

© 2022 by the author(s).

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2022.3-4.126>

УДК: 615.36+618.46+616.3-07+616.33-07

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ ШЛУНКА КРІОКОНСЕРВОВАНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ В УМОВАХ ВОДНО-ІМОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Кошурба І.В.^{1,2} ORCID: 0000-0002-4595-9245

Гладких Ф.В.^{1,3} ORCID: 0000-0001-7924-4048

Чиж М.О.¹ ORCID: 0000-0003-0085-296X

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, м. Харків, Україна
Відділ експериментальної кріомедицини

² Комунальне некомерційне підприємство "Чернівецький обласний перинатальний центр", м. Чернівці, Україна
Відділення інтенсивної терапії новонароджених

³ Державна установа "Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України", м. Харків, Україна

Група променевої патології та паліативної медицини Відділу радіології

Ключові слова: кріоконсервований екстракт плаценти, виразкова хвороба шлунка, водно-іммобілізаційний стрес, стрес-індукований улцерогенез

Для цитування: Кошурба І.В., Гладких Ф.В., Чиж М.О. Характеристика цитопротективної дії на слизову оболонку шлунка кріоконсервованого екстракту плаценти в умовах водно-іммобілізаційного стресу. Львівський медичний часопис. 2022. Т. 28. № 3-4. С. 126-139. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2022.3-4.126>

Для кореспонденції: Кошурба Ілля Васильович, Комунальне некомерційне підприємство "Чернівецький обласний перинатальний центр", вул. Буковинська, буд. 1а, м. Чернівці, 58000, Україна; e-mail: koshurba@gmail.com

Стаття надійшла: 2.06.2022 **Прийнята до друку:** 10.12.2022

CHARACTERISTICS OF CYTOPROTECTIVE EFFECT ON THE GASTRIC MUCOSA OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT UNDER WATER-IMMOBILIZATION STRESS

Illia Koshurba^{1,2} ORCID: 0000-0002-4595-9245

Fedir Hladkykh^{1,3} ORCID: 0000-0001-7924-4048

Mykola Chyzh¹ ORCID: 0000-0003-0085-296X

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

² Communal non-profit enterprise "Chernivtsi Regional Perinatal Center", Chernivtsi, Ukraine
Department of Neonatal Intensive Care

³ State of Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

Radiation Pathology and Palliative Medicine Group of the Department of Radiology

Keywords: cryopreserved placenta extract, gastric ulcer, water-immobilization stress, stress-induced ulcerogenesis

For citation: Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Characteristics of cytoprotective effect on the gastric mucosa of cryopreserved placenta extract under water-immobilization stress. Acta Medica Leopoliensia. 2022;28(3-4):126-139. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2022.3-4.126>

For correspondence: Koshurba Illia Vasylovych, Municipal Non-Profit Enterprise "Chernivtsi Regional Perinatal Center", 1a, Bukovynska Str., Chernivtsi, 58000, Ukraine; e-mail: koshurba@gmail.com

Received: June 2, 2022 **Accepted:** December 10, 2022

Реферат

Серед етіологічних чинників розвитку виразкової хвороби на сьогоднішні всі частіше мають місце стресові фактори. Причиною формування стресових виразок, крім психоемоційних переживань, виступають великі оперативні втручання, термічні або механічні

Abstract

Various stressors are currently considered to play a significant role among the etiological factors for development of peptic ulcer disease. Along with psycho-emotional stressing experiences, the causes of formation of stress ulcers include major surgical interventions,

травми, тяжка крововтрата, прогресуючий синдром ендогенної інтоксикації тощо. Серед пацієнтів відділень інтенсивної терапії та реанімації частота стресових виразок становить 5,0%, а в 30,0 - 50,0% випадків стресові виразки ускладнюються кровотеєю та перфорацією.

Мета. Охарактеризувати гастроцитопротективну дію кріоконсервованого екстракту плаценти (КЕП) на моделі водно-імобілізаційного стресу у щурів за макроскопічними даними та результатами біохімічного дослідження гомогенатів слизової оболонки шлунка (СОШ).

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200-220 г. Стрес-індуковану виразку шлунка моделювали в умовах водно-імобілізаційного стресу (ВІС). ВІС моделювання за методикою Takagi K.Y. et al. Активність NO-синтаз (NOS) у СОШ визначали спектрофотометричним методом за кількістю НАДФН+H⁺, що окислюється.

Результати й обговорення. Застосування КЕП, як і езомепразолу, зумовило ослаблення виразкування СОШ. На це вказувало статистично ймовірне ($p < 0,05$) зниження виразкового індексу (ВІ) відносно показників щурів контрольної групи у 9,8 та 3,3 рази відповідно. При цьому, вказаний показник був втричі нижчим на тлі запобіжного застосування КЕП ніж у щурів, яким вводили езомепразол, відповідно противиразкова активність (ПВА) становила 96,4 % та 69,2 %. Дослідження активності конститутивної (cNOS) та індукційної (iNOS) ізоформ NOS продемонструвало, що на патобіохімічному рівні на тлі стрес-індукованого ульцерогенезу в тканинах СОШ відмічається статистично вірогідне ($p < 0,001$) підвищення активності iNOS у 5,2 рази щодо показників щурів інтактної групи та становила $0,89 \pm 0,01$ НАДФН/хв \times г білка. За ступенем модуляції активності як сумарної NOS так і її окремих ізоформ дослідження показало, що превентивне п'ятиденне введення езомепразолу поступається за ефективністю КЕП. Так, активність сумарної NOS у щурів, яким вводили езомепразол, статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизилась лише на 17,1%, в той час як на тлі застосування КЕП активність вказаного ензиму зменшилась ($p < 0,001$) на 35,8%.

Висновки. Профілактичне п'ятиденне введення КЕП спричинило модуляції активності системи NOS в СОШ, яке при макроскопічному дослідженні виявилось статистично вірогідним ($p < 0,05$) зниження ВІ показників щурів контрольної групи у 9,8 разів. Так, активність NOS статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизилась на 35,8%, а активність iNOS статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизилась на 58,4% щодо показників тварин контрольної групи. Під час профілактичного режиму застосування КЕП проявляв виразнішу за езомепразол противиразкову активність, яка становила 96,4% та 69,2% відповідно.

thermal or mechanical injuries, severe blood loss, progressive syndrome of endogenous intoxication and more. Among patients in intensive care units, the incidence of stress ulcers is 5.0%, and in 30.0-50.0% of cases stress ulcers are complicated by bleeding and perforation.

Aim. The research aims at characterizing the gastrocytoprotective effect of cryopreserved placenta extract (CEP) on the model of water-immobilization stress in rats according to macroscopic data and the results of biochemical study of homogenates of the gastric mucosa (GM).

