



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.4.024>
УДК 616.37-002.4-036.11-092.4:602.9



Куделич О.А.¹✉, Кондратенко Г.Г.¹, Потапнев М.П.², Колесникова Т.С.¹,
Клименкова О.В.², Гончарова Н.В.²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Сравнительная оценка влияния биопродуктов клеточного происхождения на течение острого некротизирующего панкреатита в эксперименте

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Куделич О.А. – концепция и дизайн исследования, эксперимент, обработка данных, оценка результатов, написание статьи; Кондратенко Г.Г., Потапнев М.П. – концепция и дизайн исследования, утверждение рукописи для публикации; Колесникова Т.С. – выполнение биохимических исследований, иммуноферментный анализ; Клименкова О.В., Гончарова Н.В. – получение ПОРФТ, выделение и культивирование стволовых клеток и их микровезикул.

Финансирование: работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований по заданию «Разработать метод терапии острого тяжелого экспериментального панкреатита с применением биопродуктов клеточного происхождения» подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной научно-технической программы «Биотехнологии-2» на 2021–2025 годы, присвоен № гос. регистрации в Белорусском институте системного анализа 20220363 от 28.03.2022. Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей авторы не получали.

Этическое заявление: протокол исследований утвержден на заседании этической комиссии Белорусского государственного медицинского университета (№ 8 от 01.02.2022). Все работы проводились в соответствии с международными правилами и принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью (Страсбург, 18.03.1986), а также в соответствии с Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете.

Подана: 20.05.2024

Принята: 12.09.2024

Контакты: kudelichsurg@gmail.com

Резюме

Цель. Обосновать возможность коррекции системной патологической реакции при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите с помощью локального применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их микровезикул (МВ) или плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ).

Материалы и методы. Изучено влияние МСК, МВ МСК и ПОРФТ на гематологические и биохимические показатели при остром экспериментальном некротизирующем панкреатите. Исследование проведено на 54 половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Модель острого некротизирующего панкреатита создавали стандартно введением 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в хвостовую часть поджелудочной железы крыс. На 3-и и 7-е сутки от начала моделирования заболевания оценивали гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (альфа-амилаза, глюкоза, аспартат-аминотрансфераза, аланинаминотрансфераза), маркеры эндогенной интоксикации (малоновый диальдегид, уровень оксида азота), маркеры системного воспалительного ответа (фактор некроза опухоли α , интерлейкин-6, СРБ).

Результаты. Применение МСК и их микровезикул на ранней стадии острого некротизирующего панкреатита положительно влияет на количество тромбоцитов

в периферической крови экспериментальных животных. В эти же сроки МСК предотвращали гипергликемию, что может свидетельствовать о цитопротекторном их действии в отношении гормонпродуцирующих клеток поджелудочной железы. Использование МСК и ПОРФТ способствует нормализации активности α -амилазы в сыворотке крови, что также может косвенно свидетельствовать о системном антиферментном, опосредованном через цитопротекторное действие в отношении экзокринных клеточных структур поджелудочной железы. Использование ПОРФТ, МСК и МВ МСК при остром экспериментальном некротизирующем панкреатите уменьшает системный воспалительный ответ, что продемонстрировала динамика значений ФНО- α и ИЛ-6. В сыворотке крови животных, которым проводилось лечение МСК, уровень СРБ на протяжении всего эксперимента не повышался. Регионарное использование МСК препятствует росту уровня оксида азота и малонового диальдегида в сыворотке крови экспериментальных животных.

Заключение. Раннее регионарное применение биопродуктов клеточного происхождения при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите оказывает системный положительный эффект, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для патогенетического лечения данного заболевания.

Ключевые слова: острый панкреатит, мезенхимальные стромальные клетки, микровезикулы, плазма, растворимые факторы тромбоцитов



Kudelich O.¹✉, Kondratenko G.¹, Potapnev M.², Kalesnikava T.¹, Klimenkova O.²,
Goncharova N.²

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical
Biotechnology, Minsk, Belarus

Comparative Evaluation of Cellular Origin Bioproducts Effects on the Course of Acute Necrotizing Pancreatitis in Experiment

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kudelich O. – study concept and design, experiment, data collection and processing, research materials evaluation, text writing; Kondratenko G., Potapnev M. – study concept and design, final approval of the version to be published; Kalesnikava T. – biochemical tests and enzyme immunoassay performing; Klimenkova O., Goncharova N. – PRP obtaining, stem cells and their microvesicles isolation and cultivation.

Funding: the work was carried out in accordance with the plan of scientific research on the assignment "To develop a method for acute severe experimental pancreatitis treatment using bioproducts of cellular origin" of the subprogram "Molecular and cellular biotechnologies-2" within the state scientific and technical program "Biotechnologies-2" for 2021–2025, State Registration No. 20220363 in the State Institution "Bel ISA" dated 03/28/2022. The authors received no financial support from manufacturing companies.

Ethics statement: the research protocol was approved at the ethics committee of the Belarusian State Medical University meeting (No. 8 dated 02/01/2022). All works were carried out in accordance with international rules and the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986), as well as in accordance with the Regulations on the use of experimental animals in research and educational process in the Belarusian State Medical University.

Submitted: 20.05.2024

Accepted: 12.09.2024

Contacts: kudelichsurg@gmail.com

Abstract

Purpose. To substantiate a possibility of correcting a systemic pathological reaction in experimental acute necrotizing pancreatitis by local application of mesenchymal stromal cells (MSCs), their microvesicles (MV MSCs), or plasma enriched with platelet factors (PRP).

Materials and methods. The effect of MSCs, MB MSCs and PORFT on hematological and biochemical parameters in acute experimental necrotizing pancreatitis was studied. The study was carried out on 54 adults Wistar rats. Acute pancreatitis was induced by introducing 0.3 ml of 5% solution of non-ionic polyethylene glycol octylphenol ether detergent into the caudal part of rats' pancreas. Hematological parameters, markers of systemic manifestation of the pathological process (alpha-amylase, glucose, AST, ALT), markers of endogenous intoxication (malondialdehyde, nitric oxide), and markers of systemic inflammatory response (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, CRP) were evaluated on the 3rd and 7th day from the beginning of disease modeling.

