

НИИ ФАРМАКОЛОГИИ СО РАМН

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ фармакологии
СО РАМН, академик РАМН А.М. Дыгай

« _____ » _____ 2009 г.



ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ОТЧЕТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОЯЗВЕННОГО
ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ
«БИОСИНОЛ»

Томск - 2009

Название исследования: экспериментальное исследование противоязвенного действия биологически активной добавки к пище «Биосинол»

Спонсор исследования:

Общество с ограниченной ответственностью «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

Центр исследования:

Научно-исследовательский институт фармакологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, лаборатория онкофармакологии


Адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

Руководитель исследования:

Руководитель лаборатории онкофармакологии

НИИ фармакологии СО РАМН,

д.б.н., профессор

 Е.И. Зуева

Исследователи:

Ведущий научный сотрудник, д.б. н.

Старший научный сотрудник, д.б.н.

Старший научный сотрудник, д.б.н.

Старший научный сотрудник, к.м.н.





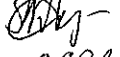
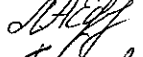
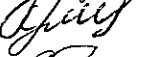


Научный сотрудник, к.м. н.

Младший научный сотрудник, к.б.н.

Младший научный сотрудник, к.м.н.

Аспирант

Лаборант-исследователь

 С.Г. Крылова
 Т.Г. Разина
 Е.Н. Амосова
 Т.И. Фомина
 К.А. Лопатина
 Л.А. Ефимова
 Л.А. Ермолаева
 Е.А. Сафонова
 О.Ю. Рыбалкина

Тестируемые препараты:

«Биосинол» - биологически активная добавка к пище, содержащая сухой экстракт коры осины, высокоочищенную протеазами ДНК из молок лососевых рыб и вспомогательные компоненты (крахмал картофельный, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленоксид, натрия хлорид), 70 капсул по 0,5 г.

ООО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» представили информацию о количественном содержании действующих веществ и наполнителей в капсулах «Биосинола».

Сроки исследования / длительность исследования: 01.05.09- 30.10.09

Цель исследования: изучение противоязвенного действия «Биосинола» на модельных системах: гистаминового повреждения слизистой желудка у крыс, хронического язвенного повреждения слизистой желудка у крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние лечебно-профилактического введения «Биосинола» на развитие «острого» язвенного дефекта и хронического язвенного процесса слизистой оболочки желудка животных на модельных системах, отражающих основные этиопатогенетические факторы язвообразования:

1.1. Исследовать влияние профилактического введения «Биосинола» на модели ulcerогенеза, обусловленного стимуляцией кислотно-пептического фактора (гистаминовое повреждение) у крыс;

1.2. Исследовать влияние лечебного введения «Биосинола» на процесс заживления хронического язвенного дефекта, обусловленного введением 5% уксусной кислоты в подсерозный слой слизистой желудка крыс.

Эксперименты проведены в соответствии с: правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Федеральным законом «О лекарственных средствах» (статья 36), «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005).

Содержание

1. Введение	5
2. Материалы и методы	6
2.1. Экспериментальные животные.....	6
2.2. Дизайн исследования.....	6
2.3. Обоснование выбора доз тестируемого препарата.....	7
2.4. Обоснование пути введения тестируемого препарата	7
2.5. Критерии эффективности.....	8
2.9. Статистическая обработка результатов.....	8
3. Экспериментальная модель гистаминовая язва.....	9
3.1. Экспериментальные группы	9
3.2. Протокол исследования.....	9
4. Результаты.....	10
5. Выводы.....	12
6. Экспериментальная модель «хроническая ацетатная язва».....	12.
6.1. Экспериментальные группы.....	13
6.2. Протокол исследования.....	13
7. Результаты.....	14
7.1. Результаты морфологического исследования.....	15
8. Выводы.....	19
9. Литература.....	22
Приложение к отчету (первичные материалы).....	24

1. ВВЕДЕНИЕ

Язвенная болезнь (ЯБ) является одним из наиболее распространенных заболеваний органов пищеварения [Васильев Ю.В., 2005, 2007; Волков А.И., 2006; Кривошеев А.Б. и др., 2006]. Независимо от локализации язвенного поражения желудка и двенадцатиперстной кишки – это хроническое циклически протекающее рецидивирующее заболевание организма, которое поражает, прежде всего, людей активного трудоспособного возраста и нередко приводит к инвалидизации [Кокуева О.В. и др., 2002]. Развитие ЯБ часто сопровождается кровотечением, перфорацией, стенозированием, что требуют вмешательства хирургов. Существуют нозологии, сочетанные с язвенной болезнью, что значительно осложняет проведение терапии [Бутов М.А., 2003].

Вследствие полиэтиологичности язвенной болезни фармакотерапия заболевания включает различные группы лекарственных средств, действие которых направлено на основные звенья патогенеза язвообразования. Современные терапевтические схемы включают антациды, блокаторы H_2 -рецепторов и протонной помпы, антибиотики, антихеликобактерные средства и др. [Васильев Ю.В., 2004, 2005, 2007]. На сегодняшний день очевидно, что хеликобактерная теория язвенной болезни не решила в полной мере вопросы профилактического и противорецидивного лечения данного заболевания. Высокая частота рецидивов и осложнений при терапии язвенной болезни актуализирует необходимость создания препаратов, направленных на регенерацию язвенного дефекта, нормализующих секреторную и моторно-эвакуаторную функции желудочно-кишечного тракта, повышающих защитные свойства слизи и, кроме того, не обладающих побочными эффектами, не вызывающих привыкания и экономически доступных для большинства пациентов.

В лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии СО РАМН ранее было показано, что сухой экстракт осины обладает выраженными гастропротективными свойствами как при профилактическом введении животным с «острыми» язвенными деструкциями различного генеза, так и в случае лечения им язвенной болезни хронического характера. Механизм антиязвенного действия фитопрепарата обусловлен снижением кислотно-пептической агрессии и повышением «защитных» факторов (увеличение фукозы, эндогенного аммиака, стимуляция слизиобразования и сохранение морфоструктурной целостности желез и клеток, отвечающих за выработку бикарбонатов). Репаративные свойства экстракта коры осины проявляются в ускорении заживления хронического язвенного дефекта за счет усиления образования защитных компонентов (нейтральных и кислых ГАГ), более активного созревания грануляционной и формирования зрелой

соединительной ткани. Экстракт коры осины проявляет выраженное анальгезирующее и антипролиферативное действие, повышает тонус гладкой мускулатуры желудка и кишечника как у здоровых животных, так и с язвенной патологией, обладает умеренным послабляющим действием. Сравнительная оценка фармакологического действия флавоноидов и фенологликозидов с комплексным экстрактом коры осины на моделях нейрогенного, резерпинового и атофанового повреждения слизистой оболочки желудка мышей и крыс показала, что данные биологически активные вещества определяют его антиульцерогенную активность [Крылова С.Г., 2005].

