

# ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЭНТЕРАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ ГИАЛУРОНИДАЗЫ

[М. А. Шилова, О. Р. Грек, П. Г. Мадонов, К. И. Ершов, С. В. Мишенина, М. Э. Филь,  
М. В. Рамзин](#)

*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава  
России (г. Новосибирск)*

Целью исследования являлось изучение параметров энтерального транспорта модифицированной и нативной гиалуронидазы из просвета тощей кишки крыс в эксперименте. Были использованы следующие экспериментальные модели: инкубация препарата в кишечнике (in situ) и камера Уссинга. Проводилась оценка динамики содержания препаратов в кровеносном русле, возможность проникновения в лимфатическое русло и скорость всасывания. На обеих моделях было показано, что модификация ГЭБН полксамером повышает энтеральный транспорт фермента, создает возможность получения терапевтически значимых концентраций препарата в крови и печени.

*Ключевые слова:* гиалуронидаза, пегилирование, полксамер, энтеральный транспорт.

---

**Шилова Маргарита Анатольевна** — аспирант кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: [pharmacevt85@list.ru](mailto:pharmacevt85@list.ru)

**Грек Олег Рувимович** — доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: [grekor-40@yandex.ru](mailto:grekor-40@yandex.ru)

**Мадонов Павел Геннадьевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: [pmadonov@yandex.ru](mailto:pmadonov@yandex.ru)

**Ершов Константин Игоревич** — ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: [ershov\\_k@bk.ru](mailto:ershov_k@bk.ru)

**Мишенина Светлана Владимировна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО

«Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: m-svetlana@ngs.ru

**Филь Марина Эдуардовна** — студент 3-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: lucia\_di\_lammermoor@mail.ru

**Рамзин Михаил Владимирович** — студент 3-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: microdnoy@gmail.com

---

*Введение.* Многие хронические заболевания сопровождаются фибротическими изменениями тканей. Например, при хроническом гепатите наблюдаются нарастающие воспалительные, некротические и фибротические изменения в тканях печени, которые в итоге приводят к осложнениям, среди которых наиболее тяжелыми являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома [1]. Исходя из биохимической сути фиброзной дегенерации органов, наиболее адресной терапией будет ферментативная ликвидация фиброза.

Весьма перспективным методом лечения выглядит использование гиалуронидазы (гиалуронат-эндо- $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы, ГЭБНА), обладающей выраженными антифибротическими свойствами, однако её реальное использование затруднено вследствие низкой биодоступности при энтеральном введении. Между тем, известно, что проблема низкой энтеральной биодоступности фармакологически активных белковых молекул может быть решена посредством конъюгации белка и полимерного носителя. Создание комплекса белок-полимер не приводит к структурной деградации белка, а лишь модифицирует его физико-химические свойства. Увеличивается гидрофильность молекулы, повышается стабильность при изменении параметров внешней среды, создаётся защита от гидролиза пищеварительными ферментами, что в результате делает возможным использование перорального пути введения [3, 5-7].

*Цель исследования:* изучение параметров всасывания модифицированной формы ферментного препарата ГЭБНА из просвета тощей кишки крыс в эксперименте.

*Материалы и методы исследования.* Объектами исследования были выбраны следующие препараты.

Препарат 1: ГЭБНА-L31, представляет собой белково-полимерный конъюгат, полученный смешиванием гиалуронидазы с полуксамером (торговая марка Pluronic® L31, BASF). Содержание полуксамера составляет 5 %. Для данного препарата характерно термообратимое мицеллообразование: при повышении температуры выше 33 °C наблюдается образование мицелл и при снижении температуры ниже данного значения происходит их разрушение.

Препарат 2: ГЭБНА-ПЭГ 1500, представляет собой гиалуронидазу, иммобилизованную с помощью ионизирующего излучения на предварительно активированном полиэтиленгликоле 1500 (ПЭГ 1500). Параметры ионизирующего излучения, генерируемого ускорителем ИЛУ-10, составляли: доза 1,5 Мрад, энергия электронов 2,5 МэВ, поглощенная доза 2-10 кГр, скорость набора дозы 1,65 кГр/ч.

