

УДК: 615.276+618.46+612.592+616-002+612.11



ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ НА ОТДЕЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ ПРИ АДЪЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННОМ АРТРИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ф.В. Гладких^{1,2}, Н.А. Чиж¹, А.А. Манченко¹, И.В. Белочкина¹, И.П. Михайлова¹

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины
61016, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, д. 23

² Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С.П. Григорьева
Национальной академии медицинских наук Украины»
61024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, д. 82

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Получено 28.05.2021

Принята к печати 16.08.2021

Актуальность. Нестероидные противовоспалительные препараты являются одними из наиболее востребованных классов лекарственных средств в клинике внутренней медицины. Однако применение указанных препаратов ассоциируется с широким спектром нежелательных реакций с вовлечением ряда органов и систем, в частности желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы и почек.

Цель. Охарактеризовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия при их комбинированном применении на состояние прооксидантно-оксидантной системы, активность воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также состояние белкового и липидного обмена по данным биохимических исследований у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

Результаты. Введение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты крысам с адъювантным артритом привело к нормализации уровня активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, что указывает на нивелирование признаков артрит-индуцированного оксидативного стресса. Также выявлено статистически достоверное ($p=0,01$) повышение активности супероксиддисмутазы на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы. Установлено усиление противовоспалительных свойств диклофенака натрия на фоне комбинированного применения диклофенака натрия с криоконсервированным экстрактом плаценты, так как уровень С-реактивного белка снизился ($p<0,001$) на 61,1% относительно нелеченых крыс, а уровень серомукоида статистически достоверно ($p<0,01$) снизился на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии исследуемым нестероидным противовоспалительным препаратом. Показано, что уровень аланин-аминотрансферазы статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а аспартат-аминотрансферазы – ниже на 37,9% ($p<0,01$) относительно показателей животных, которым вводили диклофенак натрия, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым адъювантным артритом. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность криоконсервированного экстракта плаценты нивелировать не только артрит-индуцированный цитолитический синдром, но и диклофенак-индуцированный. Комбинированное применение криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия сопровождалось нормализацией уровня общих липидов и фосфолипидов в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального ревматоидного артрита. Так содержание фосфолипидов в пуле липидов статистически достоверно ($p=0,02$) выросло на 22,6% относительно показателей животных с адъювантным артритом без лечения.

Заключение. Исследование показало, что комбинированное применение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты приводит к восстановлению равновесия прооксидантно-антиоксидантной системы, более выраженному, чем при монотерапии диклофенаком натрия, снижению активности воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также восстановлению липидного обмена у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

Ключевые слова: криоконсервированный экстракт плаценты; адъювантный артрит; противовоспалительная активность; нестероидные противовоспалительные препараты; диклофенак натрия

Для цитирования: Ф.В. Гладких, Н.А. Чиж, А.А. Манченко, И.В. Белочкина, И.П. Михайлова. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на отдельные биохимические показатели лечебной эффективности и токсичности диклофенака натрия при адъювант-индуцированном артрите в эксперименте. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):278-293. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293

© Ф.В. Гладких, Н.А. Чиж, А.А. Манченко, И.В. Белочкина, И.П. Михайлова, 2021

For citation: F.V. Hladkykh, M.O. Chyzh, A.O. Manchenko, I.V. Belochkina, I.P. Mikhailova. Effect of cryopreserved placenta extract on some biochemical indices of therapeutic efficiency and toxicity of diclofenac sodium in adjuvant-induced experimental arthritis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):278-293. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293

Список сокращений: АА – адьювантный артрит; АЛАТ – аланин-аминотрансфераза; АОС – антиоксидантная система; АсАТ – аспартат-аминотрансфераза, в/ж – внутривенно, в/м – внутримышечно; ГГТП – гамма-глутамилтраспептидаза; ДН – диклофенак натрия; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ИПКиК НАН Украины – Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины; КЭП – криоконсервированный экстракт плаценты; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; ОС – оксидативный стресс; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ПОЛ-АОС – перекисное окисление липидов-антиоксидантная система; СОД – супероксиддисмутаза; С-РБ – С-реактивный белок; ТБК-РП – активные продукты тиобарбитуровой кислоты; ЦОГ – циклооксигеназа; 95% ДИ – 95% доверительный интервал

EFFECT OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT ON SOME BIOCHEMICAL INDICES OF THERAPEUTIC EFFICIENCY AND TOXICITY OF DICLOFENAC SODIUM IN ADJUVANT-INDUCED EXPERIMENTAL ARTHRITIS

F.V. Hladkykh^{1,2}, M.O. Chyzh¹, A.O. Manchenko¹, I.V. Belochkina¹, I.P. Mikhailova¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
23, Pereyaslavka Str., Kharkiv, Ukraine, 61015

²State Organization “Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”
82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Received 28 May 2021

Accepted 16 Aug 2021

Relevance. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are among the top requested ones in the clinic of internal medicine. However, these drugs are associated with a wide range of adverse reactions involving a number of organs and systems, in particular the gastrointestinal tract, cardiovascular system and kidneys.

The aim of the study is to characterize the effect of the combined use of cryopreserved placenta extract and diclofenac sodium on the prooxidant-oxidative system, the activity of inflammatory, destructive and cytolytic processes, as well as protein and lipid metabolism in rats with experimental rheumatoid arthritis.

Results. The administration of diclofenac sodium and cryopreserved placenta extract to rats with adjuvant arthritis normalized the level of active products of thiobarbituric acid and hence was indicative of the neutralization of an arthritis-induced oxidative stress. A statistically significant ($p=0.01$) increase of in a superoxide dismutase activity (by 30.6% relative as compared with rats of the control group) has also been established. An increase in the anti-inflammatory properties of diclofenac sodium in the combined use of diclofenac sodium with a cryopreserved placenta extract has been found out. The level of C-reactive protein decreased ($p<0.001$) by 61.1% as compared with the untreated rats, and the level of seromuroid has been significantly ($p<0.01$) decreased by 17.1% as compared with the rats of the monotherapy group treated with the studied NSAIDs. It was shown that alanine aminotransferase and aspartate levels were significantly lower (by 38.9%, $p<0.01$ and by 37.9%, $p<0.01$, respectively) as compared with those of the animals that had been administered with diclofenac sodium. Their indices were by 16.7% ($p=0.02$) and 17.2% ($p<0.001$) lower than the indices of the control group rats with untreated adjuvant arthritis. The established changes of aminotransferases levels indicate the ability of a cryopreserved placenta extract to level not only an arthritis-induced cytolytic syndrome, but also a diclofenac-induced one. The combined use of cryopreserved placenta extract and diclofenac sodium was accompanied by the normalization of the total lipids level and phospholipids in the blood serum of rats against the background of experimental rheumatoid arthritis. Thus, the content of phospholipids in the lipid pool statistically significantly ($p=0.02$) increased by 22.6% as compared with the indices of the animals with adjuvant arthritis without treatment.

Conclusion. The study showed that the combined use of diclofenac sodium and cryopreserved placenta extract leads to the restoration of the balance of the prooxidant-antioxidant system that is more pronounced than monotherapy with diclofenac sodium. A decrease in the activity of inflammatory, destructive and cytolytic processes, as well as the restoration of lipid metabolism in the rats with experimental rheumatoid arthritis, has also been observed.

Keywords: cryopreserved placenta extract; adjuvant arthritis; anti-inflammatory activity; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; diclofenac sodium

Abbreviations: АЛАТ – alanine-aminotransferase; АсАТ – aspartate aminotransferase; АА – adjuvant arthritis; АОС – antioxidant system; СОХ – cyclooxygenase; СРЕ – cryopreserved placenta extract; С-РБ – C-reactive protein; ДС – diclofenac sodium; ГГТП – gamma glutamyl trapeptidase; GI tract – gastrointestinal tract; i/g – intragastrically; i/m – intramuscularly; ИПКиК НАН Украины – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; LP – lipid peroxidation; LP-АОС – lipid peroxidation-antioxidant system; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; ОС – oxidative stress; РА – rheumatoid arthritis; СОД – superoxide dismutase; ТБА-АП – active products of thiobarbituric acid; 95% ДИ – 95% Confidence interval

ВВЕДЕНИЕ

Среди многочисленных лекарственных средств, которые есть в арсенале клиницистов, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) занимают особое место. Это обусловлено наличием у них неспецифического противовоспалительного и обезболивающего свойств, что обосновывает ежегодное увеличение их продаж на фоне старения населения, поскольку, как известно, частота их применения возрастает с возрастом. НПВП играют особую роль в симптоматической терапии больных с ревматическими заболеваниями: ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилоартрит, подагра и др. [1–5].