Установленное иммуотропное действие ДНК из молок лососевых рыб позволяет применять его в комплексном лечении различных заболеваний, связанных с иммунодефицитными состояниями, в том числе, и язвенных патологий различного генеза [Беседнова Н.И. и др., 1999]. Доказано, что фрагментированная ДНК и протеазы, входящие в состав БАД Биосиноп, обладают мощным противовоспалительным действием, обеспечивают отсутствие токсичности и аллергенности, уменьшают интоксикационный синдром, являются стимуляторами гемопозеза, повышают эффективность экстракта коры осины [Беседнова Н.И. и др., 1999]. Диэнайн С стимулирует репарацию и регенерацию: ускоряет заживление ран и язвенно-некротических поражений кожи и слизистых оболочек, активизирует рост грануляций и эпителия [Касьяненко Ю.И., Ковалева Ю.В., Эпштейн Л.М., Артюков А.А., 1997]. При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки отмечается репаративное действие комплексного средства, восстановление слизистой оболочки и выраженный иммуномодулирующий эффект, направленный на устранение инфекционного фактора *Helicobacter pylori*.

Приведенные данные свидетельствуют в пользу перспективности исследования биологической добавки к пище «Биосиноп», содержащей сухой экстракт коры осины и ДНК из молок лососевых рыб, на модельных системах ульцерогенеза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Эксперименты выполнены на 75 беспородных крысах-самках (масса 218-226 г) первой категории, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (сертификат имеется). Содержание животных осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). До и в период экспериментов крысы находились в виварии при

температуре воздуха +20-22⁰С, влажности – не более 50%, объеме воздухообмена (вытяжка: приток) – 8:10, в световом режиме – день – ночь. Животных размещали в стандартных пластиковых клетках и содержали на стандартном рационе (гранулированный корм ПК120-3 согласно приказу № 1179 МЗ СССР от 10.10.83).

2.2. Дизайн исследования

Исследование противоязвенного действия биологически активной добавки к пище «Биосинол» проведено по требованиям Фармакологического комитета МЗ и СР РФ в соответствии с методическими указаниями, опубликованными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005 г.).

2.3. Обоснование выбора доз тестируемого препарата

При выборе доз 167 – 334 мг/кг для крыс (содержание сухого экстракта коры осины в диапазоне доз: 50-100 мг/кг в биологически активной добавке к пище «Биосинол») руководствовались результатами, полученными в лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии СО РАМН в скрининговых экспериментах на моделях нейрогенного и индометацинового повреждения.

2.4. Обоснование выбора пути введения тестируемого препарата

Результаты доклинического, клинического исследования сухого экстракта коры осины, способ получения «Биосинола» и его лекарственная форма (капсулы) предусматривают только внутрижелудочный путь введения.

2.5. Критерии эффективности:

В конце экспериментов животные были умерщвлены эфирным наркозом, желудки извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали холодным физиологическим раствором и макроскопически с помощью лупы при ярком освещении определяли число и площадь деструкций, которые дифференцировали на точечные (≤ 1 мм), крупные (≥ 1 мм) и полосовидные. Подсчитывали среднее количество изъязвлений на одно животное в группе, процент животных с язвами.

Индекс Паулса (ИП) определяли как интегральный показатель количества деструкций по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{Среднее количество язв} \times \% \text{ животных с язвами}}{100\%}$$

Противоязвенную активность (ПА) препаратов определяли как отношение индекса Паулса в контрольной группе к индексу Паулса в опытной группе. Исследуемое средство считали активным, если ПА составляла 2 и более единиц [Pauls F., Wick A.M., Mac Key E.M. et al., 1947].

Степень повреждений (СП) слизистой желудка характеризовали на основании расчетов суммарной длины/ площади язвенных поражений (в мм/ мм²) у каждой крысы. Тяжесть повреждения (ТП) рассчитывали по формуле: $ТП = СП_{\text{контр}} / СП_{\text{опыт}}$ (%). При подсчете учитывали, что длина точечной деструкции составляет 1 мм, длина крупной - 2 мм.

В конце экспериментов с использованием хронической язвенной патологии животные были умерщвлены эфирным наркозом, желудки извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали холодным физиологическим раствором и макроскопически с помощью лупы при ярком освещении определяли локализацию и размеры одиночного язвенного дефекта, который имел форму эллипса. Площадь язвенного дефекта (S) подсчитывали по формуле: $S = \pi Rr$, где R – половина большего диаметра; r – половина меньшего диаметра. О выраженности противоязвенного действия препарата судили по величине площади язвенного дефекта (площадь язвы с валиком и площадь дна язвы) в указанные сроки.

Для морфологического исследования желудок крыс фиксировали в формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону - на соединительную ткань, реактивом Шиффа на нейтральные гликозаминогликаны (ГАГ) по Мак-Манусу [Меркулов Г.А, 1969]. Определение площади сосудов и коллагеновых волокон грануляционной ткани дна язвы проводили методом графического компьютерного анализа с помощью микровидеокамеры и программного обеспечения фирмы «Элекард» (г. Томск).

2.6. Статистическая обработка результатов производилась путем расчета средней (X) и стандартной ошибки (m) с использованием непараметрических методов Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и углового преобразования Фишера (ϕ). Различие считали достоверным при $P < 0,05$ [Гублер Е.В., 1978].

3. Экспериментальная модель «гистаминовая язва»

Гистамин является медиатором передачи импульсов непосредственно на секреторную клетку. В желудочно-кишечном тракте избыточная секреция гистамина приводит к повышению активности кислотно-пептического фактора. В результате

появляются очаги деструкций слизистой оболочки желудка, гистологическая картина которых сходна с таковой при язвенной болезни человека [Заводская И.С., Морева Е.В., 1981]. Для моделирования гистаминового язвообразования у крыс применяли однократное внутрибрюшинное введение гистамина в дозе 6 мг/кг в виде 0,1 % раствора. Эвтаназию животных осуществляли через 24 ч после инъекции гистамина.

