

# МЕТОДИКА

УДК 616-032:611.31

П.Л. Старокадомський

## Защитні мішки хом'яка як модель для дослідження проникності слизової оболонки порожнини рота

*Предложена методика предварительной оценки проницаемости слизистой оболочки полости рта для высокомолекулярных соединений. В качестве модели слизистой рта использовали изолированные защечные мешки хомяка (ЗМХ). Экспериментально показано проницаемость слизистой оболочки для а-интерферона, инсулина. Доказано, что нуклеиновые кислоты и пероксидаза не способны преодолеть барьер слизистой оболочки полости рта, а инсулин преодолевает ее, двигаясь по каналам межклеточного матрикса. Мы показали, что несмотря на различия в строении слизистой оболочки рта хомяка и человека, изолированные ЗМХ являются удобной и дешевой моделью для первичной оценки буккальной проницаемости для лекарственных макромолекул.*

### ВСТУП

Одним із перспективних способів доставки лікувальних і профілактичних препаратів у організм людини є введення ліків через слизову оболонку рота, або буккальний шлях введення (від лат. *bucca* – щока). Такі низькомолекулярні препарати, як нітроглицерин, нікотин, ментол, антибіотики вводять в організм за допомогою природного їх всмоктування слизовою оболонкою рота [1, 4]. Однак особливий інтерес викликає можливість буккального транспорту високомолекулярних препаратів (інсулін, інтерферон тощо) [6–8]. Буккальний спосіб введення білків дозволяє уникнути деяких побічних ефектів, що виникають внаслідок ін'єкцій – знижується ймовірність виникнення імунологічних реакцій, пов'язаних із різкими змінами концентрації чужорідного білка у крові, зникає проблема больових відчуттів і психологічної травми від ін'єкцій тощо.

При розробці буккальних препаратів важливим є вибір моделі слизової оболонки

порожнини рота, за допомогою якої можна було б оцінювати їх проникність. У літературі описано різні способи оцінки ефективності введення препаратів через слизову оболонку рота. Одні автори досліджували буккальну проникність міченого флюоресцеїном ізотіоціанату інсуліну (ФІТЦ-інсулін), використовуючи конфокальну сканувальну мікроскопію препаратів слизової оболонки оброблених тварин [15]. Інші визначали проникність препаратів *in vivo*, заміряючи концентрацію препарату або його ефект у крові, сечі чи інших рідинах організму [1, 6, 14]. Запропоновано також вивчати буккальний транспорт препаратів за допомогою моношару еукаріотних клітин та деяких інших моделей [9, 10]. Однак більшість із запропонованих систем для дослідження буккального транспорту або трудомісткі та потребують значних коштів, або недостатньо точні та адекватні. Тому актуальним завданням залишається розробка простої та зручної моделі для дослідження буккальної проникності для макромолекул.

© П.Л. Старокадомський

Метою нашої роботи було дослідити можливість букального транспорту високомолекулярних сполук за допомогою ізольованих защичних мішків хом'яка (ЗМХ).

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на ізольованих ЗМХ (довжина 3–5 см, товщина близько 0,4 мм). Крім слизового епітелію, у складі ЗМХ наявна сполучна та м'язова тканини, а також розвинута мережа капілярів. Все це дозволяє припустити, що за допомогою ізольованого ЗМХ можна швидко та вирігдно оцінювати букальну проникність для різних макромолекул. Хом'яків забивали під ефірним наркозом. Виділені защичні мішки використовували негайно. Їх тричі промивали теплим розчином Рінгера-1 [2] при дослідженні проникності білків або розчином Рінгера-2 (р. Рінгера-1 з 5 ммоль/л ЕДТА) при дослідженні проникності ДНК. Ізольований ЗМХ обережно вивертали слизовою стороною назовні, наливали 1 мл чистого відповідного розчину Рінгера та занурювали у 5 мл цього розчину з речовиною, транспорт якої досліджували. Концентрація білків у розчині Рінгера-1 була  $4,4 \cdot 10^{-5}$ – $3,1 \cdot 10^{-3}$  ммоль/л, концентрація ДНК у розчині Рінгера-2 – 20 мкг/мл. Масова частка стимуляторів проникності становила 0,1–10 %. Інкубацію проводили на водяній бані при 37°C і постійному перемішуванні. Через визначені проміжки часу (1–30 хв) зсередини ЗМХ відбирали проби для подальшого аналізу. Як стимулятори проникності використовували дезоксихолат натрію – ДХН ("Fluka", США), додецилсульфат натрію – ДСН ("Sigma", США), та лізальбінову кислоту (ЛК) власного виробництва [3]. Проведено дослідження букальної проникності плазміді рBluSKM-neo (4,0 тис. п. н.) і білків пероксидази, б-інтерферону та ФІТЦ-міченого інсуліну. Проникність ДНК аналізували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

