

Доклинические исследования препарата Панкреалекс (рабочее название Панкреол).

Доклинические исследования препарата включали изучение острой токсичности, субхронической токсичности, местнораздражающего и сенсибилизирующего действий, а также изучение фармакологических свойств и дозозависимости эффекта.

Исследование острой токсичности, субхронической токсичности препарата Панкреалекс (рабочее название Панкреол) проведенное на базе КНИВИ РАСХН, показало, что препарат является малотоксичным и по ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества» относится к 4-му классу опасности (малоопасные вещества).

1. Изучение фармакологических свойств.

Исследование влияния введения препарата под рабочим названием «Панкреол» на течение острого панкреатита у крыс Wistar.

Исследование проведено на базе ООО «НИИ Митоинженерии МГУ».

Цель исследования: Получить данные о влиянии введения препарата под рабочим названием «Панкреол» по результатам биохимического и гистологического исследований на модели острого панкреатита у крыс Wistar.

Материалы и методы.

Экспериментальная модель: острый панкреатит, вызванный введением L-аргинина

Модель нетравматична, очень хорошо воспроизводится и приводит к дозозависимому некрозу ацинарных клеток (Mizunuma, 1984). Исследования с помощью электронной микроскопии показали, что дегенерация поджелудочной железы начинается с разрушения эндоплазматического ретикулума. Спустя 48 часов после введения L-Аргинина наблюдалась диссоциация и некроз ацинарных клеток. Впоследствии, некротические клетки замещаются интраститиальной тканью, содержащей лейкоциты и фибробласты (Kishino, Kawamura, 1984; Tani et al., 1990). Для изучения лечения панкреатита с помощью введения различных лекарственных средств L-Аргинина обычно используют дозу в пределах 100-200 мг/100 гр. внутривентриально (Hegyí et al., 1997; Takacs et al., 2001).

Лабораторные животные.

В работе использованы половозрелые самцы крыс, сток Wistar, количество – 40 особей. Вес 300-400 гр., возраст при поставке: 12-14 недель. Животные содержались группами по 5-6 животных в клетке, в условиях свободного доступа к воде и корму при световом режиме 12/12, в хорошо вентилируемых помещениях (кратность 10-12 об/ч стерильным ламинарным потоком) с температурой воздуха 20-24С, влажностью 30-70%. В первые сутки эксперимента был ограничен доступ крыс к корму. Для исключения появления патогенной флоры в помещениях ежедневно проводились мероприятия по дезинфекции с помощью профессиональных дезинфицирующих средств (Лайна-Мед, Россия).

Дизайн исследования:

Для получения адекватных результатов проводили ранжирование животных на 5 групп, гомогенных по весу и уровню биохимических показателей плазмы крови. Взвешивание

животных проводили на технических весах с точностью ± 0.1 г. согласно СОП «Процедура взвешивания животных» (СОП № 11И).

За сутки до моделирования острого панкреатита проводили биохимический анализ крови, взятой из хвоста согласно СОП № 15И «Процедура взятия проб крови путем ампутации кончика хвоста у мышей и крыс» и ранжирование крыс по уровню ферментов в крови.

Острый панкреатит моделировали внутрибрюшинным введением L-Аргинина в дозе 100 мг/100 грамм веса крысы. Аргинин вводили в виде 20% раствора, приготовленного на фосфатном буфере рН 6.8 (объеме примерно 2,5 мл).

Экспериментальные группы:

1. «Интактная группа» (n=5) – животным проведена инъекция физ. раствора, внутрибрюшинно. Объем вводимого раствора аналогичен объему, вводимому животным экспериментальных групп.
2. «Негативный контроль» (n=9) – животным вводится физ.р-р подкожно в дозе 1 мл/100 грамм веса; первый раз через 12 часов после введения Аргинина, затем два раза в день, ежедневно, в течение 6 суток.
3. «Экспериментальная группа 0,035» (n=8) – животным вводится препарат Панкреолекс подкожно в дозе 0,035 мл/100 гр. (0,12 мл на крысу), первый раз через 12 часов после введения Аргинина, затем два раза в день, ежедневно, в течение 6 суток.
4. «Экспериментальная группа 0,1» (n=9) – животным вводится препарат Панкреолекс подкожно в дозе 0,1 мл/100 гр. (0,3 мл на крысу), первый раз через 12 часов после введения Аргинина, затем два раза в день, ежедневно, в течение 6 суток.
5. «Экспериментальная группа 0,35» (n=9) – животным вводится препарат Панкреолекс подкожно в дозе 0,35 мл/100 гр. (1,2 мл на крысу), первый раз через 12 часов после введения Аргинина, затем два раза в день, ежедневно, в течение 6 суток.