3.1. Экспериментальные группы

На модельной системе гистаминового повреждения слизистой желудка крыс были использованы следующие группы:

1. Контроль – крысы получали растворитель - дистиллированную воду в объеме 0,5 мл внутрижелудочно ежедневно в течение 4 сут
2. Биосиол 167 мг/кг (50 мг/кг экстракта коры осины) – крысы получали препарат в объеме 0,5 мл дистиллированной воды внутрижелудочно ежедневно в течение 4 сут
3. Биосиол 334 мг/кг (100 мг/кг экстракта коры осины) – крысы получали препарат в объеме 0,5 мл дистиллированной воды внутрижелудочно ежедневно в течение 4 сут

Перед началом экспериментов было взято по 10 особей в группу

3.2. Протокол исследования:

Дни исследования	Манипуляции
20.04-29.04.09	Поступление животных в виварий, карантин
30.04	Подготовка животных к эксперименту: взвешивание крыс, разбивка на группы, расчет доз, взвешивание субстанции
4.05	Введение биосиола
5.05	Введение биосиола
6.05	Введение биосиола, подготовка животных к индукции язвы
7.05	Введение биосиола, индукция гистаминовой язвы
8.05	Умерщвление животных, выделение желудка, подсчет язв
11.05-13.05	Статистическая обработка результатов
13.05-14.05.09	Написание промежуточного отчета по исследованию

Примечание: взвешивание животных и введение препаратов производили м.н.с. Ефимова Л.А., н.с. Лопатина К.А.; умерщвление крыс, выделение желудков, подсчет язв проводили в.н.с. Крылова С.Г., с.н.с. Разина Т.Г., с.н.с. Амосова Е.Н., м.н.с. Ефимова Л.А., н.с. Лопатина К.А., аспирант Сафонова Е.А.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Биосиол в дозах 167 и 334 мг/кг применяли профилактическим курсом внутрижелудочно однократно ежедневно в течение 4 дней беспородным

крысам-самкам. Последнее введение биокомплекса приходилось за 1 ч до инъекции гистамина.

Однократное внутрибрюшинное введение гистамина (в дозе 6 мг/кг в виде 0,1 % раствора) вызывало выраженный отек слизистой желудка крыс, гастрит и приводило к образованию всех типов язвенных дефектов, при этом среднее количество язв достигало $8,30 \pm 0,70$, а их протяженность – $13,75 \pm 1,29$ мм (табл.1, 2, 3).

Таблица 1

Влияние курсового введения биосинола на развитие гистаминового повреждения слизистой оболочки желудка беспородных крыс-самок

Группа наблюдения, доза мг/кг (количество животных)	Число животных с язвами, %	Количество язв ($X \pm m$)			Количество язв на 1 крысу ($X \pm m$)	ИП	ПА
		Точечные	Полосовидные	Крупные			
1. Контроль (n=10)	100	$5,40 \pm 0,72$	$1,90 \pm 0,35$	$1,00 \pm 0,30$	$8,30 \pm 0,70$	8,30	-
2. Биосиол, 167 (n=10)	100	$3,80 \pm 0,44$	$0,80 \pm 0,29$ $P_{1-2} < 0,01$	$0,20 \pm 0,13$ $P_{1-2} < 0,05$	$4,80 \pm 0,68$ $P_{1-2} < 0,01$	4,80	1,73
3. Биосиол, 334 (n=10)	80 $P_{1-3} < 0,01$	$2,00 \pm 0,68$ $P_{1-3} < 0,01$	$0,50 \pm 0,27$ $P_{1-3} < 0,01$	$0,10 \pm 0,10$ $P_{1-3} < 0,05$	$2,60 \pm 0,67$ $P_{1-3} < 0,01$	2,08	3,99

Слизистая оболочка желудка животных, получавших биосиол в дозе 167 мг/кг, имела розовую окраску, отсутствовал выраженный отек. Количество полосовидных язв уменьшалось в 2,4 раза ($P < 0,01$), а длина этого вида деструкций - в 2,6 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (табл.1, 3). Следует отметить снижение количества крупных язвенных деструкций в 5 раз ($P < 0,05$), точечных поражений - в 1,4 раза. В пользу противоязвенного действия биосинола в дозе 167 мг/кг свидетельствует снижение числа животных с полосовидными язвами на 40% ($P < 0,01$), количества крыс с крупными язвами - на 50 % ($P < 0,01$). Кроме того, достоверное снижение линейных размеров полосовидных и крупных язв выразилось в уменьшении степени повреждения в 2,1 раза ($P < 0,01$) и тяжести повреждения на 52 % по сравнению с аналогичными показателями нелеченых животных (табл. 1, 2, 3).

Влияние биосинола на развитие язвенных деструкций различного типа у беспородных крыс-самок после введения гистамина

Группа наблюдения, доза (мг/кг) (количество животных)	Число животных с язвами, %		
	Крупные	Полосовидные	Точечные
1. Контроль (n=10)	70	100	100
2. Биосиол, 167 (n=10)	20 $_{1-2}P<0,01$	60 $_{1-2}P<0,01$	100
3. Биосиол, 334 (n=10)	10 $_{1-3}P<0,01$	30 $_{1-3}P<0,01$	70 $_{1-3}P<0,01$

Введение биосинола в дозе 334 мг/кг приводило к нормализации макроскопической картины слизистой желудка, сходной с описанием группы назначения БАДа в дозе 167 мг/кг. Количество точечных деструкций уменьшалось в 2,7 раза ($P<0,01$), полосовидных язв — в 3,8 раза ($P<0,05$).

