лекарственного средства только по боковому отверстию непосредственно к патологическому процессу в ПЖ. После завершения манипуляции ПЖ аккуратно погружали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку ушивали наглухо однорядными узловыми швами (изобретение № 24210 от 28.12.2023, РБ).

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

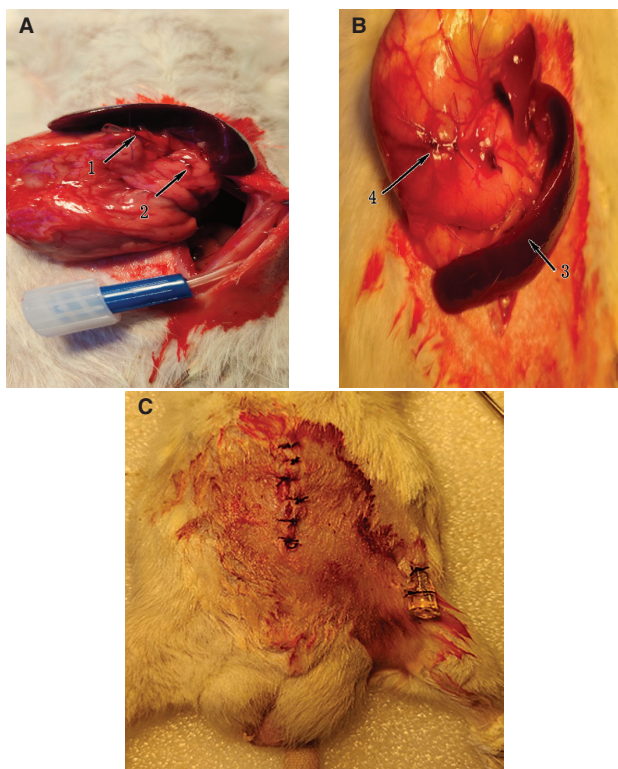


Рис. 1. Способ установки катетера для регионального введения лекарственных средств при лечении острого экспериментального панкреатита у крысы. А – проксимальная часть катетера уложена между желудочно-селезеночной частью ПЖ и селезенкой (1 – проксимальная часть катетера, 2 – поджелудочная железа); В – проксимальный конец катетера фиксирован к желудку погружным П-образным швом (3 – селезенка, 4 – П-образный шов на желудке); С – вид послеоперационной раны и катетера, выведенного через контрапертуру на коже

Fig. 1. Method of placing the catheter for regional administration of drugs in the treatment of acute experimental pancreatitis in a rat model. A. The proximal part of the catheter is placed between the gastrosplenic part of the pancreas and the spleen (1, Proximal part of the catheter; 2, Pancreas); B. The proximal end of the catheter is fixed to the stomach with a submersible U-shaped suture (3, Spleen; 4, U-shaped suture on the stomach); C. View of a postoperative wound and a catheter pulled out through a counter-aperture on the skin

Лечение острого некротизирующего панкреатита в эксперименте

С целью изучения влияния МВ МСК на ранние патологические системные изменения при ОП лечение начинали через 24 часа от начала эксперимента. Животным III группы, кроме обезболивания, внутривенно вводили 0,9% раствор натрия хлорида в объеме 2 мл 1 раз в сутки, а животным IV группы вышеуказанное лечение дополняли регионарным введением через установленный катетер суспензии МВ МСК в объеме 1,0 мл приготовленного раствора. Дозу микровезикул рассчитывали, как эквивалентную, полу-

ченную из 1 млн мезенхимальных стромальных клеток.

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

Методика получения внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток крыс и их характеристика

Из костного мозга получали образцы МСК от крыс породы Wistar. Выделение МСК проводили путем адгезии клеток к пластику на культуральных флаконах T25 (Sarstedt, Германия). Визуальный контроль клеток осуществляли в инвертированном микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия) при увеличении $\times 25$ раз. Для идентификации выделенных МСК оценивали степень экспрессии на поверхности мембран CD90 (BIO-RAD, cat. 158952) и CD45 (BD Biosciences, США), идентифицирующих молекулы МСК. Регистрацию и анализ данных производили с использованием проточного цитометра FACSCantoII и программного обеспечения FACSDiva 8.0 (Becton Dickinson, США).

Для выделения и характеристики МВ из культуральной среды, согласно минимальным критериям исследования внеклеточных везикул, выполняли базовую характеристику культивируемых клеток, а также условий культивирования и сбора культуральной жидкости [18].

На первом этапе МСК высевали в культуральный флакон T75 в концентрации 550 тысяч клеток/флакон в полную питательную среду DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и раствора антибиотиков (стрептомицин/пенициллин). Клетки культивировали в углекислотном инкубаторе при поддержании в нем температуры, равной 37°C , и 5% содержания углекислоты в течение 2 дней до достижения конфлюентности на ростовой поверхности 95–100%.

На втором этапе для обогащения культуральной среды микровезикулами культуру клеток

промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и переводили культуру на бессывороточную среду DMEM/F12 (10 мл). Культивирование продолжали в течение 48 часов для создания условий легкого клеточного стресса, не вызывающего некротической гибели клеток и способствующего выделению внеклеточных МВ.

Третий этап представлял собой непосредственно получение фракции МВ из культуральной жидкости МСК. Получение МВ проводили с использованием метода дифференциального центрифугирования в стерильных условиях.

Таким образом, стандартом количества МВ на одно животное являлось их приготовление из 10 мл кондиционной среды из одного культурального флакона (Т75) и разведение в 1 мл раствора ФСБ.

