

УДК 616.37-002-022.258-008.852-08-092.4

## ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, НА СИСТЕМНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

*Куделич О. А.<sup>1</sup>, Кондратенко Г. Г.<sup>1</sup>, Потаннев М. П.<sup>2</sup>, Степура О. А.<sup>1</sup>,  
Ходосовская Е. В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Высокая распространенность и неудовлетворительные результаты лечения тяжелых форм острого панкреатита требуют поиска новых и более эффективных методов лечения.

Целью исследования было оценить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, на системные изменения и морфологическую характеристику поджелудочной железы (ПЖ) на ранней стадии тяжелого острого экспериментального панкреатита.

Согласно полученным в эксперименте сведениям, плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), при раннем использовании благоприятно влияет на изменения количества и размеров тромбоцитов, способствует снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления, ферментемии и элементов эндогенной интоксикации, которые являются ключевыми звеньями патогенеза тяжелого острого панкреатита. После применения ПОРФТ гистологически уже на 3-е сутки в поврежденных структурах поджелудочной железы на фоне лимфо-лейкоцитарной инфильтрации отмечались элементы организации в зоне некроза со значительным количеством фибробластов. На 7-е сутки наблюдались процессы репарации, полная резорбция и организация очагов некроза ткани ПЖ с круглоклеточной инфильтрацией стромы. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии на системные изменения, о цитопротекторном и регенераторном действии ПОРФТ, на ранней стадии тяжелого острого экспериментального панкреатита.

**Ключевые слова:** острый панкреатит, эксперимент, плазма, растворимые факторы тромбоцитов, ПОРФТ, поджелудочная железа.

**Введение.** Острый панкреатит (ОП) до настоящего времени остается потенциально смертельным и одним из самых тяжелых заболеваний органов брюшной полости. Высокая распространенность и неудовлетворительные результаты лечения тяжелых форм ОП требуют поиска новых и более эффективных методов лечения [1].

Использование биопродуктов клеточного происхождения в медицине в настоящее время постоянно расширяется. За последние 20 лет одним из перспективных для клинического направления стала плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ, аналог PRP — platelet-rich

plasma). Установлено, что при региональном применении ПОРФТ оказывает антиапоптотическое, иммуномодулирующее и регенеративное действие на поврежденные органы и ткани. В хирургической практике это средство уже используется для лечения поверхностных язв кожи, остеоартрита и другой патологии костно-мышечной системы [2]. При локальной обработке ран пациентов, оперированных по поводу рака поджелудочной железы, ПОРФТ ускоряет заживление с 32 (31–35) дней до 26,5 дней (24,8–28) дней [3]. Подкожное введение ПОРФТ по 0,5 мл дважды в неделю в течение 3 недель вызывает значительное большее сохранение коли-

чества  $\beta$ -клеток в поджелудочной железе крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом [4].

С учетом изложенного представляют научный и практический интерес исследование влияния ПОРФТ на системные показатели и морфологические изменения в поджелудочной железе на ранних стадиях тяжелого острого экспериментального панкреатита.

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской, опытно-конструкторской и опытно-технологической работы (НИОК(Т)Р) «Разработать метод терапии острого тяжелого экспериментального панкреатита с применением биопродуктов клеточного происхождения» в рамках подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной научно-технической программы «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг. (№ гос. регистрации 0220363 от 28.03.2022 в Государственном реестре НИОК(Т) Республики Беларусь).

**Цель работы** — оценить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, на системные изменения и морфологическую характеристику поджелудочной железы на ранней стадии тяжелого острого экспериментального панкреатита.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводился в лаборатории экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии Научно-исследовательской части при Белорусском государственном медицинском университете. Протокол исследований был утвержден на заседании этической комиссии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (№ 8 от 01.02.2022 г.).

**Характеристика лабораторных животных.** Исследование выполнено на 42 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275–380 г. Животные случайным образом были разделены на четыре группы: I группа ( $n = 6$ ) — интактные животные; II группа (контрольная) ( $n = 12$ ) — тяжелый острый экспериментальный панкреатит (ОЭП) без лечения; III группа ( $n = 12$ ) — тяжелый ОЭП, лечение: обезболивание+инфузии физиологического раствора; IV группа ( $n = 12$ ) — тяжелый ОЭП, лечение: обезболивание+инфузии физиологического раствора+регионарно ПОРФТ. До начала основного эксперимента случайным образом было изъято 6 крыс (группа I, интактные животные)

для предварительной оценки лабораторных показателей. Поскольку полученные данные не отличались от нормальных физиологических показателей у представителей используемых лабораторных животных, эти данные были приняты за норму.

**Моделирование тяжелого острого панкреатита у крыс.** Для воспроизведения острого панкреатита выполняли лапаротомию, в лапаротомную рану выводили желудочно-селезеночную часть поджелудочной железы (ПЖ). Инсулиновым шприцем в ткань ПЖ вводили 0,3 мл 5%-го раствора неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира стандартно всем опытным животным.

Из эксперимента животных выводили путем эвтаназии (нарколизация животного с использованием тиопентала натрия в дозе 45 мг/кг веса) на 3 и 7-е сутки от начала моделирования ОП. У всех животных в контрольные сроки производили забор крови и органов для патоморфологических исследований.

**Гематологические исследования** выполнены на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе 5-дифф. IVet-5, Norma Instruments Zrt. (Венгрия). Определялись следующие гематологические показатели: количество эритроцитов, гемоглобин (Hb), гематокрит (HCT), количество тромбоцитов, количество лейкоцитов.

**Биохимические исследования** выполнялись с использованием биохимического анализатора А-25, BioSystems (Испания) и наборов реактивов для него (Fenix Medical Solutions, Республика Беларусь). Исследуемые биохимические показатели сыворотки крови у крыс: креатинин, мочевины, глюкоза, С-реактивный белок (СРБ), аспаратамино-трансфераза (АсАТ), аланинаминотрансфераза (АлАТ), альфа-амилаза.

**Методом иммуноферментного анализа (ИФА)** в сыворотке крови крыс определяли концентрацию интерлейкина-6 (Ил-6) с использованием набора реагентов Fine Test RAT IL-6 Elisa Kit (КНР). Содержание фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) определяли с использованием набора реагентов Fine Test RAT TNF- $\alpha$  Elisa Kit (КНР). Содержание оксида азота (NO) определяли с использованием набора реагентов RAT Nitric Oxide BT-LAB Kit (КНР).