Однако, не смотря на общепризнанную эффективность НПВП, их применение в клинической практике существенно ограничено риском развития нежелательных побочных эффектов со стороны различных органов и систем, в частности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), сердечно-сосудистой системы, печени, почек [2–6]. К тому же в 25,0–35,0% случаев пациенты применяют НПВП нерационально и не учитывают наличия факторов риска развития нежелательных эффектов.

Известно, что максимальный риск сердечно-сосудистых осложнений имеет место при приеме препаратов, обладающих высокой селективностью к циклооксигеназе (ЦОГ) 2 типа (коксибов – целекоксиба, эторикоксиба и др.), в то время как риск осложнений со стороны ЖКТ наиболее характерен при приеме неселективных НПВП (диклофенака, индометацина, ибупрофена и др.) [3, 4]. Так в первые 7 дней приема целекоксиба, повышение риска инфаркта миокарда составляет 92,0–99,0% [3, 7]. Нежелательные реакции со стороны ЖКТ – наиболее распространенная патология, обусловленная ингибированием ЦОГ-1 и как следствие снижением защитного потенциала слизистой оболочки пищеварительного тракта [8, 9]. Неселективные ингибиторы ЦОГ повышают риск ЖКТ-кровотечений в среднем в 4 раза, а селективные – в 3 раза [4, 5].

Проблема ЖКТ-переносимости широко применяемых НПВП обосновывает актуальность поиска эффективных цитопротективных препаратов, способных повышать устойчивость слизистой оболочки пищеварительного тракта [10, 11]. Лечение НПВП-индуцированной эзофагогастроэнтероколонопатии классически направлено на кислотосупрессивную терапию (ингибиторы протонной помпы, H₂-гистаминоблокаторы и др.), применение гастроцитопротекторов (девол, сукральфат и др.) и препаратов, которые восстанавливают содержание простагландинов в слизистой оболочке (мизопростол, ребамипид и др.) [5, 12–14]. Однако все указанные группы лекарственных средств недостаточно удовлетворяют клиницистов, поскольку направлены преимущественно на лечение НПВП-гастропатии, в то время как НПВП способны вызывать поражения, в том числе, и дистальных отделов ЖКТ, а также имеют собственные побочные эффекты [13–19].

Одним из перспективных направлений терапии патологий ЖКТ является использование препаратов биологического происхождения, преимуществами которых является их комплексное фармакологическое действие и хорошая переносимость. [20–22].

В качестве средства коррекции ulcerогенного действия НПВП наше внимание привлек криоконсервированный экстракт плаценты (КЭП) человека, обладающий мультивекторным спектром биологической активности [23–26].

Впервые криоконсервированные препараты плацентарной ткани человека были получены учеными Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины (ИПКК НАН Украины), которые разработали и внедрили в практику уникальную методику его длительного хранения в низкотемпературной среде. Это обеспечило первенство Украины среди европейских стран по опыту криоконсервирования биологических тканей [26–31].

В предыдущих исследованиях нами показано, что КЭП способен нивелировать ulcerогенное действие НПВП, в частности диклофенака натрия, мелоксикама, ибупрофена и др. [32–34]. В то же время по данным литературы КЭП присущи собственные противовоспалительные свойства [35], механизм которых, очевидно, связан с действием содержащихся в нем гормонов (прогестерона, эстрадиола, пролактина, гонадотропина и др.).

Кроме того, КЭП обладает выраженными антиоксидантными свойствами и его противовоспалительное действие, возможно, связано с устранением провоспалительной модуляции реакций системы крови активными формами кислорода и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в результате стимуляции физиологической антиоксидантной системы [35].

Все вышеуказанные факты обосновывают необходимость углубленного изучения механизмов терапевтического, в частности противовоспалительного, действия КЭП при его комбинированном использовании с НПВП.

ЦЕЛЬ. Охарактеризовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия при их комбинированном применении на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы, активность воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также состояние белкового и липидного обмена по данным биохимических исследований у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе ИПКК НАН Украины в отделе экспериментальной криомедицины. Работа выполнена в контексте плановой научно-исследовательской работы «Деструктивные и

восстановительные процессы в тканях *in vivo* после воздействия низких температур и биологически активных веществ» (шифр 2.2.6.113, номер государственной регистрации 0117U001049).

Исследование проведено на 28 половозрелых нелинейных крысах-самцах, полученных из вивария ИПКиК НАН Украины, массой 200–220 г, разделенных на 4 группы, по 7 животных в каждой: I – интактные крысы (n=7); II (контроль) – крысы (n=7) с экспериментальным РА без лечения; III – крысы (n=7) с экспериментальным РА, которым вводили диклофенак натрия (ДН) (8 мг/кг [36], внутривенно (в/в)); IV (n=7) – крысы с экспериментальным РА, которым вводили ДН (8 мг/кг, в/в) и КЭП (0,16 мг/кг [37], внутримышечно (в/м)).

Режим введения и дозировки исследуемых средств

Лечение АА проводилось с 14-го по 28-й день. ДН (ЧАО «Химфармзавод «Красная звезда», ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина) вводили в/в в дозе, равной ED_{50} противовоспалительной активности на модели карагенин-индуцированного отека – 8 мг/кг в виде эмульсии на полисорбате «Твин-80» [35, 37]. Указанная доза ДН соответствует разовой дозе для человека 88 мг (1,25 мг/кг), что согласуется с клиническими рекомендациями об использовании ДН у больных по 75–100 мг/сут. при его длительном применении и в 1,7 раза ниже его максимальной суточной дозы 150 мг [8].

Препарат КЭП «Криоцелл-криоэкстракт плаценты» (Государственное предприятие «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины Национальной академии наук, Национальной академии медицинских наук и Министерства здравоохранения Украины», Украина) согласно инструкции, применяется у пациентов парентерально в разовой дозе 1,8 мл [37]. Перед применением препарата «Криоцелл-криоэкстракт плаценты» разовую дозу (0,16 мл/кг) экстенпорально разводили в 0,9% растворе хлорида натрия из расчета 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия /100 г массы тела. КЭП по 0,16 мл/кг массы тела вводили в/м с интервалом 2 дня (всего 5 инъекций), соответственно на 14, 17, 20, 23 и 26 дни, что соответствовало инструкции к его клиническому применению – в/м по 1,8 мл с интервалом 2–3 дня курсом 1–5 инъекций.

Модель хронического иммунного воспаления

Для воспроизведения условий введения крысам НПВП, соответствующих их клиническому применению нами была выбрана модель экспериментального ревматоидного артрита (РА) – адьювантный артрит (АА) у крыс, которая имеет все морфофункциональные признаки РА и сопровождается типичной реакцией, основным звеном которой является Т-клеточный иммунитет [38–40]. АА моделировали путем

субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда (ПАФ, Thermo Fisher Scientific, США) в заднюю правую конечность из расчета 0,1 мл на крысу. День введения адьюванта принимали за «0» день эксперимента [40–42]. Максимальное проявление местной воспалительной реакции, которая сопровождалась значительным увеличением объема конечности определялась на 12–14 сутки, далее активность воспалительного процесса постепенно уменьшалась.¹

На 28 сутки эксперимента животных выводили из эксперимента и после декапитации животных отбирали образцы крови в пробирки с предварительно внесенным антикоагулянтом (2-х замещенной калийной солью этилендиаминотетрауксусной кислоты). Плазму отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для получения сыворотки кровь отбирали в стеклянные пробирки без антикоагулянта и выдерживали при комнатной температуре (20–26°C) до полного отделения сыворотки, которую отбирали в пробирку и центрифугировали в течение 15–20 мин при 3000 об/мин.

Биохимические методы исследования крови²

1. Содержание активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-РП) в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по методу Asakawa T. et al. [43] по реакции с ТБК и рассчитывали по показателям оптической плотности, определенным по светопоглощению при длине волны $\lambda=535$ нм, учитывая коэффициент молярной экстинкции окрашенного в красный цвет комплекса, который равен $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹/см⁻¹ и выражали в мкмоль/л;
2. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови (КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрически по методу Костюка В.А. и соавт. [44], основанному на подавлении реакции окисления кверцетина, по показателям оптической плотности, определенным по светопоглощению при длине волны $\lambda=406$ нм. Активность СОД выражали в % ингибирования окисления кверцетина;
3. Содержание серомукоида в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по методу Weimer H.E. и Moshin R.J., который заключается в осаждении белков сыворотки крови 1,8 М раствором перхлорной кислоты (HClO₄), выделении серомукоида из фильтрата с помощью фосфорно-вольфрамовой кислоты и дальнейшем количественном определении по разнице светопоглощения при длине волны $\lambda=260$ нм и $\lambda=280$ нм. Содержание серомукоида определяли в единицах оптической плотности (ед. оп. плотн.) и вы-

¹ Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – Київ: Видавничі дім «Авіцена», 2001. – 527 с.

² Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ; 2009. 896 с.

- ражали в ммоль/л (коэффициент пересчета = 1; 1 ед. опт. плотн. = 1 ммоль/л);
4. Содержание С-реактивного белка (С-РБ) в сыворотке крови определяли по степени агглютинации и помутнения согласно инструкции использования латексного диагностического теста для выявления С-реактивного белка в сыворотке крови «С-РБ латекс-тест» (ООО НПЛ «Гранум», Украина) и выражали в мг/л;
 5. Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови (КФ 2.6.1.1) определяли спектрофотометрически по методу Reitman S. и Frankel S. и выражали в мкмоль/(млхч). Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «АЛТ (Райтман-Френкеля с калибратором)» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 6. Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови (КФ 2.6.1.1) определяли спектрофотометрически по методу Reitman S. и Frankel S. и выражали в мкмоль/(млхч). Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «АсАТ (Райтман-Френкеля с калибратором)» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 7. Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом и выражали в Ед/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «ГГТП» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 8. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом и выражали в мкмоль/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «Щелочная фосфатаза» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 9. Содержание общего белка в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом по биуретовой реакции и выражали в г/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «Общий белок» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 10. Содержание общих липидов в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по цветовой реакции с сульфосфосванилиновым реактивом, которая основывается на том, что продукты распада ненасыщенных жирных кислот, образующихся после кислотного гидролиза липидов, взаимодействуют с фосфорнованилиновым реактивом с образованием окрашенных комплексов, имеющих максимум поглощения при длине волны $\lambda=530$ нм. Липидные экстракты получали по методу Bligh E. G. и Dyer W. I. [45]. Фосфолипиды фракционировали методом Svetashev V. I. и Vaskovsky V. E., путем двумерной микротонкошаровой хроматографии [46]. Фосфолипиды идентифицировали по методу

[47] и выражали их содержание по уровню неорганического фосфора в г/л.

Биоэтические аспекты исследования

Животных содержали в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. В течении 14 дней крысы находились на карантине (в соответствии с санитарными нормами «Структура и содержание экспериментальных биологических клиник» (Приказ № 755 от 12.08.1997 г.) на водно-пищевом рационе со свободным доступом к пище и воде (согласно Приложения от 04.12.1977 г. к Приказу №163 от 10.03.1996 г. «Про суточные нормы кормления лабораторных животных и продуцентов»). Все экспериментальные исследования над лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями надлежущей лабораторной практики и с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях от 18 марта 1986 г.; Директивы Европейского парламента и Совета Евросоюза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей; приказ Министерства здравоохранения Украины от 14 декабря 2009 г. №944 «Об утверждении порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств» и Закона Украины от 21 февраля 2006 г. № 3447-IV «О защите животных от жестокого обращения».

Комплексная программа исследований рассмотрена и согласована Комитетом по биоэтике при ИПКиК НАН Украины (выписка из протокола № 2 от 11 марта 2020).

Статистическая обработка полученных результатов

Проведена с использованием прикладной программы для работы с электронными таблицами «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (Microsoft Corporation, США) с помощью расширения «Real Statistics» (<http://www.real-statistics.com/>). Оценку характера распределения величин в каждой группе выборочной совокупности проводили с использованием W-критерия Шапиро-Вилка (Shapiro-Wilk test; $n < 50$). Однородность дисперсий определяли по критерию Левена (Levene's test). Для оценки значимости выявленных различий исследуемых показателей при разных условиях эксперимента проводили статистический анализ с использованием параметрических и непараметрических критериев. При нормальном распределении независимых величин различия между группами определяли попарно по t-критерию Стьюдента. При ненормальном распределении по крайней мере одной из групп независимых величин различия между ними определяли попарно по непараметрическому ранговому U-критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney). Полученные значения сравнивали с критическими при уровне достоверности выше 95,0%

($p \leq 0,05$), выше 99,0% ($p \leq 0,01$), выше 99,5% ($p \leq 0,005$) и выше 99,9% ($p \leq 0,001$) и делали вывод о вероятности погрешности. Цифровые данные в случае нормального распределения величин приведены в виде « $M \pm m$ » ($M \pm SE$), где: M – среднее арифметическое значение; m (SE) – стандартная ошибка среднего арифметического или M (95% ДИ: 5% – 95%), где: 95% ДИ – 95% доверительный интервал. При ненормальном распределении полученных величин данные представлены в виде Me [LQ ; UQ], где Me – медиана [LQ ; UQ] – верхняя граница нижнего (первого) квартиля (lower quartile – LQ) и нижняя граница верхнего (третьего) квартиля (upper quartile – UQ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические исследования периферической крови крыс с АА (контрольная группа) показали статистически достоверное ($p < 0,001$) увеличение содержания ТБК-РП на 53,7% относительно показателей интактных животных (рис. 1), что указывает на активацию ПОЛ, что вероятно обусловлено развитием системного воспалительного процесса [47, 48].

Как известно продукты ПОЛ способствуют агрегации тромбоцитов, уменьшению синтеза простагландинов с антикоагулянтным действием, формированию синдрома цитолиза, выходу факторов свертывания крови и подавлению деления и регенерации клеток. ТБК-РП выступает эндогенным альдегидом, который является клинико-лабораторным маркером оксидативного стресса и широко применяется для контроля эффективности лечения целого ряда заболеваний – РА, остеоартрит, ишемическая болезнь сердца и др. [49–51].

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному ($p < 0,01$) снижению уровня ТБК-РП на 19,0% относительно показателей животных контрольной группы в аналогичные сроки исследования. Комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось более выраженным снижением интенсивности процессов ПОЛ на что указывало уменьшение содержания ТБК-РП у крыс с АА на 31,7% относительно показателей крыс с АА без лечения, что в 1,7 раз превышало аналогично направленные изменения на фоне применения только ДН.

Следует отметить, что у животных с АА, которым вводили ДН и КЭП уровень ТБК-РП на 28 день эксперимента практически сопоставлялся с показателями интактных крыс и составлял 4,3 [3,6; 4,5] мкмоль/л (рис. 1), что указывает на нивелирование признаков АА-индуцированного оксидативного стресса и может расцениваться как один из механизмов лечебного действия исследуемых препаратов.

Установленная активация ПОЛ у крыс на фоне развития АА согласовывалась с параллельным истощением антиоксидантной системы (АОС) на что указывало статистически достоверно ($p < 0,01$) снижение уровня СОД на 27,9% относительно показателей интактных животных (рис. 2).

Как известно, СОД совместно с другими ферментами АОС (каталаза, церулоплазмин, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.) выступают неотъемлемым компонентом ПОЛ-АОС. Оценка функционального состояния АОС определяет уровень компенсаторного и адаптивного ответа организма в условиях возможного развития ОС [51, 52].

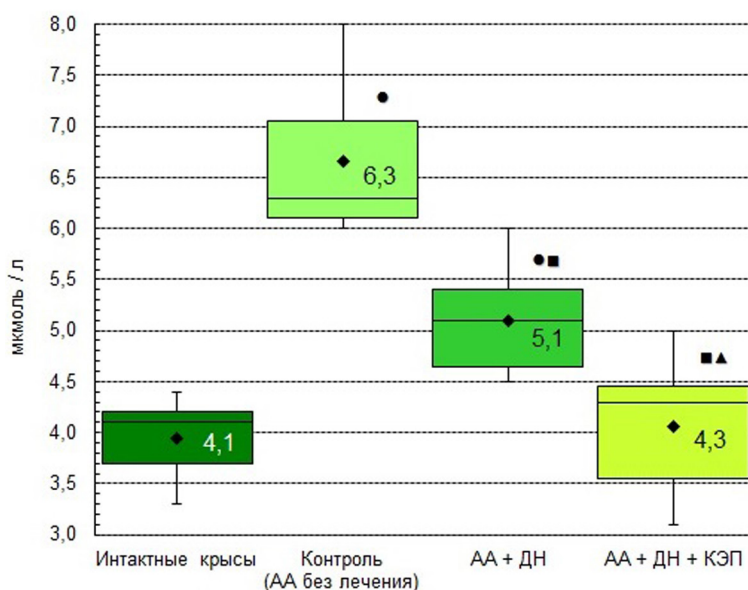


Рисунок 1 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень ТБК-РП в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентилей, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилею), ◆ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