Materials and Methods. *In vivo* experimental studies were performed on 28 nonlinear laboratory male rats weighing 200-220 g. Stress-induced gastric ulcer was simulated under water-immobilization stress (WIS) in rats. WIS simulation according to the method of Takagi K.Y. et al. The activity of NO synthases (NOS) in GM was determined spectrophotometrically by the amount of oxidized NADPH+H⁺.

Results and Discussion. The use of CEP, as well as esomeprazole, led to a weakening of GM ulcers. This was indicated by a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in ulcer index (UI) relative to the indicators of control rats by 9.8 and 3.3 times, respectively. At the same time, this indicator was three times lower on the background of preventive use of CEP than in rats treated with esomeprazole, respectively, antiulcer activity (AUA) was 96.4% and 69.2%. The study of the activity of constitutive (cNOS) and inducible (iNOS) isoforms of NOS showed that at the pathobiochemical level against the background of stress-induced ulcerogenesis in the tissues of the central nervous system there is a statistically significant ($p < 0.001$) increase in iNOS activity in 5.2 times was 0.89 ± 0.01 NADPH_{min} \times g protein. According to the degree of modulation of the activity of both total NOS and its individual isoforms, the study showed that preventive five-day administration of esomeprazole is inferior to the effectiveness of CEP. Thus, the activity of total NOS in rats administered esomeprazole was statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by only 17.1%, while the activity of this enzyme decreased ($p < 0.001$) by 35.8% due to the use of CEP.

Conclusions. Prophylactic five-day administration of CEP modulated the activity of the NOS system in the central nervous system, which in a macroscopic study appeared statistically significant ($p < 0.05$) reduction in UI relative to rats in the control group by 9.8 times. Thus, NOS activity statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by 35.8%, and iNOS activity statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by 58.4% relative to the control animals. CEP under the prophylactic regimen showed more pronounced anti-ulcer activity than esomeprazole, which was 96.4% and 69.2%, respectively.

Вступ

Виразкова хвороба (ВХ) шлунка та дванадцятипалої кишки належить до найбільш актуальних проблем сучасної гастроентерології [1-3]. Посідаючи одне з провідних місць серед захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ), вона має надзвичайне медико-соціальне значення, адже поширення вказаної патології становить 8,0%-10,0% серед дорослого населення працездатного віку [3]. На сьогодні ВХ розглядають як поліетіологічне, генетично та патогенетично неоднорідне захворювання. Основними етіологічними чинниками виразкоутворення в гастродуоденальній зоні є спадкова схильність, інфікованість *Helicobacter pylori*, типи нервової та ендокринної регуляції, імунний статус цитокінового профілю, нейроімуноендокринні порушення тощо [3]. На сучасному етапі особливе місце серед причин розвитку ВХ все частіше відіграють стрес та емоційне перенапруження, особливо серед осіб працездатного віку. Причиною формування стресових виразок, крім психоемоційних переживань, виступають великі оперативні втручання, термічні або механічні травми, тяжка крововтрата, прогресуючий синдром ендогенної інтоксикації тощо. Серед пацієнтів відділень інтенсивної терапії та реанімації частота стресових виразок становить 5,0%, а в 30,0-50,0% випадків вони ускладнюються кровотечею та перфорацією [2]. Ерозії та виразки слизової оболонки (СО) ШКТ можуть виникати вже через кілька годин після госпіталізації у відділення інтенсивної терапії, а в післяопераційний період подібні зміни СОШ констатують найчастіше у перші три доби після оперативного втручання, зокрема й через недоліки передопераційної підготовки [2]. До основних патогенетичних ланок стрес-індукованого ульцерогенезу належать: ішемія СО, гіперсекреція соляної кислоти та зниження секреції гідрокарбонату.

Зважаючи на вищенаведені факти, профілактика формування стресових виразок має велике медичне та соціально-економічне значення. Як потенційний лікарський засіб з

противиразковою активністю нашу увагу привернув препарат кроїконсервованого екстракту плаценти (КЕП), створений фахівцями Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (м. Харків). Відомо, що КЕП 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 [4-6].

За даними літератури КЕП проявляє виразну гастропротективну дію в умовах медикаментозного ульцерогенезу. Так, на тлі профілактичного введення противиразкова активність (ПВА) КЕП становила 69,1% при гострій індометацин-індукованій гастропатії (виразковий індекс (ВІ)=3,5 та 1,08 відповідно у щурів контрольної групи та щурів, яким вводили КЕП) [6].

Мета роботи-охарактеризувати гастроцитопротективну дію кроїконсервованого екстракту плаценти на моделі водно-іммобілізаційного стресу у щурів за макроскопічними даними та результатами біохімічного дослідження гомогенатів слизової оболонки шлунка.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200-220 г, розділених на 4 групи: I-інтактні щури (n=7); II (контрольна група)-щури зі стрес-індукованим ураженням СОШ (n=7); III (n=7)-щури зі стрес-індукованим ураженням СОШ, яким у профілактичному режимі вводили внутрішньом'язово (в/м) КЕП ("Кріоцелл-кріоекстракт плаценти" (Державне підприємство "Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, НАМН та МОЗ України", м. Харків, Україна); IV (n=7)-щури зі стрес-індукованим ураженням СОШ, яким у профілактичному режимі за схемою, аналогічною введенню КЕП, внутрішньошлунково (в/шл) вводили інгібітор протонної помпи езомепразол у дозі 50 мг/кг [7-9].

Стрес-індуковану виразку шлунка моделювали в умовах водно-імобілізаційного стресу (ВІС) у щурів, який на рівні патобіохімічних змін у травній системі є відповідником гострого стресу в людини [7]. ВІС моделювання за методикою Takagi K.Y. et al., [10]. Щурів іммобілізували в індивідуальних плексигласових пеналах за Коганом О.Х. та вертикально занурювали до рівня яремної ямки у воду температурою $23,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Тварин витримували у воді протягом 5 год, після чого їх виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під інгаляційним "рауш-наркозом".

Після лапаротомії по білій лінії живота (*linea alba abdominis*) проводили оцінку розмірів шлунка (здуття) та наявності спайкових процесів із суміжними органами, як ознак перфорації. Екстирповані шлунки розкривали по великій кривизні (*curvatura ventriculi major*), промивали у 0,9% р-ні NaCl. Вплив досліджуваних лікарських засобів на стан СОШ оцінювали макроскопічно за такими критеріями: набряк, гіперемія та наявність крововиливів на поверхні слизової оболонки. Для кожної групи проводили розрахунок відсоткового складу піддослідних тварин за вказаними ознаками та середнє значення їх виразності, яку оцінювали за шкалою: 0 балів-ознака відсутня; 1 бал-ознака слабо виражена; 2 бали-ознака помірно виражена; 3 бали-ознака добре виражена [7].