Первый раз Панкреолекс вводят через 12 часов после введения аргинина. Далее введение Панкреолекса производилось каждый день два раза в день (утром и вечером) в течение 6 дней.

На второй и четвертый день после введения аргинина проводилось взятие крови из хвоста на биохимический анализ согласно СОП № 15И «Процедура взятия проб крови путем ампутации кончика хвоста у мышей и крыс». На 6-е сутки после введения аргинина животных эвтаназировали согласно СОП № 6Ж «Процедура эвтаназии грызунов углекислым газом». Кровь отбиралась из сердца животных согласно СОП № 17И «Процедура взятия проб крови из камер сердца у мышей и крыс». У 3-5 крыс из каждой группы отбирали поджелудочную железу, печень и тонкий кишечник для гистологического исследования, определяли соотношение массы поджелудочной железы к массе тела.

Методы исследования:

Биохимический анализ

Собранная в пробирку кровь отстаивается при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого центрифугируется при 5000 об. в течение 5 минут. После этого отбирается супернатант и, при необходимости, хранится при -80 °С. Анализ проводится при помощи Биохимического автоматического анализатора А-25 (Biosystems).

Определяемые биохимические параметры: амилаза, глюкоза, триглицериды, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, липаза.

Гистологический анализ

Для гистологического исследования брались образцы и фиксировались в 10% растворе формалина. Образцы обрабатывали с помощью общепринятых методов: после стандартной проводки по спиртам образцы заливают парафином и готовят срезы толщиной 5-6 мкм, которые окрашивают гематоксилин-эозином. Анализ гистологических препаратов проводили под световым микроскопом.

Критерии оценки: общее состояние, биохимические показатели, морфология (результаты патологоанатомического и гистологического исследований)

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрических (критерии Манна-Уитни, Вилкоксона, Фишера).

Результаты.

Установлено, что однократное внутрибрюшинное введение L-Аргинина в дозе 100мг/100 гр приводит к развитию острого панкреатита (подтверждено гистологическим исследованием).

Результаты биохимического исследования крови:

Анализ динамики изменений уровня липазы в группах животных после моделирования острого панкреатита выявил следующую закономерность: в группе негативного контроля уровень липазы постепенно снижался в течение всего периода наблюдений и на 6 сутки после введения аргинина был значимо ниже, чем в контроле ($10,60 \pm 2,34$ u/L против $22,05 \pm 2,53$ u/L, $p < 0,05$). Снижение уровня липазы сопровождалось повышением уровня триглицеридов. Это может свидетельствовать о повреждении ацинарных клеток поджелудочной железы и развитии внешнесекреторной недостаточности. У животных, получавших лечение Панкреолексом в дозе 0,35 мл/100 гр., на 6 сутки после моделирования острого панкреатита уровень липазы в крови был значимо выше, чем в группе негативного контроля ($23,98 \pm 5,69$ u/L против $10,60 \pm 2,34$ u/L соответственно, $p < 0,05$) и соответствовал значению в контрольной группе ($22,05 \pm 2,53$ u/L). Уровень триглицеридов у животных данной группы на 6 сутки составлял $1,77 \pm 0,66$ mmol/l, колебания уровня триглицеридов в группе интактного контроля за время наблюдений колебался в пределах от $0,65 \pm 0,09$ mmol/l до $1,78 \pm 0,54$ mmol/l. Это косвенно может свидетельствовать о протекторном действии Панкреолекса.

Введение Панкреолекс в исследованных дозах после моделирования состояния острого панкреатита способствует нормализации уровня глюкозы в крови животных.

Изменения других исследуемых биохимических показателей было несущественным, значения во все периоды находились в пределах физиологических норм, различия между группами статистически недостоверны.

Необходимо отметить, что на основании только биохимических показателей сложно оценивать степень повреждения поджелудочной железы при введении аргинина. Поэтому окончательное заключение о характере повреждений поджелудочной железы,

спровоцированных введением аргинина, и протекторном действии Панкреолекса необходимо делать с учётом данных гистологического исследования.

Результаты патологоанатомического исследования:

Таблица 2. Вес крыс и поджелудочной железы на 6 сутки после моделирования острого панкреатита.