Таблица 3

Влияние курсового назначения биосинола на степень развития различных видов язвенных деструкций при гистаминовом повреждении слизистой оболочки желудка беспородных крыс-самок

Группа наблюдения, доза мг/кг (количество животных)	Протяженность язвы ($X\pm m$), мм			Степень повреждения ($X\pm m$), мм	Тяжесть повреждения, %
	Точечные	Полосовидные	Крупные		
1. Контроль (n=10)	$5,40\pm 0,72$	$6,35\pm 1,39$	$2,00\pm 0,60$	$13,75\pm 1,29$	100
2. Биосиол, 167 (n=10)	$3,80\pm 0,44$	$2,40\pm 0,78$ $P_{1-2}<0,05$	$0,40\pm 0,27$ $P_{1-2}<0,05$	$6,60\pm 1,17$ $P_{1-2}<0,01$	48
3. Биосиол, 334 (n=10)	$2,00\pm 0,68$ $P_{1-3}<0,01$	$1,15\pm 0,63$ $P_{1-3}<0,01$	$0,20\pm 0,20$ $P_{1-3}<0,05$	$3,35\pm 0,77$ $P_{1-3}<0,01$	24,4

Отмечалось подавление образования крупных повреждений: количество этого типа язв на одно животное снижалось в 10 раз ($P<0,01$). В результате вышеописанных изменений среднее число язв уменьшилось в 3,2 раза, а противоязвенная активность достигала значения 3,99 единицы. При этом число животных с крупными, полосовидными и точечными язвами уменьшилось на 60 %, 70% и 30% соответственно по сравнению с

аналогичными значениями нелеченых животных (табл.2). Кроме того, следует подчеркнуть достоверное снижение линейных размеров точечных, полосовидных и крупных деструкций в 2,5; 5,5 и 10 раз соответственно по сравнению с показателями контрольной группы, что приводило к уменьшению степени повреждения в 4,1 раза, тяжести - на 75,6% (табл. 3).

Таким образом, выявлена преимущественная антиульцерогенная активность биосинола при использовании в дозе 334 мг/кг по сравнению с эффективностью в результате применения дозы 167 мг/кг.

5. ВЫВОДЫ

1. На модели гистаминового повреждения слизистой желудка у крыс выявлен существенный противоязвенный дозозависимый эффект субстанции биологически активной добавки к пище «Биосинол».
2. Результаты экспериментов, проведенных на модельной системе гистаминового повреждения слизистой желудка крыс, подтверждают выявленную ранее противоязвенную активность биосинола на моделях нейрогенного и индометацинового ульцерогенеза у животных другого вида.

6. Экспериментальная модель «хроническая ацетатная язва»

Быстрое исчезновение признаков язвенных дефектов и, как следствие, невозможность выявления ранозаживляющего эффекта изучаемых биологически активных веществ, являются одним из существенных недостатков «острых» язв желудка животных. Модель хронического язвенного повреждения обеспечивает длительное течение патологического процесса, что позволяет оценить лечебное действие препаратов.

Язва по А.А. Никулину и С.И. Буданцевой. Хроническую ацетатную язву, которая характеризуется системностью и длительностью течения патологического процесса, моделировали на крысах [Крылова С.Г., 2005]. Под легким эфирным наркозом у животных производили лапаротомию по белой линии живота, в подсерозный слой передней стенки желудка вводили 0,05 мл 5% раствора уксусной кислоты. Рану ушивали послойно. Препараты вводили внутривентрикулярно, начиная со дня индуцирования язвы и продолжая в течение 21 сут. На 7, 14 и 21 сут от начала эксперимента животных умерщвляли эфирным наркозом.

6.1. Экспериментальные группы

На модельной системе хронического повреждения слизистой желудка крыс были использованы следующие группы:

1. Контроль – крысы получали растворитель - дистиллированную воду в объеме 0,5 мл внутривентрикулярно ежедневно, начиная со дня операции и в течение 21 сут;
2. Биосиноп 334 мг/кг (100 мг/кг экстракта коры осины) – крысы получали препарат в объеме 0,5 мл дистиллированной воды внутривентрикулярно ежедневно, начиная со дня операции и в течение 21 сут.

Перед началом экспериментов было взято по 23 особи в группу. В процессе операции от эфирного наркоза погибли 2 крысы.

6.2. Протокол исследования

Дни исследования	Манипуляции
1-10 сут	поступление животных в виварий, карантин
11 сут	подготовка животных к эксперименту: взвешивание крыс, разбивка на группы, расчет доз, взвешивание субстанции
12 сут	проведение операции, индукция язвы, введение биосинола
13 сут	введение биосинола
14 сут	введение биосинола
15 сут	введение биосинола
16 сут	введение биосинола
17 сут	введение биосинола
18 сут	введение биосинола
19 сут	умерщвление эфирным наркозом 14 крыс, выделение и измерение язвенного дефекта, введение биосинола, забор материала для гистологических исследований
20 сут	введение биосинола
21 сут	введение биосинола
22 сут	введение биосинола
23 сут	введение биосинола
24 сут	введение биосинола
25 сут	введение биосинола
26 сут	умерщвление эфирным наркозом 14 крыс, выделение и измерение язвенного дефекта, введение биосинола, забор материала для гистологических исследований
27 сут	введение биосинола

28 сут	введение биосинола
29 сут	введение биосинола
30 сут	введение биосинола
31 сут	введение биосинола
32 сут	введение биосинола
33 сут	умерщвление эфирным наркозом 16 крыс, выделение и измерение язвенного дефекта, забор материала для гистологических исследований
34 – 35 сут	статистическая обработка результатов
36-38 сут	написание промежуточного отчета по исследованию
39-59 сут	проведение морфологического и морфометрического исследования, статистическая обработка полученных результатов
60-65 сут	написание заключительного отчета

Примечание: взвешивание животных и введение препаратов производили м.н.с. Ефимова Л.А., н.с. Лопатина К.А., лаб.-исслед. Рыбалкина О.Ю.; проведение операции, умерщвление крыс, выделение желудков, подсчет язв проводили в.н.с. Крылова С.Г., с.н.с. Разина Т.Г., с.н.с. Амосова Е.Н., м.н.с. Ефимова Л.А., н.с. Лопатина К.А., лаб.-исслед. Рыбалкина О.Ю.; гистологическое исследование выполняли с.н.с. Фомина Т.И., м.н.с. Ермолаева Л.А.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

Макроскопическое изучение желудка нелеченых крыс на 7 сут исследования выявило у всех животных язвы слизистой оболочки глубиной 1-2 мм, по краям язвы отмечался валик за счет воспалительной инфильтрации и отека слизистой оболочки. Следует отметить наличие прободной язвы у одной крысы.

Размеры язвенных дефектов у крыс, получавших биосинол (334 мг/кг), были значительно меньше по сравнению с таковыми группы нелеченных животных во все сроки наблюдения (табл.4).

