

УДК 632.938+616-092+615.451.16+615.29+615.832.98+616.8-009.7

DOI <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2024-1-6>Ф. В. Гладких^{1,2} <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>Т. І. Лядова¹ <https://orcid.org/0000-0002-5892-2599>

АНАЛГЕТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ КРІОЕКСТРАКТІВ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН ТА КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО АРТРИТУ

¹Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна²Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

УДК 632.938+616-092+615.451.16+615.29+615.832.98+616.8-009.7

Ф. В. Гладких^{1,2}, Т. І. Лядова¹

АНАЛГЕТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ КРІОЕКСТРАКТІВ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН ТА КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО АРТРИТУ

¹Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна²Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

Лікування больового синдрому залишається в центрі уваги клініцистів, а розробка нових методів лікування є актуальним завданням сучасної медицини. Експериментальні дослідження проведені на 42 шурах-самцях масою 200–220 г на моделі ревматоїдного артриту. Встановлено, що безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби володіють власною аналгетичною активністю як на спінальному, так і на супраспінальному рівнях ноцицепції. На спінальному рівні ноцицепції кріоекстракт плаценти та кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин проявляли співставну аналгетичну активність, яка становила 43,1% та 42,7% відповідно. На супраспінальному рівні ноцицепції найвиразнішу аналгетичну активність виявлено у кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин, яка становила 54,8%, що лише на 18,8% було нижче ($p=0,049$) за показники шурів, яким вводили диклофенак натрію.

Ключові слова: безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби, аутоімунні захворювання, кріоекстракт селезінки, кріоекстракт плаценти, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин.

UDC 632.938+616-092+615.451.16+615.29+615.832.98+616.8-009.7

F. V. Hladkykh^{1,2}, T. I. Liadova¹

ANALGESIC POTENTIAL OF CRYOEXTRACTS OF BIOLOGICAL TISSUES AND CONDITIONED MEDIA OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ARTHRITIS

¹V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine²State Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

Background. Treating pain syndrome remains the focus of clinicians' attention, and developing new treatment methods is an urgent task of modern medicine. Particular attention is drawn to the results of recent studies on the use of cell-free cryopreserved biological agents to optimize anti-inflammatory and analgesic therapy for a number of autoimmune diseases.

Objective – to characterize the analgesic activity of cryoextract of placenta (CEP), cryoextract of spleen, and conditioned medium of mesenchymal stem cells in the model of autoimmune arthritis (AA) in rats.

Methods. Experimental studies were conducted on 42 male rats weighing 200–220 g. AA was modeled by sub-plantar administration of complete Freund's adjuvant. AA treatment was carried out from 14 to 28 days. On "0" (initial indicators), 14 and 28 days of the experiment, pain sensitivity was assessed (electrical impulse irritation and mechanical irritation according to Randall-Selitto).

Results. The conducted study showed that on the 14th day of the experiment in rats with simulated AA, a statistically significant ($p<0.009$) decrease by 2 times in the threshold of pain sensitivity with mechanical irritation according to Randall-Selitto was observed relative to the initial indicators. Evaluation of the effect of administration of biological agents to rats with AA demonstrated the ability of the studied drugs to reduce the threshold of pain sensitivity from the action of a mechanical stimulus, which indicates the modulation of the peripheral component of nociception. Against the background of the introduction of CEP to rats with AA, a statistically significant ($p=0.01$) increase in threshold of pain sensitivity from an electrical impulse stimulus was noted by 44.7%.

Conclusions. At the spinal level of nociception, cryoextract of placenta and conditioned medium of mesenchymal stem cells showed comparable analgesic activity, which was 43.1% and 42.7%, respectively. At the supraspinal level of nociception, the most pronounced analgesic activity was found in the conditioned medium of mesenchymal stem cells, which was 54.8%, that is only 18.8% lower ($p=0.049$) than the indicators of rats administered diclofenac sodium.

Key words: cell-free cryopreserved biological agents, autoimmune diseases, spleen cryoextract, placenta cryoextract, mesenchymal stem cell conditioned medium.

