

© 2021 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/aml2021.3-4.068>

УДК: 615.36+618.46+615.276+616.3-07+616.33-07

ПРОТИВИРАЗКОВА АКТИВНІСТЬ КРІОЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНДОМЕТАЦИН-ІНДУКОВАНОМУ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗІ

Гладких Ф.В.^{1,2} ORCID: 0000-0001-7924-4048

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

² 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

ANTIULCER ACTIVITY OF PLACENTAL CRYOEXTRACT IN EXPERIMENTAL INDOMETHACIN-INDUCED ULCEROGENESIS

Fedir Hladkykh^{1,2} ORCID: 0000-0001-7924-4048

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

² State 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

Ключові слова: кріоконсервований екстракт плаценти, нестероїдні протизапальні засоби, індометацин, ультцерогенність, ентеропротекція

Для цитування: Гладких Ф.В. Протівивразкова активність кріоекстракту плаценти при експериментальному індометацин-індукованому ультцерогенезі. Львівський медичний часопис. 2021. Т. 27. № 3-4. С. 68-83. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.068>

Для кореспонденції: Гладких Федір Володимирович, Державна установа "Інститут медичної радіології та онкології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України", м. Харків, Україна, 61024; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Стаття надійшла: 16.07.2021 **Прийнята до друку:** 5.11.2021

Keywords: cryopreserved placenta extract, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin, ulcerogenicity, enteroprotection

For citation: Hladkykh FV. Antiulcer activity of placental cryoextract in experimental indomethacin-induced ulcerogenesis. *Acta Medica Leopoliensia*. 2021;27(3-4):68-83. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.068>

For correspondence: Hladkykh Fedir Volodymyrovych, State Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Radiology Department, Kharkiv, Ukraine, 61024; e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Received: July 16, 2021 **Accepted:** November 5, 2021

Реферат

Мета. На сьогодні залишається актуальною проблема пошуку шляхів послаблення побічних ефектів, які спостерігаються у близько 30-60% пацієнтів, які використовують індометацин. Нашу увагу у якості засобу патогенетичної корекції ультцерогенної дії індометацину привернув кріоконсервований екстракт плаценти (КЕП). Мета роботи - охарактеризувати протівивразкову активність кріоконсервованого екстракту плаценти на моделі індометацин-індукованого ультцерогенезу.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200-220 г. Гостре індометацин-ін-

Abstract

Aim. The side effects associated with the use of indometacin are noted by about 30-60% of patients, therefore, in this context the problem of adverse event rate reduction is still relevant today. Cryopreserved placental extract (CEP) attracted our attention as a means of pathogenetic correction of the ulcerogenic action of indomethacin. The aim of the paper is to characterize the antiulcer activity of cryopreserved placenta extract on a model of indomethacin-induced ulcerogenesis.

Materials and Methods. *In vivo* experimental studies were performed on 28 nonlinear laboratory male rats weighing 200-220 g. Acute indomethacin-induced gastrointestinal injury was replicated by a single injection

дуковане ушкодження шлунково-кишкового тракту відтворювали шляхом одноразового введення цурам індометацину в дозі 60 мг/кг. Евтаназію тварин проводили через 4 год. після введення.

Результати й обговорення. Макроскопічна оцінка стану слизової оболонки шлунка показала, що у всіх тварин наявні численні точкові геморагії, а у 49,2% цурів спостерігалась слабо виражена гіперемія та порушення складчастості. Оцінка стану слизової оболонки тонкої кишки показала, що у 57,1% цурів, яким вводили тільки індометацин, виявлялось $11,1 \pm 4,1$ виразок на 10 см довжини. Профілактичне введення езомепразолу привело до статистично вірогідного ($p < 0,05$) ослаблення ульцерогенної дії індометацину на слизову оболонку шлунка - середній бал стану слизової оболонки у 3,9 рази був нижчим за показники цурів контрольної групи та становив $0,9 \pm 0,26$.

Висновки. На тлі комбінованого застосування індометацину та КЕП виразковий індекс був у 1,9 нижчим, ніж у цурів, яким вводили тільки індометацин, що вказує на гастропротективну активність КЕП. На відміну від езомепразолу, введення КЕП чинить виразну ентеропротективну дію, що засвідчила відсутність ушкоджень слизової тонкої кишки у цурів, яким вводили досліджуваний кріоекстракт та індометацин.

Вступ

Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) - це великий клас лікарських засобів, які займають провідне місце у фармакотерапії патологічних процесів, що проявляються больовим синдромом, запаленням, лихоманкою та ін. В останні роки у всьому світі спостерігається значне збільшення спектру показань та частоти призначень НПЗЗ, що зумовлено, зокрема, зростанням питомої ваги захворювань, які потребують призначення препаратів цієї групи, у т.ч. остеоартрозу, ревматоїдного артриту та ін., та, з іншого боку, демографічним "постарішанням" населення [1, 2, 3].

До числа найуживаніших НПЗЗ ще з минулого століття належать похідні оцтової (індометацин, диклофенак, суліндак та ін.) та похідні пропіонової (ібупрофен, напроксен, кетопрофен та ін.) кислот. Індометацин (1-(пара-хлорбензоїл)-5-метокси-2-метиліндол-3-оцтова кислота) займає особливе місце серед усіх НПЗЗ. Він був одним з найперших серед перелічених НПЗЗ, який було впроваджено в клінічну практику. Клінічні дослідження індометацину було розпочато у 1961 р.,

of indomethacin at 60 mg/kg in rats. Euthanasia of animals was performed after 4 hours after indomethacin administration.

Results and Discussion. Macroscopic evaluation of the condition of the gastric mucosa showed that all animals had numerous pinpoint hemorrhages, and 49.2% of rats had mild hyperemia and abnormal folding. Evaluation of the condition of the small intestinal mucosa showed that 57.1% of rats injected with indomethacin alone had 11.1 ± 4.1 ulcers per 10 cm of mucosa length. Prophylactic administration of esomeprazole led to a statistically significant ($p < 0.05$) attenuation of the ulcerogenic effect of indomethacin on the gastric mucosa - the mean score of the mucosa was 3.9 times lower than in control rats and was 0.9 ± 0.26 .

Conclusions. The combined use of indomethacin and CEP was associated with a 1.9-fold lower ulcer index as compared with rats administered indomethacin only, thus demonstrating the gastroprotective activity of CEP. In contrast to esomeprazole, the introduction of CEP has a pronounced enteroprotective effect, as indicated by the absence of damage to small intestinal mucosa in rats treated with the studied cryoextract and indomethacin.

а у 1965 р. його вже було дозволено до медичного застосування. Індометацин отримав визнання, оскільки став одним з перших засобів, який був ефективним у лікуванні мігрені та головного болю, а також у тогочасній клінічній практиці отримав назву "болю, що купується індометацином" [4].