Идентификацию микровезикул проводили на проточном цитометре FACSCantoII относительно латексных калибровочных частиц Negative Control Compensation Particles Set и контролей. Популяцию МВ оценивали после выделения логического «гейта» микровезикул (частицы от 300 до 1000 нм) в Dot/Plot анализе, ориентируясь на их расположение относительно калибровочных частиц по прямому и боковому светорассеиванию и отсекая область «шума», находящуюся ниже порогового уровня чувствительности прибора. Количество МВ оценивалось как количество регистрируемых событий ("events") в выделенной области. На пробу анализировали от 100 000 до 150 000 частиц. Для идентификации популяции микрочастиц от других сигналов прибора («шум») были использованы контроли: фосфатно-солевой буфер, фильтрованный через шприцевой фильтр с пораами величиной 0,2 мкм, и неокрашенная популяция микровезикул. Для иммунофенотипической характеристики МВ МСК крыс использовали антитела против CD90, CD45 и оценивали степень их экспрессии на поверхности мембран.

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

С использованием биохимического анализатора А-25, BioSystems (Испания) и наборов реактивов для него (Diasens, Республика Беларусь и

Fenox Medical Solutions, Республика Беларусь) исследованы биохимические показатели сыворотки крови животных: активность АЛТ, АСТ, альфа-амилазы.

Содержание оксида азота определяли с использованием набора реагентов Bioassay Technology laboratory (КНР) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию ИЛ-6 в образцах сыворотки 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 Cloud-CloneCorp (КНР).

Оценку интенсивности ПОЛ проводили по уровню накопления вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). По методу Т. Asakava и S. Matsshita (1980) определяли содержание МДА в гемолизатах крови животных [19].

Статистика

Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых переменных нормальному распределению по критерию Колмогорова–Смирнова. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25;Q75). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

По результатам проведенных нами ранее исследований, модель ОНП, созданная введением 0,3 мл 5% раствора тритона X-100 в ткань ПЖ, позволяет воспроизвести у животных форму заболевания с гистологической картиной некроза ткани железы и патоморфологическими изменениями в сердце, легких, печени и почках, а также с развитием эндогенной интоксикации и существенными изменениями системных показателей [20, 21].

В настоящем исследовании получены данные, из которых следует, что у животных II и III группы отмечалось статистически значимое снижение количества тромбоцитов. Как показано на рис. 2, на 3-и сутки в крови животных II и III групп, где МВ МСК не применялись, тромбоцитопения была

наиболее выраженной, а количество тромбоцитов было статистически значимо меньше, чем в крови интактных животных ($p < 0,05$). У животных IV группы, где для лечения применялись МВ МСК, уровень содержания тромбоцитов на 3-и сутки был наиболее высокий и не отличался от данного показателя у интактных животных: $734,5 (574,50; 843,75)$ и $553,0 (428,25; 751,0) \times 10^9/\text{л}$ соответственно; $p > 0,05$).

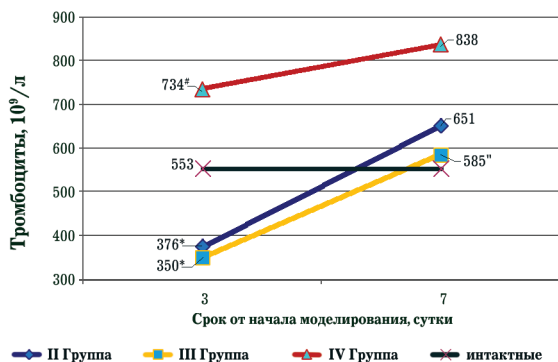


Рис. 2. Динамика уровня тромбоцитов в крови экспериментальных животных ($n=6$ в каждой подгруппе; * – статистически значимо по сравнению с результатами у интактных животных; # – статистически значимо по сравнению с результатами на 3-и сутки у животных III группы; " – статистически значимо между результатами на 3-и и 7-е сутки в группе)

Fig. 2. Dynamics of platelet levels in the blood of experimental animals ($n=6$ in each subgroup; * – significant difference when compared with intact animals; # – significant difference when compared with the results of group III animals on day 3; " – statistically significant difference between the results in the group on days 3 and 7)

На протяжении эксперимента в дальнейшем у всех животных отмечалось нарастание уровня тромбоцитов, и на 7-е сутки этот показатель статистически значимо не отличался от такового у интактных животных ($p > 0,05$). Установлено, что после применения МВ МСК у животных IV группы на 7-е сутки уровень тромбоцитов оказался наиболее высоким $(838,5 (531,50; 1055,25) \times 10^9/\text{л})$.

У экспериментальных животных наблюдалась преждевременная активация ферментов поджелудочной железы и уклонение их в системный кровоток, что является важным ранним звеном патогенеза ОП. На 3-и сутки от начала моделирования тяжелого ОП во II группе животных (без лечения) отмечалась наиболее высокая активность α -амилазы, которая статистически значимо отличалась от данного показателя у интактных животных $(904,0 (845,0; 1339,50)$ и $819,0 (499,75; 980,0)$ ед./мл соответственно; $p < 0,05$). В

III группе в эти же сроки активность α -амилазы составила $744,0 (721,50; 855,0)$ ед./мл, а в IV группе животных, где для лечения использовались МВ МСК, активность α -амилазы составила $873,50 (748,50; 1051,75)$ ед./мл без статистически значимых отличий от нормальных значений ($p > 0,05$). В дальнейшем, через 7 суток наблюдения, во II и III группах животных активность α -амилазы не менялась, а в IV группе изменения данного показателя не имели статистически значимых различий между группами.

