

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ НА ПРОТИЗАПАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ

Ф.В. Гладких*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна
Державна установа “Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор’єва Національної академії медичних наук України”, Харків, Україна

*Corresponding author: fedir.hladkykh@gmail.com

Received 19 July 2021; Accepted 18 August 2021

Проблематика. Як засіб корекції ulcerогенної дії нестероїдних протизапальних засобів нашу увагу привернув кріоконсервованій екстракт плаценти людини, який володіє мультивекторним спектром біологічної активності. Відомості про його вплив на специфічну активність вказаного класу лікарських засобів (протизапальну, знеболювальну тощо) в опублікованих джерелах на сьогодні відсутні.

Мета. Охарактеризувати вплив кріоконсервованого екстракту плаценти на протизапальну активність диклофенаку натрію за їх нарізного введення на моделі гострого ексудативного запалення.

Методика реалізації. Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28-ми нелінійних лабораторних щурах-самцях. Модель гострого ексудативного запалення відтворювали субплантарним введенням у праву задню кінцівку щурів 0,1 мл 1,0 %-ного водного розчину λ -карагеніну. Кріоконсервованій екстракт плаценти вводили внутрішньом’язово у дозі 0,16 мл/кг за 60 хв до диклофенаку натрію (8 мг/кг).

Результати. Превентивне введення диклофенаку натрію спричинило антиексудативну дію вже на 30 хв після введення λ -карагеніну – протизапальна активність становила 11,0 %, що у 4,6 рази перевищує аналогічні показники в ті самі строки у щурів, яким вводили кріоекстракт плаценти. На 60 хв спостереження диклофенак натрію був зіставним за протизапальною активністю з кріоконсервованим екстрактом плаценти: 28,6 і 22,2 % відповідно, однак на 120 і 180 хв диклофенак натрію перевищував досліджуваний кріоекстракт за антифлогістичною дією в 1,6 рази в обидва строки спостереження. Протизапальна дія за комбінованого нарізного застосування кріоекстракту плаценти та диклофенаку натрію перед λ -карагеніном на 30 і 60 хв спостереження становила 12,7 і 32,3 % відповідно, що зіставно з аналогічними показниками на фоні монотерапії диклофенаком натрію. Проте на 120 хв спостереження у групі комбінованого застосування кріоекстракту плаценти та диклофенаку натрію відзначено найвиразнішу протизапальну дію серед щурів усіх досліджуваних груп – 52,6 %, що у 2,2 рази перевищувало показники групи монотерапії кріоекстракту плаценти і в 1,4 рази поступалось показникам щурів групи монотерапії диклофенаком натрію.

Висновки. Через 4 год після введення кріоекстракт плаценти чинив супресивну дію на кініни подібно до диклофенаку натрію, а в простагландиновий період карагенін-індукованого запалення на тлі комбінованого застосування досліджуваного кріоекстракту та диклофенаку натрію протизапальна активність становила 46,4 %. Це дає змогу припустити й супресивну дію на продукцію простагландинів як можливий механізм антиексудативної активності кріоконсервованого екстракту плаценти.

Ключові слова: кріоконсервованій екстракт плаценти; ексудативне запалення; нестероїдні протизапальні засоби; диклофенак натрію; карагенін.

Вступ

Сьогодні нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) широко призначають своїм пацієнтам лікарі різних спеціальностей [1, 2]. Ці препарати є найважливішим інструментом протизапальної та анагетичної терапії, що зумовлено їх комплексною дією (знеболювальна, протизапальна, жарознижувальна тощо) та пояснює перевагу цих лікарських засобів над іншими анальгетиками, такими як парацетамол та опіоїди [1, 3, 4].

Через широку затребуваність НПЗЗ стали однією з найбільших груп лікарських засобів [3]. Практично всі препарати цієї групи є безрецептурними для продажу в аптеках і належать до так званих препаратів групи ОТС (over-the-counter – “за стійкою аптеки”), що призводить до їх безконтрольного застосування та створює передумови до зростання частоти розвитку небажаних реакцій у пацієнтів [1]. Деякі дослідники вважають, що без рецепта НПЗЗ застосовуються в 7 разів частіше, ніж за призначенням лікаря [3, 5, 6].

Відомо, що основний механізм дії НПЗЗ пов'язаний із роз'єднанням циклооксигеназного (ЦОГ) шляху метаболізму арахідонової кислоти. На сьогодні відкриті й вивчені три ізоформи ЦОГ: структурна ЦОГ-1, індукована ЦОГ-2 та нещодавно виявлена ЦОГ-3. Протизапальна дія НПЗЗ залежить від пригнічення ЦОГ-2, побічні ефекти пов'язують із пригніченням активності ЦОГ-1 [2, 3].

