

Л. А. Сахно, В. В. Сарнацкая, В. Н. Масленный, Л. А. Юшко,
Л. Н. Корнеева, В. Г. Коротич, В. Г. Николаев

Сравнительная оценка способности энтеросорбентов различной природы связывать бактериальные эндотоксины

(Представлено академиком НАН Украины В. Ф. Чехуном)

Порівняльна оцінка кінетичних параметрів та ізотерм адсорбції бактеріальних ендотоксинів (БЕТ) ентеросорбентами різної природи показала очевидні переваги вуглецевих сорбентів на основі волокнистих матеріалів АУВМ-МН та АУТ-М, що здатні поглинати в 5 і 3 рази більше БЕТ, ніж широко застосовуваний в Україні кремнієвмісний ентеросорбент ентеросгель. Ентеросорбенти на основі харчових волокон — мікрокристалічна целюлоза, російський препарат поліфепан та кремнієвмісний силікс мають мінімальну здатність поглинати БЕТ. Вивчено токсичність БЕТ, який вводили мишам внутрішньоочередово у комплексі з вуглецевими ентеросорбентами та ентеросгелем у кількості, при застосуванні якої з фізіологічним розчином фіксувалась 100% загибель тварин. При введенні БЕТ у комплексі з ентеросгелем та АУТ-М смертність становила 57 і 30% відповідно, а при введенні комплексу БЕТ — АУВМ-МН не загинула жодна тварина. Подібний ефект досягався при введенні комплексів БЕТ з ентеросорбентами на фоні дактиноміцину Д — антибіотика, який у 150 разів посилював токсичну дію БЕТ.

Ведущим звеном в развитии эндотоксемии является массивное поступление в системный кровоток бактериальных эндотоксинов (БЭТ), что может быть вызвано целым рядом причин, в том числе массовой гибелью грамотрицательной микрофлоры кишечника на фоне функционального срыва кишечного и/или печеночного барьеров (энтероколиты, сальмонеллезы, отравления, пероральная антибиотикотерапия, лучевые поражения), а также инфекционными и неинфекционными заболеваниями, сопровождающимися портальной гипертензией, шунтированием портального кровотока, нарушениями целостности слизистой оболочки кишечника (шок любой этиологии, цирроз печени, острая и нарастающая сердечно-сосудистая недостаточность, тяжелая механическая и термическая травма) [1, 2]. В подобных ситуациях присутствие в кишечнике сорбентов, способных активно поглощать и достаточно прочно удерживать БЭТ, может в определенной мере предупреждать попадание их критического количества в кровоток.

В настоящем сообщении приведены результаты сравнительной оценки способности энтеросорбентов различной природы поглощать БЭТ, а также изучения токсичности комплексов БЭТ — сорбент. Исследовались отечественные углеродные энтеросорбенты на основе активированных волокнистых углей марок АУТ-М и АУВМ-МН, отличающихся хорошо развитой внутренней пористостью (объем сорбционных пор по бензолу от 0,4 до 1,2 см³/г) и высокой удельной сорбционной поверхностью (700–2000 м²/г), что позволяет им поглощать широкий спектр веществ различной молекулярной массы. Описание свойств углеродных энтеросорбентов и возможностей их клинического применения можно найти в обзорах [3–5]. В качестве кремнийсодержащих энтеросорбентов изучены широко распространенный в Украине препарат энтеросгель (гель гидроокиси метилкремниевой кислоты), обла-

дающий сравнительно небольшой удельной поверхностью (около 300 м²/г) и уступающий углеродным сорбентам в сорбции веществ низко- и среднемoleкулярной массы, но достаточно хорошо поглощающий высокомолекулярные соединения [5–7], а также отечественный энтеросорбент силикс, получаемый на основе высокодисперсных кремнезёмов, с удельной поверхностью 200–300 м²/г [5, 7]. Кроме того, были протестированы два энтеросорбента на основе пищевых волокон — микрористаллическая целлюлоза (МКЦ), получаемая путем гетерогенного гидролиза хлопкового волокна, и российский препарат полифепан, изготавливаемый путем гидролиза древесины и обладающий, благодаря выраженной макропористой структуре, высокой впитывающей способностью [7, 8].

Материалы и методы. В работе использовали БЭТ *E. coli* O111:B4 (“Sigma”, США). В качестве тест-объектов выбраны образцы сорбентов: карболайн на основе АУТ-М и новый вариант на основе АУВМ-МН (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины), энтеросгель (ЗАТ ЕОФ “Креома-Фарм”, Украина), силикс (ДКП по производству бактериальных препаратов “Биофарма”, Украина), МКЦ (фармацевтическая фирма “Дарница”, Украина) и полифепан (ЗАО “Экосфера”, Россия).

