

ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА ВСАСЫВАНИЕ D-КСИЛОЗЫ В КИШЕЧНИКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

А.И. Маркина, И.И. Геращенко

*Институт химии поверхности им. А.А.Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

Изучено влияние ряда энтеросорбентов, среди которых наноразмерные диоксид кремния и оксид алюминия, энтеросгель, каолин, смектит, активированный уголь и микрокристаллическая целлюлоза, на скорость всасывания D-ксилозы из кишечника крыс и мышей (“ксилозный тест”). При этом не установлено статистически достоверных различий полученных показателей по сравнению с контрольным опытом (без введения животным сорбентов). Результаты физико-химического эксперимента показывают, что диффузия D-ксилозы через гидрогель, моделирующий муциновый слой кишечника, в присутствии некоторых энтеросорбентов существенно замедлена. Данный эффект связан со способностью наночастиц сорбентов взаимодействовать с гидрогелем с образованием структур, затрудняющих миграцию молекул D-ксилозы.

Введение

Метод энтеросорбции все шире используется в комплексном лечении различных заболеваний. Одновременно наблюдается увеличение количества исследований и, соответственно, публикаций в области создания сорбентов медицинского назначения. Одно из требований к энтеросорбентам заключается в минимизации механического, химического и иного взаимодействия со слизистой оболочкой кишечника, следствием которого может быть нарушение всасывающей функции. При приеме энтеросорбентов возможно изменение свойств и проницаемости мукополисахаридного барьера желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), что, в свою очередь, сказывается на всасывании лекарственных веществ, принятых одновременно с энтеросорбентом или сразу после него. Таким образом, важным вопросом, требующим серьезной проработки, является доказательство инертности энтеросорбента по отношению к структурам ЖКТ.

Целью работы явилось изучение влияния энтеросорбентов различной химической природы на процесс диффузии D-ксилозы через слизистую ЖКТ в эксперименте на животных и с помощью физико-химической модели. D-ксилоза является химически инертным углеводом и используется в разнообразных методиках исследования всасывающей способности ЖКТ (“ксилозный тест” [1]). Этот моносахарид абсорбируется путем пассивной диффузии и не метаболизируется в организме человека и животных [2], поэтому его выделение с мочой достаточно адекватно отражает степень всасывания в тонком кишечнике.

Экспериментальная часть

Объектами исследования послужили зарегистрированные в Украине энтеросорбенты и субстанции, представленные в табл. 1.

Эксперимент на животных состоял из трех серий опытов.

В первой серии исследование проведено на 25 белых нелинейных крысах-самцах средней массой 200 г, которых разделили на контрольную и опытные группы. Животным опытных групп однократно интрагастрально вводили взвесь сорбента в дозе 100 мг/кг, в контрольной группе вводили одинаковый объем воды. Спустя 1 ч всем животным однократно интрагастрально вводили 10% раствор D-ксилозы из расчета 100

мг/кг массы тела. Количество, дозы и пути введения веществ были выбраны согласно литературным источникам [1, 3]. Крыс фиксировали в клетках и в течение 4 ч собирали мочу, в которой определяли концентрацию D-ксилозы и креатинина, после чего рассчитывали индекс “ксилоза/креатинин”. (В норме креатинин свободно фильтруется в почечных клубочках и полностью выводится с мочой, являясь показателем деятельности почек [4]). D-ксилозу определяли орциновым методом после депротеинизации и разбавления образца [5], креатинин – по реакции с пикриновой кислотой в щелочной среде [4].

Таблица 1. Энтеросорбенты, использованные в работе.

Энтеросорбент	Состав основного компонента	Производитель, источник получения
Наноразмерный кремнезем (нано-SiO ₂)	SiO ₂	Опытный завод ИХП НАН Украины, г.Калуш
Оксид алюминия пирогенный	Al ₂ O ₃	Тот же
Энтеросгель	(CH ₃ SiO _{1,5} · nH ₂ O) _∞ , где n=30–46	“Креома-Фарм”, г. Киев
Каолин	Каолинит, Al ₄ [Si ₄ O ₁₀](OH) ₈	Фармакопейная субстанция
Смекта	Смектит, Al ₄ [Si ₈ O ₂₀](OH) ₄ · nH ₂ O	“Ipsen”, Франция
Уголь активированный	Аморфный углерод	Борщаговский ХФЗ, г. Киев
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	Полимер β-D-глюкозы (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	“Эвалар”, Россия

Вторая серия опытов была выполнена на 36 белых нелинейных крысах-самцах средней массой 250 г. Животным контрольной и опытных групп однократно интрагастрально вводили взвесь сорбента в дозе 200 мг/кг. Через 1 ч производили вторую затравку 2% раствором D-ксилозы в дозе 200 мг/кг. В части сбора мочи и определения концентраций ксилозы и креатинина вторая серия повторяла предыдущую.

