

## Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование миотоксичности и нейротоксичности бупивакаина в эксперименте у крыс

**Р.Е. Лахин\*, И.А. Гемуа, В.В. Шустров**

Кафедра анестезиологии и реаниматологии

ФГБУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ,

Российская Федерация, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

\* Контактная информация: Лахин Роман Евгеньевич, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова. Email: doctor-lahin@yandex.ru

<b>АКТУАЛЬНОСТЬ</b>	Местные анестетики, проникая внутрь клетки, кроме блокады натриевых каналов воздействуют на другие структуры и процессы, приводя к развитию повреждения клетки.
<b>ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	Изучить повреждающее действие бупивакаина на седалищный нерв и двуглавую мышцу бедра крыс.
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ</b>	Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. Плацебо – введение 0,9% раствора хлорида натрия. Исследуемые концентрации бупивакаина – 0,2%, 0,5%, 0,75% и 1%. Под ультразвуковым контролем вводили по 0,2 мл в седалищный нерв параневрально и 0,2 мл внутрь двуглавой мышцы. Забор препаратов: 1-й этап – через 1 час после введения, 2-й этап – через 14 суток.
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	При инъекции 0,9% раствора хлорида натрия некроза клеток или апоптоза в мышце и нерве обнаружено не было, выявлены единичные клетки воспалительного типа. Введение всех концентраций бупивакаина вызывало повреждение и воспалительную инфильтрацию мышечной ткани и нервных структур по сравнению с действием 0,9% раствора хлорида натрия. В седалищном нерве выявлены дистрофические изменения нервных волокон, нейтрофильная инфильтрация. В двуглавой мышце бедра определены перимускулярный отек, апоптоз, некроз и полихроматизация с исчезновением поперечной исчерченности мускулатуры, формирование сократительных контрактур, появление скоплений воспалительных клеток. Среди воспалительных клеток преобладали нейтрофилы и макрофаги, умеренное количество лимфоцитов. Через 14 суток признаки повреждения и воспалительной инфильтрации уменьшились, но продолжали сохраняться. Исследование показало наличие нейротоксичности и миотоксичности всех четырех концентраций бупивакаина по сравнению с действием 0,9% раствором хлорида натрия. Выявлено сохранение признаков повреждения и воспалительной инфильтрации через 14 суток после введения бупивакаина.
<b>ВЫВОДЫ</b>	Показатели повреждения и воспалительной инфильтрации в двуглавой мышце и седалищном нерве через 1 час после введения 0,2, 0,5, 0,75 и 1% растворов бупивакаина больше в сравнении с действием 0,9% раствора хлорида натрия. На 14-е сутки после введения бупивакаина полного восстановления мышечной ткани и периферического нерва не происходило.
<b>Ключевые слова:</b>	крысы-альбиносы, бупивакаин, местный анестетик, миотоксичность, нейротоксичность, скелетные мышцы, седалищный нерв
<b>Ссылка для цитирования</b>	Лахин Р.Е., Гемуа И.А., Шустров В.В. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование миотоксичности и нейротоксичности бупивакаина в эксперименте у крыс. <i>Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь</i> . 2019;8(3):288–294. <a href="https://doi.org/10.23934/2223-9022-2019-8-3-288-294">https://doi.org/10.23934/2223-9022-2019-8-3-288-294</a>
<b>Конфликт интересов</b>	Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
<b>Благодарности</b>	Исследование не имеет спонсорской поддержки

### ВВЕДЕНИЕ

Проблему локальной токсичности местных анестетиков изучают многие годы. Поскольку местные анестетики не являются высокоселективными блокаторами потенциалзависимых натриевых каналов, они также могут блокировать кальциевые [1] и калиевые каналы [2]. Кроме того, местные анестетики влияют на различные сигнальные пути внутри клетки, активируя митохондриальный и ядерный пути апоптоза клетки [3, 4]. Все это приводит к нарушению жизнедеятельности клетки, способствуя развитию повреждения ткани.

Так как целевой структурой регионарной анестезии является периферический нерв, то наиболее ярким проявлением локальной токсичности является повреждение нерва с развитием неврологического дефицита [3, 5]. Нейротоксичность была выявлена для различных местных анестетиков [4, 6, 7]. Периферические нервы проходят в мышечных тканях и межмышечных пространствах, введение местного анестетика может вести к миотоксичности [7, 8]. Повреждение мышечных клеток кроме вышеописанных процессов связа-

но с кальций-зависимым ингибированием контрактильности и модуляцией рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума мышечных клеток [9]. В клинической практике было показано, что повреждение мышечной ткани может приводить к развитию миопатий [10]. Однако однозначного мнения о миотоксичности местных анестетиков в настоящее время нет. Имеются работы, которые демонстрируют незначимость в клинической практике миотоксичности местных анестетиков [11], но и есть клинические свидетельства о серьезном ухудшении качества жизни пациентов [12, 13].

Несмотря на интерес исследователей к проблеме локальной токсичности местных анестетиков, механизмы развития повреждения до конца пока еще не ясны. Нет ответа и на вопрос о восстановлении поврежденных местными анестетиками клеток.

**Цель исследования:** изучить повреждающее действие бупивакаина на седалищный нерв и двуглавую мышцу бедра крысы.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное экспериментальное исследование было одобрено независимым Этическим комитетом на базе Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 203 от 20.03.2018 г.). Работа выполнена с соблюдением правил использования и содержания лабораторных животных согласно приказу № 755 МЗ СССР от 12.07.1977 г. и рекомендаций Хельсинкской декларации. Проведена серия экспериментов на 25 беспородных половозрелых альбиносах крысах-самках массой 160–200 г.

