

УДК 615.361:615.451.1:618.46+615.276

Ф. В. Гладких

Протизапальні властивості диклофенаку натрію на тлі комбінованого застосування з кріоконсервованим екстрактом плаценти в експерименті

UDC 615.361:615.451.1:618.46+615.276

F. V. Hladkykh

Anti-Inflammatory Properties of Diclofenac Sodium on Background of Its Combined Use With Cryopreserved Placenta Extract in Experiment

Ключові слова: кріоконсервованний екстракт плаценти, нестероїдні протизапальні засоби, диклофенак натрію, протизапальна дія.
Key words: cryopreserved placenta extract, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac sodium, anti-inflammatory action.

Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) належать до найбільш уживаних препаратів з доведеною клінічною ефективністю в лікуванні системних запальних захворювань, у тому числі аутоімунної природи [1, 7]. Проте всі НПЗЗ володіють передбачуваними побічними ефектами, зокрема, ульцерогенним, тому пошук шляхів їх корекції досі залишається актуальною проблемою медицини [9, 10]. У якості засобу корекції ульцерогенної дії НПЗЗ нами був обраний кріоконсервованний екстракт плаценти (КЕП) [2, 8].

У попередніх експериментальних дослідженнях встановлено, що застосування КЕП приводить до зниження ульцерогенного впливу НПЗЗ на шлунок. Противиразкову активність при профілактичному застосуванні КЕП було встановлено на моделі диклофенак натрій (ДН)-індукованої гастропатії (92,1%), що обумовило вивчення впливу КЕП на специфічну активність НПЗЗ, зокрема на їх протизапальну дію [1]. В результаті скринінгових експериментальних досліджень встановлено, що при комбінованому застосуванні НПЗЗ та КЕП їх знеболювальна активність не знижується.

Мета роботи – оцінити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти на протизапальну активність диклофенаку натрію при їх комбінованому застосуванні на моделі експериментального ревматоїдного артрити у щурів.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among those, which are most commonly used to prove clinical efficiency in treatment of systemic inflammatory diseases, including the ones autoimmune origin [1, 3]. However, all NSAIDs have predictable side effects, in particular, ulcerogenic, so the search for ways of their mitigation has still remained an urgent task in medicine [7, 8]. Cryopreserved placenta extract (CPE) was chosen by us as a means of correcting the ulcerogenic action of NSAIDs [2, 5].

Previous experimental studies have shown that the use of CPE reduces the ulcerogenic effect of NSAIDs on stomach. Antiulcer activity in prophylactic use of CPE was observed in the model of diclofenac sodium (DS)-induced gastropathy (92.1%), that stipulated the investigation of CPE effect on the specific activity of NSAIDs, in particular on their anti-inflammatory effect [3]. Experimental screening has established if the NSAIDs and CPE were used in combination, their analgesic activity did not reduce.

The aim of this study was to evaluate the effect of cryopreserved placenta extract on anti-inflammatory activity of diclofenac sodium when used in combination in a model of experimental rheumatoid arthritis in rats.

The study was performed in compliance with the main provisions of the 'European Convention for the

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Адреса для кореспонденції:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: fedir.hladkykh@gmail.com

Address for correspondence:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Надійшла 08.06.2021

Прийнята до друку 19.10.2021

Received 08, June, 2021

Accepted 19, October, 2021

© 2021 F. V. Hladkykh. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Дослідження виконано з дотриманням основних положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006). Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Протокол № 2 від 11.03.2020).

Для відтворення умов введення шурам НПЗЗ, що відповідають їх клінічному застосуванню, нами було обрано модель експериментального ревматоїдного артриту (РА) – ад'ювантний артрит (АА), який має всі морфофункціональні ознаки РА та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. Ад'ювантний артрит моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда («Thermo Fisher Scientific», США) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [6]. Добу введення ад'юванту вважали нульовою («0») добою експерименту. Експерименти проводили на 28 нелінійних білих щурах-самцях масою 200–220 г, розділених на 4 групи по 7 тварин у кожній: 1 – інтактна; 2 (контроль) – щури з АА без лікування; 3 – щури з АА, ліковані ДН («Червона зірка», «Здоров'я», Україна) (8,0 мг/кг); 4 – щури з АА, ліковані ДН (8,0 мг/кг) та КЕП (0,16 мл/кг маси тіла, внутрішньом'язово), які утримувались в умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Лікування АА проводилося з 14 по 28 добу експерименту.