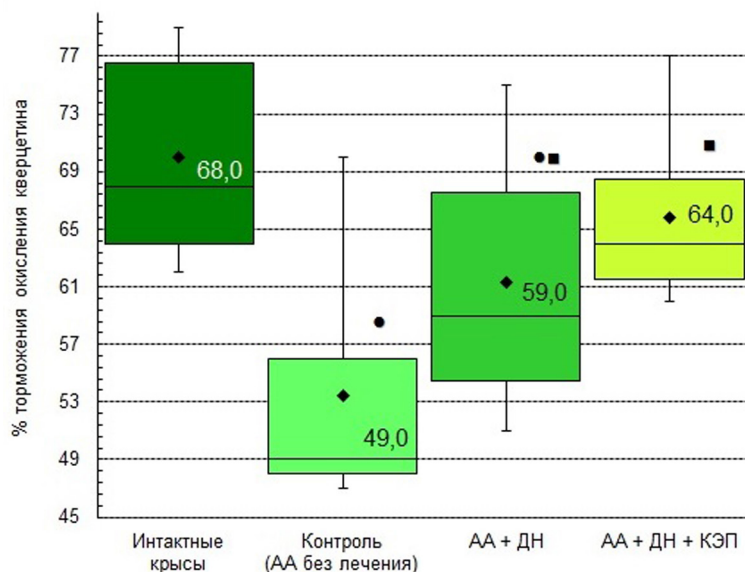


Рисунок 2 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень СОД в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилю), ◆ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

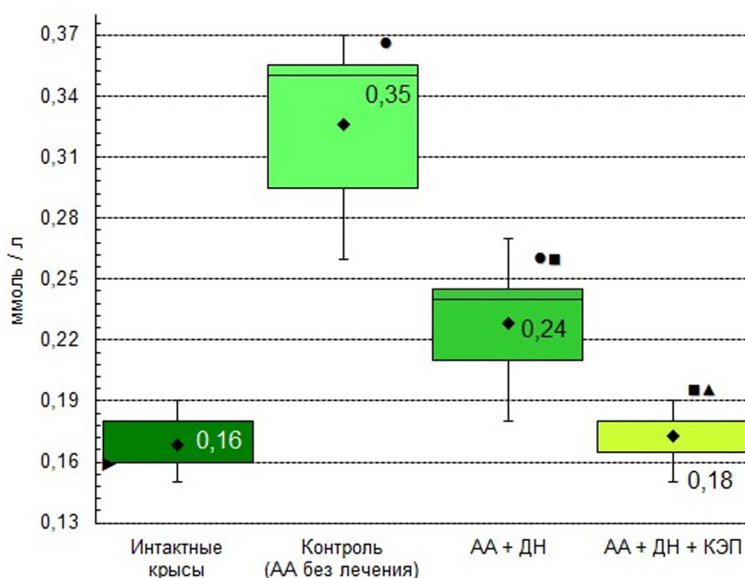


Рисунок 3 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень серомукоида в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилю), ◆ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

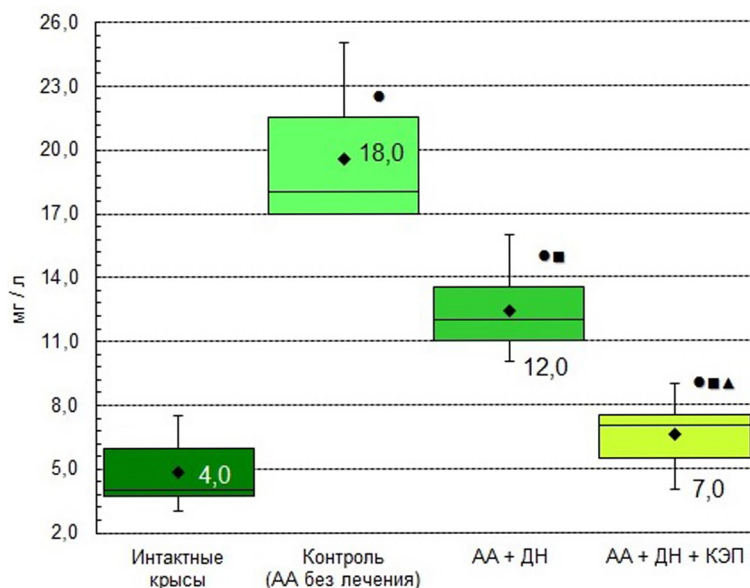


Рисунок 4 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень С-РБ в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилю), ◆ – среднее значение; • – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

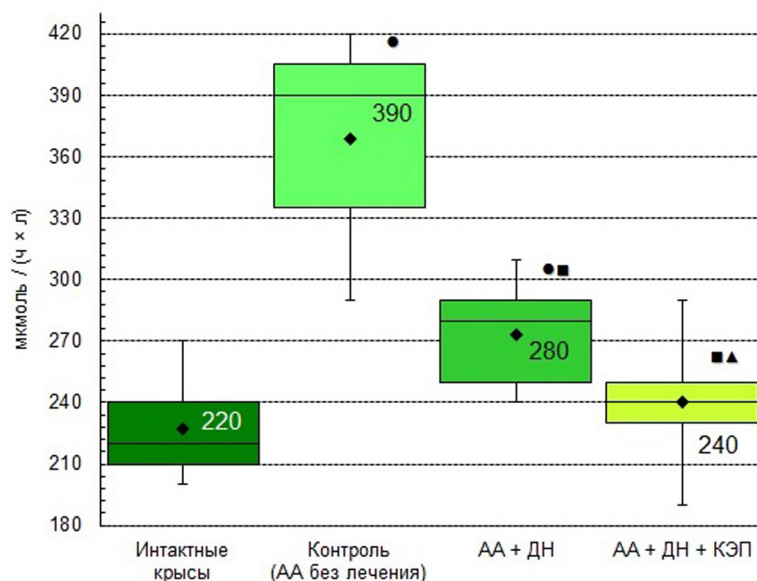


Рисунок 5 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень щелочной фосфатазы в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилю), ◆ – среднее значение; • – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

Таблица 1 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на маркеры цитолиза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента (M±m (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; n=28)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
	Интактные крысы	Контроль (АА без лечения)	АА + ДН	АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Аланин-аминотрансфераза (АлАт), мкмоль/мл/ч	1,4 [1,3; 1,6]	1,8 [1,6; 1,9] p ₁₋₂ =0,01	2,2 [2,1; 2,3] p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ =0,01	1,5 [1,5; 1,6] p ₁₋₄ =0,17 p ₂₋₄ =0,02 p ₃₋₄ <0,01
Аспарат-аминотрансфераза (АсАт), мкмоль/мл/ч	2,3 [2,1; 2,4]	2,9 [2,9; 3,5] p ₁₋₂ <0,001	3,5 [3,3; 2,4] p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ =0,2	2,4 [2,3; 2,5] p ₁₋₄ =0,14 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,01
Гаммаглутамил-транспептидаза (ГГТП), Ед/л	22,3±1,81 (95% ДИ: 18,7–25,8)	36,1±0,80 (95% ДИ: 34,6–37,7) p ₁₋₂ <0,001	27,9±1,30 (95% ДИ: 25,3–30,4) p ₁₋₃ =0,03 p ₂₋₃ <0,001	23,9±1,10 (95% ДИ: 21,7–26,0) p ₁₋₄ =0,5 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ =0,04

Таблица 2 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на показатели белкового гомеостаза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента (M±m (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; n=28)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
	Интактные крысы	Контроль (АА без лечения)	АА +ДН	АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Общий белок, г/л	78,9±1,45 (95% ДИ: 76,0–81,7)	74,6±1,36 (95% ДИ: 71,9–77,2) p ₁₋₂ = 0,05	74,7±0,92 (95% ДИ: 72,9–76,5) p ₁₋₃ = 0,03 p ₂₋₃ = 0,9	81,0±1,50 (95% ДИ: 78,1–83,9) p ₁₋₄ = 0,3 p ₂₋₄ =0,01 p ₃₋₄ <0,01
Альбумины, г/л	35,3±1,69 (95% ДИ: 32,0–38,6)	25,1±1,03 (95% ДИ: 23,1–27,2) p ₁₋₂ <0,001	27,9±1,30 (95% ДИ: 25,3–30,4) p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ =0,1	37,4±1,90 (95% ДИ: 33,7–41,2) p ₁₋₄ =0,01 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,01
Глобулины, г/л	45,7±1,54 (95% ДИ: 42,7–48,7)	49,6±1,29 (95% ДИ: 47,0–52,1) p ₁₋₂ = 0,08	46,7±1,19 (95% ДИ: 44,4–49,0) p ₁₋₃ =0,6 p ₂₋₃ =0,1	40,4±0,65 (95% ДИ: 39,2–41,7) p ₁₋₄ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ < 0,001
Соотношение «альбумины/глобулины»	0,78±0,039 (95% ДИ: 0,70–0,85)	0,51±0,028 (95% ДИ: 0,46–0,57) p ₁₋₂ <0,001	0,60±0,035 (95% ДИ: 0,53–0,67) p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ =0,07	0,93±0,045 (95% ДИ: 0,84–1,02) p ₁₋₄ =0,03 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,001

