

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Тишин А.Н., Покровский М.В., Тишина О.М., Сернов Л.Н., Степченко А.А., 2017
DOI:10.23888/PAVLOVJ20174551-564

**ПРИМЕНЕНИЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ МОНТМОРИЛЛОНИТА
ПРИ ОСТРОЙ ДИАРЕЕ
(экспериментальное исследование)**

А.Н. Тишин¹, М.В. Покровский², О.М. Тишина³, Л.Н. Сернов², А.А. Степченко⁴

БУЗ ОО Орловская областная клиническая больница,
бульвар Победы, 10, 302028, г. Орел, Российская Федерация (1)
ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, 308015, г. Белгород, Российская Федерация (2)
ФКУЗ «Медико-санитарная часть УМВД России по Орловской области»,
ул. Салтыкова-Щедрина, 37, 302028, г. Орёл, Российская Федерация (3)
ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет,
ул. К. Маркса, 3, 305041, г. Курск, Российская Федерация (4)

Цель. Изучить противодиарейную активность энтеросорбента на основе монтмориллонита на модели серотонин-индуцированной диареи. **Материалы и методы.** Исследование проведено на лабораторных мышах обоего пола, острая диарея индуцировалась внутрибрюшинным введением серотонина гидрохлорида в дозе 0,32 мг/кг, энтеросорбент в виде водной суспензии вводили перорально в широком диапазоне доз за 30 минут до введения серотонина. В течении 4 часов учитывали время наступления диареи, количество дефекаций, содержание жидкости в каловых массах. Проводили морфологическое исследование тонкой кишки. **Результаты.** Введение серотонина приводило к развитию диареи у 100% животных в течении 12,8±1,2 минут, количество дефекаций увеличивалось в 2,5 раза по сравнению с интактными животными и составило 19,5±0,5 раз за 4 часа, дефекации были преимущественно влажными и жидкими. Применение энтеросорбента под шифром Crim_04 в максимальной используемой дозе приводило к задержке развития диареи до 73,6±4,1 минут, сокращению количества дефекаций до 9,4±0,1 и значительному уплотнению каловых масс. Противодиарейный эффект энтеросорбента подтвержден морфологически. **Выводы.** Энтеросорбент на основе монтмориллонита под лабораторным шифром Crim_04 обладает дозозависимой противодиарейной активностью при моделировании серотонин-индуцированной диареи.

Ключевые слова: энтеросорбент, монтмориллонит, диарея, противодиарейная активность.

Одним из самых распространенных заболеваний, имеющих водное или пищевое происхождение, является диарея. По данным ВОЗ, диарея является одной из ведущих причин смертности в мире. Несмотря на то, что смертность от диареи в последние годы сократилась, в 2015 году в мире от диарейных заболеваний погибло 1,39 млн человек, большинство из которых

дети. Ежегодно регистрируется более 1,7 млрд случаев диареи в мире [1,2].

В качестве адьювантной терапии острых диарей, в том числе и у детей, используется метод энтеросорбции [3,4]. Особый интерес в этом отношении представляет минеральное сырье, в частности монтмориллонит. Монтмориллонит относится к слоистым минералам из группы

сметита. Диоктаэдрический смектит, имеющий сходную с монтмориллонитом структуру, пользуется повышенным спросом у населения России [5]. Минералы смектитовой группы обладают противодиарейным и цитомукопротекторным эффектами, имеют высокую сорбционную активность в отношении токсинов бактерий при пероральном применении [6-11].

В настоящий момент на российском фармацевтическом рынке нет минерального энтеросорбента на основе отечественного сырья [12]. Разработка лекарственных препаратов на основе отечественных субстанций является актуальной задачей для здравоохранения и фармацевтической промышленности и согласуется со «Стратегией Фарма-2020» [13].

Цель исследования – провести доклиническое изучение противодиарейной активности энтеросорбента на основе монтмориллонита под лабораторным шифром Сгim_04 на модели серотонин-индуцированной диареи.

Материалы и методы

Работа была выполнена на базе ФГАОУ «Белгородский государственный университет» в лаборатории доклинических исследований. Все этапы исследования были выполнены с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU].

