

П.Л. Старокадомський

Механізм букального транспорту інсуліну

Проведено обобщение теоретических и экспериментальных данных и предложен гипотетический механизм букальной проницаемости инсулина, который хорошо согласовывается с опубликованными экспериментальными данными. Указаны и описаны основные барьеры, которые должен преодолеть инсулин для того, чтобы через слизистую оболочку рта попасть в кровоток. На основе предложенного гипотетического механизма обосновано применение поверхностно-активных веществ для усиления букальной проницаемости инсулина. Предложенный механизм будет полезным при разработке новых белковых букальных препаратов.

Букальний спосіб введення, або введення препарату за допомогою його всмоктування слизовою оболонкою порожнини рота (СОПР), широко використовують для введення таких низькомолекулярних препаратів, як валідол, нітрогліцерин тощо. Нині зусилля багатьох дослідників сконцентровані на розробці систем для букальної доставки високомолекулярних препаратів, зокрема білків, для яких поки що ін'єкції є єдиним надійним способом введення. Головна проблема букального способу введення білків, як і всіх інших неін'єкційних методів: слабка проникність препаратів у кров і як наслідок – його низька ефективність та висока вартість порівняно з ін'єкційним введенням. Причина цього полягає у наступному. При ін'єкціях білкові препарати у достатній кількості вводяться під шкіру або у кровотік, тобто швидко та без втрат долають зовнішні захисні бар'єри організму (шкіра, слизові оболонки тощо). Подальша доставка білків забезпечується транспортними системами організму, що забезпечує швидкий і потужний ефект. Тому для підвищення ефективності букальних композицій стає актуальним пошук ефективного та безпечного способу посилення проникності СОПР для макромо-

лекул. Для цього потрібно визначити, що перешкоджає букальній проникності макромолекул.

Під проникністю ми надалі будемо розуміти перехід препаратів з місця введення у загальний кровотік або тканину-мішень. Протягом цього процесу молекули препарату долають низку бар'єрів – слизові оболонки, базальні мембрани тканин, стінки капілярів тощо. Для кожного виду бар'єрів характерні своя структура та функції. Узагальнену їх сукупність називають гісто-гематичним бар'єром (ГГБ) [2]. За існуючою класифікацією, слизова оболонка порожнини рота характеризується як частково ізолюючий гісто-гематичний бар'єр зі змінним рівнем проникності [2]. Це означає, що ізолююча здатність СОПР змінюється залежно від деяких факторів.

Для того щоб виділити основні фактори, які впливають на проникність, проведемо аналіз літературних даних з цього питання для білків на прикладі інсуліну.

Перші спроби букального введення інсуліну були невдалими. Виявилось, що сухі препарати інсуліну (у вигляді кристалів) не можуть подолати слизового бар'єра порожнини рота [4]. У вигляді водного розчину інсулін проходив крізь слизову оболонку

рота у недостатніх для терапевтичних ефектів кількостях [4]. З появою нових технологій можливість ефективного букального його введення ставала все більш реальною. Так, деякі автори, використовуючи ліпідні нанокапсули як стимулятор проникності інсуліну, відзначили значний гіпоглікемічний ефект у крові тварин через 7 год [25]. Також багатьма дослідниками було показано підсилення проникності інсуліну через СОПР при використанні як стимуляторів поверхнево-активних речовин (ПАР). Гіпоглікемічний ефект таких композицій звичайно сягав до 25–30 % порівняно з ін'єкційною дозою [22]. Однак, незважаючи на велику кількість відомостей з питань проникності СОПР, немає єдиної теорії букального транспорту білкових препаратів, хоча й описані різні гіпотетичні механізми, що забезпечують букальну проникність для окремих препаратів. Тому актуальним є виявлення та описання особливості букальної проникності для білків. Нижче, на основі узагальнення літературних та власних даних нами запропоновано гіпотетичний механізм, за яким деякі білки, зокрема інсулін, можуть долати букальний бар'єр.