У розвинених країнах світу саме прийом НПЗЗ є найважливішим етіологічним чинником виникнення виразки шлунка й кровотечі з органів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [1]. За даними [3–5], найбільша кількість побічних реакцій виникає на тлі прийому ацетилсаліцилової кислоти – 21,62 %, диклофенаку – 18,55 %, ібупрофену – 13,55 % та кеторолаку – 11,56 %. Варто зазначити, що НПЗЗ індукують ураження слизової оболонки (СО) ШКТ по всій його довжині [4]. Ослаблення захисних механізмів СО обумовлено переважно зниженням вмісту простагландинів через інгібування ЦОГ-1, що призводить до підвищення проникності бар'єра СО, і через порушені щільні міжклітинні контакти жовч, бактерії, поліморфноядерні нейтрофіли, запальні медіатори, гідролітичні й протеолітичні ферменти проникають у підслизовий шар, активізуючи інтраорганні запальні процеси та порушуючи передачу нервових імпульсів [3, 7–9]. Ступінь вираженості запальної реакції залежить від впливу факторів агресії. Запалення низького ступеня активності асоціюється із функціональними захворюваннями ШКТ, а запалення високого ступеня – з органічними захворюваннями ШКТ і подальшим прогресуванням фіброзу, утворенням ерозій і виразок, які ускладнюються кровотечею, перфорацією або кишковою обструкцією [4, 8, 9].

Пошук шляхів послаблення ульцерогенної дії НПЗЗ на ШКТ залишається однією з найбільш актуальних проблем медицини упродовж останніх десятиліть. Медикаментозна профілактика та лікування НПЗЗ-індукованого ураження травного тракту традиційно спрямовані на кислотосупресивну терапію (інгібітори протонної помпи, H_2 -гістаміноблокатори тощо), застосування гастроцитопротекторів (вісмуту субцитрат, сукральфат тощо) та препаратів, які відновлюють вміст простагландинів у СО (мізопропростол, ребаміпід тощо) [8–10]. Проте всі зазначені групи лікарських засобів мають власні побічні ефекти, а тому не здатні повною мірою задовольнити потреби клініцистів [1, 9].

Проведені останніми роками експериментальні дослідження, спрямовані на пошук нових підходів до послаблення ульцерогенної дії НПЗЗ на ШКТ, продемонстрували гастро-/ентеропротекторні властивості цукрознижувального лікарського засобу класу бігуанідів метформіну, антигіпертензивного препарату групи бета-блокаторів небівололу, інгібітора фосфодіестерази силденафілу, репаративів даларгіну та солкосерилу, антиоксидантів мексидолу та гіпоксену, актопротектора метапроту, біофлаванонів рутину та кверцетину, похідних амінокислот тощо [4, 9].

На особливу увагу заслуговують дані низки дослідників [4, 9–11] щодо комбінованого застосування НПЗЗ та засобів із гастро-/ентеропротекторною дією, яке здатне не тільки нівелювати їх пошкоджуючий вплив на ШКТ, а й посилювати їх класспецифічні ефекти – протизапальну та знеболювальну активність. Такі властивості було експериментально продемонстровано у кверцетину, вінборону, тіотриазоліну, капсаїцину тощо [10–12]. У роботі [13] було доведено, що на моделі карагенін-індукованого набряку протизапальний ефект диклофенаку натрію (ДН) значно посилюється місцевим пластиром, який містить капсаїцин.

Як засіб корекції ульцерогенної дії НПЗЗ нашу увагу привернув кріоконсервований екстракт плаценти (КЕП) людини, який характеризується мультивекторним спектром біологічної активності [14, 15]. У дослідженні [15] доведено, що комбіноване нарізне введення мелоксикаму та КЕП супроводжувалось зниженням співвідношення вільної та загальної кислотності на $43,0 \pm 3,0\%$ і статистично вірогідним ($p < 0,05$) зменшенням перистальтичної активності на 12,3 % відносно показників тварин, які отримували тільки мелоксикам. У попередньому дослідженні нами було виявлено здатність КЕП послаблювати гіперсекрецію шлункового соку та гіпермоторику, що виступає механізмом його гастроцитопротекторної активності [16]. Скринінгові дослідження показали наявність цитопротекторної активності КЕП у ШКТ й на моделях ульцерогенезу, індукованого іншими НПЗЗ – ацетилсаліциловою кислотою, ібупрофеном, індометацином і диклофенаком [17]. Наведені вище дані спонукали до вивчення впливу КЕП на класспецифічні фармакологічні властивості НПЗЗ, зокрема на їх протизапальну активність.

Мета нашої роботи – охарактеризувати вплив КЕП на протизапальну активність ДН за

їх нарізного введення на моделі гострого ексудативного запалення.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на базі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (далі – ІПКіК НАНУ) у відділі експериментальної кріомедицини. Робота виконана в рамках планової науково-дослідної роботи “Деструктивні та відновні процеси в тканинах *in vivo* після дії низьких температур та біологічно активних речовин” (шифр 2.2.6.113, номер державної реєстрації 0117U001049).

Експериментальні дослідження *in vivo* проведено на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200–220 г, які утримувались в умовах віварію ІПКіК НАНУ. До початку експерименту щури впродовж 14-ти діб перебували в умовах карантину (СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 “Лікарські засоби. Належна лабораторна практика”), після чого проводилась рандомізація на групи по 7 особин у кожній із подальшим утриманням в умовах стандартного водно-харчового раціону (Наказ МОЗ СРСР № 163 від 10.03.1966 р. “Про добові норми годування лабораторних тварин та продуцентів”) із вільним доступом (*ad libitum*) до води та їжі [18].

Щури були розділені на чотири групи:

I група – контрольні щури ($n = 7$);

II група – щури ($n = 7$), яким вводили КЕП (0,16 мл/кг, внутрішньом’язово (в/м));

III група – щури ($n = 7$), яким вводили ДН (8,0 мг/кг, внутрішньошлунково (в/шл));

IV група – щури ($n = 7$), яким вводили ДН (8,0 мг/кг, в/шл) та КЕП (0,16 мл/кг, в/м).

