

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВСАСЫВАНИЯ РАЗНЫХ ФОРМ ВИТАМИНА D3

Мартиньш Борудушкис
Факультет биологии ЛУ

Анна Рамата-Стунда
Факультет биологии ЛУ

Гуна Биланде Медицинский
факультет ЛУ, SIA Jūrmalas slimnīca,
SIA Aiwa clinic

Др. мед. Алексей Дерев
Врач-интернист, гастроэнтеролог
Ассоциированный профессор RSU
Амбулаторная часть RAKUS
Латвийский центр морской медицины

Витамин D имеет доказанное важнейшее значение для нормального функционирования человеческого организма, поэтому на данный момент — это единственный витамин, необходимость дополнительного приема которого доказана, и в отдельных регионах ассоциации врачей поддерживают его регулярный прием с соблюдением рекомендаций по применению конкретной формы и контролем уровня витамина D в крови [1,2]. Споры относительно лучшей для постоянного приема формы витамина D, в т.ч. формы, которая всасывается в полости рта, продолжаются на протяжении многих лет, с тех пор, как стали коммерчески доступны разные формы витамина D.

Это особенно важно для пациентов с синдромом мальабсорбции независимо от его генеза. Во многих странах проводились многочисленные исследования для оценки эффективности разных форм, и часть из них отражена в этой статье.

Несмотря на мальабсорбцию витамина D у пациентов с заболеваниями печени или желудочно-кишечного тракта, зачастую уровню витаминов в организме этих пациентов не придается особого значения. Несмотря на то, что им часто назначается витамин D, достаточная абсорбция этих лекарств не задокументирована [3].

Известно, что витамин D является жирорастворимым, и его относительная биодоступность при приеме в твердой форме (капсуле) может привести к неблагоприятным последствиям, поскольку его выделение является фактором, ограничивающим скорость абсорбции, при этом следует помнить о том, что биодоступность связана не только с фармакологически активными молекулами, но и с использованными составами и вспомогательными веществами.

Считается, что при распылении в полости рта микрокапли витамина D3 быстро и полностью всасываются через слизистую оболочку щек в многочисленные капилляры и вены, которые находятся близко к поверхности ткани.

С учетом вышесказанного, целью рабо-

ты MC Satia с соавторами было сравнение абсорбции витамина D3 в форме мягких желатиновых капсул для приема внутрь (1000 МЕ в одной капсуле) и буккального аэрозоля (500 МЕ/одна доза) у здоровых людей и пациентов с синдромом кишечной мальабсорбции. Эта рабочая группа включила в свое исследование 40 человек (в том числе 12 в качестве контрольных случаев). Исследование состояло из двух этапов:

1 – пациенты были случайным образом распределены в одну из групп и в течение 30 дней получали одну из форм витамина D3 (общая дневная доза составляла 1 000 МЕ),

затем следовал 30-дневный период выведения, а на втором этапе участники менялись группами, то есть те, кто получали капсулы, были направлены в группу буккального спрея и наоборот, продолжая получать витамин D3 на протяжении еще 30 дней.

В результате авторы пришли к выводу, что форма буккального аэрозоля смогла заметно увеличить среднюю концентрацию витамина D в сыворотке крови по сравнению с мягкими желатиновыми капсулами (в 1,9 раз) как у здоровых людей, так и у пациентов с синдромом кишечной мальабсорбции (в 2,6 раз) [4].

Несмотря на коммерческую доступность препарата, мало известно об эффективности пероральной формы витамина D, которая в основном всасывается

в мембраны полости рта, неба и под языком, а не в желудочно-кишечном тракте [5]. Результаты последних исследований также свидетельствуют о том, что витамин D3 для приема внутрь может обеспечить более быстрый путь абсорбции, чем капсулы, и может быть эффективен для пациентов с мальабсорбцией пищеварительного тракта [4]. В связи с липофильной природой витамина D аэрозоли для приема внутрь, содержащие этот микроэлемент, обычно содержат транспортное вещество TAG, а также солибилизирующие вспомогательные вещества, например, α-токоферол и олеиновую кислоту, которые способствуют пассивной абсорбции микроэмульгированного раствора в системной циркуляции [6]. Это достигается за счет рассредоточения капиллярных лож в слизистой оболочке полости рта [7].

Поэтому коллектив авторов из Ирландии провел рандомизированное исследование, в котором были задействованы 22 здоровых участника, получавших 3000 МЕ (75 µg) витамина D3 (в форме капсул или орального спрея). Подобно тому, как это было сделано в предыдущем исследовании, авторы распределили участников в одну из, способные повлиять на всасывание витамина D3.