Сучасні уявлення про транспорт білків всередині тканини. Основа будь-якої тканини складається з клітин і міжклітинної речовини (МР), або інтерстицію. Отже, теоретично, будь-яка молекула може рухатися всередині тканини двома шляхами – через клітини (трансклітинний шлях) і по міжклітинному середовищу. Оскільки білки, попадаючи всередину клітини, з високою часткою ймовірності руйнуються лізосомальними ферментами, то трансклітинний шлях проникності для них навряд чи є можливим. Справді, описані у літературі дані та власні результати мікроскопічних досліджень букального транспорту мічених модельних білків свідчать, що гідрофільні макромолекули транспортуються вглиб слизової рота в основному міжклітинним

простором [17–24]. Крім того, більшість білкових молекул-регуляторів організму досягають клітин-мішеней саме по міжклітинній речовині. Це можливо тому, що транспорт макромолекул є однією з найважливіших функцій міжклітинної речовини. Транспортна функція інтерстицію забезпечується розгалуженою мережею тканинних каналів, середній радіус яких становить 40–100 нм, а загальний об'єм, який вони займають – 1,5–2 % від загального об'єму міжклітинної речовини [1, 13]. Число каналів постійно змінюється і залежить від багатьох зовнішніх умов. Зокрема кількість тканинних каналів різко збільшується при травмах чи набряках [1]. Середній радіус каналу приблизно дорівнює радіусу молекули глобулярного білка з молекулярною масою 50–100 кДа, тому вони здатні рухатися по каналам інтерстицію. Про це свідчить градієнт концентрації білків у ньому – біля капілярів або на поверхні епітелію порожнин організму білків значно більше, ніж усередині МР [5].

Транспорт білків по МР регулюється низкою систем і факторів, зокрема ступенем гідратації МР, і тісно пов'язаний з процесом лімфоутворення [7, 8, 13]. Нині розглядають комплексний механізм транспорту, який зумовлюється, по-перше, конвекційним переносом речовини через циркуляцію водних розчинів і, по-друге, дифузією молекул у середовищі [3]. В основі вказаних процесів лежать існуючі в інтерстиційному просторі градієнти сил і концентрацій. Конвекційний перенос водних розчинів макромолекул визначається головним чином неоднаковим гідростатичним тиском у різних частинах МР. Вода, накопичуючись у інтерстицію, викликає набухання полімерів гіалуринової кислоти, що спричинює збільшення об'єму системи. Однак останньому перешкоджає мережа волокон еластину та колагену. Внаслідок збільшення тиску у міжклітинному просторі активізується піноцитоз, тобто відтік

рідини, у лімфатичні капіляри [1]. Енергія цього процесу і забезпечує рух розчинених речовин, зокрема білків, по каналах інтерстицію у певному напрямку [13]. Підвищення концентрації білка в інтерстицію також призводить до утворення градієнта, що, в свою чергу, викликає дифузію води з кровоносних судин у МР, підвищує осмотичний тиск і викликає ресорбцію МР у лімфатичні судини та евакуацію її надлишку разом з розчиненими у інтерстицію білками. При зменшенні концентрації білків у МР нижче від певного значення напрямок транспорту білків змінюється на протилежний і зумовлює міграцію макромолекул з кровоносних судин у МР [3].

Регуляція процесів транспорту всередині МР забезпечується тісною взаємодією деяких систем, у першу чергу кровоносної та лімфатичної. Дослідження показали, що вся сукупність транспортних комунікацій МР організована у вигляді функціональних блоків, які повторюються. Тому в деяких літературних джерелах вводиться поняття „функціонального блоку” інтерстицію [3]. Кожен блок у своєму складі містить фільтрувальні (прекапілярну артеріолу та посткапілярну венулу) та ресорбувальні елементи (лімфатичні мікросудини), які чітко орієнтовані одне відносно одного (рис. 1).