© Ф. В. Гладких, Т. І. Лядова, 2024

Стаття поширюється на умовах ліцензії



Вступ. Ревматоїдний артрит (РА) визначається як системне аутоімунне захворювання (АІЗ), зумовлене хронічним запальним процесом, який вражає суглоби, а також інші органи та системи – серце, нирки, легені, травну систему, очі, шкіру та нервову систему [1; 2]. РА є однією з найпоширеніших форм артриту з поширеністю 0,3–4,2%, залежно від досліджуваної популяції [2]. Патогенез РА є складним та багатофакторним і ґрунтується на нерегульованій цитрулінізації, яка призводить до вироблення антитіл проти цитрулінованого білка [1].

Запальні цитокіни та медіатори запалення, зокрема фактор некрозу пухлини- α , інтерлейкін- 1β , інтерлейкін-6 та інтерлейкін-17, активуючи внутрішньоклітинні сигнальні шляхи призводять до каскаду фосфорилування, що знижує поріг для ноцицепторних нейронів для генерування потенціалів дії, що зрештою призводить до підвищеної чутливості до болю. Біль у разі РА формується поєднанням больових сигналів, які надходять периферичними, спінальними та супраспінальними шляхами, а інтенсивність та характер болю в підсумку залежить від комбінації прямої активації периферичних ноцицепторів та модуляції чутливості нейронів по всьому ноцицептивному шляху. Добре відомо, що для РА є характерними підвищення больової чутливості – аллодінія та гіпералгезія, які добре відтворюються у разі розвитку експериментального артриту. Крім запального болю, пацієнти з РА також відчують незапальний біль, який включає механічний біль (у разі деформації суглобів), нейропатичний біль, фіброміалгію, а також психосоціальні наслідки захворювання, такі як депресія, тривога, порушення сну, сексуальна дисфункція та інвалідність.

Лікування болю залишається в центрі уваги більшої клініцистів, а розробка інноваційних методів лікування запального та незапального компонентів больового синдрому у разі РА є актуальним завданням сучасної медицини. Особливу увагу привертають результати нещодавніх досліджень щодо застосування **безклітинних біологічних засобів (БКБЗ)** з метою оптимізації протизапальної та знеболюючої терапії цілої низки АІЗ [3; 4]. Так, у роботі [5] продемонстровано, що застосування кріоекстракту плаценти (КЕП) підвищує фармакотерапевтичну ефективність одного з найуживаніших нестероїдних протизапальних засобів диклофенаку натрію (ДН). L. Не та співав. (2020 р.) продемонстрували, що везикули з мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку полегшують біль у разі експериментального остеоартриту у щурів [6].

Мета – охарактеризувати анальгетичну активність КЕП, кріоекстракту селезінки (КЕС) та кондиціонованого середовища МСК (КС-МСК) на моделі аутоімунного артриту у щурів.

Методи. Експериментальні дослідження проведені на 42 щурах-самцях масою 200–220 г у відповідності до основних біоетичних принципів Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах. Дослідження знеболюючої активності БКБЗ – КЕП, КЕС та КС-МСК проведені на моделі експериментального РА – ад'ювантного артриту (АА)

у щурів. Для моделювання АА використовували повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ), який вміщує вакцину БЦЖ (*від BCG – Bacillus Calmette-Guerin*) або полісахариди, отримані з мікобактерій туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*), складні жирні кислоти (деривати ланоліну), олії та емульгатор у співвідношенні: 10 мл ПАФ = 5 мл безводного ланоліну + 15 мл вазелінової олії + 50 мг вбитої нагріванням вакцини БЦЖ. ПАФ являє собою емульсію типу «вода в маслі», яка не розділяється на масляну та водну фази під час тривалого зберігання. Вазелінова олія, яка використовується в ПАФ, забезпечує наступні три специфічні механізми дії: 1) створення депо антигену з повільним вивільненням, 2) забезпечення транспорту антигену через лімфатичну систему до дренажних лімфатичних вузлів та селезінки, де створюються локалізовані невеликі антигенні депо та 3) взаємодія з антигенпрезентуючими клітинами, включаючи фагоцити, макрофаги та дендритні клітини. Модель експериментального РА – АА у щурів, яка має всі морфологічно-функціональні ознаки РА та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали субплантарним веденням щурам ПАФ (*Thermo Fisher Scientific, США*) у задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [7].

Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні. Як референс-препарат використано ДН, який вводили в/м у дозі, яка дорівнювала ED_{50} за протизапальною активністю – 8,0 мг/кг [7; 8]. Зазначена доза відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями про використання ДН у хворих по 75–100 мг/добу у разі його тривалого застосування [8].

Перед розподілом тварин на групи проводили їх рандомізацію за індивідуальною больовою чутливістю, яку визначали в тесті відсмикування хвоста за дії термічного подразника (тест теплової імєрсії хвоста) та відбирали для подальших досліджень тварин, латентний період больової реакції у яких відповідав діапазону від 7 до 12 с включно [7]. Щурів розподіляли на 6 груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АА (n=7) без лікування (контрольна група), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl у дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили референс-препарат ДН у дозі 8,0 мг/кг [7];

IV – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [9];

V – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [10];

VI – щури зі змодельованим АА (n=7), яким на 14, 17, 20, 23 та 26 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [11].

На «0» (вихідні показники), 14 та 28 дні експерименту проводили оцінку больової чутливості – електроімпульсне подразнення та механічне подразнення за Рендаллом-Селітто. Аналгетичну активність оцінювали за величиною порогу больової чутливості (ПБЧ).

Термічне подразнення (для рандомізації тварин) викликали шляхом занурення хвоста (*tail immersion test*) лабораторних тварин на 3 см у воду зі сталою $t = 52,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ у лабораторний стакан (400 мл), довкола якого циркулювала вода для підтримання заданої температури води всередині ємкості за допомогою водяної бані [7; 12]. Величину больового відчуття реєстрували за тривалістю (с) латентного періоду відсмикування хвоста у відповідь на термічне подразнення.

Механічне подразнення за Рендаллом-Селітто проводили за допомогою механічного тензоалгозіметра «Paw Pressure Analgesia Meter DAQ 37215» (*Ugo Basile, Італія*). ПБЧ визначали за максимальним механічним тиском (у грамах) на дорзальну поверхню задньої кінцівки у разі наростаючої сили компресії зі швидкістю 39,2 г/с, який викликає рефлекторне висмикування кінцівки. Максимально можливі величини тиску від приладу – 375 г (25 см). Визначення ПБЧ проводили тричі з наступним розрахунком середнього арифметичного показника для кожної тварини [13].

Електроімпульсне подразнення у щурів викликали шляхом електроімпульсного подразнення слизової оболонки прямої кишки від електростимулятора лабораторного «ЕСЛ-2», який генерував прямокутні П-подібні електричні імпульси з параметрами: частота – 100 Гц, тривалість – 5 мс та затримка – 5 мс [8; 14]. Шура фіксували в модифікованому індивідуальному плексигласовому пеналі О.Х. Когана таким чином, щоб задні кінцівки тварини спирались на металеву пластину, розміщену на дні внутрішньої поверхні пеналу, яка виконувала функцію електроду. Другий електрод електричного ланцюга мав вигляд металевого стрижня діаметром 0,5 см та довжиною 4 см вводили у пряму кишку щура. За ПБЧ приймали таку напругу (Вольт) електричного струму, яка викликала ноцицептивну реакцію у щурів, яку визначали за вокалізацією [7; 8; 14].