Препарат 3: ГЭБНА — нативная гиалуронидаза производства ООО «Самсон-Мед», г. Санкт-Петербург.

На все образцы наносили флюоресцентную метку — флуоресцеин изотиоцианат (FITC) — для детекции всасывания препаратов через кишечную стенку [2].

Работа выполнена на 50-ти самцах-крыс Wistar массой 270–300 г. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Выведение животных из опыта проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 года № 755).

Для исследования параметров всасывания препаратов 24-м животным под инъекционным наркозом после срединной лапаротомии в дистальном отделе тощей кишки с двух сторон фиксировали трубки (входящая, выходящая) для растворов. Длина выбранного фрагмента тощей кишки составляла 10 см, далее просвет промывали физиологическим раствором для удаления химуса и зашивали брюшную полость. Перед инкубированием растворов в кишке повышали базальную температуру крысы с 34 до 37 °С путем нагревания тела крысы струей теплого воздуха. Для перфузии использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с содержанием препаратов по 25 мкг/мл (рН 7,4). После инкубации в тощей кишке в течение 30 мин при постоянной температуре  $37,7 \pm 1,0$  °С собирали кровь из *v. mesenterica* (непосредственно прилегающей к тощей кишке, где осуществлялась инкубация раствора), *v. hepatica* (выносящая кровь из печени) и *v. renalis* (выносящая кровь из почки). Кровь набирали в присутствии гепарина, в дальнейшем ее центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, отбирали супернатант и измеряли флуоресценцию (Varian, Австралия) [4].

Меченый препарат экстрагировали из прилегающей к области инкубации интерстициальной жидкости кишечника, слизистый слой которого был удален, и из паренхимы лимфатических узлов I порядка. Для этого фрагменты ткани выдерживали в течение суток в ФСБ при 4 °С, далее центрифугировали раствор, чтобы отделить его от остатков ткани и форменных элементов. В надосадочной жидкости определяли флуоресценцию с учетом изначальной массы образца ткани и процента содержащейся в нем воды. В качестве контроля и для установления уровня автофлуоресценции в работе была использована группа интактных крыс (8 животных), с которыми проводили аналогичные хирургические манипуляции, но в качестве раствора для инкубации использовали только ФСБ. От полученных значений по флуоресценции биологических жидкостей отнимали показатели автофлуоресценции (контрольная группа). Количество препарата определялось по калибровочным кривым.

Исследование скорости всасывания оценивали в камере Уссинга на 18-ти крысах. Фрагмент кишки с двух сторон находился с серозной и слизистой сторон в растворе Кребса-Рингера. Растворы аэрировались с двух сторон карбогеном. После предварительной 15 мин прединкубации со стороны слизистой в раствор добавляли исследуемые препараты ГЭБНА, меченной FITC до конечной концентрации 10 мкг/мл. Далее инкубация длилась в течение 10, 20 и 30 мин. По окончании инкубации с серозной стороны собирались полученные растворы. Их флуоресценцию определяли на флуориметре (Varian, Австралия). Количество ГЭБНА определялось по калибровочным кривым.

Статистическая обработка результатов включала подсчет среднеарифметических значений ( $M$ ) и их ошибки ( $m$ ). Для выявления достоверности полученных значений применяли тест множественных сравнений Дункана (Duncan's test, ANOVA) с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Отличия считали

достоверными при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования.* При оценке нахождения препарата в системном кровотоке было установлено, что содержание ГЭБНА-L31 в крови (*v. mesenterica*) оказалась в 20 раз выше, чем с нативной гиалуронидазы (рис. 1).

