

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНІЗМІВ ЦИТОПРОТЕКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ ЗА ДАНИМИ МОРФОЛОГІЧНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

^{1,2}Гладких Ф.В. <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

³Вернигородський С.В. <https://orcid.org/0000-0002-9314-8527>

¹Чижев М.О. <https://orcid.org/0000-0003-0085-296X>

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», Харків, Україна

³Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

fedir.hladkykh@gmail.com

Актуальність. Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) застосовуються у якості жарознижуючих та знеболюючих препаратів. При цьому НПЗЗ мають побічну дію – ульцерогенну. Тому актуальним є пошук засобів корекції ульцерогенної дії НПЗЗ. Потенціальна антиульцерогенна дія може бути у кріоконсервованого екстракту плаценти людини «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти».

Ціль: дослідити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти (КЕП) на морфологічний стан шлунка та процеси синтезу білка у слизовій оболонці шлунка при введенні НПЗЗ диклофенаку натрію щурам з експериментальним ревматоїдним артритом.

Матеріали та методи. Дослідження проведене на 28 нелінійних щурах-самцях масою 200-220 г. Тварин поділили на 4 групи: I (n=7) – інтактні щури; II (n=7) – щури з ад'ювантним артритом (АА), це контроль без лікування; III (n=7) – щури з АА, ліковані диклофенаком натрію (ДН), 8,0 мг/кг, внутрішньошлунково (в/шл); IV (n=7) – щури з АА, ліковані ДН, 8,0 мг/кг, в/шл та КЕП, 0,16 мл/кг маси тіла, внутрішньом'язово (в/м). АА моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура. День введення ад'юванту вважали як «0» добу експерименту. Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. ДН застосовували щоденно, а КЕП – з інтервалом 3 дні: на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. На 28 добу тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під інгаляційним наркозом.

Для оцінки морфологічних змін фрагменти шлунка фіксували в 10,0 % розчині нейтрального формаліну. Гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, а також реактивом Шиффа (фуксинсірчана кислота) з йодною кислотою. Концентрацію загального білка (ЗБ) визначали спектрофотометрично за світлопоглинанням при довжині хвилі 546 нм. Вміст РНК та ДНК у гомогенатах слизової оболонки шлунка визначали спектрофотометрично за реакції з хлорною кислотою.

Результати. У щурів з АА слизова оболонка (СО) мала збережену структуру у всіх тварин. Ознак гіпер- чи гіпосекреції муцинів при забарвленні ШИК-реакцією з альціановим синім не виявлено. Відмічались вогнища десквамації поверхневого епітелію та поодинокі лімфоцити. Введення ДН щурам з АА призвело до ознак ерозивних змін СО. У 28,6 % щурів виявлені глибокі ерозії та поодинокі виразкові дефекти, які за глибиною ураження сягали м'язової пластинки. Наявна незначна кількість мукополісахаридів з переважанням кислих глікопротеїнів. Знижений вміст нейтральних глікопротеїнів. Виявлені поодинокі десквамовані епітеліоцити. У підслизовому прошарку СО відмічена вогнищева лімфо-плазмоситарна інфільтрація ексудатом з еозинофіліїними лейкоцитами. На тлі комбінованого застосування ДН та КЕП у щурів з АА у жодної тварини не виявлено значних порушень гістоархітекtonіки СОШ, окрім поодиноких вогнищ десквамації поверхневого епітелію.

В гомогенатах СОШ у щурів з АА відмічалось зниження ($p < 0,01$) рівня ЗБ на 14,1 % та зниження ($p < 0,05$) вмісту РНК та ДНК на 27,5 % та 14,3 %, відповідно, відносно показників інтактних тварин.

На тлі монотерапії ДН відмічено ще більше зниження ($p < 0,001$) рівня ЗБ: на 26,2 % ($40,3 \pm 1,43$ мг/мг) щодо показників інтактних тварин ($54,6 \pm 1,39$ мг/мг). А вміст РНК та ДНК становив $0,59 \pm 0,57$ мг/мл та $2,21 \pm 0,27$ мг/мл, відповідно.

На тлі комбінованого застосування ДН та КЕП відмічено співставні з рівнем інтактних тварин показники ЗБ та ДНК. Так, рівень ЗБ становив $53,0 \pm 2,09$ мг/мг, що лише на 2,9 % було нижче за показники інтактних тварин ($54,6 \pm 1,39$ мг/мг), а вміст ДНК на 5,1 % ($p = 0,3$) був нижчим за показники інтактних тварин ($3,1 \pm 0,12$ мг/мл) та становив відповідно $2,94 \pm 0,08$ Рівень РНК ($1,72 \pm 0,12$ мг/мл) на 17,6 % перевищував ($p = 0,1$) показники інтактних тварин ($1,46 \pm 0,08$ мг/мл).