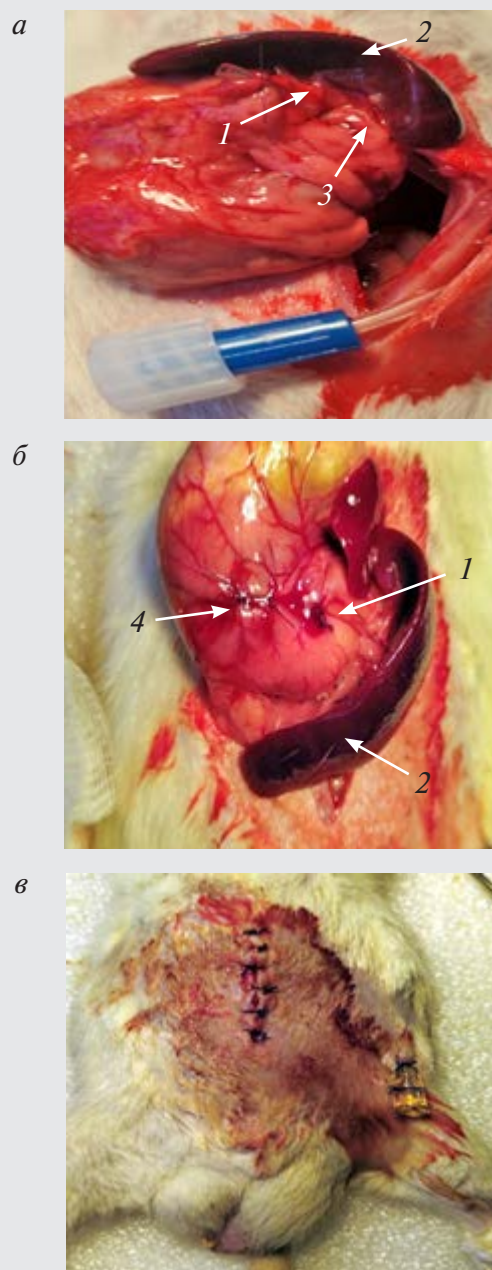
*Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню накопления вторичных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА в гемолизатах крови проводили по методу T. Asakava и S. Matsshita (1980).*

*Получение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов. Для получения ПОРФТ использовали здоровых животных — крыс-самок весом 250–300 г, содержащихся в виварии УО «БГМУ». ПОРФТ получали модифицированным методом R. Yamaguchi с соавт. (2012).*

*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, 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 (рисунок 1). 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 г.).*

*Лечение ОЭП. Для оценки влияния ПОРФТ на системные изменения при тяжелом остром панкреатите лечение начинали через 24 ч после начала моделирования ОП. Животным III группы кроме обезболивания, лечение ОЭП проводилось внутривенным введением (в хвостовую вену) 0,9%-го раствором NaCl в объеме 2 мл 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 ч через ранее установленный дренаж (заявка на изобретение а20230042 от 09.02.2023 г.).*

*Макроскопическая и гистологическая оценка органов и тканей крыс. На 3 и 7-е сутки после создания модели острого панкреатита у животных визуально изучались изменения в поджелудочной железе и брюшной полости, которые фиксировались с помощью*



**Рисунок 1 — Способ установки катетера для регионарного введения лекарственных средств при лечении острого экспериментального панкреатита у крысы:**

**а** — проксимальная часть катетера уложена между желудочно-селезеночной частью ПЖ и селезенкой; **б** — проксимальный конец катетера фиксирован к желудку погружным П-образным швом; **в** — вид послеоперационной раны и катетера, выведенного через контрапертуру на коже (**1** — проксимальная часть катетера, **2** — селезенка, **3** — поджелудочная железа, **4** — П-образный шов на желудке)



динамической фотосъемки. Затем производился забор ткани поджелудочной железы, печени, почек, сердца, легких животных для патоморфологического исследования. Фиксация материала проводилась в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина ( $pH = 7,2$ ) в течение двадцати четырех часов. Полученные образцы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70–96 %). Затем образцы помещали в жидкий парафин. Проводка осуществлялась с помощью тканевого процессора Leica TP 1020, с последующим изготовлением парафиновых блоков на станции заливки Leica EG 1160. Из всех парафиновых блоков были сделаны срезы толщиной 3 мкм и окрашены гематоксилином и эозином. С использованием гистологического сканера Motic EASYSCAN PRO (Motic) были выполнены полнослайдовые цифровые сканы гистологических препаратов, анализ которых и видеозахват полей зрения для иллюстративного материала осуществлялся в программе Aperio ImageScope (Leica).

*Статистическая обработка результатов исследования* производилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых переменных 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 распределения 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 статистиче-

ски значимыми при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** У животных II, III и IV групп за весь период наблюдения не отмечалось достоверных изменений в сыворотке крови уровня эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и лейкоцитов по сравнению с контрольными значениями (Mann – Whitney  $U$ -test,  $p > 0,5$ ). При анализе числа тромбоцитов имелись различия в их содержании в сыворотке крови животных различных групп. На 3-и сутки течение ОЭП во всех группах сопровождалось тромбоцитопенией, однако у животных IV группы, где для лечения применялась ПОРФТ, уровень содержания тромбоцитов был наиболее высокий, хотя и был ниже значений 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 всего эксперимента в опытных группах животных отмечалось нарастание уровня тромбоцитов, и на 7-е сутки этот показатель достоверно не отличался от нормальных значений (Mann – Whitney  $U$ -test,  $p > 0,05$ ). На третьи сутки после моделирования ОП отмечалось увеличение объема тромбоцитов (MPV) без достоверных различий между группами ( $p > 0,05$ ). Установлено, что 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.), в IV группе животных увеличение объема тромбоцитов составило 0,9 % (5,70 [5,70; 5,90] фл.) по сравнению со значением у интактных животных (5,65 [5,43; 6,05] фл.). К 7 суткам эксперимента в опытных группах животных MPV снизился по сравнению с 3-ми сутками и не отличался от исходных значений этого показателя до начала моделирования ( $p > 0,05$ ). Однако в IV группе животных наблюдалось более интенсивное уменьшение MPV и на 7-е сутки он был несколько ниже уровня интактных животных (5,55 [5,45; 5,80] и 5,65 [5,43; 6,05] фл. соответственно; Mann – Whitney  $U$ -test,  $p = 0,571$ ). Известно, что чем больше выраженность тромбоцитопении и увеличение среднего объема тромбоцитов, тем тяжелее течение ОП, что объясняется наличием коагулопатии потребления [5]. Количественный анализ тромбоцитов и MPV позволяет

сделать вывод о положительном влиянии ПОРФТ на динамику данных показателей при тяжелом ОЭП.

