УДК 616-035:616.381:616.381-007.274

Шурыгина И.А. [1], Аюшинова Н.И. [1], Родионова Л.В. [1], Чепурных Е.Е. [1, 2], Шурыгин М.Г. [1, 3]

ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ И НЕФРОТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРОТИВОСПАЕЧНОГО ПРЕПАРАТА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

[1] ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии». Иркутск, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия
[3] АО «Фармасинтез» Иркутск, Россия

Проведена оценка влияния однократного введения нового противоспаечного препарата на биохимические показатели периферической крови у экспериментальных животных (крыс) для выявления возможных неблагоприятных воздействий препарата на органы системы, выявления потенциальной токсичности. Установлено, что новый противоспаечный препарат не обладает гепатотоксичностью и нефротоксичностью при однократном введении в брюшную полость. Профиль безопасности препарата не отличается от показателей контрольной группы, т. е. при внутрибрюшинном введении физиологического раствора.

Ключевые слова: *биохимические показатели крови, спайка, брюшная полость*

AN EXAMINATION OF HEPATOTOXICITY AND NEPHROTOXICITY OF A NEW ANTIADHESIVE PREPARATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Shurygina I.A. [1], Ayushinova N.I. [1], Rodionova L.V. [1], Chepurnykh E.E. [1, 2], Shurygin M.G. [1, 3]

[1] Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia
[2] Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia
[3] Pharmasyntez, J.S.C., Irkutsk, Russia

Adhesive process in the abdominal cavity was simulated in Wistar rats. The animals were divided into two groups: the main one – simulation of adhesive process in the abdominal cavity and introduction of 3 ml of saline into the abdominal cavity; and the controls – simulation of adhesive process in the abdominal cavity and introduction of 3 ml of new antiadhesive preparation.
We evaluated biochemical parameters at eight time points during the period from 2 hours to 28 days.
The introduced drug for adhesion prevention did not affect the protein-synthetic function of the liver: the blood level of whole protein was the same in both groups and remained within the normal range throughout the follow-up period. The blood level of creatinine, which is the end product of protein metabolism reflecting the renal excretory function, was within normal values in both groups throughout the observation period. Significant differences between the groups were noted only on the 28th day of the experiment: in the main group creatinine level was higher as compared to the control group ($p = 0.014$), but remained within the normal range.
The same pattern was observed when evaluating the blood urea level, which reflects the renal excretory function – the blood urea level remained normal in both groups throughout the experiment.
Hence, the new antiadhesive drug does not produce toxic effect on liver and kidneys in a single intraperitoneal introduction in experiment. Biochemical indices are the same as in single intraperitoneal infusion of saline.

Key words: *biochemical blood indices, adhesion, abdominal cavity*

ВВЕДЕНИЕ

Развитие абдоминальной хирургии и гинекологии определило увеличение числа больных с послеоперационными спайками брюшной полости. Это связано как с увеличением количества операций, так и с отсутствием надёжных средств и способов периоперационной профилактики адгезивного процесса, в результате чего заболеваемость спаечной болезнью брюшной полости не имеет тенденции к снижению [10, 11]. Послеоперационная спаечная болезнь резко нарушает качество жизни, приводит к затруднению повторных доступов при операциях на брюшной полости, непроходимости желудочно-кишечного тракта [3, 8], хроническим абдоминальным и тазовым болям, женскому бесплодию [3, 11, 14].

Несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время по отношению ни к одному существующему методу лечения и препарату однозначно не доказана его эффективность в предупреждении образования спаек [1, 8, 9, 11], поэтому разработка и внедрение в практику новых перспективных противоспаечных средств являются актуальной задачей. Особенно важна разработка препаратов, подавляющих рост соединительной ткани в зоне спайкообразования путём воздействия на натоленетические механизмы формирования спаек [6, 7].

В настоящем исследовании изучена безопасность перспективного противоспаечного препарата, представляющего собой стерильный водный раствор конъюгата 4-[4-(4-флюорофенил)-2-(4-метилсульфилфенил)-1Н-имидазол-5-пиридина с поливинилимидазолом, продемонстрировавшего высокую противоспаечную активность, в экспериментальных исследованиях при однократном внутрибрюшинном введении [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под кетаминовым наркозом (кетамин 50 мг/кг, дроперидол и атропин) у крыс линии Вистар производили моделирование спаечного процесса в брюшной

полости путём вскрытия серозно-мышечного слоя слепой кишки длиной 1 см с последующим ушиванием раны непрерывным самовворачивающимся швом и скарификацию париетальной брюшины правого бокового канала размером 1,5 × 1,5 см [2, 5].