Группы	вес крыс, гр.	поджелудочная железа, гр.	% к массе поджелудочной железы
Интактный контроль	372,80±12,8623	1,53±0,089588	0,411481
Негативный контроль	349,60±16,58192	1,05±0,124130 *	0,298913
Группа 0,035	350,67±23,28185	1,56±0,200734	0,443441
Группа 0,1	320,29±21,98020 *	1,62±0,319891	0,506839 @
Группа 0,35	344,80±14,38888	1,84±0,144305 #	0,532918

*- $p < 0,05$ по сравнению с интактным контролем

- $p < 0,05$ по сравнению с негативным контролем

@ - $p = 0,05$ по сравнению с негативным контролем

Масса поджелудочной железы в группе негативного

Масса поджелудочной железы в группе негативного контроля была достоверно ниже на 6-е сутки после введения аргинина ($p < 0,05$). Поскольку использовался зафиксированный в формалине материал, снижение массы поджелудочной железы косвенно отражает некротические процессы, прошедшие в ней. В то же время, во всех трех группах животных, получавших Панкреолекс, снижение веса данного органа не наблюдалось. Более того, в группе крыс, получавших максимальную дозу Панкреолекс 0,35 мл/100 гр, наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение массы поджелудочной железы относительно негативного контроля. Это может косвенно свидетельствовать о протекторном действии препарата Панкреолекс в дозе 0,35 мл/100 гр.

Соотношение массы поджелудочной железы к общей массе тела в группе контроля также снижается по сравнению с интактными животными. У крыс, получавших Панкреолекс во всех трех дозах, не наблюдалось снижения соотношения массы поджелудочной железы к общей массе тела, и данное соотношение было на уровне интактного контроля. В группе животных, получавших Панкреолекс в дозе 0,1 мл/100 гр. это изменение было близко к достоверному (@- $p = 0,05$).

Данные гистологического исследования:

Поджелудочная железа (интактный контроль). Рис. 1.

Общая структура железы не нарушена. Ацинусы в основном состоят из типичных, морфологически интактных экзокриноцитов с эозинофильными секреторными гранулами в апикальной части, базофильной цитоплазмой и круглым ядром в базальной. Единичные очаги изменения паренхиматозных клеток поджелудочной железы в виде фокальной вакуолярной дистрофии экзокриноцитов.

Протоки поджелудочной железы выстланы кубическим эпителием без морфологических изменений, наличие оксифильных масс в просвете выводных протоков. Интима, медиа и адвентиция стенок внутриорганных артерий и вен без патологических изменений.

Островки Лангерганса нормального размера и формы, состоят из полигональных клеток с широкой мелкозернистой цитоплазмой, расположенных в центре (В-клетки) и относительно небольших клеток по периферии островка (А-клетки), между которыми видны выстланные эндотелием синусоиды.

Поджелудочная железа (негативный контроль, аргинин). Рис.2, 3.

Архитектоника железы нарушена, основная масса железистой ткани с явлениями дистрофического и некробиотического поражения панкреоцитов. В дольках железы, сохранивших ацинарное строение, панкреоциты с явлениями дистрофии и некробиоза: уменьшены в размерах, повышена базофилия цитоплазмы, уменьшена в размерах зимогенная зона, часты очаги ацинусов с вакуолизированной цитоплазмой с пикнотичными ядрами. Единичные вакуоли наблюдаются в отдельных панкреатических островках (островках Лангерганса).

Кровеносные сосуды и капилляры как внутри дольки, так и междольковые расширены и полнокровны. Стенки сосудов утолщены, отечны. Наблюдался отек между ацинусами внутри дольки и междольковой соединительной ткани.

Поджелудочная железа (Панкреолекс). Рис.4-6.

Структура железы сохранена. Среди общей массы сохранившихся ацинусов единичные островки дистрофических изменений (очаговая вакуолизация). Ацинусы в основном состоят из типичных, морфологически интактных экзокриноцитов с эозинофильными секреторными гранулами в апикальной части, базофильной цитоплазмой и круглым ядром в базальной. Островки Лангерганса нормального размера и формы, без признаков дистрофии.

Протоки поджелудочной железы выстланы кубическим эпителием без морфологических изменений. Просветы отдельных выводных протоков содержат оксифильно окрашенные гомогенные массы.

Рис.1. Гистоструктура поджелудочной железы. Контроль.

Общая структура железы не нарушена. Ацинусы в основном состоят из типичных экзокриноцитов с эозинофильными секреторными гранулами в апикальной части. Единичные очаги дистрофических изменений паренхиматозных клеток в виде фокальной вакуолярной дистрофии экзокриноцитов. Островки Лангерганса без изменений.

