



Куделич О.А.¹✉, Кондратенко Г.Г.¹, Потапнев М.П.², Картун Л.В.¹, Клименкова О.В.², Нищищенко А.О.¹

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

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

Влияние путей и времени введения 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, редактирование и утверждение рукописи статьи для публикации; Картун Л.В. – выполнение биохимических исследований, иммуноферментный анализ; Клименкова О.В. – получение ПОРФТ, выделение и культивирование стволовых клеток и их микровезикул; Нищищенко А.О. – обработка данных.

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: 04.12.2024

Принята: 07.04.2025

Контакты: kudelichsurg@gmail.com

Резюме

Цель. В сравнительном плане оценить влияние мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их микровезикул (МВ) и плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), на системные патологические изменения при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите (ОНП) в зависимости от их пути и времени введения, а также раздельного и сочетанного применения.

Материалы и методы. Изучено влияние МСК, МВ МСК и ПОРФТ на течение ОНП у крыс в зависимости от пути (внутрибрюшинный/внутривенный) и времени введения (6 и 24 часа от начала моделирования заболевания), а также их раздельного или сочетанного применения (ПОРФТ и МСК, ПОРФТ и МВ МСК). Исследование проведено на 72 половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Модель острого очагового некротизирующего панкреатита создавали введением 0,3 мл 5% неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в хвостовую часть поджелудочной железы крыс. На 3-и сутки от начала моделирования заболевания оценивали гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (альфа-амилаза, глюкоза), маркеры эндогенной интоксикации (малоновый диальдегид (МДА), уровень оксида азота (NO), содержание продуктов окислительной



модификации белков), маркеры системного воспалительного ответа (фактор некроза опухоли α).

Результаты. Внутривенное применение МСК и их микровезикул на ранней стадии острого некротизирующего панкреатита предотвращает развитие тромбоцитопении. На уровень гликемии при ОНП у крыс положительно влияет только внутрибрюшинное применение МСК. Применение биопродуктов клеточного происхождения вне зависимости от их вида, времени и пути введения способствовало снижению гиперамилаземии, наименьшая активность α -амилазы в сыворотке крови отмечена после внутривенного введения МВ МСК через 24 часа от начала эксперимента. Снижению концентрации ФНО- α при экспериментальном ОНП способствует внутрибрюшинное и внутривенное введение МСК. Внутрибрюшинное применение МСК и МВ МСК, а также внутривенное введение МСК статистически значимо препятствовало росту уровня NO в сыворотке крови животных опытных групп. Внутривенное введение МСК и МВ МСК снижало содержание продуктов окислительной модификации белков. Наименьшие значения МДА наблюдались после внутривенного введения МСК и МВ МСК.

Заключение. Разработанная концепция раннего (в 1-е сутки заболевания) применения биопродуктов клеточного происхождения при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите показала, что внутривенное использование МСК и МВ МСК оказывает системный положительный эффект у экспериментальных животных, и это позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для патогенетического лечения данного заболевания в клинических условиях.

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

Kudelich O.¹✉, Kondratenko G.¹, Potapnev M.², Kartun L.¹, Klimenkova O.²,
Nischimenko A.¹

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

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

Effect of Routes and Time of Administating Bioproducts of Cellular Origin on the Course of Acute Necrotizing Pancreatitis in an Experiment

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kudelich O. – study concept and design, carrying out the experiment, data collection and processing, results evaluating, text writing; Kondratenko G., Potapnev M. – study concept and design, editing and final approval of the version to be published; Kartun L. – performing biochemical tests, enzyme immunoassay; Klimenkova O. – obtaining PRP, stem cells and microvesicles isolation and cultivation; Nischimenko A. – data collection.

Funding. The work was carried out in accordance with the plan of scientific research under the assignment "To elaborate a method for the treatment of acute severe experimental pancreatitis using bioproducts of cellular origin" of the subprogram "Molecular and cellular biotechnologies-2" in the frame of the state scientific and technical program "Biotechnologies-2" for 2021–2025; state registration No. 20220363 dated 03/28/2022 in the Belarusian Institute of System Analysis. The authors received no financial support from manufacturing companies.

Ethics statement. The research protocol was approved by 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, 03/18/1986), 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: 04.12.2024

Accepted: 07.04.2025

Contacts: kudelichsurg@gmail.com

Abstract

Purpose. To evaluate, in comparative terms, the effect of mesenchymal stromal cells (MSCs), their microvesicles (MV MSCs) and plasma enriched with platelet factors (PRP) on systemic pathological changes in experimental acute necrotizing pancreatitis (ANP) depending on route and time of their administration, as well as on their separate and combined use.

Materials and methods. The effect of MSCs, MV MSCs and PRP on the course of ANP in rats was studied, depending on the route (intraperitoneal /intravenous) and time of administration (6 and 24 hours from the start of the disease modeling), as well as their separate or combined use (PRP and MSCs, PRP and MV MSCs). The study was carried out on 72 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 the rat pancreas. Hematological parameters, markers of systemic manifestations of the pathological process (alpha-amylase, glucose), markers of endogenous intoxication (malondialdehyde/MDA, nitric oxide/NO level, content of products of protein oxidative modification), and markers of systemic inflammatory response (tumor necrosis factor- α) were assessed on the 3rd day from the beginning of the disease modeling.

Results. Intravenous administration of MSCs and their microvesicles at the early stage of acute necrotizing pancreatitis prevents thrombocytopenia. Only intraperitoneal administration of MSCs has a positive effect on glycemia level in ANP in rats. Introducing cell origin bioproducts regardless of their type, time and route of administration contributed



to hyperamylasemia reduction; the lowest activity of α -amylase in blood serum was observed after intravenous administration of MSC MB in 24 hours from the beginning of the experiment. Intraperitoneal and intravenous administration of MSCs reduce TNF- α levels in experimental ANP. Intraperitoneal administration of MSC and MB MSC, as well as intravenous administration of MSC statistically significantly prevented increasing of NO level in blood serum of experimental groups animals. Intravenous administration of MSC and MB MSC decreased the content of protein oxidative modification products. The lowest MDA values were observed after intravenous administration of MSC and MB MSC.