Отже, робота блоку забезпечується структурою та станом тканинних каналів, високою проникністю венул для макромолекул, фільтрацією рідини з капілярів по всій довжині, а також ритмічною активністю лімфатичної системи, яка евакуує надлишок рідини та макромолекул з блоку [3]. Очевидно, і терапевтичні білкові препарати, потрапивши в міжклітинний простір, внаслідок цього ефективно та швидко надходять у кровотік [16, 19, 21].

Гіпотетичний механізм букального транспорту. Наведені дані не пояснюють, як можуть посилювати букальну проникність білків додавання ПАР, хоча про це вказано у більшості праць. Транспорт білків

всередині тканин досить ефективно забезпечується системами організму, і роль ПАР у цьому процесі практично відсутня. Отже, білки долають додатково низку бар'єрів, про які не вказано у літературі, і проникність яких має підвищувати ПАР. Дійсно, жоден з авторів не аналізував таке питання – як при нанесенні на поверхню СОПР препарат потрапляє у міжклітинний простір, і які зовнішні бар'єри мають подолати молекули ліків. Тому проведемо аналіз сучасних даних щодо структури букального бар'єра і визначимо, у який спосіб можливо посилювати букальну проникність для білків.

Поверхня слизового епітелію вкрита шаром слизу, який можна вважати першим, зовнішнім бар'єром. Слиз – це в'язка рідина, основу якої складає вода та білки, в першу чергу такі глікопротеїни, як муцини та низка ферментів і проферментів. Основною функцією слизу, за твердженням багатьох дослідників, є механічний і



Рис. 1. Взаємна топографія кровоносних і лімфатичних мікросудин у блоці міжклітинної речовини: 1 – кровоносний капіляр, 2 – лімфатична судина, 3 – прекапілярна артеріола, 4 – посткапілярна венула

хімічний захист слизового епітелію. Однак уже є досить даних про агрегаційну активність муцинів. Показано, що муцини здатні викликати агрегацію макромолекул, а також деяких вірусів і мікроорганізмів [19, 20]. Як відомо, після агрегації білки втрачають біологічну активність і швидко інактивуються. Тому додавання ПАР дозволить запобігти агрегації білків. Подальший рух молекул, розчинених у зовнішньому шарі слизу, може зумовлюватися спрямованою дифузією під дією електричних сил [6]. Поява у шарі слизу електричного поля пояснюється неоднорідним розподілом деяких іонів, зокрема Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- тощо. Біля мембран клітин епітелію концентрація вказаних іонів підтримується клітинними системами у визначених концентраціях. У товщі слизу такі системи відсутні. Тому чим більша відстань від поверхні клітин, тим більшою буде різниця концентрації іонів. Це призводить до утворення слабого електричного поля, направлено перпендикулярно до площини слизової тканини. Тому використання речовин, що будуть укривати поверхню молекул білків рівномірним зарядом, буде стимулювати рух макромолекул у шарі слизу [6]. Цього можна досягти також за допомогою додавання ПАР.

Наступним бар'єром на шляху білкових молекул є зовнішній шар клітин епітелію. Здавалося б, для білків це не має суттєвого значення, оскільки вони здатні легко оминати клітини у міжклітинних коридорах. Але у поверхневому шарі міжклітинної речовини СОПР накопичується секрет так званих вкритих мембранами гранул [14, 17, 23]. Це гідрофобні сферичні гранули ліпідної природи діаметром близько 0,2 мкм, які утворюються у цитоплазмі клітин поверхневого шару слизового епітелію [23]. Після дозрівання вони мігрують до плазматичної мембрани і зливаються з нею, а їх вміст – суміш ліпідів і жирних кислот – секретується, внаслідок чого у міжклітинному

просторі формуються ліпідні гідрофобні „барикади”. Показано, що від концентрації таких гранул значно залежить проникність слизових оболонок для нікотину [15], поліпептидів [16] тощо. Отже, їх ліпідні компоненти відіграють роль гідрофобного бар'єра, який перекриває доступ зарядженим молекулам з порожнини рота всередину слизової тканини та навпаки. Очевидно і в цьому випадку ПАР зможуть екранувати ліпофобні ділянки білків та емульгувати ліпідні структури вкритих мембранами гранул, що полегшить проникність гідрофільних молекул препарату. Це дозволить букально введеної речовині потрапити всередину слизового епітелію, де він потрапляє у систему каналів МР.