Таблица 3 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на показатели липидного гомеостаза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента (M±m (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; n=28)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа Интактные крысы	II группа Контроль (АА без лечения)	III группа АА +ДН	IV группа АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Общие липиды, г/л	3,0 [2,7–3,3]	5,1 [4,5–5,2] p ₁₋₂ <0,001	4,4 [4,2–4,5] p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,07	3,3 [3,2–3,4] p ₁₋₄ =0,1 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,001
Фосфолипиды, г/л	2,1±0,05 (95% ДИ: 2,0–2,2)	2,5±0,09 (95% ДИ: 2,3–2,7) p ₁₋₂ <0,001	2,0±0,05 (95% ДИ: 1,9–2,1) p ₁₋₃ =0,6 p ₂₋₃ <0,001	2,1±0,05 (95% ДИ: 2,0–2,2) p ₁₋₄ =0,5 p ₂₋₄ <0,01 p ₃₋₄ =0,2
Фосфолипиды относительно общих липидов, %	70,9±5,35 (95% ДИ: 60,4–81,4)	53,2±3,60 (95% ДИ: 46,2–60,3) p ₁₋₂ =0,02	46,9±1,80 (95% ДИ: 43,3–50,4) p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ =0,1	65,2±2,47 (95% ДИ: 60,3–70,0) p ₁₋₄ =0,4 p ₂₋₄ =0,02 p ₃₋₄ <0,001

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному (p=0,03) повышению активности СОД на 20,4% относительно показателей нелеченых животных (II группа), однако данное значение (59,0% ингибирования окисления кверцетина) все же на 13,2% было ниже показателей животных без АА (68,0 [64,0; 76,5] %).

На фоне комбинированного применения ДН и КЭП нами отмечено статистически достоверное (p=0,01) повышение активности СОД на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы, что лишь на 5,9% было ниже показателей интактных крыс и указывало на наиболее выраженное восстановление активности АОС.

Для оценки состояния соединительнотканых структур у крыс на фоне развития АА нами исследовался уровень серомукоидов, поскольку именно эта группа гликопротеинов поступает в плазму крови при разрушении, деградациии или повреждении соединительной ткани. Кроме того, серомукоиды принято рассматривать как острофазные маркеры воспаления, которые могут служить индикатором выраженности воспалительного процесса поскольку их период жизни составляет около 5 дней [53–56].

Установлено, что на 28-й день эксперимента у крыс с АА отмечено статистически достоверный (p<0,001) рост уровня серомукоида в 2,2 раза относительно показателей интактных крыс (рис. 3).

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному (p<0,01) снижению уровня изучаемого показателя на 31,4% относительно уровня нелеченых животных. Комбинированное применение ДН и КЭП привело к статистически достоверному

(p<0,01) еще большему снижению содержанию серомукоида на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии ДН, который составил соответственно 0,18 [0,17; 0,18] ммоль/л.

«Золотым» маркером воспаления практически при всех патологических процессах по праву принято считать С-РБ, поскольку он имеет тенденцию значительно повышаться при повреждениях тканей, инфекциях бактериальной или вирусной природы, воспалении и злокачественных новообразованиях, а при некрозе тканей и вовсе может в течении суток возрастать до 300 мг/л [47, 57–61].

Установлено, что развитие экспериментального РА у крыс привело к статистически достоверному (p<0,001) увеличению уровня С-РБ в 4,5 раза относительно показателей интактных животных (рис. 4).

На фоне монотерапии ДН данный показатель снизился (p<0,001) на 33,3%, а на фоне комбинированного введения ДН и КЭП – снизился (p<0,001) на 61,1% относительно значений у крыс с АА без лечения. Полученные данные указывают на выраженные противовоспалительные свойства ДН, которые потенцируются при совместном применении с КЭП, однако могут быть связаны и с собственной противовоспалительной активностью КЭП.

Установленные биохимические признаки активного воспалительного процесса и развивающийся при этом дисбаланс в системе ПОЛ-АОС обосновывает целесообразность детального анализа активности маркеров цитолиза на фоне лечения крыс с АА – АлАТ, АсАТ и ГГТП [62, 63].

Исследование показало, что развитие АА у крыс сопровождалось увеличением содержания АлАТ на

28,6% ($p=0,01$), АсАТ на 26,1% ($p<0,001$) и ГГТП на 62,2% ($p<0,001$) относительно показателей интактных крыс (табл. 1).

Аминотрансферазы являются сложными белками-ферментами, которые катализируют процессы трансаминирования и обеспечивая синтез отдельных аминокислот в организме. Доказано, что под влиянием повреждающего фактора нарушается энергетический метаболизм гепатоцитов, что приводит к повышению проницаемости клеточных мембран и появлению в сыворотке крови компонентов цитоплазмы.

Поскольку маркер повреждения клеточных – ГГТП в наибольшей степени содержится в почках, печени и тонкой кишке то можно предположить о наличии воспалительного процесса в указанных органах, что сопоставляется с данными литературы о системности воспалительного процесса при РА, аналогом которого является АА у животных [50].

Применение ДН привело к усилению цитолитических процессов, на что указывало еще большее возрастание исследуемых маркеров в периферической крови – так АлАТ был выше на 22,2% ($p<0,01$), а АсАТ – на 20,7% ($p=0,2$) относительно показателей крыс с АА без лечения, что на 57,1% ($p<0,01$) и 52,2% ($p<0,01$) соответственно превышало показатели интактных животных (табл. 1). Летальности в группе комбинированного применения ДН и КЭП не отмечено. Указанные изменения со стороны активности аминотрансфераз согласуются с данными о гепатотоксическом действии ДН [3, 8, 64–66].

Также установлено, что на фоне применения ДН ГГТП статистически достоверно ($p<0,001$) снизилась на 22,9% относительно показателей животных контрольной группы (табл. 1).

Особое внимание привлекают показатели цитолитических процессов у крыс с АА на фоне комбинированного применения ДН и КЭП (табл. 1). Так установлено, что АлАТ статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а АсАТ – ниже ($p<0,01$) на 37,9% относительно показателей животных, которым вводили ДН, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым АА. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность КЭП нивелировать не только АА-индуцированный цитолитический синдром, но и сопутствующий цитолиз, усиливаемый ДН, что указывает на универсальность его цитопротективной активности, вероятно, обусловленной его способностью стабилизировать клеточные мембраны, а также его антиоксидантными свойствами.

Кроме того установлено, что комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось также статистически достоверным ($p<0,001$) снижением уровня ГГТП на 28,6% относительно нелеченых крыс с АА, что на 11,4% было ниже ($p=0,01$) чем у крыс, леченных только ДН (табл. 1).

Оценка уровня щелочной фосфатазы в периферической крови у крыс с АА показала, что развитие системного аутоиммунного воспаления сопровождалось статистически достоверным ($p<0,001$) повышением указанного металлопротеина на 77,3% относительно показателей интактных крыс и составило 390 [335; 405] мкмоль/чл (рис. 5).

Щелочная фосфатаза – гетерогенный энзим, состоящий из отдельных изоферментов, каждый из которых сосредоточен в определенном органе: печени, костной ткани, кишечнике, плаценте. Локализуясь на клеточной мембране, фермент подключается к транспортировке биологически важных соединений, в первую очередь, фосфора. Щелочная фосфатаза активно участвует в процессах фосфорно-кальциевого обмена в организме. Рост активности щелочной фосфатазы указывает на активацию процессов ремоделирования костной ткани, поскольку ее костная фракция синтезируется остеобластами и их предшественниками и участвует в минерализации костного матрикса [50, 67–69]. Повышение активности данного фермента может указывать на повышение остеобластической активности и усиление деструктивных изменений в печени или возникновения холестаза у крыс с АА [3].

Монотерапия ДН привела к статистически достоверному ($p<0,01$) снижению активности щелочной фосфатазы на 28,2%, а комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось более выраженным снижением активности указанного фермента на 38,5% ($p<0,01$) относительно показателей нелеченых крыс с АА (рис. 5).