Исследование, проведенное в Латвии

Наконец, важно отобразить результаты исследования, проведенного в этом году в Латвии. Целью исследования *in vitro* было изучение проникающей способности и безопасности для тканей слизистой оболочки рта различных доступных на рынке аэрозольных форм витамина D3 в разные интервалы времени и доказать абсорбцию активного вещества холекальциферола (витамина D3) буккально-сублингвальным способом. Исследование проводилось с исполь-

зованием Лаборатории биоаналитических и биодозиметрических методов ФБ ЛУ и базы InCell SIA при поддержке SIA pharm&med.

Тканевые культуры и питательная среда для их культивирования

Для выполнения исследования были использованы тканевые культуры EpiOral (MatTek, кат. № ORL-212 вер.3.0, Лот № 31634 и Кат. № ORL-200 вер.3.0, Лот № 31634, чтобы вместе получить 36 образцов тканей). Тканевые культуры культивировались в рекомендованной производителем питательной среде для культивирования ORL-200 Assay Media (MatTek, Кат. № ORL-200-ASY, Лот № 112919TVKD) с использованием 6-луночных стерильных планшетов для культивирования тканей (MatTek, Кат. № MW-15-003-0027). Все действия, связанные с культивированием тканей и применением тестируемых образцов, проводились в ламинарных боксах. Ткани культивировались в инкубаторе Binder при 37°C, 5 % CO₂.

Тестируемые образцы и контроль

В исследовании использованы следующие образцы (см. таблицу ниже)

Дополнительно в качестве контрольного соединения использовался диацетат флуоресцеина – FDA (Sigma, 7378), а также применялся негативный контроль – ткани, в которых конкретный объем образца был заменен на фосфатный буфер – PBS (pH 7.4). Все образцы использовались в одинаковой дозе.

Применение тестируемых образцов на тканях EpiOral

После получения тканей, в соответствии с рекомендациями производителя, они были отделены от агара и перенесены в предварительно нагретую питательную среду (объем 1 мл), помещенную в 6-луночный планшет. Ткани оставляли для инкубации на ночь (12-16 часов) при 37°C, 5 % CO₂. После ночной инкубации проводилась замена 1 мл питательной среды. Апикальную поверхность ткани два раза промывали в 400 мкл PBS (MatTek, TC-PBS, фосфатный буферный раствор, pH 7.4).

После данных манипуляций образцы тканей были подготовлены к тестиро-

ванию. Перед нанесением образцов на ткани каждый вид продуктов распылялся в пробирки объемом 1,5 мл. С помощью микропипетки каждый образец наносился в объеме 40 мкл, чтобы он закрывал всю апикальную поверхность тканей. В качестве негативного контроля в исследование были включены ткани без покрытия, к которым добавлялось 40 мкл фосфатного буферного раствора, для сравнительного контроля – ткани, обработанные диацетатом флуоресцеина (растворенным в диметилсульфоксиде (DMSO)). Через два часа тканевые вкладыши были сфотографированы с помощью объектива цифрового фотоаппарата Canon EFS 18-55 мм. Дополнительно была проведена микроскопическая оценка с использованием микроскопа Leica DMI4000B и получены фотоснимки с помощью встроенной в микроскоп камеры и программы Axio Vision 4.8. Через 30 минут и два часа были собраны аликвоты тканевой питательной среды по 0,5 мл для дальнейшего проведения количественного анализа абсорбции витамина D₃. Эксперимент проводился с тремя повторами – каждый из тестируемых образцов, а также контрольные образцы наносили на три образца тканей.

Оценка жизнеспособности тканей

Жизнеспособность тканей оценивалась в соответствии с протоколом, рекомендованным поставщиком тканей, с использованием восстановительных тестов MTT (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид). Для проведения теста использовались концентрат реагента MTT (MatTek, кат. № MTT-100-CON, Лот № 102219TVKA), растворитель (MatTek MTT-100-DIL), экстракционный