#### РАНДОМИЗАЦИЯ И ОСЛЕПЛЕНИЕ

Простая табличная рандомизация лабораторных животных на девять групп генерацией случайных чисел выполнена с помощью ресурса *Research Randomizer* (<https://www.randomizer.org>). Ослепления крыс в исследовании достигали привлечением внешнего специалиста, который с соблюдением правил асептики и антисептики согласно таблице случайных чисел готовил и кодировал шприцы с анестетиками для введения лабораторным животным. После приготовления препаратов таблица распределения была запечатана в конверт. Исследователь вводил неизвестный для него кодированный препарат, осуществлял выведение животных из эксперимента и проводил забор материала. Кодированный материал передавали в лабораторию, где врач-патоморфолог выполнял гистологическое исследование. Врач-патоморфолог не имел информации о препаратах, вводимых лабораторным животным. После получения всех результатов конверт с таблицей распределения лабораторных животных на группы был вскрыт и проведено раскрытие полученной информации.

В роли плацебо использован 0,9% раствор хлорида натрия. Распределение по группам в зависимости от вводимого препарата представлено в табл. 1.

Всем лабораторным животным выполняли блокаду седалищного нерва — параневрально вводили 0,2 мл препарата. Точность подведения контролировали с помощью ультразвуковой навигации аппаратом *Sono Site Edge* линейным датчиком *L25X* с частотностью 6–13 МГц. После параневрального введения, также под контролем ультразвука, вводили 0,2 мл препарата в двуглавую мышцу бедра.

Таблица 1

#### Распределение экспериментальных животных по группам

Table 1

#### The distribution of experimental animals in groups

№ группы	n	Концентрация, %	Наименование препарата
1-я (плацебо) контрольная	10	0,9	натрия хлорид
2-я	10	0,2	бупивакаин
3-я	10	0,5	бупивакаин
4-я	10	0,75	бупивакаин
5-я	10	1	бупивакаин

Для оценки воздействия бупивакаина на скелетную мускулатуру и периферический нерв по 5 животных каждой группы выводили из эксперимента через 1 час после введения препарата, а для оценки восстановления ткани — через 14 суток. Для выведения использовали передозировку тиопенталом натрия. После выведения производили забор участка седалищного нерва и двуглавой мышцы бедра, который фиксировали в 10% растворе формалина в течение 48 ч. Далее участки нерва и мышцы обезвоживали и заливали в парафиновые блоки. Тканевые срезы толщиной 5–6 мкм помещали на предметные стекла. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а затем исследовали под световым микроскопом. Оценка повреждения ткани была проведена отдельно для седалищного нерва и мышечной ткани в соответствии с модифицированными критериями *P. Benoit et al.* (1980) от 0 до 3 баллов [14] врачом-патоморфологом, не имеющим информации о препаратах и группах исследования. Воспалительные изменения ранжировали следующим образом: 0 баллов — признаков воспаления нет, 1 балл — единичные воспалительные клетки, 2 балла — воспалительные клетки немногочисленны, расположены преимущественно вокруг сосудов, 3 балла — воспалительные клетки заполняют все интерстициальное пространство, пропитывают мышечную ткань, окружают сосуды и нервы. Повреждение клеток ранжировали следующим образом: 0 баллов — отсутствие повреждения, 1 балл — единичные клетки или волокна с признаками некроза или апоптоза, 2 балла — множественные клетки с признаками клеточного повреждения по типу некроза или апоптоза, 3 — препарат демонстрирует разрушение больших объемов волокон с вовлечением оболочек, фасций и других структур.

#### СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью компьютерной программы *IBM SPSS Statistics 25.0*. Данные степени повреждения представлены в виде медианы (Me) (квартиль 1(Q1); квартиль 3(Q3)). Парное сравнение данных представлено с помощью непараметрических методов для несвязанных выборок (*Mann-Whitney*). Различия статистически учитывались как значимые при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инъекция физиологического раствора лабораторным животным контрольной группы вызывала расширение межклеточных пространств и соединительнотканых перегородок. Признаков некроза клеток

Таблица 2

**Изменения в мышечной ткани и седалищном нерве через 1 час после введения бупивакаина и хлорида натрия**

Table 2

**Changes in muscle tissue and sciatic nerve 1 hour after the administration of bupivacaine and sodium chloride**

№ п/п	Группы	Двуглавая мышца бедра		Седалищный нерв	
		Воспаление	Повреждение	Воспаление	Повреждение
1.	Хлорид натрия 0,9% (n=5)	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;0,5)	0 (0;0)
2.	Бупивакаин 0,2% (n=5)	1 (1;2)	1 (1;2)	1 (1;1,5)	1 (1;1,5)
3.	Бупивакаин 0,5% (n=5)	2 (1;2)	2(1;2)	1 (1;2)	2 (1;2)
4.	Бупивакаин 0,75% (n=5)	2 (2;2,5)	2 (2;2)	2 (1,5;2)	2 (1,5;2)
5.	Бупивакаин 1,0% (n=5)	2 (2;3)	2 (2;2,5)	2 (2;2)	2 (2;2)

или апоптоза обнаружено не было. У двух лабораторных животных в этой группе в зоне введения 0,9% раствора хлорида натрия были обнаружены единичные клетки макрофагального типа и нейтрофилы.