Активация внутриклеточных ферментов ПЖ является важным ранним этапом патогенеза ОП [1]. У животных опытных групп активность амилазы в сыворотке крови был выше, чем у интактных животных. Как следует из таблицы 1, на 3-и сутки от начала моделирования ОП во II группе отмечалось повышение активности  $\alpha$ -амилазы до 1937,0 [1567,0; 2493,0] ед./мл (Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,037$ ), в III – до 1703,0 [1507,0; 2333,25] ед./мл (Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,150$ ), в IV группе животных активность амилазы была наименьшей и составила 1633,50 [1393,75; 1750,0] ед./мл (Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,748$ ) по сравнению с нормальными значениями (1422,0 [1373,0; 1764,50] ед./мл). В дальнейшем на протяжении эксперимента в группе животных с ОЭП без лечения отмечался незначительный рост этого показателя и на 7-е сутки активность  $\alpha$ -амилазы превышала значения интактных животных в 1,4 раза (Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,025$ ). В III и IV группах напротив отмечалось снижение этого показателя и к концу эксперимента его значения достоверно не отличались от значений интактных животных (Mann – Whitney *U*-test,  $p < 0,05$ ). Установлен, что у животных IV группы на 7-е сутки активность амилазы сыворотки крови была наиболее низкой (1528,0 [1433,0; 1648,75] ед./мл).

С целью сравнительного изучения влияния примененных средств на цитолиз гепатоцитов при ОЭП, проведено исследование основных внутриклеточных ферментов (АсАТ и АлАТ) (таблица 1). На 3-и сутки у животных II и III групп активность АсАТ в сыворотке крови был выше, чем у интактных животных ( $p > 0,05$ ). У животных IV группы в этот период 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,  $p = 0,522$ ). В дальнейшем на протяжении эксперимента отмечено повышение этого показателя у всех животных опытных групп, однако в III группе животных, где для лечения применялся только физиологический раствор наблюдалось более интенсивное повышение (критерий Wilcoxon,  $p = 0,028$ ) активности АсАТ и на 7-е сутки

она достоверно (в 2,2 раза) превышала уровень 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, напротив, АсАТ оказалась наиболее низкой и достоверно не отличалась от исходных данных (148,50 [127,25; 163,25] ед./л; Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,337$ ). При исследовании АлАТ в сыворотке крови животных II и IV групп активность этого фермента достоверно не отличалась от контрольных показателей (Mann – Whitney *U*-test,  $p > 0,05$ ). Только у животных III группы наблюдалось незначительное повышение активности АлАТ и на 7-е сутки от начала эксперимента уровень этого показателя составил 63,0 [43,25; 81,25] ед./л (см. таблицу). Этот факт в определенной степени свидетельствует о цитопротекторном действии ПОРФТ, применение которой может способствовать предупреждению цитолиза панкреоцитов и печеночных клеток при тяжелом остром панкреатите.

Поврежденная ацинарная клетка при тяжелом ОП выделяет свободные радикалы кислорода и продукты ПОЛ, которые способны активировать нейтрофилы с последующим потенцированием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и микроциркуляторных расстройств [6]. Отображают интенсивность ПОЛ концентрации промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных (МДА) продуктов окисления. Из таблицы 1 видно, что уровень содержания МДА во II группе животных на 3-и сутки от создания модели ОЭП был выше, чем в группе интактных животных (21,60 [19,40; 22,45] и 18,65 [16,50; 19,53] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,109$ ). В III группе на протяжении трех суток от начала лечения отмечалось некоторое накопление малонового диальдегида до 19,95 [18,10; 21,80] мкмоль/мл и далее на протяжении всего эксперимента наблюдалось (критерий Wilcoxon,  $p = 0,225$ ) повышение МДА, содержание которого на 7-е сутки достигло максимальных значений (21,25 [19,68; 22,38] мкмоль/мл). В IV группе, где для лечения ОЭП применялась ПОРФТ, на протяжении эксперимента значения МДА достоверно не отличались от значений интактных животных (Mann – Whitney *U*-test,  $p > 0,05$ ).

Таблица — Динамика биохимических показателей, маркеров окислительного стресса и ССВО в сыворотке крови животных