раствор MTT (MatTek, MTT-100-EXT) и 24-луночные планшеты (MatTek, MW-15-003-0028). В ламинарном боксе путем переноса концентрата MTT в растворитель был подготовлен рабочий раствор MTT. В каждую лунку 24-луночного планшета вносили 300 мкл рабочего раствора MTT и выдерживали планшет при температуре 37°C. После 6 часов инкубирования с образующимися покрытиями образцами и контрольными образцами тканевый материал три раза прополаскивали в 400 мкл PBS (MatTek, TC-PBS), чтобы избавиться от покрытия. В ламинарном боксе промытые ткани помещали в предварительно нагретый 24-луночный планшет с реагентом MTT и инкубировали 3 часа при 37°C, 5 % CO₂. Раствор окрашивался в фиолетовый цвет пропорционально количеству живых клеток в тканях. Незадолго до окончания срока инкубации в другой 24-луночный планшет вносили по 2 мл экстракционного раствора MTT в каждую лунку. Извлекали ткани из раствора MTT, просушивали их фильтровальной бумагой и переносили ткани в экстракционный раствор. Ткани инкубировали в экстракционном растворе в течение ночи – 12-16 часов при комнатной температуре, обеспечивая защиту планшета от доступа света. После инкубации ткани извлекали из экстракционного раствора и утилизировали, хорошо перемешивали экстракционный раствор и переносили его на 96-луночный планшет по 200 мкл в лунку с тремя техническими повторами (соответственно для каждого отдельного образца тканей проводилось три измерения). С помощью считывателя микропланшетов TECAN 200 Pro фиксировалась оптическая плотность при длине волны 570 нм. Коррекция фона выполнялась путем вычитания поглощения при длине волны 650 нм.

Таб.1 | Тестируемые образцы

Кодировка	Расшифровка состава тестируемых образцов
Состав LYL EFFUSIO® плацебо	Плацебо – водная основа без активного вещества
Состав LYL EFFUSIO®	Водная основа, встроенный в наночастицы холекальциферол
Состав LYL COMPOSITUM® плацебо	Плацебо – водная основа без активного вещества
Состав LYL COMPOSITUM®	Водная основа, холекальциферол
Состав LYL BASIS® плацебо	Плацебо – масляная основа без активного вещества
Состав LYL BASIS®	Масляная основа, холекальциферол
Состав LYL EXCELSIS® плацебо	Плацебо – водная основа без активного вещества
Состав LYL EXCELSIS®	Встроенный в липосомы холекальциферол на водной основе
Состав LYL MICRO® плацебо	Плацебо – водная основа без активного вещества
Состав LYL MICRO®	Водная основа, встроенный в микроэмульсию холекальциферол

Оценка диффузии холекальциферола (витамина D₃), с использованием мембраны

Для оценки диффузии через мембраны (0,45 *мкм Кат. № PRO4114, Лот № R8EA76013 из Millipore) была использована автоматическая система трансдермальной вертикальной диффузии с шестью ячейками. Производитель: Hanson Research Corporation, модель: 6 cell Vision Microette diffusion test system. В вертикальных диффузионных ячейках в качестве приемного раствора была использована смесь 70 % этанола/воды общим объемом 10 мл, объем нанесения образца 100 мкл, площадь мембраны для соприкосновения с образцом – 0,64 см². Система настраивалась для сбора образцов 0,5 мл через 30 минут, 3 часа и 16 часов в режиме постоянной температуры 37°C и скорости перемешивания 100 об./мин. Образцы автоматически собирались в хроматографические бутылки для немедленной квантификации холекальциферола (витамина D₃).

Данные хроматографического анализа

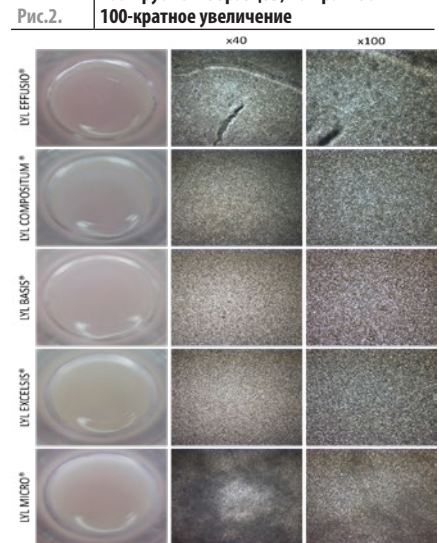
Для квантификации холекальциферола (витамина D₃) было использовано устройство для жидкостной хроматографии ультравысокой эффективности (UHPLC) Agilent 1290 Infinity series с диодно-матричным детектором (DAD), соединенным с масс-спектрометром высокого разрешения Agilent 6230 TOF LC/MS). Хроматографический анализ выполнялся с использованием колонок Kinetex C18, 3,00×100 мм, 2,6 μm (Phenomenex). Под-