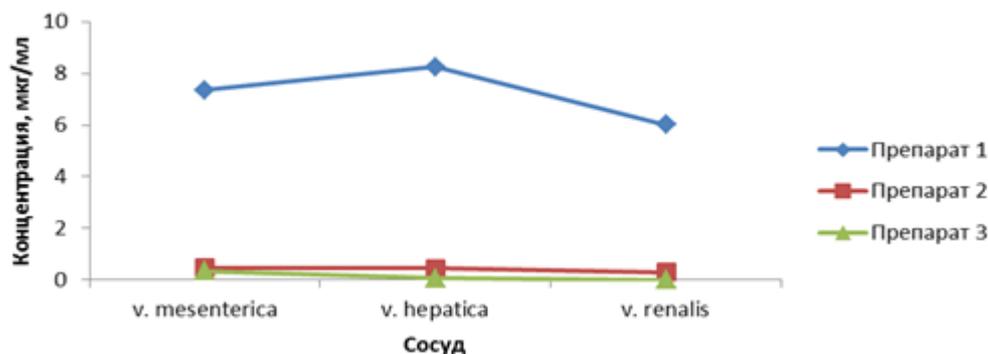


Рис. 1. Содержание препаратов в крови по детекции FITC

После 30-минутной инкубации в кишечнике концентрация ГЭБНА-L31 в *v. mesenterica* и *v. hepatica* остаётся на одном уровне и на 25 % снижается в *v. renalis*. Снижение концентрации препарата в *v. renalis*, вероятно, обусловлено системным метаболизмом фермента, захватом клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). В тех же условиях содержание нативной ГЭБНА стремится к нулю, следовательно, препарат более активно разрушается ферментными системами и быстрее выводится из организма. ГЭБНА-ПЭГ 1500 демонстрирует сохранение значений концентрации в кровотоке во всех трех венах на начальном уровне, что свидетельствует о его незначительной ферментной деструкции.

Также мы определяли уровень содержания препаратов в межклеточной жидкости. При индивидуальном рассмотрении каждого из исследуемых препаратов их содержание в межклеточной жидкости тощей кишки и в паренхиме узлов I порядка статистически не отличается (рис. 2). При анализе содержания препаратов в зависимости от типа модификации было выявлено, что концентрации ГЭБНА-ПЭГ 1500 и нативной ГЭБНА находятся на одном уровне, в то время как содержание ГЭБНА-L31 превышает их в 40 раз. Обнаружение препарата 1, меченного FITC, в лимфоузлах является дополнительным подтверждением его всасывания в лимфу. Таким образом, нами установлено, что ГЭБНА-L31 наиболее интенсивно всасывается из дистального отдела тощей кишки как в системный кровоток, так и лимфатическое русло.

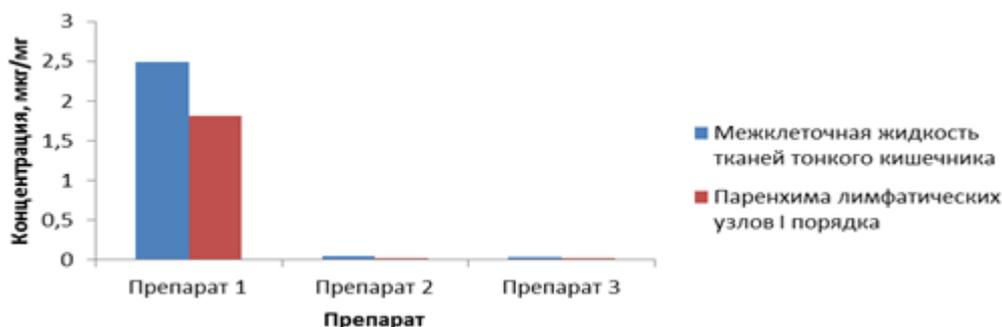


Рис. 2. Содержание препаратов в межклеточной жидкости кишки и в паренхиме лимфатических узлов

В ходе эксперимента *in vitro* (камера Уссинга) установлено, что скорость всасывания

препарата 1 (рис. 3) значительно превышает скорости всасывания других препаратов. Его максимальная концентрация формируется уже на 10 мин инкубации и далее остается на прежнем уровне. На 30 мин количество ГЭБНА-L31 с серозной стороны превышает концентрацию препарата 2 и 3 в 1,5 и 3 раза соответственно.

