

*Н. А. Платэ<sup>1</sup>, Л. К. Старосельцева<sup>2</sup>, Л. И. Валуев<sup>1</sup>, Г. А. Сытов<sup>1</sup>,  
М. В. Ульянова<sup>1</sup>, И. Л. Валуев<sup>1</sup>, Л. В. Ванчугова<sup>1</sup>*

## **РАСТВОР ИНСУЛИНА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ**

<sup>1</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН, Москва;

<sup>2</sup> Эндокринологический научный центр РАМН, Москва

Предложен новый подход, обеспечивающий проникновение активного инсулина в кровоток через пищеварительную систему. Этот подход основан на пероральном введении разбавленных растворов инсулина. Использование таких растворов приводит к увеличению концентрации инсулина и уменьшению концентрации глюкозы в крови.

Одной из наиболее сложных проблем современной фармакологии является создание полипептидных лекарственных препаратов с повышенной устойчивостью к действию протеолитических ферментов. Известно, что жизненно важные полипептиды (ферменты, ингибиторы, гормоны и т.п.) синтезируются внутри организма; поступление их с пищей практически невозможно из-за разрушения этих веществ протеолитическими ферментами желудка и тонкого кишечника. Даже при введении полипептидов непосредственно в тонкий кишечник (минуя желудок) около 75 % этих веществ разрушаются под действием ферментов уже в первые полчаса и в кровоток попадает не более 0,5 % от их введенного количества [1]. Вследствие этого для устранения дефицита какого-либо полипептида его вводят в организм в виде раствора инъекционно или иным способом, минуя пищеварительный тракт.

Вместе с тем, преимущества перорального способа введения полипептидных лекарственных препаратов настолько очевидны (особенно при многократном введении препарата), что до сих пор не прекращаются попытки ученых преодолеть барьеры на пути проникновения таких лекарств в кровоток через пищеварительную систему.

Особенно это актуально для таких препаратов, как инсулин — гормон поджелудочной железы, частичная или полная недостаточность которого приводит к сахарному диабету и который постоянно используется при лечении этого заболевания.

В физиологических условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин секретируется в кровеносные сосуды, непосредственно соединенные с портальной веной, по которой из кишечника к печени транспортируются также и продукты пищеварения. При этом печень осуществляет контроль количества проходящего через нее гормона. При инъекционном же введении инсулина такой контроль отсутствует, что и является одной из причин таких осложнений при сахарном диабете, как сердечно-сосудистые заболевания, расстройство функций головного мозга и т.д. [2]. В связи с этим наиболее оптимальным с физиологической точки зрения является пероральный способ введения инсулина, при котором инсулин вместе с продуктами пищеварения в первую очередь попадает в печень. Фактически проблема сводится к обеспечению безопасного пути прохождения инсулина через агрес-

сивную среду желудка и к “нейтрализации” действия протеиназ тонкого кишечника.

К настоящему времени известны многие десятки различных подходов к решению этой проблемы. Не останавливаясь детально на их сути (а это, в основном, модификация самой молекулы инсулина, применение разного рода защитных покрытий, совместное применение инсулина и ингибиторов протеиназ, а также соединений, ускоряющих всасывание инсулина через стенки тонкого кишечника [3]), отметим лишь, что до сих пор не существует реально применяемых пероральных препаратов инсулина.

Нами предлагается принципиально новое решение этой проблемы. В основе его лежит следующее предположение. Хорошо известно, что поглощенная вода быстро проходит через желудок в тонкий кишечник, где и всасывается в кровь со скоростью, минимальное значение которой составляет 200 – 400 мл/ч. Имеющиеся в слизистой оболочке кишечника поры обеспечивают пассивный транспорт растворенных в воде соединений с молекулярной массой ниже 200 (так называемое явление “solvent drag”) [4].

Мы предполагаем, что использование достаточно разбавленных растворов инсулина и других белков должно обеспечить быстрое прохождение этих растворов через желудок. При этом железы слизистой оболочки желудка не должны успеть прореагировать на появление белка в желудке и не должны секретировать желудочный сок, то есть появляется реальная возможность предотвратить гидролиз инсулина в желудке.

Использование разбавленных растворов должно также существенно замедлить скорость ферментативного гидролиза инсулина в тонком кишечнике просто за счет уменьшения его концентрации [5]. Следовательно, в этом случае можно высказать вполне разумное предположение о возможности проникновения инсулина в кровоток при пероральном введении его разбавленного раствора. Тем более, что имеются данные о принципиальной возможности транспорта инсулина через слизистые оболочки, хотя и в очень небольшом количестве. Так, биодоступность инсулина при пероральном, ректальном, вагинальном и подкожном способе введения составляет 0,05, 2,5, 18 и 80 %, соответственно [6].

В связи с этим, целью настоящей работы является изучение зависимости физиологического действия ин-

Влияние способа введения инсулина на концентрацию глюкозы в крови здоровых кроликов.