вижная фаза состояла из 0,1 % муравьиной кислоты в воде (А) и 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле (В). Скорость потока составляла 0,3 мл мин⁻¹ со следующей программой использованного градиента: 0 мин, 50 % В; 3,0 мин, 50 % В; 5,0 мин, 98 % В; 10 мин, 98 % В; 11 мин, 50 % В; 15 мин, 50 % В. Температура термостата колонки составляла 40 °С, объем инъекции образца – 5 мкл. Аналит был обнаружен с помощью DAD при 265 нм и масс-спектрометра. Данные масс-спектрометрии: распыление электронов в позитивном режиме (ESI+), температура сушильного газа 325 °С и скорость потока 12 мл/мин, напряжение фрагментации 130 V, давление распыления 40 psi, диапазон сканирования m/z 100 – 1000. Внутренняя калибровочная жидкость – 121,050873 m/z и 922,009798 m/z (G1969-85001 ES-TOF Reference Mass Solution Kit, Agilent Technologies) использовалась в течение всего времени проведения анализов. Полученные хроматограммы были обработаны с помощью программы обработки данных MassHunter Qualitative Analyses B.07.00.

Подготовка образцов и их анализ

Для проведения квантификации были приготовлены шесть стандартных растворов витамина D₃ с соответствующей концентрацией: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 μг мл⁻¹. Сначала, используя аналитически чистое стандартное вещество холекальциферола (Sigma-Aldrich) и 96 % этанол (Sigma-Aldrich), приготовили исходный стандартный раствор с концентрацией 1000 мкг мл⁻¹.

Изображение. Микроскопический анализ EpiOral через 2 ч после нанесения тестируемых образцов, 40-кратное и 100-кратное увеличение



Результаты

Влияние покрытий на жизнеспособность тканей

Результаты показали, что разница между образцами невелика и свидетельствует о том, что тестируемые образцы не оказывают значительного влияния на жизнеспособность тканей. Полученные результаты показаны на рисунке ниже. Ни один из образцов не показал цитотоксического действия, в целом изменение жизнеспособности тестируемых образцов не велико, чтобы можно было предположить, что тестируемый материал не цитотоксичен. Небольшие колебания результатов можно объяснить плотностью конкретной композиции и несколько различающимися механическими свойствами, что могло оказать незначительное влияние на газообмен в тканях и их жизнеспособность.

Микроскопическая и макроскопическая оценка тканевых культур EpiOral

После инкубации с образцами препаратов, содержащими витамин D₃, культуры тканей исследовали под микроскопом и, используя интегрированную в микроскоп камеру, документировали структуру тканей. Дополнительно была сделана цифровая фотография апикальной поверхности тканей для оценки и документирования макроскопически измеримых изменений структуры тканей. И снимки под микроскопом, и макроскопическая оценка апикальной поверхности

Изменения жизнеспособности тканей EpiOral через 2 ч после нанесения тестируемых образцов, изменения показаны как относительные изменения (%) по отношению к негативному контролю. Негативный контроль – ткани без покрытия, FDA – дигидрат флуоресцеина

Рис.1.



Таб.2. Концентрация холекальциферола в тестируемых образцов

Контрольные образцы	UV, площадь пика	D3 γ, μг/мл
LYL EFFUSIO®	207,59	4,34
LYL COMPOSITUM®	97,56	2,04
LYL BASIS®	162,85	3,41
LYL EXCELSIS®	2,94	0,06
LYL MICRO®	94,22	1,97

тканей показывают, что тестируемые образцы не оказывают влияния на структуру тканей. Микроскопический анализ показал типичную ячеистую морфологию клеток характерную для тканей EpiOgal. Эти наблюдения подтверждают данные, уже полученные во время теста жизнеспособности тканей, о том, что прошедшие тестирование образцы образующих покрытие компонентов не оказывают негативного влияния на жизнеспособность тканей, к тому же они указывают на то, что образцы не оказывают влияние также на структуру и целостность тканей.

Количественная оценка диффузии холекальциферола (витамина D3) через мембраны

Для относительного сравнения эффективности диффузии холекальциферола (витамина D3) между образцами была выбрана автоматическая система вертикальных диффузионных ячеек, в качестве барьера использовались целлюлозные мембраны так, как описано в методе. Были выбраны временные промежутки: 30 минут, немного увеличенный – 2 часа, а также 16 часов. Результат миграции рассчитывался на основании определения концентрации витамина D3 в контрольных образцах и анализируемых образцах. Определенная в контрольных образцах концентрация была принята за 100 % – максимальная концентрация, способная диффундировать через мембраны. Была проведена статистическая обработка результатов между техническими повторами с расчетом стандартных отклонений. Результаты свидетельствуют о том, что лучшие

показатели миграции холекальциферола были у образцов LYL EFFUSIO® и LYL MICRO®, хотя самые большие численные показатели процентного соотношения миграции были у образца LYL EXCELSIS®, однако этот показатель нельзя оценивать как объективный, поскольку абсолютное количество холекальциферола, прошедшее через мембрану, весьма незначительно, что при малой детекции в тестируемых образцах дает высокий процентуальный результат. Несмотря на то, что концентрация холекальциферола в тестируемых образцах значительно отличается, абсолютное количество холекальциферола, которое могло мигрировать через мембрану, в LYL MICRO® было в 32 раза больше.