Перед тим, як розчинений у водній фазі інтерстицію білок досягне капілярів, він повинен пройти ще через один бар'єр – базальну мембрану епітелію. Ця мембрана здатна пропускати крізь себе білки з молекулярною масою не більшою ніж 45 кДа. Тобто можуть проникнути молекули певного розміру, а більші молекули та надмолекулярні структури будуть затримуватися базальною мембраною як потенційно небезпечні. Базальна мембрана також може ускладнювати проникність гідрофобних молекул через високий вміст заряджених молекул.

Після подолання зовнішніх бар'єрів транспорт препарату буде забезпечуватись енергією транспортних систем організму. Це означає, що для ефективного введення білків через СОПР нам необхідно зосередитися на полегшенні подолання білками зовнішніх бар'єрів.

Отже, СОПР являє собою комплексну багатокомпонентну бар'єрну систему, складна будова якої дозволяє ефективно регулювати проникність екзогенних макромолекул. Надзвичайна ефективність бар'єрної функції пояснюється тим, що для кожного типу молекул послідовно стоять два чи більше бар'єрів. Наприклад, ліпо-

фільні молекули затримуються зовнішнім шаром слизу та базальною мембраною, гідрофільні не можуть подолати бар'єр вкритих мембранами гранул і плазматичних мембран клітин, великі макромолекули затримуються у тканинних каналах і базальній мембрані. Така продубльованість надає букальному бар'єрові значної ефективності. Зрозуміло, що для букального введення макромолекул важливо створити умови, які дозволять білкам подолати зовнішній слизовий шар і потрапити у власне міжклітинний простір. Схематично процес букальної проникності білкового препарату можна зобразити так, як це наведено на рис.2.

Запропонований механізм букального транспорту для макромолекул, який наведено вище, дозволяє теоретично окреслити ряд основних засад букального транспорту для білків. Нами проведено перевірку основних тверджень, використовуючи інсулін як маркерний білок.

Отже, за нашою гіпотезою, для інсуліну основними бар'єрами, що перешкоджають його букальній проникності, є слиз і зовнішній шар епітелію, інтерстицій якого насичений гідрофобним вмістом вкритих мембранами гранул. Характерним є те, що всі бар'єри знаходяться на зовнішній межі СОПР. Тому для посилення букальної проникності необхідно як стимулятор