В заключительной серии опыты проводили на 35 белых беспородных мышак-самцах массой 30–50 г. Животным интрагастрально вводили взвесь сорбента в дозе 100 мг/кг (в повторном исследовании – 200 мг/кг), суспендированного в 10% растворе D-ксилозы. Через 30 мин животных декапитировали и собирали цельную кровь. В сыворотке определяли концентрацию тест-вещества.

Физико-химический эксперимент проводили в диализной ячейке с полупроницаемой мембраной, имитирующей поверхность энтероцитов. Во внутреннее пространство ячейки помещали модельную среду (“муциновый слой”), во внешнее – 0,9 % раствор NaCl. Через 2; 4; 6; 8 и 24 ч в пробах диализата орциновым методом определяли концентрацию D-ксилозы. Модельной средой служил препарат “Стекловидное тело”, полученный из глаз крупного рогатого скота (ЧАО “Биофарма”, Украина). Основанием для выбора модельной среды было подобие состава и свойств муцинового слоя и гидрогеля стекловидного тела [6].

Результаты и обсуждение

Эксперимент на животных. Результаты первой серии опытов представлены в табл. 2. Главной выявленной особенностью оказалось достоверно сниженное содержание креатинина в моче у животных опытных групп (кроме группы, где вводили

смектит), что, по-видимому, связано с замедлением у них почечной фильтрации вследствие приема сорбентов. Кроме этого, во всех опытных группах наблюдается уменьшение выделения D-ксилозы, что, соответственно, может свидетельствовать о замедлении ее всасывания из ЖКТ. Однако, после пересчета на индекс “ксилоза/креатинин” статистически значимых различий между показателями контрольной и опытных групп выявить не удалось.

Таблица 2. Влияние энтеросорбентов на показатели уровня ксилозы и креатинина в моче крыс (серия № 1)

Вводимый сорбент	Количество животных	D-ксилоза, мг/мл	Креатинин, мг/мл	Ксилоза / креатинин
Контроль (без сорбента)	5	56,6 ± 8,6	0,26 ± 0,02	215 ± 21
Нано-SiO ₂	4	32,9 ± 2,9*	0,17 ± 0,01**	195 ± 14
Смектит	5	28,8 ± 8,5*	0,18 ± 0,05	171 ± 37
Уголь активированный	5	30,3 ± 4,2*	0,14 ± 0,02**	210 ± 38
МКЦ	5	30,9 ± 6,2*	0,17 ± 0,02*	170 ± 17

Различие достоверно по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; одно животное из группы “нано-SiO₂ + ксилоза” выбыло из эксперимента.

Для проверки полученных данных была проведена вторая серия опытов с удвоенной дозой сорбента и D-ксилозы, в результате которой у животных, получавших нано-SiO₂, МКЦ и смектит, обнаружена тенденция к увеличению экскреции D-ксилозы, не подтвержденная статистической обработкой (табл. 3). Таким образом, результаты второй серии не подтверждают данные, полученные в серии № 1 для этих сорбентов. Каолин и энтеросгель (в первой серии не изучались) достоверно задерживают выделение тест-вещества, что может свидетельствовать о замедлении его всасывания.

Таблица 3. Влияние энтеросорбентов на показатели уровня ксилозы и креатинина в моче крыс (серия № 2)

Вводимый сорбент	Количество животных	D-ксилоза, ммоль/мл	Креатинин, мг/мл	Ксилоза / креатинин
Контроль (без сорбента)	6	1,19 ± 0,24	0,041 ± 0,004	29,4 ± 6,0
Нано-SiO ₂	5	1,90 ± 0,32	0,042 ± 0,007	48,2 ± 9,0
Смектит	5	1,76 ± 0,36	0,047 ± 0,008	37,5 ± 2,2
Уголь активированный	5	1,30 ± 0,41	0,063 ± 0,008**	23,0 ± 7,8
МКЦ	5	1,09 ± 0,28	0,033 ± 0,005	36,4 ± 12,4
Каолин	5	0,43 ± 0,10**	0,034 ± 0,006	15,0 ± 4,6*
Энтеросгель	5	0,77 ± 0,08	0,049 ± 0,008	16,6 ± 1,6*

Различие достоверно по сравнению с контролем: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$.