Препарат КЕП «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» (ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини» НАН, НАМН та МОЗ України, Україна) згідно з інструкцією застосовується пацієнтам парентерально в разовій дозі 1,8 мл. Відповідно разову дозу для щурів перераховували за формулою: $(1,8 \text{ мл} / 70 \text{ кг}) \times 6,35 = 0,16 \text{ мл/кг маси тіла}$ [2, 4, 8]. Перед застосуванням разову дозу КЕП (0,16 мл/кг) екстемпорально розводили у 0,9 %-му розчині NaCl із розрахунку 0,1 мл 0,9 %-го розчину NaCl / 100 г маси тіла та вводили внутрішньом'язово за 60 хв до ДН [6] (10) на 14, 17, 20, 23 та 26-у добу (усього 5 ін'єкцій), що відповідає інструкції до клінічного застосування препарату – внутрішньом'язово по 1,8 мл з інтервалом 2–3 доби, курсом 1–5 ін'єкцій.

Диклофенак натрію вводили внутрішньошлунково в дозі, яка дорівнювала ЕД₅₀ за протизапальною активністю – (8 мг/кг), у вигляді емульсії на полісорбаті Tween-80 («Sigma Aldrich», США) [5]. Зазначена доза відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями щодо тривалого застосування ДН

Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986) and the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of 21.02.2006). The comprehensive research program was considered and approved by the Committee in Bioethics at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Protocol № 2 of March 11, 2020).

To reproduce the conditions of administration of NSAIDs to rats, corresponding to their clinical application, we chose a model of experimental rheumatoid arthritis (RA), namely adjuvant arthritis (AA), which has all the morpho-functional features of RA and is accompanied by a typical reaction, the main link of which is T-cell immunity. Adjuvant arthritis was modeled by subplantation of complete Freund's adjuvant (Thermo Fisher Scientific, USA) into the posterior right limb at a rate of 0.1 ml per rat [10]. The day of adjuvant administration was considered as the «0» day of the experiment. The experiments were performed in 28 nonlinear white male rats weighing 200–220 g, divided into 4 groups of 7 animals each: 1 – intact; 2 (control) – rats with AA without treatment; 3 – rats with AA treated with DS (Red Star Chemical Plant, Zdorovya, Ukraine) (8.0 mg/kg); 4 – AA rats treated with DS (8.0 mg/kg) and CPE (0.16 ml/kg body mass, intramuscularly), which were maintained at the animals' house of the IPC&C NAS of Ukraine. AA was treated from 14 to 28 days of the experiment.

The drug CPE 'Cryocell-cryoextract of the placenta' (Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS, NAMS and the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine) according to the instructions is used in patients parenterally in a single dose of 1.8 ml. Accordingly, a single dose for rats was counted by the formula: $(1.8 \text{ ml} / 70 \text{ kg}) \times 6.35 = 0.16 \text{ ml/kg body weight}$ [2, 5, 6]. Before use, a single dose of CPE (0.16 ml/kg) was extemporaneously diluted in 0.9% NaCl solution at the rate of 0.1 ml of 0.9% NaCl solution / 100 g body weight and administered intramuscularly 60 min before DS [10] for 14, 17, 20, 23 and 26 days (total 5 injections), which corresponded to the instructions for clinical use of the drug, *i. e.* intramuscularly 1.8 ml with an interval of 2–3 days at a rate of 1–5 injections.

DS was administered intragastrically at a dose equal to the ED₅₀ for anti-inflammatory activity – (8 mg/kg) as an emulsion on Twin-80 polysorbate (Sigma Aldrich, USA) [9]. This dose corresponds to a single human dose of 88 mg (1.25 mg/kg), which is consistent with clinical recommendations for its long-term use (75–100 mg/day) in patients, and 1.7 times lower than the maximum daily dose (150 mg), that excess can cause damage to the digestive tract [1, 3, 4].



Вплив КЕП та ДН на величину об'єму (мл) кінцівки у щурів з АА в динаміці ($M \pm m$, (довірчий інтервал, 95 %))
 Effect of CPE and DS on amount of limb volume (ml) in rats with AA in dynamics ($M \pm m$, (confidence interval, 95%))