Технологія отримання КЕП. Етап 1 (підготовка матеріалу). Плаценту після операції кесарів розтин відмивали від крові у 0,9% розчину NaCl, відділяли амніотичну оболонку, розділяли на фрагменти масою 5–10 г, промивали 5–6 разів 0,9% розчином NaCl та занурювали на 15 хв. у флакони із трикомпонентним розчином натрію хлориду (NaCl), антибіотика та диметилсульфоксиду (ДМСО):

1) NaCl.....	9,0 мг/мл	(0,9%)
2) Канаміцин.....	1,25 мг/мл	(0,125%)
3) ДМСО.....	20,0 мг/мл	(2,0%)

Етап 2 (дія ультранизькими (-80°C, -196°C) температурами). Фрагменти плаценти поміщали у флакон з 0,9% розчину NaCl у співвідношенні 1:1, додавали кріопротектор ДМСО (5,0%)

та заморожували зі швидкістю охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -80°C . Через 30 хв. зразки розморожували на водяній бані з температурою $37\text{--}40^\circ\text{C}$ до повного відтавання. Після розморожування фрагменти плацентарної тканини піддавали ще двом послідовним циклам заморожування до -196°C , витримці 30 хв. у парах рідкого азоту та розморожували на водяній бані [9].

Етап 3 (водно-сольова екстракція). Для видалення кріопротектора ДМСО розморожені після триразового заморожування (-80°C , -196°C , -196°C) фрагменти плацентарної тканини занурювали у розчин сахарози, після чого переносили у флакон із 0,9% розчином NaCl та збовтували впродовж 1–2 хв., після чого зливали надосад та доливали нову порцію фізіологічного розчину. Цю процедуру повторювали 5–6 разів після чого тканину механічно диспергували у гомогенізаторі та додавали 0,9% розчин NaCl у співвідношенні 1:2, витримували 24 год. за температури 4°C та центрифугували 15–20 хв. при 4000 об/хв. Одержаний надосад фільтрували через міліпорові фільтри (діаметр пор 0,22 мкм), отримуючи водно-сольовий екстракт плаценти – КЕП, який стандартизували за вмістом білка (1,5 мг/мл), який визначали спектрофотометрично [9]. Стандартизований КЕП фасували в ампули по 1,8 мл та зберігали у рідкому азоті за -196°C .

Препарат КЕП вводили щурам внутрішньом'язово (в/м) у дозі 2,5 мл/кг, що відповідає 0,5 мл/200 г маси тіла щура (з урахуванням, що середня маса щура становить 200–240 г). Перед застосуванням КЕП разову дозу екстемпорально (*ex tempore* – за потребою) розводили у фізіологічному розчині з розрахунку 0,1 мл 0,9% розчину NaCl / 100 г маси тіла щура [8].

Технологія одержання КЕС. Етап 1 (підготовка матеріалу). Селезінку свиней розділяли на дрібні фрагменти масою 5–10 г та тричі відмивали 0,9% розчином NaCl у співвідношенні 1:10.

Етап 2 (дія низькими (-70°C) та ультранизькими (-196°C) температурами). До фрагментів селезінки додавали у співвідношенні 1:1 розчин кріопротектора поліетиленоксиду з молекулярною масою 1500 Да у концентрації 10%. Після еквілібрації у розчині кріопротектора фрагменти селезінки заморожували зі швидкістю охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -70°C з наступним зануренням у рідкий азот (-196°C) [15].

Етап 3 (водно-сольова екстракція). Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою $37\text{--}40^\circ\text{C}$ та відмивали від кріопротектора фізіологічним розчином. Для одержання водно-сольових екстрактів фрагменти селезінки інкубували у 0,9% розчині NaCl упродовж 90 хв. за температури $22\text{--}24^\circ\text{C}$. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на водяній бані з температурою $37\text{--}40^\circ\text{C}$ 15 хв. та очищали, пропускаючи через фільтрувальний папір. КЕС стандартизували за вмістом білка (0,1 мг/мл), який визначали спектрофотометрично.

Препарат КЕС з вмістом білків 0,1 мг/мл вводили щурам в/м у дозі 5,0 мл/кг маси тіла щура, що відповідає 1 мл/200 г [10].