Окрім того проводили оцінку стану СОШ за бальною шкалою Яковлевої Л.В. [7]. Розрахунок інтегрального показника стану СОШ-ВІ проводили за формулою:

$$VI = (\text{Середній бал за шкалою} \times \% \text{ тварин з виразками}) / 100$$

ПВА визначали за формулою:

$$ПВА = ((VI \text{ дослідної групи} - VI \text{ контрольної групи}) / VI \text{ контрольної групи}) \times 100$$

Препарат КЕП "Кріоцелл-кріоекстракт плаценти" згідно з інструкцією застосовується у пацієнтів парентерально в разовій дозі 1,8 мл. Відповідно разова доза для щурів становить: $(1,8 \text{ мл} / 70 \text{ кг}) \times 6,35 = 0,16 \text{ мл} / \text{кг}$ маси тіла або відповідно 0,02 мл/100 г маси тіла

щуро [5]. КЕП отримали науковці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, які й розробили та впровадили в практику унікальну методику його тривалого зберігання у низькотемпературному середовищі. Добре відомо, що у плаценті дуже висока активність ряду ферментів: дихальні ферменти (моноамінооксидаза, система цитохромоксидаз), каталаза, НАД- і НАДФ-діафори, сукцинатдегідрогеназа, системи гістамін-гістаміназа, ацетилхолін-ацетилхолінестрераза, фактори згортання крові та фібринолізу та ін. У плаценті також відбувається синтез білків, що відносяться до класу ІЛ-ІЛ1, ІЛ6, ІЛ8, ІЛ2, однією з функцій яких є індукція гуморальних факторів неспецифічної резистентності, а секретований клітинами трансформуючий фактор росту стимулює репарацію за рахунок активації мезенхімальних клітин та процесів неоваскуляризації. Крім того, до складу препаратів плаценти входить ряд факторів росту: гепатоцитів (HGF), інсуліноподібний (IGF), фібробластів (FGF), епідермальний (EGF), нервів (NGF), колонієстимулюючий (CSF) та ін. [4-6]. Дослідження показали, що КЕП впливає на органи-мішені, стимулюючи їх функціонування, та підвищує неспецифічну резистентність організму до несприятливих факторів зовнішнього середовища та стресових чинників, проявляє антиоксидантну, імономодельючу, противиразкову, метаболотропну дію [4-6].

Перед застосуванням препарату "Кріоцелл-кріоекстракт плаценти" разову дозу (0,16 мл/кг) екстемпорально (ex tempore-за потреби) розводили у 0,9% р-ні NaCl (ПрАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця"", Україна) з розрахунку 0,1 мл 0,9% р-ну NaCl/100 г маси тіла та вводили в/м у профілактичному режимі-1 р/д упродовж 5 днів [4, 7].

Активність NO-синтаз (NOS) у СОШ визначали спектрофотометричним методом за кількістю НАДФН₂, що окислюється [11]. Для отримання гомогенату СОШ перфузували холодним (+4°C) буферним розчином (250 ммоль сахароза, 5 ммоль Na₂EDTA, 5 ммоль

трис-НCl буфер (рН=7,4) та гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) у середовищі буферного розчину. Гомогенати СОШ інкубували 20 хв при температурі 40°C з 1 мл реакційної суміші (при визначенні сумарної активності NOS (iNOS та cNOS): CaCl₂, трис-НCl, MgCl₂, НАДФН+Н⁺, L-Арг; при визначенні активності iNOS: ЕДТА, трис-НCl, MgCl₂, НАДФН+Н⁺, L-Арг) [11]. Реакцію зупиняли додаванням 0,3 мл НClO₄ та центрифугували (3000 об/хв), в надосадовій рідині визначали концентрацію НАДФН+Н⁺, яку реєстрували за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda=340$ нм. Активність cNOS визначали як різницю між рівнем загальної NOS та iNOS. Активність NO-синтаз виражали у нмоль НАДФН₂/хв×г білка.

Біоетичні аспекти дослідження. 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", затвердженої Законом України, наказом МОЗ України № 95 від 16 лютого 2009 р. і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, котрі 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".

До початку експерименту щури впродовж 14 діб перебували в умовах карантину (Наказ № 755 від 12 серпня 1997 р. "Структура та утримання експериментальних біологічних клінік"), після чого проводилася рандомізація на групи по 7 особин у кожній із подальшим утриманням в умовах стандарт-

ного водно-харчового раціону (Наказ № 163 від 10 березня 1996 р. "Про добові норми годування лабораторних тварин та продуцентів") з вільним доступом (ad libitum) до води та їжі. У всіх серіях дослідження тваринам у групах наносили індивідуальні мітки [7].

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/>). Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка (Shapiro-Wilk test, $p < 0,05$). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (Levene's test). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз з використанням параметричних або непараметричних критеріїв.

При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Стьюдента. При ненормальному розподілі бодай однієї з груп незалежних величин відмінності між ними визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна-Уїтні (Mann-Whitney). Вірогідність відмінностей між відсотковими частками якісних параметрів в альтернативній формі визначали за значенням F-критерію кутового перетворення Фішера (F-test). Отримані результати порівнювали з критичними значеннями при рівні вірогідності вище 95,0% ($p \leq 0,05$) та вище 99,0% ($p \leq 0,01$).

Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді "M±m" (M±SE), де M-середнє арифметичне значення, m (SE)-стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ: 5%-95%), де 95% ДІ:-95% довірчий інтервал (Confidence interval-CI). При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлено у вигляді Me [LQ; UQ], де Me-медіана, [LQ; UQ]-верхня межа нижнього (першого) квантиля

(lower quartile-LQ) та нижня межа верхнього (третього) квантиля (upper quartile-UQ) [7].

Результати й обговорення

Дослідження показало, що п'ятигодинна іммобілізація щурів із зануренням у воду призвела до статистично вірогідного ($p < 0,05$) виразкування СОШ у 100,0% щурів контрольної групи (Табл. 1). При макроскопічному дослідженні у тварин контрольної групи простежувалися множинні ерозії та геморагії й гіперемія СОШ, а ВІ становив 3,9. Застосування КЕП, як і езомепразолу, призвело до ослаблення виразкування СОШ. На це вказувало статистично вірогідне ($p < 0,05$) зниження ВІ відносно показників щурів контрольної групи у 9,8 та 3,3 рази відповідно (Табл. 1). При цьому, зазначений показник був втричі нижчим на тлі превентивного застосування КЕП ніж у щурів, яким вводили езомепразол, ПВА становила 96,4 % та 69,2 % відповідно. Це вказує на більш виразну ПВА КЕП за умов профілактичного режиму застосування, порівняно із езомепразолом, що узгоджується із механізмом дії останнього, адже інгібітори протонної помпи є ефективними за лікувального режиму застосування. Водночас дослідження показало, що п'ятиденне введення КЕП проявляє виразну ПВА на моделі ВІС у щурів. Ерозивно-виразкові ушкодження СОШ на тлі введення КЕП простежені лише у 28,6% щурів, а гіперемія СОШ-лише у

42,9%, в той же час при застосуванні езомепразолу ерозії, геморагії та виразкові дефекти СОШ відмічені у 71,4% тварин.