Досліджувані препарати вводили за 60 хв до введення флогогену. Тваринам контрольної групи вводили 0,9 %-ний розчин (р-н) NaCl (ПрАТ “Фармацевтична фірма «Дарниця»”, Україна). ДН (ТОВ “Фармацевтична компанія «Здоров’я»”) вводили в/шл у дозі, яка дорівнювала ED_{50} за протизапальною активністю на моделі карагенін-індукованого набряку – 8 мг/кг у вигляді емульсії, отриманої з розтертої таблетованої маси додаванням води та полісорбату Twin-80 [18–20]. Зазначена доза ДН відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями про використання ДН у хворих по 75–100 мг/добу при його тривалому застосуванні. Ця доза ДН у 1,7 разу нижча за максимальну добову дозу 150 мг [3].

Препарат КЕП “Кріоцелл-кріоекстракт плаценти” (Державне підприємство “Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини” Національної академії наук, Національної академії медичних наук та Міністерства охорони здоров’я (далі – МОЗ) України, Україна) згідно з інструкцією застосовується у пацієнтів парентерально в разовій дозі 1,8 мл [14]. Відповідно, разова доза для щурів становить: $(1,8 \text{ мл}/70 \text{ кг}) \times 6,35 = 0,16 \text{ мл}/\text{кг}$ маси тіла [21]. Перед застосуванням препарату “Кріоцелл-кріоекстракт плаценти” разову дозу (0,16 мл/кг) екстемпорально (*ex tempore* – за потребою) розводили у 0,9 %-ному р-ні NaCl із розрахунку 0,1 мл 0,9 % р-ну NaCl/100 г маси тіла та вводили в/м за 60 хв до НПЗЗ [18].

Модель гострого ексудативного запалення відтворювали субплантарним (під подошовний апоневроз) введенням у праву задню кінцівку щурів 0,1 мл 1,0 %-ного водного розчину λ -карагеніну (“Sigma”, США) [18, 19]. λ -карагенін – сульфатований полісахарид, виділений з ірландського моху *Chondrus*. За даними [22], у перші 30–90 хв у патогенезі запалення беруть участь гістамін і серотонін, в інтервалі між 1,5–2,5 годинами – кініні, а між 2,5–5,5 годинами – простагландини [18, 19]. Спектр медіаторів, які стимулюють процес ексудації за цієї моделі, дає змогу припустити механізм дії досліджуваних речовин [19].

Антиексудативну дію оцінювали за величиною набряку кінцівки, який визначали онкометрично через 0,5, 1, 2 та 3 год після введення флогогену за допомогою водного плетизмометра [19].

Розвиток запальної реакції оцінювали за динамікою об’єму кінцівки (у мілілітрах), яку визначали за допомогою електронних ваг (Radwag WLC 0.2/C/1, Польща) та ємкості з рідиною (рис. 1). Об’єм кінцівки визначали за об’ємом рідини, яку виміщувала кінцівка при зануренні [23].

Враховуючи, що за температури 14–17 °C щільність води становить 0,998–0,999 г/мл, об’ємні показники зануреної кінцівки тварини умовно прирівнювали до значення маси води, що виміщувалась: 1 г = 1 мл.

Протизапальну активність (ПЗА, %) у динаміці карагенін-індукованого набряку кінцівок у щурів розраховували за формулою:

$$\text{ПЗА} = \Delta V_n \text{ дослідної групи} - \Delta V_n \text{ контрольної групи},$$

де ΔV_n – приріст об'єму ушкодженої кінцівки щурів у термін спостереження n відносно вихідних показників, %.



Рисунок 1: Визначення об'єму кінцівки у щурів: 1 – електронні ваги, 2 – ємкість із водою

Методи статистичної обробки. Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Office Excel 2003; 2013 (Microsoft Corporation, США) за допомогою розширення “Real Statistics” (<http://www.real-statistics.com/>) у середовищі Windows 10 (Microsoft Corporation, США). Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W -критерію Шапіро–Вілка (*Shapiro–Wilk test*, $n < 50$). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (*Levene's test*). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз із використанням параметричних або непараметричних критеріїв.

За нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t -критерієм Ст'юдента. Зіставлення показників однієї групи при повторюваних вимірюваннях за різних умов експерименту проводили за непараметричним T -критерієм Вілкоксона (*Wilcoxon T test*). Отримані значення порівнювали з критичними за рівня вірогідності вище 95,0 % ($p \leq 0,05$), вище 99,0 % ($p \leq 0,01$), вище 99,5 % ($p \leq 0,005$) і вище 99,9 % ($p \leq 0,001$) та робили висновок про ймовірність похибки. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді “ $M \pm m$ ” ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного –

M (95 % ДІ: 5–95 %), де 95 % ДІ – 95 %-ний довірчий інтервал (Confidence interval – CI) [18].

Біоетичні аспекти дослідження. Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог належної лабораторної практики (GLP – Good Laboratory Practice), відображених у настанові “Лікарські засоби. Належна лабораторна практика”, затвердженій наказом МОЗ України № 95 від 16 лютого 2009 р., і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу МОЗ України від 14 грудня 2009 р. № 944 “Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів”, Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [18].

Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при ІПКіК НАНУ (витяг з Протоколу № 2 від 11 березня 2020 р.).