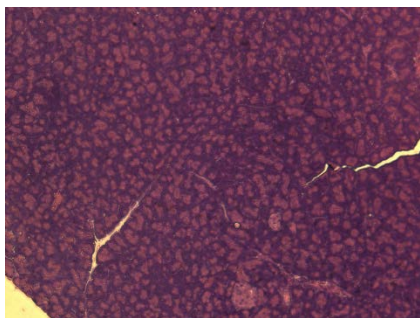


Рис.2. Гистоструктура поджелудочной железы. Негативный контроль.

Некробиотические изменения ацинарных клеток, вакуолизация цитоплазмы.

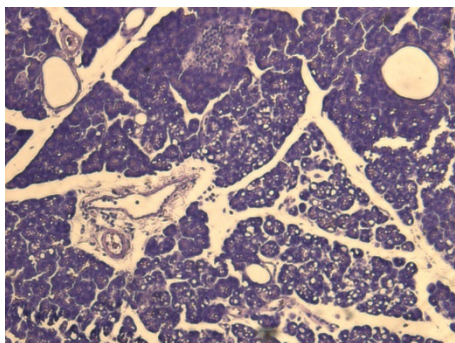


Рис.3 Гистоструктура поджелудочной железы. Негативный контроль. Некробиотические изменения ацинарных клеток, вакуолизация цитоплазмы. Разрежение островка Лангерганса.

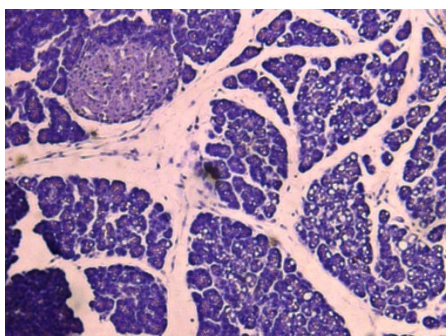


Рис. 4. Гистоструктура поджелудочной железы. Группа Панкреолекс 0,035. Сохранение структуры поджелудочной железы. Очаговые дистрофические изменения ацинарных клеток. Островки Лангерганса не затронуты. Лейкоцитарная реакция не обнаружена.

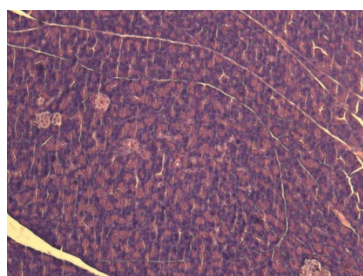


Рис. 5. Гистоструктура поджелудочной железы. Группа Панкреолекс 0,1. Сохранение структуры поджелудочной железы. Среди общей массы сохранившихся ацинусов локальные очаги с признаками вакуольной дистрофии панкреатоцитов. Островки Лангерганса не затронуты. Лейкоцитарная реакция не обнаружена.

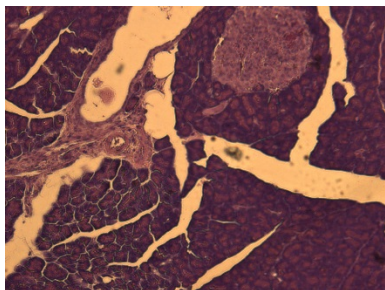
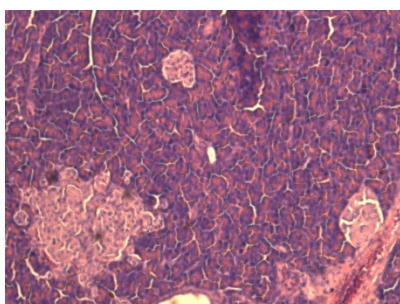


Рис. 6. Гистоструктура поджелудочной железы. Группа Панкреолекс 0,35. Сохранение структуры поджелудочной железы. Среди общей массы сохранившихся ацинусов единичные островки дистрофических изменений. Островки Лангерганса сохранены. Лейкоцитарная реакция не обнаружена.



Заключение:

По результатам проведенного исследования препарат под рабочим названием «Панкреол» в дозе 0,1 мл/100 гр. нормализует состояние животных после моделирования состояния острого панкреатита, оказывает протекторное действие на клетки поджелудочной железы. Введение препарата в дозе 0,35 мл/100 гр. кроме того способствует восстановлению уровню липазы до контрольных значений, что косвенно может свидетельствовать о нормализации экзокринной функции поджелудочной железы.