Results. MSCs and their microvesicles used at early stages of acute necrotizing positively affect the number of platelets in the peripheral blood of experimental animals. At the same time, MSCs prevented hyperglycemia, indicating their cytoprotective effect on hormone-producing pancreatic cells. The use of MSCs and PRP promotes normalization of α -amylase activity in serum, which may also indirectly indicate systemic anti-enzyme action, mediated through cytoprotective one, against exocrine cellular structures of the pancreas. MSCs, MB MSCs and PRP application in acute experimental necrotizing pancreatitis reduced the systemic inflammatory response, as demonstrated by TNF- α and

IL-6 values changes. CRP blood serum levels in animals treated with MSCs did not increase throughout the experiment. A regional use of MSCs prevents increasing nitric oxide and malondialdehyde levels in blood serum of experimental animals.

Conclusion. A regional use of cell origin bioproducts at early stages of experimental acute necrotizing pancreatitis provides a positive systemic effect, which allows considering them as promising agents for pathogenetic treatment of this disease.

Keywords: acute pancreatitis, mesenchymal stromal cells, microvesicles, plasma, soluble platelet factors

■ ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы острого некротизирующего панкреатита (ОНП) обусловлена увеличением заболеваемости и высокой летальностью, связанной с ростом числа распространенных форм панкреонекроза, сопровождающихся большой частотой развития тяжелых осложнений [1]. За последние годы разработан и внедрен в клиническую практику ряд усовершенствованных методов диагностики и лечения ОНП. Однако, по данным официальной статистики, общая летальность при данном заболевании по-прежнему остается высокой и при его тяжелых формах может достигать 40% [2]. Столь высокая частота неблагоприятных исходов, особенно на ранних стадиях острого некротизирующего панкреатита, во многом обусловлена выраженными патологическими системными изменениями и эндогенной интоксикацией, приводящей к развитию полиорганной недостаточности [1, 2].

В последнее время требования к консервативной терапии острого панкреатита существенно возросли: она должна быть более целенаправленной и патогенетически строго обоснованной, методы инструментальной диагностики и виды хирургических пособий также продолжают совершенствоваться [3, 4]. Таким образом, ОНП до сих пор остается потенциально смертельным и проблемным экстренным хирургическим заболеванием, что вынуждает искать новые, более эффективные лечебные подходы. Одним из таких подходов является применение биопродуктов клеточного происхождения. С учетом вышеизложенного научный и практический интерес представляет проведение экспериментальных исследований для оценки способности мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их дериватов в виде микровезикул (МВ), а также плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), оказывать терапевтический эффект при локальном применении при ОНП.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обосновать возможность коррекции системной патологической реакции при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите с помощью локального применения мезенхимальных стромальных клеток, их микровезикул или плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе вивария учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» 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. Протокол исследований утвержден на заседании этической комиссии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (№ 8 от 01.02.2022).

Дизайн эксперимента

На 54 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275–380 г проведено экспериментальное исследование, во время которого животные случайным образом были разделены на пять групп: I группа (n=6) – интактные, II группа (контрольная) (n=12) – крысы с ОНП без лечения, III группа (n=12) – крысы с ОНП, лечение: обезбоживание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + регионарное введение ПОРФТ; IV группа (n=12) – крысы с ОНП, получавшие лечение: обезбоживание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + регионарное введение МСК; V группа (n=12) – крысы с ОНП, получавшие лечение: обезбоживание + инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + регионарное введение микровезикул МСК. До начала эксперимента было изъято 6 крыс для предварительной оценки лабораторных показателей, полученные данные которых не отличались от нормальных физиологических показателей у представителей используемых лабораторных животных, поэтому они 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 (три-тон X-100, производитель Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия). Предварительными экспериментальными исследованиями было показано, что таким способом воспроизводится модель острого панкреатита с гистоморфологическими признаками некроза поджелудочной железы [5, 6].

Способ регионарного (локального) введения биопродуктов клеточного происхождения при лечении ОНП

Животным III, IV и V групп после завершения этапа моделирования ОП через контрапертуру на передней брюшной стенке в левом нижнем квадранте в брюшную полость к ПЖ подвели катетер из прозрачного термопластичного имплантационно-нетоксичного поливинилхлорида по разработанной нами методике (патент на изобретение ВУ 24210 от 28.12.2023). Хирургические процедуры выполнялись в стерильных условиях, антибиотикопрофилактику не проводили. В послеоперационном периоде всем животным обезбоживание осуществляли внутримышечным введением кеторолака из расчета 4,8 мг/кг/сут массы животного.

Лечение острого некротизирующего панкреатита в эксперименте

Для оценки влияния на системные изменения при ОНП лечение начинали через 24 часа после моделирования. Животным III группы кроме обезболивания, внутривенного введения 0,9% раствора NaCl в объеме 2 мл 1 раз в сутки регионарно вводилась ПОРФТ в объеме 150 мкл двукратно через 6 часов через ранее установленный дренаж (патент на изобретение ВУ 24225 от 07.02.2024). Животным IV группы в этот же период стандартное лечение дополнялось регионарным введением МСК в дозе 1×10^6 клеток в 1,0 мл приготовленного раствора через ранее установленный катетер (приоритетная справка а20230332 от 20.02.2024). В V группе стандартная инфузионная терапия сочеталась с регионарным введением МВ МСК в объеме 1,0 мл приготовленного раствора через ранее установленный катетер (приоритетная справка а20240025 от 12.04.2024). Дозу МВ рассчитывали как эквивалентную (полученную из) 1 млн МСК.

На 3-и и 7-е сутки 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. Определяли гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (альфа-амилаза, глюкоза, аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), маркеры системного воспалительного ответа (ФНО- α , ИЛ-6, СРБ), маркеры эндогенной интоксикации (активность перекисного окисления липидов, уровень оксида азота – NO). После получения крови для эвтаназии животному дополнительно выполняли внутрибрюшинную инъекцию тиопентала натрия в дозе 200 мг/кг.