Адсорбцию БЭТ изучали в шуточных экспериментах из натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,2), содержащего 0,5 мг БЭТ в 1 мл. Объем раствора сорбата составлял 3 мл, время адсорбции 6 ч. Навески сорбентов перед началом эксперимента уравнивались буферным раствором. Величину адсорбции определяли по снижению содержания БЭТ в растворе и рассчитывали на 1 г массы сорбента. Константы скорости адсорбции определяли как соотношение количества адсорбированного БЭТ к массе сорбента и корню квадратному из времени от начала процесса адсорбции. Для определения содержания БЭТ в растворе использовали спектрофотометрический метод М. Cynkin, G. Ashwell, основанный на регистрации при $\lambda = 532$ нм абсорбции 3-дезоксисахаров, образующихся в результате кислотного гидролиза БЭТ [9].

Токсичность БЭТ оценивали в двух модельных вариантах на мышах линии BALB/c (разводка вивария ИЭПОР им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины) массой (20 ± 2) г. В первом варианте БЭТ вводили мышам внутрибрюшинно в 0,2–0,4 мл физиологического раствора в дозах от 5,0 до 20,0 мг на 1 кг массы тела животного (контрольные группы) и в течение 48 ч фиксировали количество погибших мышей. БЭТ, адсорбированный на энтеросорбенте, вводили мышам в 0,2–0,4 мл физиологического раствора в количестве, которое соответствовало количеству БЭТ, вызывающему 100% гибель контрольных животных. Второй вариант отличался от первого тем, что с целью повышения чувствительности мышей к токсическому действию БЭТ перед его введением (в дозах от 12,5 до 50,0 мкг на 1 кг массы тела животного) внутрибрюшинно вводили антибиотик дактиномицин Д (производственное химико-фармацевтическое объединение “Октябрь”, Россия) в дозе 1,0 мг/кг. Токсичность каждой дозы БЭТ тестировали не менее чем на 9 животных.

Результаты исследования и их обсуждение. Сравнительная оценка изотерм адсорбции БЭТ энтеросорбентами различной природы показала, что эффективность адсорбции возрастает по мере увеличения объема сорбционных пор энтеросорбента. Наибольшую сорбционную емкость имеют углеродные сорбенты АУВМ-МН ($V_s = 1,01$ см³/г) и АУТ-М ($V_s = 0,52$ см³/г), которые способны поглощать до 30 и 18 мг БЭТ на 1 г сорбента соответственно (рис. 1). Сорбционная емкость кремнийсодержащих сорбентов в отношении БЭТ заметно ниже и составляет 5,7 и 1,6 мг/г для энтеросгеля и силикса ($V_s = 0,37$ см³/г) соответственно. Значение объема сорбционных пор, определяемое по насыщению сорбента

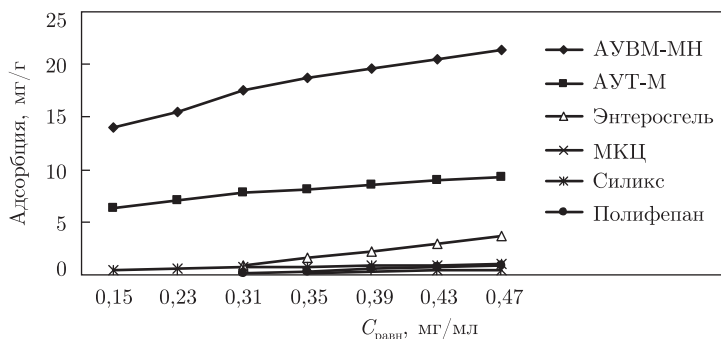


Рис. 1. Изотермы адсорбции БЭТ из буферного раствора

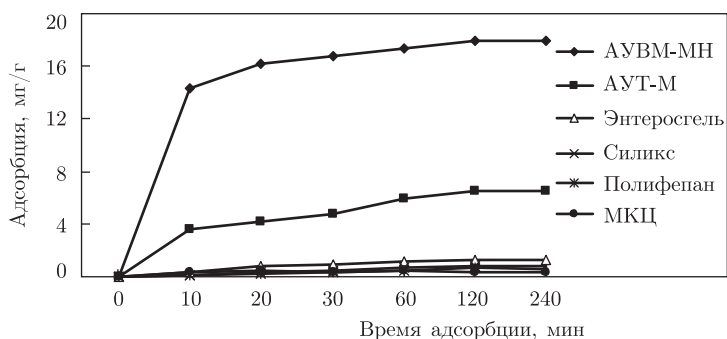


Рис. 2. Кинетика адсорбции БЭТ из буферного раствора

парами бензола после предварительного высушивания сорбента, не указано для энтеросгеля, пористость которого формируется за счет заполненных водой пространств между микроглобулами материала. При высушивании энтеросгеля его гелевая структура, которая как раз обеспечивает поглощение высокомолекулярных соединений, разрушается. Энтеросорбенты на основе пищевых волокон обладают наименьшей способностью поглощать БЭТ: полифенан ($V_s = 0,12 \text{ см}^3/\text{г}$) — 0,9 мг/г, МКЦ ($V_s = 0,02 \text{ см}^3/\text{г}$) — 0,5 мг/г.