Изучение белкового спектра крови крыс с АА показало, что уровень общего белка практически не имел различий у интактных крыс и крыс с АА (табл. 2).

Изучение содержания отдельных белковых фракций показало, что развитие АА у крыс сопровождалось статистически достоверным ($p<0,001$) снижением содержания альбуминов на 28,7% относительно показателей интактных крыс. Альбумины – наиболее гомогенная фракция протеинов, основной функцией которых является поддержание коллоидно-осмотического давления, а также транспорт углеводов, липидов, гормонов и пигментов. Организм пациента с активным РА более активно потребляет альбумины в месте воспаления, в результате чего развивается гипоальбуминемия.

Кроме того, отмечено, что у крыс с АА незначительно возрастало содержание глобулинов на 8,4% ($p=0,04$) относительно показателей интактных животных. Как известно, при длительном подостром прогрессирующем процессе наблюдается, главным образом, гипергаммаглобулинемия, что связано с ростом уровня аутоантител [50, 51, 70, 71].

Указанные изменения приводили к статистически достоверному ($p<0,001$) снижению значения альбумин/глобулинового соотношения периферической

крови на 34,2% относительно показателей интактных животных (табл. 3). Изменение соотношения протеиновых фракций, как правило, соответствует тяжести РА и отражает динамику воспалительного процесса [50, 51, 70, 72].

Монотерапия ДН привела к статистически достоверному ($p=0,04$) снижению значения альбумин/глобулинового соотношения на 17,5% относительно крыс с АА без лечения. Комбинированное же применение ДН и КЭП сопровождалось полным повышением ($p=0,01$) исследуемого соотношения на 19,5% выше чем у интактных животных, что обусловлено повышением уровня альбуминов практически до уровня интактных животных и в то же время на 11,6% ниже ($p<0,01$) значения у интактных крыс содержание глобулинов (табл. 3).

Важную роль в жизнедеятельности клетки играют липиды, которые выступают структурными компонентами биомембран, энергетическим субстратом клетки, участвующие в реакциях сигнальной трансдукции, экзо- и эндоцитоза и тому подобное. Кроме того, они участвуют в фиксации белков фосфолипидного бислоя и обеспечивают их соответствующую ориентацию в клеточной мембране, является неполярным средой для жирорастворимых субстратов и кофакторов ферментов, обуславливают их фолдинг, а также выполняют роль регуляторов и модуляторов ферментативной активности [69, 73].

Исследование показало, что у крыс на фоне развития АА отмечается статистически достоверное ($p=0,02$) снижение доли фосфолипидов в пуле общих липидов на 25,0%. При этом отмечено рост общего уровня липидов ($p<0,001$) в 1,7 раза и непропорциональный рост содержания фосфолипидов ($p<0,001$) в 1,2 раза, что обусловлено активацией циклооксигеназного пути метаболизма мембранных фосфолипидов (табл. 3).

На фоне монотерапии ДН отмечено снижение уровня общих липидов ($p=0,07$) в 1,3 раза и снижение уровня фосфолипидов ($p<0,001$) так же в 1,3 раза относительно показателей животных с АА без лечения, что соответствовало развитию еще большего дисбаланса содержания фосфолипидов в пуле общих липидов – их содержание снизилось еще на 6,3%, однако указанные изменения не достигли уровня статистической значимости ($p=0,1$).

На фоне комбинированного применения ДН и КЭП у крыс с АА отмечена статистически достоверная ($p=0,02$) гармонизация липидного баланса – содержание фосфолипидов выросло на 22,6% относительно показателей животных с АА без лечения и составил соответственно $2,1\pm 0,05$ (95% ДИ: 2,0–2,2) г/л. Ука-

занные изменения наблюдались на фоне снижения уровня общих липидов в сыворотке крови ($p<0,001$) на 35,3% относительно показателей нелеченых крыс и составили соответственно 3,3 [3,2–3,4] г/л, что сопоставлялось с показателями интактных животных 3,0 [2,7–3,3] г/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты крысам с адьювантным артритом привело нормализации уровня активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, что указывает на нивелирование признаков артрит-индуцированного оксидативного стресса. Также выявлено статистически достоверное ($p=0,01$) повышение уровня супероксиддисмутазы на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы.

Установлено усиление противовоспалительных свойств диклофенака натрия на фоне комбинированного применения диклофенака натрия с криоконсервированным экстрактом плаценты – уровень С-реактивного белка снизился ($p<0,001$) на 61,1% относительно нелеченых крыс, а уровень серомукоида статистически достоверно ($p<0,01$) снизился на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии исследуемым НПВП.

Показано, что уровень аланин-аминотрансфераз статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а аспартат-аминотрансферазы – ниже ($p<0,01$) на 37,9% относительно показателей животных, которым вводили диклофенак натрия, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым адьювантным артритом. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность криоконсервированного экстракта плаценты нивелировать не только артрит-индуцированный цитолитический синдром, но и диклофенак-индуцированный.

Комбинированное применение криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия сопровождалось нормализацией уровня общих липидов и фосфолипидов в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального ревматоидного артрита. Так содержание фосфолипидов в пуле фосфолипидов статистически достоверно ($p=0,02$) выросло на 22,6% относительно показателей животных с адьювантным артритом без лечения.

В дальнейшем, для корректной оценки активности воспалительного процесса целесообразно определение уровня матриксных металлопротеиназ и гомоцистеина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность лаборантам Отдела экспериментальной криомедицины З.Е. Губенко и Л.М. Гордеевой и заведующей вивария Л.В. Бацуновой Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины за помощь в проведении экспериментальных исследований.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ф.В. Гладких – идея, концепция и дизайн исследования, координация и участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание основного текста статьи и формулирование выводов; Н.А. Чиж – концепция исследования, участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, редактирование текста статьи;

А.А. Манченко – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов;

И.В. Белочкина – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, поисково-аналитическая работа; И.П. Михайлова – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zeng C., Wei J., Persson M. S. M., Sarmanova A., Doherty M., Xie D., Wang Y., Li X., Li J., Long H., Lei G., Zhang W. Relative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies // *British Journal of Sports Medicine*. – 2018. – Vol. 52, No.10. – P. 642–650. DOI: <https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098043>.
2. Балабанцева А.П., Каратеев А. Е. Частота и клинико-эндоскопические особенности сочетанных НПВП-индуцированных гастроинтестинальных повреждений // *Современная ревматология*. 2018. – Т. 12, №4. – С. 95–100. DOI: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2018-4-95-100>.
3. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К., Затолочина К.Э. Безопасность и переносимость НПВС: фокус на ацеклофенак // *Медицинский совет*. – 2019. – №9. – С. 110–120. – DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-9-110-120>.
4. Fischbach W. Drug-induced gastrointestinal bleeding // *Internist*. – 2019. – Vol. 60, No.6. – P. 597–607. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00108-019-0610-y>.
5. Трінус Ф.П. Рзвиток уявленнь про механізм дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів та анальгетиків-антипіретиків Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – Т. 2, №27. – С. 68–72.
6. Гладких Ф.В. Мультимодальная анальгезия: полипрагмазия в обезболивании или рациональное применение нестероидных противовоспалительных средств для предотвращения хронизации боли // *Траекторія науки: міжнародний електронний науковий журнал = Traektoriâ Nauki = Path of Science*. – 2020. – Т. 6, №7. – С. 4009–4018. DOI: <http://dx.doi.org/10.22178/pos.60-5>.
7. Bally M., Dendukuri N., Rich B., Nadeau L., HelinSalmivaara A., Garbe E., Brophy J. M. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data // *British Medical Journal*. – 2017. – No.357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.j1909>.
8. Каратеев А.Е., Насонов Е.Л., Ивашкин В.Т., Мартынов А.И., Яхно Н.Н., Арутюнов Г.П., Алексеева Л.И., Абузарова Г.Р., Евсеев М.А., Кукушкин М.Л., Копенкин С.С., Лиля А.М., Лапина Т.Л., Новикова Д. С., Попкова Т.В., Ребров А.П., Скоробогатых К.В., Чичасова Н.В. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации // *Научно-практическая ревматология*. – 2018. – №56. – С. 1–29. DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-1-29>.
9. Cooper C., Chapurlat R., Al-Daghri N., Herrero-Beaumont G., Bruyere O., Rannou F., Roth R., Uebelhart D., Reginster J. Y. Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: what does the literature say? // *Drugs & Aging*. – 2019. – Vol. 36, No.1. – С. 15–24. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00660-1>.
10. Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Алексеенко С.А., Бакулина Н.В., Барановский А.Ю., Белова Г.В., Бордин Д.С., Вьючнова Е.С., Гайдуклова И.З., Гимаева З.Ф., Кашкина Е.И., Козлова И.В., Кокорин В.А., Лапина Е.Д., Ли Е.Д., Мигуськина Е.И., Мирончев О.В., Онучина Е.В., Охлобыстин А.В., Пасечников В. Д., Пахомова И.Г., Позднякова О.Ю., Путинцева И.В., Сарсенбаева А.С., Свиридова Т.Н., Симаненков В.И., Симонова Ж.Г., Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Туркина С.В., Хабарова Ю.А., Шевяков М.А., Яковенко Э.П., Яковлев А.А., Янковая Т.Н. Рекомендации по профилактике и лечению эзофаго-гастро-энтеро-колопатий, индуцированных нестероидными противовоспалительными препаратами // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2018. – Т.3, №151. – С. 4–18. – <https://www.nogor.org/jour/article/view/567/562>.
11. Yang J.H., Lee B.H., Eum K.S., Suk K.S., Park J.O., Kim H.S., Lee H.M., Moon S.H. Prevalence of gastrointestinal and cardiovascular risk in patients with degenerative lumbar spinal disease // *Clinics in Orthopedic Surgery*. – 2020. – Vol. 12, No.3. – P. 343–352. DOI: <https://doi.org/10.4055/cios20021>.
12. Каратеев А.Е. Обладают ли нестероидные противовоспалительные препараты патогенетическим действием? // *Современная ревматология*. – 2012. – №4. – С. 13–22.
13. Каратеев А.Е. Селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 и «защищенные» нестероидные противовоспалительные препараты: два метода профилактики лекарственных осложнений // *Клиническая медицина*. – 2014 – №8. – С. 54–61.
14. Davis A., Robson J. The dangers of NSAIDs: look both ways. *British Journal of General Practice*. – 2016. – Vol. 66, No.645. – P. 172–173. DOI: <https://doi.org/10.3399/bjgp16X684433>.
15. Довгань Е.В. Клиническая фармакология нестероид-