Результати

Проведене дослідження показало, що субплантарне введення λ -карагеніну призводить до статистично вірогідного ($p = 0,018$) збільшення об'єму ушкодженої кінцівки вже через 30 хв на $29,2 \pm 3,3$ % відносно вихідних показників, що становить, відповідно, $2,04 \pm 0,06$ мл (таблиця). Запальний процес у стопі щурів супроводжувався характерним збільшенням її об'єму, яке зберігалось в щурів контрольної групи впродовж усього терміну дослідження з максимальною виразністю на 120–180 хв після введення флогогену, що узгоджувалось із даними літератури [19, 24]. Відомо, що через 3 год після введення починається поступова регресія запальної відповіді, тому спостереження проводили впродовж саме перших трьох годин [19].

Так, дослідження показало, що на 120 хв після введення λ -карагеніну в щурів контрольної групи об'єм кінцівки статистично вірогідно ($p < 0,05$) перевищував вихідні показники на $75,0 \pm 6,4$ %, а на 180 хв – на $62,0 \pm 4,2$ % ($p < 0,05$) (рис. 2).

Таблиця: Вплив кріоконсервованого екстракту плаценти і диклофенаку натрію на динаміку карагенін-індукованого набряку кінцівки в щурів ($M \pm m$ (95 % ДІ), $n = 28$)

Умови експерименту	n	Вихідні показники (фон)	Строк дослідження							
			30 хв		60 хв		120 хв		180 хв	
			Об'єм кінцівки, мл	ПЗА, %	Об'єм кінцівки, мл	ПЗА, %	Об'єм кінцівки, мл	ПЗА, %	Об'єм кінцівки, мл	ПЗА, %
Контрольна група	7	$1,59 \pm 0,05$ (95 % ДІ: 1,49–1,69)	$2,04 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,93–2,15) §	–	$2,29 \pm 0,03$ (95 % ДІ: 2,22–2,35) §	–	$2,57 \pm 0,04$ (95 % ДІ: 2,49–2,65) §	–	$2,56 \pm 0,04$ (95 % ДІ: 2,48–2,63) §	–
КЕП	7	$1,56 \pm 0,04$ (95 % ДІ: 1,47–1,64)	$1,97 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,85–2,09) §	2,4	$2,17 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 2,06–2,28) * §	22,2	$2,19 \pm 0,07$ (95 % ДІ: 2,05–2,32) * §	23,4	$2,17 \pm 0,05$ (95 % ДІ: 2,07–2,27) *	22,3
ДН	7	$1,57 \pm 0,05$ (95 % ДІ: 1,47–1,67)	$1,84 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,72–1,97) §	11,0	$2,10 \pm 0,08$ (95 % ДІ: 1,95–2,25) * §	28,6	$2,10 \pm 0,08$ (95 % ДІ: 1,95–2,25) * # §	38,3	$1,97 \pm 0,07$ (95 % ДІ: 1,83–2,11) * #	36,4
ДН + КЕП	7	$1,57 \pm 0,05$ (95 % ДІ: 1,47–1,67)	$1,83 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,71–1,95) §	12,7	$2,04 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,93–2,15) * §	32,3	$2,04 \pm 0,06$ (95 % ДІ: 1,93–2,15) * # ° §	52,6	$1,81 \pm 0,07$ (95 % ДІ: 1,68–1,95) § * #	46,4

Примітки. КЕП – кріоконсервований екстракт плаценти; ДН – диклофенак натрію; ПЗА – протизапальна активність; * – $p < 0,05$ відносно показників тварин контрольної групи; # – $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували КЕП; ° – $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували ДН; § – $p < 0,05$ відносно вихідних (фон) показників (T -критерій Вілкоксона).

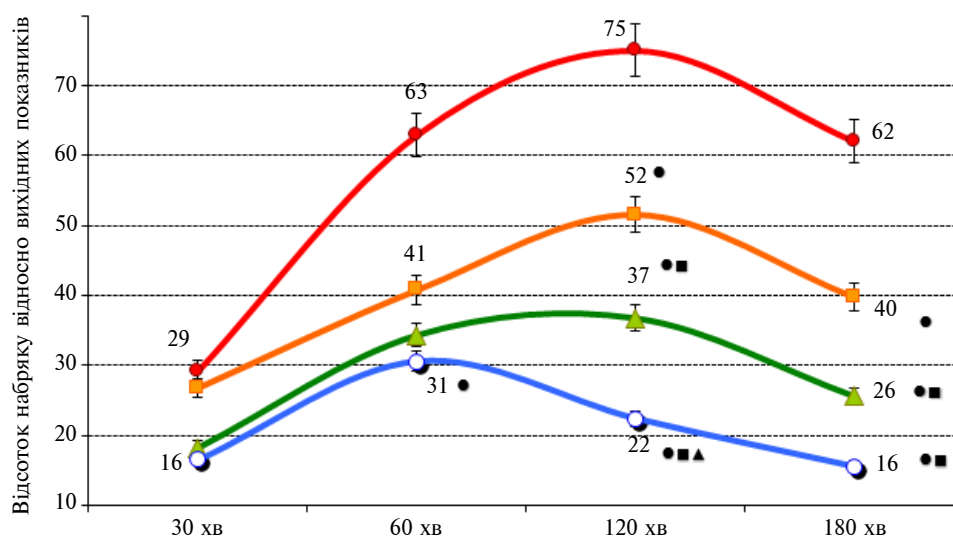


Рисунок 2: Вплив кріоконсервованого екстракту плаценти (КЕП) і диклофенаку натрію (ДН) на динаміку карагенін-індукованого набряку кінцівки у щурів, %: ● – $p \leq 0,05$ відносно показників тварин контрольної групи; ■ – $p \leq 0,05$ відносно показників щурів, які отримували КЕП; ▲ – $p \leq 0,05$ відносно показників щурів, які отримували ДН; ● – контрольна група, ■ – КЕП, ▲ – ДН, ● – ДН + КЕП