Введение местных анестетиков уже через 1 час вызывало воспалительную инфильтрацию и повреждение мышечной и нервной ткани (табл. 2). Низкие концентрации бупивакаина (0,2, 0,5%), воздействуя на двуглавую мышцу и периферический нерв, вызывали небольшую воспалительную инфильтрацию и слабые признаки повреждения. Высокие концентрации (0,75, 1,0%) — более выраженные признаки воспаления и повреждения.

В мышечной ткани выявляли повреждение в виде дистрофических изменений мышечных волокон в виде полихромазии, неравномерный перимускулярный отек, исчезновение поперечной исчерченности мускулатуры, апоптоз и формирование сократительных контрактур (рис. 1).

В ткани периферического нерва изменения были менее выражены. В седалищном нерве после параневрального введения бупивакаина выявляли неравномерный отек структур нерва, дистрофические изменения нервных волокон и клетки с признаками повреждения по типу некроза и/или апоптоза (рис. 2).

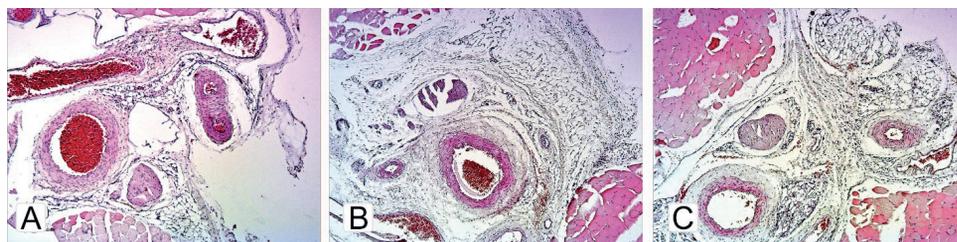


Рис. 3. Инфильтрация ткани воспалительными клетками через 1 час после введения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400): А — единичные клетки в пределах интерстиция вокруг сосудов, отдельные вокруг нерва, в мышцах; преобладают нейтрофилы, присутствуют макрофаги, единичные лимфоциты; В — воспалительные клетки в умеренном количестве в интерстиции вокруг сосудов, в мышцах, в нервах; в основном клетки макрофагального типа, имеется небольшое количество нейтрофилов и лимфоцитов; С — воспалительные клетки заполняют все интерстициальное пространство, пропитывают мышечную ткань, окружают сосуды и нервы; преобладающий тип клеток: нейтрофилы, макрофаги, встречаются единичные лимфоциты

Fig. 3. Tissues infiltrated with inflammatory cells 1 hour after administration. A — occasional cells within the interstitium around the vessels, around the nerve, in the muscles; neutrophils prevail, macrophages and occasional lymphocytes are present. B — moderate quantity of inflammatory cells in the interstitium around the vessels, in the muscles, in the nerves; basically, cells of macrophage type and a small amount of neutrophils and white blood cells are found. C — inflammatory cells fill the entire interstitial space, impregnate muscle tissue, surround vessels and nerves; prevailing cells: neutrophils, macrophages, occasional lymphocytes (stained with hematoxylin and eosin, magnification x200)

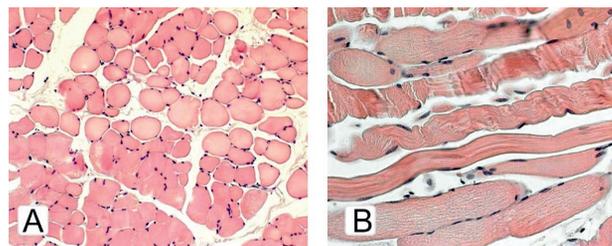


Рис. 1. Признаки повреждения мышечных волокон через 1 час после введения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400): А — перимускулярный отек, группы мышечных волокон с дистрофическими изменениями, явлениями полихромазии и апоптозом клеток; В — перимускулярный отек, мышечные волокна с формированием сократительных контрактур, явлениями полихромазии и снижением поперечной исчерченности Fig. 1. Signs of damage to muscle fibers 1 hour after administration. A — perimuscular edema, groups of muscle fibers with dystrophic changes, polychromasia, apoptosis of cells. B — perimuscular edema, muscular fibers with contractile contractures, polychromasia, and less-pronounced cross-striation (stained with hematoxylin and eosin, magnification x400)

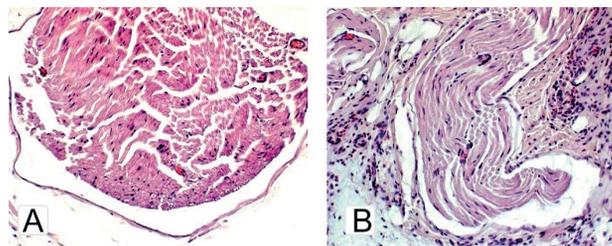


Рис. 2. Признаки повреждения нервных стволов через 1 час после введения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400): А — отек структур нерва и выраженные дистрофические изменения нервных волокон с отдельными клетками, имеющими признаки апоптоза; В — неравномерный отек структур нерва, дистрофические изменения нервных волокон с отдельными клетками, имеющими признаки апоптоза и некроза Fig. 2. Signs of damage to the nerve 1 hour after administration. A — edema of neural structures and pronounced dystrophic changes in nerve fibers with occasional cells with signs of apoptosis. B — irregular edema of neural structures, dystrophic changes in nerve fibers with occasional cells with signs of apoptosis and necrosis (stained with hematoxylin and eosin, magnification x400)