Для ГЭБНА-ПЭГ 1500 и нативной гиалуронидазы характерно постепенное увеличение содержания, выход на плато формируется с 20 мин инкубации (рис. 3). Их отличия заключаются в скорости всасывания, поскольку препарат 2 будет накапливаться с серозной стороны в 2 раза быстрее (по сравнению с препаратом 3).

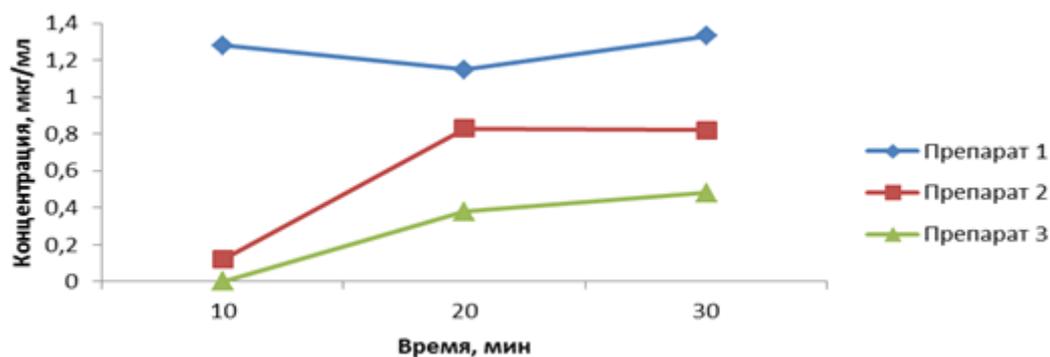


Рис. 3. Изменение концентрации препаратов с серозной стороны в процессе инкубации в камере Уссинга

*Заключение.* Таким образом, нами установлено, что модификация ГЭБНА полуксамером Pluronic L31 повышает энтеральный транспорт фермента, создаёт возможности для получения терапевтически значимых концентраций препарата в крови и печени. Необходимо отметить, что методология изучения энтерального транспорта, представленная в данной статье, является весьма перспективной для проведения скрининговых экспериментов на ранних этапах масштабных доклинических исследований, что существенно экономит материальные и временные ресурсы, позволяет избежать неоправданной гибели лабораторных животных.

#### *Выводы*

1. Гиалуронидаза, модифицированная полуксамером Pluronic L31, интенсивно проходит через кишечную стенку.
2. Гиалуронидаза, модифицированная полуксамером Pluronic L31, интенсивно проникает в лимфатическое русло.
3. Полуксамер Pluronic® L31 следует рассматривать как перспективный трансэнтеральный носитель для лекарственных средств белковой природы.
4. Экспериментальная модель инкубации препаратов в кишечнике является удобной и достоверной для оценки параметров энтерального транспорта белковых препаратов.

#### *Список литературы*

1. Иоанниди Е. А. Лечение хронических гепатитов: учебно-методическое пособие / Е. А. Иоанниди, И. В. Макарова, Е. А. Беликова. — Волгоград : Изд-во Волгоградского гос. аграрного ун-та, 2012. — 48 с.
2. Исследование пути всасывания флуоресцеина из тощей кишки крыс Wistar в систему «кровь-лимфа» / К. И. Ершов [и др.] // Вестн. НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. — 2012. — Т. 10, вып. 4. — С. 41-46.
3. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств [Электронный ресурс] / П. Г. Мадонов [и др.] //

Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание. — 2013. — № 4. — Режим доступа : ([http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1115](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115)). — Дата обращения : 20.05.2015.

4. Шилова М. А. Исследование биодоступности полимеросом полуксамер — ГЭБНА из тощей кишки крыс / М. А. Шилова, К. И. Ершов, О. Р. Грек // Сб. материалов межрегион. науч.-практ. конф. «Фармация XXI века : актуальные проблемы и перспективы». — Кемерово, 2014. — С. 164-166.
5. Kabanov A. V. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery / A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov // Journal of Controlled Release. — 2002. — Vol. 82. — P. 189-212.
6. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs / R. I. Mahato [et al.] // Therapeutic Drug Carrier Systems. — 2003. — Vol. 20 (2&3). — P. 153-214.
7. Nanoparticles : pharmacological and toxicological significance / C. Medina [et al.] // Br. J. Pharmacol. — 2007. — Vol. 50. — P. 552-558.