Превентивне введення КЕП за 60 хв до λ -карагеніну практично не чинило антиексудативної дії на 30 хв спостереження: об'єм кінцівки у вказані строки був практично зівставним із показниками щурів контрольної групи (рис. 2). Так, збільшення об'єму кінцівки у щурів, яким вводили КЕП та λ -карагенін на 30 хв, становило $26,8 \pm 3,2$ % відносно вихідних показників (див. таблицю). Проте в подальшому в щурів тієї ж групи відзначались розбіжності у дина-

міці запального процесу порівняно зі щурами контрольної групи.

Так, на 60 хв у щурів, яким вводили КЕП і λ -карагенін, об'єм кінцівки статистично вірогідно ($p < 0,05$) зріс на $40,7 \pm 4,7$ %, на 120 хв – на $51,5 \pm 1,7$ % відносно вихідних показників, а на 180 хв протизапальна активність КЕП становила 22,3 %.

Превентивне введення ДН у дозі 8 мг/кг спричиняло антиексудативну дію вже на 30 хв

після введення λ -карагеніну: протизапальна активність становила 11,0 %, що в 4,6 разу перевищувало аналогічні показники в ті самі строки у шурів, яким вводили КЕП. На 60 хв спостереження ДН був зіставним із КЕП за ПЗА, яка становила відповідно 28,6 та 22,2 %, однак на 120 і 180 хв ДН перевищував КЕП за ПЗА у 1,6 разу в обидва строки спостереження.

Комбіноване нарізне введення КЕН та ДН перед λ -карагеніном на 30 і 60 хв спостереження практично не відрізнялось за величиною ПЗА від групи монотерапії ДН та становило відповідно 12,7 і 32,3 % (див. рис. 2). Проте на 120 хв спостереження у групі комбінованого застосування КЕП і ДН відзначалася найвиразніша ПЗА серед шурів усіх досліджуваних груп – 52,6 %, що у 2,2 разу перевищувало показники групи монотерапії КЕП і в 1,4 разу поступалось показникам шурів групи монотерапії ДН.

На 180 хв спостереження у шурів, яким вводили ДН і КЕП, ПЗА становила 46,4 %, а об'єм ушкодженої кінцівки ($1,81 \pm 0,07$ мл) був практично зіставним із вихідними показниками до введення λ -карагеніну ($1,57 \pm 0,05$ мл).

Обговорення

Найбільшою цінністю моделі карагенін-індукованого гострого ексудативного запалення є змога припустити механізм дії речовин, ПЗА яких досліджується, оскільки в різні часові проміжки в процесі запалення провідну роль відіграють різні медіатори запалення [22].

Виявлена відсутність ПЗА КЕП на 30 хв спостереження пов'язана, на нашу думку, із коротким проміжком часу від його застосування, оскільки, за даними [14], досліджуваний кріоекстракт характеризується ранозагоювальною активністю, а наші власні попередні дослідження показали, що КЕП чинить виразну антиальтеративну дію на моделі оцтово-декстранових виразок у шурів при його введенні за 5 днів до моделювання запально-дегенеративного процесу (2 ін'єкції з інтервалом 3 дні). Зважаючи, що репаративні процеси тісно пов'язані з процесами альтерації, яка є компонентом, спільно з ексудацією та проліферацією, процесу запалення, можна припустити, що за інших умов експерименту (тривалішого профілактичного введення КЕП) указаний екстракт чинив би інший вплив на перебіг карагенін-індукованого запалення. Зазначені умови варто розцінювати як обмеження вказаного дослідження через його дизайн.

Комбіноване застосування ДН і КЕП мало зіставну з монотерапією ДН ПЗА – 32,3 та 28,6 % відповідно. Проте застосування тільки КЕП значно поступалось за вказаною активністю – ПЗА становила 22,2 %. Це дає змогу припустити, що КЕП має менший вплив на продукування гістаміну та серотоніну у вогнищі запалення, а при комбінованому застосуванні ДН та КЕП вплив на вказані медіатори запалення чинить переважно досліджуваний НПЗЗ.

Особливу увагу привертає динаміка запального процесу на 120–180 хв дослідження (пік запального процесу). Встановлено, що на 120 хв спостереження превентивне застосування тільки КЕП проявляло ПЗА на рівні 22,3 %, що в 1,6 разу поступалось за вказаною активністю ДН. У той же час на тлі комбінованого застосування ДН і КЕП ПЗА становила 52,6 %. Це дає змогу припустити, що через 4 год після введення (за 60 хв до ДН і, відповідно, за 120 хв до λ -карагеніну) КЕП чинить супресивну дію на кініні, оскільки саме вони виступають провідними медіаторами запалення в проміжку 1,5–2,5 год після введення флогогену [24].