Кроме признаков повреждения была выявлена инфильтрация ткани воспалительными клетками (рис. 3). Если инфильтрация была слабой (1 балл), то единичные воспалительные клетки находились в пределах интерстиция вокруг сосудов, отдельные клетки встречались вокруг нервов и в мышечной ткани. Среди воспалительных клеток преобладали нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты были единичны. При умеренной воспалительной инфильтрации (2 балла) скопления клеток были расположены в основном в интерстиции вокруг сосудов, отдельные клетки выявляли вокруг нервов и в мышечной ткани. Среди воспалительных клеток преобладали нейтрофилы и макрофаги, небольшое количество лимфоцитов. При выраженной инфильтрации (3 балла) воспалительные клетки заполняли все интерстициальное пространство, пропитывали мышечную ткань, окружали сосуды и нервы, выявлялись внутри стенок сосудов, нервов. Среди воспалительных клеток преобладали нейтрофилы и макрофаги, имелось умеренное количество лимфоцитов.

Показатели повреждения в двуглавой мышце бедра и седалищном нерве в группах с введением бупивакаина статистически значимо отличались от таковых при введении плацебо (табл. 3). Кроме маркеров апоптоза и некроза мышечных клеток и стволов периферического нерва в местах инъекции местных анестетиков выявлены статистические различия и в выраженности воспалительной инфильтрации по сравнению с картиной после введения 0,9% раствора хлорида натрия (см. табл. 3). Поскольку проводилась статистическая обработка категориальных данных, то попарные сравнения групп представлены с помощью непараметрических методов для несвязанных выборок (Mann-Whitney).

Через 2 недели признаки повреждения и воспалительной инфильтрации уменьшились, но продолжали сохраняться (табл. 4). В местах введения бупивакаина в мышечной ткани выявляли неравномерный перимускулярный отек, группы мышечных волокон с дистрофическими изменениями в виде полихромазии, в седалищном нерве также продолжали оставаться неравномерный отек структур нерва и дистрофические изменения (рис. 4).

Несмотря на то, что исследование внутри группы после введения препарата проводили на разных этапах, материал забирали у разных экспериментальных животных, поэтому статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрических методов для несвязанных выборок (Mann-Whitney). Попарное сравнение изменений в мышечной ткани через 1 ч и через 14 суток после введения показало статистически значимые различия по признакам воспаления в мышце при введении 0,75 и 1% растворов бупивакаина, а по признаку повреждения в мышечной ткани — только в отношении 0,5% раствора бупивакаина (табл. 5). Изменения в седалищном нерве по признаку воспаления статистически различались при введении 0,5 и 1% растворов бупивакаина, по признаку повреждения — только при введении 1% раствора бупивакаина. Отсутствие статистически значимых различий свидетельствует о том, что значимого снижения воспалительной инфильтрации или повреждения не было. Те концентрации, при которых выявлено значимое уменьшение воспаления и повреждения, не приводили к полному исчезновению этих признаков. Воспаление и повреждение сохранялись после введения всех исследуемых концентраций бупивакаина.

Таблица 3

**Статистические показатели попарного сравнения показателей повреждения и воспаления через 1 час после введения бупивакаина и плацебо (критерий Mann-Whitney)**

Table 3

**Statistical indicators of pairwise comparison of indicators of damage and inflammation 1 hour after the administration of bupivacaine and placebo (Mann-Whitney test)**

Группы сравнения №	Двуглавая мышца бедра		Седалищный нерв		Показатели
	Воспаление	Повреждение	Воспаление	Повреждение	
1-я и 2-я	3,00	0,00	2,00	0,00	<i>U</i>
	-2,15	-2,425	-2,425	-2,887	<i>Z</i>
	<b>0,031</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,004</b>	<i>p</i>
1-я и 3-я	2,00	0,00	1,00	0,00	<i>U</i>
	-2,324	-2,545	-2,537	-2,835	<i>Z</i>
	<b>0,020</b>	<b>0,011</b>	<b>0,010</b>	<b>0,005</b>	<i>p</i>
1-я и 4-я	0,00	0,50	0,50	0,00	<i>U</i>
	-2,739	-2,683	-2,683	-2,887	<i>Z</i>
	<b>0,006</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>	<i>p</i>
1-я и 5-я	0,00	0,00	0,00	0,00	<i>U</i>
	-2,694	-2,887	-2,886	-3,000	<i>Z</i>
	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>	<i>p</i>

Таблица 4

**Изменения в мышечной ткани и седалищном нерве через 14 суток после введения бупивакаина и хлорида натрия**

Table 4

**Changes in muscle tissue and sciatic nerve 14 days after the administration of bupivacaine and sodium chloride**

Группы	Двуглавая мышца бедра		Седалищный нерв	
	Воспаление	Повреждение	Воспаление	Повреждение
Хлорид натрия 0,9% (n=5)	0 (0;0,5)	0 (0;0)	0 (0;0,5)	0 (0;0)
Бупивакаин 0,2% (n=5)	1 (1;1,5)	1 (0,5;1)	1 (0;1)	1 (1;1,5)
Бупивакаин 0,5% (n=5)	1 (1;1,5)	1 (1;1)	1 (0,5;1)	1 (1;2)
Бупивакаин 0,75% (n=5)	1 (2;2)	2 (1;2)	1 (1;1,5)	1 (1;2)
Бупивакаин 1,0% (n=5)	1 (1;2)	2 (1;2)	1 (1;1,5)	1 (1;2)