Методика получения биопродуктов клеточного происхождения и их характеристика

МСК костного мозга получали из бедренной кости крыс породы Wistar обоего пола весом 250–300 г путем перфузии питательной средой DMEM/F12 (Elabscience, Китай) с 5% ЭТС. Выделение МСК проводили путем адгезии клеток к пластику на культуральных флаконах T25 (Sarstedt, Германия). После формирования на дне пластиковых флаконов крупных колоний первичной культуры клетки снимали 0,25% трипсин-ЭДТА (Elabscience, Китай), отмывали центрифугированием и пересеивали в новые культуральные флаконы в концентрации 3000/см². В исследовании использовали МСК 2–3 пассажей. Визуальный контроль клеток осуществляли в инвертированном микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия) при увеличении в 25 раз. Иммунофенотипическую характеристику полученных МСК проводили методом проточной цитометрии. Принадлежность выделенной популяции клеток к МСК определяли по экспрессии поверхностного маркера CD90 (BIO-RAD, США) и отсутствию экспрессии CD45 (BD Biosciences, США). Регистрация и анализ данных производились с использованием проточного цитометра FACSCantoll и программного обеспечения FACSDiva 7.0 (Becton Dickinson, США).

Внеклеточные микровезикулы (МВ) МСК получали методом дифференциального центрифугирования с подбором различных скоростных режимов, времени



и фильтрации раствором [7]. Идентификацию МВ МСК проводили на проточном цитометре FACSCantoll относительно латексных калибровочных частиц Negative Control Compensation Particles Set (BD CompBead, BD Bioscience, США) размером 300–1000 нм. Популяцию МВ оценивали после выделения логического «гейта» калибровочных частиц с использованием Dot/Plot анализа по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию. Количество МВ МСК оценивалось как количество регистрируемых событий («events») в выделенной области, для каждой пробы анализировали от 100 000 до 150 000 частиц. Для иммунофенотипической характеристики МВ МСК крыс использовали антитела против CD90, CD45 и оценивали степень их экспрессии на поверхности мембран.

Получение аллогенной ПОРФТ проводили модифицированным методом Yamaguchi R. с соавторами [8].

Оценка показателей системного проявления патологического процесса, маркеров системного воспалительного ответа и эндогенной интоксикации

В процессе эксперимента исследованы следующие гематологические показатели: количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, количество тромбоцитов, 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, Fenox Medical Solutions, Республика Беларусь) исследованы биохимические показатели сыворотки крови животных: АЛТ, АСТ, альфа-амилаза, глюкоза.

Содержание оксида азота, ИЛ-6 и ФНО- α определяли с использованием набора реагентов Cloud-CloneCorp (КНР) в соответствии с инструкциями производителя.

Оценку интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили по уровню накопления вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). По методу T. Asakava и S. Matsushita (1980) определяли содержание МДА в гемолизатах крови животных [9].

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 И ОБСУЖДЕНИЕ

После моделирования ОНП в течение суток у крыс отмечались гиподинамия, несколько заторможенное поведение, они переставали употреблять пищу. Вне зависимости от группы клинические проявления заболевания у всех животных через 24 часа были однотипны. Летальных исходов в группах не было.

Как следует из полученных данных, у животных всех групп за весь период наблюдения не отмечалось значимых изменений гематологических показателей, за исключением снижения количества тромбоцитов. В экспериментах ранее было показано, что тяжесть проявлений ОП взаимосвязана с нарушением микроциркуляции в ПЖ [10]. Агрессивные вещества, выделяющиеся из погибших секреторных клеток поджелудочной железы, повреждают эндотелий сосудов как самой поджелудочной железы, так и жизненно важных органов [11]. Функциональная недостаточность эндотелия приводит к активации его прокоагулянтных свойств [12]. Взаимодействие тромбоцитов с эндотелием играет одну из ведущих ролей в патогенезе ОП [13]. В работах некоторых авторов было также показано, что изменения количества тромбоцитов могут свидетельствовать о тяжести течения и неблагоприятном исходе ОП. Отмечено, что количество тромбоцитов значительно снижается у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым ОП, тогда как пациенты с легкой и средней тяжестью заболевания не отличались по данной характеристике между собой и с контрольной группой [14].

В нашем эксперименте установлено, что на 3-и сутки в крови животных II группы, где биопродукты клеточного происхождения не применялись, количество тромбоцитов было достоверно меньше, чем в крови интактных животных ($p=0,042$) (рис. 1). Применение ПОРФТ также не предотвращало снижения уровня тромбоцитов, на 3-и сутки этот показатель статистически значимо не отличался от данного показателя у интактных животных ($p=0,054$).

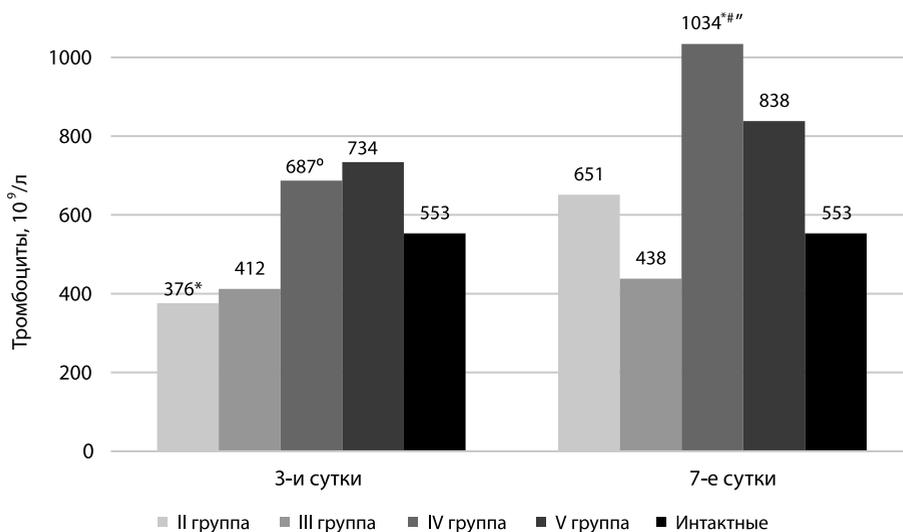


Рис. 1. Изменение уровня тромбоцитов в крови экспериментальных животных в зависимости от получаемой терапии

Примечания: $n=6$ в каждой подгруппе; * достоверно в сравнении с интактными животными; ° достоверно в сравнении с 3-ми сутками животных III группы; # достоверно в сравнении с 7-ми сутками в группах; ## достоверность различий между 3-ми и 7-ми сутками в группе.