На 7 сут эксперимента выявлено снижение площади язвы с валиком на 31,4%, площади дна язвы – на 32,0% по сравнению с аналогичными значениями нелеченых животных. Следует отметить, что в указанные сроки наблюдения позитивные изменения в результате введения биосинола имели характер тенденции.

Влияние биосинола на заживление хронической ацетатной язвы желудка беспородных крыс-самок

Группа наблюдения, доза (количество животных)	Размер язвы ($X \pm m$), мм ²		
	7 сут	14 сут	21 сут
Контроль, (n=22)	$9,42 \pm 1,49$ $64,48 \pm 11,19$	$7,96 \pm 1,26$ $64,37 \pm 10,70$	$0,60 \pm 0,11$ $21,15 \pm 3,78$
Биосинол, 334 мг/кг (n=22)	$6,41 \pm 2,20$ $44,22 \pm 9,26$	$0,81 \pm 0,21^{**}$ $8,94 \pm 1,42^{**}$	$0,35 \pm 0,15^*$ $10,60 \pm 1,52^*$

Примечание: в числителе указана площадь дна язвы, в знаменателе - площадь язвы с валиком. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$ по сравнению с соответствующим значением контроля. Распределение животных по точкам осуществляли методом случайной выборки.

На 14 сут эксперимента наблюдалась наиболее существенная динамика заживления язвенного дефекта при назначении биосинола: статистически значимое уменьшение общей площади язвы на 86,1%, снижение площади дна язвы – на 89,8% ($P < 0,01$) относительно такового значения контрольной группы (табл.4).

На 21 сут после оперативного вмешательства в группе терапии биосинолом площадь язвы с валиком уменьшилась на 49,9% ($P < 0,05$), а площадь дна язвы – на 41,7% ($P < 0,05$). Следует отметить, что во всех исследуемых группах в этот срок наблюдения язвенный дефект представлял собой рубец со слабо дифференцируемым дном, лишь у отдельных животных отмечалось дно язвы глубиной 1 мм.

7.1. РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 7 дней после индукции язвы у контрольных крыс на гистологических препаратах желудка выявляется глубокий язвенный дефект слизистой, подслизистой и мышечной оболочек, заполненный некротическими массами, фибринозно-гнойным экссудатом и грануляционной тканью. В стенках некоторых сосудов отмечается фибриноидный некроз, что приводит к

развитию кровоизлияний. Серозная оболочка утолщена, инфильтрирована лейкоцитами и нередко спаяна с печенью. В месте контакта воспалительный инфильтрат распространяется на печень. Края язвенного дефекта неровные, образованы кистозно-расширенными слизистыми железами. В секрете этих желез определяется высокое содержание нейтральных гликозаминогликанов (ГАГ), что документируется интенсивной окраской цитоплазмы секреторных клеток реактивом Шиффа. Начинается процесс эпителизации язвенного дефекта с краев раны за счет образования однослойного недифференцированного эпителия, который не имеет слизиобразующей функции.

В окружающей язвенный дефект слизистой и подслизистой оболочках выявлены гиперемия, выраженный отек и лейкоцитарная инфильтрация, преимущественно нейтрофилами и эозинофилами. Покровный эпителий дистрофически изменен, в отдельных участках слущивается с образованием поверхностных эрозий. Содержание нейтральных ГАГ в цитоплазме покровно-ямочных и добавочных клеток невысокое (рис.1). Надэпителиальный слизистый слой выражен слабо.

Таблица 5

Содержание ГАГ в покровно-ямочном эпителии СОЖ, $X \pm m$ (баллах)

Сроки	Контроль	Биосинол
7 сутки	4,32±0,70	6,57±1,11 $P_u < 0,05$
14 сутки	8,86±1,13	9,71±1,63
21 сутки	5,13±0,55	7,30±1,18

Примечание. Здесь и в табл. 5 и 6: $P_u < 0,05$ - достоверное различие с контролем, $P_u^* < 0,05$ – достоверное различие с предыдущим сроком

У крыс с экспериментальной язвой желудка, получавших биосинол, на 7 сутки исследования глубина язвенного дефекта практически не отличается от контроля. Он захватывает все слои стенки желудка. Так же, как и в контроле, у части крыс происходит пенетрация язвы в печень. Отмечен случай

желудочного кровотечения. Однако, содержание нейтральных ГАГ в цитоплазме железистых клеток края язвы и покровно-ямочных и добавочных клеток неповрежденной слизистой оболочки достоверно выше, чем в контрольной группе (табл. 5, рис. 2). Надэпителиальный слизистый слой более выражен по сравнению аналогичной морфологической картиной группы контроля. Относительная площадь сосудов и коллагеновых волокон грануляционной ткани дна язвы у крыс, получавших препарат, представлена более высокими показателями (табл. 6, 7). Степень эпителизации язвенного дефекта такая же, как и в группе нелеченых животных.

Таблица 6

Относительная площадь сосудов грануляционной ткани дна язвы желудка, $X \pm m$ (%)

Сроки	Контроль	Биосиноп
7 сутки	10,68±1,65	13,47±1,59
14 сутки	5,05±0,60 Pu * < 0,05	4,50±0,41 Pu * < 0,01
21 сутки	5,01±0,85	5,08±1,10

Через 14 дней в стенке желудка контрольных животных сохраняется обширный язвенный дефект, заполненный грануляционной тканью с остатками клеточного детрита. В дне язвы идет новообразование гладкомышечных клеток. В краях язвенного дефекта располагаются кистозно-расширенные слизистые железы, секреторные клетки которых содержат большое количество ГАГ. Отмечается частичная эпителизация язвы однослойным эпителием. В стенке желудка вокруг язвы сохраняется гиперемия, отек и дистрофические изменения покровного и железистого эпителия.

У крыс с экспериментальной язвой желудка, получавших препарат, на 14 сутки степень заживления язвенного дефекта практически не отличается от контроля.

У всех крыс с язвой желудка на 14 день почти в 2 раза уменьшается относительная площадь сосудов грануляционной ткани по сравнению с предыдущим сроком (табл. 6), и одновременно увеличивается относительная площадь коллагеновых волокон (табл. 7). Кроме того, в грануляционной ткани уменьшается количество клеточных элементов (нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов, лимфоцитов). Все это свидетельствует о созревании грануляционной ткани, полноценной репарации слизистой оболочки желудков. Содержание ГАГ в секреторных клетках неповрежденной слизистой оболочки желудка увеличивается как в контрольной, так и в экспериментальной группах. Достоверной разницы между этими показателями нет.