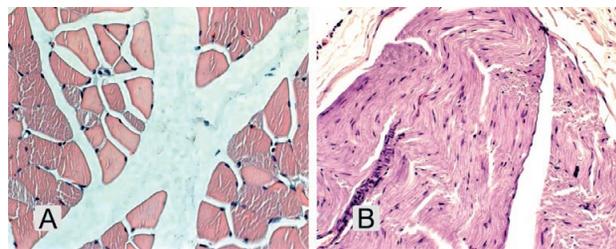


Рис. 4. Изменения в двуглавой мышце бедра и седалищном нерве через 14 суток после введения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400): А — неравномерный перимускулярный отек, группы мышечных волокон с дистрофическими изменениями в виде полихромазии; В — неравномерный отек структур нерва и слабо выраженные дистрофические изменения  
Fig. 4. Changes in biceps femoris and sciatic nerve 14 days after administration. A — irregular perimysial edema, muscle fiber groups with dystrophic changes in the form of polychromasia; B — irregular edema of neural structures and mild dystrophic changes

Таблица 5

**Статистические показатели попарного сравнения признаков воспаления и повреждения бупивакаина и плацебо через 1 час и 14 суток после введения (критерий Mann–Whitney)**

Table 5

**Statistical indices of pairwise comparison of signs of bupivacaine and placebo inflammation and damage 1 hour after administration, and 14 days after the administration (Mann–Whitney test)**

Группы сравнения	Двуглавая мышца бедра		Седалищный нерв		Показатели
	Воспаление	Повреждение	Воспаление	Повреждение	
Бупивакаин 0,2% (n=10)	7,000	6,000	6,000	12,500	U
	-1,247	-1,678	-1,678	0,000	Z
	0,212	0,093	0,093	1,000	p
Бупивакаин 0,5% (n=10)	7,500	5,000	4,000	10,000	U
	-1,225	-1,964	-2,032	-0,600	Z
	0,221	<b>0,050</b>	<b>0,042</b>	0,549	p
Бупивакаин 0,75% (n=10)	4,000	7,500	5,000	7,500	U
	-2,032	-1,500	-1,800	-1,225	Z
	<b>0,042</b>	0,134	0,072	0,221	p
Бупивакаин 1,0% (n=10)	3,000	6,000	2,500	5,000	U
	-2,154	-1,678	-2,449	-1,964	Z
	<b>0,031</b>	0,093	<b>0,014</b>	<b>0,050</b>	p

## ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании выполнено сравнение миотоксического и нейротоксического действия бупивакаина с 0,9% раствором натрия хлорида. Токсическое действие местных анестетиков на мышечную и невральную ткань было выявлено в различных исследованиях при изучении культивированных [4, 15], изолированных тканей [16] и в тканях лабораторных животных [17]. Однако выраженность воздействия бупивакаина на мышечные и нервные волокна оценивается неоднозначно.

В нашем исследовании было выявлено наличие миотоксического эффекта всех концентраций бупивакаина по сравнению с результатом введения 0,9% раствора хлорида натрия. Сходные данные о миотоксичности бупивакаина получали Yildiz et al. (2011) [18], Oz Gergin et al. (2019), W. Zink et al. (2003), исследуя действие его 0,5% раствора [17]. Как правило, в исследовании изучали только 0,5% раствор бупивакаина. В проведенном нами исследовании в сравнительном аспекте выявлено повреждающее действие на мышечную ткань четырех концентраций бупивакаина. В большинстве исследований воспалительные клетки или маркеры определяют вместе с признаками некроза и апоптоза, объединяя их единым понятием повреждения [15, 17, 18]. В нашем исследовании признаки воспалительной реакции в местах введения анестетика оценивали отдельно от признаков повреждения. Были также выявлены статистические различия в инфильтрации воспалительными клетками мышечной ткани при введении всех концентраций бупивакаина по сравнению с данными, касающимися введения 0,9% раствора хлорида натрия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Putrenko I, Ghavanini AA, Meyer Schöniger KS, Schwarz SK. Central Nervous System-Toxic Lidocaine Concentrations Unmask L-Type Ca<sup>2+</sup> Current-Mediated Action Potentials in Rat Thalamocortical Neurons: An In Vitro Mechanism of Action Study. *Anesth Analg.* 2016;122(5):1360–1369. PMID: 26771269 <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001158>

Кроме миотоксического действия было выявлено наличие нейротоксического эффекта всех концентраций бупивакаина по сравнению с действием 0,9% раствора хлорида натрия. Как и в большинстве исследований, мы выявили признаки отека седалищного нерва, апоптоза и некроза [3, 7]. Учитывая повреждающее действие на нейроны, считается, что нейротоксичность местных анестетиков может стать причиной послеоперационных неврологических осложнений [3, 19]. В литературе нейротоксичность бупивакаина исследована довольно широко [6, 3, 16]. В нашем исследовании были выявлены признаки аксональной дегенерации отдельных волокон, которые появились после введения бупивакаина. Нейротоксичность бупивакаина по данным C.M.S. Cereda et al. (2012) также проявлялась в виде разрушения шванновских клеток и повреждения самих нейронов [7].