Fig. 1. Changes in platelets blood level of experimental animals depending on the therapy received



У животных IV и V групп, где для лечения применялись МСК и МВ МСК, уровень содержания тромбоцитов на 3-и сутки был наиболее высокий и не отличался от данного показателя у интактных животных ($p > 0,05$). В дальнейшем на протяжении эксперимента в крови всех животных отмечалось нарастание уровня тромбоцитов, и на 7-е сутки этот показатель значимо не отличался от такового у интактных животных ($p > 0,05$). Между тем после применения МСК у животных IV группы уровень тромбоцитов оказался наиболее высоким ($1034,5 (972,50; 1227,25) \times 10^9/\text{л}$) и статистически значимо отличался от значений в других группах животных (Mann – Whitney U Test, $p < 0,05$).

По современным представлениям патофизиология ОП включает активацию и высвобождение панкреатических энзимов (амилаза, липаза) с последующим запуском каскада событий, приводящих к ССВО. Именно этот синдром ответственен за прогрессирующее повреждение паренхимы ПЖ, ее некроз, развитие органной недостаточности [15]. На 3-и сутки от начала моделирования ОНП 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; $p = 0,047$). В III группе, где для лечения применялась ПОРФТ, в эти же сроки активность α -амилазы была наименьшей – $771,0 (694,5; 832,5)$ ед/мл – и статистически значимо отличалась от значений во II группе животных ($p = 0,018$). В дальнейшем, через 7 суток наблюдения, во II группе животных активность α -амилазы не менялась. В IV группе, напротив, отмечалось достоверное снижение данного показателя ($p = 0,028$) и к концу эксперимента активность α -амилазы была наименьшей и статистически значимо отличалась от таковой у интактных животных ($677,0 (603,75; 816,25)$ и $819,0 (499,75; 980,0)$ ед/мл соответственно; $p = 0,039$). В V группе на 7-е сутки отмечалось некоторое повышение данного показателя без значимых различий между группами.

Согласно шкале Glasgow (Imre, 1984), одним из критериев при определении тяжести течения ОП является уровень гликемии [16]. На 3-и сутки после моделирования ОНП во II и III группах отмечалось повышение уровня глюкозы крови по сравнению с интактными животными. Применение ПОРФТ не снижало уровень гликемии, и к концу эксперимента только в III группе животных этот показатель был выше интактных значений ($10,0 (8,75; 10,0)$ и $8,0 (6,75; 8,25)$ ммоль/л соответственно; $p = 0,013$). В IV группе животных, где для лечения применялись МСК, на 3-и сутки эксперимента уровень глюкозы был статистически значимо меньше значений данного показателя у интактных животных ($5,75 (4,89; 6,47)$ и $8,0 (6,75; 8,25)$ ммоль/л соответственно; $p = 0,016$). К 7-м суткам эксперимента в этой группе наблюдалось повышение уровня глюкозы крови (с $5,79 (5,70; 5,90)$ до $7,59 (7,11; 8,63)$ ммоль/л; $p = 0,046$) и данный показатель практически не отличался от такового у интактной группы животных ($p = 0,936$).

Синдром эндогенной интоксикации при ОНП сопровождается цитотоксическим эффектом в отношении гепатоцитов, что приводит к снижению естественной детоксикации, в частности к угнетению монооксигеназной детоксицирующей функции печени [17]. С целью сравнительного изучения влияния примененных средств на цитолиз гепатоцитов при ОНП проведено исследование основных внутриклеточных ферментов (АСАТ, АЛАТ), которые служат индикаторами повреждения печеночной ткани (рис. 2). Установлено, что на 3-и сутки у животных II и IV групп уровень АСТ в сыворотке крови был выше, чем у интактных животных ($p > 0,05$). В III группе в эти сроки

значения АСТ не отличались от нормы (128,5 (108,0; 218,5) и 124,5 (96,25; 156,0) ед/л соответственно; $p=0,522$). У животных V группы, где для лечения применялись МВ МСК, на 3-и сутки значения АСТ были ниже нормы (99,15 (84,55; 125,53) ед/л; $p=0,20$).

В дальнейшем на протяжении всего эксперимента отмечено повышение этого показателя у животных II, III и IV групп, что не наблюдалось у животных V группы. В V группе животных, где применялись МВ МСК, на 7-е сутки уровень АСТ оказался наиболее низким (96,7 (92,55; 115,13) ед/л) и достоверно был ниже значений данного показателя у животных сравниваемых групп ($p<0,05$). В IV группе животных, где применялись МСК, напротив, показатель АСТ в этот же период оказался наиболее высоким и превышал интактные значения в 1,7 раза (215,50 (167,0; 265,50) и 124,50 (96,25; 156,0) ед/л соответственно; $p=0,016$).

При исследовании уровня АЛТ в сыворотке крови животных всех групп было установлено, что активность этого фермента изменялась разнонаправленно и достоверно не отличалась от контрольных показателей ($p>0,05$). Отмечено, что в IV группе животных, где применялись МСК, на 7-е сутки уровень АЛТ был наиболее высоким, хотя статистически значимо не отличался от нормальных значений (74,50 (55,0; 117,25) и 55,0 (44,50; 63,50) ед/л соответственно; $p=0,172$).

По современным представлениям ключевым патогенетическим звеном ОП является «цитокиновый шторм» с развитием синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [15, 18], поэтому изучение действия медиаторов воспаления и способов их ингибирования – основное направление совершенствования комплексного