Conclusion. The elaborated concept of an early (in the 1st day of the disease) application of cell origin bioproducts in experimental acute necrotizing pancreatitis demonstrated that intravenous use of MSCs and MB MSCs produced a systemic positive effect in experimental animals, allowing to consider them as promising means for pathogenetic treatment of this disease in clinical practice.

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

■ ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие клеточной биологии позволяет рассматривать клеточную терапию как одно из средств лечения острого некротизирующего панкреатита (ОНП). Лечение посредством мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их микровезикул (МВ) считается безопасной процедурой, но имеет ряд ограничений. Анализ данных научной литературы свидетельствует об активном исследовательском поиске оптимальных сроков, дозировок и путей доставки биопродуктов клеточного происхождения при лечении ОНП [1].

Для системного воздействия на организм введение биопродуктов клеточного происхождения (МСК и МВ МСК), как правило, осуществляется внутривенно или внутриартериально. При системном введении МСК способны к направленной миграции (хоумингу) в места повреждения тканей в ответ на секрецию хемокинов и цитокинов [1]. Несмотря на то что точный механизм хоуминга МСК в зону повреждения до конца не выяснен, известно, что он представляет собой многоэтапный процесс, в котором существенную роль играют хемотаксические факторы [2]. Очевидно, что внутрисосудистое введение является наименее инвазивным путем доставки и наиболее предпочтительным с клинической точки зрения. Однако этот путь имеет существенные недостатки, основным из которых является способность достаточно высокого процента введенных клеток задерживаться в капиллярной сети легких (эффект первого прохождения) и других органов, таких как печень, почки [3].

Применение внутрибрюшинной трансплантации клеток в клинической практике имеет существенные ограничения, обусловленные возможными осложнениями. Эти осложнения включают катетерную инфекцию и механическое повреждение внутрибрюшинных структур. В то же время следует отметить, что высокая васкуляризация брюшины позволяет большему количеству трансплантированных клеток одновременно получать доступ к лимфатической и кровеносной системам, что, безусловно, способствует их приживлению в местах повреждения тканей и зонах воспалений [1, 3, 4].

С учетом вышеизложенного научный и практический интерес представляет проведение экспериментальных исследований для оценки влияния МСК, МВ МСК и ПОРФТ на течение ОНП у крыс в зависимости от их пути (региональный/внутривенный) и времени введения, а также их отдельного или сочетанного применения (ПОРФТ и МСК, ПОРФТ и МВ МСК).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В сравнительном плане оценить влияние МСК, их МВ и ПОРФТ на системные патологические изменения при экспериментальном ОНП в зависимости от их пути и времени введения, а также отдельного и сочетанного применения.

■ 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 72 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275–380 г проведено экспериментальное исследование, во время которого животные случайным образом были разделены на следующие группы: интактные (n=6); группа К (контрольная) (n=6) – крысы с ОНП без лечения; группа О₁ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида; группа О₂ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + региональное введение ПОРФТ; группа О₃ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + региональное введение МСК; группа О₄ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + региональное введение МВ МСК; группа О₅ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + внутривенное введение МСК через 24 часа от начала заболевания; группа О₆ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + внутривенное введение МВ МСК через 24 часа от начала заболевания; группа О₇ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + внутривенное введение МСК через 6 часов от начала заболевания; группа О₈ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + внутривенное введение МВ МСК через 6 часов от начала заболевания; группа О₉ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + региональное введение ПОРФТ + внутривенное введение МСК через 6 часов от начала заболевания; группа О₁₀ (n=6) – крысы с ОНП, лечение – инфузии 0,9% раствора натрия хлорида + региональное введение ПОРФТ + внутривенное введение МВ МСК через 6 часов от начала заболевания. 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) [5, 6].

Способ регионального (внутрибрюшинного) введения биопродуктов клеточного происхождения при лечении ОНП

Животным групп O_2 , O_3 и O_4 во время этапа моделирования ОП через контрапертуру на передней брюшной стенке в левом нижнем квадранте в брюшную полость к ПЖ подводили катетер из прозрачного термопластичного имплантационно-нетоксичного поливинилхлорида по разработанной нами методике (патент на изобретение BY 24210 от 28.12.2023).

Лечение острого некротизирующего панкреатита в эксперименте

Для оценки влияния на системные изменения при тяжелом остром панкреатите животным группы O_1 лечение начинали через 24 часа после начала моделирования ОНП, кроме обезболивания, проводилось внутривенное введение 0,9% раствора NaCl в объеме 2 мл 1 раз в сутки. У животных группы O_2 вышеуказанное лечение дополнялось региональным (внутрибрюшинным) введением ПОРФТ в 1-е сутки после моделирования в объеме 150 мкл двукратно через 6 часов через ранее установленный дренаж (патент на изобретение BY 24225 от 07.02.2024). Животным группы O_3 в этот же период лечение проводилось региональным введением МСК в 1-е сутки после моделирования в дозе 1×10^6 клеток/кг в 1,0 мл приготовленного раствора через ранее установленный катетер (приоритетная справка а20230332 от 20.02.2024). В группе O_4 инфузионная терапия физиологическим раствором сочеталась с региональным введением в 1-е сутки от начала заболевания 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. Для определения наиболее эффективного способа введения (внутривенный или внутрибрюшинный/региональный), сроков лечения ОП (6 и 24 часа от начала моделирования заболевания), изолированного или совместного применения МСК, МВ МСК и ПОРФТ животным групп O_5 и O_7 вводили внутривенно МСК в дозе 1×10^6 клеток/кг в 1,0 мл приготовленного раствора через 6 (группа O_7) и 24 (группа O_5) часа после моделирования заболевания, животным групп O_6 и O_8 вводили внутривенно МВ МСК в объеме 1,0 мл приготовленного раствора через 6 (группа O_8) и 24 (группа O_6) часа после моделирования заболевания. Животным группы O_9 после моделирования заболевания перед зашиванием лапаротомной раны к патологически измененной части ПЖ регионально вводили ПОРФТ в объеме 300 мкл, через

6 часов вышеуказанное лечение сочеталось с внутривенным введением МСК в дозе 1×10^6 клеток/кг в 1,0 мл приготовленного раствора. У животных группы O_{10} локальное введение ПОРФТ в объеме 300 мкл во время моделирования ОНП через 6 часов дополнялось внутривенным введением МВ МСК в объеме 1,0 мл приготовленного раствора.

