

УДК 616.31—002.6:612.015.1

А. П. Левицкий, Р. Д. Барабаш, Т. И. Генесина

ПУТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ ЧЕРЕЗ СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЗАЩЕЧНЫХ МЕШКОВ ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯКОВ

Одним из важнейших физиологических свойств гидролитических ферментов является выраженное влияние на проницаемость тканевых барьеров, и это их свойство послужило основой для широкого применения гидролаз в качестве лекарственных средств при различных видах патологии у человека. Однако, до сих пор в литературе нет данных о возможности всасывания слизистой оболочкой ротовой полости высокомолекулярных соединений, в частности ферментов.

Мы изучали транспорт ферментов через слизистую оболочку щечных мешков золотистых хомяков.

Методика исследований

В эксперименте использовано 130 золотистых хомяков. В опытах *in vitro* выделенные у хомяков мешки выворачивали наружу слизистой оболочкой и закрепляли на стеклянной канюле. В опытах *in vivo* у хомяков под уретановым наркозом выделяли щечные мешки и выводили наружу через ротовое отверстие, сохраняя их кровоснабжение и иннервацию. Мешки, вывернутые наружу слизистой оболочкой, заполняли раствором Кребс—Хензелята и опускали в термостатированные кюветы, каждая из которых содержала растворы ферментов, меченных ^{131}I . Метили ферменты следующим образом. К раствору Na^{131}I (0,5 мКи в 0,5 мл) прибавляли 0,5 мл 2 % CH_3COOH и одну каплю насыщенного раствора KIO_3 . Спустя 2 мин прибавляли 1,0 мл раствора фермента (5—20 мг белка) и 2 мл насыщенного раствора NaHCO_3 . Через 20 мин, диализировали против проточной воды в течение 48 ч (до отсутствия радиоактивности во внешней жидкости диализатора). Концентрация всех использованных ферментов составляла 125 мкг/мл, удельная активность раствора — 0,25 мКи/мл. Проникновение меченых ферментов через слизистую оболочку мешков оценивали по приросту радиоактивности внутри мешка спустя 30 мин, 1, 2, 3, 4 ч инкубации и включению в ткань мешка. Подсчет радиоактивности препаратов проводили на установке УМФ-1500 с пересчетным устройством ПП-16. Результаты представлены в виде процента проникновения и включения в слизистую оболочку на грамм ткани. Проникновение немеченой РНКазы слюны через слизистую оболочку оценивали по приросту в течение 5 ч активности (рН 7,8) этого фермента в жидкости, находящейся внутри мешка [4], а калликреина — по БАЭЭ-эстеразной активности [1]. Цифровые данные были подвергнуты статистической обработке [5].

Результаты исследований и их обсуждение

Наши исследования показали, что через слизистую оболочку щечных мешков хомяков, которая использовалась нами из-за сходства с ротовым эпителием человека [8], проникают гидролитические ферменты. При изучении транспорта ферментов через слизистую оболочку полости рта *in vitro* и *in vivo*, было установлено, что проникновение калликреина в РНКазы протекает в шесть—восемь раз активнее при сохранении кровоснабжения и иннервации щечных мешков (рис. 1, 2) и начинается значительно быстрее. Прирост БАЭЭ-эстеразной и РНКазной активностей наблюдается и при их инкубации в среде, не содержащей калликреина и РНКазы (рис. 1, 2), по-видимому, в результате выхода слюнных и тканевых ферментов из стенки мешка и поступления из плазмы крови.

При исследовании проникновения меченых ферментов через слизистую оболочку (см. таблицу) установлено, что с увеличением времени инкубации переход ферментов в жидкость внутри мешка увеличивается. Проникновение ферментов сопровождалось накоплением их в ткани мешка. Эффект резорбции разных ферментов через слизистую оболочку был неодинаковым, что, очевидно, связано как с физико-химическими свойствами их так и с физиологическими особенностями данной мембраны. Наиболее активно

проникала через слизистую оболочку РНКазы (м. в. — $1,3 \times 10^4$ дальтон). Для этого фермента отмечено также высокое накопление в ткани щечного мешка. Панкреатическая РНКазы легко проникает через клеточные оболочки и даже из клетки в клетку в энзиматически активной форме [3, 6, 7]. Высокий уровень проникновения гиалуронидазы, очевидно, связан с деполимеризацией гликозамингликанов, что приводит к разобщению межфибриллярных связей в коллагеновых волокнах [2].