У простагландиновий період (2,5–5,5 год) карагенін-індукованого запалення відзначено аналогічні розбіжності: на тлі комбінованого застосування КЕП і ДН спостерігалася найвиразніша з-поміж досліджуваних груп ПЗА, яка становила 46,4 %, що дає змогу припустити ще й супресивну дію КЕП, як і ДН, на продукцію простагландинів.

Отримані дані узгоджуються та доповнюють дані М.В. Грищенко зі співавт. про механізми протизапальної дії КЕП [25]. Так, механізм протизапального впливу КЕП, вочевидь, пов'язаний із дією гормонів, що містяться в ньому, – прогестерону, естрадіолу, пролактину, гонадотропіну та ін. Вони можуть впливати на “клітини запалення” (лейкоцити, тканинні макрофаги, фібробласти, тучні клітини, ендотеліоцити), кістковий мозок, мікроциркуляцію як безпосередньо (через специфічні рецептори), так і опосередковано через медіатори й відповідні для них рецептори. В обох випадках цей вплив опосередковується змінами концентрацій внутрішньоклітинних циклічних нуклеотидів, ферментних систем, іонів, функціонування йонних транспортних систем тощо. Так, естрогени збільшують кількість моноцитів у крові та їх продукцію в кістковому мозку, проліферацію макрофагів та їх функціональну активність. Естрадіол гальмує синтез макрофагами макрокортину,

який пригнічує утворення прозапальних медіаторів з арахідонової кислоти (аналогічно до НПЗЗ) та ейкозаноїдів, що діють головним чином за рахунок лейкоцитарної інфільтрації. Крім того, гормони є індукторами біосинтезу низки ферментних білків, які своєю чергою мають істотне значення для саморегуляції лейкоцитарної інфільтрації при запаленні [25]. Фібробласти мають рецептори для естрогенів і реагують на дію гормонів підвищенням синтезу білків. Крім того, статеві гормони, зокрема естрогени, стимулюють проліферацію фібробластів. Одночасно статеві гормони через вазоактивні медіатори і модулятори запалення регулюють мікроциркуляцію та підвищують судинну проникність, що є сприятливою умовою для лейкоцитарної інфільтрації вогнища запалення [25]. Крім того, КЕП властивий виразний антиоксидантний ефект, і його протизапальну дію можна пов'язати з усуненням прозапальної модуляції реакцій системи крові активними формами кисню та продуктами перекисного окиснення ліпідів унаслідок стимуляції фізіологічної антиоксидантної системи [14, 25].

Отже, КП модулює перебіг запалення, що, як відомо, є поєднанням реакцій системи крові, мікроциркуляторного русла та сполучної тканини [25].

Висновки

Субплантарне введення λ -карагеніну призводить до статистично вірогідного ($p = 0,018$) збільшення об'єму ушкодженої кінцівки вже через 30 хв на $29,2 \pm 3,3$ % відносно вихідних показників, що зберігалось у щурів контрольної групи впродовж усього терміну дослідження з максимальною виразністю на 120–180 хв після введення флогогену.

Превентивне введення ДН чинило антиексудативну дію вже на 30 хв після введення λ -карагеніну: протизапальна активність становила 11,0 %, що в 4,6 рази перевищує аналогічні показники в ті самі терміни у щурів, яким вводили КЕП. На 60 хв спостереження ПЗА ДК і досліджуваного кріоекстракту була зіставною: відповідно 28,6% та 22,2%.

References

- [1] Zhuravlyova LV, Oliynyk MO. NSAID induced gastropathy in the practice of a family doctor. *Modern Gastroenterol.* 2018;3(101):48-53. DOI: 10.30978/MG-2018-3-48
- [2] Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2012;11(1):52-64. DOI: 10.2174/187152312803476255

Через 4 год після введення кріоекстракт плаценти чинив супресивну дію на кініни подібно до ДН, а в простагландиновий період карагенін-індукованого запалення на тлі комбінованого застосування досліджуваного кріоекстракту та ДН протизапальна активність становила 46,4 %. Це дає змогу припустити й супресивну дію на продукцію простагландинів як можливий механізм антиексудативної дії КЕП.

Комбіноване застосування ДЕ та КЕП показало підвищення протизапального ефекту за рахунок інгібування циклооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти досліджуваним кріоекстрактом. Це вказує на доцільність подальших досліджень комбінованого застосування НПЗЗ і КЕП з метою зниження побічних ефектів нестероїдних антифлогістиків, зокрема їх ульцерогенності, та посилення їх терапевтичної активності.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР ІПКіК НАН України “Деструктивні та відновні процеси в тканинах *in vivo* після дії низьких температур та біологічно активних речовин” (шифр 2.2.6.113, номер державної реєстрації 0117U001049).

Подяки

Автор висловлює подяку науковим співробітникам ІПКіК НАН України за допомогу в проведенні експериментальних досліджень:

М.О. Чижу – в.о. завідувача відділу експериментальної кріомедицини (к.м.н., старший дослідник, ORCID: 0000-0003-0085-296X);

І.В. Белочкіній – с.н.с. відділу експериментальної кріомедицини (к.б.н., с.н.с., ORCID: 0000-0003-0090-2971);

А.О. Манченко – в.о. м.н.с. відділу експериментальної кріомедицини (к.м.н., ORCID: 0000-0001-5982-4504);

І.П. Михайловіч – н.с. відділу експериментальної кріомедицини;

І.В. Слеті – с.н.с. відділу експериментальної кріомедицини (к.б.н.).