Внутривенное введение биопродуктов клеточного происхождения осуществлялось через хвостовую вену.

На 3-и сутки животных путем эвтаназии выводили из эксперимента. У всех животных в контрольные сроки производили забор крови для лабораторных исследований. Определяли гематологические показатели, маркеры системного проявления патологического процесса (альфа-амилаза, глюкоза), маркеры системного воспалительного ответа (ФНО- α), маркеры эндогенной интоксикации (активность перекисного окисления липидов, уровень оксида азота – NO, степень окислительной модификации белков (ОМБ)).

Методика получения биопродуктов клеточного происхождения и их характеристика

МСК костного мозга получали из бедренной кости крыс путем перфузии питательной средой DMEM/F12 (Elabscience, Китай) с 5% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка). Собранную клеточную взвесь отмывали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 минут. МСК рассеивали в питательной среде DMEM/F12 с 10% ЭТС в культуральных флаконах T25 (Sarstedt, Германия). После формирования на дне пластиковых флаконов крупных колоний МСК под контролем инвертированного микроскопа Leica DM2500 (LEICA Microsystems, Германия) при увеличении в 25 раз 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. Клеточную массу МСК наращивали до 80% конфлюентного роста в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС и раствора антибиотиков (стрептомицин/пенициллин, Sigma, США). МСК доводили до концентрации 200 тыс/мл и использовали в экспериментах *in vitro*.

Внеклеточные микровезикулы МСК получали методом дифференциального центрифугирования с подбором различных скоростных режимов центрифугирования, времени и фильтрации раствором. На первом этапе МСК высевали в культуральный флакон T75 (Sarstedt, Германия) в концентрации 3000/см² в полную питательную среду DMEM/F12 с 10% ЭТС. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (Esco, Сингапур) при +37 °C и 5% CO₂ до достижения конфлюентности на ростовой поверхности более 90%. На втором этапе для обогащения культуральной среды микровезикулами культуру клеток промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Elabscience, Китай) и переводили культуру на бессывороточную среду DMEM/F12. Культивирование продолжали в течение 48 часов для создания условий легкого клеточного стресса, не вызывающего гибели клеток и способствующего выделению внеклеточных МВ. Третий этап представлял собой непосредственно получение фракции МВ из культуральной жидкости МСК. Полученную кондиционную среду центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин при +4 °C для удаления крупных частиц, клеток и клеточного дебриса. Супернатант, содержащий микровезикулы, собирали



и осаждали путем центрифугирования в пробирках типа Эппендорф объемом 1,5 мл при 14 500 g в течение 30 минут при температуре +4 °С (микроцентрифуга MicroCL 21R, Thermo Scientific, США). Удаляли 2/3 супернатанта, нижнюю треть объема объединяли из двух пробирок. Взвесь микровезикул доводили ФСБ, предварительно профильтрованным через шприцевой мембранный фильтр 0,2 мкм до объема 1,5 мл и центрифугировали при 14 500 g в течение 30 минут при температуре +4 °С. Удаляли супернатант, оставляя в пробирке по 250 мкл осадка, объединяли в одну пробирку, доводили ФСБ до 1,5 мл и центрифугировали в том же режиме. Полученный осадок микровезикул ресуспендировали в 1 мл ФСБ (из исходного объема культуры клеток 10 мл) и использовали в экспериментах.

Получение аллогенной ПОРФТ проводили модифицированным методом Yamaguchi R. с соавторами [7].

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

Гематологические (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты, лейкоциты) исследования были выполнены на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе IVet-5, Norma Instruments Zrt. (Венгрия).

С использованием биохимического анализатора А-25 (BioSystems, Испания) и наборов реактивов для него (Diasens, Республика Беларусь) в сыворотке крови исследованы альфа-амилаза и глюкоза.

Концентрацию ФНО-α (Fine-Test RAT Elisa Kit, Китай), содержание оксида азота и окислительную модификацию белков (Bioassay Technology laboratory, Китай) определяли методом иммуноферментного анализа.

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 [8].

Статистика

Статистическая обработка полученных в исследовании результатов производилась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics 23.0 с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых переменных нормальному распределению по тесту Колмогорова – Смирнова и критерию Шапиро – Уилка. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25; Q75). Для оценки статистической значимости различий межгрупповой анализ проводили с помощью H-критерия Краскела – Уоллиса (Kruskal – Wallis H-test) с последующими апостериорными сравнениями с использованием критерия Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $P < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были проведены экспериментальные исследования для оценки способности МСК, МВ МСК и ПОРФТ оказывать терапевтический эффект при региональном (внутрибрюшинном) применении при некротизирующем ОП у экспериментальных животных [9–11].

В сравнительном плане было изучено влияние ПОРФТ, МСК и МВ МСК при региональном (внутрибрюшинном) введении через 24 часа от начала моделирования, влияние МСК и МВ МСК при внутривенном введении через 6 и 24 часа от начала моделирования, а также сочетанное применение внутрибрюшинного введения ПОРФТ с внутривенным введением МСК и МВ МСК. Из полученных данных следует, что у животных всех групп за весь период наблюдения не отмечалось статистически значимых изменений гематологических показателей, за исключением динамики тромбоцитов и их среднего объема (MPV).

Как показано на рис. 1, на 3-и сутки в крови животных контрольной (К) группы и животных, которым лечение проводилось физиологическим раствором (O_1) и внутрибрюшинным введением ПОРФТ (O_2), количество тромбоцитов было статистически значимо меньше, чем в крови интактных животных (Mann – Whitney U Test, $P_{O_1, O_2} < 0,05$). У животных опытных групп, где для лечения применялась клеточная терапия (МСК и МВ МСК), тромбоцитопении не отмечалось – уровень содержания тромбоцитов был выше данного показателя у интактных животных (Mann – Whitney U Test, $P_{O_8} < 0,05$). При сравнительном анализе установлено, что наиболее высокое значение данного показателя отмечалось у животных, лечение которым проводилось внутрибрюшинным (O_4) и внутривенным (O_8) введением МВ МСК, без значимой статистической разницы между ними (734,5 [574,50; 843,75] и 787,0 [697,0; 855,3] $\times 10^9/\text{л}$ соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,2$).