Показатель	Животные																																						
	Интактные животные (n = 6)		Группа II		Группа III		Группа IV																																
	3-и сутки (n = 6)	7-е сутки (n = 6)	3-е сутки (n = 6)	7-е сутки (n = 6)	3-е сутки (n = 6)	7-е сутки (n = 6)	3-е сутки (n = 6)	7-е сутки (n = 6)																															
Альфа-амилаза, ед./мл	1422,0 [1373,0; 1764,50]	1975,5 [1679,75; 3107,50] U = 4,0; P = 0,025 P <sub>1</sub> = 0,60	1703,0 [1507,0; 2333,25] U = 9,0; P = 0,150 U = 12,0; P <sub>2</sub> = 0,337	1695,50 [1617,75; 1785,25] U = 9,0; P = 0,150 P <sub>1</sub> = 0,917 U = 7,5; P <sub>5</sub> = 0,092	1633,50 [1393,75; 1750,0] U = 16,0; P = 0,748 U = 7,0; P <sub>3</sub> = 0,078 U = 13,0; P <sub>4</sub> = 0,423	1528,0 [1433,0; 1648,75] U = 15,0; P = 0,522 P <sub>1</sub> = 0,463 U = 2,0; P <sub>6</sub> = 0,010 U = 10,0; P <sub>7</sub> = 0,20	АсАТ, ед./л	124,50 [96,25; 156,0]	169,0 [136,50; 177,50] U = 7,0; P = 0,078 P <sub>1</sub> = 0,917	152,0 [134,50; 217,50] U = 8,5; P = 0,128 U = 15,0; P <sub>2</sub> = 0,631	275,0 [228,25; 311,50] U = 0,0; P = 0,004 P <sub>1</sub> = 0,028 U = 0,0; P <sub>5</sub> = 0,004	128,50 [108,0; 218,50] U = 14,0; P = 0,522 U = 16,0; P <sub>3</sub> = 0,749 U = 11,0; P <sub>4</sub> = 0,262	148,50 [127,25; 163,25] U = 12,0; P = 0,337 P <sub>1</sub> = 0,753 U = 8,0; P <sub>6</sub> = 0,109 U = 0,0; P <sub>7</sub> = 0,004	АлАТ, ед./л	55,0 [44,50; 63,50]	50,0 [44,25; 65,25] U = 16,0; P = 0,747 P <sub>1</sub> = 0,833	57,50 [46,50; 68,25] U = 15,0; P = 0,630 U = 12,5; P <sub>2</sub> = 0,377	63,0 [43,25; 81,25] U = 16,0; P = 0,747 P <sub>1</sub> = 0,893 U = 12,5; P <sub>5</sub> = 0,376	41,0 [33,25; 81,0] U = 12,5; P = 0,376 U = 13,0; P <sub>3</sub> = 0,423 U = 12,0; P <sub>4</sub> = 0,335	51,50 [28,25; 75,75] U = 16,5; P = 0,810 P <sub>1</sub> = 0,917 U = 17,0; P <sub>6</sub> = 0,872 U = 13,0; P <sub>7</sub> = 0,423	СРБ, мг/л	0,20 [4,0; 6,25]	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 P <sub>1</sub> = 0,4917	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 U = 6,0; P <sub>2</sub> = 0,022	0,35 [0,30; 0,40] U = 2,0; P = 0,009 P <sub>1</sub> = 0,317 U = 12,0; P <sub>5</sub> = 0,273	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 P <sub>1</sub> = 0,083 U = 18,0; P <sub>6</sub> = 1,0 U = 12,0; P <sub>7</sub> = 0,273	МДА, мкмоль/мл	18,65 [16,50; 19,53]	16,65 [12,60; 19,45] U = 13,0; P = 0,423 P <sub>1</sub> = 0,028	19,95 [18,10; 21,80] U = 10,5; P = 0,228 U = 15,5; P <sub>2</sub> = 0,686	21,25 [19,68; 22,38] U = 3,5; P = 0,020 P <sub>1</sub> = 0,225 U = 3,0; P <sub>5</sub> = 0,016	17,05 [13,65; 19,90] U = 13,5; P = 0,470 U = 6,0; P <sub>3</sub> = 0,054 U = 8,5; P <sub>4</sub> = 0,127	16,0 [15,13; 22,88] U = 13,5; P = 0,470 P <sub>1</sub> = 0,345 U = 15,5; P <sub>6</sub> = 0,688 U = 11,0; P <sub>7</sub> = 0,262	NO, мкмоль/л	28,71 [21,70; 30,98]	22,84 [20,22; 27,95] U = 10,0; P = 0,20 P <sub>1</sub> = 0,028	32,53 [25,59; 41,05] U = 11,0; P = 0,262 U = 6,0; P <sub>2</sub> = 0,055	45,24 [40,76; 46,64] U = 2,0; P = 0,010 P <sub>1</sub> = 0,116 U = 1,0; P <sub>5</sub> = 0,006	34,95 [21,47; 50,21] U = 12,0; P = 0,337 P <sub>1</sub> = 0,249 U = 11,0; P <sub>6</sub> = 0,262 U = 13,0; P <sub>7</sub> = 0,423
АлАТ, ед./л	55,0 [44,50; 63,50]	50,0 [44,25; 65,25] U = 16,0; P = 0,747 P <sub>1</sub> = 0,833	57,50 [46,50; 68,25] U = 15,0; P = 0,630 U = 12,5; P <sub>2</sub> = 0,377	63,0 [43,25; 81,25] U = 16,0; P = 0,747 P <sub>1</sub> = 0,893 U = 12,5; P <sub>5</sub> = 0,376	41,0 [33,25; 81,0] U = 12,5; P = 0,376 U = 13,0; P <sub>3</sub> = 0,423 U = 12,0; P <sub>4</sub> = 0,335	51,50 [28,25; 75,75] U = 16,5; P = 0,810 P <sub>1</sub> = 0,917 U = 17,0; P <sub>6</sub> = 0,872 U = 13,0; P <sub>7</sub> = 0,423	СРБ, мг/л	0,20 [4,0; 6,25]	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 P <sub>1</sub> = 0,4917	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 U = 6,0; P <sub>2</sub> = 0,022	0,35 [0,30; 0,40] U = 2,0; P = 0,009 P <sub>1</sub> = 0,317 U = 12,0; P <sub>5</sub> = 0,273	0,30 [0,0; 0,30] U = 3,0; P = 0,005 P <sub>1</sub> = 0,083 U = 18,0; P <sub>6</sub> = 1,0 U = 12,0; P <sub>7</sub> = 0,273	МДА, мкмоль/мл	18,65 [16,50; 19,53]	16,65 [12,60; 19,45] U = 13,0; P = 0,423 P <sub>1</sub> = 0,028	19,95 [18,10; 21,80] U = 10,5; P = 0,228 U = 15,5; P <sub>2</sub> = 0,686	21,25 [19,68; 22,38] U = 3,5; P = 0,020 P <sub>1</sub> = 0,225 U = 3,0; P <sub>5</sub> = 0,016	17,05 [13,65; 19,90] U = 13,5; P = 0,470 U = 6,0; P <sub>3</sub> = 0,054 U = 8,5; P <sub>4</sub> = 0,127	16,0 [15,13; 22,88] U = 13,5; P = 0,470 P <sub>1</sub> = 0,345 U = 15,5; P <sub>6</sub> = 0,688 U = 11,0; P <sub>7</sub> = 0,262	NO, мкмоль/л	28,71 [21,70; 30,98]	22,84 [20,22; 27,95] U = 10,0; P = 0,20 P <sub>1</sub> = 0,028	32,53 [25,59; 41,05] U = 11,0; P = 0,262 U = 6,0; P <sub>2</sub> = 0,055	45,24 [40,76; 46,64] U = 2,0; P = 0,010 P <sub>1</sub> = 0,116 U = 1,0; P <sub>5</sub> = 0,006	34,95 [21,47; 50,21] U = 12,0; P = 0,337 P <sub>1</sub> = 0,249 U = 11,0; P <sub>6</sub> = 0,262 U = 13,0; P <sub>7</sub> = 0,423														
МДА, мкмоль/мл	18,65 [16,50; 19,53]	16,65 [12,60; 19,45] U = 13,0; P = 0,423 P <sub>1</sub> = 0,028	19,95 [18,10; 21,80] U = 10,5; P = 0,228 U = 15,5; P <sub>2</sub> = 0,686	21,25 [19,68; 22,38] U = 3,5; P = 0,020 P <sub>1</sub> = 0,225 U = 3,0; P <sub>5</sub> = 0,016	17,05 [13,65; 19,90] U = 13,5; P = 0,470 U = 6,0; P <sub>3</sub> = 0,054 U = 8,5; P <sub>4</sub> = 0,127	16,0 [15,13; 22,88] U = 13,5; P = 0,470 P <sub>1</sub> = 0,345 U = 15,5; P <sub>6</sub> = 0,688 U = 11,0; P <sub>7</sub> = 0,262	NO, мкмоль/л	28,71 [21,70; 30,98]	22,84 [20,22; 27,95] U = 10,0; P = 0,20 P <sub>1</sub> = 0,028	32,53 [25,59; 41,05] U = 11,0; P = 0,262 U = 6,0; P <sub>2</sub> = 0,055	45,24 [40,76; 46,64] U = 2,0; P = 0,010 P <sub>1</sub> = 0,116 U = 1,0; P <sub>5</sub> = 0,006	34,95 [21,47; 50,21] U = 12,0; P = 0,337 P <sub>1</sub> = 0,249 U = 11,0; P <sub>6</sub> = 0,262 U = 13,0; P <sub>7</sub> = 0,423																											

Примечание — P — достоверность различий между интактными и животными II, III и IV групп (Mann – Whitney U-test); P<sub>1</sub> — достоверность различий между 3 и 7 сутками в группе (критерий Wilcoxon); P<sub>2</sub> — достоверность различий между 3 сутками у животных II и III групп (Mann – Whitney U-test); P<sub>3</sub> — достоверность различий между 3 сутками у животных III и IV групп (Mann – Whitney U-test); P<sub>4</sub> — достоверность различий между 3 сутками у животных III и IV групп (Mann – Whitney U-test); P<sub>5</sub> — достоверность различий между 7 сутками у животных II и III групп (Mann – Whitney U Test); P<sub>6</sub> — достоверность различий между 7 сутками у животных II и IV групп (Mann – Whitney U-test); P<sub>7</sub> — достоверность различий между 7 сутками у животных III и IV групп (Mann – Whitney U-test).