Для определения влияния МВ МСК на цитолиз гепатоцитов, индуцированный эндотоксинами, при тяжелом ОП проведено исследование динамики активности основных внутриклеточных ферментов (АСТ и АЛТ), которые служат индикаторами повреждения печеночной ткани. Установлено, что на 3-и сутки у животных II и III групп уровень АСТ в сыворотке крови был выше, чем у интактных животных, а у животных IV группы в эти сроки значения АСТ были ниже нормы $(99,15 (84,55; 125,53)$ и $124,50 (96,25; 156,0)$ ед./л соответственно; $p > 0,05$) (рис. 3). В дальнейшем наблюдалось повышение этого показателя у животных всех опытных групп, однако в III группе животных, где для лечения применялся физраствор, уровень АСТ возрастал наиболее интенсивно ($p = 0,006$) 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; $p < 0,05$.

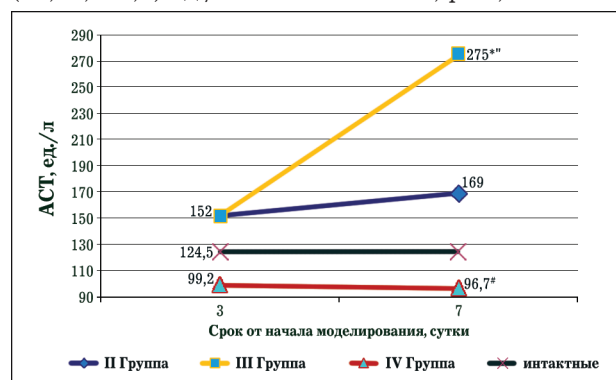


Рис. 3. Динамика уровня аспаратаминотрансферазы в крови экспериментальных животных ($n=6$ в каждой подгруппе; * – статистически значимо по сравнению с результатами у интактных животных; # – статистически значимо в сравнении с результатами на 7-е сутки у животных II и III группы; " – статистически значимо между результатами на 3-и и 7-е сутки в группе)

Fig. 3. Dynamics of aspartate aminotransferase in the blood of experimental animals ($n=6$ in each subgroup; * – significant difference when compared with intact animals; # – significant difference when compared with animals of groups II and III on day 7; " – significant differences between the results in the group on days 3 and 7)

В IV группе животных, где применялись МВ МСК, на 7-е сутки показатель АСТ оказался наиболее низким – 96,7 (92,55;115,13) ед./л) и был статистически значимо ниже значений данного показателя у животных II и III групп ($p<0,05$). При исследовании уровня АЛТ в сыворотке крови животных всех групп было установлено, что активность этого фермента изменялась разнонаправленно и статистически значимо не отличалась от контрольных показателей ($p>0,05$).

Для оценки влияния МВ МСК на развитие синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) при тяжелом ОЭП в динамике определяли уровни цитокинов ФНО- α и ИЛ-6. Как представлено на рис. 4, в IV группе животных на 3-и сутки, где базисная терапия сочеталась с введением МВ МСК, концентрация ИЛ-6 была статистически значимо ниже по сравнению с данным показателем у животных II и III групп, и в 2,6 раза ниже значений интактных животных (98,2 (71,30;102,75) и 258,30 (209,30;333,25) пг/мл соответственно; $p<0,05$).

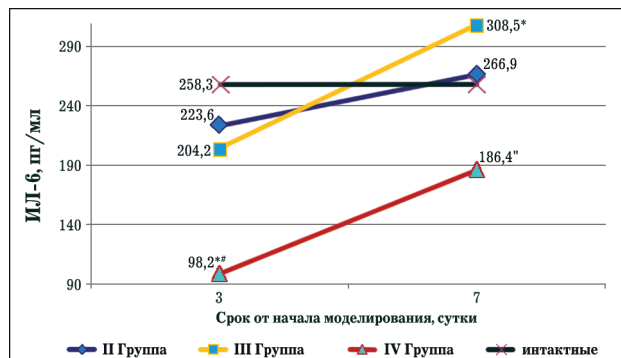


Рис. 4. Динамика концентрации интерлейкин-6 в сыворотке крови экспериментальных животных (n=6 в каждой подгруппе; * – статистически значимо по сравнению с результатами у интактных животных; # – статистически значимо по сравнению с результатами на 3-и сутки у животных II и III групп; - – статистически значимо между результатами на 3-и и 7-е сутки в группе)

Fig. 4. Dynamics of interleukin-6 concentration in the blood serum of experimental animals (n=6 in each subgroup; * – significant difference when compared with intact animals; # – significant difference when compared with the results in animals of groups II and III on day 3; - – significant difference between the results in the group on days 3 and 7)

В дальнейшем без статистически значимых различий между группами отмечалось повышение значений этого показателя, причем только у животных III группы (стандартная терапия) концентрация ИЛ-6 к 7-м суткам эксперимента оказалась наиболее высокой и отличалась от значений у интактных животных: (308,50

(232,33;406,43) и 258,30 (209,30;333,25) пг/мл соответственно; $p<0,05$).

Во II группе животных (без лечения) отмечался самый значительный рост концентрации ФНО- α , на 3-и сутки этот показатель статистически значимо был выше, чем в группе интактных животных: (1,73 (1,47;1,87) и 1,45 (1,32;1,77) пг/мл соответственно; $p<0,05$) (рис. 5).