Для вивчення механізмів ПВА КЕП на тлі ВІС у щурів були проведені біохімічні дослідження гомогенатів СОШ із визначенням активності NOS, адже добре відомо, що провідним механізмом ульцерогенної дії стресу є вазоконстрикція судин внаслідок дії катехоламінів з подальшою енетеліальною дисфункцією, протидію до якої чинить нітрогену монооксид (NO). Проте відомо, що надмірна кількість NO проявляє як захисні, так і цитотоксичні властивості [12, 13].

Встановлено, що 5-годинна експозиція ВІС призвела до статистично вірогідного ($p < 0,001$) підвищення сумарної активності NOS вдвічі, порівняно із показниками інтактних щурів, та становила $1,23 \pm 0,02$ НАДФН₂/хв×г білка та $0,62 \pm 0,02$ НАДФН₂/хв×г білка відповідно (Табл. 2). Дослідження активності конститутивної (сNOS) та індукцйбельної (іNOS) ізоформ NOS продемонструвало, що на патобіохімічному рівні на тлі стрес-індукованого ульцерогенезу в тканинах СОШ відмічається статистично вірогідне ($p < 0,001$) підвищення активності іNOS у 5,2 рази відносно показників щурів інтактною групи та становила $0,89 \pm 0,01$ НАДФН₂/хв×г білка. Водночас відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження активності сNOS на 24,5% відносно показників тварин, які не під-

Таблиця 1

Вплив КЕП за профілактичного режиму введення на стан СОШ на тлі водно-іммобілізаційного стресу у щурів ($M \pm m$ (95% ДІ) або Me [LQ; UQ], $n=28$)

Умови досліджу	n		Здуття	Ерозії та геморагії	Гіперемія	Набряк	Поруш. складчастості	К-ть тварин з виразками, абс. (%)	Середній бал в групі	ВІ
Інтактні щури	7	Абс. (%)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0	0
		Бали	0	0	0	0	0			
ВІС	7	Абс. (%)	0/7 (0)	7/7* (100)	7/7* (100)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	7/7* (100)	3,9±0,26* (95%ДІ: 3,3-4,4)	3,9
		Бали	0	3 [3; 3]*	3 [3; 3]	0 [0; 2]	0 [0; 2]			
ВІС+КЕП	7	Абс. (%)	0/7 (0)	2/7# (28,6)	3/7*# (42,9)	0/7 (0)	0/7 (0)	2/7# (28,6)	1,3±0,34*# (95%ДІ: 0,6-2,0)	0,4
		Бали	0	0 [0; 1,5]#	0 [0; 2,5]	0	0			
ВІС+Езомепразол	7	Абс. (%)	2/7 (28,6)	5/7* (71,4)	3/7*# (42,9)	0/7 (0)	0/7 (0)	4/7* (57,1)	2,1±0,49*# (95%ДІ: 1,1-3,0)	1,2
		Бали	0 [0; 1]	2 [1; 3]*	0 [0; 1]	0	0			

*- $p < 0,05$ відносно показників інтактних тварин;

#- $p < 0,05$ відносно показників щурів, підданих ВІС (контрольна група);

давались ВІС (Табл. 2).

Отримані дані узгоджуються з літературними і засвідчують, що надлишок NO за умов його значного утворення при стрес-індукованих ушкодженнях чинить цитотоксичну та прозапальну дію, адже гіпоксія, що має місце при зростанні концентрації катехоламінів, слугує передумовою для розвитку оксидативного стресу, як наслідок, у результаті взаємодії із суперексид-аніоном O_2^- з NO утворюється високоактивний сильний окисник-пероксинітрит ($ONOO^-$), який, взаємодіючи з ліпідами, може спричинити пероксидацію останніх, а утворення нітротирозину при взаємодії з тирозиновими залишками білків порушує їх функції, внаслідок цього відбуваються зміни клітинного метаболізму на всіх рівнях [14, 15].

Відомо, що утворення пероксинітриту-основний шлях метаболізму NO. Кількість його залежить *in vivo* від релятивного надходження NO та суперексид аніону в тканини, причому концентрації обох вільнорадикальних сполук мають бути приблизно однаковими [14, 15]. Є відомості про те, що пероксинітрит стимулює матричну металопротеїнк-

назу-8 (MMP-8), яка відіграє важливу роль у руйнуванні та перебудові тканин як у фізіологічних умовах, так і при розвитку запалення та інфекції. Крім активації MMP-8, пероксинітрит легко інактивує тканинний інгібітор MMP та інгібітор протеїнази (еластази нейтрофілів) у плазмі крові людини. Таким чином, $ONOO^-$ прискорює пошкодження тканин і спричиняє розвиток різних патологічних станів організму шляхом активації циклооксигенази-ключового ферменту синтезу простагландинів, які є сильними медіаторами запалення. Крім того, за тривалої дії $ONOO^-$ на гладком'язові клітини судин спостерігається втрата останніми здатності нормально реагувати на фізіологічні подразники, внаслідок цього настає незворотна релаксація міоцитів. Такі процеси можуть призводити до порушення регіонарного кровотоку, що є ушкоджуючим фактором при ульцерогенезі [14, 15].

Профілактичне п'ятиденне введення КЕП призвело до статистично вірогідного ($p < 0,01$) зниження стрес-індукованої гіперекспресії як NOS, так й iNOS (Табл. 2). Активність iNOS статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизилась на 58,4 % відносно показників тварин

Таблиця 2

Вплив КЕП за профілактичного режиму введення на активність ізоформ NOS на тлі водно-іммобілізаційного стресу у щурів ($M \pm m$ (95% ДІ), $n=28$)

Досліджуваний показник, одиниці вимірювання	Умови експерименту			
	I група Інтактні щури	II група Контроль (ВІС)	III група ВІС +КЕП	IV група ВЕС +Езомепразол
n	7	7	7	7
Активність NOS, нмоль НАДФН ₂ / хв×г білка	0,62±0,02 (95%ДІ: 0,57–0,66)	1,23±0,02 (95%ДІ: 1,19–1,28) $p_{1-2} < 0,001$	0,79±0,05 (95%ДІ: 0,70–0,89) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	1,02±0,03 (95%ДІ: 0,97–1,07) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,01$
Активність iNOS, нмоль НАДФН ₂ / хв×г білка	0,17±0,01 (95%ДІ: 1,15–0,19)	0,89±0,01 (95%ДІ: 0,87–0,92) $p_{1-2} < 0,001$	0,37±0,01 (95%ДІ: 0,34–0,39) $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	0,58±0,04 (95%ДІ: 0,50–0,66) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$
Активність cNOS, нмоль НАДФН ₂ / хв×г білка	0,45±0,02 (95%ДІ: 0,41–0,49)	0,34±0,02 (95%ДІ: 0,31–0,37) $p_{1-2} < 0,001$	0,43±0,06 (95%ДІ: 0,31–0,55) $p_{1-3} = 0,7$ $p_{2-3} = 0,18$	0,43±0,04 (95%ДІ: 0,36–0,51) $p_{1-4} = 0,7$ $p_{2-4} = 0,04$ $p_{3-4} = 0,9$

Індексами 1, 2, 3 вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння;
 p_{2-1} -рівень статистичної вірогідності розбіжності показників

контрольної групи та становила $0,37 \pm 0,01$ НАДФН₂/хвхг білка, активність сNOS навпаки зросла на 26,4%, проте ці зміни не досягли рівня статистичної значущості ($p=0,18$).