Технологія одержання КС-МСК. КС отримували під час культивування нативних культур МСК у умо-

вах газового інкубатора (37°C, 5% CO₂). КС збирали після 3 пасажу, коли клітинний ріст переходив до стаціонарної фази. Стадію стаціонарного росту стабільної лінії МСК, коли настає дозрівання КС, оцінювали за формуванням конфлюентного шару клітин за допомогою інвертованого мікроскопа. КС-МСК порційно заморожували та зберігали за -20°C. Препарат КС-МСК вводили щурам в/м у дозі 0,6 мл/кг маси тіла щура [11].

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel». Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілка. Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена. У разі нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. Співставлення показників однієї групи у разі повторюваних вимірювань за різних умов експерименту проводили за непараметричним T-критерієм Вілкоксона. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді "M±m" (M±SE), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ: 5% – 95%), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал [7].

Результати дослідження та їх обговорення. Проведене дослідження показало, що на 14 день експерименту у щурів зі змодельованим АА відзначається статистично вірогідне (p<0,009) зниження ПБЧ у разі механічного подразнення за Рендаллом-Селітто у 2 рази стосовно вихідних показників (табл. 1). Так, у щурів контрольної групи на 14 день експерименту ПБЧ становив 149±7 г, що на 51,9% було нижче за вихідні показники (309±10 г). Зниження ПБЧ від дії механічного подразника у щурів з АА узгоджується з даними літератури про запальний компонент болю у разі розвитку експериментального артриту [16]. Низка досліджень показала, що запальні цитокіни (особливо інтерлейкін-6) безпосередньо стимулюють ноцицептори, а тривала активація периферичних ноцицепторів своєю чергою може активувати больові шляхи центральної нервової системи та індукувати адаптаційні зміни, що призводять до гіпералгезії [17].

Оцінка впливу п'ятиразового введення БКБЗ щурам з АА показала здатність досліджуваних препаратів знижувати ПБЧ від дії механічного подразника, що вказує на модуляцію периферичного компонента ноцицепції. Найнижчий аналгетичний потенціал на спінальному рівні виявлено у КЕС (див. табл. 1). Так, у щурів з АА, яким вводили КЕС, на 28 добу експерименту ПБЧ статистично вірогідно (p=0,01) підвищився на 38,0% від показника на 14 день експерименту та становив відповідно 197±11 г, що на 14,8% (p=0,047) було нижче за показники тварин, яким вводили ДН (див. табл. 1).

Співставною аналгетичною активністю на периферичному рівні ноцицепції володіли КЕП та КС-МСК. Встановлено, що на тлі введення КЕП на

28 добу експерименту у щурів з АА ПБЧ від дії механічного подразника зріс (p<0,01) на 43,1% відносно значень на 14 день експерименту, а у щурів, яким вводили КС-МСК, ПБЧ зріс (p<0,01) відповідно на 42,7% (див. табл. 2). Варто зазначити, що введення референс-препарату ДН призвело до зростання (p<0,01) на 28 добу ПБЧ у разі механічного подразнення кінцівки у щурів з АА на 60,4% стосовно показників щурів до введення ДН.

Варто відзначити, що больова сенсibilізація може також виникати через підвищення рівня цитокінів у самій центральній нервовій системі через активацію нейроімунних шляхів. Місцеві прозапальні цитокіни у спинному мозку можуть безпосередньо збуджувати нейрони – явище, відоме як центральна сенсibilізація [17].

Центральний механізм знеболюючої активності досліджуваних БКБЗ вивчали шляхом електроімпульсного подразнення та оцінювали за вокалізацією тварин. Дослідження показали, що у щурів з АА на 14 день експерименту відзначалось статистично вірогідне (p<0,009) зниження ПБЧ на 54,4% стосовно вихідних показників, що становило відповідно 2,9±0,25 В (табл. 2). На тлі введення ДН досліджуваний показник зріс (p<0,01) на 86,0% та становив відповідно 5,7±0,39 В, що на 35,8% було нижче (p<0,001) за показники інтактних щурів (див. табл. 2).