- [3] Karateev AE, Nasonov EL, Ivashkin VT, Martynov AI, Yakhno NN, Arutyunov GP, et al. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clinical recommendations. *Rheumatol Sci Pract.* 2018;56:1-29. DOI: 10.14412/1995-4484-2018-1-29
- [4] Hladkykh FV. Preventive and treatment strategies for pharmacocorrection of gastropathy induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther.* 2017;4:14-23. DOI: 10.17816/RCF15414-23
- [5] Chorbinskaya SA, Kudryavtseva NA, Stepanova II, Baryshnikova GA, Alexandrova EB. NSAID-induced gastrointestinal complications. New opportunities of gastrointestinal protection. *Kremlin Med J.* 2019;4:98-104. DOI: 10.26269/brbt-1q23
- [6] Bhatt DL, Scheiman J, Abraham NS, Antman EM, Chan FK, Furberg CD, et al. ACCF/ACG/AHA 2008 Expert Consensus Document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use. *Circulation.* 2008;118(8):1894-909. DOI: 10.1161/circulationaha.108.191087
- [7] Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020;180:114-47. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147
- [8] Bondarenko OO, Agibalov OM. The drug-induced injury of the upper gastrointestinal tract: prophylaxis and treatment. *Modern Gastroenterol.* 2019;2(106):55-65. DOI: 10.30978/MG-2019-2-55
- [9] Hladkykh FV, Chyzh MO. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a modern understanding of the mechanisms of damage to the digestive tract, the shortcomings of pathogenetic drugs and prospects for biological therapy of NSAID-induced esophagogastroenterocolonopathy. *Gastroenterology.* 2020;54(4):253-66. DOI: 10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714
- [10] Karateev AE. Modification of traditional NSAIDs as a method to increase their safety and ease of use. *Rus Med J.* 2015;7:392-6.
- [11] Hladkykh FV, Stepaniuk NH. Characteristics of anti-inflammatory and analgesic activity of ibuprofen and its combination with vinboron in a model of adjuvant arthritis in rats. *Visnyk Naukovykh Doslidzhen.* 2015;2(79):108-11. DOI: 10.11603/2415-8798.2015.2.5617
- [12] Hladkykh FV, Stepaniuk NG. Description of the therapeutic effect of ibuprofen and its combination with vinboron according to hematological parameters in the model of adjuvant arthritis in rats. *Lviv Med J.* 2015;4:64-70.
- [13] Ercan N, Uludag MO, Agis ER, D-Yilmaz E. The anti-inflammatory effect of diclofenac is considerably augmented by topical capsaicinoids-containing patch in carrageenin-induced paw oedema of rat. *Inflammopharmacology.* 2013;21(6):413-9. DOI: 10.1007/s10787-013-0175-7
- [14] Goltsev AN, editor. Placenta: cryopreservation, clinical use. Kharkiv; 2013. 268 p.
- [15] Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International.* 2018;2018:1-14. DOI: 10.1155/2018/4837930
- [16] Hladkykh FV, Chyzh MO. Modulation of meloxicam-induced changes in gastrointestinal and motor activity of the stomach by applying placenta cryoextract. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2021;64(1):84-94. DOI: 10.25040/ntsh2021.01.08
- [17] Hladkykh FV, Chyzh MO. Modes of administration and antiulcer activity of cryopreserved placenta extract in gastropathies induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: *Proceedings of the 45th Annual Conference of Young Scientists Cold in Biology and Medicine: Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology – 2021; 2021; Kharkiv.* Kharkiv: Institute of Cryobiology Problems of the National Academy of Sciences of Ukraine; 2021. p. 26.
- [18] Stefanov OJ, editor. Preclinical studies of drugs. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
- [19] Drogovoz SM, Belyk GV, Demyanenko DV, Kudina OV, Mohammad RD. Screening pharmacological studies of liquefied gas extracts in linden blossoms. *Pharmaceut J.* 2012;5:94-100.
- [20] Sigidin YA, Schwartz GYa, Arzamastsev AP, Lieberman SS, editors. Drug therapy of the inflammatory process: experimental and clinical pharmacology of anti-inflammatory drugs. Moscow: Medicine; 1988. 240 p.
- [21] Rybolovlev YuR, Rybolovlev RS. Dosage of substances for mammals by constants of biological activity. *Reports of the USSR Academy of Sciences.* 1979;247(6):1513-6.
- [22] Di Rosa M, Sorrentino L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Europ J Pharmacol.* 1968;4:340-3.
- [23] Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicolog Methods.* 2000;43(1):11-4. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00089-7
- [24] Korang LA, Derymedvid LV. Anti-exudative properties of liquid alcohol-water extract of sweet flag leaves (*Acorus Calamus L.*). *Pharmacol Drug Toxicol.* 2019;13(4):263-9. DOI: 10.33250/13.04.263
- [25] Gryshchenko NG, Klimenko NA, Gorgol NI, Tatarko SV. Effect of placental cryoextract on chronic inflammation of the ovaries in mice. *Medicine Today and Tomorrow.* 2010;2-3:7-17.

Ф.В. Гладких

Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, Харьков, Украина
Государственное учреждение "Институт медицинской радиологии и онкологии имени С.П. Григорьева Национальной академии медицинских наук Украины", Харьков, Украина

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ НА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ

Проблематика. В качестве средства коррекции ulcerогенного действия нестероидных противовоспалительных средств наше внимание привлек криоконсервированный экстракт плаценты человека, обладающий мультивекторным спектром биологической активности. Сведения о его влиянии на специфическую активность указанного класса лекарственных средств (противовоспалительную, обезболивающую и др.) в опубликованных источниках на сегодняшний день отсутствуют.