Объект исследования

Объектом исследования явился опытный образец энтеросорбента под лабораторным шифром Сгim_04 на основе монтмориллонита крымского месторождения, предоставленный ООО «Крымфармамед». Опытный образец энтеросорбента Сгim_04 представляет собой порошок от желтоватого- или серовато-белого цвета до серовато- или коричневатого-жёлтого цвета с запахом ванилина. Массовая доля монтмориллонита составляет 62,4%, серебра – 0,15%. Размер наиболее часто встречающихся частиц в суспензии составляет 7,08 мкм.

Препараты сравнения: энтеросорбент «Смекта» (Beaufuor Ipsen Industrie), Фран-

ция) и препарат лоперамид («Janssen-Cilag», Франция).

Лабораторные животные, экспериментальные группы

Исследования проведены на 140 лабораторных мышах обоего пола массой 25±2г. Животные были получены из вивария ФГАОУ «Белгородский государственный университет».

Диарею вызывали внутрибрюшинным введением серотонина гидрохлорида (5-гидрокситриптамин – 5-ГТ) (Н9523, Sigma-Aldrich, США) в дозе 0,32 мг/кг (n=20 животных) [14]. Серотонина гидрохлорид применялся через 30 минут после внутрижелудочного введения энтеросорбентов и лоперамида. В группе интактных животных внутрибрюшинно применялся 0,9% раствора натрия хлорида 10 мл/кг (n=20 животных).

В экспериментальных группах животным внутрижелудочно однократно вводили водные суспензии энтеросорбентов Сгim_04 в дозах 880 мг/кг, 1660 мг/кг, 3320 мг/кг и препарата «Смекта» в дозе 1660 мг/кг, лоперамида в эффективной дозе 10 мкг/кг, полученных с учетом пересчета доз со средней терапевтической суточной дозы для человека. В контрольной группе животные получали эквивалентное количество 0,9% раствора натрия хлорида.

После моделирования патологии мыши по одной располагались на белом листе бумаги для оценки времени наступления диареи и подсчета количества дефекаций в течении 4 часов. Бумажное покрытие менялось каждый час. Для подсчета выраженности ингибирования (ВИ) диареи использовали следующую формулу:

$$ВИ(\%) = [(Дк - Ди) / Дк] \times 100\%,$$

где Дк – количество влажных и жидких дефекаций в контрольной группе, Ди – количество влажных и жидких дефекаций в исследуемых группах. Подсчет коэффициента выраженности диареи (КВД) осуществляли с помощью балльной шкалы оценки консистенции каловых масс: 1 балл – нормальные экскременты, 2 – полужидкие, влажные дефекации, 3 балла – жидкие дефекации. Показатель рассчитывался по формуле:

$$КВД = (N \times 1 + S \times 2 + L \times 3) / \Delta D,$$

где N – количество нормальных экскрементов, S – количество полужидких экскрементов, L – количество жидких экскрементов, ΔD – общее количество дефекаций за время наблюдения. Стрессовые дефекации в начале эксперимента при подсчете общего количества каловых выходов в процессе эксперимента не учитывались.

По истечении 4 часов наблюдения животные под эфирным наркозом выводились из эксперимента.

Морфологическое исследование

Для гистологического исследования у животных забирали участки ткани тонкого кишечника. При этом участки тканей фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, с последующей заливкой в парафин. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 5-7 мкм. Окраску проводили гематоксилин-эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе «Микмед-6» (ЛОМО, Санкт-Петербург), анализ изображений осуществлялся с помощью программы «Микро-анализ Про» (ООО «ЛОМО-Микросистемы», Санкт-Петербург).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010 и STATISTIKA 6.0 для Windows. Средние значения изучаемых показателей представлены в виде ($M \pm m$), где M – среднее арифметическое, а m – стандартная ошибка среднего. Для анализа различий показателей между группами использовали t -критерий Стьюдента. Достоверным считали различие сравниваемых показателей при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Было установлено, что внутрибрюшинное введение серотонина гидрохлорида в дозе 0,32 мг/кг в течении 15 минут вызывало диарею у 100% животных с выраженным увеличением количества дефекаций со значительным преобладанием водянистых каловых масс в сравнении с интактными животными (рис. 1).