Висновки. Комбіноване застосування кріоекстракту плаценти та диклофенаку натрію призводить до нівелювання негативного впливу останнього на білковий обмін в слизовій оболонці шлунка щурів з ад'ювантним артритом. Так, рівень загального білка становив $53,0 \pm 2,09$ мг/мг, що лише на 2,9 % нижче за показники інтактних тварин. Відновлення порушеної диклофенаком натрію секреції муцинів покривно-ямковим епітелієм слизової оболонки шлунка виступає одним з механізмів цитопротективної активності кріоконсервованого екстракту плаценти при експериментальному ульцерогенезі.

Ключові слова: нестероїдні протизапальні засоби, диклофенак натрію, кріоекстракт плаценти

Актуальність. Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) широко застосовуються при різних патологічних станах, нерідко безконтрольно, в якості жарознижуючих та знеболюючих препаратів, а переважну більшість з них можна придбати без рецепту, що

обумовлює розповсюдженість небажаних лікарських реакцій на тлі їх застосування [1, 2].

В літературі висвітлено дані про побічні ефекти НПЗЗ, насамперед щодо токсичного впливу препаратів цієї групи на шлунково-кишковий тракт (ШКТ) –

ульцерогенна дію. У 30-40% хворих, які отримують НПЗЗ, відзначаються диспептичні розлади, у 10-20% – ерозії та виразки шлунка та дванадцятипалої кишки, у 2-5% – кровотечі та перфорації [2, 3].

НПЗЗ-асоційована гастропатія лише частково пов'язана із локальним ушкоджуючим впливом НПЗЗ на слизову оболонку шлунка (СОШ) та в основному обумовлена системним інгібуванням ізоферменту циклооксигенази першого типу (ЦОГ-1) [2, 4, 5].

У якості засобу корекції ульцерогенної дії НПЗЗ нашу увагу привернув кріоконсервованій екстракт плаценти (КЕП) людини. Перші повідомлення про противиражкову активність екстракту плаценти датуються 1969 р. Це встановили у щурів на моделі виразки шлунка, індукованої субсерозним введенням оцтової кислоти. Екстракт плаценти впливає на органи-мішені, стимулюючи їх функціонування, та підвищує неспецифічну резистентність організму до несприятливих факторів зовнішнього середовища та стресових чинників, стимулює репаративні властивості клітин при пошкодженнях та захворюваннях різного генезу [6].

Ціль: охарактеризувати вплив кріоконсервованого екстракту плаценти на морфологічний стан шлунка та процеси синтезу білка у слизовій оболонці шлунка при введенні диклофенаку натрію щурам з експериментальним ревматоїдним артритом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на 28 нелінійних щурах-самцях масою 200-220 г. Піддослідних тварин було поділено на 4 групи: I (n=7) – інтактні щури; II (n=7) – щури з ад'ювантним артритом (АА), це контроль без лікування; III (n=7) – щури з АА, ліковані диклофенаком натрію (ДН), 8,0 мг/кг, внутрішньошлунково (в/шл); IV (n=7) – щури з АА, ліковані ДН, 8,0 мг/кг, в/шл та КЕП, 0,16 мл/кг маси тіла, внутрішньом'язово (в/м).

АА моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура. День введення ад'юванту вважали як «0» добу експерименту. Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. ДН застосовували щоденно, а КЕП – з інтервалом 3 дні: на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. На 28 добу тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під інгаляційним наркозом.

КЕП було отримано у Державному підприємстві «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Національної академії медичних наук та Міністерства охорони здоров'я України» у вигляді ампульованого препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти», який згідно інструкції застосовується у пацієнтів парентерально в разовій дозі 1,8 мл.

Для оцінки морфологічних змін фрагменти шлунка фіксували в 10,0 % розчині нейтрального формаліну. Гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксилином та еозином, а також реактивом Шиффа

(фуксинсірчана кислота) з йодною кислотою (H₅IO₆) – ШИК-реакція (PAS-reaction – Periodic Acid Schiff reaction) з альціановим синім [7]. ШИК-реакція дозволяє виявити наявність нейтральних глікопротеїнів, полісахаридів, деяких мукополісахаридів та гліколіпідів, забарвлюючи їх у рожевий колір. В той же час альціановий синій забарвлює кислі мукополісахариди та кислий слиз у синій колір. Таким чином забарвлення ШИК-реакцією з альціановим синім забезпечує одночасну ідентифікацію нейтральних та кислих мукополісахаридів секрету слизової оболонки (СО).

Вміст загального білка (ЗБ) визначали спектрофотометричним методом за біуретовою реакцією, яка полягає в тому, що в лужному середовищі йони двоцвалентного купруму (CuSO₄) взаємодіють із білками з утворенням комплексу фіолетового кольору. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda = 546$ нм. Дослідження проводили із використанням наборів для біохімічних досліджень «Загальний білок» (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна). Вміст загального білка у гомогенаті СОШ виражали у мкг/мг тканини.

Вміст РНК та ДНК у СОШ визначали спектрофотометрично за методикою Спірина А. С. [8], яка ґрунтується на реакції з хлорною кислотою, та виражали в мкг/мл.

Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка (Shapiro-Wilk test). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (Levene's test). Відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Цифрові данні наведені у вигляді "M±m", де M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка середнього арифметичного.

Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог належної лабораторної практики «GLP» (Good Laboratory Practice), відображених в настанові «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженій Законом України 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». Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при ІПКіК НАН України (витяг з Протоколу № 2 від 11 березня 2020 р.).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Патоморфологічне дослідження шлунка інтактних щурів показало, що СО залозистої частини мала звичайну структуру. СО фундального, кардіального та пілоричного відділів була вкрита одношаровим циліндричним епітелієм з ШИК-забарвленим секретом в апікальному відділі клітин. У власній пластинці СО розташовувались власні залози шлунка, які відокремлювались одна від одної тонкими прошарками пухкої сполучної тканини (рис. 1). ШИК-позитивні епітеліоцити переважали в ділянці ямок й меншою мірою знаходились в ділянці валиків СОШ. Шийкові мукоцити однорідно забарвлювались гематоксиліном та еозином у світло-рожевий колір цитоплазми та мали сплющене базofilне ядро. Позитивна ШИК-реакція в ділянці шийки залоз вказувала на наявність значної кількості муцинів, які, як відомо, забезпечують захисну роль тканин шлунка від дії НСL та пепсину [9, 10].

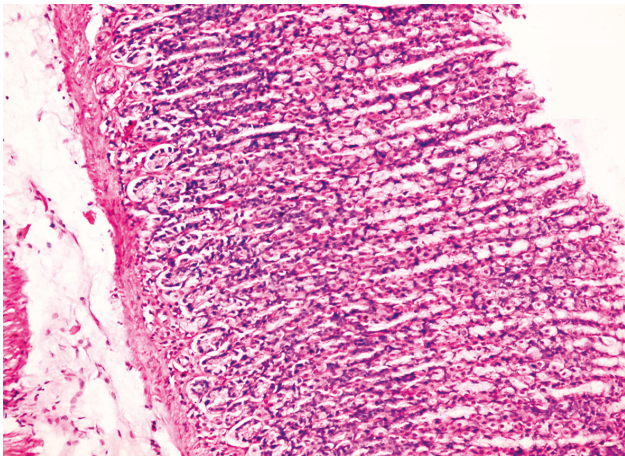


Рис. 1. Незмінена гістологічна структура слизової оболонки шлунка щура. Група I (інтактні щури), 28 день. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

Пристінкові клітини розташовувались у ділянці шийки залоз, мали оксифільне забарвлення гематоксиліном та еозином. У дні ямок СО переважали головні та паріетальні екзокриноцити, окремі з них містили кислі глікопротеїни, ідентифіковані при забарвленні альціановим синім. Головні екзокриноцити мали циліндричну або пірамідальну форму, цитоплазма в основі клітин мала переважно базofilне забарвлення гематоксиліном та еозином. Під поверхневим епітелієм чітко визначалась м'язова пластинка СО, до якої щільно прилягали судини міроциркуляторного русла у підслизовому прошарку з глибше розташованими м'язовою та серозною оболонками шлунка [10].

У щурів з АА на 28 добу експерименту СО мала збережену структуру у всіх тварин. Ознак гіпер- чи гіпосекреції муцинів при забарвленні ШИК-реакцією з альціановим синім не виявлено. Відмічались вогнища десквамації поверхневого епітелію та поодинокі лімфоцити (рис. 2).

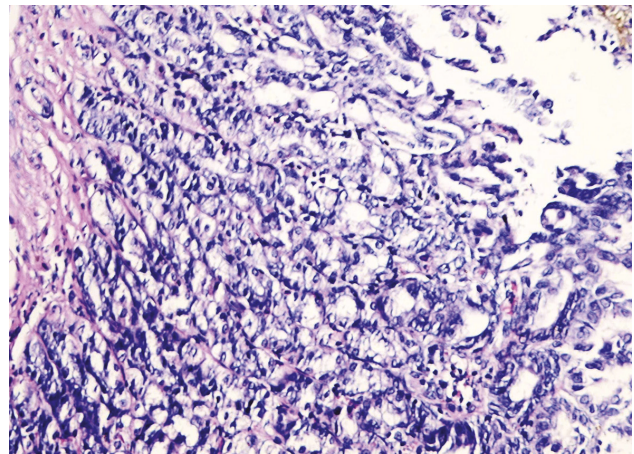


Рис. 2. Гістологічна структура слизової оболонки шлунка щура з десквамованим епітелієм. Група II (ад'ювантний артрит без лікування), 28 день. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

Введення ДН впродовж 14 днів щурам з АА призвело до ознак ерозивних змін СО. Варто відзначити, що дослідження показало відсутність запальної інфільтрації по периферії ерозивних дефектів, що може виступати патогномонічною патоморфологічною ознакою ДН-індукованого ушкодження СО. У 28,6 % щурів виявлені глибокі ерозії та поодинокі виразкові дефекти, які за глибиною ураження сягали власної м'язової пластинки (рис. 3). Виразки мали клиноподібну форму з гострим кінцем, спрямованим до м'язової оболонки. Краї виразки були представлені ділянками фібриноїдного некрозу з шаром грануляційної тканини.