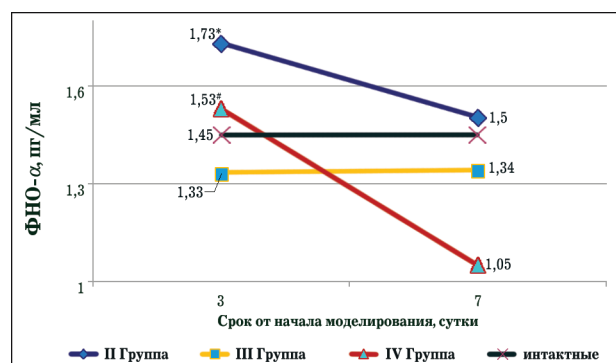


Рис. 5. Динамика концентрации фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови экспериментальных животных (n=6 в каждой подгруппе; * – статистически значимо по сравнению с результатами у интактных животных; # – статистически значимо по сравнению с результатами на 3-и сутки у животных II группы)

Fig. 5. Dynamics of tumor necrosis factor alpha concentration in the blood serum of experimental animals (n=6 in each subgroup; * – significant difference when compared with intact animals; # – significant difference when compared with the results of group II animals on day 3)

Существенного повышения концентрации ФНО- α у животных III группы на протяжении всего эксперимента не наблюдалось. В IV группе, где применялись МВ МСК, на 3-и сутки эксперимента концентрация ФНО- α не отличалась от интактных значений: (1,53(1,08;1,95) и 1,45(1,32;1,77) пг/мл соответственно; $p>0,05$). На 7-е сутки концентрация ФНО- α во II группе снизилась с 1,73 (1,47;1,87) до 1,50 (1,16;1,76) пг/мл, однако оставалась более высокой, чем у животных III и IV группы: 1,34 (1,21;2,47) и 1,05 (0,81;2,94) пг/мл соответственно; $p>0,05$).

Согласно полученным в исследованиях данным, содержание МДА в крови животных II группы на 3-и сутки после создания модели ОП было выше, чем у интактных животных: 21,60 (19,40;22,45) и 18,65 (16,50;19,53) мкмоль/мл соответственно; $p>0,05$, что указывает на увеличение интенсивности свободнорадикального окисления. У животных III группы, 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 экспери-

мента 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 применение МВ МСК не препятствовало накоплению МДА, на 3-и сутки эксперимента его значения были выше, чем у животных II и III групп, и в 2 раза выше значений интактных животных: 36,2 (34,98;39,0) и 18,65 (16,50;19,53) мкмоль/мл соответственно; $p < 0,05$. В дальнейшем отмечался рост этого показателя до 45,64(36,03;56,36) мкмоль/мл, и на 7-е сутки он был выше, чем в других группах животных ($p < 0,05$).

Цитотоксическое воздействие при тяжелых формах ОП обусловлено активацией кислород-зависимых механизмов и синтезом оксида азота. Данные исследования показали, что на 3-и сутки после создания некротизирующей формы ОП концентрация оксида азота в сыворотке крови животных II группы статистически значимо (на 81%) превышала значения у интактных животных: 29,22 (19,42;35,48) и 16,04 (14,31;23,54) мкмоль/мл соответственно; $p < 0,05$ (рис. 6).

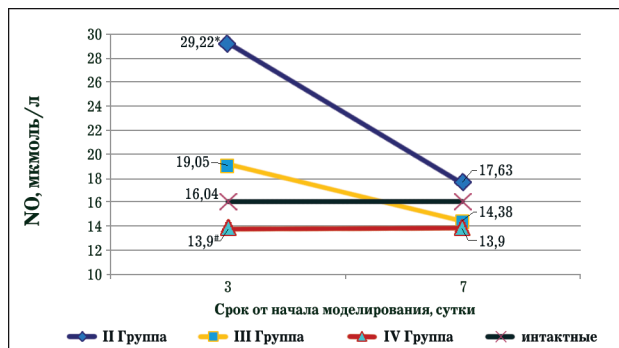


Рис. 6. Динамика уровня оксида азота в крови экспериментальных животных (n=6 в каждой подгруппе; * – статистически значимо по сравнению с результатами у интактных животных; # – статистически значимо по сравнению с результатами на 3-и сутки у животных II и III группы)

Fig. 6. Dynamics of the nitric oxide level in the blood of experimental animals (n=6 in each subgroup; * – significant difference when compared with intact animals; # – significant difference when compared with the results of groups II and III animals on day 3)

Применение для лечения базисной терапии на 3-и сутки не препятствовало росту концентрации оксида азота в сыворотке крови у животных III группы до 19,05 (14,78;23,30) мкмоль/мл. Далее на протяжении всего эксперимента у животных II и III групп наблюдалось снижение уровня этого показателя и на 7-е сутки данный показатель в обеих группах статистически значимо не отличался от значений у интактных животных

($p > 0,05$). Применение МВ МСК способствовало снижению содержания оксида азота в сыворотке крови животных и через 72 часа от начала эксперимента оно было меньшим по сравнению с таковой у интактных животных: 13,90 (11,8;15,65) и 16,04 (14,31;23,54) мкмоль/мл соответственно; $p > 0,05$, в дальнейшем роста этого показателя не отмечалось.