На 21 день исследования язвенный дефект и в контроле, и в опыте практически очищается от некротических масс. Отмечается частичная эпителизация язвы однослойным кубическим эпителием с невысокой секреторной активностью. В краях язвенного дефекта образуются кистозные полости, выстланные уплощенным эпителием без признаков слизиобразования. Грануляционная ткань, заполняющая язвенный дефект как в контроле, так и в опыте выглядит более зрелой, содержит меньше клеточных элементов и более толстые коллагеновые волокна, приобретающие горизонтальный ход. Происходит дифференцировка кровеносных сосудов (эндотелий уплощается, у артерий образуется мышечная оболочка).

Покровный эпителий слизистой оболочки вокруг язвы выглядит практически неповрежденным, однако отек и полнокровие сосудов сохраняются.

У крыс с экспериментальной язвой желудка, получавших препарат, на 21 день исследования явления отека и гиперемии стенки желудка выражены в меньшей степени. Степень заживления язвенного дефекта значительно выше, чем в контроле, но ни в одном случае не произошло полной эпителизации язвы. Содержание ГАГ в цитоплазме покровных и добавочных

клеток неповрежденной слизистой оболочки несколько выше, чем в контрольной группе.

Таблица 7

Относительная площадь коллагеновых волокон грануляционной ткани дна язвы желудка, $X \pm m$ (%)

Сроки	Контроль	Биосиноп
7 сутки	25,23±4,70	30,75±2,51
14 сутки	30,81±1,47	34,73±3,15
21 сутки	34,64±2,78	37,62±1,24

Таким образом, у крыс с хронической ацетатной язвой, леченных биосинолом, отмечается лучшая сохранность и более высокая секреторная активность покровного эпителия неповрежденной слизистой оболочки, особенно в первые 7 дней от начала развития язвы, и менее выраженные гемодинамические нарушения в окружающей язву слизистой и подслизистой оболочках.

8. ВЫВОДЫ

1. На модели хронической ацетатной язвы размеры язвенных дефектов у крыс, получавших биосиноп (334 мг/кг), были значительно меньше по сравнению с таковыми значениями группы нелеченых животных во все сроки наблюдения. Наиболее существенная динамика заживления язвенного дефекта при назначении биосинола отмечалась на 14 сут после проведения оперативного вмешательства.
2. По результатам морфологического исследования выявлена лучшая сохранность и более высокая секреторная активность покровного эпителия неповрежденной слизистой оболочки, особенно в первые 7 суток от начала развития язвы, и менее выраженные гемодинамические нарушения в окружающей язву слизистой и подслизистой оболочках у крыс, получавших биосиноп. Механизм протекторного действия биосинола обусловлен высоким содержанием нейтральных гликозаминогликанов, определяющих

количественную и функциональную полноценность секретирующих клеток желудка.

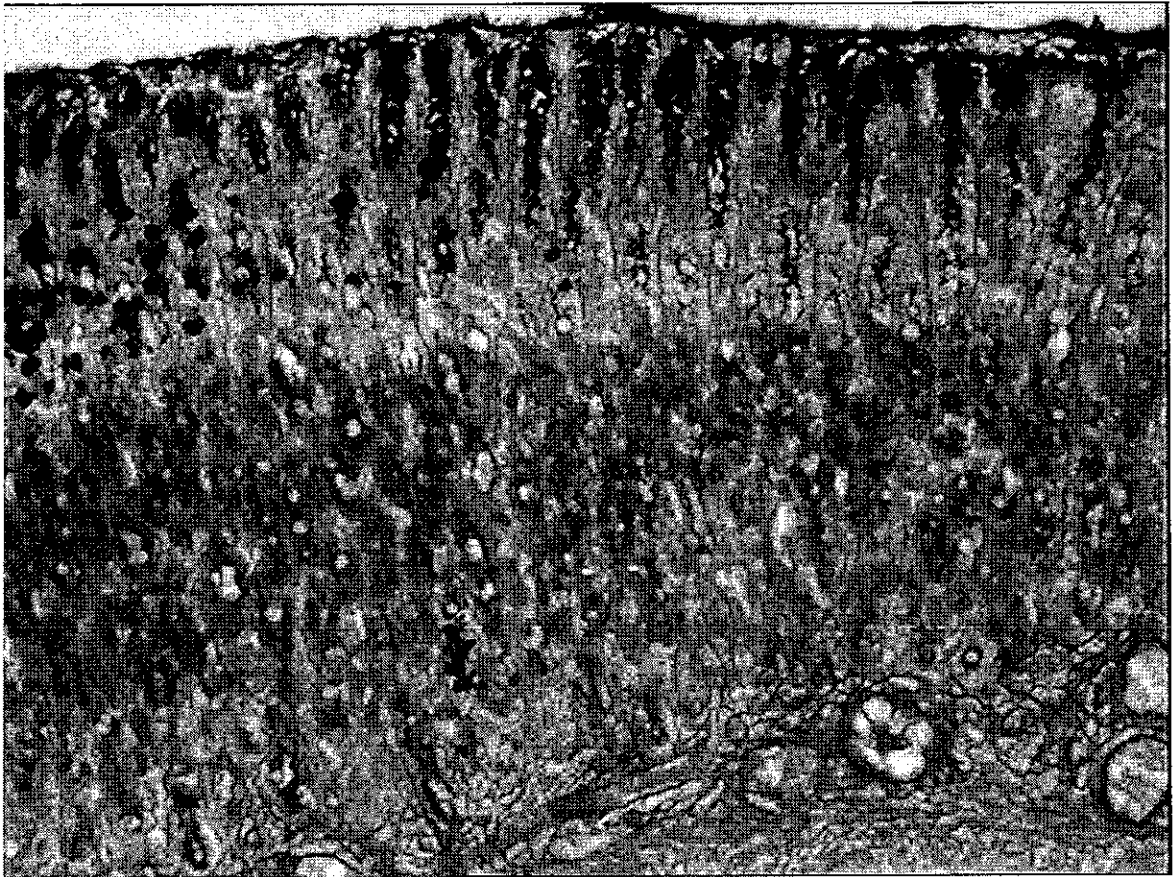


Рис. 1 Слизистая оболочка желудка крысы контрольной группы (7 сут после создания хронической ацетатной язвы). Содержание нейтральных гликозаминогликанов в цитоплазме покровно-ямочного эпителия. Шик-реакция по Мак-Манусу x 100.