Забарвлення альціановим синім показало наявність незначної кількості мукополісахаридів з переважанням кислих глікопротеїнів. Оцінка кількості ШИК-позитивних клітин виявила значне їх зменшення в популяції шийкових мукоцитів, порівняно з інтактними тваринами, що вказує на зниження вмісту нейтральних глікопротеїнів. Як поверхнево, так і в глибині ямок виявлені поодинокі десквамовані епітеліоцити.

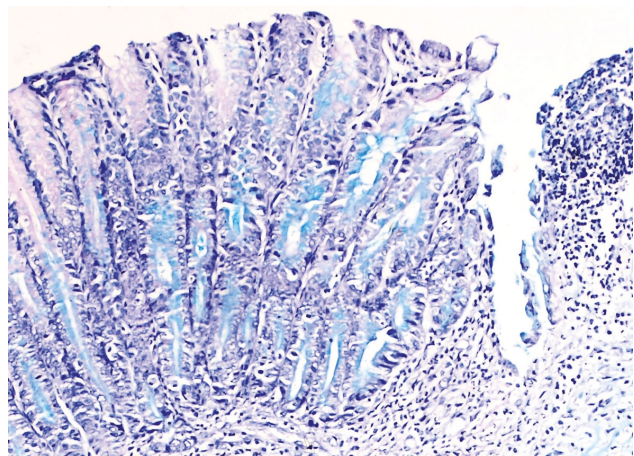


Рис. 3. Гостра виразка слизової оболонки шлунка щура з клітинним детритом. Група III (ад'ювантний артрит + диклофенак натрію), 28 день. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

Забарвлення ШИК-реакцією продемонструвало глибину ушкодження поверхневих епітеліоцитів до рівня базальної мембрани. У підслизовому прошарку СО відмічена вогнищева лімфо-плазмоцитарна інфільтрація ексудатом з еозинофільними лейкоцитами, що узгоджувалось із виявленим повнокрів'ям судин гемомікроциркуляторного руслу.

На тлі комбінованого застосування ДН та КЕП у щурів з АА на 28 добу експерименту у жодній тварині не виявлено значних порушень гістоархітекtonіки СОШ, окрім поодиноких вогнищ десквамації поверхневого епітелію. Особливу увагу привертає виявлена при забарвленні ШИК-реакцією з альціановим синім виразна секреція нейтральних глікопротеїнів (рис. 4).

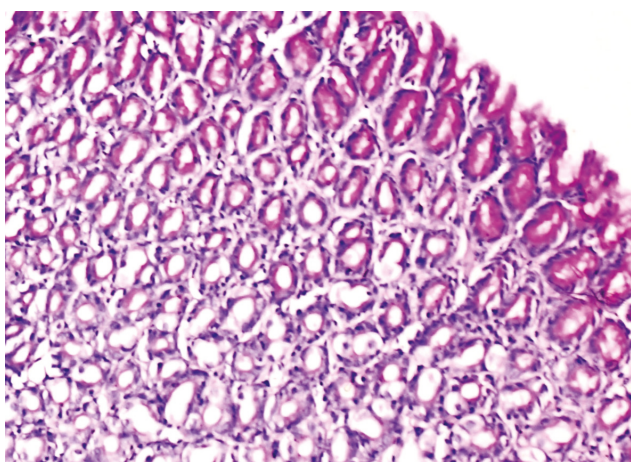


Рис. 4. Виразна секреція нейтральних глікопротеїнів поверхневими епітеліоцитами слизової оболонки шлунку щура. Група IV (ад'ювантний артрит + диклофенак натрію + кріоконсервованій екстракт плаценти), 28 день. Комбінована ШИК-реакція з альціановим синім, $\times 200$

Виявлене відновлення порушеної ДН секреції муцинів покривно-ямковим епітелієм СО виступає одним з механізмів цитопротективної активності КЕП при ДН-індукованому улцерогенезі.

Дослідження гомогенатів СОШ показало, що на 28 день експерименту у щурів з АА в СОШ відмічалось статистично вірогідне зниження ($p < 0,01$) рівня ЗБ на 14,1 % (рис. 5) та зниження ($p < 0,05$) вмісту РНК (рис. 6) та ДНК (рис. 7) на 27,5 % та 14,3 %, відповідно, відносно показників інтактних тварин.

На тлі монотерапії ДН відмічено ще більше зниження ($p < 0,001$) рівня ЗБ: на 26,2 % ($40,3 \pm 1,43$ мкг/мг) щодо показників інтактних тварин ($54,6 \pm 1,39$ мкг/мг). Вміст РНК та ДНК в гомогенаті СОШ у щурів з АА на тлі застосування ДН на 28 день становив $0,59 \pm 0,57$ мкг/мл та $2,21 \pm 0,27$ мкг/мл, відповідно.