Однак, незважаючи на успішне застосування індометацину у клінічній практиці понад п'ятдесят років, на сьогодні залишається актуальною проблема пошуку шляхів послаблення побічних ефектів, які зауважують близько 30-60% пацієнтів, що отримують звичайні терапевтичні дози вказаного НПЗЗ, а близько 10-20% вимушені вдаватись до припинення його застосування [4]. Так нудоту, печію та/або епігастральний біль відмічають 3-9% пацієнтів, а 1-3% пацієнтів скаржаться на розвиток діареї чи болю у животі при застосуванні індометацину [4].

В останні десятиліття розроблено цілу низку заходів, спрямованих на зниження ульцерогенної дії індометацину на шлунково-кишковий тракт (ШКТ). У клініці успішно застосовується поєднане застосування НПЗЗ,

зокрема індометацину, з інгібіторами протонної помпи (ІПП), H₂-гастаміноблокаторами, синтетичними аналогами простагландинів або стимуляторами їх синтезу та ін, проте, всі вказані засоби корекції володіють власними побічними ефектами, що не дозволяє вважати такий підхід "золотим стандартом" [1, 2, 5].

Вже наведені факти обґрунтовують доцільність пошуку нових підходів до послаблення ульцерогенної дії індометацину [4]. Так в останні роки проведені експериментальні дослідження, які продемонстрували доцільність комбінованого застосування з індометацином у якості гастро-/ ентеро-протектантів цукрознижувального лікарського засобу класу бігуанідів метформіну [6], синтетичного антигіпертензивного препарату, що належить до групи бета-блокаторів небівололу

[7], пептидного гормону обестатину [8], інгібітор фосфодіестерази для лікування еректильної дисфункції силденафілу [9], флаваноїду діосміну [9] та ін.

Нашу увагу у якості засобу патогенетичної корекції привернув вітчизняний біотехнологічний препарат, розроблений колективом Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України - кріоконсервований екстракт плаценти (КЕП), якому притаманна мультивекторність дії, обумовлена вмістом низки високоактивних біологічних речовин (Табл. 1) [2, 10, 11].

Технологія отримання КЕП. Донорами плацент виступають здорові породіллі, що повинні бути обстежені аналогічно донорам крові. Плацента заготовлюється після операції кесарового розтину. Препарати підлягають обо-

Таблиця 1

Біологічно активні речовини, які містяться в кріоекстракті плаценти [10]

Назва біологічно активних речовини	Характеристика	Вміст
Альфа-фетопротеїн	Активатор (або інгібітор) росту ембріональних, трансформованих, активованих імункомпетентних клітин	429±75 мМЕ/мл
Хоріонічний гонадотропін	Активатор імунної системи, стимулює виробку стероїдних гормонів (тестостерон та естрадіол)	26,8±8 мМЕ/мл
Естрадіол	Репродуктивна функція, кардіопротекторна дія	755±48 пМоль/мл
Прогестерон	Репродуктивна функція, кардіопротекторна дія	226±110 нМоль/мл
Пролактин	Вплив на розвиток вторинних статевих ознак, еритропоетична дія, регуляція жирового обміну	705±129 мМЕ/мл
АМГФ	Підготовка до вагітності, процес зачаття, нормальний розвиток фетоплацентарної одиниці	1470±173 нг/мл
Лактоферин	Стимуляція лактації	1270±223 нг/мл
СТГ	Гормон росту, анаболічна дія	5,64 нг/мл
Лютетінізуючий гормон	Гормон гіпофізу, секретія естрогенів, прогестерону, тестостерону	7,8±1,9 МЕ/л
Фолликулостимулюючий гормон	Гормон гіпофіза, сприяє дозріванню фолікулів в яєчниках та сперматогенезу	7,1±2,3 мМЕ/л
Тестостерон	Диференціювання та функціонування репродуктивної системи, анаболічна дія	3,68±1,06 нМоль/мл
Тіреотропний гормон	Стимуляція функції щитоподібної залози, імуномодельюча дія	291±13 мМЕ/л
T3	Стимуляція обміну речовин, росту та диференціювання тканин, процеси розмноження, гемопоєз	2,1±0,6 пМоль/л
T4	Стимуляція обміну речовин, росту та диференціювання тканин, процеси розмноження, гемопоєз	5,6±0,99 пМоль/л
Кортизол	Обмін білків, вуглеводів, жирів та нуклеїнових кислот	1392±515 нМоль/мл
G-CSF	Проліферація клітин кісткового мозку	9,87 нг/мл
ФНО-α	Інгібітор проліферації ракових клітин	84,5 пкг/мл
IL-1β	Регуляція диференціювання поліпотентних стовбурових клітин, імуноендокриної системи	201,7 пкг/мл
IL-4	Регуляція диференціювання поліпотентних стовбурових клітин, імуноендокриної системи	21,7 пкг/мл
IL-6	Регуляція диференціювання поліпотентних стовбурових клітин, імуноендокриної системи	114,9 пкг/мл
Загальний білок	Пластична функція	76,5±14 мг/1 г ваги

в'язковому обстеженню на пренатальні інфекції, сифіліс, синдром набутого імунodefіциту, гепатити А, В, С, цитомсгаловірусну інфекцію.

Перед кріоконсервуванням плаценту відмивають від крові, фрагментують, відділяють амніотичну оболонку та опускають у флакони із 0,2 л 0,9% розчину (р-ну) КСІ, 250 мг канаміцину та 4 мл димексиду.

Фрагменти плацентарної тканини опускають в флакон із 0,5 л 0,9% р-ну NaCl. Флакон похитують впродовж 1-2 хв, зливають надосад та доливають новий фізіологічний р-н. Цю процедуру повторюють 5-6 разів.

До диспергованої тканини додають 0,9% р-ну NaCl (1:2), витримують добу при температурі 4°C та центрифугують 15-20 хв. при 4000 об/хв. Одержаний надосад фільтрують через міліпорові фільтри (діаметр 0,22 мкм), фасують в ампули прозорого скла та зберігають у рідкому азоті [10].

Мета роботи - охарактеризувати противиразкову активність кріоконсервованого екстракту плаценти на моделі індометацин-індукованого ульцерогенезу.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200-220 г, які утримувались в умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, розділених на 4 групи:

- I - інтактні щури (n=7);
- II група (контрольна група) - щури з індометацин (АТ "Софарма", Болгарія)-індукованим ульцерогенезом (n=7);
- III група (n=7) - щури з індометацин-індукованим ульцерогенезом, яким в 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 група (n=7) - щури з індометацин-індукованим ульцерогенезом, яким у профілактичному режимі за схемою, аналогічною введенню КЕП, внутрішньошлунково (в/шл)

вводили інгібітор протонної помпи V покоління езомепразол (АТ "Актавіс", Ісландія) в дозі 50 мг/кг (5 ін'єкцій за 5 днів до введення індометацину) [12].