Как видно из рисунке 1 А применение энтеросорбента под шифром Crim_04 значительно задерживало наступление

диареи. При этом диарея наступала более чем в 5,5 раза позже, чем в контрольной группе. Этот эффект был наиболее выражен при применении энтеросорбента в дозе 3320 мг/кг.

Применение энтеросорбента под шифром Crim_04 снижало количество дефекаций у мышей при моделировании серотонин-индуцированной диареи. При этом было установлено, что применение энтеросорбента Crim_04 в дозе 3320 мг/кг вызывало ингибирование развития диареи на 52,1%, что выражается в уменьшении количества влажных и жидких дефекаций по сравнению с контрольной группой. Этот результат достоверно выше, нежели в группах где энтеросорбент применялся в дозах 880 мг/кг и 1660 мг/кг (26,7% и 35,9% соответственно). Для «Смекты» и лоперамида этот показатель составил 34,8% и 73,8% соответственно (рис. 1 Б).

При внутрижелудочном введении энтеросорбента под шифром Crim_04 наблюдалось уменьшение содержания жидкости в каловых массах, дефекации были преимущественно влажные. Наиболее этот эффект выражен в группах животных, получавших энтеросорбент Crim_04 в дозе 3320 мг/кг (рис. 1 В).

Показатели энтеросорбента под шифром Crim_04 в средней терапевтической дозе 1660 мг/кг достоверно не отличались от эффекта диоктаэдрического смектита в такой же дозе. Вместе с тем, энтеросорбент под шифром Crim_04 и препарат «Смекта» значительно уступали лоперамиду по времени наступления диареи, общему количеству дефекаций и содержанию жидкости в каловых массах.

Морфологическое исследование

У животных контрольной группы макроскопически слизистая кишечника набухшая, отечная, розово-серого цвета, отдельными участками гиперемирована. Поверхность слизистой оболочки покрыта слегка мутной, полужидкой слизью, которая хорошо смывается водой.

Микроскопически слизистая отечна. Определяется укорочение и деформирование ворсинок. На концах некоторых ворсинок наблюдается слущивание эпителия с