На тлі комбінованого застосування ДН та КЕП у щурів з АА в гомогенаті СОШ на 28 день експерименту відмічено співставні з рівнем інтактних тварин показники ЗБ та ДНК. Так, рівень ЗБ становив $53,0 \pm 2,09$ мкг/мг, що лише на 2,9 % було нижче за показники інтактних тварин ($54,6 \pm 1,39$ мкг/мг), а вміст ДНК на 5,1 % ($p = 0,3$) був нижчим за показники

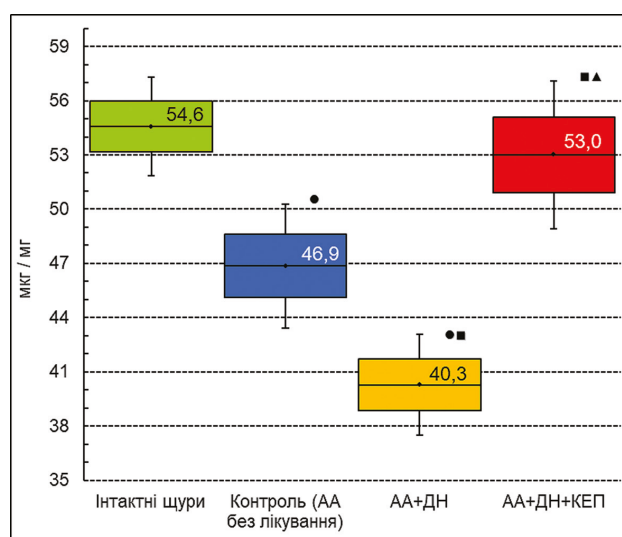


Рис. 5. Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з кріоконсервованим екстрактом плаценти на вміст загального білка в гомогенатах слизової оболонки щурів з ад'ювантним артритом на 28 добу експерименту

Примітки до рис. 5-7:

Розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний.

Бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95 % довірчий інтервал.

Горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення.

● – $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів;

■ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА без лікування;

▲ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА, лікованих ДН.

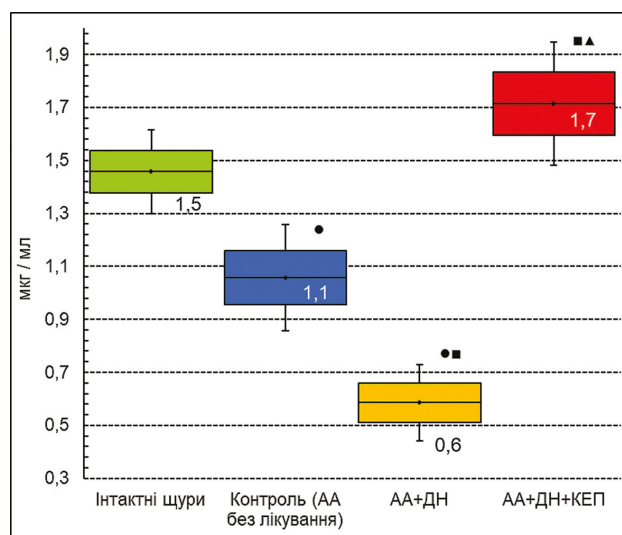


Рис. 6. Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з кріоконсервованим екстрактом плаценти на вміст РНК в гомогенатах слизової оболонки щурів з ад'ювантним артритом на 28 добу експерименту

інтактних тварин ($3,1 \pm 0,12$ мкг/мл) та становив відповідно $2,94 \pm 0,08$ мкг/мл.

Також встановлено, що рівень РНК на тлі комбінованого застосування ДН та КЕП в гомогенаті СОШ ($1,72 \pm 0,12$ мкг/мл) на 17,6 % перевищував ($p = 0,1$) показники інтактних тварин ($1,46 \pm 0,08$ мкг/мл).

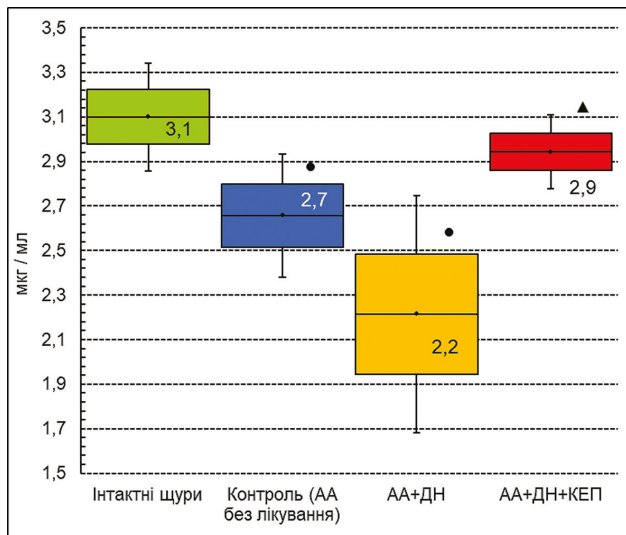


Рис. 7. Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з кріоконсервованим екстрактом плаценти на вміст ДНК в гомогенатах слизової оболонки щурів з ад'ювантним артритом на 28 добу експерименту

ВИСНОВКИ

Виявлене відновлення порушеної диклофенаком натрію секреції муцинів покривно-ямковим епітелієм слизової оболонки шлунка виступає одним з механізмів цитопротективної активності кріоконсервованого екстракту плаценти при експериментальному ульцерогенезі.