Для всех анализируемых энтеросорбентов характерна достаточно быстрая кинетика адсорбции БЭТ: уже через 30 мин насыщение сорбентов достигало не менее 80% максимального (рис. 2).

Через 2 ч кинетические кривые выходят на плато, что свидетельствует о практически полном насыщении сорбентов БЭТ. При этом константы скорости адсорбции для различных энтеросорбентов существенно отличались и составляли 1,52; 0,38 и 0,03 мг/(г · мин^{1/2}) для АУВМ-МН, АУТ-М и энтеросгеля соответственно. Для всех остальных энтеросорбентов константы скорости адсорбции не превышали 0,01 мг/(г·мин^{1/2}).

Анализ кинетических параметров и изотерм адсорбции БЭТ энтеросорбентами различных групп показал, что наиболее эффективными энтеросорбентами для поглощения БЭТ являются углеродные сорбенты АУВМ-МН и АУТ-М, а также со значительным отрывом — кремнийсодержащий энтеросгель.

На следующем этапе исследований была изучена токсичность БЭТ, внутривенно вводимого мышам в комплексе с вышеупомянутыми энтеросорбентами в количестве, вызывающем при его введении в физиологическом растворе 100% гибель животных. В экспериментах, в которых прослеживалась зависимость числа погибших мышей от дозы вво-

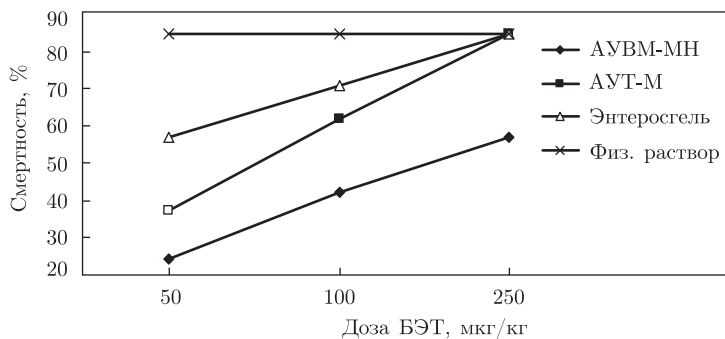


Рис. 3. Зависимость гибели мышей от дозы БЭТ, вводимого на фоне дактиномицина Д

димого в физиологическом растворе БЭТ, 100% смертность зафиксирована в группе, животные которой получали 10 мг БЭТ на 1 кг массы тела. После введения энтеросгеля совместно с соответствующим количеством БЭТ через 48 ч погибло 57% мышей. Введение комплекса АУТ-М — БЭТ привело к гибели 30% животных, а после введения комплекса АУВМ-МН — БЭТ не погибло ни одно животное, что вполне соответствует результатам вышеописанных *in vitro* экспериментов.

Известно, что чувствительность мышей к токсическому действию БЭТ возрастает в присутствии некоторых антибиотиков, в частности дактиномицина Д [10]. В условиях нашего эксперимента при введении БЭТ в дозе 50 мкг на 1 кг массы тела на фоне дактиномицина Д наблюдалась гибель 85% животных. Эта доза БЭТ в 150 раз меньше той, которая при его самостоятельном применении приводит к аналогичному токсическому эффекту. Нами проведены эксперименты, в которых на фоне дактиномицина Д мышам вводили энтеросорбенты с возрастающим количеством БЭТ. После введения энтеросгеля и АУТ-М, содержащих БЭТ в количестве, которое соответствовало 50 мкг БЭТ на 1 кг массы тела, наблюдалась гибель 57 и 37% животных соответственно. Повышение дозы БЭТ до 100 мкг/кг вызывало гибель 71 и 67% мышей соответственно. 85% животных погибло после введения сорбентов с БЭТ в количестве, соответствующем 250 мкг БЭТ на 1 кг массы тела, что в 5 раз превышает то количество БЭТ, которое вызывает аналогичный токсический эффект при введении БЭТ в физиологическом растворе. После введения мышам 250 мкг/кг БЭТ, но в комплексе с АУВМ-МН смертность составляла не более 60%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что энтеросорбенты на основе измельченных углеродных материалов АУВМ-МН и АУТ-М и кремнийсодержащий энтеросорбент энтеросгель достаточно эффективно связывают и удерживают бактериальные липополисахариды, в той или иной мере препятствуя их выходу из брюшной полости в системный кровоток.