В эксперименте использованы две группы животных:

1-я группа – контрольная (n = 40). Моделирование спаечного процесса в брюшной полости, введение в брюшную полость физиологического раствора в объёме 3 мл.

2-я группа – опытная (n = 40). Моделирование спаечного процесса в брюшной полости, введение нового противоспаечного препарата в объёме 3 мл.

Исследования проводили на 8 временных точках в сроки от 2 часов до 28 суток.

В момент выведения животного из эксперимента производили забор крови и в сыворотке животных определяли содержание:

1) общего белка – биуретовым методом («Vital», кат. № B 06.01);

2) общего и прямого билирубина – унифицированным методом Ендрассика – Грофа («Vital», кат. № B 03.12);

3) холестерина – энзиматическим колориметрическим методом («Vital», кат. № B 13.12);

4) мочевины – уреазно-салицилатным методом (Новокарб 8008, Вектор-Бест, Россия, кат. № B-8008);

5) креатинина («BioSystems», Испания, кат. № 11802);

6) мочевой кислоты («BioSystems», Испания, кат. № 11821).

В сыворотке животных определяли активность:

1) аспарагиновой аминотрансферазы (АСТ) («BioSystems», Испания, кат. № 11830);

2) аланиновой аминотрансферазы (АЛТ) («BioSystems», Испания, кат. № 11832);

3) щелочной фосфотазы (ЩФ) («BioSystems», Испания, кат. № 11832).

Исследование ферментов проводили кинетическим методом, рекомендованным Немецким обществом клинической химии и Клиническим руководством по лабораторным тестам, при температуре 25 °С.

В качестве средства измерения использовали автоматический биохимический анализатор «Сапфир-400» (Tokyo Boeki, Япония).

В целях повышения аналитической надёжности результатов с каждой серией определений проводился внутрилабораторный контроль качества исследований, согласно приказу МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 г. [4], с использованием контрольных сывороток двух уровней концентрации исследуемых аналитов (нормального и патологического).

Использовались контрольные лиофилизированные сыворотки производства фирмы CORMAY (Польша), предназначенные для контроля измерений содержания органических и неорганических составляющих, а также активности ферментов:

1) сыворотка с нормальными значениями большинства параметров (кат. № 5-172);

2) сыворотка с патологическими значениями параметров (кат. № 5-173).

Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Все оперативные вмешательства проводили в асептических условиях. Животных содержали в условиях сертифицированного вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа. Протокол эксперимента одобрен Комитетом по биомедицинской этике НЦРВХ СО РАМН (протокол № 8 от 09.10.2010 г.).

В работе применяли следующие методы статистического анализа: вариационный анализ (ANOVA), исследование статистической значимости различий в исследуемых группах (временные ряды) и между группами (критерии Краскела – Уоллиса, Манна – Уитни) [12].

При проведении всех видов статистического анализа критический уровень значимости критериев принимался равным 0,05. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета r-project.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение всего периода наблюдения в основной группе уровень билирубина не превышал нормальных показателей для данного вида животных (рис. 1). В контрольной группе отмечено минимальное повышение уровня билирубина в сроки 2 и 6 часов после операции. Статистически значимые отличия между группами по уровню общего билирубина зафиксированы только в срок 12 часов после операции (p = 0,017), при этом показатели билирубина в обеих группах не выходили за пределы нормальных значений.

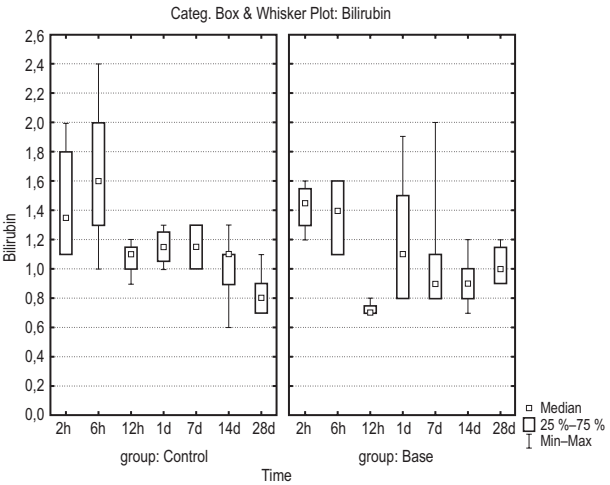

Рис. 1. Динамика концентрации общего билирубина в периферической крови у животных основной и контрольной групп, мкмоль/л.