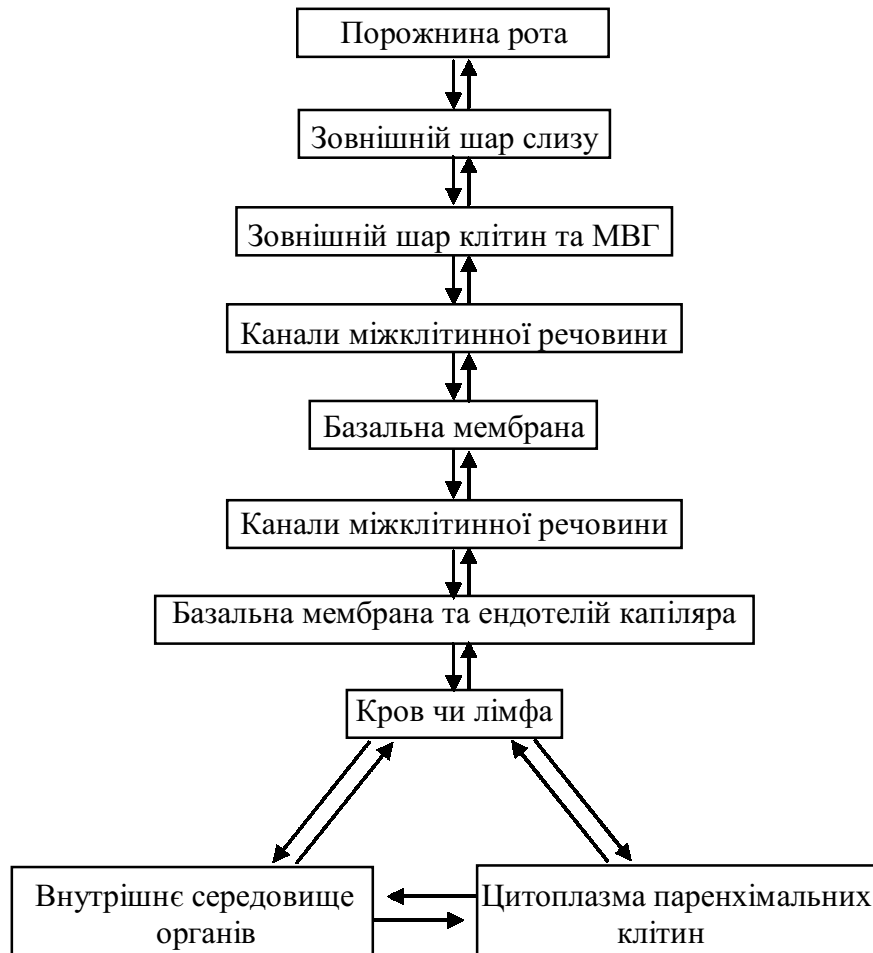


Рис. 2. Етапи букальної проникності молекул

проникності використовувати ПАР – це дозволить інсуліну подолати згадані бар'єри та потрапити у канали інтерстицію. Логічно припустити, що внаслідок своєї гідрофільності, після подолання зовнішнього бар'єра інсулін буде рухатися вглиб організму переважно по міжклітинному простору. Енергія руху забезпечується транспортними системами організму. Справді, це було підтверджено нами на практиці. Використання міченого флюоресцеїном ізотіоціанату інсуліну (ФІТЦ-інсуліну) дозволило нам візуалізувати процес проникнення білка всередину слизової оболонки [9]. Аналіз препаратів слизової оболонки рота за допомогою флуоресцентної мікроскопії показав, що ФІТЦ-інсулін, введений разом з ПАР, проникає всередину тканини [12].

З наведених вище даних випливає наступне твердження: рухаючись по міжклітинному простору, інсулін буде взаємодіяти з рецепторами на поверхні клітин слизової оболонки та підслизових тканин, локально нормалізуючи стан СОПР. Тобто букальний шлях введення інсуліну можна використовувати і для локальної корекції, наприклад для усунення стоматологічних ускладнень, викликаних нестачею ендогенного інсуліну (наприклад, у хворих на діабет 1-го типу). Нами показано високу локальну біологічну

активність інсуліну, введеного за допомогою букального шляху. Введення інсуліну разом з ПАР (надалі – інсулін/ПАР) щурам із стрептозотоциновим діабетом прискорювало процеси загоєння травм слизової оболонки порожнини рота до рівня здорових тварин [9–11].

Доведено позитивний вплив від букального введення суміші інсулін/ПАР на тканини пародонта тварин з діабетом. Букальне введення інсуліну таким щурам протягом 22 діб вірогідно знижувало розвиток пародонтозу, індукованого діабетом, на 10 %, протягом 70 діб – на 27 % (див. рис. 3) [9, 10].