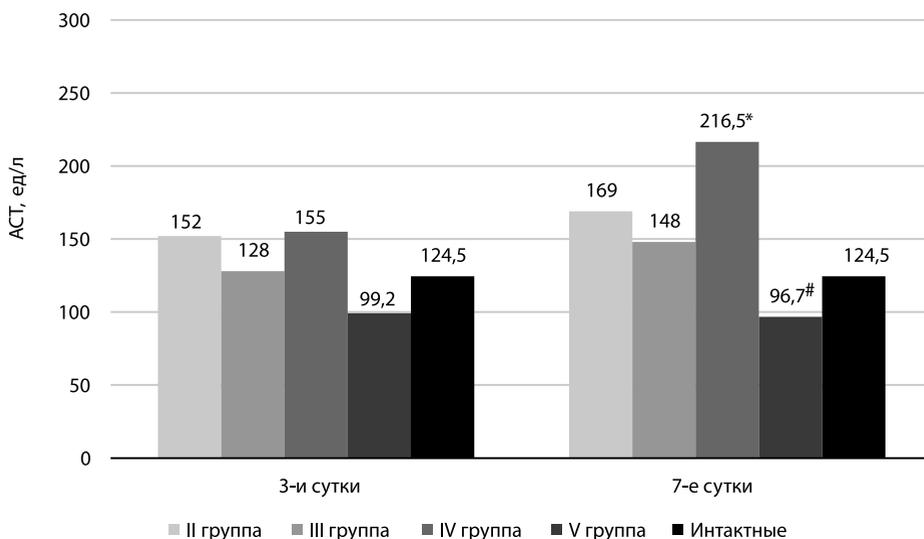


Рис. 2. Изменение уровня АСТ в крови экспериментальных животных в зависимости от получаемой терапии

Примечания: $n=6$ в каждой подгруппе; * достоверно в сравнении с интактными животными; # достоверно в сравнении с 7-ми сутками животных II, III и IV групп.

Fig. 2. Changes in AST blood level of experimental animals depending on the therapy received



лечения острого панкреатита. ССВО 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, молекул адгезии. По данным некоторых авторов, ФНО- α является одним из основных факторов в запуске каскадных реакций, способствующих повреждению паренхимы ПЖ и развитию органной недостаточности [19]. Его концентрация в сыворотке крови пациентов коррелирует с тяжестью течения острого панкреатита и системными осложнениями [20].

Установлено, что во II (контрольной) группе животных, где лечение не применялось, отмечался самый значительный рост концентрации ФНО- α , на 3-и сутки этот показатель был достоверно выше, чем в группе интактных животных (1,73 (1,47; 1,87) и 1,45 (1,32; 1,77) пг/мл соответственно; $p=0,048$). Применение ПОРФТ и МВ МСК не способствовало снижению концентрации ФНО- α в группах, в эти же сроки данный показатель был выше, чем у интактных животных ($p>0,05$), однако оставался меньше в сравнении с животными II группы ($p>0,05$) (рис. 3).

В IV группе, где применялись МСК, на 3-и сутки эксперимента концентрация ФНО- α была ниже, чем у интактных животных, на 42% (1,02 (0,85; 1,24 и 1,45 (1,32; 1,77) пг/мл соответственно; $p=0,011$), чем у животных II группы – на 70% (1,73 (1,47; 1,87) пг/мл; $p=0,011$), чем у животных III группы – на 59% (1,61 (1,56; 1,67) пг/мл; $p=0,011$) и чем у животных V группы – на 50% (1,53 (1,08; 1,95) пг/мл; $p=0,055$). На 7-е сутки

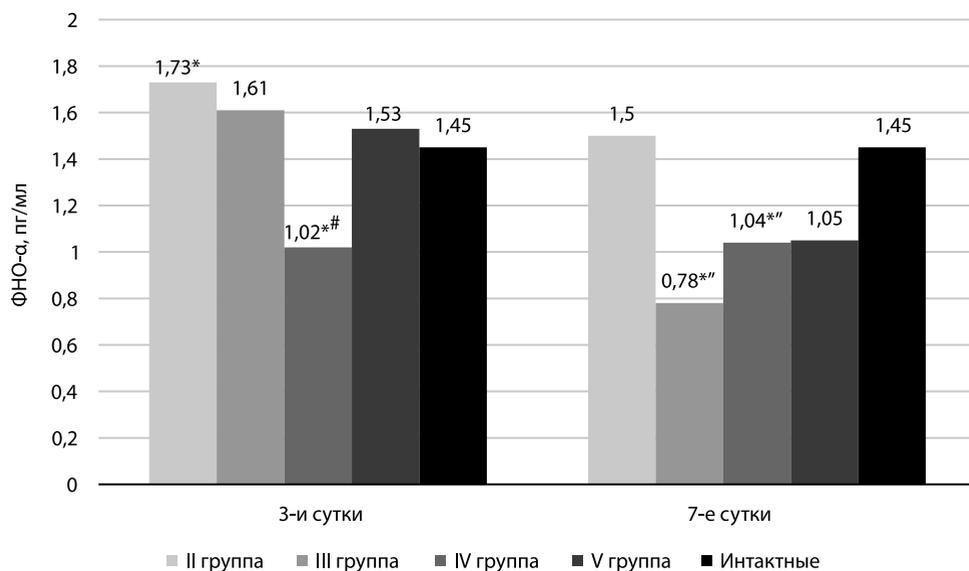


Рис. 3. Изменение концентрации ФНО- α в сыворотке крови экспериментальных животных в зависимости от получаемой терапии

Примечания: $n=6$ в каждой подгруппе; * достоверно в сравнении с интактными животными; # достоверно в сравнении с 3-ми сутками животных II и III групп; * достоверно в сравнении с 7-ми сутками животных II группы.

Fig. 3. Changes in TNF- α blood serum levels of experimental animals depending on the therapy received

у животных II группы концентрация ФНО- α снизилась и статистически значимо не отличалась от значений у интактных животных (1,50 (1,16; 1,76) и 1,45 (1,32; 1,77) пг/мл соответственно; $p=1,0$). Однако значения этого показателя в данной группе оставались выше, чем в группах, где для лечения применялись биопродукты клеточного происхождения. Как следует из рис. 3, на 7-е сутки от начала эксперимента у животных III и V групп отмечалось статистически значимое снижение концентрации ФНО- α по сравнению с интактными значениями ($p<0,05$), однако у животных III группы, где для лечения применялась ПОРФТ, этот показатель был наиболее низкий (0,78 (0,61; 1,05) пг/мл).

Уровень ИЛ-6 отражает активность всех провоспалительных цитокинов, продолжительное сохранение повышенной концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови у пациентов с некротизирующим панкреатитом коррелирует с высокой частотой осложнений и летальностью [21]. В исследовании Dambrauskas и соавт. (2010) было установлено, что тяжелый ОП был связан с гиперэкспрессией провоспалительных цитокинов, поэтому ИЛ-6 является одним из маркеров дифференциальной диагностики между легким и тяжелым острым панкреатитом [22].