В нашем исследовании к 14-м суткам полного восстановления мышечной ткани и периферического нерва не происходило, хотя K. Yildiz et al. (2011) определяли полное восстановление мышечной ткани к 3-й неделе от введения бупивакаина.

Преимуществом проводимого исследования стало изучение миотоксичности и нейротоксичности различных концентраций бупивакаина и оценка восстановления ткани через 14 суток после введения. Ограничением исследования явился категориальный перевод гистологических изменений в тканях с их ранжированием от 0 до 3 баллов, зависящий от субъективной оценки патоморфолога.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало наличие нейротоксичности и миотоксичности всех четырех концентраций бупивакаина по сравнению с 0,9% раствором хлорида натрия. В седалищном нерве выявлены дистрофические изменения нервных волокон, нейтрофильная инфильтрация. В двуглавой мышце бедра определены перимускулярный отек, апоптоз, некроз и полихроматизация с исчезновением поперечной исчерченности мускулатуры, появление скоплений воспалительных клеток. Выявлено сохранение признаков повреждения и воспалительной инфильтрации через 14 суток после введения бупивакаина.

## ВЫВОДЫ

1. Согласно изученным показателям повреждение и воспалительная инфильтрация в двуглавой мышце бедра через 1 час после введения 0,2, 0,5, 0,75 и 1% растворов бупивакаина выражены в большей степени по сравнению с результатами введения 0,9% раствора хлорида натрия.

2. Повреждение и воспалительная инфильтрация в седалищном нерве через 1 час после введения 0,2, 0,5, 0,75 и 1% растворов бупивакаина выражены в большей степени по сравнению с результатами введения 0,9% раствора хлорида натрия.

3. На 14-е сутки после введения бупивакаина полного восстановления мышечной ткани и периферического нерва не происходило.

2. Nakahira K, Oshita K, Itoh M, Takano M, Sakaguchi Y, Ishihara K. Clinical Concentrations of Local Anesthetics Bupivacaine and Lidocaine Differentially Inhibit Human Kir2.x Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels. *Anesth Analg.* 2016;122(4):1038–1047. PMID: 26756912 <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001137>

3. Verlinde M, Hollmann MW, Stevens MF, Hermanns H, Werdehausen R, Lirk P. Local Anesthetic-Induced Neurotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):339. PMID: 26959012 <https://doi.org/10.3390/ijms17030339>
4. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Frauscher S, Kirchmair L, Gerner P, et al. In vitro, lidocaine-induced axonal injury is prevented by peripheral inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not by inhibiting caspase activity. *Anesth Analg*. 2007;105(6):1657–1664. PMID: 18042864 <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000286171.78182.e2>
5. Neal JM, Barrington MJ, Brull R, Hadzic A, Hebl JR, Horlocker TT, et al. The Second ASRA Practice Advisory on Neurologic Complications Associated With Regional Anesthesia and Pain Medicine: Executive Summary 2015. *Reg Anesth Pain Med*. 2015;40(5):401–430. PMID: 26288034 <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000286>
6. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, et al. In Vitro, Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Protects Against Bupivacaine- and Ropivacaine-Induced Neurotoxicity. *Anesth Analg*. 2008;106(5):1456–1464. PMID: 18420860 <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318168514b>
7. Cereda CMS, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, et al. Local Neurotoxicity and Myotoxicity Evaluation of Cyclodextrin Complexes of Bupivacaine and Ropivacaine. *Anesth Analg*. 2012;115(5):1234–1241. PMID: 22822189 <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318266f3d9>
8. Hussain N, McCartney CJL, Neal JM, Chippor J, Banfield L, Abdallah FW. Local anaesthetic-induced myotoxicity in regional anaesthesia: a systematic review and empirical analysis. *Br J Anaesth*. 2018;121(4):822–841. PMID: 30236244 <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.05.076>
9. El-Boghdadly K, Pawa A, Chin KJ. Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. *Local Reg Anesth*. 2018;11:35–44. PMID: 30122981 <https://doi.org/10.2147/LRA.S154512>
10. Neal JM, Salinas FV, Choi DS. Local Anesthetic-Induced Myotoxicity After Continuous Adductor Canal Block. *Reg Anesth Pain Med*. 2016;41(6):723–727. PMID: 27662067 <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000466>
11. Rhee SM, Chung NY, Jeong HJ, Oh JH. Subacromial Local Anesthetics Do Not Interfere With Rotator Cuff Healing After Arthroscopic Repair. *Am J Sports Med*. 2018;46(5):1097–1105. PMID: 29470095 <https://doi.org/10.1177/0363546517753827>
12. Smolka W, Knoesel T, Mueller-Lisse U. Local anesthetic-induced myotoxicity as a cause of severe trismus after inferior alveolar nerve block. *Quintessence Int*. 2018;49(5):391–396. PMID: 29532814 <https://doi.org/10.3290/j.qi.a40051>
13. Blum RA, Lim LT, Weir CR. Diplopia following sub-tenon's anaesthesia: an unusual complication. *Int Ophthalmol*. 2012;32(2):191–193. PMID: 22350117 <https://doi.org/10.1007/s10792-012-9535-3>
14. Benoit PW, Yagiela A, Fort NF. Pharmacologic correlation between local anesthetic-induced myotoxicity and disturbances of intracellular calcium distribution. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980;52(2):187–198. PMID: 7361318 [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(80\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0041-008x(80)90105-2)
15. Kim HJ, Sung SR, Seo KS, Lim SW, Yoon TG. Bupivacaine-induced Apoptosis in the Primary Cultured Cardiomyocytes via p38 MAPKs. *Korean J Anesthesiol*. 2006;50(6):S48–S56. <https://doi.org/10.4097/kjae.2006.50.6.S48>
16. Barsa J, Batra M, Fink BR, Sumi SM. A comparative in vivo study of local neurotoxicity of lidocaine, bupivacaine, 2-chloroprocaine, and a mixture of 2-chloroprocaine and bupivacaine. *Anesth Analg*. 1982;61(12):961–967. PMID: 7149299
17. Oz Gergin O, Bayram A, Gergin IS, Aksu R, Yay A, Balcioglu E, et al. Comparison of myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine: apoptotic activity and acute effect on pro-inflammatory cytokines. *Biotech Histochem*. 2019;94(4):252–260. PMID: 30712387 <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1548711>
18. Yildiz K, Efesoyn SN, Ozdamar S, Yay A, Bicer C, Aksu R, et al. Myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine in a rat model. *Clin Investig Med*. 2011;34(5):E273 PMID: 21968269
19. Sondekoppam RV, Tsui BC. Factors Associated With Risk of Neurologic Complications After Peripheral Nerve Blocks: A Systematic Review. *Anesth Analg*. 2017;124(2):645–660. PMID: 280067709 <https://doi.org/10.1213/ANE.000000000001804>