Строк дослідження Duration of study	Група 1 Group 1	Група 2 Group 2	Група 3 Group 3	Група 4 Group 4
	Інтактні щури Intact rats	Контроль (АА без лікування) Control (AA without treatment)	АА + ДН AA + DS	АА + ДН + КЕП AA + DS + CEP
«0» доба «0» day	1,53 ± 0,06 (1,41 – 1,65)	1,59 ± 0,06 (1,48 – 1,68)	1,54 ± 0,07 (1,40 – 1,68)	1,59 ± 0,06 (1,46 – 1,71)
14 доба 14 day	1,56 ± 0,04 (1,47 – 1,64)	3,21 ± 0,07 (3,08 – 3,35) *°	3,17 ± 0,07 (3,04 – 3,30) **&	3,16 ± 0,14 (2,89 – 3,42) **&
28 доба 28 day	1,59 ± 0,03 (1,52 – 1,65)°	2,99 ± 0,07 (2,84 – 3,13) **§	2,10 ± 0,20 (1,70 – 2,50) **§	1,81 ± 0,05 (1,72 – 1,90) **§

Примітки: * – відмінності значущі відносно показників інтактних щурів (група 1), $p < 0,05$; # – відмінності значущі відносно показників щурів контрольної групи (група 2), $p < 0,05$; & – відмінності значущі відносно вихідних показників «0» доби, $p < 0,05$; § – відмінності значущі відносно показників на 14-у добу експерименту, $p < 0,05$.

Notes: * – significant differences in relative of indices of intact rats (group 1), $p < 0.05$; # – significant differences in relative of the control group indices (group 2), $p < 0.05$; & – significant differences in relative to baseline '0' day, $p < 0.05$; § – significant differences in relative of indices on day 14 of experiment, $p < 0.05$.

(75–100 мг/добу) у хворих, та у 1,7 рази нижче за його максимальну добову дозу (150 мг), перевищення якої може викликати ушкодження травного тракту [1, 3, 7].

Вираженість запальної реакції оцінювали за динамікою об'єму кінцівки, який визначали за допомогою електронних ваг WLC 0.2/C/1 («Radwag», Польща) та посудини з рідиною. Об'єм кінцівки визначали за об'ємом рідини, яку після занурення витискувала кінцівка [6]. Антиексудативний ефект (АЕ) розраховували за формулою:

$$AE = ((V_k - V_d) / V_k) \times 100 \%,$$

де V_k , V_d – об'єм кінцівки щурів контрольної та дослідної групи відповідно, мл.

Розподіл величин у кожній групі вибіркової сукупності визначали за W-критерієм Шапіро-Вілка, омонорідність дисперсій – за критерієм Левена, відмінності між групами – попарно за t-критерієм Ст'юдента [6]. Цифрові дані наведено у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка середнього арифметичного.

Результати експерименту показали, що на 14-у добу у щурів з АА в середньому у 2 рази ($p < 0,05$) збільшувався об'єм ушкодженої кінцівки відносно вихідних показників, що узгоджується з даними літератури про пік запальної реакції експериментального РА у щурів (таблиця) [6].

На 28-у добу після проведення монотерапії ДН у щурів з АА зменшувався об'єм ушкодженої кінцівки на 33,8 % відносно показників 14 доби, що на 36,1 % перевищувало вихідні показники («0» доба експерименту). Отримані нами результати щодо вираженості протизапальної активності ДН узгоджуються з даними О.В. Стефанова [6].

Severity of the inflammatory reaction was assessed by limb volume dynamics (in ml), which was determined using WLC 0.2/C/1 electronic scales (Radwag, Poland) and a fluid container. Limb volume was determined by the volume of fluid displaced by the limb during immersion [10]. Antiexudative effect (AE) was calculated by the formula:

$$AE = ((V_k - V_d) / V_k) \times 100\%,$$

where: V_k , V_d – limb volume in rats of the control and experimental groups accordingly.

The distribution of values in each group of the sample was performed using the W-test Shapiro-Wilk test, homogeneity of dispersions – by Leven's test, differences between groups in pairs – by Student's t-test [10]. Numerical data are given as $M \pm m$, where M is the arithmetic mean, m is the standard error of the arithmetic mean.

Research results showed that on day 14 in rats with AA there was a nearly two-fold increase ($p < 0.05$) in the volume of the damaged limb relative to baseline, which was consistent with the published reports on the peak of the inflammatory reaction of experimental RA in rats (Table) [10].

On day 28 of DS monotherapy of AA rats a damaged limb volume reduced by 33.8%, relatively to the indices of day 14, which was 36.1% higher than baseline («0» days of the experiment). The obtained data on the severity of anti-inflammatory activity of DS are consistent with the O.V. Stefanov data [10].

The combined use of DS and CPE mostly affected the volume of damaged limb in rats with AA. Thus, on day 28 of the experiment this index decreased by 42.5% compared to day 14, which was just by 14.4% higher than the initial values.