За аналогією до впливу на спінальний рівень ноцицепції у разі механічного подразнення введення КЕП призвело до найменш виразної аналгетичної дії на супраспінальному рівні. Так, ПБЧ у разі електроімпульсного подразнення у щурів з АА на тлі введення КЕС зріс (p=0,1) лише на 28,9% на 28 день експерименту стосовно показників на 14 день, що на 33,3% залишалось нижчим за вихідні значення та становив відповідно 4,1±0,26 В (див. табл. 2).

Встановлено, що на тлі введення КЕП щурам з АА відзначено статистично вірогідне (p=0,01) зростання ПБЧ від електроімпульсного подразника на 44,7%, що становило 3,9±0,3 В та 2,7±0,29 В відповідно на 28 та 14 дні експерименту.

Особливу увагу привертає зміна ПБЧ на супраспінальному рівні у разі введення КС-МСК. Дослідження показало, що зазначений показник зріс (p=0,01) на 54,8% на 28 день стосовно показників на 14 день експерименту, що лише на 18,8% було нижче (p=0,049) за показники щурів, яким вводили ДН в аналогічних умовах експерименту (див. табл. 2).

Висновки. Встановлено, що всі досліджувані БКБЗ володіють власною аналгетичною активністю як на спінальному, так і на супраспінальному рівнях ноцицепції, проте жоден з них не перевищував за виразністю вказаної активності референс-препарат ДН. На спінальному рівні ноцицепції КЕП та КС-МСК проявляли співставну аналгетичну активність, яка становила 43,1% та 42,7% відповідно. На супраспінальному рівні ноцицепції найвиразнішу аналгетичну активність виявлено у КС-МСК, яка становила 54,8%, що лише на 18,8% було нижче (p=0,049) за показники щурів, яким вводили ДН.

Таблиця 1
Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на ПБЧ у разі механічного подразнення за Рендаллом-Селігто у щурів з АА, ум. од. (M ± m, 95 % ДІ, n=42)

Строк	Рівень статистичної вірогідності [%]						VI (6) група	V (5) група	IV (4) група	III (3) група	II (2) група	I (1) група
	P ₂₋₁	P ₃₋₂	P ₄₋₂	P ₅₋₂	P ₆₋₂	P ₄₋₃						
«0» день	311±7 (95% ДІ: 298-325)	309±10 (95% ДІ: 290-327)	303±11 (95% ДІ: 280-325)	307±8 (95% ДІ: 292-322)	313±7 (95% ДІ: 300-326)	317±9 (95% ДІ: 299-336)	АА + КС-МСК	АА + КЕС	АА + КЕП	АА + ДН	Контроль (АА без лікування)	Інтактні щури
14 день	313±8 (95% ДІ: 298-328) P ₀ = 0,5 [0,5%] ^{1,0}	149±7 (95% ДІ: 135-162) P ₀ < 0,009 [51,9%] ^{1,0}	144±11 (95% ДІ: 123-166) P ₀ < 0,009 [52,4%] ^{1,0}	146±5 (95% ДІ: 135-156) P ₀ < 0,009 [52,6%] ^{1,0}	143±8 (95% ДІ: 127-159) P ₀ < 0,009 [54,3%] ^{1,0}	147±9 (95% ДІ: 130-164) P ₀ < 0,009 [53,6%] ^{1,0}	АА	АА + КЕС	АА + КЕП	АА + ДН	Контроль (АА без лікування)	Інтактні щури
28 день	306±8 (95% ДІ: 291-320) P ₀ = 0,17 [1,8%] ^{1,0} P _{ді4} = 0,34 [2,3%] ^{1,14}	189±8 (95% ДІ: 172-205) P ₀ < 0,01 [38,9%] ^{1,0} P _{ді4} = 0,01 [26,9%] ^{1,14}	231±11 (95% ДІ: 210-253) P ₀ = 0,01 [23,6%] ^{1,0} P _{ді4} < 0,01 [60,4%] ^{1,14}	209±6 (95% ДІ: 196-221) P ₀ = 0,01 [32,1%] ^{1,0} P _{ді4} < 0,01 [43,1%] ^{1,14}	197±11 (95% ДІ: 175-219) P ₀ = 0,01 [37,0%] ^{1,0} P _{ді4} = 0,01 [38,0%] ^{1,14}	210±7 (95% ДІ: 196-224) P ₀ = 0, [33,8%] ^{1,0} P _{ді4} < 0,01 [42,7%] ^{1,14}	АА + КС-МСК	АА + КЕС	АА + КЕП	АА + ДН	Контроль (АА без лікування)	Інтактні щури

Примітки.