По данным ряда авторов, при тяжелых формах острого панкреатита наблюдается тромбоцитопения с увеличением показателя среднего объема тромбоцитов [12]. На 3-и сутки после моделирования тяжелой формы ОП во всех группах отмечалось увеличение среднего объема тромбоцитов (рис. 2).

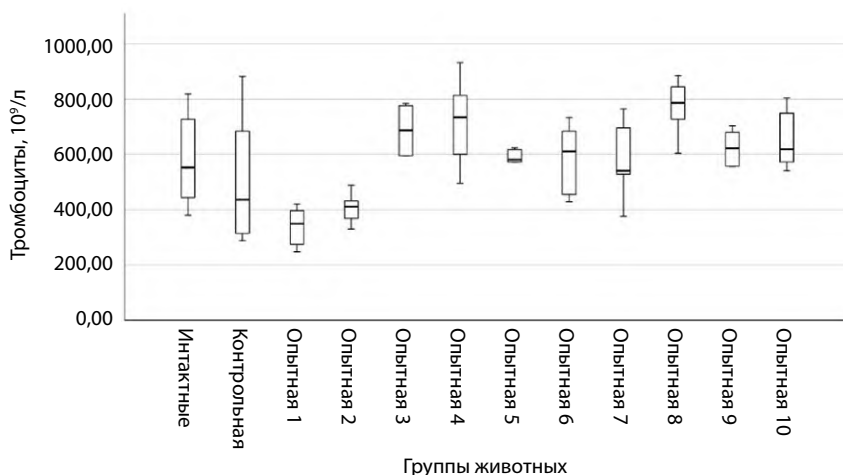


Рис. 1. Уровень тромбоцитов на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,001$.

Fig. 1. Level of platelets in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.001$.

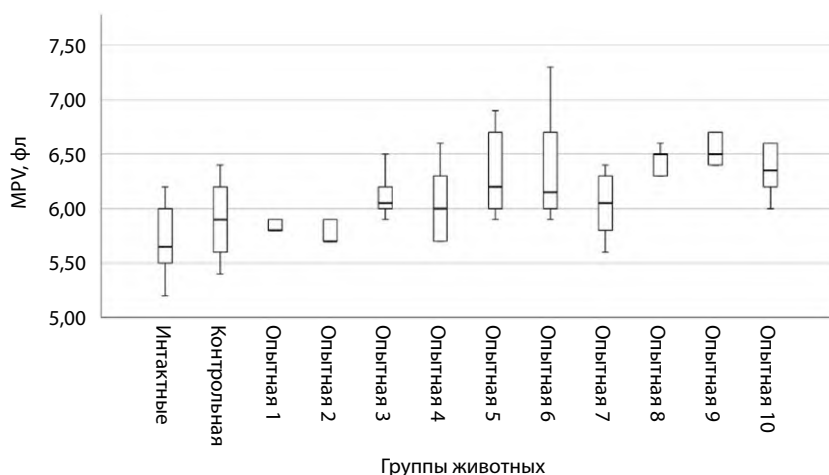


Рис. 2. Объем тромбоцитов на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,001$.

Fig. 2. Mean platelet volume level in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0,001$.

Так, в группе К наблюдалось увеличение MPV на 4,4%, в O_1 – на 2,7%, в O_2 – на 0,9%, в O_3 – на 6,2%, в O_4 – на 6,2%, в O_5 – на 9,7%, в O_6 – на 8,8%, в O_7 – на 7,1%, в O_8 – на 15%, в O_9 – на 15%, в O_{10} – на 12,4% (Mann – Whitney U Test, $PO_{5,6,8-10} < 0,05$). Как следует из полученных данных, более интенсивное повышение MPV наблюдалось у животных, которым лечение проводилось клеточной терапией (КлТ) независимо от пути и времени введения биопродуктов клеточного происхождения. Однако, как следует из рис. 1, у всех животных этих групп тромбоцитопении не было, а уровень тромбоцитов в некоторых группах был выше значений интактных животных в 1,4 раза. Таким образом, повышение уровня содержания тромбоцитов коррелировало с увеличением их среднего объема. Так, например, у животных группы O_8 , которым для лечения применялись МВ МСК внутривенно через 6 часов от начала моделирования, наиболее высокий уровень содержания тромбоцитов $787,0 [697,0; 855,3] \times 10^9/\text{л}$ сопровождался наибольшим увеличением их среднего объема (6,50 [6,18; 6,53] фл). Повышение MPV при увеличенном содержании тромбоцитов может быть обусловлено большим количеством агрегатов тромбоцитов, циркулирующих в периферической крови, которые определяются анализатором как клетки большого объема [13]. У животных групп К, O_1 и O_2 , у которых значения содержания тромбоцитов были меньше значений интактных животных $376,0 [301,5; 784,0]$, $350,0 [268,3; 403,0]$, $412,0 [359,5; 446,5]$ и $553,0 [428,25; 751,0] \times 10^9/\text{л}$ соответственно; Mann – Whitney U Test, $PK_{2,O_1} < 0,05$, также наблюдалось повышение MPV, хотя оно не было таким интенсивным. Известно, что чем больше выраженность тромбоцитопении и увеличение среднего объема тромбоцитов, тем тяжелее течение ОП, что объясняется наличием коагулопатии потребления [12, 14]. Количественный анализ тромбоцитов и MPV

позволяет сделать вывод о положительном влиянии МСК и в большей степени МВ МСК при внутривенном введении через 6 часов от начала моделирования на динамику данных показателей при ОНП в эксперименте.

Из рис. 3 следует, что на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в группе К (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; Mann – Whitney U Test, $P=0,047$). Применение биопродуктов клеточного происхождения вне зависимости от их вида, времени и пути введения способствовало снижению активности α -амилазы у всех животных опытных групп в сравнении с группой контроля (Mann – Whitney U Test, $P_{0,5-10}<0,05$). Однако наименьшие значения этого показателя были у животных опытных групп ($O_{6,8,10}$), которым для лечения внутривенно вводились микровезикулы МСК через 6 и 24 часа от начала моделирования ОНП, и они статистически значимо отличались от значений животных контрольной группы (Mann – Whitney U Test, $P<0,05$). При этом наименьшая активность α -амилазы (479,5 [428,0; 1167,5] ед/мл) отмечалась в группе O_6 , когда МВ МСК внутривенно вводили через 24 часа от начала эксперимента.