## REFERENCES

1. Putrenko I, Ghavanini AA, Meyer Schöniger KS, Schwarz SK. Central Nervous System-Toxic Lidocaine Concentrations Unmask L-Type Ca<sup>2+</sup> Current-Mediated Action Potentials in Rat Thalamocortical Neurons: An In Vitro Mechanism of Action Study. *Anesth Analg*. 2016;122(5):1360–1369. PMID: 26771269 <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001158>
2. Nakahira K, Oshita K, Itoh M, Takano M, Sakaguchi Y, Ishihara K. Clinical Concentrations of Local Anesthetics Bupivacaine and Lidocaine Differentially Inhibit Human Kir2.x Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channels. *Anesth Analg*. 2016;122(4):1038–1047. PMID: 26756912 <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001137>
3. Verlinde M, Hollmann MW, Stevens MF, Hermanns H, Werdehausen R, Lirk P. Local Anesthetic-Induced Neurotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):339. PMID: 26959012 <https://doi.org/10.3390/ijms17030339>
4. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Frauscher S, Kirchmair L, Gerner P, et al. In vitro, lidocaine-induced axonal injury is prevented by peripheral inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not by inhibiting caspase activity. *Anesth Analg*. 2007;105(6):1657–1664. PMID: 18042864 <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000286171.78182.e2>
5. Neal JM, Barrington MJ, Brull R, Hadzic A, Hebl JR, Horlocker TT, et al. The Second ASRA Practice Advisory on Neurologic Complications Associated With Regional Anesthesia and Pain Medicine: Executive Summary 2015. *Reg Anesth Pain Med*. 2015;40(5):401–430. PMID: 26288034 <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000286>
6. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, et al. In Vitro, Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Protects Against Bupivacaine- and Ropivacaine-Induced Neurotoxicity. *Anesth Analg*. 2008;106(5):1456–1464. PMID: 18420860 <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318168514b>
7. Cereda CMS, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, et al. Local Neurotoxicity and Myotoxicity Evaluation of Cyclodextrin Complexes of Bupivacaine and Ropivacaine. *Anesth Analg*. 2012;115(5):1234–1241. PMID: 22822189 <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318266f3d9>
8. Hussain N, McCartney CJL, Neal JM, Chippor J, Banfield L, Abdallah FW. Local anaesthetic-induced myotoxicity in regional anaesthesia: a systematic review and empirical analysis. *Br J Anaesth*. 2018;121(4):822–841. PMID: 30236244 <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.05.076>
9. El-Boghdadly K, Pawa A, Chin KJ. Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. *Local Reg Anesth*. 2018;11:35–44. PMID: 30122981 <https://doi.org/10.2147/LRA.S154512>
10. Neal JM, Salinas FV, Choi DS. Local Anesthetic-Induced Myotoxicity After Continuous Adductor Canal Block. *Reg Anesth Pain Med*. 2016;41(6):723–727. PMID: 27662067 <https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000466>
11. Rhee SM, Chung NY, Jeong HJ, Oh JH. Subacromial Local Anesthetics Do Not Interfere With Rotator Cuff Healing After Arthroscopic Repair. *Am J Sports Med*. 2018;46(5):1097–1105. PMID: 29470095 <https://doi.org/10.1177/0363546517753827>
12. Smolka W, Knoesel T, Mueller-Lisse U. Local anesthetic-induced myotoxicity as a cause of severe trismus after inferior alveolar nerve block. *Quintessence Int*. 2018;49(5):391–396. PMID: 29532814 <https://doi.org/10.3290/j.qi.a40051>
13. Blum RA, Lim LT, Weir CR. Diplopia following sub-tenon's anaesthesia: an unusual complication. *Int Ophthalmol*. 2012;32(2):191–193. PMID: 22350117 <https://doi.org/10.1007/s10792-012-9535-3>
14. Benoit PW, Yagiela A, Fort NF. Pharmacologic correlation between local anesthetic-induced myotoxicity and disturbances of intracellular calcium distribution. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980;52(2):187–198. PMID: 7361318 [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(80\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0041-008x(80)90105-2)
15. Kim HJ, Sung SR, Seo KS, Lim SW, Yoon TG. Bupivacaine-induced Apoptosis in the Primary Cultured Cardiomyocytes via p38 MAPKs. *Korean J Anesthesiol*. 2006;50(6):S48–S56. <https://doi.org/10.4097/kjae.2006.50.6.S48>
16. Barsa J, Batra M, Fink BR, Sumi SM. A comparative in vivo study of local neurotoxicity of lidocaine, bupivacaine, 2-chloroprocaine, and a mixture of 2-chloroprocaine and bupivacaine. *Anesth Analg*. 1982;61(12):961–967. PMID: 7149299
17. Oz Gergin O, Bayram A, Gergin IS, Aksu R, Yay A, Balcioglu E, et al. Comparison of myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine: apoptotic activity and acute effect on pro-inflammatory cytokines. *Biotech Histochem*. 2019;94(4):252–260. PMID: 30712387 <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1548711>
18. Yildiz K, Efesoyn SN, Ozdamar S, Yay A, Bicer C, Aksu R, et al. Myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine in a rat model. *Clin Investig Med*. 2011;34(5):E273 PMID: 21968269
19. Sondekoppam RV, Tsui BC. Factors Associated With Risk of Neurologic Complications After Peripheral Nerve Blocks: A Systematic Review. *Anesth Analg*. 2017;124(2):645–660. PMID: 280067709 <https://doi.org/10.1213/ANE.000000000001804>