То же касается и показателей прямого билирубина – различия между группами зафиксированы только в срок 12 часов (p = 0,037), при этом показатели в обеих группах находились в пределах нормальных значений (рис. 2).

Активность аланиновой аминотрансферазы кратковременно повышалась в ранние сроки после

операции (2 и 6 часов), при этом ни в одном случае её активность не превышала нормальных значений. Статистической значимости различий между группами не зарегистрировано на протяжении всего периода наблюдения (рис. 3).

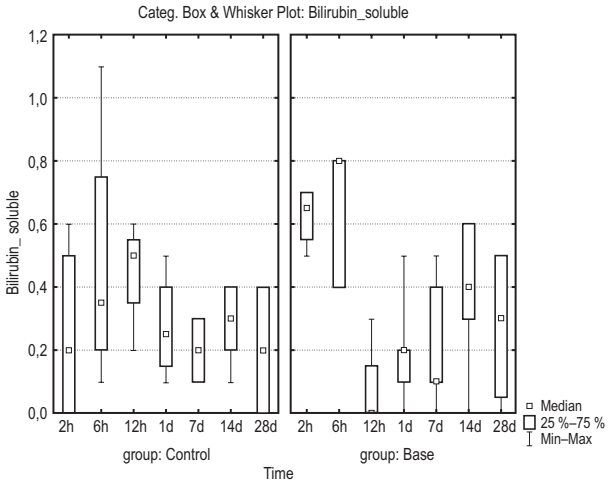

Рис. 2. Динамика концентрации прямого билирубина в периферической крови у животных основной и контрольной групп, мкмоль/л.

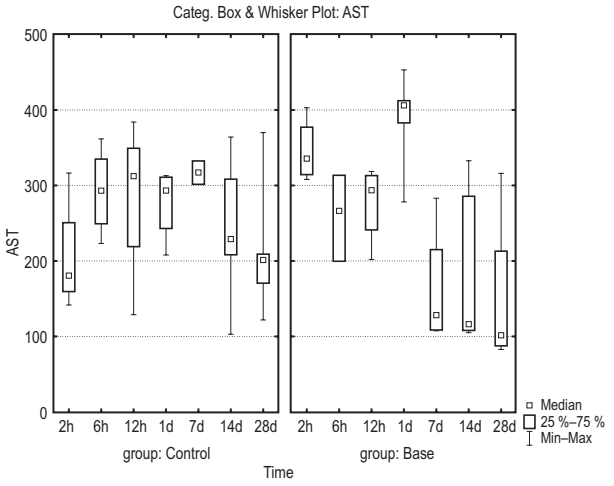

Рис. 3. Динамика активности аспарагиновой аминотрансферазы в периферической крови у животных основной и контрольной групп, ЕД/л.

Активность аспарагиновой аминотрансферазы повышалась выше нормальных показателей с первых часов после операции (рис. 4), что можно объяснить тем, что АСТ является не только маркером цитолиза гепатоцитов, но и маркером травмы мышечной ткани. В основной группе повышенная активность АСТ сохранялась до 1-х суток после операции, в последующем показатели снижались до нормальных значений. В контрольной группе повышенные показатели АСТ сохранялись до 14-х суток.

Активность щелочной фосфатазы, отражающей наличие холестаза, не превышала нормальных показателей ни в основной, ни в контрольной группах в течение всего периода наблюдения. Статистически значимых различий между исследуемыми группами не зарегистрировано (рис. 5).

Вводимый препарат для профилактики спайкообразования не влиял на белково-синтетическую функцию печени – концентрация общего белка в крови между контрольной и основной группами не различалась в течение всего периода наблюдения и находилась в пределах нормальных значений (рис. 6).