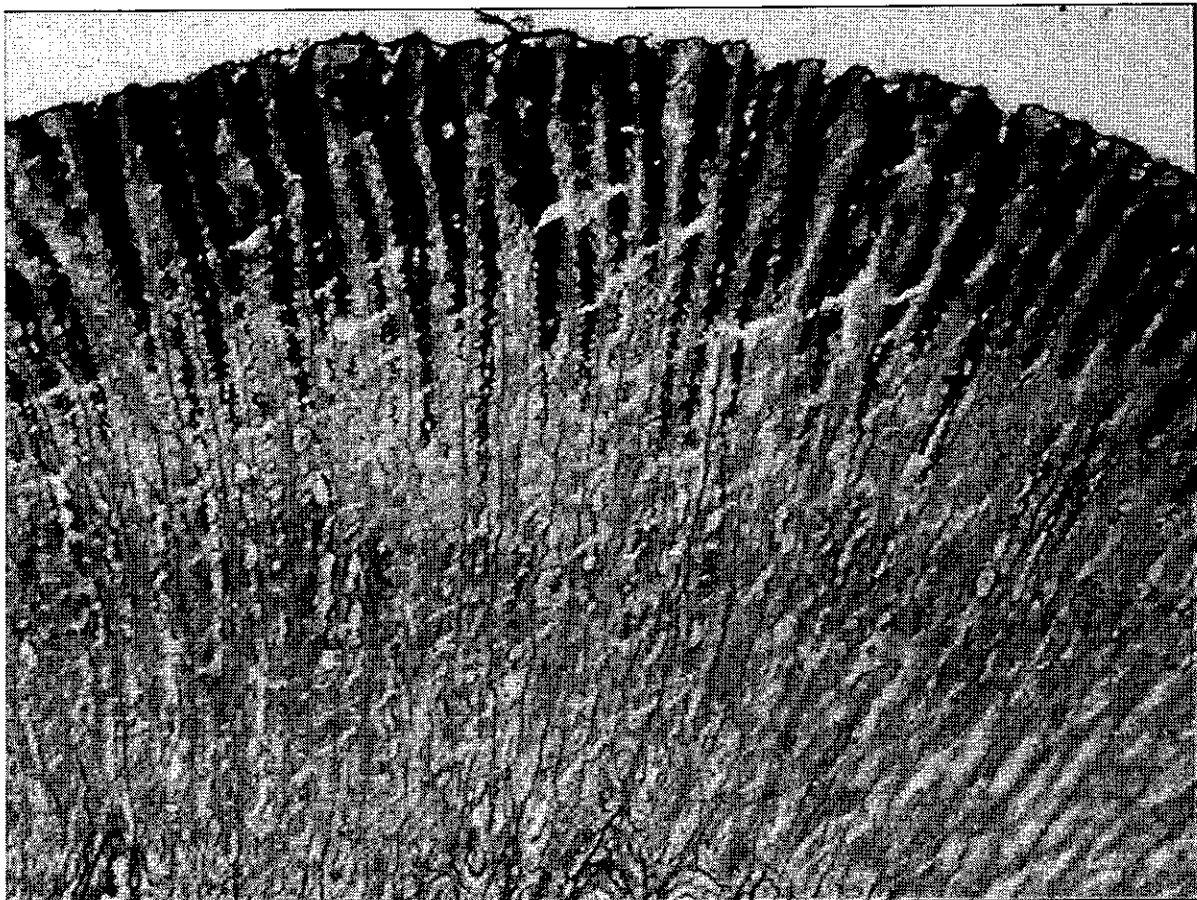


Рис. 2 Слизистая оболочка желудка крысы, леченной биосиномом (7 сут после создания хронической ацетатной язвы). Более высокое содержание нейтральных гликозаминогликанов определяет большее количество клеток, включенных в секреторную активность. Шик-реакция по Мак-Манусу $\times 100$.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Беседнова Н.И. и др. Антибиотики и химиотерапия. - 1999.-№10.-С.13-15.
2. Бутов М.А. Об этиологии и патогенезе язвенной болезни // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2003. - №5. - С.23-27.
3. Васильев Ю.В. Обволакивающие (антацидные) лекарственные препараты в терапии некоторых заболеваний верхних отделов пищеварительного тракта // Гастроэнтерология. – Прил. к Consilium Medicum. - 2004. - №5. - С. 244-248.
4. Васильев Ю.В. Современная терапия язвенной болезни, ассоциируемой с *Helicobacter pylori* // Трудный пациент. - 2007. - №6-7. - С. 35-41.
5. Васильев Ю.В. Язвенная болезнь // Избранные главы клинической гастроэнтерологии / под ред. Л.Б. Лазебника. М.: Анахарсис, 2005. - С. 82–112.
6. Волков А.И. Хронические гастродуодениты и язвенная болезнь у детей // Гастроэнтерология. – Прил. к Consilium Medicum. - 2006. - №11. - С. 4-10.
7. Заводская И.С., Морева Е.В. Фармакологический анализ механизмов стресса и его последствий. - Л.: Медицина, 1981. - 212 с.
8. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.
9. Касьяненко Ю.И., Ковалева Ю.В., Эпштейн Л.М., Артюков А.А. Получение и свойства производных ДНК из молок лососевых // Известия ТИНРО-центра. Владивосток (1997); 37-43 с.
10. Кокуева О.В., Степанова Л.Л., Усова О.А. и др. Фармакотерапия язвенной болезни с учетом сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта // Клиническая и экспериментальная гастроэнтерология. - 2002. - №1. - С.35-49.
11. Кривошеев А.Б., Хван Л.А., Филиппова О.А. Прогноз и профилактика осложнений язвенной болезни // Сибирский вестник гепатологии и гастроэнтерологии. - 2006. - №20. - С. 60-62.
12. Крылова С.Г. Растения Сибири и Дальнего Востока в терапии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук, Томск, 2005, 50 с.
13. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
14. Оболенцева Г.В., Хаджай Я.И. О влиянии некоторых природных полисахаридов на дистрофические процессы в желудке // Фармакологическая регуляция обменных процессов. – Л., 1972. – С.121- 122.
15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых

фармакологических веществ / под общей редакцией член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева.- 2-изд., перераб. и доп.- М.:ОАО «Издательство «Медицина», 2005.– 832 с.