Гостре індометацин-індуковане ушкодження ШТК відтворювали шляхом одноразово в/шл введення щурам індометацину в дозі 60 мг/кг (6 УД50) [14]. Евтаназію тварин проводили через 4 год. після введення НПЗЗ шляхом цервікальної дислокації під інгаляційним наркозом.

Після видалення стравоходу з органоконструкції його розрізали у повздовжньому напрямку та проводили макроскопічну оцінку структури СО, враховуючи рекомендації міжнародної наукової номенклатурної групи Vevey (2011 р.) про важкість езофагіту та розширення стандартної Лос-Анжелеської класифікації гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби, виокремлюючи нові стадії: М (мінімальні заміни, гіперемія, набряк СО стравоходу) та N (зміни відсутні) [15, 16].

Після лапаротомії по білій лінії живота (*linea alba abdominis*) проводили оцінку розмірів шлунка (здуття) та наявності спайкових процесів з суміжними органами, як ознак перфорації. Екстирповані шлунки розкривали по великій кривизні (*curvatura ventriculi major*), промивали у 0,9% р-ні NaCl та робили знімки за допомогою цифрового фотоапарату Canon PowerShot SX120 IS. Вплив досліджуваних лікарських засобів на стан шлунка оцінювали макроскопічно за наступними 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 наступною шкалою:

- 0 балів - ознака відсутня;
- 1 бал - ознака слабо виражена;
- 2 бали - ознака помірно виражена;
- 3 бали - ознака добре виражена [13, 17].

Окрім того проводили оцінку стану слизової оболонки шлунка (СОШ) за бальною шкалою Яковлевої Л. В. (Табл. 2) [13, 17].

Розрахунок інтегрального показника

Таблиця 2

Бальна оцінка стану СО шлунка

Бали	Характеристика стану СОШ
0	Відсутність видимих ушкоджень.
1	Наявність однієї або декількох ознак з переліку: набряк, крововилив(и), виразка(и) діаметром до 1 мм в кількості не більше трьох
2	Більше трьох виразок діаметром до 1 мм або одна виразка діаметром до 3 мм
3	Наявність бодай однієї виразки діаметром до 4 мм
4	Декілька виразок діаметром до 4 мм
5	Перфоративна виразка

стану СОШ - виразкового індексу (ВІ) проводили за формулою:

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

Для уникнення впливу на експеримент добового ритму біологічної активності досліди виконували завжди у першій половині дня з 8 до 11 години. У разі загибелі тварин та здійснювали макроскопічний аналіз органів черевної порожнини з метою встановлення, що летальний вихід тварини не був обумовлений маніпуляційними помилками, а також для визначення вірогідної причини загибелі. Різниця цільової концентрації речовин в крові ссавців та людини, яка залежить від інтенсивності їх надходження та елімінації, обумовлює видові відмінності в дозах лікарських препаратів для досягнення еквівалентних ефектів. Тому для екстраполяції середньотерапевтичних доз для людини на ізоеквівалентні дози для щурів нами здійснено перерахунок за методом Риболовлева Ю. Р. та співав. (1979 р.) із використанням коефіцієнту видової витривалості (R), який обчислюється за формулою [18]:

$$R = \sqrt{Q \times V / Kc}$$

де R - коефіцієнт видової витривалості;
Q - основний обмін, ккал/кг×год;
V - об'єм серцевої діяльності, л/кг×год;
Kc - коефіцієнт церебрації (Kc = маса мозку, г/маса тіла, кг).

Показник $\sqrt{Q \times V}$ характеризує витривалість організму до дії хімічної речовини, а коефіцієнт церебрації (Kc) дозволяє врахувати можливі зміни у функціонуванні регуляторних механізмів нервової системи в підтримці гомеостазу.

Так для щурів

$$R = \sqrt{(4,8 \text{ ккал/кг} \cdot \text{год} \times 23,0 \text{ л} \cdot \text{кг/год}) : (1,68 \text{ г} : 0,2 \text{ кг})} = 3,62;$$

для мишей

$$R = \sqrt{(7,1 \text{ ккал/кг} \cdot \text{год} \times 30,0 \text{ л} \cdot \text{кг/год}) : (0,42 \text{ г} : 0,02 \text{ кг})} = 3,20;$$

для людини

$$R = \sqrt{(1,02 \text{ ккал/кг} \cdot \text{год} \times 6,4 \text{ л} \cdot \text{кг/год}) : (1400 \text{ г} : 70,0 \text{ кг})} = 0,57;$$

[18].

Згідно з методикою, доза для тварин (D_2) вираховується відповідно до пропорції:

$$\frac{D_1}{R_1} = \frac{D_2}{R_2}$$

за формулою:

$$D_2 (\text{мг/кг}) = (D_1 (\text{мг/кг}) \times R_2) : R_1$$

де D_1 - доза для людини, мг/кг маси тіла;

D_2 - доза для тварин, мг/кг маси тіла;

R_1 - константа видової витривалості для людини;

R_2 - константа видової витривалості для тварин.

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 щура.

Перед застосуванням препарату "Кріоцелл-кріоекстракт плаценти" разову дозу (0,16 мл/кг) екстемпорально (ex tempore - за потребою) 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 впродовж 5 днів до НПЗЗ (останнє введення за 60 хв до в/шл введення індометацину) [13].

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, 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 Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (витяг з Протоколу № 2 від 11 березня 2020 р.). До початку експерименту щури впродовж 14 діб перебували в умовах карантину (Наказ № 755 від 12.08.1997 р. "Структура та утримання експериментальних біологічних клінік"), після чого проводилась рандомізація на групи по 7 особин в кожній із подальшим утриманням в умовах стандартного водно-харчового раціону (Наказ № 163 від 10.03.1996 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 [13].

Статистичне опрацювання результатів. Статистичне опрацювання 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 в 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 принаймні 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 значення 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 " $M \pm m$ " ($M \pm SE$), 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) [13].

Результати й обговорення

Проведене дослідження показало, що одноразове введення індометацину в дозі 60 мг/кг призводило до статистично вірогідного ($p < 0,05$) розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень шлунка у 100% щурів та тонкої кишки у 57,1% щурів (Табл. 3). Окрім того, у 57,1% тварин відмічено M -стадію езофагіту та Лос-Анджелеською класифікацією гастроезофагеальної рефлюксної хвороби (Табл. 4).