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

<b>Лакhin Роман Евгеньевич</b>	доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, <a href="https://orcid.org/0000-0001-6819-9691">https://orcid.org/0000-0001-6819-9691</a>
<b>Гемуа Инал Ардонбеевич</b>	адъюнкт кафедры анестезиологии и реаниматологии, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации
<b>Шустров Вячеслав Владимирович</b>	адъюнкт кафедры анестезиологии и реаниматологии, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, <a href="https://orcid.org/0000-0001-5144-3360">https://orcid.org/0000-0001-5144-3360</a>

Received on 03.05.2019

Accepted on 07.06.2019

Поступила в редакцию 03.05.2019

Принята к печати 07.06.2019

## Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Myotoxicity and Neurotoxicity of Bupivacaine in Rats

**R.E. Lakhin\*, I.A. Gemua, V.V. Shustrov**

Department of Anesthesiology and Intensive Care

Federal State Budgetary Military Educational Institution of Higher Education S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of Russian Federation

4 Klinicheskaya St., St. Petersburg 194044, Russian Federation

\* **Contacts:** Roman Y. Lakhin, Dr. Med. Sci., Docent, Professor of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Email: [doctor-lakhin@yandex.ru](mailto:doctor-lakhin@yandex.ru)

**ABSTRACT** When penetrating into the cell, local anesthetics affect some structures and processes, in addition to blocking sodium channels, leading to the development of cell damage. The aim of the article was to study the damaging effect of bupivacaine on the sciatic nerve and biceps femoris in rats.

The study is double-blind and placebo-controlled. We used 0.9% sodium chloride as the placebo. The studied concentrations of bupivacaine were 0.2%, 0.5%, 0.75%, and 1%. We performed perineural introduction of 0.2 ml into the sciatic nerve and administered 0.2 ml into the biceps femoris muscle under the ultrasound guidance. The samples were taken twice: 1 hour after administration, and over 14 days. Cell necrosis or apoptosis were not found in the muscle and nerve after the 0.9% sodium chloride administration; occasional inflammatory cells were detected. Introduction of all concentrations of bupivacaine induced damage and inflammatory infiltration of muscle tissue and neural structures compared with 0.9% sodium chloride solution. Dystrophic changes and neutrophilic infiltration were detected in nerve fibers. Perimuscular edema, apoptosis, polychromasia, necrosis, disappearance of cross-striation of muscles, clusters of inflammatory cells were found in the biceps femoris. Signs of damage and inflammatory infiltration decreased, but continued to persist over 14 days.

The study showed the presence of neurotoxicity and myotoxicity of all concentrations of bupivacaine compared to a 0.9% sodium chloride solution. It was revealed that signs of damage and inflammatory infiltration persisted 14 days after the administration of bupivacaine.

**Keywords:** albino rats, bupivacaine, local anesthetic, myotoxicity, neurotoxicity, skeletal muscle, sciatic nerve

**For citation** Lakhin RE, Gemua IA, Shustrov VV. Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Myotoxicity and Neurotoxicity of Bupivacaine in Rats. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*. 2019;8(3):288–294. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2019-8-3-288-294> (in Russ.)

**Conflict of interest** Authors declare lack of the conflicts of interests

**Acknowledgments** The study had no sponsorship

### Affiliations

Roman Y. Lakhin	Dr. Med. Sci., Docent, Professor of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, <a href="https://orcid.org/0000-0001-6819-9691">https://orcid.org/0000-0001-6819-9691</a>
Inal A. Gemua	Postgraduate of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation
Vyacheslav V. Shustrov	Postgraduate of the Department of Anesthesiology and Intensive Care, S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, <a href="https://orcid.org/0000-0001-5144-3360">https://orcid.org/0000-0001-5144-3360</a>