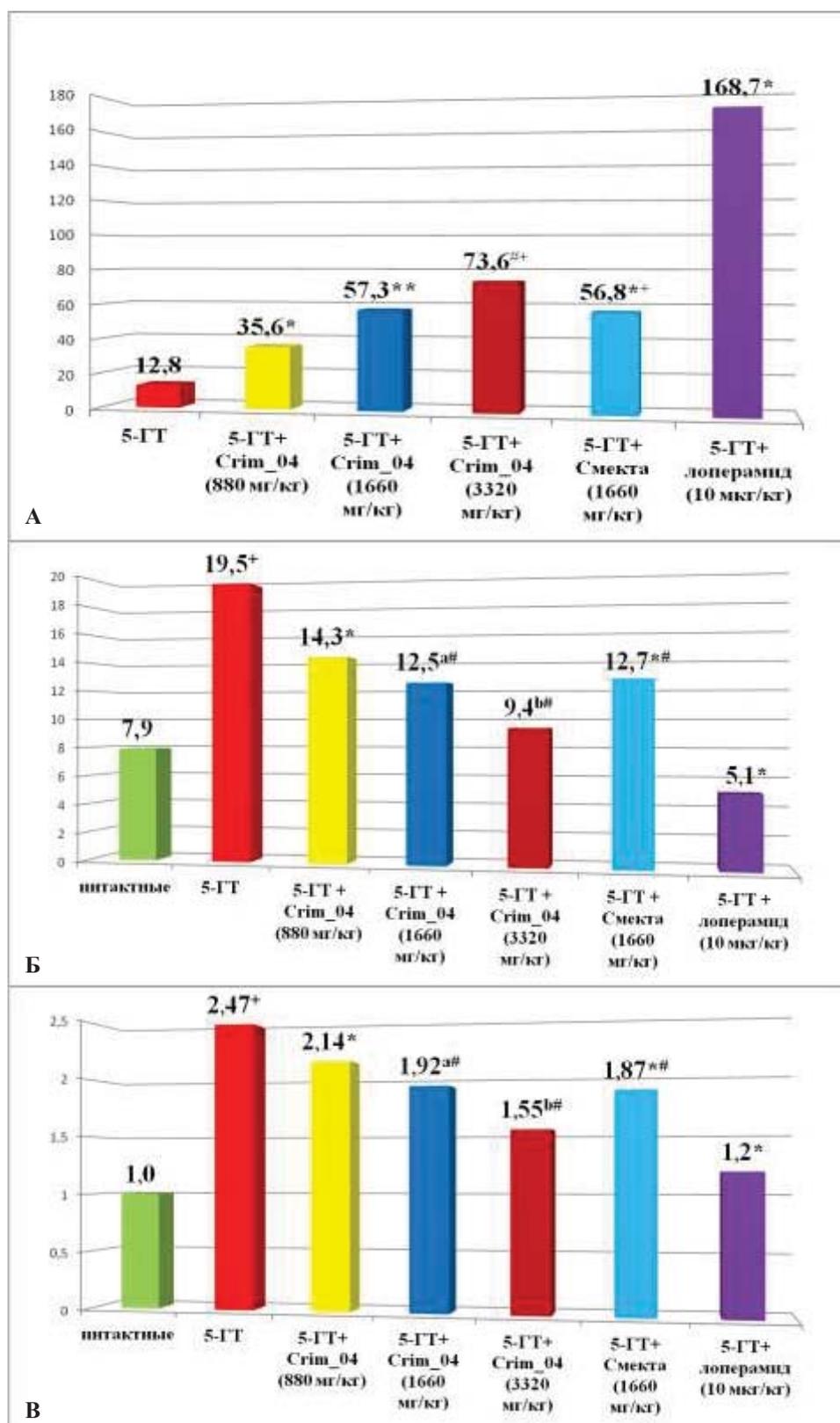


Рис. 1. Дозозависимое влияние энтеросорбента под шифром Crim_04 на время наступления диареи (А, минуты), количество дефекаций (Б, число), консистенцию каловых масс (В, усл. ед.) при серотонин-индуцированной диарее у мышей.

Примечание: ⁺ – при $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; * – при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; а – $p < 0,05$ в сравнении группой Crim_04 в дозе 880 мг/кг; b – $p < 0,05$ в сравнении группой Crim_04 в дозе 1660 мг/кг; # – $p < 0,05$ в сравнении с группой лоперамида

обнажением собственной пластинки слизистой. Определяется выраженная гипертрофия крипт. Кровеносные сосуды слизистой и подслизистого слоя полнокровны. Мышечная и серозная оболочки кишечника без изменений. В просвете кишки большое количество слизи (рис. 2 Б). Эти изменения не были характерны для интактных животных (рис. 2 А).

В группах животных, получавших энтеросорбент под лабораторным шифром Crim_04 в дозах 3320 мг/кг, патологические изменения тонкой кишки заключались в незначительном отеке слизистой оболочки. Участков гиперемии слизистой не наблюдалось. Явления сдувания эпителия были минимальны, участков обнажения

собственной пластинки слизистой оболочки не наблюдалось. Кровенаполнение сосудов слизистой оболочки и подслизистого слоя было умеренным. Мышечный слой и серозная оболочка без патологических изменений (рис. 2 Г).

В контрольной группе с моделированием серотонин-индуцированной диареи выявлены уменьшение высоты ворсинок в 1,4 раза, увеличение ширины ворсинок у основания в 1,4 раза и глубины крипт в 1,2 раза по сравнению с интактными животными. Применение энтеросорбента под шифром Crim_04 в дозе 3320 мг/кг значительно улучшало гистологическую картину тонкой кишки, приближая морфометрические показатели к уровню интактных животных (рис. 3).