Перед выполнением третьей серии предварительно исследовали кинетику поступления D-ксилозы в кровь мышей после однократного интрагастрального введения. Установлено, что пик концентрации ксилозы в сыворотке наблюдается через 30 мин после затравки (рис. 1), что и было выбрано как время отбора проб крови. После этого был проведен основной эксперимент, в результате которого установлено, что введение сорбентов одновременно с ксилозой практически не изменяет концентрацию данного маркера в крови подопытных животных (табл. 4 и 5). Тенденция к снижению скорости всасывания D-ксилозы установлена для каолина.

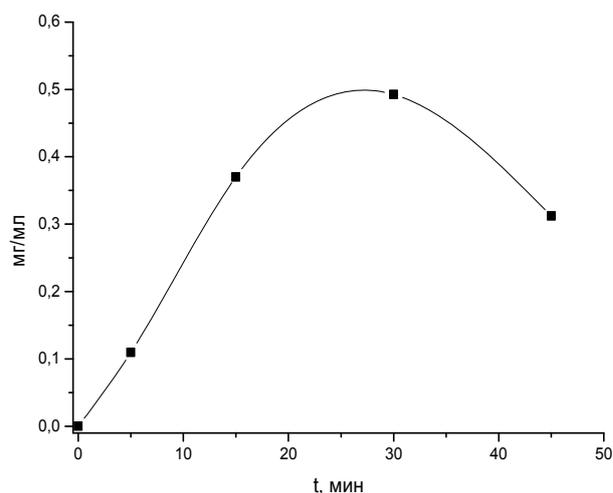


Рис. 1. Кинетика уровня D-ксилозы в сыворотке крови мышей (усредненные данные для двух животных)

Таблица 4. Влияние энтеросорбентов на уровень ксилозы в крови мышей (доза сорбента 100 мг/кг)

Вводимый сорбент	Количество животных	Ксилоза, мг/мл
Контроль (без сорбента)	5	0,53 ± 0,10
Нано-SiO ₂	5	0,54 ± 0,07
Al ₂ O ₃	6	0,51 ± 0,05

В табл. 4 и 5 различия между показателями недостоверны.

Таблица 5. Влияние энтеросорбентов на уровень ксилозы в крови мышей (доза сорбента 200 мг/кг)

Вводимый сорбент	Количество Животных	Ксилоза, мг/мл
Нано-SiO ₂	5	0,23 ± 0,01
Al ₂ O ₃	5	0,24 ± 0,04
Смектит	5	0,22 ± 0,04
Каолин	4	0,19 ± 0,01

Таким образом, совокупные результаты нескольких серий экспериментов *in vivo* не позволяют сделать однозначный вывод о характере влияния изученных сорбентов на скорость всасывания D-ксилозы из ЖКТ.

Физико-химическая модель. В экспериментах *in vitro* установлено (рис.2, а), что в воде, гидрогеле стекловидного тела и суспензии нанокремнезема, в каждой среде отдельно, D-ксилоза диффундирует с одинаковой скоростью. В среде, содержащей вместе стекловидное тело и нанокремнезем, диффузия тест-вещества существенно замедлена, что связано, по-видимому, со способностью наночастиц SiO₂ взаимодействовать с гидрогелем с образованием структур, затрудняющих миграцию молекул D-ксилозы. Действительно, нами ранее было показано, что и гиалуроновая кислота, и белок стекловидного тела взаимодействуют с нано-SiO₂ по механизму адсорбции, причем для белка величина адсорбции достигает 20 мг на 1 г нано-SiO₂ [7]. Аналогичный эффект замедления диффузии D-ксилозы установлен также для оксида алюминия (рис. 2, б) и каолина.