ВИСНОВКИ

На основі узагальнення теоретичних та експериментальних даних запропоновано гіпотетичний механізм, який описує шлях букальної проникності білків, зокрема інсуліну, з моменту нанесення на поверхню слизової рота і до надходження білка у внутрішній простір організму. Описаний механізм добре пояснює наші експериментальні результати та узгоджується з літературними даними. Виявлено, що основними бар'єрами, які інсулін має подолати для того, щоб через слизову оболонку потрапити у кровотік, є слиз та зовнішній шар епітелію. На основі запропонованого

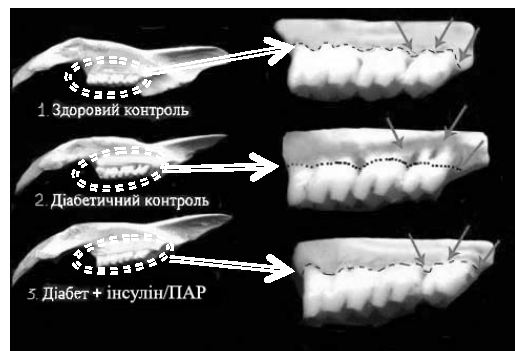
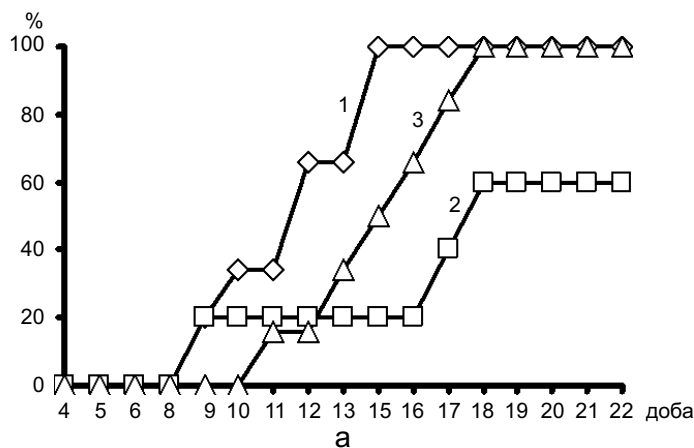


Рис. 3. Порівняння динаміки (а) епітелізації і загоєння травм слизової оболонки порожнини рота у здорових (1) і контрольних щурів з діабетом (2) та в діабетичних щурів, яким обробляли ЛКІН 3 рази на добу (3) та виразність (б) процесів пародонтозу у щурів різних експериментальних груп. Стрілками позначено – дійсну межу кісткової тканини

гіпотетичного механізму обґрунтовано та експериментально доведено ефективність використання поверхнево-активних речовин для посилення букальної проникності інсуліну. Також запропонований гіпотетичний механізм букальної проникності білків буде корисним при розробці нових білкових букальних препаратів.

P. L. Starokadomsky

MECHANISM OF THE BUCCAL PERMEABILITY OF SOME PROTEINS

Summary of theoretical and experimental data of insulin buccal permeability is presented in the article. The hypothetical mechanism of insulin buccal permeability which complies with published experimental data is proposed. The basic barriers for insulin before getting into blood through the mucous membrane of mouth are indicated and described. On the basis of the proposed hypothetical mechanism the application of surfactants for facilitating the buccal permeability of insulin is substantiated. The proposed mechanism will be useful for the development of new protein buccal preparations.

Institute of molecular biology and genetics, NAS of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гареев Р.А. Транскапиллярный обмен и лимфообразование. – Алма-Ата: Наука, 1989. – 141 с.
2. Горбань В.А., Зайко Н.Н. Материалы к систематизации гисто-гематических барьеров. – В кн.: Гисто-гематические барьеры и нейро-гуморальная регуляция. – М.: Медицина, 1981. – С.57–67.
3. Караганов Я.Л., Банин В.В. Интерстициальный транспорт как механизм обмена клеточной среды. – Там же. – С. 224–229.
4. Марченко А.И. Исследование физиологических механизмов всасывания слизистой оболочкой полости рта и языка: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Одесса, 1966. – 27 с.
5. Мунтина Д.У., Микитин Б.Н. Липидный состав крови и лимфы собак. – В кн.: Лимфообразование и транскапиллярный обмен: Тр. Ин-та физиологии АН Казах. ССР. – Алма-Ата, 1984. – 27. – С. 72–77.
6. Панков В.В. Транспорт липосом в слое слизи. – Пушино, 1987. – 46 с.
7. Поликар А.Ф., Колле А.С. Физиология нормальной и патологической соединительной ткани. – Новосибирск, 1966. – 69 с.
8. Росин Я.А. Учение Л.С. Штерн о гисто-гематических барьерах // Гисто-гематические барьеры и нейро-гуморальная регуляция. – М., 1981. – С.22–33.
9. Старокадомський П.Л. Створення букального