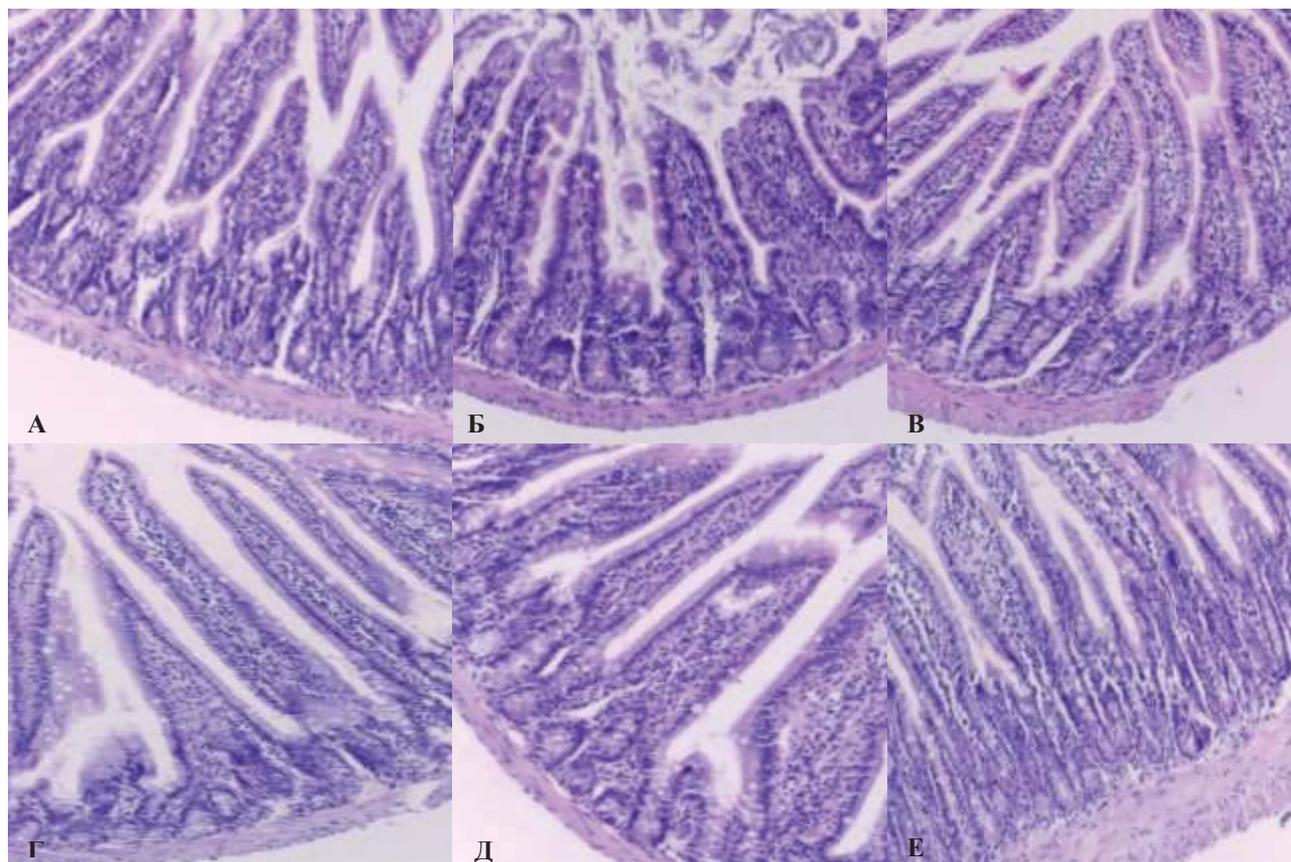


Рис. 2. Гистологическая структура тонкой кишки у мышей (микрофото $\times 100$): А – интактные животные; Б – контрольная группа; В – энтеросорбент Crim_04 в дозе 1660 мг/кг; Г – энтеросорбент Crim_04 в дозе 3320 мг/кг; Д – энтеросорбент «Смекта» 1660 мг/кг; Е – лоперамид 10 мкг/кг. Окр. гематоксилином и эозином



Рис. 3. Влияние энтеросорбента под шифром Crim_04 на отношение длины ворсинок к ширине ворсинок и длины ворсинок к глубине крипт в тонкой кишке мышей при моделировании серотонин-индуцированной диареи (усл. ед.).

Примечание: * – при $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; ** – при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой; а – $p < 0,05$ в сравнении с группой Crim_04 в дозе 880 мг/кг

Серотонин является важной сигнальной молекулой, регулирующей секрецию кишечного эпителия, моторику стенок желудочно-кишечного тракта [15,16]. Механизм слабительного действия серотонина заключен, по-видимому, в стимуляции им 5-HT₃-рецепторов. Это приводит к повышению моторики желудочно-кишечного тракта, повышению кишечной секреции, как следствие накоплению в просвете кишки повышенного количества жидкости и её ускоренной эвакуации естественным путем [14,17]. При моделировании серотонин-индуцированной диареи отмечалось раннее начало развития диареи у мышей ($12,8 \pm 1,2$ минут), резкое увеличение количества дефекаций и содержания в каловых массах жидкости ($19,5 \pm 0,5$ и $2,47 \pm 0,02$ соответственно по сравнению с группой интактных животных – $7,9 \pm 0,04$ и $1,0 \pm 0,0$ соответственно).