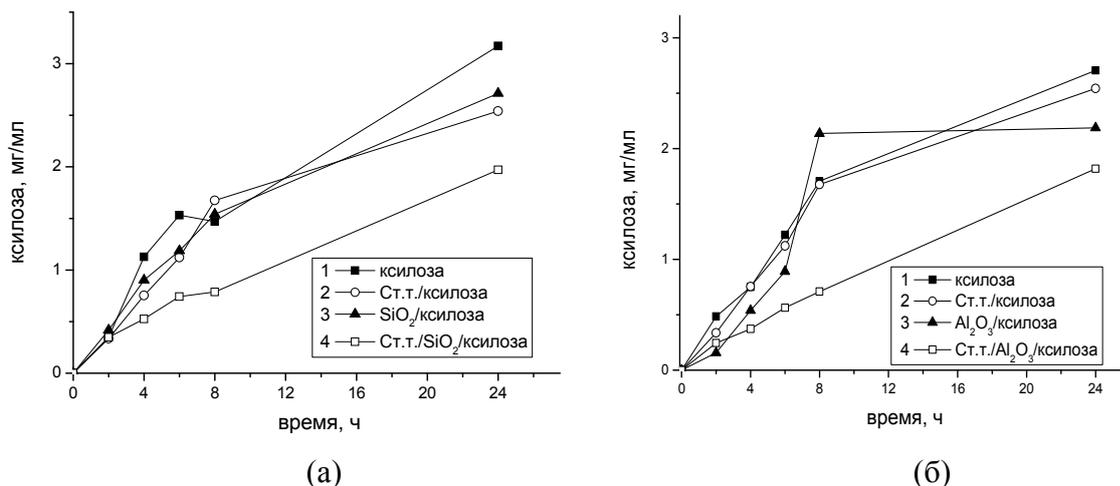


Рис. 2. Кинетика накопления D-ксилозы в диализате. Состав сред во внутренней камере ячейки, (а): 1 – раствор ксилитозы; 2 – стекловидное тело/ксилитоза; 3 – суспензия SiO₂/ ксилитоза; 4 – стекловидное тело/ суспензия SiO₂/ксилитоза; (б) : 1 – раствор ксилитозы; 2 – стекловидное тело/ксилитоза; 3 – суспензия Al₂O₃/ ксилитоза; 4 – стекловидное тело/ суспензия Al₂O₃/ксилитоза.

Обсуждение. Взаимодействие частиц энтеросорбентов со слизистой кишечника, представленной слоем энтероцитов, следует увязывать с их взаимодействием с поверхностью клеток вообще. Установленным фактом является мембранотропное свойство нано-SiO₂, подтвержденное в отношении плазматических мембран эритроцитов (гемолитическое действие), лимфоцитов (активация), поверхности микроорганизмов (агглютинирующее действие). В основе мембранотропности нано-SiO₂ лежит, очевидно, высокое сродство к белкам, входящим в состав плазматических мембран [8].

В случае энтероцитов частицы сорбентов, прежде чем достигнуть их поверхности, должны преодолеть муциновый слой – вязкоупругий гель, прочно удерживающий внутригелевую воду (в гастроэнтерологии такое свойство получило название “неперемешивающегося слоя”). Муциновый слой содержит гликозаминогликаны и протеоглики (около 3 %), свободные белки, нуклеиновые кислоты и липиды (0,5–2%), соли и другие диализуемые компоненты (1%) [9]. Нами ранее было показано, что нано-SiO₂ обладает сродством (хотя и меньшим, чем к белкам) к гиалуроновой кислоте – типичному представителю класса гликозаминогликанов [7].

Общая картина взаимодействия частиц энтеросорбентов, в частности нано-SiO₂, со слизистой кишечника может выглядеть следующим образом. Терапевтические количества нано-SiO₂ (в дозе не более 100 мг/кг) обладают обволакивающим действием: частицы сорбента накапливаются в муциновом слое, приводя к его определенной структурной перестройке, которая затрудняет диффузию веществ, что и было продемонстрировано нами с помощью физико-химической модели. При более высоких дозах (1 г/кг) нано-SiO₂ заполняет все активные центры муцинового барьера, проникая далее к мембранам энтероцитов, что сопровождается их разрушением (по типу гемолиза). В результате нарушения целостности эпителиального барьера возможно ускоренное всасывание лекарственных веществ, введенных вместе с нано-SiO₂, описанное некоторыми исследователями [10].

С тропностью нано-SiO₂ к эпителиальным клеткам кишечника можно связать следующие эффекты: 1) неповрежденная слизистая кишечника является

непреодолимым барьером для проникновения наночастиц сорбента во внутреннюю среду организма (важно для оценки токсичности нанокремнезема); 2) один из механизмов антидиарейного действия нанокремнезема заключается в блокировании рецепторов слизистой, ответственных за адгезию микроорганизмов и связывание токсинов.