За ступенем модуляції активності як сумарної NOS, так і її окремих ізоформ, дослідження показало, що превентивне п'ятиденне введення езомепразолу поступається за ефективністю КЕП (Табл. 2). Так, активність сумарної NOS у щурів, яким вводили езомепразол статистично вірогідно ($p<0,001$) знизилась лише на 17,1%, в той час як на тлі застосування КЕП активність вказаного ензиму знизилась ($p<0,001$) на 35,8 % (Табл. 2).

Висновки

1. Встановлено, що 5-годинна експозиція водно-іммобілізаційного стрету призводить до ерозивно-виразкових ушкоджень слизової оболонки шлунка у 100,0% щурів, які на біохімічному рівні обумовлюються гіперактивацією системи NOS, опосередкованою цитотоксичною дією NO, на що вказувало статистично вірогідне ($p<0,001$) зростання у 2 рази активності сумарної NOS.

2. Профілактичне п'ятиденне введення кріоекстракту плаценти призвело до модуляції активності системи NOS у слизовій оболонці шлунка, яке при макроскопічному дослідженні проявлялося статистично вірогідним ($p<0,05$) зниженням виразкового індексу відносно показників щурів контрольної групи у

9,8 разів. Так, активність NOS статистично вірогідно ($p<0,001$) знизилась на 35,8%, а активність іNOS статистично вірогідно ($p<0,001$) зменшилася на 58,4% відносно показників тварин контрольної групи.

3. Кріоекстракт плаценти за профілактичного режиму застосування проявляв виразнішу за езомепразол противиразкову активність, яка становила відповідно 96,4% та 69,2%.

Перспективи подальших досліджень

Отримані данні про виразну противиразкову активність КЕП на моделі стрес-індукованого ураження СОШ вказують на доречність подальших поглиблених досліджень патобіохімічних механізмів гастропротективної дії вказаного екстракту.

Конфлікт інтересів

Автор рукопису свідомо засвідчує 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.

CHARACTERISTICS OF CYTOPROTECTIVE EFFECT ON THE GASTRIC MUCOSA OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT UNDER WATER-IMMOBILIZATION STRESS

Introduction

Gastric or peptic ulcer (PU) is one of the major problems of modern gastroenterology [1, 2, 3]. It is considered to be one of the most common diseases of the gastrointestinal tract (GI tract) with the prevalence up to 8.0%-10.0% among the adult population of the working age, therefore, it has considerable medical and social importance [3]. Today PU is considered to be a polyetiological, genetically and pathogenetically heterogeneous disease. The main etiological

factors of gastroduodenal ulceration include hereditary predisposition, Helicobacter pylori infection, alterations in nervous and endocrine regulation, immune status, cytokine profile, neuroimmunoendocrine disorders and others. [3]. A particular place among the causes of PU nowadays is occupied by stress, including emotional stress, especially in people of the working age. In addition to psycho-emotional experiences, the causes of PU include major surgical interventions, thermal or mechanical

injuries, severe blood loss, progressive syndrome of endogenous intoxication and more. Among patients of intensive care units and intensive care units, the incidence of stress ulcers is 5.0%, and in 30.0-50.0% of cases stress ulcers are complicated by bleeding and perforation [2]. Erosion and ulceration of the gastric mucosa (GM) can occur within a few hours after hospitalization in the intensive care unit, and in the postoperative period such changes in the central nervous system are most common in the first three days after surgery, including due to lack of preoperative preparation [2]. The main pathogenetic links of stress-induced ulcerogenesis include: GM ischemia, hypersecretion of hydrochloric acid and decreased secretion of bicarbonate.

Given the above facts, the prevention of stress ulcers is of great medical and socio-economic importance. As a potential drug with antiulcer activity, our attention was drawn to the preparation of canned placenta extract (CEP), created by specialists of the Institute of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). It is known that CEP affects target organs, stimulating their functioning, and increases non-specific resistance of the body to adverse environmental factors and stressors, stimulates the reparative properties of cells in injuries and diseases of various origins [4, 5, 6].

According to current literature, CEP has a pronounced gastroprotective effect in terms of drug ulcerogenesis. Thus, against the background of prophylactic administration of antiulcer activity (AUA) CEP was 69.1% in acute indomethacin-induced gastropathy (ulcer index (UI)=3.5 and 1.08, respectively, in control rats and rats injected with CEP) [6].

The aim - to characterize the gastrocytoprotective effect of cryopreserved placenta extract on the model of water-immobilization stress in rats according to macroscopic data and the results of biochemical study of homogenates of the gastric mucosa.

Materials and Methods

In vivo experimental studies were performed on

28 nonlinear laboratory male rats weighing 200-220 g, divided into 4 groups: Group I - intact rats (n=7); Group II (control group) - rats with stress-induced damage of GM (n=7); Group III (n=7) - rats with stress-induced damage of GM, which in the prophylactic mode was administered intramuscularly (i/m) CEP ("Cryocell-cryoextract of the placenta") State Enterprise "Interdepartmental Research Center of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, the National Academy of Medical Sciences of Ukraine and the Ministry of Health of Ukraine", Ukraine); Group IV (n=7) - rats with stress-induced damage of GM, which in a prophylactic mode according to a scheme similar to the administered of CEP, were i.g. injected a proton pump inhibitor esomeprazole at a dose of 50 mg/kg [7, 8, 9].

Stress-induced gastric ulcer was modeled under water-immobilization stress (WIS) in rats, which at the level of pathobiochemical changes in the digestive system is equivalent to acute stress in humans [7]. WIS simulation according to the method of Takagi K.Y. et al., [10]. Rats were immobilized in individual plexiglass cases according to Kogan O.H. and immersed vertically to the level of the jugular fossa in water at a temperature of $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The animals were kept in water for 5 h and then removed from the experiment by cervical dislocation under inhalation "raush anesthesia".