# STUDYING THE PARAMETERS OF ENTERAL TRANSPORT OF MODIFIED HYALURONIDASUM FORMS

[M. A. Shilova](#), [O. R. Grek](#), [P. G. Madonov](#), [K. I. Yershov](#), [S. V. Mishenina](#), [M. E. Fil](#),  
[M. V. Ramzin](#)

*SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)*

The research objective was studying of parameters of enteral transport of the modified and native Hyaluronidasum from a lumen of a jejunum at rats in experiment. The following experimental models were used: medicine incubation in an intestine (in situ) and a chamber of Ussinga. The assessment of dynamics of the medicine maintenance in a vascular channel, possibility of penetration into a lymphatic channel and rate of absorption was carried out. On both models it was shown that modification of GEBN with poloxamer raises enteral transport of enzyme, frames possibility of obtaining therapeutically significant concentration of a preparation in a blood and in a liver.

**Keywords:** Hyaluronidasum, pegylation, poloksamer, enteral transport.

---

## About authors:

**Shilova Margarita Anatolyevna** — post-graduate student of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [pharmacevt85@list.ru](mailto:pharmacevt85@list.ru)

**Grek Oleg Ruvimovich** — doctor of medical science, professor, head of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: [grekor-40@yandex.ru](mailto:grekor-40@yandex.ru)

**Madonov Pavel Gennadevich** — doctor of medical science, professor, head of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [pmadonov@yandex.ru](mailto:pmadonov@yandex.ru)

**Ershev Konstantin Igorevich** — assistant of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [ershov\\_k@bk.ru](mailto:ershov_k@bk.ru)

**Mishenina Svetlana Vladimirovna** — candidate of medical science, assistant of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [m-svetlana@ngs.ru](mailto:m-svetlana@ngs.ru)

**Fil Marina Eduardovna** — student of the 3<sup>rd</sup> course of therapeutic faculty at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [lucia\\_di\\_lammermoor@mail.ru](mailto:lucia_di_lammermoor@mail.ru)

**Ramzin Mikhail Vladimirovich** — student of the 3<sup>rd</sup> course of therapeutic faculty at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», e-mail: [microdnoy@gmail.com](mailto:microdnoy@gmail.com)

## List of the Literature:

1. Ioannidi E. A. Treatment of chronic hepatitises: educational and methodical guidance / E. A. Ionniidi, I. V. Makarov, E. A. Belikov. — Volgograd: Publishing house of Volgograd State Agrarian University, 2012. — 48 P.
2. Research of absorption of fluoresceine from jejunum of Wistar rats to blood lymph system / K. I. Yershov [etc.] // Bulletin of NSU. Series: Biology, clinical medicine. — 2012. — V. 10, Iss. 4. — P. 41-46.
3. Electron beam modification of preparations of albuminous nature for improvement of their pharmacological properties [electron resource] / P. G. Madonov [et al.] // Medicine and education in Siberia: online scientific publication. — 2013. — N 4. — Access mode: ([http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1115](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115)). — Access date: 20.05.2015.
4. Shilova M. A. Bioavailability research polimerose poloxamer — GEBN at jejunum of rats / M. A. Shilova, K. I. Yershov, O. R. Grek // Materials of interregion. scient. — pract. conf. «Pharmaceutics of the XXI century: actual problems and prospects». — Kemerovo, 2014. — P. 164-166.
5. Kabanov A. V. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery/A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov//Journal of Controlled Release. — 2002. — Vol. 82. — River 189-212.
6. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs/R. I. Mahato [et al.]//Therapeutic Drug Carrier Systems. — 2003. — Vol. 20 (2&3). — P. 153-214.
7. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance/C. Medina [et al.]//Br. J. Pharmacol. — 2007. — Vol. 50. — River 552-558.