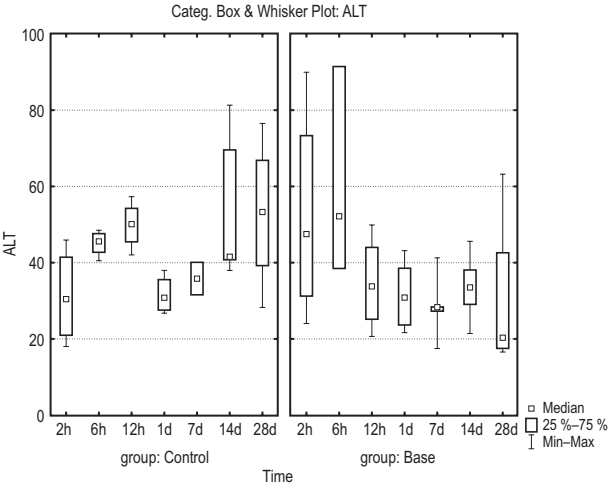

Рис. 4. Динамика активности аланиновой аминотрансферазы в периферической крови у животных основной и контрольной групп, ЕД/л.

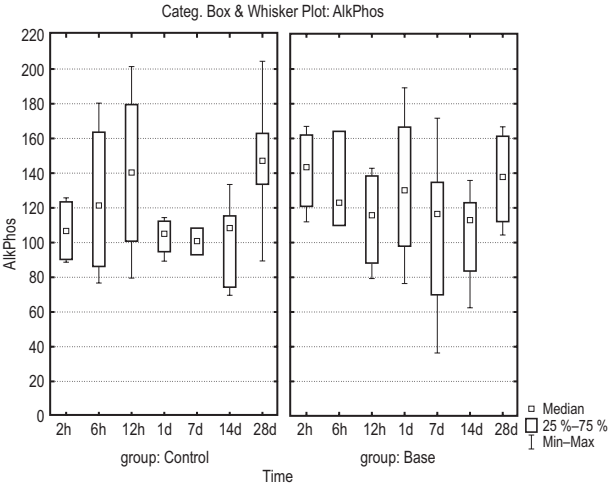

Рис. 5. Динамика активности щелочной фосфатазы в периферической крови у животных основной и контрольной групп, ЕД/л.

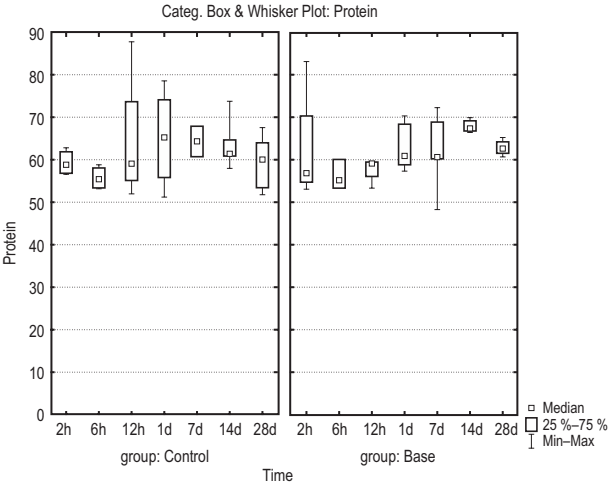

Рис. 6. Динамика концентрации общего белка в периферической крови у животных основной и контрольной групп, г/л.

Концентрация в крови креатинина, являющегося конечным продуктом обмена белков и отражающего выделительную функцию почек, в обеих группах находилась в пределах нормальных величин в течение всего периода наблюдения. Статистически значимые различия между группами зарегистрированы только на 28-е сутки эксперимента: в основной группе уровень креатинина превышал показатели контрольной группы (p = 0,014), однако оставался в пределах нормальных значений (рис. 7).

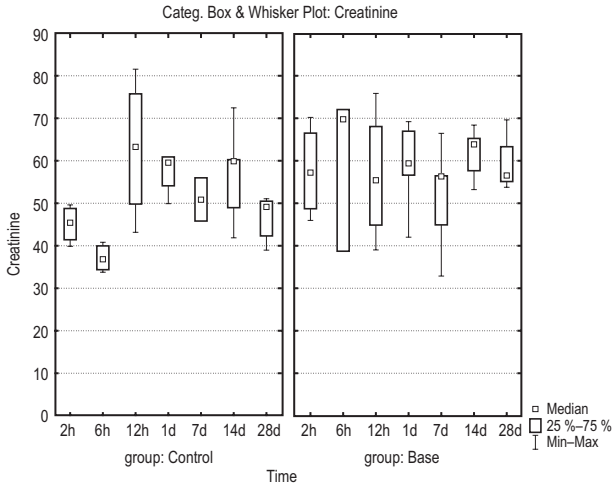

Рис. 7. Динамика концентрации креатинина в периферической крови у животных основной и контрольной групп, мкмоль/л.