Как представлено на рис. 4, в IV и V группе животных на 3-и сутки, где базисная терапия сочеталась с введением МСК и МВ МСК, концентрация ИЛ-6 была достоверно ниже, по сравнению с данными показателями у животных II и III групп, и в 2,6–3 раза ниже значений интактных животных (88,0 (71,65; 155,95), 98,2 (71,30; 102,75) и 258,30 (209,30; 333,25) пг/мл соответственно; $p=0,011$). В дальнейшем отмечалось повышение этого показателя без достоверных различий между группами.

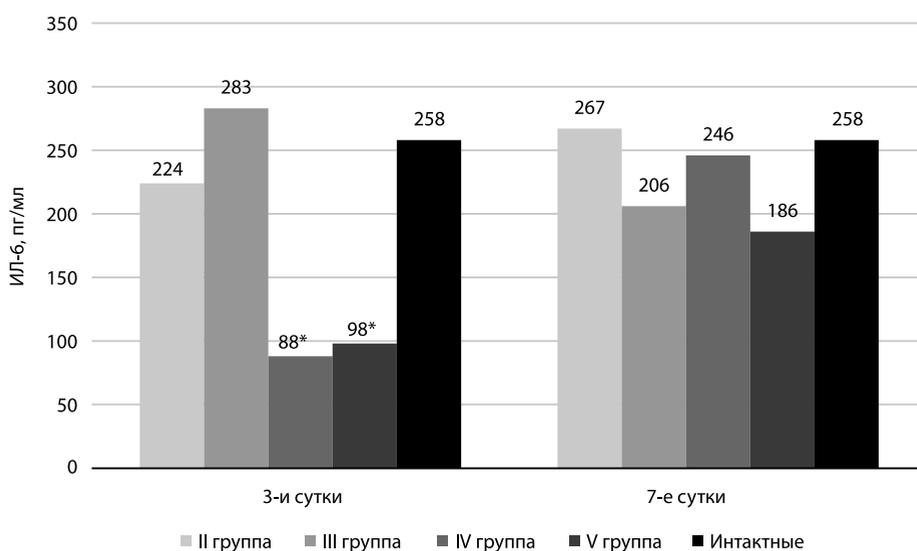


Рис. 4. Изменение концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови экспериментальных животных в зависимости от получаемой терапии

Примечания: $n=6$ в каждой подгруппе; * достоверно в сравнении с интактными, II и III группами животных.

Fig. 4. Changes of IL-6 blood serum levels of experimental animals depending on the therapy received



Через 3 суток после моделирования ОНП у животных II группы отмечался значительный рост уровня СРБ (в 2 раза) по сравнению с нормой (0,40 (0,30; 0,55) и 0,20 (0,20; 0,30) пг/мл соответственно; $p=0,004$). При исследовании уровня СРБ в сыворотке крови животных III группы на 3-и сутки от начала моделирования ОНП также отмечено достоверное повышение этого показателя по сравнению с интактными животными (0,35 (0,30; 0,40) и 0,20 (0,20; 0,30) пг/мл соответственно; $p=0,005$). В дальнейшем во II и III группах наблюдалось снижение СРБ до 0,30 (0,0; 0,30) пг/мл, однако на 7-е сутки он оставался выше, чем в группе интактных животных ($p=0,005$). Напротив, в IV группе животных, которым базисная терапия была дополнена введением МСК, уровень СРБ на протяжении всего эксперимента статистически значимо не отличался от значений интактных животных (0,20 (0,20; 0,30) и 0,20 (0,20; 0,30) пг/мл соответственно; $p=0,523$) и был достоверно ниже значений во II и III группах ($p<0,05$).

Период полувыведения цитокинов из кровотока составляет 3,2–7,5 мин., и при «цитокиновом шторме» наблюдается их постоянное поступление в периферическое кровяное русло из очага воспаления (ПЖ), а также из клеток воспаленного эндотелия кровеносных сосудов, которые становятся основными продуцентами цитокинов [18]. Активация и гибель клеток эндотелия ведет к клиническим проявлениям эндovasкулита, 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 [18, 23]. В результате взаимодействия оксида азота с АФК происходит образование пероксинитрита, который является крайне цитотоксичным продуктом, способным повреждать эндотелий. Как было ранее установлено, взаимодействие между АФК и оксидом азота играет одну из ключевых ролей в развитии тяжелых форм панкреатита [24].

Согласно полученным данным, на 3-и сутки после моделирования ОНП концентрация NO 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; $p=0,004$) (рис. 5). Применение для лечения ПОРФТ на 3-и сутки не препятствовало росту концентрации NO в сыворотке крови у животных III группы до 20,1 (17,70; 25,79) мкмоль/мл. Напротив, применение МСК и их микровезикул способствовало тому, что содержание NO в сыворотке крови животных этих групп через 3 суток от начала эксперимента было наименьшим по сравнению с интактными животными (14,20 (11,35; 16,05), 13,90 (11,8; 15,65) и 16,04 (14,31; 23,54) мкмоль/мл соответственно; $p=0,201$) и статистически значимо было меньше данного показателя у животных II группы ($p=0,011$).

Далее на протяжении всего эксперимента у животных II и III групп наблюдалось снижение в крови уровня NO, и на 7-е сутки этот показатель во всех группах значимо не отличался от значений у интактных животных ($p>0,05$).

Тесно связаны с ССВО процессы перекисного окисления липидов, продукты которых обладают выраженной токсичностью и деструктивным воздействием на ткани [24]. 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 [25]. Как показали наши исследования, содержание МДА в крови животных II группы на 3-и сутки после создания модели ОНП было выше, чем у интактных животных (21,60 (19,40; 22,45) и 18,65 (16,50; 19,53)