На 3-и сутки после моделирования ОНП у животных групп К, $O_{1,2,4,5,6,7,10}$ отмечалось повышение уровня глюкозы крови по сравнению с интактными животными (Mann – Whitney U Test, $P_{K,O_{1,2,6}}<0,05$) (рис. 4).

Применение ПОРФТ и МВ МСК не снижало уровень гликемии у опытных животных. Только в группе животных O_3 , где для лечения заболевания внутривенно

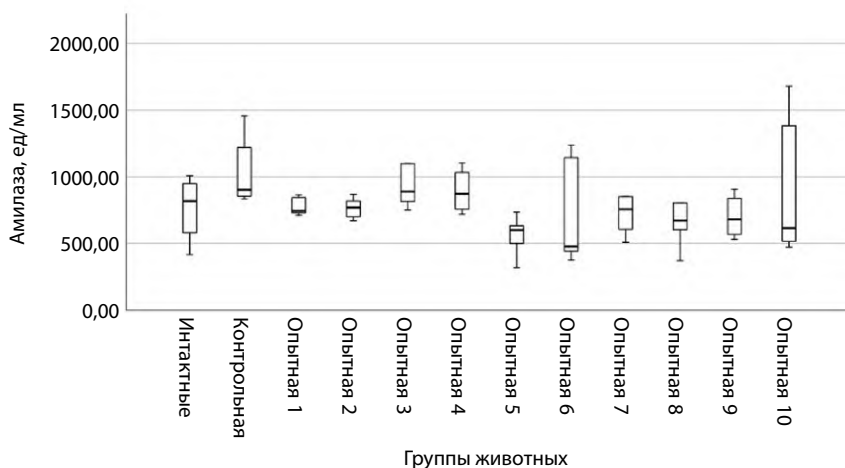


Рис. 3. Активность α -амилазы на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,05$.

Fig. 3. α -amylase activity in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.05$.

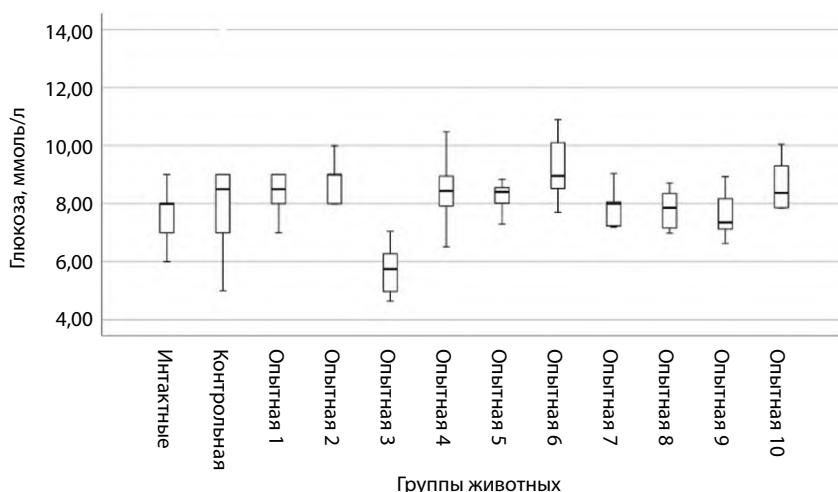


Рис. 4. Уровень глюкозы на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,01$.

Fig. 4. Glucose level in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.01$.

через 24 часа от начала моделирования вводились МСК, на 3-и сутки эксперимента уровень глюкозы был статистически значимо меньше значений данного показателя у животных группы К (5,75 [4,89; 6,47] и 9,0 [6,5; 11,5] ммоль/л соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,016$).

Внутрибрюшинное введение ПОРФТ и МВ МСК (группа O_2 и O_4) через 24 часа от начала моделирования ОНП не способствовало снижению концентрации ФНО- α , на 3-и сутки этот показатель был выше, чем у интактных животных (1,61 [1,56; 1,67], 1,53 [1,08; 1,95] и 1,45 [1,32; 1,77] пг/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P>0,05$), однако оставался меньше в сравнении с животными группы К (1,73 [1,47; 1,87] пг/мл; Mann – Whitney U Test, $P>0,05$) (рис. 5). Наиболее низкая концентрация ФНО- α отмечалась у животных группы O_3 , где для лечения ОНП внутрибрюшинно применялись МСК (1,02 [0,85; 1,24] пг/мл). На 3-и сутки эксперимента концентрация ФНО- α в этой группе была ниже, чем в группе контроля и животных опытных групп (Mann – Whitney U Test, $PK, O_{1,2,5,6,8,9}=0,01$).

При сравнении внутривенного введения КлТ для лечения ОНП в эксперименте в разные сроки от начала моделирования наиболее низкая концентрация ФНО- α отмечалась в группе O_{10} , где для лечения применялось сочетанное внутривенное введение МВ МСК через 6 часов от начала моделирования с внутрибрюшным введением ПОРФТ, показатель в этой группе (1,17 [0,87; 1,70] пг/мл) был статистически значимо ниже значений животных группы К (Mann – Whitney U Test, $P=0,01$). У животных группы O_7 внутривенное введение МСК через 6 часов от начала моделирования

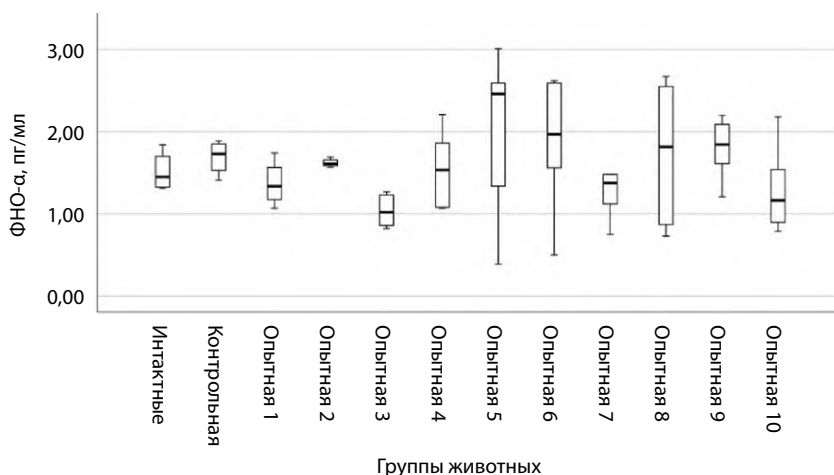


Рис. 5. Концентрация ФНО-α на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,01$.