Комбіноване застосування ДН та КЕП найбільш впливало на об'єм ушкодженої кінцівки шурів з АА. Так, на 28 добу експерименту даний показник зменшувався на 42,5% відносно 14 доби, що лише на 14,4 % перевищувало вихідні значення.

Таким чином, у шурів з ад'ювантним артритом ступінь зменшення об'єму ушкодженої кінцівки після комбінованого застосування диклофенаку натрію та кріоконсервованого екстракту плаценти на 8,7% перевищує даний показник ушкодженої кінцівки на тлі монотерапії диклофенаком натрію. Цей факт підтверджує, що комбіноване лікування диклофенаком натрію та кріоконсервованим екстрактом плаценти має більш виражену протизапальну активність, ніж монотерапія диклофенаком натрію.

Література

1. Гладких ФВ, Чиж НА, Манченко АА, и др. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на отдельные биохимические показатели лечебной эффективности и токсичности диклофенака натрия при адьювант-индуцированном артрите в эксперименте. Фармация и фармакология. 2021;9(4):278–93.
2. Гольцев АН, Юрченко ТН. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков; 2013. 317 с.
3. Каратеев АЕ, Насонов ЕЛ, Ивашкин ВТ, и др. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации. Научно-практическая ревматология. 2018; 56: 1–29.
4. Рыболовлев ЮР, Рыболовлев РС. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. 1979; 247(6): 1513–6.
5. Сигидин ЯА, Шварц ГЯ, Арзамасцев АП, Либерман СС, редакторы. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов: монография. Москва: Медицина; 1988. 240 с.
6. Стефанов ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 527 с.
7. Bielsa-Fernandez MV, Tamayo-de la Cuestab JL, Lizarraga-Lopez J, et al. The Mexican consensus on the diagnosis, treatment, and prevention of NSAID-induced gastropathy and enteropathy. *Revista de Gastroenterología de Mexico*. 2020; 85(2): 190–206.
8. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. 2018: Jan 18 [cited 2021 Sept 05]; 2018: 4837930. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930/>
9. Shih AR, Misdrari J. Drug-induced pathology of the upper gastrointestinal tract. *Diagnostic Histopathology*. 2017; 23(2): 84–95.
10. Shin SJ, Noh CK, Lim SG, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Intestinal Research*. 2017; 15(4): 446–55.

Thus, in rats with adjuvant arthritis, the degree of reduction in the volume of the damaged limb after the combined use of diclofenac sodium and cryopreserved placenta extract is 8.7% higher than the degree of reduction in the volume of the damaged limb on diclofenac sodium monotherapy. This fact evidences that the combined treatment using diclofenac sodium and cryopreserved placental extract has more pronounced anti-inflammatory activity if compared with diclofenac sodium monotherapy.

References

1. Bielsa-Fernandez MV, Tamayo-de la Cuestab JL, Lizarraga-Lopez J, et al. The Mexican consensus on the diagnosis, treatment, and prevention of NSAID-induced gastropathy and enteropathy. *Revista de Gastroenterología de Mexico*. 2020; 85(2): 190–206.
2. Goltsev AN, Yurchenko TM. [Placenta: cryopreservation, clinical use]. Kharkiv; 2013. 268 p. Russian.
3. Hladkykh FV, Chyzh MO, Manchenko AO, et al. [Effect of cryopreserved placenta extract on some biochemical indices of therapeutic efficiency and toxicity of diclofenac sodium in adjuvant-induced experimental arthritis]. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021; 9(4):278–93. Russian.
4. Karateev AE, Nasonov EL, Ivashkin VT, et al. [Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clinical recommendations]. *Scientific and practical rheumatology*. 2018; 56: 1–29. Russian.
5. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. 2018: Jan 18 [cited 2021 Sept 05] 2018: 4837930. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930/>.
6. 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. Russian.
7. Shih AR, Misdrari J. Drug-induced pathology of the upper gastrointestinal tract. *Diagnostic Histopathology*. 2017; 23(2): 84–95.
8. Shin SJ, Noh CK, Lim SG, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Intestinal Research*. 2017; 15(4): 446–55.
9. Sigidin YA, Schwartz GYA, Arzamastsev AP, Lieberman SS, editors. [Drug therapy of the inflammatory process: experimental and clinical pharmacology of anti-inflammatory drugs: a monograph]. Moscow: Medicine; 1988. 240 p. Russian.
10. Stefanov OJ, editor. [Preclinical studies of drugs: guidelines]. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p. Ukrainian.