16. Pauls F., Wick A.M., Mac. Key E.M. et al. An assau method for anti ulcer substances // Gastroenterology.-1947.- №8.– P.774-782.

Приложение
(первичные материалы)

Гистаминовое поражение слизистой желудка крыс**Масса тела крыс, г**

Контроль	Биосиноп 1 (167 мг/кг)	Биосиноп 2 (334мг/кг)
199	209	250
229	196	247
205	239	226
223	214	215
272	219	236
218	192	222
226	219	225
205	229	228
209	237	197
241	231	219
222,70±6,84	218,50±5,11	226,50±4,88

Количество язв			Общее количество язв	Число животных с язвами
Крупные	Полосовидные	Точечные		
Контроль (10)				
1	2 мм	1, 4, 1	8	
0	2,5 мм	1, 4, 3	9	
1	3,5 мм	2, 1	5	
1	4 мм, 2,5 мм	3	6	100%
0	2мм, 2 мм, 5мм	3	6	
2	3,5 мм	2, 4, 2	11	
3	2 мм	3, 2	9	
0	5 мм, 4,5 мм	7	9	
1	3,5 мм, 2,5 мм, 4 мм	1, 3, 4	12	
1	3,5 мм, 5 мм, 4 мм, 2,5 мм	3	8	
Биосиноп 1 (10)				
0	2,5 мм	1, 2, 1, 1	6	
0	3 мм	3	4	
0	0	2, 2	4	
0	2,5 мм, 2,5 мм, 2 мм	3, 2, 1	9	100%
1	0	4	5	
1	5,5 мм	4	6	
0	3,5 мм	5	6	
0	0	1	1	
0	2,5 мм	2, 1	4	
0	0	2, 1	3	
Биосиноп 2 (10)				
0	0	3	3	
0	0	0	0	80%
0	0	1, 1	2	
0	2,5 мм, 2 мм	0	2	
0	0	1	1	
0	0	3	3	
1	3 мм, 2 мм	1	4	
0	2 мм	1, 2	4	
0	0	2, 5	7	
0	0	0	0	

Хроническая язвенная патология слизистой желудка крыс**Масса животных до начала экспериментов, г**

Контроль	Биосиноп (334 мг/кг)
264	291
285	252
199	212
208	244
242	273
282	261
228	230
242	245
241	255
278	298
202	265
252	236
246	290
218	255
255	218
285	276
255	290
241	250
274	261
240	236
266	248
238	260
271	299
248,35±5,34	258,48±5,09

Результаты измерений язвенного дефекта на 7 сут после проведения операции (1-я точка)

№	Контроль		
	Диаметр язвы с валиком, мм	Диаметр дна язвы, мм	Примечание
1	10x10	4x4	прободная
2	9x6	3x2	
3	6x8	3x3	
4	11x13	4x5	
5	11x10	5x3	
6	8x10	3x3	
7	8x5	3x3	
Биосиноп			
1	6x5	2x1,5	
2	12x12 ↑	8x7 ↑	
3	9x8	2x4	
4	8x6	2x1,5	
5	3x6	2x1,5	
6	10x8	4x5	с кровоточением
7	10x9	4x3	

№	Контроль	
	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	78,50	12,56
2	42,39	4,71
3	37,68	7,07
4	112,26	15,70
5	86,35	11,78
6	62,80	7,07
7	31,40	7,07
n=7	64,48±11,19	9,42±1,49
№	Биосиноп	
	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	23,55	2,36
2	26,52	6,28
3	37,68	2,36
4	14,13	2,36
5	62,80	15,70
6	70,65	9,42
n=6	44,22±9,26	6,41±2,20

Результаты измерений язвенного дефекта на 14 сут после проведения операции (2-я точка)

№	Контроль		
	Диаметр язвы с валиком	Диаметр язвы	Примечание
1	10x11	4x3	
2	9x6	5x2	
3	7x8	4x3	
4	13x10	4x4	
5	10x9	3x3	
6	13x8	5x2	
7	6x5	2x1	
	Биосиноп		
1	3x4	1x1	Без спаек
2	5x2	2x0,5	
3	5x2	2x1	
4	4x3	0,5x0,5	
5	3x4	2x1	
6	4x5	1x0,5	
7	2,5x1,5	0,5x1	

№	Контроль	
	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	86,35	9,42
2	42,39	7,85
3	43,96	9,42
4	102,05	12,56
5	70,65	7,07
6	81,64	7,85
7	23,55	1,57
n=7	64,37±10,70	7,96±1,26
	Биосиноп	
№	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	9,42	0,79
2	7,85	0,79
3	7,85	1,57
4	9,42	0,20
5	9,42	1,57
6	15,70	0,39
7	2,94	0,39
n=7	8,94±1,42 p<0,01	0,81±0,21 p<0,01

Результаты измерений язвенного дефекта на 21 сут после проведения операции (3-я точка)

№	Контроль		Примечание
	Диаметр язвы с валиком	Диаметр язвы	
1	3,5x5	1x0,5	
2	3x3,5	1x1	
3	2,5x4	0,5x1	
4	4x5,5	0,2x1,5	
5	6x7	0,5x2	
6	7x6	1,5x0,5	
7	6,5x5	1x0,5	
8	6x6,5	1,5x1	
	Биосиноп		
1	3x2,5	1x0,5	
2	10x9↑	2x1,5↑	
3	6x2	1,5x1	
4	5x4	0,5x1	
5	5x3	0,8x0,2	
6	4x3	0,8x0,2	
7	4x2	0,5x0,2	
8	5x4	1x0,2	

№	Контроль	
	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	13,74	0,39
2	8,24	0,79
3	7,85	0,39
4	17,27	0,24
5	32,97	0,79
6	32,97	0,59
7	25,51	0,39
8	30,62	1,18
n=8	21,15±3,78	0,60±0,11
	Биосиноп	
№	Площадь язвы с валиком	Площадь язвы
1	5,89	0,39
2	9,42	1,18
3	15,70	0,39
4	11,78	0,13
5	9,42	0,13
6	6,28	0,08
7	15,70	0,16

n=7	10,60±1,52 p<0,05	0,35±0,15 p<0,05
-----	----------------------	---------------------

Примечание: ↑ - артефакт по техническим причинам