Обсуждение

По современным представлениям, ключевым патогенетическим звеном ОП является синдром цитокинового шторма (ЦШ) с развитием синдрома системного воспалительного ответа [22]. Изучение действия медиаторов воспаления и способов их ингибирования – основное направление совершенствования комплексного лечения острого панкреатита. Синдром системного воспалительного ответа представляет собой сложный каскад активации провоспалительных медиаторов (простагландины, лейкотриены, цитокины (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, фактор активации тромбоцитов)), фосфолипазы A2, нейтрофилов, тромбоцитов, моноцитов и молекул адгезии [23].

Считается, что миграция лейкоцитов в интерстиций является одним из ключевых моментов в развитии ССВО. Содержание лейкоцитов увеличивается уже через час в ПЖ, а через 3 часа – в легких [24]. По данным некоторых авторов, ФНО- α является одним из основных факторов в запуске каскадных реакций, способствующих повреждению паренхимы ПЖ и развитию полиорганной недостаточности [25]. Существует также мнение о том, что первичным источником провоспалительных медиаторов являются сами клетки ацинусов. В ответ на гиперстимуляцию или прямое повреждение ацинарной клетки происходит синтез ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, а также активация важного провоспалительного медиатора – фактора активации тромбоцитов [26]. Последний притягивает нейтрофилы, которые мигрируют в очаг поражения через стенку сосуда, а также вызывает адгезию и агрегацию тромбоцитов. После того как активированный нейтрофил проникает в ткань, происходит «респираторный взрыв» с выбросом большого количества протеолитических ферментов, свободных радикалов кислорода и цитокинов, способных разрушать клетки и привлекать новые лейкоциты, в том числе моноциты. Моноциты превращаются в активные макрофаги, которые также вырабатывают большое количество провоспалительных

медиаторов и растворимых рецепторных белков [27]. Выброс значительного количества цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α) может активировать лейкоциты в системной циркуляции и микроциркуляторном русле печени, почек, легких, других органов, что снова индуцирует синтез медиаторов воспаления (ЦШ) [28]. Это приводит к сепсисоподобному состоянию, характеризующемуся лихорадкой, лейкоцитозом и высвобождением белков острой фазы, таких как С-реактивный белок, компонентов комплемента и ферритина.

Цитокин ФНО- α является одним из ведущих медиаторов воспаления при ОП. Его концентрация в сыворотке крови больных коррелирует с тяжестью течения ОП и системными осложнениями [29]. В нашем исследовании установлено, что в III (контрольной) группе животных, где лечение не применялось, отмечался самый значительный рост концентрации ФНО- α , на 3-и сутки этот показатель был в 1,2 раза выше, чем в группе интактных животных, что коррелирует с данными других авторов. У животных, где для лечения применяли МВ МСК, на 3-и сутки эксперимента концентрация ФНО- α не отличалась от интактных значений. В дальнейшем отмечалось снижение этого показателя, и на 7-е сутки концентрация ФНО- α у этих животных была на 43% ниже значений контрольной группы.

Уровень ИЛ-6 отражает активность всех провоспалительных цитокинов, поэтому для исследования системных изменений под воздействием цитокинов пользуются показателем уровня ИЛ-6. Продолжительное сохранение повышенной концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови у больных деструктивным панкреатитом коррелирует с высокой частотой осложнений и летальностью [30]. В исследовании Z. Dambraskas et al. (2010) было установлено, что тяжелый ОП был связан с гиперэкспрессией провоспалительных цитокинов, а ИЛ-6 является одним из маркеров дифференциальной диагностики между легким и тяжелым ОП [31]. Использование МВ МСК у экспериментальных животных уменьшало системный воспалительный ответ, что прослеживалось в динамике значений ИЛ-6. В этой группе животных на 3-и сутки концентрация ИЛ-6 была статистически значимо ниже по сравнению с данным показателем у животных контрольной группы и в 2,6 раза ниже значений интактных животных.

Период полувыведения цитокинов из кровотока составляет 3,2–7,5 минуты, и при ЦШ требуется их постоянное поступление в периферическое кровяное русло из очага воспаления и

из клеток воспаленного эндотелия кровеносных сосудов, которые становятся основными продуцентами цитокинов [23, 32]. Активация и гибель клеток эндотелия ведет к клиническим проявлениям эндоваскулита, увеличению проницаемости стенок сосудов, продукции активных форм кислорода (АФК) и оксида азота, гепараназы, эндотелина, выбросу связанных с повреждением молекулярных паттернов (damage-associated molecular patterns, DAMPs), отеку и нарушению функции тканей и органов [23, 33]. В результате взаимодействия оксида азота с АФК происходит образование пероксинитрита, который является крайне цитотоксичным продуктом, способным повреждать эндотелий [34]. Он вызывает вазодилатацию, нарушает транспорт кислорода и приводит к ухудшению кислородного статуса организма. Оксид азота также стимулирует секвестрацию тромбоцитов, увеличивает проницаемость клеточных мембран, вызывает метаболические и структурные повреждения клеток эндотелия, обладает цитотоксическим эффектом [35]. Как было ранее установлено, взаимодействие между АФК и оксидом азота играет одну из ключевых ролей в развитии тяжелых форм панкреатита [36]. Согласно полученным нами данным, на 3-и сутки после создания тяжелой формы ОП концентрация оксида азота в сыворотке крови животных II группы (без лечения) на 81% превышала значения у интактных животных. Применение МВ МСК способствовало тому, что содержание оксида азота в сыворотке крови животных через 72 часа от начала эксперимента не отличалось от значений интактных животных и было в 2,1 раза меньше, чем в группе контроля (без лечения).