Таким образом, массивная энтеросорбция с применением активных в отношении БЭТ энтеросорбентов может снизить риск развития эндотоксемии и системной воспалительной реакции, приводящей к гибели организма. С другой стороны, связывание в кишечнике бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий может дать существенное улучшение результатов терапии хронических иммунозависимых заболеваний кишечника, таких как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона, где БЭТ играет существенную роль в поддержании активности воспалительного процесса. Не менее важным является возможность профилактического применения энтеросорбентов при подготовке больных к тяжелым оперативным вмешательствам, сопряженным с риском значительной кровопотери. В подоб-

ной ситуации стенка кишечника, оказавшаяся из-за централизации кровообращения в состоянии выраженной гипоксии, в значительной степени теряет свою барьерную функцию, что может привести как к развитию ирреверсивного геморрагического шока, так и к нарушению функции печени, получающей основной эндотоксиновый удар.

1. Салахов И. М., Ипатов А. И., Конев Ю. В., Яковлев М. Ю. Современные аспекты патогенеза эндотоксинового шока // Успехи соврем. биологии. – 1998. – **118**, № 1. – С. 33–49.
2. Яковлев М. Ю. “Эндотоксиновая агрессия” как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных. Современные аспекты патогенеза эндотоксинового шока // Там же. – 2003. – **123**, № 1. – С. 31–40.
3. Николаев В. Г., Михаловский С. В., Гурина Н. М., Мартынов А. К. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия // Эфферент. терапия. – 2005. – № 4. – С. 3–17.
4. Mikhalovsky S. V., Nikolaev V. G. Activated carbons as a medical adsorbent // Activated Carbon Surfaces in Environmental Remediation / Ed. by T. J. Vadosz. – Amsterdam: Elsevier, 2006. – Vol. 7. – P. 529–561.
5. Николаев В. Г., Михайловский С. В., Николаева В. В. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее // Вісн. пробл. біології і медицини. – 2007. – № 4. – С. 7–16.
6. Шевченко Ю. Н. Кремнийорганические сорбенты. Свойства и область применения // Сб. работ по применению препарата “Энтеросгель” в медицине. – Москва, 2002. – С. 3–12.
7. Шевченко Ю. Н. Современные адсорбционные материалы для энтеросорбции // Біосорбційні методи і препарати в профілактичній та лікувальній практиці: Матеріали наук.-практ. конф. – Київ, 1997. – С. 6–10.
8. Дудкин М. С., Шелжунов Л. Ф. Об использовании термина “пищевые волокна” и их классификация // Вопр. питания. – 1997. – № 3. – С. 42–43.
9. Cynkin M., Ashwell G. Estimation of 3-deoxy sugar by means of the malonaldehyde thiobarbituric acid reaction // Nature. – 1960. – **186**. – P. 155–156.
10. Bradley S. G. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxin // Ann. Rev. Microbiol. – 1979. – **33**, No 1. – P. 67–94.

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 29.05.2008

L. A. Sakhno, V. V. Sarnatskaya, V. N. Maslenny, L. A. Yushko,
L. N. Korneeva, V. G. Korotich, V. G. Nikolaev

Comparative evaluation of capability of different nature enterosorbents to bind bacterial endotoxins

Comparative evaluation of kinetic parameters and isotherms of adsorption of bacterial endotoxins (BET) by enterosorbents of different nature has demonstrated obvious benefits of carbon sorbents on the base of fibrous materials trade-marks – ACFM-MU and ACF-M that are capable to adsorb BET in 5- and 3-fold higher quantities than silicon-containing enterosorbent Enterogel widely distributed in Ukraine. Enterosorbents on the base of nutrient fibers – microcrystal cellulose and Russian preparation Polyphepane, as well as silicon-containing Silix, possess the minimal ability to adsorb BET. The toxicity of BET injected intraperitoneally at the dose that causes 100% lethality in mice if administered solely in physiologic solution has been studied upon its injection in complex with carbon enterosorbents and Enterogel. After the administration of BET in complex with Enterogel and ACF-M, the rate of lethality was 57% and 30%, respectively, while no animals died upon the administration of BET – ACFM-MU complex. Similar results were obtained if BET complexes with enterosorbents were injected at the background of actinomycin D – an antibiotic that promotes the toxic action of BET by 150 times.