Макроскопічна оцінка стану СОШ по-

Таблиця 3

Стан СОШ на тлі індометацин-індукованої гастропатії ($M \pm t$ або $Me [LQ; UQ]$, $n=28$)

Умови досліджу		Показник				
		Здуття	Геморагії	Гіперемія	Набряк	Порушення складчастості
Інтактні щури ($n=7$)	Абс. (%)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)
	Бали	0	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0	0 [0; 0]
Індометацин ($n=7$)	Абс. (%)	0/7 (0)	7/7* (100)	3/7* (42,9)	0/7 (0)	3/7* (42,9)
	Бали	0	3 [3; 3]*	0 [0; 2]	0	0 [0; 3]
Індометацин + КЕП ($n=7$)	Абс. (%)	0/7 (0)	5/7* (71,4)	0/7# ° (0)	0/7 (0)	0/7# (0)
	Бали	0	1 [0,5; 2,5]*#	0 [0; 0]	0	0
Індометацин + Езомепразол ($n=7$)	Абс. (%)	0/7 (0)	3/7*# (42,9)	3/7 (42,9)	0/7 (0)	0/7# (0)
	Бали	0	0 [0; 2]#	0 [0; 1]	0	0

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

- $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували тільки індометацин;

° - $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували індометацин та езомепразол

казала, що у всіх тварин відмічено численні точкові геморагії (Рис. 1Б), а у 49,2% щурів відмічено слабо виражену гіперемію та порушення складчастості (Табл. 1). Інтегральна оцінка стану СОШ показала, що ВІ в групі щурів контрольної групи становив 3,5 (Табл. 4).

Оцінка стану СО тонкої кишки показала, що у 57,1% щурів, яким вводили тільки індометацин, відмічалось 11,1±4,1 виразок на 10 см довжини, з яких - 7,3±2,7 з гемосидерином (Табл. 4), що вказувало на ушкодження не тільки поверхневого епітелію, а й інтими судин. Перфоративних виразок відмічено не було, що вірогідно обумовлено терміном дослідження, оскільки за 4 години індометацин не мав настільки деструктивного впливу на

кишківник, зокрема через недостатній час для реалізації механізму ентеро-гепатичної рециркуляції метаболітів останнього, що за даними літератури розглядається як один із ключових механізмів ентеротоксичності НПЗЗ [3].

Профілактичне введення езомепразолу призвело до статистично вірогідного ($p < 0,05$) ослаблення ульцерогенної дії індометацину на СОШ, обумовленого, зокрема, зниженням кислотності шлункового соку. Так середній бал візуальної оцінки стану СОШ у 3,9 рази був нижчим за показники щурів контрольної групи та становив 0,9±0,26 (рис. 1Г), а ВІ у 13,5 рази був статистично вірогідно нижчим ($p < 0,05$) за показники щурів контрольної групи (3,5) та становив 0,26 (Табл. 4).

Таблиця 4

Стан СО проксимальних та дистальних відділів ШКТ на тлі індометацин-індукованого ушкодження ($M \pm t$ або $Me [LQ; UQ]$, $n=28$)

Показник	Відділ ШКТ:		Шлунок			Тонка кишка			
	Кількість тварин, n	Кількість тварин з М-ступенем ушкодження, абс. (%)	Кількість тварин з виразками, абс. (%)	Середній бал в групі	Виражовані індекс	Кількість тварин з виразками, абс. (%)	Кількість виразок на 10 см довжини		
Умови досліджу							загальне число	з гемосидерином	перфоративних
Інтактні щури	7	0 (0)	0 (0)	0	0	0/7 (0)	0	0	0
Індометацин	7	4/7 (57,1)*	7/7 (100)*	3,5±0,33*	3,5	4/7* (57,1)	11,1±4,1*	7,3 ±2,7*	0
Індометацин + КЕП	7	0/7# (0)	4/7 (57,1)*#	1,9±0,34*#	1,08	0/7# (0)	0 #°	0 #°	0
Індометацин + Езомепразол	7	0/7# (0)	2/7 (28,6)#	0,9±0,26*#	0,26	4/7* (57,1)	3,1±1,4*	1,7±,07*	0

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

- $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували тільки індометацин;

° - $p < 0,05$ відносно показників щурів, які отримували індометацин та езомепразол

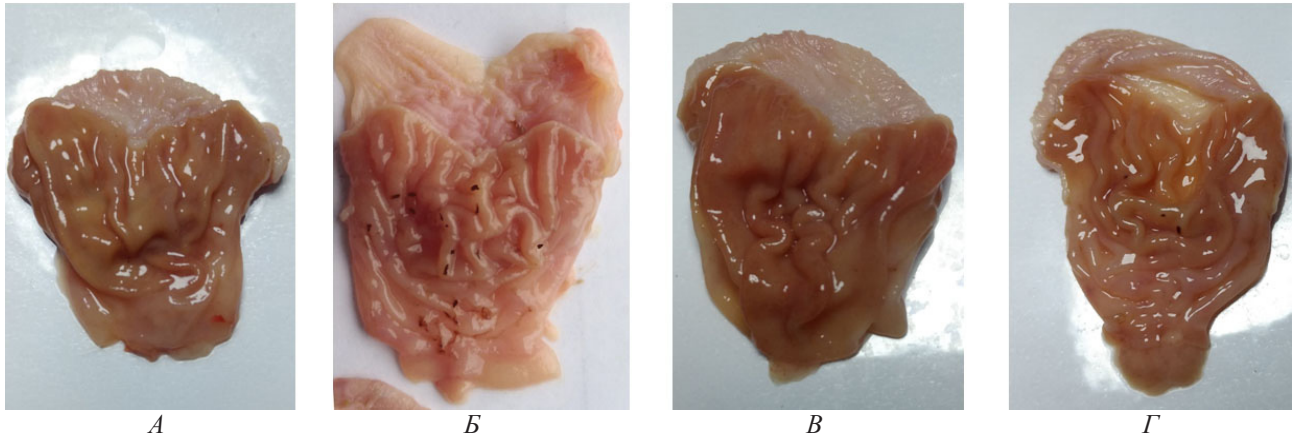


Рис. 1

Стан СОШ: А - інтактної тварини; Б - тварини з індометацин-індукованою гастропатією; В - тварини з індометацин-індукованою гастропатією в умовах корекції КЕП; Г - тварини з індометацин-індукованою гастропатією в умовах корекції езомепразолом

Окрім того встановлено, що введення езомепразолу чинило ентеропротективну дію, на що вказувала статистично вірогідно ($p < 0,05$) у 3,6 рази нижча середня кількість виразкових дефектів СО тонкої кишки на 10 см довжини (Табл. 4), проте загальна кількість тварин із ушкодженнями, як і в контролі становила 57,1%.