Тесно связаны с ССВО процессы перекисного окисления липидов. Продукты ПОЛ сами по себе обладают выраженной токсичностью и деструктивным действием [36]. Есть мнения, что именно процессы ПОЛ являются одной из основных причин развития деструктивных изменений в органах и тканях, и объем этих изменений прямо пропорционален интенсивности ПОЛ [37]. Однако по нашим данным применение МВ МСК не препятствовало накоплению МДА, так как на 3-и сутки эксперимента его значения были выше, чем у животных II и III групп, и в 2 раза выше значений у интактных животных.

Заключение

Применение в эксперименте внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток на ранней стадии тяжелого острого некротизирующего панкреатита способствует нормализации уровня тромбоцитов крови, снижению ферментемии, уровня элементов системного воспалительного ответа и эндогенной интоксикации (ФНО- α , ИЛ-6 и уровня оксида азота), которые составляют основу патогенеза тяжелого острого панкреатита, что свидетельствует о положительном влиянии внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток на вышеуказанные показатели патологического процесса при данном заболевании.

Выводы

1. В группе животных, где для лечения применялись внеклеточные микровезикулы мезенхимальных стромальных клеток, уровень тромбоцитов на 3-и сутки был в 2 раза выше, чем в контрольной группе (376,0 (301,5;784,0) $\times 10^9$ /л) и не отличался от данного показателя у интактных животных (734,5 (574,50;843,75) и 553,0 (428,25;751,0) $\times 10^9$ /л соответственно; $p > 0,05$, Mann–Whitney U Test).

2. Сочетание стандартной терапии с введением внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток препятствовало росту уровня аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови животных, что может свидетельствовать о цитопротекторном действии мезенхимальных стромальных клеток в отношении клеточных структур печени. На 3-и сутки у животных этой группы значения аспаратаминотрансферазы были ниже нормы: (99,15 (84,55;125,53) и 124,50 (96,25;156,0) ед./л соответственно; $p > 0,05$, Mann–Whitney U Test) и в дальнейшем роста уровня этого фермента не наблюдалось.

3. Использование внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток уменьшало выраженность системного воспалительного ответа, что продемонстрировала динамика зна-

чений интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа. В этой группе животных на 3-и сутки концентрация интерлейкина-6 была статистически значимо ниже по сравнению с данным показателем у животных контрольной группы и в 2,6 раза статистически значимо ниже его значений у интактных животных: 98,2 (71,30;102,75) и 258,30 (209,30;333,25) пг/мл соответственно ($p < 0,05$, Mann–Whitney U Test). Через 72 часа от начала эксперимента у этих животных концентрация фактора некроза опухоли альфа не отличалась от интактных значений: 1,53 (1,08;1,95) и 1,45 (1,32;1,77) пг/мл соответственно; $p > 0,05$, Mann–Whitney U Test. В дальнейшем отмечалось снижение значений данного показателя и на 7-е сутки концентрация фактора некроза опухоли альфа была на 43% ниже значений контрольной группы: 1,50 (1,16;1,76) и 1,05 (0,81;2,94) пг/мл соответственно; $p > 0,05$, Mann–Whitney U Test).

4. Регионарное применение внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток препятствовало росту концентрации оксида азота в сыворотке крови у экспериментальных животных. Через 72 часа от начала эксперимента значение этого показателя не отличалось от такового у интактных животных: 13,90 (11,8;15,65) и 16,04 (14,31;23,54) мкмоль/мл соответственно; $p > 0,05$, Mann–Whitney U Test) и было в 2,1 раза статистически значимо меньше, чем в группе контроля: 29,22 (19,42;35,48) мкмоль/мл; $p < 0,05$, Mann–Whitney U Test).

5. Лечение острого некротизирующего панкреатита с использованием внеклеточных микровезикул мезенхимальных стромальных клеток не препятствовало накоплению малонового диальдегида, так как на 3-и сутки эксперимента его значения были статистически значимо выше, чем у животных II и III групп и в 2 раза выше его значений у интактных животных: 36,2 (34,98;39,0) и 18,65 (16,50;19,53) мкмоль/мл соответственно; $p < 0,05$, Mann–Whitney U Test. В дальнейшем отмечался рост уровня этого показателя до 45,64 (36,03;56,36) мкмоль/мл, и на 7-е сутки он был статистически значимо выше, чем в других группах животных ($p < 0,05$, Mann–Whitney U Test).