Концентрация или абсолютное количество холекальциферола (витамина D3) в контрольных образцах показано на рисунке ниже.

Данное исследование позволило сделать вывод, что

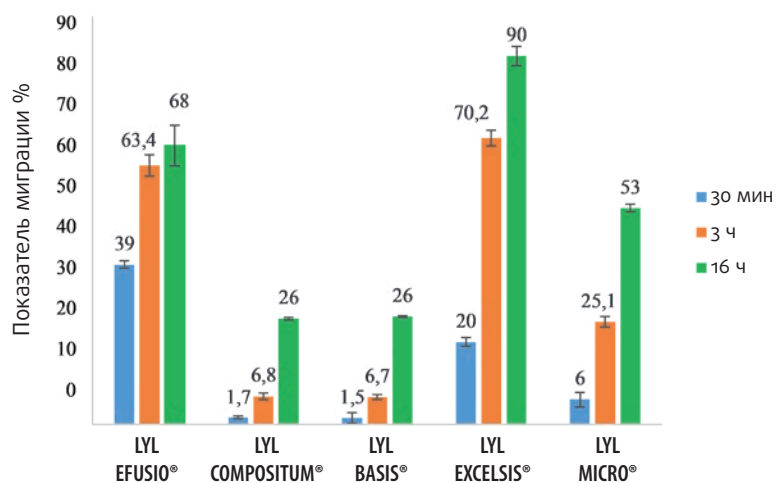
- Протестированные композиции, содержащие витамин D3, не оказывают существенного негативного влияния на жизнеспособность эпителиальной ткани слизистой оболочки рта, что

свидетельствует о безопасности препарата.

- Чтобы характеризовать эффективность миграции заключенного в липосомы витамина D3 (формула LYL EXCELSIS®) через целлюлозную мембрану, было бы необходимо оптимизировать тестовую систему, в том числе, за счет использования среды человеческой слюны в моделирующих жидкостях.
- Наилучшие показатели миграции витамина D3 через целлюлозную мембрану во всех протестированных временных точках продемонстрировали составы LYL EFFUSIO® и LYL MICRO®.

С учетом того, что практически все исследования *in vivo* проводились в других странах на разных популяциях, в следующем издании будут опубликованы результаты проведенного в Латвии исследования *in vivo*, в ходе которого оценивались различные формы орального всасывания витамина D3. Данное исследование отражает эффективность этих форм витамина D3 именно в контексте жителей Латвии и показывает форму витамина D3, способную эффективно повышать уровень витамина D в крови всего лишь за 30 дней.

Рис.3. Процентуальный результат миграции холекальциферола (витамина D3) в образцах



Использованная литература.

- Holick M & Chen T (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr 87: 1080S-1086S.
- Mithal A, Wahl DA, Bonjour J, et al. (2009) Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. Osteoporos Int 20, 1807-1820.
- Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. Am J Clin Nutr. 1985 Oct; 42(4):644-9.
- MC Satia, AG Mukim, KD Tibrewala, MS Bhavsar. A randomized two way cross over study for comparison of

- absorption of vitamin D3 buccal spray and soft gelatin capsule formulation in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption. Nutr J. 2015; 14: 114.
- Narang N & Sharma J (2011) Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. Int J Pharm Pharm Sci 3, 18-22.
- Strickley RG (2004) Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharm Res 21, 201-230.
- Kalepu S, Manthina M & Padavala V (2013) Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. Acta Pharm Sin B 3, 361-372.
- Joshua J. Todd, Emeir M. McSorley, L. Kirsty Pourshahidi

- et al. Vitamin D3 supplementation in healthy adults: a comparison between capsule and oral spray solution as a method of delivery in a wintertime, randomised, open-label, cross-over study. British Journal of Nutrition (2016), 116, 1402-1408.
- L. Salvia-Trujillo, B. Fumiaki, Y. Park and D. J. McClements. The influence of lipid droplet size on the oral bioavailability of vitamin D2 encapsulated in emulsions: an in vitro and in vivo study:12:39. Food Funct. 2017 Feb 22;8(2):767-777.