Как показали наши опыты, слюнной калликреин проникал через слизистую оболочку полости рта, что является весьма существенным в понимании физиологии и патологии

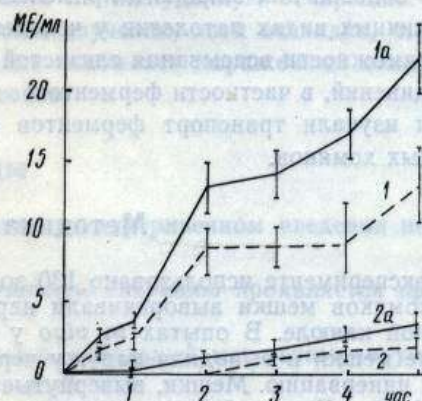
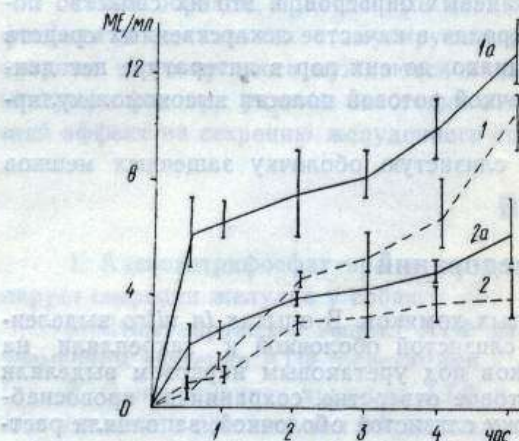


Рис. 1. Активность РНКазы внутри вывернутых щечных мешков хомяков *in vitro* (1, 1a) и *in vivo* (2, 2a) при инкубации их в контрольной среде (1, 2) и в среде, содержащей 50 мкг/мл очищенной РНКазы слюны кролика (1a, 2a).

Рис. 2. Активность калликреина внутри вывернутых щечных мешков хомяков *in vitro* (1, 1a) и *in vivo* (2, 2a) при инкубации их в контрольной среде (1, 2) и в среде, содержащей 1,76 МЕ/мл очищенного калликреина смешанной слюны хомяка (1a, 2a).

гии тканей ротовой полости. Проникновение калликреина наряду с РНКазой в полости рта объясняет роль этих ферментов в патогенезе пародонтоза. Несмотря на довольно высокий молекулярный вес ДНКазы (63 000 дальтон), она проникала через слизистую оболочку щечных мешков хомяков, но незначительно в ней накапливалась.

Проникновение и включение ферментов через слизистую оболочку щечных мешков хомяков *in vivo* (%)

Фермент	Статистический показатель	Проникновение спустя					Включение
		30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	
Лизоцим	M	0,113	0,242	0,353	0,467	0,688	55,51
	±m	0,0164	0,0308	0,0352	0,0448	0,0507	3,84
Гиалуронидаза	M	0,103	0,237	0,657	0,888	1,414	46,871
	±m	0,0141	0,0316	0,114	0,122	0,194	3,106
РНКазы	M	0,161	0,467	0,820	1,428	1,613	57,80
	±m	0,0318	0,164	0,187	0,352	0,375	5,58
ДНКазы	M	0,124	0,352	0,662	0,811	1,089	16,807
	±m	0,050	0,083	0,154	0,132	0,129	2,198
Калликреин	M	0,116	0,268	0,460	0,675	1,366	37,66
	±m	0,0191	0,0460	0,0572	0,0923	0,193	2,707
Трипсин	M	0,146	0,210	0,465	0,553	0,713	58,43
	±m	0,016	0,024	0,076	0,091	0,098	3,066

В ряде исследований было показано, что через десневой эпителий проникают вещества с м. в. 4×10^4 дальтон и более, проникновение связано не столько с размером молекулы, сколько с видовыми особенностями слизистой оболочки [9, 10].