Fig. 5. TNF-α concentration in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.01$.

также препятствовало накоплению концентрации ФНО-α и на 3-и сутки значение этого показателя не отличалось от значений интактных животных (1,38 [1,03; 1,74] и 1,45 [1,32; 1,77] пг/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P>0,05$).

Полученные нами данные согласуются с результатами других экспериментальных исследований. По данным Wang M. и соавт. (2016), при сравнительном исследовании трех различных путей доставки МСК (внутрибрюшинного, внутривенного и анального) на модели колита у мышей было показано, что внутрибрюшинная доставка обеспечивала более высокое содержание МСК в органах и более быстрое выздоровление экспериментальных животных [3]. Эффективность терапии оценивали по гистологическому индексу, общей массе тела животных и их выживаемости. Распределение и приживление МСК в органах анализировали и количественно оценивали с помощью флуоресцентной визуализации. Приводятся данные, что МСК, введенные внутрибрюшинно, образуют агрегаты с макрофагами и лимфоцитами в брюшной полости и секретируют TSG-6 (ФНО-α-индуцированный белок 6), что, скорее всего, и является основным противовоспалительным механизмом МСК. Увеличение TSG-6 выявлялось в сыворотке крови после трансплантации МСК, при этом самый высокий уровень сывороточного TSG-6 обнаруживался после внутрибрюшинного введения. МСК-опосредованная экспрессия белка TSG-6 вызывает подавление активации инфламмосомы NLRP3, активирующейся при ОП, созревание секретируемого ИЛ-1β, что вызывает ослабление воспаления. Следует отметить, что в брюшной полости содержится большое количество иммунных клеток, которые могут стать компонентами агрегатов МСК. Такая тесная межклеточная перекрестная связь между МСК



и иммунными клетками может быть еще одним фактором, способствующим улучшению терапевтического эффекта [1, 3].

С целью оценки влияния биопродуктов клеточного происхождения на показатели окислительного стресса при остром экспериментальном некротизирующем панкреатите в зависимости от получаемой терапии на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в сыворотке крови экспериментальных животных определяли уровни МДА, оксида азота и окислительной модификации белков.

Согласно полученным данным, на 3-и сутки после моделирования ОНП концентрация NO в сыворотке крови животных группы К статистически значимо превышала значения у интактных животных (29,2 [19,4; 35,5] и 16,0 [14,3; 23,5] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,004$) (рис. 6). Внутривенное применение для лечения ПОРФТ на 3-и сутки не препятствовало росту концентрации NO в сыворотке крови у животных группы O_2 до 20,1 [17,7; 25,8] мкмоль/мл. Напротив, внутрибрюшинное применение МСК и их микровезикул (группы O_3 и O_4) способствовало тому, что содержание NO в сыворотке крови животных в этих группах через 72 часа от начала эксперимента было наименьшим по сравнению с интактными животными (14,2 [11,4; 16,1], 13,9 [11,8; 15,7] и 16,0 [14,3; 23,5] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,2$) и статистически значимо было меньше показателя у животных группы К (Mann – Whitney U Test, $P=0,01$).

Как видно из рис. 6, внутривенное применение биопродуктов клеточного происхождения независимо от сроков введения препятствовало росту уровня NO в сыворотке крови животных опытных групп O_{5-10} . На 3-и сутки эксперимента уровень

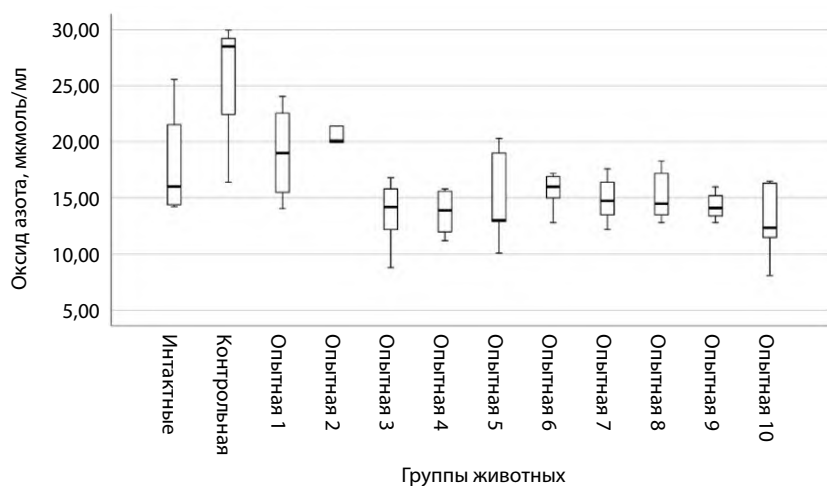


Рис. 6. Уровень оксида азота на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,01$.

Fig. 6. Nitric oxide level in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0,01$.

данного показателя у этих животных не отличался от интактных значений (Mann – Whitney U Test, $P > 0,05$), и статистически значимо был меньше в сравнении с животными группы K_2 (Mann – Whitney U Test, $P = 0,01$). Однако наименьшие значения оксида азота были у животных опытных групп O_5 (13,0 [12,2; 19,3] мкмоль/мл) и O_{10} (12,4 [10,7; 16,4] мкмоль/мл), которым для лечения внутривенно вводились МСК через 24 часа и сочетанно применялись МВ МСК и ПОРФТ через 6 часов от начала моделирования ОНП, и они статистически значимо отличались от значений контрольной группы животных (Mann – Whitney U Test, $P < 0,05$).