Выводы

Обобщенные результаты нескольких экспериментов на животных не позволяют однозначно судить о характере влияния наноразмерных кремнезема и оксида алюминия, энтеросгеля, смектита, активированного угля и микрокристаллической целлюлозы на всасывание D-ксилозы из желудочно-кишечного тракта. Снижение скорости всасывания D-ксилозы установлено для каолина.

Результаты физико-химического эксперимента показывают, что диффузия D-ксилозы через гидрогель, моделирующий муциновый слой кишечника, в присутствии наноразмерных кремнезема, оксида алюминия и каолина достоверно замедлена. Это согласуется с устоявшимися представлениями об энтеросорбентах как препаратах, замедляющих всасывание одновременно принятых с ними веществ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам медико-биологической лаборатории Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова и отдела фармакокинетики Института фармакологии и токсикологии НАМН Украины за организацию экспериментов на животных и персонально к.м.н. Штатько Е.И. за помощь в обработке и интерпретации полученных результатов.

Литература

1. Фролькис А.В. Изучение взаимодействия лекарств в кишечнике с помощью теста на всасывание D-ксилозы // *Клин. медицина.* – 1982. – №9. – С. 69–73.
2. Clark P.A. and Harland W.A. The Effect of Dose on D-Xylose Excretion/ *Am. Journal of Digestive Diseases.* – 1967. – V.12, N 2. – P.183–188.
3. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
4. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
5. Swinnen M.J. A colorimetric micromethod for the estimation of xylose in blood and urine // *Biol.et gastroenterol.* – 1968. – N 2. – P.194–200.
6. Lieleg O. Biological hydrogels as selective diffusion barriers // *Trends in Cell Biol.* – 2011. – V. 21, N 9. – P. 543–551.
7. Маркина А.И., Геращенко И.И., Пахлов Е.М. Взаимодействие наноразмерных оксидов кремния и алюминия со стекловидным телом крупного рогатого скота/ Авторефер. доп. конф. молодых ученых “Хімія, фізика та технологія поверхні”. – Київ, 15–16 травня 2012. – С.224–225.
8. Геращенко І.І. Мембранотропные свойства наноразмерного кремнезема// В сб.: *Поверхность*, вып. 1 (16) / Под ред. Н.Т.Картеля. – К.: Наук. думка, 2009. – С. 288–306.
9. Железная Л.А. Структура и функции гликопротеинов слизи (муцинов) // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.* – 1998. – № 1. – 30–37.
10. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния* / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – 416 с.

**ВПЛИВ ЕНТЕРОСОРБЕНТІВ НА ВСМОКТУВАННЯ
D-КСИЛОЗИ В КИШЕЧНИКУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН:
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ АСПЕКТ**

А.І. Маркіна, І.І. Геращенко

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна*

Вивчений вплив низки ентеросорбентів, серед яких нанорозмірні діоксид кремнію і оксид алюмінію, ентеросгель, каолін, смектит, активоване вугілля і мікрокристалічна целюлоза, на швидкість всмоктування D-ксилози з кишечника щурів і мишей (“ксилозний тест”). При цьому не встановлено статистично вірогідних відмінностей отриманих показників порівняно з контрольним дослідом (без введення тваринам сорбентів). Результати фізико-хімічного експерименту показують, що дифузія D-ксилози через гідрогель, який моделює муциновий шар кишечника, у присутності деяких ентеросорбентів істотно сповільнена. Цей ефект пов'язаний із здатністю наночастинок сорбентів взаємодіяти з гідрогелем з утворенням структур, що перешкоджають міграції молекул D-ксилози.

**IMPACT OF ENTEROSORBENTS ON ABSORPTION
OF D-XYLOSE FROM INTESTINE OF EXPERIMENTAL
ANIMALS: PHYSICAL CHEMICAL ASPECT**

A.I. Markina, I.I. Gerashchenko

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str. Kyiv, 03164, Ukraine*

Impact of some enterosorbents, among which nano-sized silica and oxide of aluminium, enterogel, kaolin, smectit, activated coal and microcrystalline cellulose, on the rate of absorption of the D-xylose from the intestine of rats and mice was studied (“xylose test”). Thus it is not stated the statistically reliable differences of the obtained indexes as compared to control experience (without introduction of sorbents). The results of physical chemical experiment show that diffusion of D-xylose through a hydrogel, designing a mucin layer of intestine, in presence of some enterosorbents substantially slow. This phenomenon is related with ability of nanoparticles of sorbents to interact with a hydrogel with formation of structures which prevent to migration of the molecules of D-xylose.