Список литературы/References

1. Petrov MS, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(3):175–184. PMID: 30482911 <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0087-5>
2. Kiss S, Pintér J, Molontay R, Nagy M, Farkas N, Sipos Z, et al. Early prediction of acute necrotizing pancreatitis by artificial intelligence: a prospective cohort-analysis of 2387 cases. *Sci Rep*. 2022;12(1):7827. PMID: 35552440 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11517-w>
3. Zhuang WZ, Lin YH, Su LJ, Wu MS, Jeng HY, Jeng HC, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications. *J Biomed Sci*. 2021;28(1):28. PMID: 33849537 <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7>
4. Jung KH, Song SU, Yi T, Jeon M, Hong S, Zheng H, et al. Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 2011;140(3):998–1008.e4. PMID: 21130088 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.047>
5. Куделич О.А., Кондратенко Г.Г., Потапнев М.П. Клеточные технологии в лечении острого экспериментального панкреатита. *Военная медицина*. 2022;3(64):90–99. Kudelich OA, Kondratenko GG, Potapnev MP. Stem cell technologies in the treatment of acute experimental pancreatitis. *Voen'naya medicina*. 2022;3(64):90–99. (In Russ.). <https://doi.org/10.51922/2074-5044.2022.3.90>
6. Rezvanfar MA, Hodjat M, Abdollahi M. Growing knowledge of using embryonic stem cells as a novel tool in developmental risk assessment of environmental toxicants. *Life Sci*. 2016;158:137–60. PMID: 27208651 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.027>
7. Cheng J, Sun Y, Ma Y, Ao Y, Hu X, Meng Q. Engineering of MSC-derived exosomes: a promising cell-free therapy for osteoarthritis. *Membranes (Basel)*. 2022;12(8):739. PMID: 36005656 <https://doi.org/10.3390/membranes12080739>
8. Mohammadi MR, Riazifar M, Pone EJ, Yeri A, Van Keuren-Jensen K, Lässer C, et al. Isolation and characterization of microvesicles from mesenchymal stem cells. *Methods*. 2020;177:50–57. PMID: 31669353 <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.10.010>
9. Cha H, Hong S, Park JH, Park HH. Stem cell-derived exosomes and nanovesicles: promotion of cell proliferation, migration, and anti-senescence for treatment of wound damage and skin ageing. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1135. PMID: 33255430 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121135>
10. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*. 2017;7(1):180–195. PMID: 28042326 <https://doi.org/10.7150/thno.17133>
11. Zhang N, He F, Li T, Chen J, Jiang L, Ouyang XP, et al. Role of exosomes in brain diseases. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:743353. PMID: 34588957 <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.743353>
12. Xiao M, Zeng W, Wang J, Yao F, Peng Z, Liu G, et al. Exosomes protect against acute myocardial infarction in rats by regulating the renin-angiotensin system. *Stem Cells Dev*. 2021;30(12):622–631. PMID: 33765842 <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0132>
13. De Castro LL, Xisto DG, Kitoko JZ, Cruz FF, Olsen PC, Redondo PAG, et al. Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):151. PMID: 28646903 <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0600-8>
14. Chen JY, An R, Liu ZJ, Wang JJ, Chen SZ, Hong MM, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived microvesicles on pulmonary arterial hypertension in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35(9):1121–8. PMID: 25088001 <https://doi.org/10.1038/aps.2014.61>
15. Sabry D, Mohamed A, Monir M, Ibrahim HA. The effect of mesenchymal stem cells derived microvesicles on the treatment of experimental CCL4 induced liver fibrosis in rats. *Int J Stem Cells*. 2019;12(3):400–409. PMID: 31474025 <https://doi.org/10.15283/ijsc18143>
16. Zhang R, Zhu Y, Li Y, Liu W, Yin L, Yin S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes alleviate sepsis-associated acute kidney injury via regulating microRNA-146b expression. *Biotechnol Lett*. 2020;42(4):669–679. PMID: 32048128 <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02831-2>
17. Yan Y, Wu R, Bo Y, Zhang M, Chen Y, Wang X, et al. Induced pluripotent stem cells-derived microvesicles accelerate deep second-degree burn wound healing in mice through miR-16-5p-mediated promotion of keratinocytes migration. *Theranostics*. 2020;10(22):9970–9983. PMID: 32929328 <https://doi.org/10.7150/thno.46639>
18. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andrian-tsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750. PMID: 30637094 <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
19. Asakawa T, Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980;15(3):137–140. <https://doi.org/10.1007/BF02540959>
20. Куделич О.А., Кондратенко Г.Г., Летковская Т.А., Потапнев М.П., Неровня А.М., Степура О.А. Патоморфологическое обоснование модели тяжелого острого панкреатита. *Хирургия. Восточная Европа*. 2022;11(4):490–502. Kudelich OA, Kondratenko GG, Letkovskaya TA, Potapnev MP, Nerovnya AM, Stepuro OA. Morphological substantiation of severe acute pancreatitis model. *Surgery. Eastern Europe*. 2022;11(4):490–502. (In Russ.). <https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.4.014>
21. Куделич О.А., Кондратенко Г.Г., Метелица Т.Г., Колесникова Т.С., Ходосовская Е.В. Обоснование выбора модели тяжелого острого панкреатита, пригодной для изучения новых подходов к его лечению. *Хирургия. Восточная Европа*. 2023;12(1):66–79. Kudelich OA, Kondratenko GG, Miat-selitsa TG, Kolesnikova TS, Khodosovskaya EV. Justification of the choice of the model of severe acute pancreatitis suitable for studying new approaches to its treatment. *Surgery. Eastern Europe*. 2023;12(1):66–79. (In Russ.). <https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.1.017>
22. Власов А.П., Анашкин С.Г., Власова Т.И., Рубцов О.Ю., Лещанкина Н.Ю., Муратова Т.А. и др. Синдром системного воспалительного ответа при панкрео-