Как известно, активные формы кислорода, выделяемые нейтрофилами при тяжелом ОП, оказывают прямое цитотоксическое действие, кроме того, стимулируют процессы перекисного окисления липидов, а в результате взаимодействия NO с супероксидными анионами, происходит образование пероксинитрита, который является крайне цитотоксическим продуктом [7]. На третьи сутки после моделирования тяжелого ОП концентрация NO в сыворотке крови животных II группы достоверно превышала исходные значения на 43 % (41,21 [40,30; 41,79] и 28,71 [21,70; 30,98] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,004$ ) и только на 7-е сутки содержание NO не отличалось от нормальных значений (22,84 [20,22; 27,95] мкмоль/мл; Mann – Whitney *U*-test,  $p = 0,2$ ) (см. таблицу). Через 72 ч от начала моделирования ОП применение физиологического раствора не препятствовало росту концентрации NO в сыворотке крови у животных III группы до 32,53 [25,59; 41,05] мкмоль/мл, в дальнейшем наблюдалось значительное 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 препятствовало накоплению оксида азота в сыворотке крови животных и через 72 ч от начала эксперимента концентрация NO у животных IV группы была ниже 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 падение сменялось его незначительным повышением к 7-м суткам до

34,95 [21,47; 50,21] мкмоль/мл (критерий Wilcoxon,  $p = 0,249$ ). Сравнительная динамика изучаемых показателей свидетельствует об уменьшении интенсивности процессов окислительного стресса при тяжелом остром экспериментальном панкреатите под влиянием регионарного применения ПОРФТ.

Для оценки выраженности ССВО в динамике определяли уровень СРБ, содержание которого в сыворотке крови животных опытных групп на 3-е сутки от начала моделирования ОП достоверно превышало исходный уровень (Mann – Whitney *U*-test;  $p < 0,05$ ) и оставалось высоким на протяжении всего эксперимента без значимых различий между группами. Однако к концу эксперимента наиболее низкое значение этого показателя отмечалось во II и IV группах животных (см. таблицу).

В результате наблюдения установлено, что у всех животных опытных групп клинические проявления моделируемого заболевания были однотипны: в течение первых суток у них отмечалась гиподинамия, несколько заторможенное поведение, снижение исследовательской реакции, они переставали употреблять пищу. Летальных исходов в группах не было. У животных II группы на 3-и сутки от начала ОП макроскопически в брюшной полости определялось небольшое количество серозно-геморрагического выпота (рисунок 2, а), поджелудочная железа была пастозная, рыхло спаянная с желудком, селезенкой и петлей тонкой кишки (рисунок 2, б). При разведении инфильтрата на тонкой кишке определялись плотные наложения фибрина (рисунок 2, в).

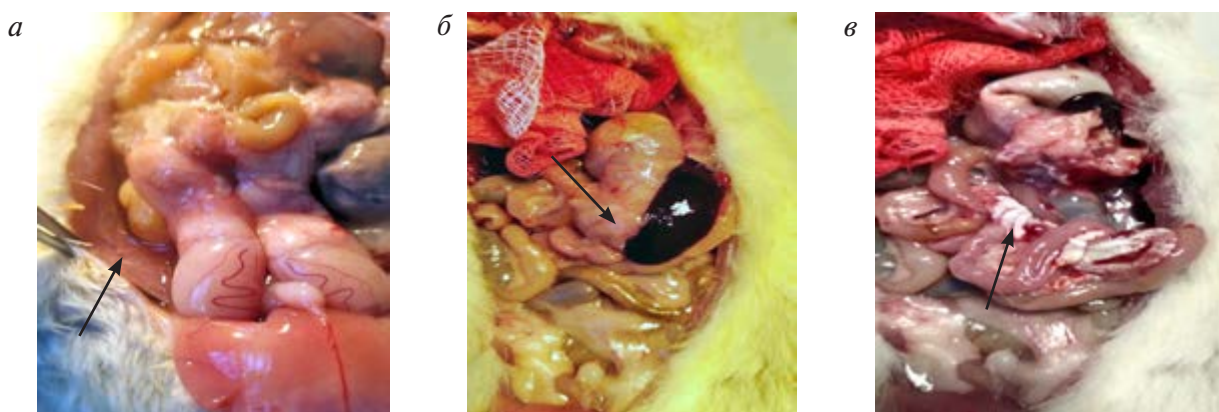


Рисунок 2 — Макрофотография. Патологические изменения в брюшной полости через 72 ч от начала моделирования острого панкреатита у животных II группы

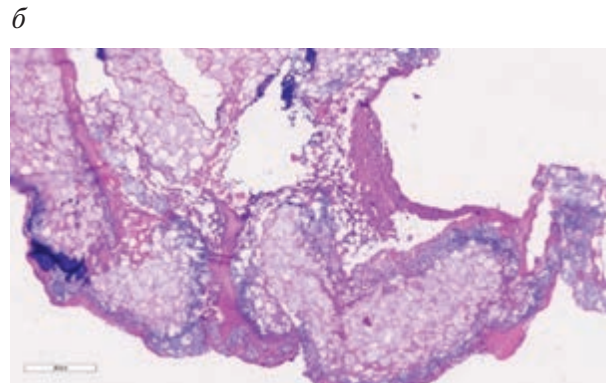
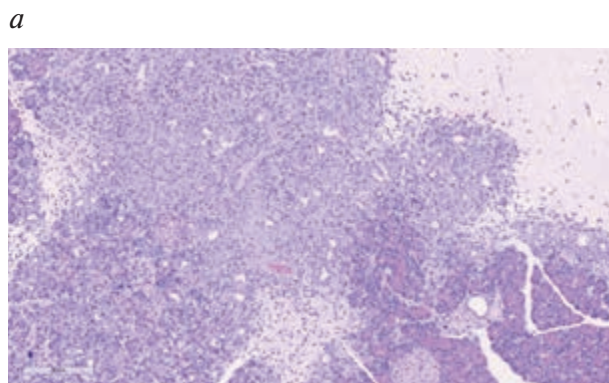


**Рисунок 3 — Макрофотография. Патологические изменения в брюшной полости через 72 ч от начала моделирования острого панкреатита у экспериментальных животных:**  
*а* — III группа; *б* — IV группа

При аутопсии животных III и IV групп на 3-е сутки от начала моделирования ОП визуально поджелудочная железа была в рыхлом инфильтрате, отечная серого цвета, дольчатость ее сглажена, в брюшной полости выпота не было (рисунок 3).