Комбіноване застосування кріоекстракту плаценти та диклофенаку натрію призводить до нівелювання негативного впливу останнього на білковий обмін в слизовій оболонці шлунка щурів з ад'ювантним артритом. Так, рівень загального білка становив $53,0 \pm 2,09$ мкг/мг, що лише на 2,9 % було нижче за показники інтактних тварин.

Конфлікт інтересів. Автори засвідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чії продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Інформація про фінансування. Фінансування видатками Державного бюджету України. Робота виконана в контексті планової науково-дослідної роботи відділу експериментальної кріомедицини Інституту проблем кріобіології і кріомедицини 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).

REFERENCES

1. Chuan-Guo G, Wai KL. Potential strategies in the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory

drugs-associated adverse effects in the lower gastrointestinal tract. *Gut and Liver*. 2020;14(2):179-189. DOI: 10.5009/gnl19201. View at:

Publisher Site: <https://www.gutnliver.org/journal/view.html?doi=10.5009/gnl19201>

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31547642/>

PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7096237/>

2. Maksimov ML. Topical issues of the efficacy and safety of modern non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Russian medical journal*. 2014; 28: 1-7. [in Russian]. View at:

Publisher Site: https://www.rmj.ru/articles/revmatologiya/Aktualnyye_voprosy_effektivnosti_i_bezopasnosti_sovremennyh_nesteroidnyh_protivovospalitelnykh_preparatov/

Elibrary: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22989681>

3. 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 Gastroenterologia de Mexico*. 2020;85(2):190-206. DOI: 10.1016/j.rgmexen.2019.11.001. View at:

Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255534X2030013X>

4. Hladkykh FV, Stepaniuk NH, Vernihorodskiy SV. The study of cell homeostasis state of the gastric mucosa of rats on model of rheumatoid arthritis, treatment with ibuprofen and its combination with vinboron. *Pharmacy & Pharmacology*. 2016;4(3):68-83. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-3-68-83. [in Russian]. View at:

Publisher Site: <https://www.pharmpharm.ru/journal/article/view/205>

5. Hladkykh FV, Stepaniuk NH. The effect of vinboron on the analgesic activity of ibuprofen in a model of adjuvant arthritis in rats. *Achievements of clinical and experimental medicine*. 2015;1(22):47-50. DOI: 10.11603/1811-2471.2015.v22.i1.4218. [in Ukrainian]. View at:

Publisher Site: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/zdobutky-eks-med/article/view/4218>

6. Goltsev AN., ed. Placenta: cryopreservation, clinical use. Kharkiv: Brovin, 2013; 268 p. [in Russian]. View at:

Irbis: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&S21P03=FILA=&S21STR=Krio-Biol_2012_22_3_120

7. Avtandilov GG. Fundamentals of Quantitative Pathological Anatomy. Moscow: Medicine, 2002. 240 p. [in Russian].

View at:

Publisher Site: <https://www.mmbook.ru/catalog/patanatomija-gistologija-morfologija/105036-detail>

8. Trudolyubova MT, Orekhovich VN. ed. Quantitative determination of DNA and RNA in subcellular fractions of animal cells. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicine, 1977: 313-16. [in Russian].

9. Johansson ME, Sjoval H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2013;10(6):352-61. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.35

View at:

Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2013.35>PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23478383/>PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3758667/>

10. Ruiz-Pulido G, Medina DI. An overview of gastrointestinal mucus rheology under different pH conditions and introduction to pH-dependent rheological interactions with PLGA and chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;159:123-36. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.12.013

View at:

Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641120303726?via%3Dihub>PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33387633/>

Article history:

Received: 17.11.2021

Revision requested: 30.11.2021

Revision received: 12.12.2021

Accepted: 23.12.2021

Published: 30.12.2021

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ ЦИТОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ ПО ДАННЫМ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СЛИЗИСТОЙ ЖЕЛУДКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

^{1,2}Гладких Ф.В., ³Вернигородский С.В., ²Чижев Н.А.

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

²Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины», Харьков, Украина

³Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Винница, Украина

fedir.hladkykh@gmail.com

Актуальность. Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) применяются в качестве жаропонижающих и обезболивающих препаратов. При этом НПВС нередко проявляют побочное ulcerогенное действие. Поэтому актуален поиск средств коррекции ulcerогенного действия НПВС. Потенциальное антиulcerогенное действие может быть у криоконсервированного экстракта плаценты человека «Криоцелл-криоэкстракт плаценты».