After laparotomy along the white line of the abdomen (linea alba abdominis) a macroscopic evaluation of the size of the stomach (bloating) was performed along with assessment for the presence of adhesions with adjacent organs as a sign of perforation. The removed stomachs were opened along the greater curvature and washed in 0.9% NaCl solution. The effect of the studied drugs on the condition of the GM was assessed macroscopically by the following criteria: edema, redness and the presence of hemorrhages on the surface of the mucous membrane. For each group, the percentage of experimental animals was calculated according to these characteristics and the average value of the injury severity was assessed on the following scale: 0 points - no

signs of injury; 1 point - signs of injury are weakly expressed; 2 points - signs of injury are moderately expressed; 3 points - marked signs of injury.

In addition, GM's condition was assessed on a scale Calculation of the integrated GM condition index (an ulcerative index) was performed according to the formula [7]:

$$UI = (\text{Average score on the scale} \times \% \text{ rats with ulcers}) / 100$$

AUA determined by the formula:

$$AUA = (UI \text{ of the experimental group} - UI \text{ of the control group}) / UI \text{ of the control group} \times 100$$

The drug CEP "Cryocell-cryoextract of the placenta" according to the instructions is used in patients parenterally in a single dose of 1.8 ml. Accordingly, a single dose for rats is: $(1.8 \text{ ml} / 70 \text{ kg}) \times 6.35 = 0.16 \text{ ml/kg}$ body weight or 0.02 ml/100g body weight of rats.

CEP is obtained by scientists of the Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, who developed and put into practice a unique method of its long-term storage in a low-temperature environment. It is well known that the placenta has very high activity of a number of enzymes: respiratory enzymes (monoamine oxidase, cytochrome oxidase system), catalase, NAD- and NADPH-diaphorase, succinate dehydrogenase, histamine-histamine system, acetylcholine-acetylcholinesterase, factors of blood coagulation and fibrinolysis, etc. The placenta also synthesizes proteins belonging to the IL class - IL1, IL6, IL8, IL2, whose functions are the induction of humoral factors of nonspecific resistance, and the transforming growth factor secreted by the cells stimulates repair due to the activation of mesenchymal cells and neovascularization processes. In addition, placenta preparations include a number of growth factors: hepatocyte (HGF), insulin-like (IGF), fibroblast (FGF), epidermal (EGF), nerve (NGF), colony-stimulating (CSF), etc. [4-6]. Studies have shown that CEP affects target organs, stimulating their work, and achieves non-specific resistance of substances to adverse environmental factors and stress factors, exhibits antioxidant, immunomodulating, anti-shock,

metabolotropic effects [4-6]. Before using the drug "Cryocell-cryoextract of the placenta" a single dose (0.16 ml/kg) extemporaneously (ex tempore - if necessary) was diluted in 0.9% solution of NaCl (PJSC "Pharmaceutical Company" Darnitsa", Ukraine) with calculation of 0.1 ml of 0.9% NaCl solution/100 g of body weight and was administered in the preventive mode - once a day for 5 days [4, 7].

The activity of NO synthases (NOS) in GM was determined spectrophotometrically by the amount of oxidized NADPH₂ [11]. To obtain the homogenate, the GM was perfused with cold (+4°C) buffer (250 mmol sucrose, 5 mmol Na₂EDTA, 5 mmol Tris-HCl buffer (pH 7.4)) and homogenized at 3000 rpm (Teflon glass) in buffer. GM homogenates were incubated for 20 min at 40°C with 1 ml of reaction mixture (in determining the total activity of NOS (iNOS and cNOS): CaCl₂, Tris-HCl, MgCl₂, NADPH+H⁺, L-Arg, in determining the activity of iNOS: EDTA, Tris-HCl, MgCl₂, NADPH+H⁺, L-Arg) [11]. The reaction was stopped by the addition of 0.3 ml of HClO₄ and centrifuged (3000 rpm), the concentration of NADPH₂ in the supernatant was determined, which was recorded by light absorption at a wavelength of $\lambda = 340 \text{ nm}$. cNOS activity was defined as the difference between the level of total NOS and iNOS. NO synthase activity was expressed in nmol NADPH₂/min × g protein.

Bioethical compliance. All experimental studies on laboratory animals were performed in accordance with the requirements of Good Laboratory Practice and in compliance with the basic provisions of the Council of Europe Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used in Experiments and Other Scientific Purposes of 18 March 1986, European Parliament and Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals.

Prior to the experiment, rats were quarantined for 14 days (Order № 755 of 12.08.1997 "Structure and maintenance of experimental biological clinics"), followed by randomization into groups of 7 individuals in

each with subsequent maintenance in standard water-food conditions. ration (Order № 163 of 10.03.1996 "On daily feeding rates of laboratory animals and producers") with free access (ad libitum) to water and food. In all series of studies, animals in groups were marked individually [7]. Statistical analysis. Evaluation of the nature of the distribution of values in each group of the sample was performed using the W-test Shapiro-Wilk test. Homogeneity of dispersions was determined by Levene's test. To assess the significance of the identified differences in the studied indicators under different experimental conditions, statistical analysis was performed using parametric or nonparametric criteria.

The probability of differences between the percentages of qualitative parameters in the alternative form was determined by the value of the F-test of Fisher's angular transformation (F-test).

In case of normal distribution of the independent values, the differences between the groups were determined in pairs by the Student's t-test. In case of abnormal distribution of at least one of the groups of independent quantities, the differences between them were determined in pairs by the nonparametric Mann-Whitney rank U-test. The obtained values were compared with the critical ones with a probability level above 95.0% ($p \leq 0.05$), above 99.0% ($p \leq 0.01$), above 99.5% ($p \leq 0.005$) and above 99.9% ($p \leq 0.001$) and concluded that the probability of error.

Numerical data in the case of normal distribution of values are given as "M±m" (M±SE), where M is the arithmetic mean, m (SE) is the standard error of the arithmetic mean or M (95% CI: 5% -95%), where 95% CI: - 95% confidence interval.

At abnormal distribution of the received sizes the data are presented in the form of Me [LQ; UQ], where Me is the median, [LQ; UQ] is the upper limit of the lower quartile (LQ) and the lower limit of the upper quartile (UQ). [7].