1. P₂₋₁ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
3. Індексами ^{1, 2, 3, 4, 5, 6} вказано номер групи, між показниками яких проведено порівняння;
4. Індексами ^{ді4} вказано строки дослідження, з показниками яких проведено порівняння в динаміці.

Таблиця 2

Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та ДН на ПЕЧ у разі електроімпульсного подразнення, Вольт ($M \pm m$, 95 % ДІ, n=42)

Строк	I (1) група	II (2) група	III (3) група	IV (4) група	V (5) група	VI (6) група	Рівень статистичної вірогідності [%]											
							P ₂₋₁	P ₃₋₂	P ₄₋₂	P ₅₋₂	P ₆₋₂	P ₄₋₃	P ₅₋₃	P ₆₋₃				
«0» день	Інтактні шури	Контроль (AA без лікування)	AA + ДН	AA + КЕП	AA + КЕС	AA + КС-МСК												
	5,8±0,32 (95 % ДІ: (5,1-6,4)) P ₁₀ = 0,3 [4,9%] ^{1,0}	6,4±0,20 (95 % ДІ: (6,0-6,8))	6,5±0,39 (95 % ДІ: (5,7-7,3))	5,8±0,49 (95 % ДІ: (4,8-6,7))	6,2±0,26 (95 % ДІ: (5,7-6,7))	6,0±0,38 (95 % ДІ: (5,3-6,7))		0,1 [11,1%]	0,9 [1,1%]	0,2 [10,0%]	0,5 [0,6%]	0,3 [6,7%]	0,3 [11,0%]	0,6 [0,6%]	0,4 [7,7%]			
14 день	6,1±0,37 (95 % ДІ: (5,3-6,8)) P ₁₀ = 0,3 [4,9%] ^{1,0}	2,9±0,25 (95 % ДІ: (2,4-3,4)) P ₁₀ < 0,009 [54,4%] ^{1,0}	3,1±0,20 (95 % ДІ: (2,7-3,5)) P ₁₀ < 0,009 [52,7%] ^{1,0}	2,7±0,29 (95 % ДІ: (2,2-3,3)) P ₁₀ < 0,009 [53,1%] ^{1,0}	3,2±0,36 (95 % ДІ: (2,5-3,9)) P ₁₀ < 0,009 [48,3%] ^{1,0}	3,0±0,22 (95 % ДІ: (2,6-3,4)) P ₁₀ < 0,009 [50,0%] ^{1,0}		< 0,001 [51,8%]	0,7 [4,9%]	0,6 [7,3%]	0,5 [9,8%]	0,8 [2,4%]	0,3 [11,6%]	0,7 [4,7%]	0,8 [2,3%]			
28 день	5,8±0,32 (95 % ДІ: (5,1-6,4)) P ₁₀ = 0,5 [0%] ^{1,0} P ₁₄ = 0,25 [4,7%] ^{1,14}	3,7±0,24 (95 % ДІ: (3,2-4,2)) P ₁₀ < 0,01 [42,2%] ^{1,0} P ₁₄ = 0,06 [26,8%] ^{1,14}	5,7±0,39 (95 % ДІ: (4,9-6,5)) P ₁₀ = 0,03 [12,1%] ^{1,0} P ₁₄ < 0,01 [86,0%] ^{1,14}	3,9±0,30 (95 % ДІ: (3,3-4,5)) P ₁₀ = 0,01 [32,1%] ^{1,0} P ₁₄ = 0,01 [44,7%] ^{1,14}	4,1±0,26 (95 % ДІ: (3,6-4,7)) P ₁₀ = 0,01 [33,3%] ^{1,0} P ₁₄ = 0,1 [28,9%] ^{1,14}	4,6±0,28 (95 % ДІ: (4,1-5,2)) P ₁₀ = 0,01 [22,6%] ^{1,0} P ₁₄ = 0,01 [54,8%] ^{1,14}		< 0,001 [35,8%]	< 0,001 [53,8%]	< 0,001 [5,8%]	0,25 [11,5%]	0,028 [25,0%]	0,003 [31,3%]	0,006 [27,5%]	0,049 [18,8%]			