Цель: исследовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты (КЭП) на морфологическое состояние желудка и процессы синтеза белка в слизистой желудка при введении НПВС диклофенака натрия крысам с экспериментальным ревматоидным артритом.

Материалы и методы. Исследование проведено на 28 нелинейных крысах-самцах массой 200-220 г. Животных разделили на 4 группы: I (n=7) – интактные крысы; II (n=7) – крысы с адьювантным артритом (АА) – контроль без лечения; III (n=7) – крысы с АА, леченные диклофенаком натрия (ДН), 8,0 мг/кг, внутривентриально (в/в); IV (n=7) – крысы с АА, леченные ДН, 8,0 мг/кг, в/ж и КЭП, 0,16 мл/кг массы тела, внутримышечно (в/м).

АА моделировали путем субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда в заднюю правую конечность из расчета 0,1 мл на крысу. День введения адьюванта считали «0» сутки эксперимента. Лечение АА проводилось с 14 по 28 день. ДН применяли ежедневно, а КЭП – с интервалом 3 дня: на 14, 17, 20, 23 и 26 дни. На 28 день животных выводили из опыта методом цервикальной дислокации под ингаляционным наркозом.

Для оценки морфологических изменений фрагменты желудка фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также реактивом Шиффа (фуксинсерная кислота) с йодной кислотой. Концентрацию общего белка (ОБ) определяли спектрофотометрически по светопоглощению при длине волны 546 нм. Содержание РНК и ДНК в гомогенатах слизистой желудка определяли спектрофотометрически по реакции с хлорной кислотой.

Результаты. У крыс с АА слизистая оболочка (СО) имела сохраненную структуру у всех животных. Признаков гипер- или гипосекретии муцинов при окраске ШИК-реакцией с ализановым синим не обнаружено. Отмечались очаги десквамации поверхностного эпителия и лимфоциты. Введение ДН крысам с АА привело к признакам эрозивных изменений СО. У 28,6% крыс обнаружены глубокие эрозии и единичные язвенные дефекты, которые по глубине поражения достигали мышечной пластинки. Имелись незначительное количество мукополисахаридов с преобладанием кислых гликопротеинов. Снижено содержание нейтральных гликопротеинов. Выявлены единичные десквамированные эпителиоциты. В подслизистой прослойке СО отмечена очаговая лимфо-плазмочитарная инфильтрация экссудатом с эозинофильными лейкоцитами. На фоне комбинированного применения ДН и КЭП у крыс из АА ни у одного животного не выявлено значительных нарушений гистоархитектоники СОШ, кроме единичных очагов десквамации поверхностного эпителия.

В гомогенатах СОШ у крыс с АА отмечалось снижение ($p < 0,01$) уровня ОБ на 14,1% и снижение ($p < 0,05$) содержания РНК и ДНК на 27,5% и 14,3% соответственно относительно показателей интактных животных.

На фоне монотерапии ДН отмечено еще большее снижение ($p < 0,001$) уровня ОБ: на 26,2% ($40,3 \pm 1,43$ мкг/мг) по отношению к показателям интактных животных ($54,6 \pm 1,39$ мкг/мг). Содержание РНК и ДНК составило $0,59 \pm 0,57$ мкг/мл и $2,21 \pm 0,27$ мкг/мл соответственно.

CHARACTERISTICS OF THE MECHANISMS OF CYTOPROTECTIVE ACTIVITY OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT ACCORDING TO MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE GASTRIC MUCOSA IN THE EXPERIMENT

На фоне комбинированного применения ДН и КЭП отмечены сопоставимые с уровнем интактных животных показатели ОБ и ДНК. Так, уровень ОБ составлял $53,0 \pm 2,09$ мкг/мг, что только на 2,9 % было ниже показателей интактных животных ($54,6 \pm 1,39$ мкг/мг), а содержание ДНК на 5,1 % ($p = 0,3$) был ниже показателей интактных животных ($3,1 \pm 0,12$ мкг/мл) и составил соответственно $2,94 \pm 0,08$ Уровень РНК ($1,72 \pm 0,12$ мкг/мл) на 17,6% превышали ($p = 0,1$) показатели интактных животных ($1,46 \pm 0,08$ мкг/мл).

Выводы. Комбинированное применение криоэкстракта плаценты и диклофенака натрия приводит к нивелированию негативного влияния последнего на белковый обмен в слизистой желудка крыс с адьювантным артритом. Так, уровень общего белка составил $53,0 \pm 2,09$ мкг/мг, что только на 2,9 % ниже показателей интактных животных. Восстановление нарушенной диклофенаком натрия секреции муцинов покровно-ямковым эпителием слизистой желудка выступает одним из механизмов цитопротективной активности криоконсервированного экстракта плаценты при экспериментальном ulcerogenezе.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные средства, диклофенак натрия, криоэкстракт плаценты

CHARACTERISTICS OF THE MECHANISMS OF CYTOPROTECTIVE ACTIVITY OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT ACCORDING TO MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE GASTRIC MUCOSA IN THE EXPERIMENT

^{1,2}Hladkykh F.V., ³Vernygorodskiy S.V., ²Chyzh M.O.