гомогенату слизової оболонки ЗМХ (праймери Mun-Neo sn (3'-AGG TCG ACT ACA ATT GGT ACA-5'), Mun-Neo asn (3'-TGT ACA ATT GAG ATC TC-5')); умови проведення ПЛР стандартні. Визначення вмісту пероксидази ("Sigma", США) проводили за допомогою колориметричної реакції з 3,3',5,5'-тетраметилбензидином ("Amersham", США). Концентрацію  $\alpha$ -інтерферону («Фарм Біотек», Україна) досліджували за допомогою диск-електрофорезу у 16%-му поліакриламідному гелі [11]. Після електрофорезу гелі фарбували Coomassie R250 за стандартною методикою, сканували на приладі HP Deskjet Professional. Концентрацію білка визначали за допомогою програми TotalLab 2,01. Інсулін («Індар», Україна) мітили ФІТЦ [5]. Визначення вмісту ФІТЦ-міченого інсуліну всередині ЗМХ проводили за допомогою флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse ("Varian", Австралія). Параметри визначення: опромінення при 496 нм, емісія – 507 нм. Розподіл ФІТЦ-інсуліну всередині слизової оболонки ЗМХ і шлях його транспорту досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії (мікроскоп Ломо).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені експерименти довели, що препарати ДНК не здатні проникати через слизовий бар'єр ЗМХ. Протягом 15 хв інкубації ДНК всередині ЗМХ не виявлялося, незалежно від того, використовувалися стимулятори всмоктування чи ні. ПЛР-аналіз показав, що введена плазмідна була відсутня і всередині тканини ЗМХ. Оскільки активність нуклеаз на поверхні слизової рота була блокована 5 ммоль/л ЕДТА, стає очевидним, що плазмідна не руйнувалася, а затримувалася зовнішнім шаром слизу і не проникала всередину тканини.

Проведені експерименти підтвердили літературні дані про те, що слизова оболонка рота ефективно затримує і білкові моле-

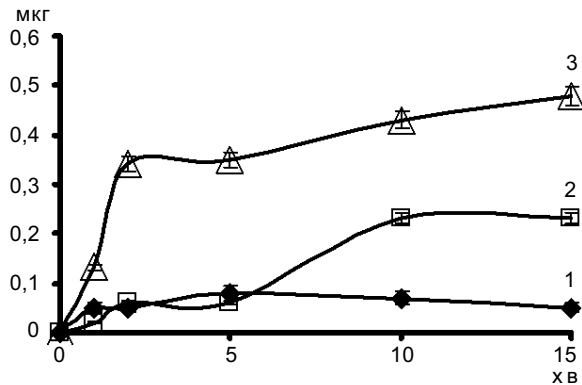


Рис. 1. Проникність защічних мішків хом'яка для  $\alpha$ -інтерферону (16 кДа): 1 –  $\alpha$ -інтерферон без лізальбінової кислоти (ЛК), контроль; 2 –  $\alpha$ -інтерферон і 1%-й розчин ЛК; 3 –  $\alpha$ -інтерферон і 5%-й розчин ЛК

кули з масою, що більша від 30–45 кДа [13]. Протягом усього часу інкубації без стимуляторів всмоктування пероксидаза не визначалася у ЗМХ у достовірних кількостях. Додавання в досліджуваний розчин різних стимуляторів (ДХН, ДСН, ЛК) істотно не змінювало проникність ферменту – пероксидазна активність у пробах вірогідно не відрізнялася від контрольного фону. Отримані результати добре узгоджуються з літературними даними, де також вказується, що пероксидаза не здатна долати зовнішній бар'єр слизової оболонки рота

[13]. Вона є занадто великим білком, і активізувати її транспорт через слизову оболонку без механічного порушення цілісності тканини поки що неможливо.

За відсутності стимуляторів всмоктування  $\alpha$ -інтерферон визначався в ЗМХ через 15–30 хв інкубації у слідових кількостях (рис. 1). Це добре узгоджується з літературними даними, де показано, що при букальному введенні без стимуляторів всмоктування  $\alpha$ -інтерферон визначався у кровотоці у кількостях, що не перевищували 1 % від уведеної дози [7]. Додавання стимулятора всмоктування (ЛК) у концентрації 1 % підсилювало перенесення  $\alpha$ -інтерферону через слизову в 5 разів уже на 10-й хвилині. Додавання того самого стимулятора в концентрації 5 % призводило до різкого посилення проникності в 6 і 9 разів на 2-й і 15-й хвилини інкубації відповідно (див. рис. 1).