Профілактичне в/м введення КЕП призвело, за аналогією з езомепразолом, до ослаблення ульцерогенного впливу на СОШ, проте поступалось за величиною гастропротективної активності досліджуваному ІПП. Так, на тлі комбінованого застосування індометацину та КЕП геморагії відмічено у 71,4% щурів, в той час як при застосуванні індометацину і КЕП - тільки у 42,9% (Табл. 3). Проте, варто відзначити, що на відміну від щурів, яким профілактично вводили езомепразол, у тварин, яким в аналогічному режимі вводили КЕП, не відмічалась гіперемія СОШ, в той час як у групі зрівняння зазначену ознаку виявлено у 42,9% тварин (Табл. 3). Встановлені розбіжності можна пов'язати із підвищенням резистентності СОШ щурів, яким профілактично вводили КЕП до місцевопоздразнюючої дії індометацину.

Інтегральна оцінка стану СОШ показала, що у щурів, яким вводили у профілактичному режимі КЕП, виразкові ушкодження траплялись удвічі частіше, ніж у щурів, яким

вводили езомепразол, та були відмічені у 57,1% тварин (Табл. 4), а ВІ у 1,9 рази був нижчим, ніж у щурів, яким вводили тільки індометацин, що вказує на гастропротективну активність КЕП, проте зазначена активність у 4 рази поступалась показникам щурів, яким вводили досліджуваний ІПП (Рис. 1В).

Варто відзначити, що на відміну від езомепразолу, на тлі введення КЕП у тварин не відмічалось ушкодження тонкого кишківника, що вказує на виразні ентеропротективні властивості досліджуваного кріоекстракту (Табл. 4).

Висновки

1. Встановлено, що одноразове введення індометацину в дозі 60 мг/кг призводило до статистично вірогідного ($p < 0,05$) розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень шлунка у 100% щурів та тонкої кишки у 57,1% щурів.
2. На тлі комбінованого застосування індометацину та КЕП геморагії відмічено у 71,4% щурів, в той час як при застосуванні індометацину і КЕП - тільки у 42,9%, а ВІ у 1,9 рази був нижчим, ніж у щурів, яким вводили тільки індометацин, що вказує на гастропротективну активність КЕП.
3. На відміну від езомепразолу, введення КЕП чинить виразну ентеропротективну дію, на що вказувала відсутність ушкоджень слизової тонкої кишки у щурів, яким вводили досліджуваний кріоекстракт та індометацин.

Перспективи подальших досліджень

Потребує вивчення противиразкова активності кріоконсервованого екстракту плаценти на моделі ушкодження шлунково-кишкового тракту іншими нестероїдними протизапальними засобами. Особливої уваги заслуговує дослідження впливу досліджуваного кріоекстракту на протизапальну та знеболюючу активність, як клас-специфічних видів активності НПЗЗ.

Конфлікт інтересів

Автор рукопису свідомо засвідчує відсутність

фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чийі 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.

Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) represent a large class of drugs occupying a leading position in pharmacotherapy of pathologies manifested by pain, inflammation, fever, and others. In the recent years, there has been a significant widening in the scope of indications and an increase of prescription rate of NSAIDs worldwide. This was due, on the one hand, to increase of the proportion of diseases requiring the prescription of these drugs, e.g., including osteoarthritis, rheumatoid arthritis, etc., and, on the other hand, the ageing of the population [1, 2, 3].

Derivatives of acetic acid (indomethacin, diclofenac, sulindac, etc.) and derivatives of propionic acid (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, etc.) have been among the most commonly used NSAIDs since the last century. Indomethacin (1-(para-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid) occupies a special place among all NSAIDs. It was one of the first NSAIDs to be introduced into clinical practice. Clinical trials of indomethacin were started in 1961, and in 1965 it was approved for medical use. Indomethacin gained recognition because it was one of the first drugs to be effective in the treatment of migraine and headache, which in clinical practice at the time was called "pain acquired by indomethacin" [4].

However, despite more than fifty years' history of successful use of indomethacin in clinical practice, today there is still a problem of finding effective ways to reduce the rate of adverse effects, which are noted by about 30-

60% of patients receiving regular therapeutic doses of NSAIDs, and about 10-20% of them are forced to discontinue their use [4]. Thus, 3-9% of patients report nausea, heartburn, and/or epigastric pain, and 1-3% of patients complain of diarrhea or abdominal pain with indomethacin. [4].

In recent decades, a number of measures have been developed aimed to reduce the ulcerogenic effect of indomethacin on the gastrointestinal tract (GI tract). The combined use of NSAIDs, in particular indomethacin, with proton pump inhibitors (PPIs), H₂-gastaminoblockers, synthetic prostaglandin analogues or stimulators of their synthesis, etc. have been successfully implemented into clinical practice, but all these means of correction have their own side effects, which does not allow such an approach. gold standard" [1, 2, 5].

The above facts justify the feasibility of finding new approaches to reduce the ulcerogenic effect of indomethacin [4]. So in recent years, experimental studies have shown the feasibility of combined use with indomethacin as a gastro- / entero-protectors of a sugar-lowering drug of the methaneform biguanide class. [6], synthetic antihypertensive drug belonging to the group of beta-blockers nebivolol [7], peptide hormone obestatin [8], phosphodiesterase inhibitor for the treatment of erectile dysfunction sildenafil [9], flavonoid diosmin [9] etc.

Our attention as a means of pathogenetic correction was attracted by the domestic biotechnological drug developed by the staff of the Institute of Problems of Cryobiology and

Table 1

Biologically active substances contained in the cryoextract of the placenta [10]

Name of biologically active substances	Characteristics	Content
Alpha-fetoprotein	Activator (or inhibitor) of growth of embryonic, transformed, activated immunocompetent cells	429±75 mIU/mL
Chorionic gonadotropin	Activator of the immune system, stimulates the production of steroid hormones (testosterone and estradiol)	26,8±8 mIU/mL
Estradiol	Reproductive function, cardioprotective action	755±48 pmol/mL
Progesterone	Reproductive function, cardioprotective effect	226±110 nmol/mL
Prolactin	Influence on the development of secondary sexual characteristics, erythropoietic action, regulation of fat metabolism	705±129 mIU/mL
Alpha-2-fertility microglobulin	Preparation for pregnancy, conception process, normal development of fetoplacental unit	1470±173 ng/mL
Lactoferrin	Stimulation of lactation	1270±223 ng/mL
Somatotropin	Growth hormone, anabolic action	5,64 ng/mL
Luteinizing hormone	Pituitary hormone, secretion of estrogen, progesterone, testosterone	7,8±1,9 IU/l
Follicle-stimulating hormone	Pituitary hormone, promotes the maturation of follicles in the ovaries and spermatogenesis	7,1±2,3 mIU/l
Testosterone	Differentiation and functioning of the reproductive system, anabolic action	3,68±1,06 nmol/mL
Thyrotropic hormone	Stimulation of thyroid function, immunomodulatory effect	291±13 mIU/l
T3	Stimulation of metabolism, growth and differentiation of tissues, reproductive processes, hematopoiesis	2,1±0,6 pmol/L
T4	Stimulation of metabolism, tissue growth and differentiation, reproduction processes, hematopoiesis	5,6±0,99 pmol/l
Cortisol	Metabolism of proteins, carbohydrates, fats and nucleic acids	1392±515 nmol/l
G-CSF	Bone marrow cell proliferation	9,87 ng/mL
TNF-α	Inhibitor of cancer cell proliferation	84,5 pg/mL
IL-1β	Regulation of differentiation of polypotent stem cells, immunoendocrine system	201,7 pg/mL
IL-4	Regulation of differentiation of polypotent stem cells, immunoendocrine system	21,7 pg/mL
IL-6	Regulation of differentiation of polypotent stem cells, immunoendocrine system	114,9 pg/mL
Total protein	Plastic function	76,5±14 mg/g

Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine - cryopreserved placental extract (CEP). (Table 1) [2, 10, 11].