Противодиарейный эффект энтеросорбента под шифром Crim_04 носил дозозависимый характер. Наибольшую активность энтеросорбент под шифром Crim_04 показывал в дозе 3320 мг/кг, что проявлялось увеличением времени наступления диареи, уменьшением общего количества дефекаций с уменьшением содержания жидкости в каловых массах на модели экспериментальной диареи. Этот эффект, по-видимому, связан с сорбцией излишне секретированной жидкости в просвете кишки, повышением плотности каловых масс и, как следствие, с уменьшением скорости продвижения каловых масс по кишечнику [18].

Вывод

Энтеросорбент на основе монтмориллонита под лабораторным шифром Crim_04 обладает дозозависимой противодиарейной активностью при моделировании серотонин-индуцированной диареи.

Конфликт интересов отсутствует.

Исследование выполнено в ходе 1 этапа государственного контракта № 14.N08.11.0109 от 19.09.2016.

Литература

1. Top 10 causes of death in the world. Geneva: WHO; 2017. Available at:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru>. Accessed: 02.05.2017.

2. Diarrhea: Information Bulletin No. 330. Geneva: WHO; 2013. Available at:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en>. Accessed: 14.05.2017.

3. Carretero M.I., Pozo M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries. *Active ingredients // Appl. Clay Sci.* 2010. №47. P. 171-181.

4. Liashenko N.V. Peculiarities of enterosorption via nasointestinal probe using sorbent diosmectite // *Klin. Khir.* 2014. Vol. 12. P. 16-18.

5. Бондарев А.В., Жилиякова Е.Т. Анализ спроса на адсорбционные кишечные препараты при помощи индекса Вышковского // *Фармация и фармакология.* 2014. Vol. 6, №7. С. 114-116.

6. Новокшенов А.А., Соколова Н.В. Клиническая эффективность этиопатогенетической терапии энтеросорбентами острых кишечных инфекций у детей // *Consilium Medicum.* 2009. №1. С. 4-8.

7. Bui Q.C., Nguen H.C., Vesentsev A.I., et al. The antibacterial properties of modified bentonite deposit tam bo // *Research result: pharmacology and clinical pharmacology.* 2016. Vol. 2, №3. P. 63-74.

8. Bukhanov V.D., Vezentsev A.I., Filippova O.V. The influence of the concentration of montmorillonite containing sorbent and pH of the culture medium on the antibiotic sensitivity of *Escherichia coli*, as well as the effect of ground on growth of *Escherichia coli* // *Research result: pharmacology and clinical pharmacology.* 2017. Vol. 3, №1. P. 97-104.

9. Hu C., Song J., You Z., et al. Zinc oxide-montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs // *Biological trace element research.* 2012. №149. P. 190-196.

10. Khediri F., Mrad A.I., Azzouz M., et al. Efficacy of diosmectite (smecta) in the treatment of acute watery diarrhea in adults: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study // *Gastroenterol Res Pract.*

2011. Vol. 2011. P. 721-736.

11. Mujawar Q.M., Naganoor R., Ali M.D., et al. Efficacy of dioctahedral smectite in acute watery diarrhea in Indian children: a randomized clinical trial // *J. Trop. Pediatr.* 2012. Vol. 58. P. 63-67.

12. Жилиякова, Е.Т., Самсонов А.А., Голубев Н.Н., и др. Обзор российских энтеросорбционных лекарственных средств // *Ремедиум.* 2014. №10. С. 40-47.

13. Фарма-2020 – экспертная площадка открытого обсуждения. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. [Электронный ресурс]. Доступно по URL: <http://www.pharma2020.ru/download/1594.html?pharma2020=0223e3cc41acc42e5>. Ссылка активна на 21.05.2017.