Такая же картина наблюдалась при оценке концентрации уровня мочевины в крови, отражающей выделительную функцию почек: уровень мочевины в крови в обеих группах оставался на уровне нормальных значений в течение всего эксперимента. Статистически значимые различия между группами зарегистрированы только на 28-е сутки эксперимента: в основной группе уровень мочевины превышал показатели контрольной группы (p = 0,014), оставаясь в пределах нормальных значений (рис. 8).

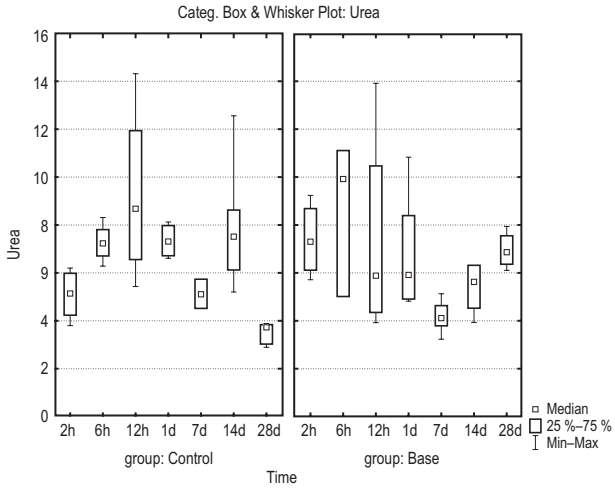

Рис. 8. Динамика концентрации мочевины в периферической крови у животных основной и контрольной групп, ммоль/л.

Таким образом, установлено, что новый противоспаечный препарат не обладает гепатотоксичностью и нефротоксичностью при однократном введении. Профиль безопасности препарата не отличается от показателей контрольной группы.

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Панасюк А.И. Современные подходы к профилактике спаечного процесса в брюшной полости // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 105, № 6. – С. 16–20.

Ayushinova NI, Shurygina IA, Shurygin MG, Panasyuk AI. (2011). Modern approaches to the prevention of intraperitoneal adhesions [Sovremennye podkhody k profilaktike spaechnogo protsessa v bryushnoy polosti]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, 105 (6), 16-20.

2. Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Лепехова С.А., Балыкина А.В., Малгатаева Е.Р., Попова А.Д., Янкелевич С.А. Экспериментальная модель для разработки способов профилактики спаечного процесса в брюшной полости // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 109, N 2. – С. 51–53.

Ayushinova NI, Shurygina IA, Shurygin MG, Lepekhova SA, Balykina AV, Malgataeva ER, Popova AD, Yankelevich SA. (2012). Experimental model for the development of ways to prevent adhesions in the abdominal cavity [Eksperimental'naya model' dlya razrabotki sposobov profilaktiki spaechnogo protsessa v bryushnoy polosti]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, 109 (2), 51-53.

3. Бурлев В.А., Дубинская Е.Д., Гаспаров А.С. Перитонеальные спайки: от патогенеза до профилактики // Проблемы репродукции. – 2009. – № 3. – С. 36–44.

Burlev VA, Dubinskaya ED, Gasparov AS. (2009). Peritoneal adhesions: from pathogenesis to prevention [Peritoneal'nye spayki: ot patogeneza do profilaktiki]. *Problemy reproduktsii*, (3), 36-44.

4. Меньшиков В.В. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. – М.: Лабинформ, 1999. – 318 с.

Menshikov VV. (1999). Quality control in laboratory research. Preanalytical phase [*Obespechenie kachestva laboratornykh issledovaniy. Preanaliticheskiy etap*]. Moskva, 318 p.

5. Способ моделирования спаечного процесса в брюшной полости: Патент № 2467401 Рос. Федерация; МПК G09B 23/28 (2006.01) / Аюшинова Н.И., Лепехова С.А., Шурыгина И.А., Рой Т.А., Шурыгин М.Г., Зарицкая Л.В., Гольдберг О.А.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения РАМН (НЦРВХ СО РАМН). – № 2011131678/14; заявл. 27.07.2011; опубл. 20.11.2012. – Бюл. № 32.