Technology of obtaining CEP. Placental donors are healthy mothers who are examined similarly to blood donors. The placenta is prepared after cesarean section. Drugs are subject to mandatory examination for prenatal infections, syphilis, acquired immunodeficiency syndrome, hepatitis A, B, C, cytomegalovirus infection.

Before cryopreservation, the placenta is washed from the blood, fragmented, the amniotic membrane is separated and immersed in vials with 0.2 l of 0.9% solution (solution) of KSI, 250 mg of kanamycin and 4 ml of dimexid.

Fragments of placental tissue are immersed in a vial of 0.5 l of 0.9% NaCl solution. The vial is shaken for 1-2 minutes, the supernatant is drained and a new physiological

solution is added. This procedure is repeated 5-6 times.

0.9% NaCl solution (1:2) is added to the dispersed tissue, kept at 4°C for 24 hours and centrifuged for 15-20 minutes. at 4000 rpm The resulting supernatant is filtered through millipore filters (diameter 0.22 μm), packed in clear glass ampoules and stored in liquid nitrogen [10]. Objective - to characterize the antiulcer activity of cryopreserved placenta extract in the model of indomethacin-induced ulcerogenesis.

Materials and Methods

In vivo experimental studies were performed on 28 nonlinear laboratory male rats weighing 200-220 g, which were kept in a vivarium of the Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, divided into 4 groups:

- Group I - intact rats (n=7);

- Group II (control group) - rats with indomethacin (JSC "Sopharma", Bulgaria) -induced ulcerogenesis (n=7);
- Group III (n=7) - rats with indomethacin-induced ulcerogenesis, which in the prophylactic mode was administered intramuscularly (intravenously) 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 indomethacin-induced ulcerogenesis, which in a prevention regimen according to a scheme similar to the introduction of CEP, were i.g. injected esomeprazole, a proton pump inhibitor of the Vth generation (Joint Stock Company "Actavis", Iceland) at a dose of 50 mg/kg (5 injections for 3 days) (5 injections 5 days before the introduction of indomethacin) [12].

Acute indomethacin-induced damage to the GI tract was reproduced by a single i/g administration to rats indomethacin at a dose of 60 mg/kg (6 UD50) [14]. Euthanasia of animals was performed after 4 hours. after NSAID administration by cervical dislocation under inhalation anesthesia.

Euthanasia of animals was performed by cervical dislocation under inhalation anesthesia. After removal of the esophagus from the organ complex, it was cut in the longitudinal direction and macroscopically evaluated the structure of MM, taking into account the recommendations of the international scientific nomenclature group Vevey (2011) on the severity of esophagitis and the expansion of the standard Los Angeles classification of gastroesophageal reflux disease

hyperemia, edema of the MM esophagus) and N (no changes) [15, 16].

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 MM of GI tract 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 as shown in Table 2 Calculation of the integrated GM condition index (an ulcerative index) was performed according to the formula [13, 17]:

$$\text{Ulcerative index} = (\text{Average score on the scale} \times \% \text{ rats with ulcers}) : 100.$$

The total number of ulcers in the small and large intestine was assessed, including the number of hemosiderin ulcers and the number of perforated ulcers. [13, 17]

To avoid the impact on the experiment of the circadian rhythm of biological activity, the experiments were always performed in the

Table 2

Score condition GM

Points	Characteristics of the condition GM
0	No visible damage.
1	The presence of one or more features from the list: edema, hemorrhage(s), ulcer(s) up to 1 mm in diameter in an amount not exceeding three.
2	More than three ulcers up to 1 mm in diameter or one ulcer up to 3 mm in diameter.
3	The presence of at least one ulcer diameter up to 4 mm.
4	Several ulcers up to 4 mm in diameter.
5	Perforated ulcer.

morning from 8 to 11 o'clock. In the event of death, the animals were dissected and macroscopically analyzed of the abdominal organs to establish that the lethal outcome of the animal was not due to manipulation errors, as well as to determine the probable cause of death.

The difference in the target concentration of substances in the blood of mammals and humans, which depends on the intensity of their entry and elimination, causes species differences in the doses of drugs to achieve equivalent effects. Therefore, to extrapolate the average therapeutic doses for humans to isoeffective doses for rats, we recalculated according to the method of Rybolovlev Yu.R. and sang. (1979) using the coefficient of species endurance (R), which is calculated by the formula [18]:

$$R = \sqrt{Q \times V / Kc}$$

where R is the coefficient of species endurance;

Q - basal metabolism, kcal / kg h;

V - volume of cardiac activity, l / kg h;

Kc - coefficient of cerebation (Ks=brain weight, g / body weight. kg).

Indicator $\sqrt{Q \times V}$ characterizes the endurance of the organism to the action of a chemical substance, and the coefficient of cerebation (Ks) allows to take into account possible changes in the functioning of the regulatory mechanisms of the nervous system in maintaining homeostasis.

So for rats

$$R = \sqrt{(4,8 \text{ kkal/kg} \cdot \text{h} \times 23,0 \text{ l/kg/h}) : (1,68 \text{ g} : 0,2 \text{ kg})} = 3,62;$$

for mice

$$R = \sqrt{(7,1 \text{ kkal/kg} \cdot \text{h} \times 30,0 \text{ l/kg/h}) : (0,42 \text{ g} : 0,02 \text{ kg})} = 3,20;$$

for man

$$R = \sqrt{(1,02 \text{ kkal/kg} \cdot \text{h} \times 6,4 \text{ l/kg/h}) : (1400 \text{ g} : 70,0 \text{ kg})} = 0,57;$$

[18]. According to the method, the dose for animals (D_2) is calculated according to the proportion:

$$\frac{D_1}{R_1} = \frac{D_2}{R_2}$$

according to the formula:

$$D_2 \text{ (mg/kg)} = (D_1 \text{ (mg/kg)} \times R_2) : R_1$$

where D_1 - dose for a person, mg/kg body weight;

D_2 - dose for animals, mg / kg body weight;

R_1 - species endurance constant for humans;

R_2 is the species endurance constant for animals.