- препарату з інсуліном та оцінка його ефективності при корекції стоматологічних порушень у хворих на діабет 1-го типу: Автореф. дис. ... канд.біол.наук. – К., 2005. – 20 с.
10. Старокадомський П.Л., Кордюм В.А. Дослідження парадонтопротекторної активності нового інсулінвмісного букального препарату // Ендокринологія. – 2005. – 10, №1. – С. 28–35.
11. Старокадомський П.Л., Кордюм В.А. Дослідження соматотропної дії нового інсулінвмісного букального препарату // Там само. – 2004. – 9, №2. – С. 155–161.
12. Старокадомський П.Л. Защитні мішки хом'яка як модель для дослідження проникності слизової оболонки порожнини рота // Фізіол. журн. – 2006. – 52, № 1. – С. 101–105.
13. Юсин В.А., Султанов Ф.Ф. Очерки по экспериментальному изучению сосудисто-тканевой проницаемости. – Ашхабад: Ылым, 1969. – 255 с.
14. Chang F, Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Squier C.A. Covalently bound lipids in keratinizing epithelia // Biochim. and Biophys. Acta. – 1993. – 1150, №1. – P. 98–102.
15. Chen L.L., Chetty D.J., Chien Y.W. A mechanistic analysis to characterize oramucosal permeation properties // Int. J. Pharmacol. – 1999. – 5, № 184 (1). – P. 63–72.
16. He Y.L., Murby S., Gifford L., Collett A. et al. Oral absorption of D-oligopeptides in rats via the paracellular route // Pharm. and Res. – 1996. – 13, №11. – P. 1673–1678.
17. Hill M.W., Squier C.A., Linder J.E. A histological method for the visualization of the intercellular permeability barrier in mammalian stratified squamous epithelia // Histochem J. – 1982. – 14, №4. – P. 641–648.
18. Hoogstraate A.J., Cullander C., Nagelkerke J.F. et al. Diffusion rates and transport pathways of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled model compounds through buccal epithelium // Pharm. and Res. – 1994. – 11, №1. – P. 83–89.
19. Li C.Y., Zimmerman C.L., Wiedmann T.S. Diffusivity of bile salt/phospholipid aggregates in mucin // Ibid. – 1996. – 13, №4. – P. 535–541.
20. Mandel I.D. The functions of saliva // J. Dent. Res. – 1987. – № 66. – P. 623–627.
21. Nicolazzo J.A., Reed B.L., Finin B.C. Buccal penetration enhancers—How do they really work? // J. Contr. Release. – 2005. – 105. – P. 1–15.
22. Oh C.K., Ritschel W.A. Biopharmaceutic aspects of buccal absorption of insulin // Meth. Find. Exp. Clin. Pharm. – 1990. – 12, №3. – P. 205–212.
23. Raknerud N. The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr/hr) mouse. IV. Lamellated bodies (Odland bodies, membrane-coating granules) and intercellular material in the upper part of the granular and horny layers // Virch. Arch. Biol. Cell Pathol. – 1976. – 17, № 21(3). – P.189–210.

24. Simonetti O., Hoogstraate A.J., Bialik W., Kempenaar J.A., Schrijvers A.H., Bodde H.E., Ponc M. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy // Arch. Dermatol. Res. – 1995. – **287**, №5. – P. 465–473.
25. Venugopalan P., Sapre A., Venkatesan N., Vyas S.P. Pelleted bioadhesive polymeric nanoparticles for buccal delivery of insulin: preparation and characterization // Pharmazie. – 2001. – **56**, №3. – P. 217–219.

Ин-т молек. біології і генетики НАН України

Матеріал надійшов до редакції 22.02.2006