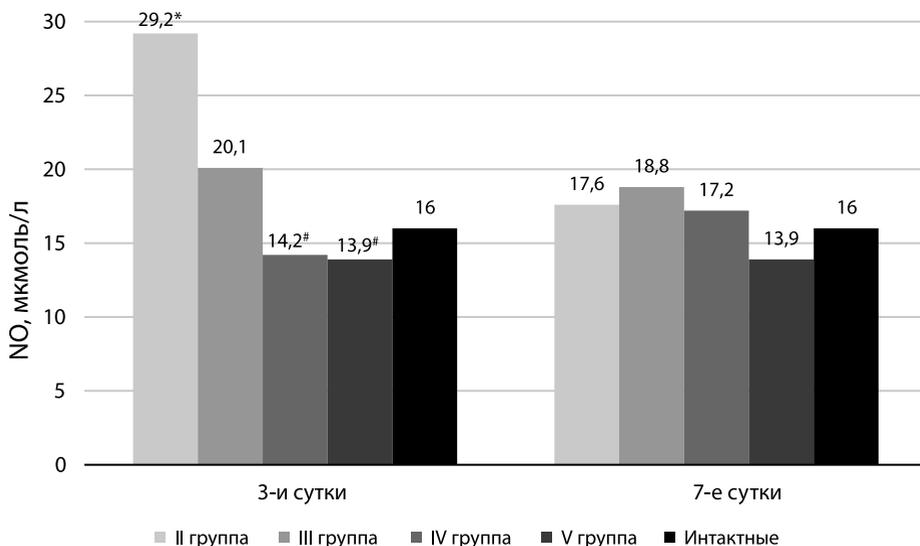


Рис. 5. Изменение уровня NO в крови экспериментальных животных в зависимости от получаемой терапии

Примечания: n=6 в каждой подгруппе; * достоверно в сравнении с интактными животными; # достоверно в сравнении с 3-ми сутками животных II группы.

Fig. 5. Changes of NO blood levels of experimental animals depending on the therapy received

мкмоль/мл соответственно), что указывает на увеличение интенсивности свободно-радикального окисления. В III и IV группе животных, где для лечения применялись ПОРФТ и МСК, на 3-и сутки эксперимента значения МДА были ниже, чем у животных II группы ($p > 0,05$). На 7-е сутки уровень МДА в этих группах статистически значимо не отличался от значений у интактных животных и животных без лечения (II группа). Последнее свидетельствует о положительном влиянии ПОРФТ и МСК на интенсивность ПОЛ при экспериментальном ОНП. В V группе животных применение МВ МСК не препятствовало накоплению МДА, на 3-и сутки эксперимента его значения были выше, чем у животных II, III и IV 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; $p = 0,04$). В дальнейшем в данной группе 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 ($p < 0,05$).

■ ВЫВОДЫ

1. Регионарное применение МСК и их микровезикул снижало патологическую тромбоцитарную реакцию (тромбоцитопению) при остром экспериментальном некротизирующем панкреатите. У животных, для лечения которых использовались МСК и МВ МСК, уровень содержания тромбоцитов в крови на 3-и сутки эксперимента в 1,8–1,9 раза был выше, чем в группе животных без лечения, и не отличался от данного показателя у интактных животных ($p = 0,631$). Применение



МСК в эти же сроки эксперимента приводило к коррекции гипергликемии, уровень глюкозы после применения МСК был достоверно меньше значений данного показателя у животных контрольной группы (5,75 (4,89; 6,47) и 9,0 (6,50; 11,50) ммоль/л соответственно; $p=0,016$). Эти данные могут свидетельствовать о цитопротекторном действии МСК в отношении гормонпродуцирующих клеточных структур поджелудочной железы.

2. Применение ПОРФТ и МСК для лечения острого экспериментального панкреатита препятствовало росту активности α -амилазы в сыворотке крови, что может также свидетельствовать о системном антиферментном, опосредованном через цитопротекторное действие ПОРФТ и МСК в отношении экзокринных клеточных структур поджелудочной железы. На 3-и сутки в группе животных, где применялась ПОРФТ, активность α -амилазы была наименьшей – 771,0 (694,5; 832,5) ед/мл – и статистически значимо отличалась от значений в контрольной группе животных ($p=0,018$). У животных, получавших лечение МСК, на протяжении эксперимента отмечалось статистически значимое ($p=0,028$) снижение активности α -амилазы и на 7-е сутки эксперимента этот показатель в 1,3 раза был ниже значений контрольной группы ($p=0,045$). Сочетание стандартной терапии с МВ МСК препятствовало росту уровня АСТ в сыворотке крови, что может указывать на их цитопротекторное действие в отношении клеточных структур печени. На 3-и сутки у животных этой группы значения АСТ были ниже нормы (99,15 (84,55; 125,53) и 124,50 (96,25; 156,0) ед/л соответственно; $p>0,05$). В дальнейшем роста уровня этого фермента не наблюдалось, на 7-е сутки показатель АСТ в данной группе оказался наиболее низкий (96,7 (92,55; 115,13) ед/л) и статистически значимо был ниже значений у животных сравниваемых групп ($p<0,05$).
3. Использование ПОРФТ, МСК и МВ МСК при остром экспериментальном некротизирующем панкреатите уменьшало системный воспалительный ответ, что продемонстрировала динамика значений ФНО- α и ИЛ-6. На 3-и сутки эксперимента в сыворотке крови животных, где базисная терапия сочеталась с введением МСК, концентрация ФНО- α была наименьшей и статистически значимо отличалась от значений в сравниваемых группах ($p<0,05$), в дальнейшем повышения этого показателя не отмечалось. Применение ПОРФТ и МВ МСК также способствовало снижению концентрации ФНО- α , на 7-е сутки от начала эксперимента наблюдалось статистически значимое снижение этого показателя по сравнению с таковым у интактных животных ($p<0,05$). У животных III группы, где для лечения применялась ПОРФТ, этот показатель оказался наиболее низкий (0,78 (0,61; 1,05) пг/мл) и в 1,9 раза был ниже значений контрольной группы ($p=0,033$). На 3-и сутки эксперимента в сыворотке крови животных, где базисная терапия сочеталась с введением МСК и МВ МСК, концентрация ИЛ-6 была статистически значимо ниже ($p<0,05$) по сравнению с животными, которым лечение не проводилось, и с животными, для лечения которых применялась ПОРФТ. В сыворотке крови животных, которым проводилось лечение МСК, уровень СРБ на протяжении всего эксперимента не отличался от значений у интактных животных (0,20 (0,20; 0,30) и 0,20 (0,20; 0,30) пг/мл соответственно; $p=0,523$) и был статистически значимо ниже значений в группе животных без лечения и в группе животных, где применялась ПОРФТ ($p<0,05$).
4. Регионарное применение МСК и МВ МСК препятствовало росту концентрации НО в сыворотке крови у экспериментальных животных. На 3-и сутки от начала