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 $0.02 \text{ ml} : 100 \text{ g}$ body weight of rats.

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 intravenously for 5 days before NSAIDs (last administration 60 min before IV administration of indomethacin) [13].

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. The comprehensive research program was considered and approved by the Committee on Bioethics at the Institute of Cryobiology and Cryomedicine (excerpt from Protocol No 2 of March 11, 2020).

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 [13].

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 " $M \pm m$ " ($M \pm SE$), 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). [13].

Results and Discussion

The study showed that a single injection of

indomethacin at a dose of 60 mg/kg led to a statistically significant ($p < 0.05$) development of erosive-ulcerative lesions of the stomach in 100% of rats and small intestine in 57.1% of rats (Table 3). In addition, 57.1% of animals had M-stage esophagitis and the Los Angeles classification of gastroesophageal reflux disease (Table 4).

Macroscopic assessment of the condition of the central nervous system showed that in all animals there were numerous punctate hemorrhages (Fig. 1B), and in 49.2% of rats there was a weak hyperemia and folding disorders (Table 1). An integrated assessment of the state of the secondary school showed that the VI in the group of rats of the control group was 3.5 (Table 4).

Assessment of the state of MM of the small intestine showed that 57.1% of rats administered only indomethacin had 11.1 ± 4.1 ulcers per 10 cm in length, of which - 7.3 ± 2.7 with hemosiderin (Table 4), which indicated damage not only to the superficial epithelium, but also the intima of blood vessels. No perforated ulcers were noted, probably due to the study period, because for 4 hours indomethacin did not have such a destructive effect on the intestine, in particular due to insufficient time to implement the mechanism of enterohepatic recirculation of metabolites of the latter, which according to the literature is considered one of the key NSAIDs [3].

Prophylactic administration of esomeprazole led to a statistically significant

Table 3

GM condition on the background of Indomethacin-induced gastropathy ($M \pm m$ or Me [LQ; UQ], $n=28$)

Experimental conditions		Indicator				
		Flatulence	Hemorrhages	Hyperemia	Edema	Folding disorders
Intact rats (n=7)	Abs. (%)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)	0/7 (0)
	Points	0	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0	0 [0; 0]
Indomethacin (n=7)	Abs. (%)	0/7 (0)	7/7* (100)	3/7* (42,9)	0/7 (0)	3/7* (42,9)
	Points	0	3 [3; 3]*	0 [0; 2]	0	0 [0; 3]
Indomethacin + CEP (n=7)	Abs. (%)	0/7 (0)	5/7* (71,4)	0/7# ° (0)	0/7 (0)	0/7# (0)
	Points	0	1 [0,5; 2,5]* #	0 [0; 0]	0	0
Indomethacin + Esomeprazole (n=7)	Abs. (%)	0/7 (0)	3/7*# (42,9)	3/7 (42,9)	0/7 (0)	0/7# (0)
	Points	0	0 [0; 2] #	0 [0; 1]	0	0

* - $p < 0.05$ relative to intact animals;

- $p < 0.05$ relative to rats treated only with indomethacin;

° - $p < 0.05$ relative to rats treated with indomethacin and esomeprazole

Table 4

The state of the MM of the proximal and distal parts of the GI tract in Indomethacin - induced damage ($M \pm m$, $n=28$)

Parts of the gastrointestinal tract:		Esophagus	Stomach			Small intestine			
Experimental conditions	Number of animals, n	Number of animals with M-degree of damage, abs. (%)	Number of animals with ulcers, abs. (%)	Average score in the group	Ulcerative index	Number of animals with ulcers, abs. (%)	The number of ulcers per 10 cm in length		
							total number	with hemosiderin	perforated
Intact rats	7	0 (0)	0 (0)	0	0	0/7 (0)	0	0	0
Indomethacin	7	4/7 (57,1)*	7/7 (100)*	3,5±0,33*	3,5	4/7* (57,1)	11,1±4,1*	7,3 ±2,7*	0
Indomethacin + CEP	7	0/7# (0)	4/7 (57,1)*#	1,9±0,34*#°	1,08	0/7# (0)	0 #°	0 #°	0
Indomethacin + Esomeprazole	7	0/7# (0)	2/7 (28,6)#	0,9±0,26*#	0,26	4/7* (57,1)	3,1±1,4*	1,7±,07*	0

* - $p < 0.05$ relative to intact animals;

- $p < 0,05$ relative to rats that received only indomethacin;

° - $p < 0.05$ relative to rats treated with indomethacin and esomeprazole

($p < 0.05$) weakening of the ulcerogenic effect of indomethacin on the central nervous system, due, in particular, to a decrease in the acidity of gastric juice. Thus, the average score of visual assessment of the state of GM was 3.9 times lower than the rats of the control group and was 0.9 ± 0.26 (Fig. 1D), and VI was 13.5 times statistically significantly lower ($p < 0, 05$) for the indicators of rats of the control group (3.5) and amounted to 0.26 (Table 4).

In addition, it was found that the introduction of esomeprazole had an enteroprotective effect, as indicated by statistically significant ($p < 0.05$) 3.6 times lower average number of ulcerative defects of the small intestine per 10 cm in length (Table 4), but the total number of animals with injuries, as in the control was 57.1%.

Prophylactic intravenous administration of CEP led, by analogy with esomeprazole, to a weakening of the ulcerogenic effect on the central nervous system, but was inferior in terms of gastroprotective activity to the studied PPI. Thus, against the background of the combined use of indomethacin and CEP hemorrhage was observed in 71.4% of rats, while with the use of indomethacin and CEP only in 42.9% (Table 3). However, it should be noted that in contrast to rats, which were prophylactically administered esomeprazole in animals that were similarly administered CEP, there was no hyperemia of the central nervous system, while in the comparison group this feature was found in 42.9% of animals (Table 3). The discrepancies found may be related to an increase in the SOS