Ayushinova NI, Lepekhova SA, Shurygina IA, Roi TA, Shurygin MG, Zaritskaya LV, Goldberg OA. (2012). Method of modeling adhesive process: Patent N 2467401 of the Russian Federation [*Sposob modelirovaniya spaechnogo protsessa v bryushnoy polosti: Patent № 2467401 Ros. Federatsiya*], (32).

6. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Каня О.В. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 110, № 3. – С. 8–12.

Shurygina IA, Shurygin MG, Ayushinova NI, Kanya OV. (2012). Fibroblasts and their role in the development of connective tissue [Fibroblasty i ikh rol' v razvitii soedinitel'noy tkani //]. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal, 110 (3), 8-12.

7. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль МАР-киназных механизмов в регуляции клеточного роста // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 89, № 6. – С. 36–40.

Shurygina IA, Shurygin MG, Zelenin NV, Granina GB. (2009). Role of MAP-kinase mechanisms in the regulation of cell growth [Rol' MAP-kinaznykh mekhanizmov v regulyatsii kletochnogo rosta]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal,* 89 (6), 36-40.

8. Amid PK. (2002). Hyaluronate does not prevent adhesions. *J. Surg. Res*., 107 (2), 219-222.

9. Aydin C. (2006). Effect of temporary abdominal closure on colonic anastomosis and postoperative adhesions in experimental secondary peritonitis. *World J. Surg*., 30 (4), 612-619.

10. Beck DE, Cohen Z, Fleshman JW, Kaufman H, van Goor H, Wolff B. (2003). A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. *Dis. Colon. Rectum*, 46 (10), 1310-1319.

11. Di Zerega GS, Verco SJ, Young P, Kettel M, Kobak W, Martin D, Sanfilippo J, Peers EM, Scrimgeour A, Brown CB. (2002). A randomized, controlled pilot study of the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery. *Hum. Reprod*., 17 (4), 1031-1038.

12. Glantz SA, Slinker BK (2000). Primer of applied regression and analysis of variance. N.Y., 949.

14. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The Society of Reproductive Surgeons. (2007). Pathogenesis, consequences, and control of peritoneal adhesions in gynecologic surgery. *Fertil.,* 88, 21-26.

13. Shurygin MG, Shurygina IA. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process. *Patent WO2012156938*, March 20, 2014.

Сведения об авторах
Information about the authors

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com)
Shurygina Irina Aleksandrovna – Doctor of Medical Sciences, Professor of RAS, Deputy Director for Science of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; tel. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com)

Аюшинова Наталья Ильинична – кандидат медицинских наук, врач-хирург отделения гнойной хирургии № 1 ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664049, г. Иркутск, Юбилейный, 100; тел. (3952) 40-78-74; e-mail: katnatlove@mail.ru)
Ayushinova Nataliya Ilyinichna – Candidate of Medical Sciences, Surgeon at the Unit of Purulent Surgery of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (664049, Irkutsk, Yubileyniy, 100; tel. (3952) 40-78-74; e-mail: katnatlove@mail.ru)

Родионова Любовь Викторовна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточной патофизиологии и биохимии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (тел. (3952) 29-03-50; e-mail: greidmacho@yandex.ru)
Rodionova Lyubov Viktorovna – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of cell Pathophysiology and Biochemistry of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (tel. (3952) 29-03-50; e-mail: greidmacho@yandex.ru)

Чепурных Елена Евгеньевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, специалист по учебно-методической работе научно-учебно организационного отдела ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел. (3952) 40-77-19; e-mail: chepurnikh_ee@rambler.ru)
Chepurnykh Elena Evgenyevna – Candidate of Medical Sciences, Assistant Professor at the Department of Hospital Surgery of Irkutsk State Medical University, Specialist in Teaching and Guiding Work at the Scientific, Teaching and Organizational Department of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (664049, Irkutsk, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1; tel. (3952) 40-77-19; e-mail: chepurnikh_ee@rambler.ru)

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», директор по науке и инновациям АО «Фармасинтез» (664007, г. Иркутск, ул. Красногвардейская, 23, оф. 3; тел. (3952) 550-355; e-mail: shurygin@rambler.ru)
Shurygin Mikhail Gennadyevich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Scientific Laboratory Department of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Director for Science and Innovations of Pharmasyntez, J.S.C. (664007, Irkutsk, ul. Krasnogvardeyskaya, 3, office 3; tel. (3952) 550-355; e-mail: shurygin@rambler.ru)