эксперимента значение этого показателя в опытных группах (14,2 (11,35; 16,05) и 13,9 (11,8; 15,65) мкмоль/мл соответственно) не отличалось от значений у интактных животных ($p > 0,05$) и в 2,1 раза было меньше, чем в группе контроля (29,22 (19,42; 35,48) мкмоль/мл; $p < 0,05$). На 3-и сутки эксперимента в сыворотке крови групп животных, где для лечения применялись ПОРФТ и МСК, значения МДА были ниже, чем у животных других опытных групп, и не отличались от значений интактных животных ($p > 0,05$). Применение МВ МСК не препятствовало накоплению МДА, в этот же период его значения были выше, чем у животных сравниваемых 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; $p = 0,04$). На 7-е сутки после применения МВ МСК этот показатель также был выше, чем в других сравниваемых группах животных ($p < 0,05$).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение различных схем терапии экспериментального острого некротизирующего панкреатита показало, что раннее применение клеточной терапии оказывает системный положительный эффект, что позволяет рассматривать ее в клинических условиях в качестве перспективного средства для патогенетического лечения данного заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Saveliev V., Filimonov M., Burnevich S. *Pancreonecrosis*. Moscow: M.I.A, 2008:264 p. (in Russian)
2. Petrov M., Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(3):175–184. doi: 10.1038/s41575-018-0087-5
3. Banks P.A., Bollen T.L., Dervinen C., Gooszen H.G., Johnson C.D., Sarr M.G., Tsiotis G.G., Vege S.S.; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis – 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62(1):102–11. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779. Epub 2012 Oct 25.
4. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2013;13(4 Suppl 2):e1–15. doi: 10.1016/j.pan.2013.07.063
5. Kudelich O., Kondratenko G., Letkovskaya T., Potapnev M., Nerovnyia A., Stepuro O. Morphological Substantiation of Severe Acute Pancreatitis Model. *Surgery Eastern Europe*. 2022;11(4):490–502. Available at: <https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.4.014> (in Russian)
6. Kudelich O., Kondratenko G., Metelica T., Kolesnikova T., Hodosovskaya E. 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. Available at: <https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.1.017> (in Russian)
7. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina 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. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
8. Yamaguchi R., Terashima H., Yoneyama S., Tadano S., Ohkochi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res*. 2012;173(2):258–66. doi: 10.1016/j.jss.2010.10.001
9. Asakava T., Matsushita S. Colorus condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980;5(3):137–140.
10. Andreeva S., Mamedova S., Rasputin P. Ultrastructural disorders of microvasculature of the pancreas at experimental acute destructive pancreatitis. *Medical newsletter of Vyatka*. 2019;3(63):18–22. doi: 10.24411/2220-7880-2019-10004 (in Russian)
11. Poryadin G., Vlasov A., Anaskin S., Vlasova T., Potyanova I., Turygina S. Systemic factors of acute pancreatitis advance. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2015;59(2):46–50. Available at: <https://pfiet.ru/article/view/854> (in Russian)
12. Zagorodskikh E., Cherkasov V., Shchekotova A. Markers of endothelial dysfunction and theirs prognostic significance in severe acute pancreatitis. *Fundamental research*. 2013;9(3):355–361. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32353> (in Russian)
13. Maeda K., Hirota M., Ichihara A., Ohmuraya M., Hashimoto D., Sugita H. et al. Applicability of disseminated intravascular coagulation parameters in the assessment of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006;32(1):87–92. doi: 10.1097/01.mpa.0000186248.89081.44
14. Akbal E., Demirci S., Koçak E., Köklü S., Başar O., Tuna Y. Alterations of platelet function and coagulation parameters during acute pancreatitis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013;24(3):243–6. Available at: <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835aef51>
15. Vlasov A., Anaskin S., Vlasova T., Rubtsov O., Leshchankina N., Muratova T., et al. Systemic inflammatory response syndrome in pancreatic necrosis: triggers and organ damage. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2021;4(4):21–28. doi: 10.17116/hirurgiya202104121 (in Russian)
16. Kiat T.T.J., Gunasekaran S.K., Junnarkar S.P., Low J.K., Woon W., Shelat V.G. Are traditional scoring systems for severity stratification of acute pancreatitis sufficient? *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2018;22(2):105–15. doi: 10.14701/ahbps.2018.22.2.105
17. Tarasenko V. Pathological mechanisms of acute pancreatitis. *Innovatics and Expert Examination*. 2016;3(18):175183. Available at: <https://www.inno-exp.ru/archive/18/index.php> (in Russian)



18. Potapnev M. Cytokine storm. Causes and consequences. *Immunologiya*. 2021;42(2):175–88. doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-175-188 (in Russian)
19. Bishehsari F, Sharma A, Stello K, Toth C, O'Connell M.R., Evans A.C., et al. TNF-alpha gene (TNFA) variants increase risk for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2012;12(2):113–118. doi: 10.1016/j.pan.2012.02.014
20. De Beaux A.C., Fearon K.C. Circulating endotoxin, tumour necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;219:43–6. doi: 10.3109/00365529609104999
21. Tarasenko V., Kubyshkin V., Demin D., Volkov D., Smoliagin A., Chukina O. Immune correction by pancreonecrosis. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2013;(1):88–95. Available at: <https://www.mediasphera.ru/issues/khirurgiya-zhurnal-im-n-i-pirogova/2013/11/030023-12072013118?lang=ru> (in Russian)
22. Dambrauskas Z., Giese N., Gulbinas A., Giese T., Berberat P.O., Pundzius J., Barauskas G., Friess H. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(15):1845–53. doi: 10.3748/wjg.v16.i15.1845
23. Kang R., Lotze M.T., Zeh H.J., Billiar T.R., Tang D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Mol Med*. 2014;20(1):466–77. doi: 10.2119/molmed.2014.00117
24. Pădureanu V., Florescu D.N., Pădureanu R., Ghenea A.E., Gheonea D.I., Oancea C.N. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*. 2022;23(3):197. doi: 10.3892/etm.2022.11120. Epub 2022 Jan 5.
25. Booth D.M., Murphy J.A., Mukherjee R., Awais M., Neoptolemos J.P., Gerasimenko O., 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. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.054>