Полученные данные позволили предположить существование двух потоков. На гипотетической схеме (рис. 3) показано, что проникновение молекул фермента представляет собой результирующую этих потоков: межклеточного диффузионно-осмотического и через мембрану клеток. Эффект проникновения определяется взаимодействием I и II потоков. Для оценки двух потоков мы использовали два показателя: собственно

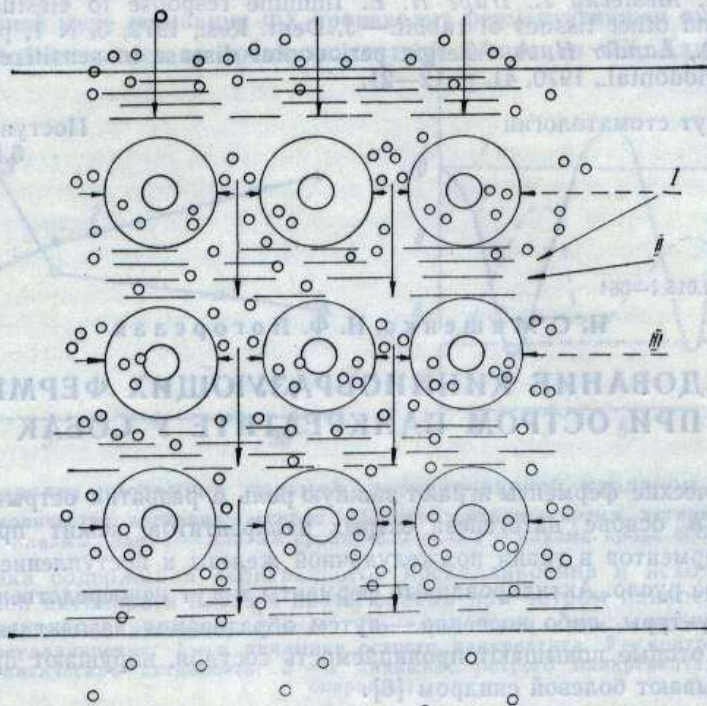


Рис. 3. Схема проникновения и включения в слизистую оболочку полости рта.

I — РНКаза, II — ДНКаза, III — трипсин.

проникновение и включение в ткань слизистой оболочки. В результате проведенных нами исследований удалось показать, что РНКаза, калликреин, гиалуронидаза участвуют в обоих потоках. Можно полагать, что транспорт этих ферментов осуществлялся как через межклеточные пространства, так и внутрь клетки. Для ДНКаза преимущественно характерен I поток, то есть по межклеточным пространствам, тогда как для лизоцима — проникновение через клеточные мембраны.

Таким образом, полученные данные показывают существование физиологических механизмов проникновения ферментов из ротовой жидкости в ткани слизистой оболочки, а также свидетельствуют о возможности целенаправленного воздействия применением гидролитических ферментов на метаболизм пораженных тканей пародонта и слизистой оболочки полости рта, практически независимо от глубины локализации патологического процесса.

Литература

1. Барабаш Р. Д., Левицкий А. П. Казеинолитическая и БАЭЭ-эстеразная активность слюны и слюнных желез крыс в постнатальном онтогенезе. — Бюл. эксперим. биол. и мед., 1973, № 8, с. 65—67.
2. Иванова А. С. К вопросу о противофиброзных свойствах лидазы при экспериментальном бериллиозе. — Фармакол. и токсикол., 1976, № 4, с. 474—477.
3. Куриненко Б. М., Беляева М. И., Черепнева И. Е., Куприянова-Ашина Ф. Г. Проницаемость нуклеазы, связанная с декстраном через сосудистый барьер и оболочку опухолевых клеток. — Вопросы онкологии, 1977, 25, № 5, с. 86—90.