В последние годы внимание исследователей привлекает роль окислительной модификации белков в патогенезе острых воспалительных процессов. Показано, что окисление белков является надежным и ранним маркером окислительных повреждений. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что в условиях окислительного стресса под влиянием активных форм кислорода происходят изменения в структуре белковых молекул, нарушающие ее физико-химические и биологические свойства [15]. Измененные белковые молекулы легче подвергаются протеолизу с образованием пептидов средней молекулярной массы, которые являются одним из компонентов эндогенной интоксикации. Продукты такой модификации могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул [16]. Несмотря на наличие отдельных работ, свидетельствующих об усилении ОМБ при острых воспалительных процессах брюшной полости, ее роль в патогенезе ОНП до конца не выяснена.

Как следует из рис. 7, у животных контрольной группы К на 3-и сутки от начала моделирования ОНП отмечалось повышение уровня продуктов ОМБ по сравнению с интактными значениями (274,2 [246,5; 274,2] и 255,5 [229,3; 272,8] нмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P = 0,09$). Последнее указывает на увеличение интенсивности свободнорадикального окисления, что и привело к накоплению в сыворотке крови животных продуктов ОМБ. Внутривенное введение ПОРФТ (группа O_2) через 24 часа от начала моделирования ОНП препятствовало повышению уровня ОМБ, на 3-и сутки этот показатель не отличался от значений интактных животных (256,6 [195,1; 303,6] и 255,5 [229,3; 272,8] нмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P = 0,87$). В сравнении с животными контрольной группы на 3-и сутки эксперимента в группе O_3 уровень ОМБ был ниже на 21,5% (215,4 [195,6; 231,7]) нмоль/мл; $P = 0,016$), у животных группы O_4 на 34,8% (178,7 [162,3; 215,4] нмоль/мл; $P = 0,006$), у животных группы O_5 на 23,1% (210,8 [194,3; 218,3] нмоль/мл; $P = 0,016$), у животных группы O_6 на 29,7% (192,8 [164,8; 203,5] нмоль/мл; $P = 0,004$), у животных группы O_7 на 29,2% (194,2 [46,2; 202,5] нмоль/мл; $P = 0,004$), у животных группы O_8 на 61,5% (105,7 [96,5; 119,9] нмоль/мл; $P = 0,004$), у животных группы O_9 на 55,9% (120,9 [89,7; 149,7] нмоль/мл; $P = 0,004$), у животных группы O_{10} на 59,1% (112,2 [100,6; 154,6] нмоль/мл; $P = 0,004$).

Таким образом, применение биопродуктов клеточного происхождения независимо от пути введения и сроков лечения от начала моделирования ОНП препятствовало росту уровня ОМБ в сыворотке крови животных опытных групп O_{2-10} . Тем не менее при сравнении путей введения биопродуктов клеточного происхождения меньшие значения показателя ОМБ отмечены при внутривенном способе их введения (группы O_{5-10}), а при сравнении вида применяемого биопродукта клеточного происхождения лучшие результаты получены при внутривенном введении МВ МСК через 6 часов от начала моделирования ОНП (группа O_8).

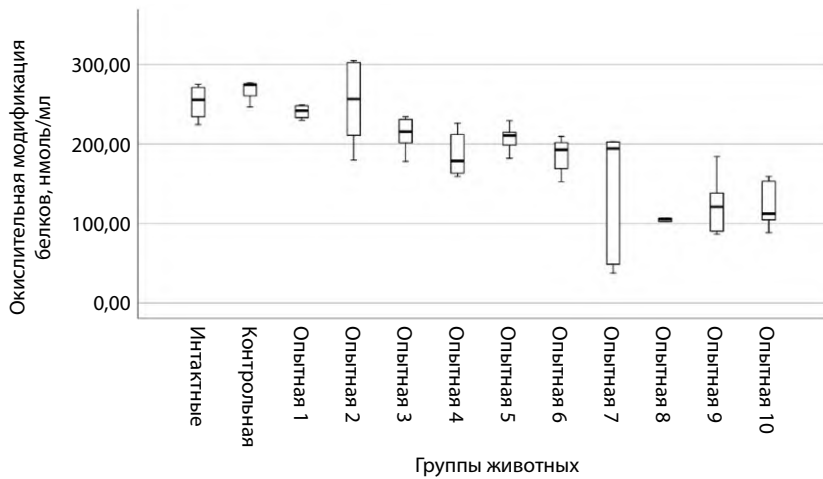


Рис. 7. Уровень окислительной модификации белков на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,001$.

Fig. 7. Level of oxidative modification of proteins in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.001$.

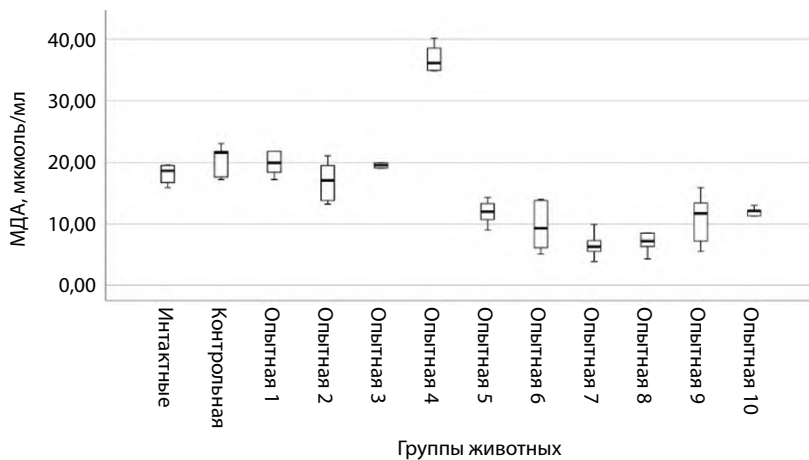


Рис. 8. Уровень малонового диальдегида на 3-и сутки от начала моделирования ОНП в крови животных в зависимости от получаемой терапии

Примечание: 6 животных в каждой группе; $P=0,001$.

Fig. 8. Malondialdehyde level in the blood of animals on the 3rd day from the start of ANP modeling depending on the therapy received

Note: 6 animals in each group; $P=0.001$.