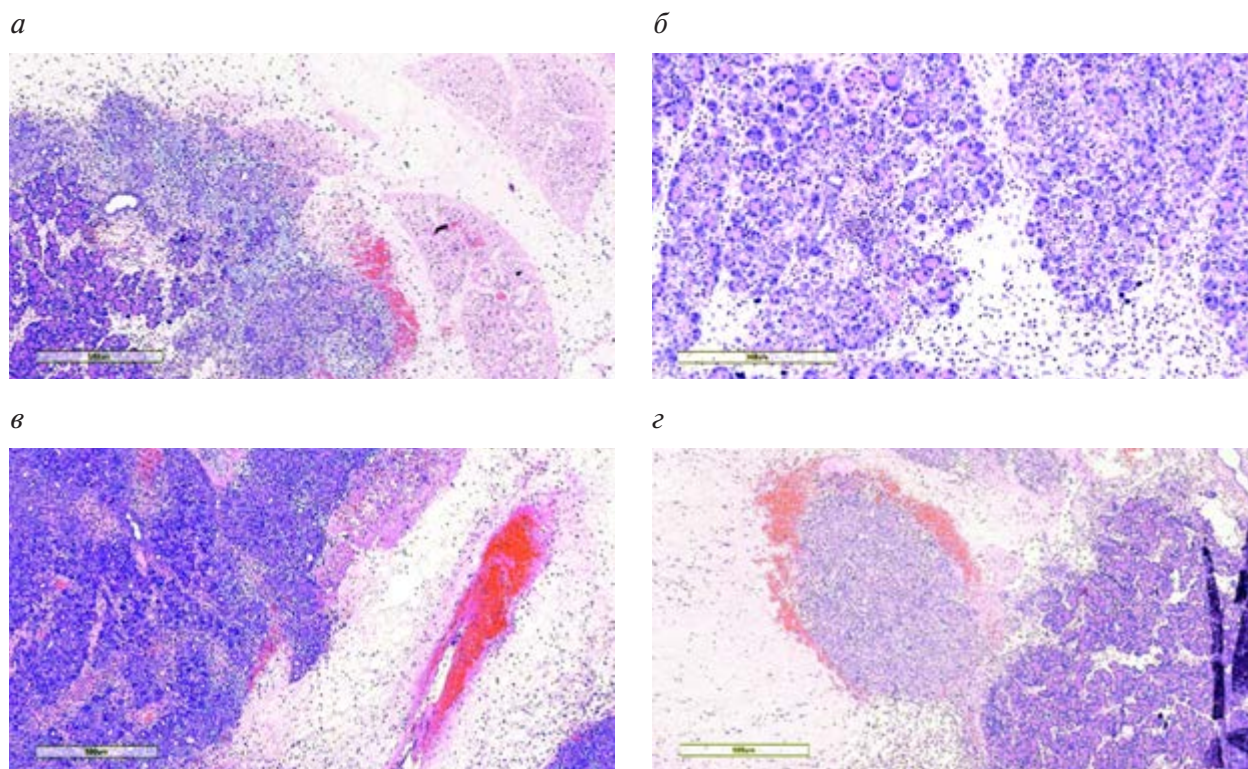
Гистологически на 3-и сутки в ткани поджелудочной железы у животных II группы степень выраженности некротических изменений носила переменный характер — от субтотального некроза до очаговых в краевых отделах долек железы, но уже отмечались начальные процессы резорбции некротического детрита на месте некротизированной ткани. Определялась также пролиферация фибробластов, синтез коллагеновых волокон, пролиферация железистоподобных структур с набухшим эпителием, отёк и воспалительная инфильтрация (рисунок 4, *а*). В прилежащих тканях сальника наблюдались распространенные стеатонекрозы (рисунок 4, *б*).

У животных III группы, которым проводилось базисное лечение физиологическим раствором, в этот же период отмечалось структурное повреждение ткани ПЖ, наблюдались фокусы некроза целых долек, полиморфноклеточная воспалительная инфильтрация, выраженный отек, фиброплазия и потеря зимогена (рисунок 5, *а*). Выявлялась резко выраженная дисконкомплексация и дистрофические изменения ациноцитов поджелудочной железы (рисунок 5, *б*). Структурные повреждения долек ПЖ сопровождалась тромбозом сосудов и множественными микрокровоизлияниями (рисунок 5, *в*, *г*).



**Рисунок 4 — Изменения в поджелудочной железе на 3-и сутки от начала моделирования острого экспериментального панкреатита у животных II группы. Окраска гематоксилином и эозином:**  
*а* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм; *б* — цифровое увеличение  $\times 2$ , G 1 мм

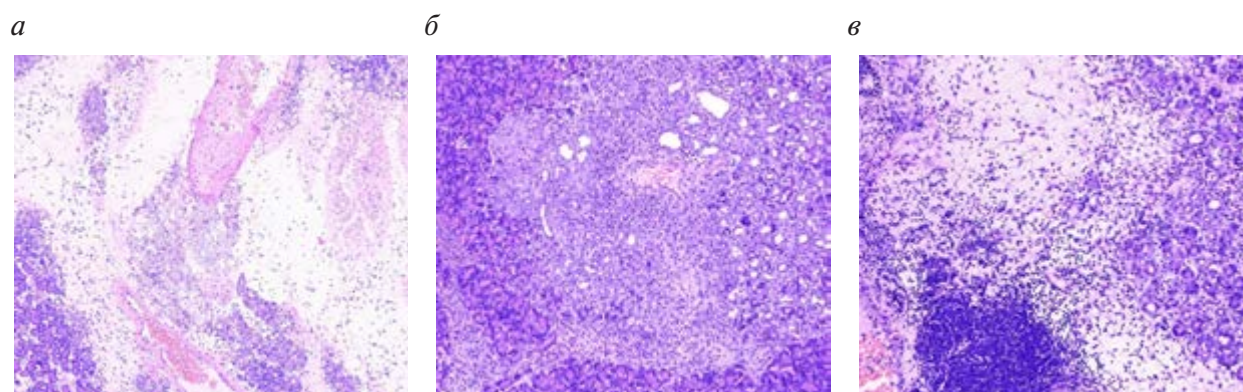




**Рисунок 5 —** Изменения в поджелудочной железе на 3-и сутки от начала моделирования острого экспериментального панкреатита у животных III группы. Окраска гематоксилином и эозином: *а* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм; *б* — цифровое увеличение  $\times 8$ , G 300 нм; *в* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм; *г* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм

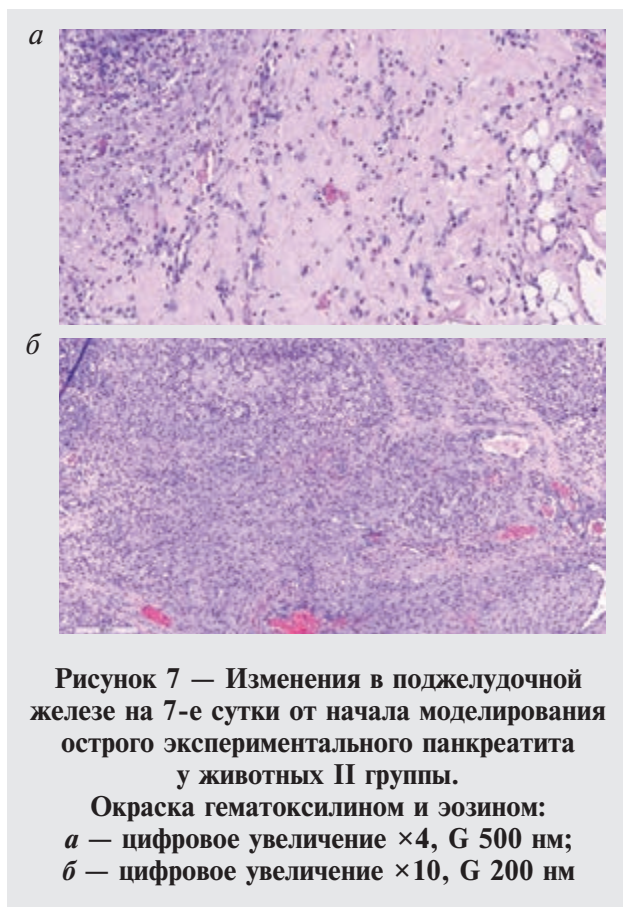
В IV группе, где применялась ПОФРТ, на 3-и сутки наблюдались фокусы стеатонекрозов и мелкие очаги некроза в ткани поджелудочной железы, отек интерстиция с полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрацией, в просвете вен встречались фибриновые тромбы (рисунок 6, *а*). Но уже в этот период отмечалась организация в поврежден-

ных структурах поджелудочной железы, выраженная фиброплазия, лимфо-лейкоцитарная инфильтрация в зоне некроза (рисунок 6, *б*). Наблюдался отек ткани поджелудочной железы, значительное количество фибробластов, строма нежно-волокнистая, лимфоидная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов (рисунок 6, *в*).



**Рисунок 6 —** Изменения в поджелудочной железе на 3-и сутки от начала моделирования острого экспериментального панкреатита у животных IV группы. Окраска гематоксилином и эозином: *а* — цифровое увеличение  $\times 8$ , G 300 нм; *б* — цифровое увеличение  $\times 8$ , G 300 нм; *в* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм

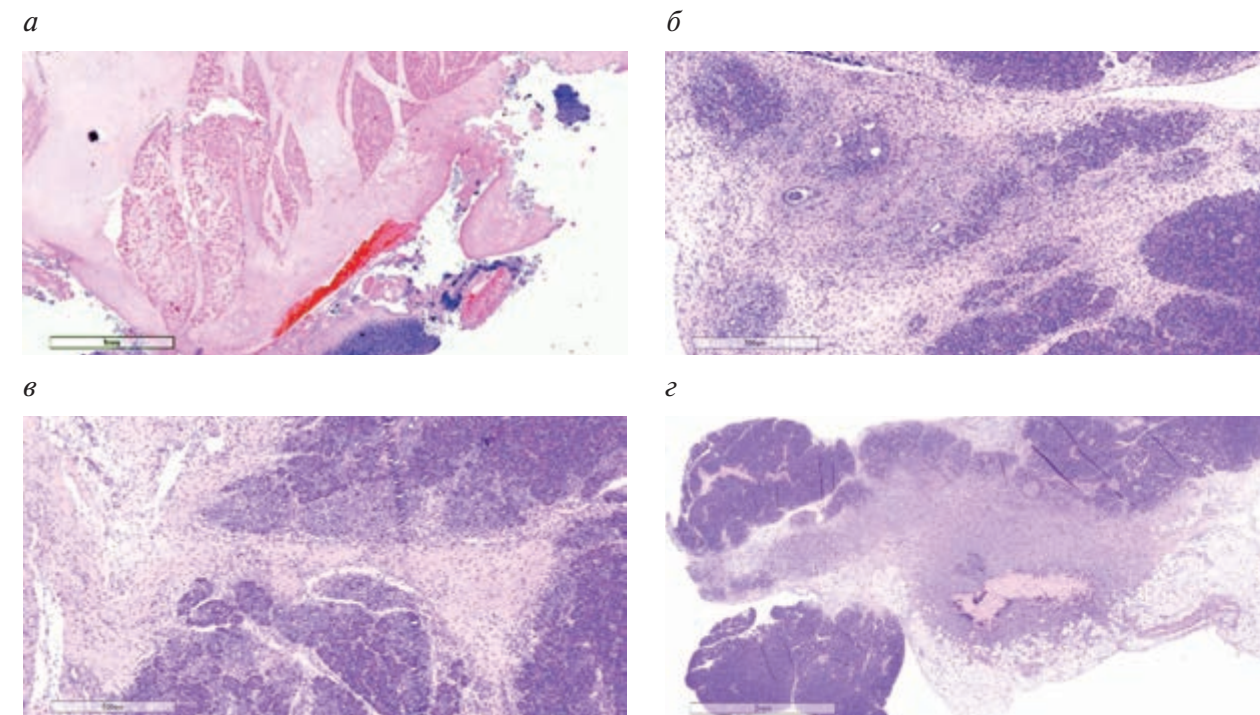




На 7-е сутки эксперимента у всех опытных животных макроскопически желудочно-селезеночная часть поджелудочной железы была пастозная, рыхлая, капсула ПЖ в данном участке рыхло спаяна с селезенкой и желудком.

У животных без лечения (II группа) в эти сроки гистологически в железе отмечались начальные процессы репарации, наблюдалась морфологическая картина фиброплазии (рисунок 7, *a*). Воспалительная инфильтрация носила разноплановый характер, в зависимости от объема повреждения поджелудочной железы в ходе эксперимента. В тканях поджелудочной железы встречались фокусы осумкованных стеатонекрозов с участками склерогелиноза (рисунок 7, *б*).