- некрозе: триггерные агенты, органные повреждения. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2021;(4):21–28. Vlasov AP, Anaskin SG, Vlasova TI, Rubtsov OYu, Leshchankina NYu, Muratova TA, et al. Systemic inflammatory response syndrome in pancreatic necrosis: triggers and organ damage. *Khirurgiya. Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2021;(4):21–28. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/hirurgia202104121>
23. Потапнев М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия. *Иммунология*. 2021;42(2):175–188. Potapnev MP. Cytokine storm. Causes and consequences. *Immunologiya*. 2021;42(2):175–188. (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-175-188>
24. Никитина Е.В., Илюкевич Г.В. Клинико-лабораторная оценка синдрома системного воспалительного ответа у пациентов с острым тяжелым панкреатитом. *Вестник ВГМУ*. 2023;22(3):55–62. Nikitsina KV, Ilukevich GV. Clinical and laboratory assessment of systemic inflammatory response syndrome in patients with acute severe pancreatitis. *Vestnik VGMU*. 2023;22(3):55–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.3.55>
25. Bishehsari F, Sharma A, Stello K, Toth C, O'Connell MR, Evans AC, et al. TNF-alpha gene (TNFA) variants increase risk for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2012;12(2):113–118. PMID: 22487520 <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.02.014>
26. Liu LR, Xia SH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(4):539–545. PMID: 16489665 <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i4.539>
27. Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2003;124(3):725–736. PMID: 12612911 <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50099>
28. Singh P, Garg PK. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: current understanding. *Indian J Gastroenterol*. 2016;35(3):153–66. PMID: 27206712 <https://doi.org/10.1007/s12664-016-0647-y>
29. De Beaux AC, Fearon KC. Circulating endotoxin, tumour necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;219:43–6. PMID: 8865471 <https://doi.org/10.3109/00365529609104999>
30. Тарасенко В.С., Кубышкин В.А., Демин Д.Б., Волков Д.В., Смолягин А.И., Чукина О.В. Иммунологические нарушения при панкреонекрозе и их коррекция. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2013;(1):88–95. Tarasenko VS, Kubyshekin VA, Demin DB, Volkov DV, Smoliagin AI, Chukina OV. Immune correction by pancreonecrosis. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2013;(1):88–95. (In Russ.).
31. Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, et al. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(15):1845–53. PMID: 20397261 <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i15.1845>
32. Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, Scott F, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell*. 2011;146(6):980–91. PMID: 21925319 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.015>
33. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Mol Med*. 2014;20(1):466–77. PMID: 25105302 <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00117>
34. Стародубцева М.Н. Двойственная роль пероксинитрита в организме. *Проблемы здоровья и экологии*. 2004;1(1):35–41. Starodubtseva MN. Dual role of peroxynitrite in organism. *Health and Ecology Issues*. 2004;1(1):35–41. (In Russ.). <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2004-1-1-6>
35. Hegyi P, Rakonczay Z Jr. The role of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the exocrine pancreas. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(10):2723–2741. PMID: 21777142 <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4063>
36. Pădureanu V, Florescu DN, Pădureanu R, Gheanea AE, Gheanea DI, Oancea CN. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*. 2022;23(3):197. PMID: 35126700 <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11120>
37. Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasicimenko OV, et al. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2011;140(7):2116–25. PMID: 21354148 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.054>

Информация об авторах

**Олег Аркадьевич
Куделич**

канд. мед. наук, доцент кафедры хирургии и трансплантологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
<https://orcid.org/0000-0003-0569-3427>, kudelichsurg@gmail.com
 50% – концепция и дизайн исследования, проведение эксперимента, сбор и обработка данных, оценка результатов, написание статьи, ответственность за целостность всех частей статьи

**Геннадий Георгиевич
Кондратенко**

д-р мед. наук, профессор кафедры хирургии и трансплантологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
<https://orcid.org/0000-0001-5295-1068>
 10% – концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение рукописи для публикации

**Михаил Петрович
Потапнев**

проф., д-р мед. наук, заведующий отделом клеточных биотехнологий и медицинских биотехнологий ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ, <https://orcid.org/0000-0002-6805-1782>
 10% – концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение рукописи для публикации

**Оксана Владимировна
Клименкова**

научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ,
<https://orcid.org/0009-0001-1651-4298>
 20% – выделение и культивирование стволовых клеток, микровезикул, анализ и интерпретация данных

**Наталья Васильевна
Гончарова**

старший научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ,
<https://orcid.org/0000-0002-8143-4518>
 10% – выделение и культивирование стволовых клеток, микровезикул, анализ и интерпретация данных

Information about the authors

Oleg A. Kudelich	Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Surgery and Transplantology, Belarusian State Medical University, https://orcid.org/0000-0003-0569-3427 , kudelichsurg@gmail.com 50%, concept and design of the study, conducting the experiment, data collection and processing, assessment of results, article writing, responsibility for the integrity of all parts of the article
Gennady G. Kondratenko	Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Surgery and Transplantology, Belarusian State Medical University, https://orcid.org/0000-0001-5295-1068 10%, concept and design of the study, editing the manuscript, final approval of the manuscript
Mikhail P. Potapnev	Prof., Dr. Sci. (Med.), Head Department of Cellular Biotechnologies and Medical Biotechnologies, Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, https://orcid.org/0000-0002-6805-1782 10%, concept and design of the study, editing the manuscript, final approval of the manuscript
Oksana V. Klimenkova	Researcher, Laboratory of Biology and Genetics of Stem Cells, Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, https://orcid.org/0009-0001-1651-4298 20%, isolation and cultivation of stem cells, data analysis and interpretation
Natalia V. Goncharova	Senior Researcher, Laboratory of Biology and Genetics of Stem Cells, Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, https://orcid.org/0009-0001-1651-4298 10%, isolation and cultivation of stem cells, data analysis and interpretation

Статья поступила в редакцию 21.02.2024;
одобрена после рецензирования 10.04.2024;
принята к публикации 26.06.2024

The article was received on February 21, 2024;
approved after reviewing on April 10, 2024;
accepted for publication on June 26, 2024