Results and Discussion

The study showed that five-hour immobilization of rats with immersion in water led to statistically significant ($p < 0.05$) GM ulceration in 100.0% of control rats (Tab. 1). Macroscopic examination of animals in the control group showed multiple erosions and hemorrhages and hyperemia of the central nervous system, and UI was 3.9. The use of CEP, as well as esomeprazole, led to a weakening of SOS ulcers. This was indicated by a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in UI relative to the rats of the control group in 9.8 and 3.3 times, respectively (Tab. 1). At the same time, this figure was three times lower on the background of preventive use of CEP than in rats administered esomeprazole, AUA was 96.4% and 69.2%, respectively. This indicates a more pronounced AUA CEP in terms of prophylactic regimen, compared with esomeprazole, which is consistent with the mechanism of action of

Table 1

Influence of CEP under the preventive mode of administration on the state of the secondary school on the background of water-immobilization stress in rats (M±m (95% CI) or Me [LQ; UQ], n=28)

Conditions of the research	n		Flatulence	Erosions and hemorrhages	Hyperemia	Edema	Folding disorders	Number of animals with ulcers, abs. (%)	Average score in the group	UI
Intact rats	7	abs. (%)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0	0
		Point	0	0	0	0	0			
WIS	7	abs. (%)	0/7 (0)	7/7* (100)	7/7* (100)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	7/7* (100)	3,9±0,26* (95%ДІ: 3,3–4,4)	3,9
		Point	0	3 [3; 3]*	3 [3; 3]	0 [0; 2]	0 [0; 2]			
WIS+CEP	7	abs. (%)	0/7 (0)	2/7# (28,6)	3/7*# (42,9)	0/7 (0)	0/7 (0)	2/7# (28,6)	1,3±0,34*# (95%ДІ: 0,6–2,0)	0,4
		Point	0	0 [0; 1,5]#	0 [0; 2,5]	0	0			
WIS+Esomeprazole	7	abs. (%)	2/7 (28,6)	5/7* (71,4)	3/7*# (42,9)	0/7 (0)	0/7 (0)	4/7* (57,1)	2,1±0,49*# (95%ДІ: 1,1–3,0)	1,2
		Point	0 [0; 1]	2 [1; 3]*	0 [0; 1]	0	0			

* - $p < 0.05$ relative to intact animals

- $p < 0.05$ relative to the performance of rats exposed to WIS (control group)

the latter, because proton pump inhibitors are effective in the therapeutic regimen. At the same time, the study showed that a five-day administration of CEP shows a pronounced AUA in the WIS model in rats. Erosive-ulcerative lesions of the central nervous system on the background of CEP were observed in only 28.6% of rats, and hyperemia of the central nervous system - only 42.9%, while on the background of esomeprazole erosion, hemorrhage and ulcerative defects of the central nervous system were observed in 71.4% animals.

To study the mechanisms of AUA CEP on the background of WIS in rats, we conducted biochemical studies of NOS homogenates to determine the activity of NOS, because it is well known that the leading mechanism of ulcerogenic stress is vascular vasoconstriction due to catecholamines with subsequent endothelial. However, it is known that excessive amounts of NO exhibit both protective and cytotoxic properties [12, 13].

It was found that 5-hour exposure to WIS led to a statistically significant ($p < 0.001$) increase in total NOS activity twice compared to intact rats and was 1.23 ± 0.02 NADPH₂/min

×g protein and 0.62 ± 0.02 NADPH₂/min×g protein, respectively (Tab. 2). The study of the activity of constitutive (cNOS) and inducible (iNOS) isoforms of NOS showed that at the pathobiochemical level on the background of stress-induced ulcerogenesis in the tissues of the central nervous system there is a statistically significant ($p < 0.001$) increase in iNOS activity in 5.2 times relative to 0.89 ± 0.01 NADPH₂/min×g protein. At the same time, there was a statistically significant ($p < 0.001$) decrease in cNOS activity by 24.5% relative to the indicators of animals that were not exposed to WIS (Tab. 2).

The obtained data are consistent with the literature that the excess of this NO in conditions of significant growth of its formation in stress-induced damage, has a cytotoxic and proinflammatory effect, because hypoxia, which occurs with increasing catecholamines, is a prerequisite for oxidative stress. Interaction with the superoxide anion O²⁻ with NO produces a highly active strong oxidant - peroxynitrite (ONOO⁻), which interacts with lipids, can cause peroxidation of the latter, and the formation of nitrotyrosine in interaction with tyrosine residues of proteins disrupts their functions. metabolism at all levels [14, 15].

Table 2

Influence of CEP under the prophylactic regimen of administration on the activity of NOS isoforms against the background of water-immobilization stress in rats ($M \pm m$ (95% CI), $n = 28$)

The studied indicator, units of measurement	Conditions of the experiment			
	Group I	Group II	Group III	Group IV
	Intact rats	Control (WIS)	WIS+CEP	WIS+Esomeprazole
n	7	7	7	7
NOS activity, nmol NADPH ₂ /min×g protein	$0,62 \pm 0,02$ (95 % CI: 0,57–0,66)	$1,23 \pm 0,02$ (95 % CI: 1,19–1,28) $p_{1-2} < 0,001$	$0,79 \pm 0,05$ (95 % CI: 0,70–0,89) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	$1,02 \pm 0,03$ (95 % CI: 0,97–1,07) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,01$
Activity iNOS, nmol NADPH ₂ /min×g protein	$0,17 \pm 0,01$ (95 % CI: 1,15–0,19)	$0,89 \pm 0,01$ (95 % CI: 0,87–0,92) $p_{1-2} < 0,001$	$0,37 \pm 0,01$ (95 % CI: 0,34–0,39) $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	$0,58 \pm 0,04$ (95 % CI: 0,50–0,66) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$
Activity cNOS, nmol NADPH ₂ /min×g protein	$0,45 \pm 0,02$ (95 % CI: 0,41–0,49)	$0,34 \pm 0,02$ (95 % CI: 0,31–0,37) $p_{1-2} < 0,001$	$0,43 \pm 0,06$ (95 % CI: 0,31–0,55) $p_{1-3} = 0,7$ $p_{2-3} = 0,18$	$0,43 \pm 0,04$ (95 % CI: 0,36–0,51) $p_{1-4} = 0,7$ $p_{2-4} = 0,04$ $p_{3-4} = 0,9$

Indices 1, 2, 3 indicate the number of the group between the indicators of which the comparison was made
 p_{2-1} - the level of statistical probability of discrepancy

It is known that the formation of peroxynitrite is the main pathway of NO metabolism. Its amount depends in vivo on the relative entry of NO and superoxide anion into tissues, and the concentrations of both free radical compounds should be approximately the same [14, 15]. There is evidence that peroxynitrite stimulates matrix metalloprotein kinase-8 (MMP-8), which plays an important role in tissue destruction and rearrangement both in physiological conditions and in the development of inflammation and infection. In addition to activating MMP-8, peroxynitrite readily inactivates the tissue MMP inhibitor and the proteinase inhibitor (neutrophil elastase) in human blood plasma. Thus, ONOO accelerates tissue damage and causes the development of various pathological conditions of the body by activating cyclooxygenase - a key enzyme in the synthesis of prostaglandins, which are strong mediators of inflammation. In addition, prolonged exposure to vascular smooth muscle cells has led to a loss of the latter's ability to respond normally to physiological stimuli, resulting in irreversible relaxation of myocytes. Such processes can lead to disruption of regional blood flow, which is a damaging factor in ulcerogenesis [14, 15].