Дослідження проникності ЗМХ для ФІТЦ-інсуліну показало, що слизова оболонка порожнини рота здатна пропускати інсулін при спільному введенні білка із стимуляторами всмоктування. Так, ЛК у концентрації 5 % підсилювала букальну проникність ФІТЦ-інсуліну більше ніж у 5

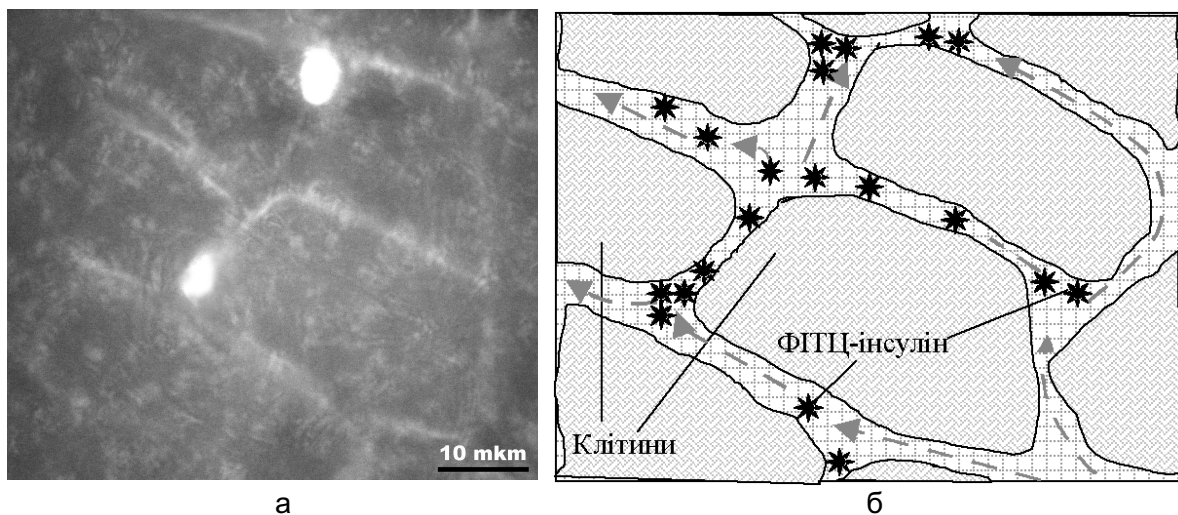


Рис. 2. Флуоресцентна фотографія (а) та схема (б) тканини слизової оболонки защічного мішка хом'яка після інкубації з інсуліном, міченим флюоресцеїном ізотіоціанату та лізальбіновою кислотою

разів уже на 10-й хвилині інкубації. Логічно припустити, що інсулін буде рухатися вглиб тканини переважно по каналам міжклітинної речовини внаслідок своєї гідрофільності. Це припущення було підтверджено практично. Використання флуоресцентної мікроскопії дозволило нам візуалізувати шлях, за яким ФІТЦ-інсулін долає слизову оболонку ЗМХ (рис. 2). Видно, що максимум флуоресценції спостерігається у міжклітинному просторі. Цей факт дозволяє стверджувати, що білок проникає у середину слизової оболонки рота в основному по міжклітинному простору. Дійсно, у деяких працях [12] показано, що білки рухаються переважно по так званим тканинним каналам. Беручи до уваги результати мікроскопічних досліджень та опубліковані дані [12], можна стверджувати, що букальна проникність білків забезпечується саме транспортом по каналам міжклітинної речовини. Це дозволяє більш спрямовано підбирати необхідні для букальної проникності макромолекул стимулятори всмоктування.

## ВИСНОВКИ

Результати досліджень проникності слизової оболонки для білків, отримані за допомогою моделі ЗМХ, чітко узгоджуються з даними про букальну проникність цих самих білків, отриманими *in vivo* за допомогою інших методів [7, 12, 13]. Таким чином, ЗМХ є простою та дешевою моделлю, за допомогою якої можливо досліджувати проникність слизової рота для різних речовин. За допомогою описаної вище методики можна також швидко підібрати оптимальний склад стимуляторів всмоктування для будь-якого препарату, а також дослідити механізм букального транспорту для низки високомолекулярних препаратів.