- ных противовоспалительных препаратов: курс – на безопасность // Российский медицинский журнал. – 2017. – №13. – С. 979–985.
16. Степанюк Н.Г., Гладких Ф.В., Басараб О.В. Аналіз побічних реакцій на тлі застосування анальгетиків–антипіретиків та нестероїдних протизапальних засобів, які призначались лікарями закладів охорони здоров'я Подільського регіону у 2015 році // Галицький лікарський вісник. – 2016. – Т. 2, №23. – С. 60–63. – Режим доступу: <http://ojs.ifnmu.edu.ua/index.php/gmj/article/view/545>.
 17. Vjarnason I., Takeuchi K. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy // *Journal of Gastroenterology*. – 2009. – No.44. – P. 23–29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2266-6>.
 18. Голованова Э.В. Защита слизистой желудочно-кишечного тракта от повреждающего действия нестероидных противовоспалительных средств // *Клиническая геронтология*. – 2017. – №1–2. – С. 47–51.
 19. Гладких Ф.В. Превентивно-лечебные стратегии фармакокоррекции гастропатии, индуцированной нестероидными противовоспалительными препаратами // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2017. – №4. – С. 14–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/RCF15414-23>.
 20. Куксгауз И.А., Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Фаустова Н.М., Гущин Я.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение гастропротективного эффекта препарата Алфлутоп на модели индуцированной диклофенаком гастропатии у крыс // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019. – №5. – С. 15–21. DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-165-5-15-21>.
 21. Гулевский А.К., Абакумова Е.У., Моисеева Н.Н., Долгих О.Л. Влияние фракции пуповинной крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка крыс // *Украинский биохимический журнал*. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 120–127.
 22. Жариков А.Ю., Лоренц С.Э., Бобров И.П., Мазко О.Н., Макарова О.Г. Поиск новых молекул олигопептидов для фармакологической коррекции НПВС-индуцированной язвы желудка // *Биомедицина*. – 2019. – Т. 15, №3. – С. 90–97. DOI: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-90-97>.
 23. Гулида М.О., Мирошниченко Е.В., Берёзка Н.И., Гарячий Е.В. Применение экстракта плаценты в комплексном лечении больных ревматоидным артритом // *Экспериментальная и клиническая медицина*. – 2014. – Т. 1, №62. – С. 168–171.
 24. Капустянська А.А. Застосування препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» в комплексному лікуванні загострення подагричного артриту з метаболічним артритом // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. – 2010. – Т. 10, №30. – С. 54–58.
 25. Pogozhykh O., Prokopyuk V., Figueiredo C., Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. – 2018. – No.2018. – P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4837930>.
 26. Shepitko K.V. Application of cryopreserved placenta preparations in the small intestine pathologies in rats for their further use in exigent conditions // *Bulletin of problems biology and medicine*. – 2019. – Vol. 4, No.154. P. 56–61. DOI: <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-2-154-56-61>.
 27. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Martin I., Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts // *Cryobiology*. – 2017. – No. 76. – P. 150–153. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.001>.
 28. Rogulska O., Tykhvynska O., Revenko O., Grischuk V., Mazur S., Volkova N., Vasyliiev R., Petrenko A., Petrenko Y. Novel cryopreservation approach providing off-the-shelf availability of human multipotent mesenchymal stromal cells for clinical applications // *Stem Cells International*. – 2019. – No.2019. – 4150690. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4150690>.
 29. Pogozhykh D., Pogozhykh O., Prokopyuk V., Kuleshova L., Goltsev A., Blasczyk R., Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8, No.1. – P. 66. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0512-7>.
 30. Капустянська А.А. Застосування препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» в комплексному лікуванні загострення подагричного артриту з метаболічним артритом. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медико-стоматологічної академії. – 2010. – Т. 10, №30. – С. 54–58.
 31. Прокопюк В.Ю., Фалько О.В., Мусатова І.Б., Прокопюк О.С., Роєнко О.О., Терехова О.О., Чуб О.В. Кріоконсервування та низькотемпературне зберігання плацентарних біоб'єктів // *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 291–310.
 32. Гладких Ф.В., Чиж Н.А. Механізми захисти слизової оболонки желудка в умовах застосування кріоекстракта плаценти при диклофенак-індуцированій гастропатії. *Сборник матеріалів сателітної дисциплінарної науково-практичної конференції студентів і молодих учених «Фундаментальна наука в сучасній медицині–2021»*. Мінськ: Заклад освіти «Білоруський державний медичний університет». – 2021. – С. 436–340.
 33. Гладких Ф.В., Чиж Н.А., Слета І.В. Исследование гастропротекторной активности криоконсервированного экстракта плаценты при ибупрофен-индуцированном поражении желудка в эксперименте. *Материалы VII Республиканской научно-практической конференции молодых ученых «Современные достижения молодых ученых в медицине–2020»*. Гродно. Гродно: Заклад освіти «Гродненський державний медичний університет». – 2020. – С. 57–60.
 34. Гладких Ф.В., Чиж М.О. Модуляція мелоксікам-індукованих змін секреторної та моторної активності шлунка шляхом застосування кріоекстракту плаценти // *Праці Наукового Товариства ім. Т.Г. Шевченка. Медичні науки*. – 2021. – Т. 64, №1. – С. 84–94. DOI: <https://doi.org/10.25040/10.25040/ntsh2021.01.08>. Режим доступу: <https://mspsss.org.ua/index.php/journal/article/view/400>.
 35. Gryshchenko N.G., Klimenko N.A., Gorgol N.I., Tatarko S.V. Effect of placental cryoextract on chronic inflammation of the ovaries in mice // *Medicine today and tomorrow*. – 2010. – Vol. 2–3, No.47–48. – P. 7–17.