Как показали наши исследования, содержание МДА в крови животных контрольной 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] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,109$) (рис. 8). В опытных группах животных O_2 и O_3 , где для лечения регионально применялись ПОРФТ и МСК, на 3-и сутки эксперимента значения МДА были ниже, чем у животных контрольной группы К (Mann – Whitney U Test, $P>0,05$). В группе животных O_4 региональное применение МВ МСК не препятствовало накоплению МДА, на 3-и сутки эксперимента его значения были выше, чем у животных групп К, O_2 , O_3 , и в 2 раза выше значений интактных животных (36,2 [34,98; 39,0] и 18,65 [16,50; 19,53] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U Test, $P=0,04$).

Как представлено на рис. 8, внутривенное применение биопродуктов клеточного происхождения (группы O_{5-10}) независимо от сроков использования препятствовало ПОЛ и росту уровня МДА в сыворотке крови животных. На 3-и сутки эксперимента значения данного показателя у этих животных статистически значимо были меньше, чем у животных группы К (Mann – Whitney U Test, $P<0,05$). Однако наименьшие значения уровня МДА были у животных опытных групп O_7 , (6,3 [4,7; 8,6] мкмоль/мл) и O_8 (7,2 [5,3; 11,8] мкмоль/мл), которым для лечения внутривенно вводились МСК и МВ МСК через 6 часов от начала моделирования ОНП, и они статистически значимо отличались от значений в сравниваемых группах животных (Mann – Whitney U Test, $P<0,05$).

■ ВЫВОДЫ

1. Внутривенное введение МСК и их микровезикул в ранние сроки положительно влияет на патологические изменения количества и размеров тромбоцитов в периферической крови животных при ОНП ($P<0,05$).
2. Наименьшая активность α -амилазы при ОНП в сыворотке крови экспериментальных животных наблюдается после внутривенного введения МВ МСК через 24 часа от начала эксперимента ($P<0,05$).
3. На уровень гликемии при ОНП у крыс положительно влияет только внутрибрюшинное раннее применение МСК ($P=0,016$).
4. Применение клеточной терапии в ранние сроки заболевания оказывает положительное влияние на содержание ФНО- α в сыворотке крови экспериментальных животных, причем наиболее низкая концентрация этого цитокина отмечается у животных, которым для лечения внутрибрюшинно ($P=0,01$) и внутривенно применялись МСК.
5. Раннее внутрибрюшинное и внутривенное применение МСК и МВ МСК статистически значимо ($P<0,05$) препятствует росту уровня NO и продуктов окислительной модификации белков в сыворотке крови экспериментальных животных.
6. Применение клеточной терапии при экспериментальном ОНП способствует снижению перекисного окисления липидов, наименьшие значения МДА наблюдаются после внутривенного введения МСК и МВ МСК через 6 часов от начала моделирования ОНП ($P<0,05$).



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная концепция раннего (в 1-е сутки заболевания) применения биопродуктов клеточного происхождения при экспериментальном остром некротизирующем панкреатите показала, что внутривенное использование МСК и МВ МСК оказывает системный положительный эффект у экспериментальных животных, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для патогенетического лечения данного заболевания в клинических условиях.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pak N., Murzina E., Aksenova N., Krylova T., Aleksandrov V. Effect of the delivery route and dose of multipotent mesenchymal stem cells on the efficacy of cell therapy (review). *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2024;26(2):126–134. Available at: <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2024-2-126-134>
2. García-Sánchez D., Fernández D., Rodríguez-Rey J.C., Pérez-Campo F.M. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2019;11(10):748–763. doi: 10.4252/wjsc.v11.i10.748
3. Wang M., Liang C., Hu H., Zhou L., Xu B., Wang X. et al. Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci Rep*. 2016;6(1):30696. doi: 10.1038/srep30696
4. Ramalho B.S., de Almeida F.M., Sales C.M., de Lima S., Martinez A.M.B. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. *Neural Regen Res*. 2018;13(6):1046–1053. doi: 10.4103/1673-5374.233448
5. Kudelich O., Kondratenko G., Letkovskaya T., Potapnev M., Nerovnya A., Stepuro O. Morphological Substantiation of Severe Acute Pancreatitis Model. *Surgery. Eastern Europe*. 2022;11(4):490–502. (in Russian). Available at: <https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.4.014>
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. (in Russian). Available at: <https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.1.017>
7. Yamaguchi R., Terashima H., Yoneyama S., Tadano S., Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res*. 2012;173(2):258–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.10.001>
8. Asakava T., Matsushita S. Colorus condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980;5(3):137–140.
9. Kudelich O., Kondratenko G., Potapnev M. Application of Platelet-Rich Plasma in Severe Acute Experimental Pancreatitis. *Novosti hirurgii*. 2023;31(1):5–15. (in Russian). Available at: <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2023.1.5>
10. Kudelich O., Kondratenko G., Potapnev M., Klimenkova O. Application of mesenchymal stem cells in severe acute experimental pancreatitis. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2024;16(1):74–87. Available at: <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-1-74-87>
11. Kudelich O., Kondratenko G., Potapnev M., Klimenkova O., Goncharova N. 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. Available at: <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2024-16-3-313-327>
12. Yilmaz N., Ozkan O.V., Buyukbas S., et al. Mean platelet volume in patients with acute pancreatitis. *J Clin Exp Invest*. 2011;2:362–365. Available at: <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2011.04.0072>
13. Shlyahova M., Maryko V., Kazakov V. Features of changes in platelet growth of hematopoiesis in severe acute pancreatitis. *Journal of New Medical Technologies, eEdition*. 2019;6:75–79. (in Russian). Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-izmeneniya-trombotsitarnogo-rostka-krovetvorenija-pri-tyazhelom-ostrom-pankreatite> (accessed 06.11.2024).
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):243–246. doi: 10.1097/MBC.0b013e32835aef51
15. Murphy M.P., Bayir H., Belousov V., et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab*. 2022;4(6):651–662. doi: 10.1038/s42255-022-00591-z
16. Piroddi M., Depunzio I., Calabrese V., et al. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino Acids*. 2007;32(4):573–592. doi: 10.1007/s00726-006-0433-8