Цель. Охарактеризовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты на противовоспалительную активность диклофенака натрия при их раздельном введении на модели острого экссудативного воспаления.

Методика реализации. Экспериментальные исследования *in vivo* проведены на 28-ми нелинейных лабораторных крысах-самцах. Модель острого экссудативного воспаления воспроизводили субплантарным введением в правую заднюю конечность крыс 0,1 мл 1,0 %-ного водного раствора λ -карагенина. Криоконсервированный экстракт плаценты вводили внутримышечно в дозе 0,16 мл/кг за 60 мин до диклофенака натрия (8 мг/кг).

Результаты. Превентивное введение диклофенака натрия вызывало антиэкссудативное действие уже на 30 мин после введения λ -карагенина – его противовоспалительная активность составляла 11,0 %, что в 4,6 раза превышало аналогичные показатели в те же сроки у крыс, которым вводили криоэкстракт плаценты. На 60 мин наблюдения диклофенак натрия был сопоставим по противовоспалительной активности с криоконсервированным экстрактом плаценты: 28,6 и 22,2 % соответственно, однако на 120 и 180 мин диклофенак натрия превышал исследуемый криоэкстракт по антифлогистическому действию в 1,6 раза в оба срока наблюдения. Противовоспалительное действие при комбинированном раздельном введении криоэкстракта плаценты и диклофенака натрия перед λ -карагенином на 30 и 60 мин составило 12,7 и 32,3 % соответственно, что сопоставимо с аналогичными показателями на фоне монотерапии диклофенаком натрия. Однако на 120 мин наблюдения в группе комбинированного применения криоэкстракта плаценты и диклофенака натрия отмечено наибольшее противовоспалительное действие среди крыс всех исследуемых групп – 52,6 %, что в 2,2 раза превышало показатели группы монотерапии криоэкстрактом плаценты и в 1,4 раза уступало показателям крыс группы монотерапии диклофенаком натрия.

Выводы. Через 4 ч после введения криоэкстракта плаценты оказывал супрессивное действие на кинины подобно диклофенаку натрия, а в простагландиновый период карагенин-индуцированного воспаления на фоне комбинированного применения изучаемого криоэкстракта и диклофенака натрия противовоспалительная активность составляла 46,4 %. Это позволяет предположить и супрессивное действие на продукцию простагландинов как возможный механизм антиэкссудативной активности криоконсервированного экстракта плаценты.

Ключевые слова: криоконсервированный экстракт плаценты; экссудативное воспаление; нестероидные противовоспалительные средства; диклофенак натрия; карагенин.

F.V. Hladkykh

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
State Organization "Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT EFFECT ON THE SODIUM DICLOFENAC ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Background. As a means of correcting the ulcerogenic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, our attention was attracted by a cryopreserved extract of the human placenta, which has a multivector spectrum of biological activity. To date, there is no information about its effect on the specific activity of this class of medicines (anti-inflammatory, analgesic, etc.) in published sources.

Objective. We are aimed to characterize the effect of cryopreserved placenta extract on the anti-inflammatory activity of diclofenac sodium when administered separately in a model of acute exudative inflammation.

Methods. Experimental studies *in vivo* were conducted on 28 nonlinear male laboratory rats. The model of acute exudative inflammation was reproduced by subplantar injection of 0.1 ml of 1.0% aqueous solution of λ -karagenin into the right hind limb of rats. Cryopreserved placenta extract was administered intramuscularly at a dose of 0.16 ml/kg 60 minutes before diclofenac sodium (8 mg/kg).

Results. Preventive administration of diclofenac sodium caused an antiexudative effect as early as 30 minutes after administration of λ -karagenin – its anti-inflammatory activity was 11.0%, which is 4.6 times higher than similar indicators at the same time in rats injected with placental cryoextract. At 60 minutes of observation, diclofenac sodium was comparable in anti-inflammatory activity with cryopreserved placenta extract: 28.6% and 22.2%, respectively, but at 120 and 180 minutes, diclofenac sodium exceeded the studied cryoextract in antiphlogistic effect by 1.6 times in both periods of observation. The anti-inflammatory effect of the combined separate administration of placenta cryoextract and diclofenac sodium before λ -karagenin for 30 and 60 minutes was 12.7% and 32.3%, respectively, which is comparable with analogous indicators against the background of diclofenac sodium monotherapy. However, at 120 minutes of observation, the group of combined use of placenta cryoextract and diclofenac sodium showed the greatest anti-inflammatory effect among rats of all the studied groups – 52.6%, which was 2.2 times higher than the indicators of the placenta cryoextract monotherapy group and 1.4 times lower than the indicators of the rats of the diclofenac sodium monotherapy group.

Conclusions. 4 hours after administration, placental cryoextract had a suppressive effect on kinins like diclofenac sodium, and in the prostaglandin period of caragenin-induced inflammation against the background of combined use of the studied cryoextract and diclofenac sodium, the anti-inflammatory activity was 46.4%. This suggests a suppressive effect on the production of prostaglandins as a possible mechanism of anti-exudative action of cryopreserved placenta extract.

Keywords: cryopreserved placenta extract; exudative inflammation; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; diclofenac sodium; carrageenan.