Досліди показують, що слизова оболонка порожнини рота є складним бар'єром, пропускну здатність якого можна підсилити

додаванням деяких сполук. Також показано вибірковість цього бар'єра. Зокрема, екзогенна ДНК затримується поверхнею слизової рота. Даних про проникнення ДНК через слизову рота знайти в літературі також не вдалося, нами вони наведені вперше. Непроникність слизової оболонки рота для нуклеїнових кислот можна пояснити їх потужним зарядом та великим розміром, що не дає змогу їм долати зовнішній слизовий бар'єр. Проникнення ж білкових молекул без стимуляторів всмоктування також практично не відбувається. Однак за допомогою моделі ЗМХ показано, що використання певних стимуляторів всмоктування дозволяє активізувати букальний транспорт таких невеликих білків, як інсулін чи  $\alpha$ -інтерферон.

**P. L. Starokadomskyy**

### **HAMSTER'S CHEEK POUCHES AS A MODEL FOR INVESTIGATION OF MACROMOLECULES PERMEABILITY THROUGH THE MOUTH CAVITY MUCOUS MEMBRANE**

The technique of permeability assessment for high-molecular compounds is presented in present work. Isolated hamster cheek pouches as a simple and convenient model for the transport studies were used. It was shown that a mucous membrane is permeable for  $\alpha$ -interferon, insulin but not for nucleic acids and peroxidase. Buccal permeability for insulin is provided by its transport through the intercellular ways. Data obtained in experiments with use of rodent keratinized mucous membrane could not be directly extrapolated to human buccal mucous permeability due to significant differences in the nature and organization of intercellular lipids in these species. However, we supposed that freshly isolated hamster cheek pouch could be employed as initial step of assessment for the fast screening of buccal permeability for the high-molecular compounds.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Генесина Т.И. Исследование проницаемости слизистой зашечных мешков хомяков для электролитов и неэлектролитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Одесса, 1971. – 22 с.
2. Справочник биохимика: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
3. Старокадомский П. Л., Дубей И. Я. Лизальбиновая

- кислота – новый стимулятор всасывания для буккального введения белковых препаратов // Укр. биохим. журн. – 2005 – **77**, №6. – С. 78–82.
4. Старокадомський П.Л., Скиба О.И. Проницаемость слизистой оболочки полости рта для некоторых неорганических и органических молекул // Вісн. стоматології. – 2003. – №3. – С. 2–9.
  5. Фримель Х. Иммунологические методы. – М.: Мир, 1979. – 518 с.
  6. al-Achi A., Greenwood R. Buccal administration of human insulin in streptozocin-diabetic rats // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. – 1993. – **82**, №3. – P. 297–306.
  7. Bayley D., Temple C., Clay V. et al. The transmucosal absorption of recombinant human interferon-alpha B/D hybrid in the rat and rabbit // J. Pharm. Pharmacol. – 1995. – **47**, № 9. – P. 721–724.
  8. Hubbard R.C., Casolaro M.A., Mitchell M. et al. Fate of aerosolized recombinant DNA-produced alpha 1-antitrypsin: use of the epithelial surface of the lower respiratory tract to administer proteins of therapeutic importance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – **86**, №2. – P. 680–684.
  9. Jacobsen J. TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability // Int. J. Pharm. – 1995. – **125**. – P. 165–184.
  10. Kataoka M., Masaoka Y., Yamazaki Y. et al. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs // Pharm Res. – 2003. – **20**, №10. – P. 1674–1680.
  11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **15**, 227. – P. 680–685.
  12. Senel S., Kremer M., Nagy K. et al. Delivery of bioactive peptides and proteins across oral (buccal) mucosa // Cur. Pharm. Biotech. – 2001. – № 2. – P. 175–186.
  13. Squier C.A., Eady R.A., Hopps R.M. The permeability of epidermis lacking normal membrane-coating granules: an ultrastructural tracer study of Kyrle-Flegel disease // J. Invest. Dermatol. – 1978. – **70**, №6. – P. 361–364.
  14. Tian-Zhi Y., Xiang-Tao W., Xue-Ying Y. et al. Phospholipid Deformable Vesicles for Buccal Delivery of Insulin // Chem. Pharm. Bull. – 2002. – 50, №6. – P. 749–753.
  15. Xu H.B., Huang K.X., Zhu Y.S. et al. Hypoglycaemic effect of a novel insulin buccal formulation on rabbits // Pharmacol Res. – 2002. – **46**, №5. – P. 459–467.