Примітки.

P₂₋₁ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;

[%] – значення розбіжностей показників у відсотках;

Індексами ^{1, 2, 3, 4, 5, 6} вказано номер групи, між показниками яких проведено порівняння;

Індексами ^{1,0, 1,14} вказано строки дослідження, з показниками яких проведено порівняння в динаміці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*. 2021; 10(11):2857. <https://doi.org/10.3390/cells10112857>.
2. Hladkykh FV. Current understanding of the immunological basis of rheumatoid arthritis: from post-translational modification of proteins to the use of disease-modifying antirheumatic drugs. *Eastern Ukrainian medical journal*. 2023; 11(4):326–336. [https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11\(4\):326-336](https://doi.org/10.21272/eumj.2023;11(4):326-336).
3. Hladkykh FV. Cell-free biologics: focus on mesenchymal stem cell conditioned media. *Odesa Medical Journal*. 2023; 4(185):75–82. <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>.
4. Hladkykh FV. Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment of patients with autoimmune diseases. *Clinical and Preventive Medicine*. 2023(6):121–130. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>.
5. Hladkykh FV. Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021; 31(4):364–367. <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>.
6. He L, He T, Xing J, Zhou Q, Fan L, Liu C, Chen Y, Wu D, Tian Z, Liu B, Rong L. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*. 2020; 11(1):276. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01781-w>.
7. Stefanov OV, ed. Preclinical studies of medicinal products: methodical recommendations. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p.
8. Hladkykh FV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic and undesirable effects, ways of their optimization. Vinnytsia: Tvory; 2022. 216 p. <https://doi.org/10.46879/2022.1>.
9. Shepitko VI. Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation. Doctor of Medicine: special. 14.01.35 “Cryomedicine”, Kharkiv, 2004. 326 p. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>.
10. Bespalova IG. Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin: thesis. biol. n.: spec. 03.00.19 “Cryobiology”, Kharkiv, 2016. 162 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>.
11. Globa VYu. Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. Thesis in specialty 222 “Medicine”, Kharkiv, 2021. 156 p. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>.
12. Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1959; 122:434–447.
13. Randall L, Selitto J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives of International Pharmacodynamics*. 1957; 111:409–419.
14. Hatsura VV. Methods of primary pharmacological research of biologically active substances. M.: Medicine; 1974. 142 p.
15. Galchenko SE, Shkodovska NY, Sandomirsky BP, Hryshchenko VI. Patent of Ukraine No. 64381. Method of obtaining extracts of xenogenic organs. Application No. 2003054649. Submitted on May 22, 2003; Publ. 16.02.2004. Bul. No. 2.
16. Ye Z, Zhang M, Ding N, Gao P, Hei Y, Wang Y, Gao W, Ye Q. Antinociceptive effects of dezocine on complete Freund’s adjuvant-induced inflammatory pain in rats. *Exp Ther Med*. 2018; 15(6):5469–5474. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6110>.
17. Kwok CHT, Learoyd AE, Canet-Pons J, Trang T, Fitzgerald M. Spinal interleukin-6 contributes to central sensitisation and persistent pain hypersensitivity in a model of juvenile idiopathic arthritis. *Brain Behav Immun*. 2020; 90:145–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.08.004>.

Надійшла до редакції 26.02.2024 р.

Прийнята до друку 22.03.2024 р.

Електронна адреса для листування fedir.hladkykh@gmail.com