36. Брунь Л.В., Маколінець В.І. Дослідження впливу низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання на концентрацію диклофенаку натрію у плазмі крові щурів методом вискоєфективної рідинної хроматографії. *Медична та клінічна хімія*. – 2016. – Т. 18, №2. – С. 54–59.
37. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // *Доклады АН СССР*. – 1979. – Т. 247, №6. – С. 1513–1516.
38. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Щелкунов С.Н. Ревматоидный артрит: лабораторные модели заболевания // *Медицинская иммунология*. – 2015. – Т. 17, №3. – С. 203–210.
39. Громыко М.В., Грицук А.И. Экспериментальные модели ревматоидного артрита // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2012. – Т. 2, №32. – С. 115–118.
40. Freund J. Some aspects of active immunization. *Annual Review of Microbiology*. – 1947. – No.1. – P. 291–308.
41. Choudhary N., Bhatt L.K., Prabhavalkar K.S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2018. – Vol. 40, No.3. – P. 193–200. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1434793>.
42. Alavala S., Nalban N., Sangaraju R., Kuncha M., Jerald M. K., Kilari E. K., Sistla R. Anti-inflammatory effect of stevioside abates Freund's complete adjuvant (FCA)-induced adjuvant arthritis in rats // *Inflammopharmacology*. – 2020. – Vol. 28, No.6. – P. 1579–1597. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00736-0>.
43. Asakawa T., Matsushita S. coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // *Lipids*. – 1980. – Vol. 15, No.3. – P. 137–140.
44. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалёва Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супрокиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопросы медицинской химии*. – 1990. – №2. – С. 88–91.
45. Bligh E.G., Dyer W.I. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. – 1959. – Vol. 37, No.8. – P. 911–917.
46. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // *Journal of Chromatography*. – 1972. – No.67. – P. 376–378.
47. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *Journal of Chromatography*. – 1975. – No.114. – P. 129–141.
48. Mititelu R.R., Padureanu R., Vacanoiu M., Padureanu V., Docea A. O., Calina D., Barbulescu A. L., Buga A. M. Inflammatory and oxidative stress markers-mirror tools in rheumatoid arthritis // *Biomedicines*. – 2020. – №8(5). – P. 125. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050125>.
49. Войтенко Н.Г., Макарова М.Н., Зуева А.А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2020. – №1. – С. 47–53. – DOI: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-01-06>.
50. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г. Характеристика терапевтического эффекту ібупрофену та його комбінації з вінбономом за даними гематологічних показників на моделі ад'ювантного артриту у щурів // *Львівський медичний часопис*. – 2015. – №4. – С. 64–70. Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch_2015_21_4_14.
51. Подольський В. В., Подольський В. В. Перекисне окислення ліпідів як прояв оксидативного стресу в організмі жінок із змінами репродуктивного здоров'я на тлі соматоформних захворювань із порушеннями вегетативного гомеостазу // *Акушерство та гінекологія*. – 2017. – № 2. – С. 98–104. DOI: <https://doi.org/10.11603/24116-4944.2017.2.8095>.
52. Agrahari G., Sah S. K., Nguyen C. T., Choi S. S., Kim H. Y., Kim T. Y. Superoxide dismutase 3 inhibits LL-37/KLK-5-mediated skin inflammation through modulation of EGFR and associated inflammatory cascades // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2020. – Vol. 140, No.3. – P. 656–665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.434>.
53. Nguyen N.H., Tran G.B., Nguyen C.T. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases // *Journal of Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 98, No.1. – P. 59–69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>.
54. Suchdev P.S., Williams A.M., Mei Z., Flores-Ayala R., Pasricha S.R., Rogers L.M., Namaste S.M. Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2017. – Vol. 106, No.6. – P. 1626–1633. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155937>.
55. Iwanczak B., Ruczka M., Matusiewicz M., Pytrus T., Matusiewicz K., Krzesiek E. Correlation between biomarkers (calprotectin, seromuroid, metalloproteinase-3 and CRP) and clinical and endoscopic activity of ulcerative colitis in children // *Advances in Medical Sciences*. – 2020. – Vol. 65, No.2. – P. 259–264. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.03.004>.
56. Namaste S.M., Aaron G.J., Varadhan R., Peerson J.M., Suchdev P.S., BRINDA Working Group. Methodologic approach for the biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2017. – Vol. 106, No.1. – P. 333–347. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.142273>.
57. Smith S.A., Waters N.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drugs binding to alpha-1-acid glycoprotein // *Pharmaceutical Research*. – 2018. – Vol. 36, No.2. – P. 30. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2551-x>.
58. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – No.9. – P. 754. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>.
59. Lopic I., Padoan A., Bozzato D., Plebani M.. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in acute inflammation // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2020. – Vol. 153, No.1. – P. 14–29. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz142>.
60. Yao Z., Zhang Y., Wu H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation // *Inflammation Research*. – 2019. – Vol. 68, No.10. – P. 815–823. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01269-1>.
61. Avan A., Tavakoly Sany S.B., Ghayour-Mobarhan M., Rahimi H.R., Tajfard M., Ferns G. Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – Vol. 233, No.11. – P. 8508–8525. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.26791>.

62. Li W., Cao T., Luo C., Cai J., Zhou X., Xiao X., Liu S. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, No.14. – P. 6129–6140. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10614-y>.
63. Wang J., Xia J., Yan X., Yang Y., Wei J., Xiong Y., Wu W., Liu Y., Chen Y., Jia B., Chen Z., Zhang Z., Ding W., Huang R., Wu C. The gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio predicts liver inflammation in chronic hepatitis B with normal or mildly elevated alanine transaminase // *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 44, No.6. – P. 913–922. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.01.011>.
64. Ndrepepa G, Collieran R, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease // *Clinica Chimica Acta*. – 2018. – No.476. – P. 130–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.026>.
65. Mohi-Ud-Din R., Mir R. H., Sawhney G., Dar M.A., Bhat Z.A. Possible pathways of hepatotoxicity caused by chemical agents // *Current drug metabolism*. – 2019. – Vol. 20, No.11. – P. 867–879. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389200220666191105121653>.
66. Jung S.H., Lee W., Park S.H., Lee K.Y., Choi Y.J., Choi S., Kang D., Kim S., Chang T.S., Hong S.S., Lee B.H. Diclofenac impairs autophagic flux via oxidative stress and lysosomal dysfunction: Implications for hepatotoxicity // *Redox Biology*. – 2020. – No.37. – P. 101751. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101751>.
67. Vyas A., Purohit A., Ram H. Assessment of dose-dependent reproductive toxicity of diclofenac sodium in male rats // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2019. – Vol. 42, No.5. – P. 478–486. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1421659>.
68. Yeh J.C., Wu C.C., Choy C.S., Chang S.W., Liou J.C., Chen K.S., Tung T.H., Lin W.N., Hsieh C.Y., Ho C.T., Wang T.M., Chang J.F. Non-hepatic alkaline phosphatase, hs-CRP and progression of vertebral fracture in patients with rheumatoid arthritis: a population-based longitudinal study // *Journal of Clinical Medicine*. – 2018. – Vol. 7, No.11. – P. 439. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm7110439>.
69. Jo S., Han J., Lee Y.L., Yoon S., Lee J., Wang S.E., Kim T.H. Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis // *International Journal of Rheumatic Diseases*. – 2019. – Vol. 22, No.2. – P. 252–261. DOI: <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13419>.
70. Hirschmugl B., Crozier S., Matthews N., Kitzinger E., Klymiuk I., Inskip H. M., Harvey N. C., Cooper C., Sibley C.P., Glazier J., Wadsack C., Godfrey K.M., Desoye G., Lewis R.M. Relation of placental alkaline phosphatase expression in human term placenta with maternal and offspring fat mass // *International Journal of Obesity*. – 2018. – Vol. 42, No.6. – P. 1202–1210. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0136-8>.
71. Liao K.P., Solomon D.H. Lipids and cardiovascular risk through the lens of rheumatoid arthritis // *Arthritis & Rheumatology*. – 2019. – Vol. 71, No.9. – P. 1393–1395. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.40891>.
72. Криль І.Й., Гаврилюк А.М., Стойка Р.С., Чоп'як В.В., Кіт Ю.Я. Характеристика ензиматичної активності та білкового складу сироватки крові щурів за умови індукваного імунізацією запалення суглобів // *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія*. – 2014. – №2. – С. 15–23.
73. Гладких Ф.В., Михайлова І.П., Манченко А.О. Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з криоконсервованим екстрактом плаценти на ліпідний баланс в сироватці крові при експериментальному ревматоїдному артриті. *Матеріали XXVII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new medicines development» (18–19 березня 2021 р.)*; Харків: Національний фармацевтичний університет МОЗ України. – 2021. – С. 272–273.

АВТОРЫ

Гладких Фёдор Владимирович – аспирант (доктор философии в области здравоохранения по специальности «222 – Медицина») отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины; младший научный сотрудник группы лучевой патологии и паллиативной медицины отдела радиологии, ГУ «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С.П. Григорьева Национальной академии медицинских наук Украины». ORCID ID: 0000-0001-7924-4048. E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Чиж Николай Алексеевич – кандидат медицинских наук, старший исследователь, и. о. заведующего отделом экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0003-0085-296X. E-mail: chizh.cryo@gmail.com

Манченко Анна Александровна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0001-5982-4504. E-mail: anna.gorlenko@gmail.com

Белочкина Ирина Владиславовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0003-0090-2971. E-mail: ibelochkina@ukr.net

Михайлова Ирина Павловна – научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0001-9388-2820. E-mail: expcryomed@gmail.com