Prophylactic five-day administration of CEP resulted in a statistically significant ($p < 0.01$) reduction in stress-induced hyperexpression in both NOS and iNOS (Tab. 2), which were in agreement with the literature data [16, 17]. Thus, the activity of iNOS was statistically significant ($p < 0.001$) decreased by 58.4% relative to animals in the control group and was 0.37 ± 0.01 NADPH₂/min×g protein, the activity of cNOS on the contrary increased by 26.4%, but these changes did not reach the level of statistical significance ($p = 0.18$).

According to the degree of modulation of the activity of both total NOS and its individual isoforms, the study showed that preventive five-day administration of esomeprazole is inferior to the effectiveness of CEP (Tab. 2). Thus, the activity of total NOS in rats administered esomeprazole was statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by only 17.1%, while

against the background of CEP activity of this enzyme decreased ($p < 0.001$) by 35.8% (Tab. 2).

Conclusions

1. A 5-hour exposure to BIS has been found to lead to erosive-ulcerative lesions of the central nervous system in 100.0% of rats, caused by hyperactivation of the NOS system and mediated by cytotoxic action of NO, as demonstrated by statistically significant ($p < 0.001$) 2-fold increase of activity of the total NOS.
2. Prophylactic five-day administration of cryopreserved placenta extract has been shown to modulate the activity of the NOS system in the gastric mucosa proved by a macroscopic study demonstrating a statistically significant ($p < 0.05$) 9.8 times reduction in ulcer index as compared with rats of the control group. Thus, NOS activity statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by 35.8%, and iNOS activity statistically significantly ($p < 0.001$) decreased by 58.4% as compared with the control animals.
3. Cryopreserved placenta extract in the prophylactic regimen showed a more pronounced anti-ulcer activity as compared with esomeprazole, which was 96.4% and 69.2%, respectively.

Prospects for further research

The obtained data on the pronounced antiulcer activity of CEP in the model of stress-induced lesions of the central nervous system indicate the relevance of further in-depth studies of the pathobiochemical mechanisms of gastroprotective action of this extract.

Conflict of interest

The author of the manuscript knowingly acknowledges the absence of actual or potential conflict of interest regarding the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, other organizations whose products, services, financial support may be related to the subject or sponsored research.

Funding information

Financing by expenditures of the State Budget of Ukraine.

References

- 1.Shell EJ. Pathophysiology of peptic ulcer disease. *Physician Assistant Clinics*. 2021;6(4):603-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpha.2021.05.005>.
- 2.Iskra I, Bilyaev A. The frequency of stress ulcers and their dependence on the acidity of gastric contents in the perioperative period in children. *Ukrainian Scientific Medical Youth Journal*. 2017;1(99):31-6. <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/34>.
- 3.Skrypnyk IM, Neporada KS, Hopko OF. The role of stress in the pathogenesis of peptic ulcer of the gastroduodenal zone. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2017;4(1):70-3.
- 4.Koshurba IV, Chyzh MO, Hladkykh FV. Gastroprotective action of cryopreserved placenta extract under a prophylactic regimen. *Scientific Bulletin of Uzhhorod University. "Medicine" series*. 2022;1(63):20-25. DOI: <https://doi.org/10.32782/2415-8127.2022.65.4>.
- 5.Hladkykh F. V. Gastrocytoprotective properties of cryopreserved placenta extract in combined action of low temperatures and inhibition of cyclooxygenase. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2022;39(1):48-56. DOI: <https://doi.org/10.5937/afmnai39-33036>.
- 6.Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Evaluation of the antiulcerogenic effect of cryopreserved placenta extract on a model of alcohol-prednisone gastric damage. *Medical science of Ukraine*. 2022;18(2):3-9. DOI: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2022.01>.
- 7.Stefanov OV. *Preclinical studies of drugs: guidelines*. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
- 8.Rybolovlev UR, Rybolovlev RS. Dosage of substances for mammals by constants of biological activity. *Reports of the USSR Academy of Sciences*. 1979;247(6):1513-6.
- 9.Wei Xie, Xielin Huang, Renpin Chen, Ruru Chen, Tang Li, Wei Wu, Zhiming Huang. Esomeprazole alleviates the damage to stress ulcer in rats through not only its antisecretory effect but its antioxidant effect by inactivating the p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;22(13):2969-84. DOI: <http://doi.org/10.2147/DDDT.S193641>.
- 10.Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Modulation of lipoperoxidation and energy metabolism in the gastric mucosa as a mechanism of placenta cryoextract activity in the healing of stress-induced erosive-ulcerative damage. *Gastroenterology*. 2022;56(3):149-55. DOI: <https://doi.org/10.22141/2308-2097.56.3.2022.503>.
- 11.Gula NM, Kosyakova GV, Berdishev AG. Effect of N-stearoylethanolamine on the NO-synthase pathway of nitric oxide generation in the aorta and heart of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2007;79(5):153-8.
- 12.Motko N, Fomenko I, Vozna O. The role of gas mediators of nitrogen (II) oxide and hydrogen sulfide in the development of pathochemical changes in the mucous membrane of rats at water-immobilization and adrenaline-induced stress modeling. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*. 2020;22(97):88-94. DOI: <http://doi.org/10.32718/nvlvet9715>.
- 13.Kurkin DV, Abrosimova EE, Bakulin DA, Kovalev NS, Dubrovina MA, Borisov AV, Strygin AV, Morkovin EI, Tyurenkov IN. Activity modulation of various nitric oxide syntases as an approach to endothelial dysfunction therapy. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(2):130-53. DOI: <http://doi.org/10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153>.
- 14.Oleschuk OM, Chornomidz AV. The value of nitric oxide system in the functioning of the stomach in normal and in pathology. *Medical and Clinical Chemistry*. 2016;18(2):84-95. DOI: <http://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i2.6679>.
- 15.Maksymovych YaS, Mylenko MV, Drobinska OV, Ostapchenko LI. Nitric oxide synthase activity and peroxynitrite content in cells of rat's mucous coat of stomach under experimental stress-induced ulcer. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology*. 2009;17(1):128-33. <https://www.ceeol.com/search/article-detail?id=621501>
- 16.Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Comparative characteristics of the antiulcer activity of cryoextract of the placenta under different modes of use in the experiment. *Actual problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Stomatological Academy*. 2022;2(2):5-70. DOI: <https://doi.org/10.31718/2077-1096.22.2.65>.
- 17.Koshurba I.V., Hladkykh F.V., Chyzh M.O. Effect of placenta cryoextract on the state of protein-lipid metabolism in the gastric mucosa during experimental stress-induced ulceration. *Eastern Ukrainian medical journal*. 2022;10(2):155-164. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10\(2\):155-164](https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10(2):155-164).