14. Kadowaki M., Nagakura Y., Tomoi M. Effect of FK1052, a potent 5-hydroxytryptamine 3- and 5-hydroxytryptamine 4 receptor dual antagonist, on colonic function in vivo // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993. Vol. 266. P. 74-80.

15. Парфенов А.И. Четыре варианта патогенеза и терапии диареи // *Терапевтический архив.* 2015. Т. 87, №12. С. 5-12.

16. Shcherbakov P., Trubitsyna I., Kirova M. Serotonin and Acetylcholine associated damage to microcirculation in gastric mucosa and cytokine changes in rats // *Gastroenterology.* 2011. Vol. 140. P. 318-319.

17. Dong Y., Yang C., Wang Z., et al. The injury of serotonin on intestinal epithelium cell renewal of weaned diarrhea mice // *European Journal of Histochemistry.* 2016. Vol. 60. №2689. P. 253-261.

18. Tishin A.N., Krut U.A., Tishina O.M., et al. Physico-chemical properties of montmorillonite clays and their application in clinical practice (review) // *Research result: pharmacology and clinical pharmacology.* 2017. Vol. 3, №2. P. 119-128.

Покровский М.В. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии НИУ «БелГУ», г. Белгород, Российская Федерация. SPIN 9201-3580, ORCID 0000-0004-4895-1674, Researcher ID A-1573-2014.

Тишина О.М. – терапевт ФКУЗ «Медико-санитарная часть УМВД России по Орловской области», г. Орёл, Российская Федерация. SPIN 7492-3519, ORCID 0000-0002-1893-4671, Researcher ID N-1694-2017.

Сернов Л.Н. – д.м.н., профессор, НИУ «БелГУ», г. Белгород, Российская Федерация. SPIN 5241-1276, ORCID 0000-0001-4512-6871, Researcher ID H-6475-2014.

Степченко А.А. – д.м.н., доцент, Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Российская Федерация. SPIN 5747-3948, ORCID 0000-0002-3647-9541, Researcher ID R-5487-2016.

© Tishin A.N., Pokrovskii M.V., Tishina O.M., Sernov L.N., Stepchenko A.A., 2017

APPLICATION OF ENTEROSORBENT ON THE BASIS OF MONTMORILLONITE IN ACUTE DIARRHEA (experimental study)

A.N. Tishin¹, M.V. Pokrovskii², O.M. Tishina³, L.N. Sernov², A.A. Stepchenko⁴

Orel Regional Clinical Hospital,

Pobedy Boulevard, 10, 302028, Orel, Russian Federation (1)

Belgorod National Research University,

Pobeda str., 85, 308015, Belgorod, Russian Federation (2)

Medical-sanitary unit of the Administration of Ministry of Internal Affairs of Russia
of the Orel Region, Saltykov-Shchedrin str., 37, 302028, Orel, Russian Federation (3)

Kursk State Medical University,

K. Marx str., 3, 305041, Kursk, Russian Federation (4)

Aim. To study the antidiarrheal activity of enterosorbent on the basis of montmorillonite on the model of serotonin-induced diarrhea. **Materials and Methods.** The study was conducted on laboratory mice of both sexes, acute diarrhea was induced by intraperitoneal injection of serotonin hydrochloride at the dose of 0.32 mg/kg, enterosorbent was introduced orally in the form of aqueous suspension in a wide range of doses 30 minutes before introduction of serotonin. Within 4 hours, the time of onset of diarrhea, the number of defecations, the fluid content in fecal masses were taken into account. Morphological examination of the small intestine was carried out. **Results.** introduction of serotonin led to diarrhea in 100% of animals within 12.8±1.2 minutes, the number of defecations increased 2.5 times as compared to the intact animals and was 19.5±0.5 times in 4 hours, the fecal masses were predominantly semi-liquid and liquid. Use of enterosorbent coded Crim_04 at the maximum dose led to a delay in diarrhea up to 73.6±4.1 minutes, the number of defecations decreased to 9.4±0.1 with a significant solidification of feces. The antidiarrheal effect of enterosorbent was confirmed morphologically. **Conclusions.** Enterosorbent on the basis of montmorillonite with laboratory code Crim_04 possesses a dose-dependent antidiarrheal effect in modeling of serotonin-induced diarrhea.

Keywords: enterosorbent, montmorillonite, diarrhea, antidiarrheal activity.