¹*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

²*State of Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine*

³*Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsya, Ukraine*

fedir.hladkykh@gmail.com

Relevance. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used as antipyretics and analgesics. In this case, NSAIDs have a side effect - ulcerogenic. Therefore, it is important to find means to correct the ulcerogenic action of NSAIDs. Potential antiulcerogenic action may be in cryopreserved human placenta extract "Cryocell-placental cryoextract".

Objective: to investigate the effect of cryopreserved placenta (CEP) extract on the morphological state of the stomach and the processes of protein synthesis in the gastric mucosa with the introduction of NSAIDs diclofenac sodium in rats with experimental rheumatoid arthritis.

Materials and methods. The study was performed on 28 nonlinear male rats weighing 200-220 g. The animals were divided into 4 groups: I (n = 7) – intact rats; II (n = 7) – rats with adjuvant arthritis (AA), this is a treatment without treatment; III (n = 7) – rats with AA, treated with diclofenac sodium (DN), 8.0 mg / kg, intragastrically (i/g); IV (n = 7) – rats with AA, treated with DN, 8.0 mg / kg, i/g and CEP, 0.16 ml / kg body weight, intramuscularly (i/m).

AA was simulated by subplantar injection of complete Freund's adjuvant into the hind right limb at a rate of 0.1 ml per rat. The day of adjuvant administration was considered as the "0" day of the experiment. AA treatment was performed from 14 to 28 days. DN was applied daily, and CEP – with an interval of 3 days: for 14, 17, 20, 23 and 26 days. On day 28, the animals were removed from the experiment by cervical dislocation under inhalation anesthesia.

To assess morphological changes, gastric fragments were fixed in 10.0% neutral formalin solution. Histological sections 5–7 μm thick were stained with hematoxylin and eosin, as well as Schiff's reagent (fuchsin sulfuric acid) with iodine acid. The concentration of total protein (TP) was determined spectrophotometrically by light absorption at a wavelength of 546 nm. The content of RNA and DNA in the homogenates of the gastric mucosa was determined spectrophotometrically by reaction with perchloric acid.

Results. In rats with AA, the mucous membrane (MM) had a preserved structure in all animals. There were no signs of hyper- or hyposecretion of mucins when stained with a chic reaction with alcyan blue. There were foci of desquamation of the superficial epithelium and single lymphocytes. The introduction of DN in rats with AA led to signs of erosive changes in MM. Deep erosions and single ulcerative defects were found in 28.6% of rats, reaching the depth of the lesion to the muscle plate. There is a small amount of mucopolysaccharides with a predominance of acidic glycoproteins. Reduced content of neutral glycoproteins. Single desquamated epitheliocytes were detected. Focal lympho-plasmacytic infiltration with exudate with eosinophilic leukocytes was noted in the submucosal layer of MM. Against the background of the combined use of DN and CEP in rats with AA in any animal, no significant violations of the histoarchitectonics of the MM, except for isolated foci of desquamation of the superficial epithelium.

In gastric MM homogenates in rats with AA there was a decrease ($p < 0.01$) in the level of TP by 14.1% and a decrease ($p < 0.05$) in the content of RNA and DNA by 27.5% and 14.3%, respectively, relative to indicators of intact animals.

Against the background of DN monotherapy, there was an even greater decrease ($p < 0.001$) in the level of TP: by 26.2% (40.3 ± 1.43 μg / mg) relative to intact animals (54.6 ± 1.39 μg / mg). And the content of RNA and DNA was 0.59 ± 0.57 μg / ml and 2.21 ± 0.27 μg / ml, respectively.

Against the background of the combined use of DN and CEP, comparable to the level of intact animals indicators of TP and DNA were noted. Thus, the level of TP was 53.0 ± 2.09 μg / mg, which was only 2.9% lower than intact animals (54.6 ± 1.39 μg / mg), and the DNA content by 5.1% ($p = 0.3$) was lower than intact animals (3.1 ± 0.12 μg / ml) and was respectively 2.94 ± 0.08 RNA level (1.72 ± 0.12 μg / ml) on 17.6% exceeded ($p = 0.1$) intact animals (1.46 ± 0.08 μg / ml).

Conclusions. The combined use of placental cryoextract and diclofenac sodium eliminates the negative effect of the latter on protein metabolism in the gastric mucosa of rats with adjuvant arthritis. Thus, the level of total protein was 53.0 ± 2.09 μg / mg, which is only 2.9% lower than intact animals. Restoration of diclofenac sodium-induced mucin secretion by the integumentary epithelium of the gastric mucosa is one of the mechanisms of cytoprotective activity of cryopreserved placenta extract in experimental ulcerogenesis.

Key words: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac sodium, placental cryoextract