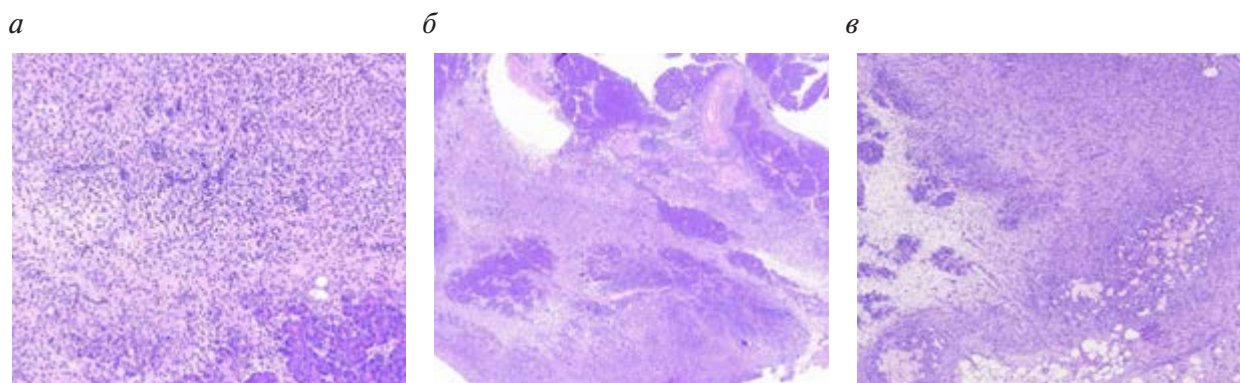
В III группе (лечение физиологическим раствором) на 7-е сутки эксперимента у животных на фоне очагов некроза ткани поджелудочной железы (рисунок 8, *a*) наблюдались очаги организации поврежденных ее участков (рисунок 8, *б*) с морфологической картиной полиморфной фиброплазии (рисунок 8, *в*). В прилежащих тканях сальника наблюдались осумкованные стеатонекрозы (рисунок 8, *г*).



**Рисунок 8 — Изменения в поджелудочной железе на 7-е сутки от начала моделирования острого экспериментального панкреатита у животных III группы. Окраска гематоксилином и эозином:**  
*a* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 1 мм; *б* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм; *в* — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм; *г* — цифровое увеличение  $\times 2$ , G 2 мм

В животных IV группы, где применялась ПОРФТ, на 7-е сутки гистологически в поджелудочной железе отмечались процессы репарации, наблюдалась полная резорбция и организация очагов некроза ткани ПЖ с круглоклеточной инфильтрацией стромы (рисун-

нок 9, а, б). Сохранялись мелкие очаги стеатонекроза в прилежащих отделах поджелудочной железы и жировой клетчатке. Интерстициальный отек сменялся фиброзом с полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрацией (рисунок 9, в).



**Рисунок 9 — Изменения в поджелудочной железе на 7-е сутки от начала моделирования острого экспериментального панкреатита у животных IV группы. Окраска гематоксилином и эозином: а — цифровое увеличение  $\times 10$ , G 300 нм; б — цифровое увеличение  $\times 2$ , G 1 мм; в — цифровое увеличение  $\times 4$ , G 500 нм**

**Заключение.** Согласно полученным в эксперименте данным плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, при раннем использовании благоприятно влияет на изменения количества и размеров тромбоцитов, способствует снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления, ферментемии и элементов эндогенной интоксикации, которые являются ключевыми звеньями патогенеза тяжелого острого панкреатита. После применения ПОРФТ гистологически уже на 3-е сутки в поврежденных структурах поджелудочной

железы на фоне лимфо-лейкоцитарной инфильтрации отмечались элементы организации в зоне некроза со значительным количеством фибробластов. На 7-е сутки наблюдались процессы репарации, полная резорбция и организация очагов некроза ткани ПЖ с круглоклеточной инфильтрацией стромы. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии на системные изменения, о цитопротекторном и регенераторном действии ПОРФТ, на ранней стадии тяжелого острого экспериментального панкреатита.

### Список цитированных источников

1. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis / M. Besselink [et al.] // *Pancreatology*. — 2013. — Vol. 13. — P. 1–15. DOI: 10.1016/j.pan.2013.07.063.
2. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина / М. П. Потапнев [и др.] // *Здравоохранение*. — 2014. — № 9. — С. 32–40.
3. Leukocyte-platelet-rich-plasma (l-PRP) and immunonutrition accelerates wound healing after surgery for pancreatic cancer / C. Wienke [et al.] // *Clinical Nutrition*. — 2018. — Vol. 37 (1). — P. 77. DOI: 10.1016/j.clnu.2018.06.1309
3. El-Haroun, H. Comparative study on the therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells versus platelet rich plasma on the pancreas of adult male albino rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus / H. El-Haroun, R. M. Salama // *Folia Morphol (Warsz)*. — 2022. — Vol. 81 (1). — P. 65–81. DOI: 10.5603/FM.a2021.0008.
5. Mean platelet volume in patients with acute pancreatitis / N. Yilmaz [et al.] // *J. of Clinical and Experimental Investigations*. — 2011. — Vol. 2 (4). — P. 362–365. DOI: 10.5799/ahinjs.01.2011.04.0072.
6. Singh, P. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding / P. Singh, P. K. Garg // *Indian J. Gastroenterol*. — 2016. — Vol. 35 (3). — P. 153–166. DOI: 10.1007/s12664-016-0647-y.





7. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review) / V. P. Dureanu [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. — 2022. — Vol. 23 (3). — P. 197. DOI: 10.3892/etm.2022.11120.

## **Effect of plasma enriched with soluble platelet factors on systemic parameters and morphological characteristics of pancreas in the treatment of acute experimental pancreatitis**

*Kudelich O. A.<sup>1</sup>, Kondratenko G. G.<sup>1</sup>, Potapnev M. P.<sup>2</sup>, Stepuro O. A.<sup>1</sup>, Khadasouskaya A. V.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Republic of Belarus*

The high prevalence and poor outcomes of severe acute pancreatitis (AP) require the search for new and more effective treatments.

The aim of the study was to evaluate the effect of plasma enriched with soluble platelet factors (PRP) on systemic changes and morphological characterization of the pancreas at an early stage of severe acute experimental pancreatitis.

The use of PRP in the early stages of severe AP favorably affects the change in 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. After the use of PRP histologically already on the 3rd day in the damaged structures of the pancreas against the background of lympho-leukocytic infiltration, organization elements were noted in the necrosis zone with a significant number of fibroblasts. On the 7th day, the processes of repair, complete resorption and organization of foci of necrosis of pancreatic tissue with round-cell infiltration of stroma were observed.

The findings suggest a positive effect on systemic changes, on the cytoprotective and regenerative effects of PRP in the early stage of severe acute experimental pancreatitis.

**Keywords:** acute pancreatitis, experiment, plasma, soluble platelet factors, PRP, pancreas.

*Поступила 19.06.2023*