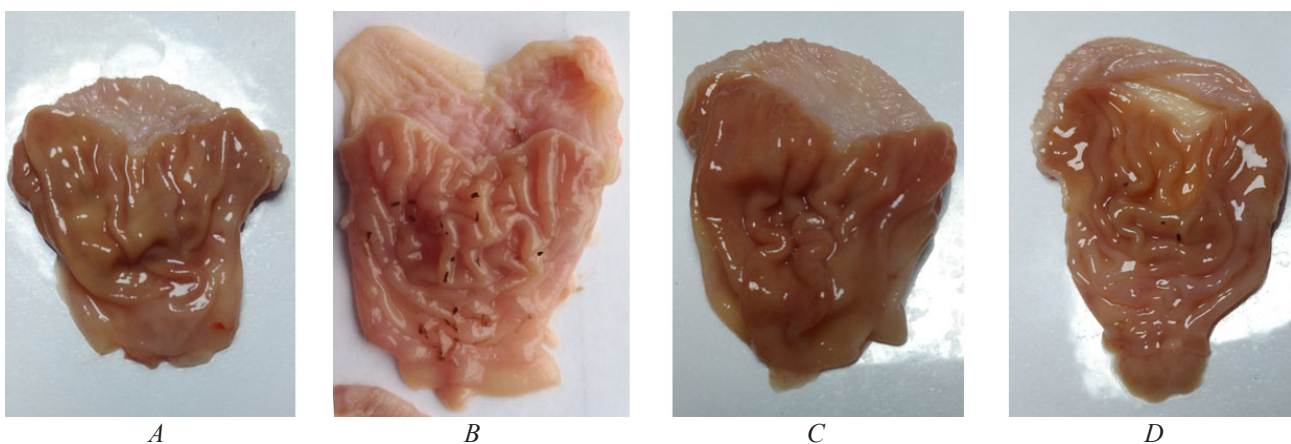


Figure 1

Condition GM: A - intact rat (Group I); B - rats with Indomethacin-induced ulcerogenesis (Group II); C - rats with Indomethacin-induced ulcerogenesis administered CEP (Group III); D - rats with Indomethacin-induced ulcerogenesis administered esomeprazole (Group IV)

resistance of rats that were prophylactically administered CEP to the local irritant effect of indomethacin.

An integrated assessment of the state of SOS showed that in rats injected in the prophylactic mode of CEP ulcerative lesions were twice as common as in rats injected with esomeprazole and were observed in 57.1% of animals (Table 4), and VI in 1.9 was lower than in rats administered only indomethacin, which indicates the gastroprotective activity of CEP, but this activity was 4 times lower than in rats injected with the studied PPI (Fig. 1B).

It should be noted that in contrast to esomeprazole, against the background of the introduction of CEP in animals there was no damage to the small intestine, which indicates a clear enteroprotective properties of the studied cryoextract (Table 4).

Conclusions

1. It was found that a single injection of indomethacin at a dose of 60 mg / kg led to a statistically significant ($p < 0.05$) development of erosive-ulcerative lesions of the stomach in 100% of rats and small intestine in 57.1% of rats.
2. Against the background of the combined use of indomethacin and CEP hemorrhage was observed in 71.4% of rats, while with the use of indomethacin and CEP only 42.9%, and VI was 1.9 times lower than in rats injected only indomethacin, which indicates the gastroprotective activity of CEP.
3. In contrast to esomeprazole, the introduction of CEP has a pronounced enteroprotective effect, as indicated by the absence of damage to the small intestinal mucosa in rats injected with the studied cryoextract and indomethacin.

Relationship with academic programs, plans and themes

The article is a fragment of the planned research work of the Department of Experimental Cryomedicine of the Institute of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine "Destructive and restorative processes in tissues in vivo after exposure to low

temperatures and biologically active substances" (№ 2.2.6.113, code 2.2.6.113, number state registration 0117U001049, term of implementation: 2017-2021, head - acting head of the department of experimental cryomedicine of the Institute, candidate of medical sciences, senior researcher Chyzh M.O.). It is financed by the state budget of Ukraine.

References

1. Anikin GS, Stozhkova IV, Kukes VG. NSAIDs: safety from the point of evidence-based medicine. *Consilium Medicum*. 2017; 19: 28-32. DOI: http://doi.org/10.26442/2075-1753_19.7.2.28-32.
2. Drini M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aust Prescr*. 2017; 40 (3): 91-3. DOI: <http://doi.org/10.18773/austprescr.2017.037>.
3. Hladkykh FV, Chyzh MO. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a modern understanding of the mechanisms of damage to the digestive tract, the shortcomings of pathogenetic drugs and prospects for biological therapy of NSAID-induced esophago-gastroenterocolonopathy. *Gastroenterology*. 2020; 4: 253-66. DOI: <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714>.
4. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*. 2016; 56 (2): 436-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/head.12769>.
5. Hladkikh FV Preventive-therapeutic strategies of pharmacocorrection of gastropathy induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*. 2017; 4: 14-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/RCF15414-23>.
6. AbdelAziz EY, Tadros MG, Menze ET. The effect of metformin on indomethacin-induced gastric ulcer: Involvement of nitric oxide/Rho kinase pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 892: e173812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173812>.
7. El-Ashmawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Selim HM. Nebivolol prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Immunotoxicology*. 2016;13(4): 580-9. DOI: <https://doi.org/10.3109/1547691X.2016.1142488>.
8. Sen LS, Ozdemir Kumral ZN, Memi G, Ercan F, Yegen BC, Yegen C. The gastroprotective effect of obestatin on indomethacin-induced acute ulcer is mediated by a vagovagal mechanism. *Physiology International*. 2020; 1: 243-55. DOI: <https://doi.org/10.1556/2060.2020.00025>.
9. El-Sisi AE, Sokar SS, Abu-Risha SE, Khira DY. The potential beneficial effects of sildenafil and diosmin in experimentally-induced gastric ulcer in rats. *Heliyon*. 2020; 6 (8): e04761. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04761>.

10. Goltsev AN, ed. Placenta: cryopreservation, clinical use. Kharkiv; 2013. 268 p.
11. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. 2018; 2018: 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4837930>.
12. 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>.
13. Stefanov OV. Preclinical studies of drugs: guidelines. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
14. Zharikov AYu, Lorenz SE, Bobrov IP, Mazko ON, Makarova OG. Search for new oligopeptide molecules for pharmacological correction of NSAID-induced gastric ulcer. *Biomedicine*. 2019; 15 (3): 90-7. DOI: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-90-97>.
15. Modlin IM, Hunt RH, Malfertheiner P, Moayyedi P, Quigley EM, Tytgat GN, Tack J, Heading RC, Holtman G, Moss SF. Diagnosis and management of non-erosive reflux disease - the Vevey NERD Consensus Group. *Digestion*. 2009; 80 (2), 74-88. DOI: <https://doi.org/10.1159/000219365>.
16. Schneider NI, Plieschnegger W, Geppert M, Wigglinghaus B, Hoess GM, Eherer A, Wolf EM, Rehak P, Vieth M, Langner C. Validation study of the Esohisto consensus guidelines for the recognition of microscopic esophagitis. *Human pathology*. 2014; 31, 45 (5), 994-1002. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.12.013>.
17. Hladkikh FV, Stepaniuk NG, Vernygorodsky SV. Macro- and microscopic study of the effect of 2-phenyl-3-carboxy-4-dimethylaminomethyl-5-oxybenzofuran hydrochloride (Vinborone) on gastrotoxicity ibuprofen in experimental rheumatoid arthritis in rats. *Trajectory of Science: International Electronic Scientific Journal = Trajectory of Science*. 2017; 10: 7001-7018. DOI: <http://dx.doi.org/10.22178/pos.27-8>.
18. 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.