Способ введения инсулина и его доза	Концентрация глюкозы в крови, % от исх., после введения препарата через			
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль (без инсулина), 14 кроликов, исходная концентрация глюкозы 90 – 120 мг/100 мл	101 ± 12	99 ± 8	102 ± 10	108 ± 12
Инъекция, 9 кроликов, исходная концентрация глюкозы 80 – 140 мг/100 мл, доза 5 ед./кг	59 ± 6	53 ± 9	52 ± 11	58 ± 4
Перорально, кристаллический инсулин + 6 мл воды, 19 кроликов, исходная концентрация глюкозы 90 – 140 мг/100 мл, доза 4 – 24 ед./кг	100 ± 13	99 ± 13	99 ± 9	104 ± 10

сулина от его концентрации в растворах, применяемых перорально.

### Экспериментальная часть

Исследования проводили на кроликах-самцах Шиншилла весом 2 – 3,1 кг. Предварительно кролики голодали 12 ч. Для эксперимента отбирали кроликов с исходным уровнем глюкозы (натощак) в пределах 65 – 140 мг/100 мл. Исходный уровень глюкозы не должен быть ниже 65 мг/100 мл, так как в противном случае при введении раствора инсулина может развиваться гипогликемическая кома. В работе был использован генноинженерный человеческий инсулин фирмы “Sigma”, США и ингибитор протеолитических ферментов овомукоид, выделенный из белка утиных яиц по методике [7]. Для оценки гипогликемического эффекта препаратов инсулина определяли концентрацию глюкозы в крови. С этой целью из краевой вены уха кролика проводили заборы крови, в которой определяли исходную концентрацию глюкозы с помощью глюкометра “One Touch Basic, LifeScan”, а затем определяли концентрацию глюкозы через каждые 30 минут в течение 2 ч. Концентрацию инсулина (ИРИ) в сыворотке определяли с помощью набора реактивов для радиоиммунного определения инсулина в сыворотке крови (ИБОХ, Беларусь).

Таблица 2

Влияние перорального введения желатиновой капсулы, содержащей кристаллический инсулин или смесь инсулина и овомукоида и покрытой ацетилфталилцеллюлозой, на концентрацию глюкозы в крови нормальных кроликов\*.

Количество полипептида в капсуле		Концентрация глюкозы в крови, % от исх., после введения препарата через		
Инсулин, ед./кг	Овомукоид, мг	30 мин	60 мин	90 мин
19,5	—	109 ± 12	112 ± 8	103 ± 13
24,8	—	111 ± 14	107 ± 11	105 ± 14
12,2	5	98 ± 9	110 ± 9	107 ± 15
18,4	6	110 ± 10	122 ± 16	115 ± 13
23,1	6	102 ± 11	99 ± 13	92 ± 11
22,6	10	83 ± 9	78 ± 10	95 ± 8
31,7	9	90 ± 11	75 ± 9	84 ± 10

\* Исходная концентрация глюкозы 90 – 140 мг/100 мл. Вес кроликов — 2,5 – 3,1 кг. Каждое значение — среднее для 6 кроликов.

### Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведены результаты изучения эффективности действия инсулина при пероральном введении кроликам кристаллического препарата. Для сравнения здесь же приведены результаты контрольных экспериментов (без использования инсулина или при инъекционном введении гормона). Как и следовало ожидать, никакого изменения концентрации глюкозы в крови при пероральном введении инсулина не происходит, то есть при таком способе введения инсулин не попадает в кровоток, а разрушается в пищеварительной системе.

Практически аналогичный результат был получен при пероральном введении кроликам кристаллического инсулина в желатиновых капсулах, покрытых желудочнонерастворимым покрытием на основе ацетилфталилцеллюлозы (табл. 2). В этом случае растворение покрытия происходит непосредственно в тонком кишечнике. Видно, что появление в тонком кишечнике твердого инсулина не сопровождается заметным изменением концентрации глюкозы в крови. И даже в присутствии эффективного ингибитора панкреатических

Таблица 3

Влияние введения раствора инсулина с концентрацией 12 – 25 ед./мл на концентрацию глюкозы в крови нормальных кроликов.

Препарат	Концентрация глюкозы в крови, % от исх., после введения препарата через			
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль, инъекция 0,5 мл раствора инсулина, доза 6,4 ед./кг	54 ± 7	41 ± 6	35 ± 5	25 ± 6
Перорально, 0,5 – 1,0 мл раствора инсулина, доза 6,0 – 15,6 ед./кг	106 ± 16	105 ± 14	102 ± 17	108 ± 16
Перорально, 1,0 мл раствора 12,7 ед. инсулина и 6 мг овомукоида на кг	88 ± 7	97 ± 8	85 ± 10	92 ± 6
Перорально, сначала 5 мл раствора овомукоида (50 мг), затем 1,0 мл раствора инсулина (12,7 ед./кг)	114 ± 11	87 ± 9	92 ± 11	91 ± 10

протеиназ овомукоида, из белка утиных яиц, максимальное снижение концентрации глюкозы не превышает 25 %.

Близкие результаты были получены в большинстве работ, посвященных изучению эффективности действия инсулина, помещенного в желудочнонерастворимую капсулу. Так, например, в работе [8] показано, что если для 80 % снижения уровня глюкозы в крови крыс требуется инъекция 0,5 ед. нативного инсулина/кг массы животного, то пероральное введение 50 ед. инсулина, покрытого сополимерами метакриловой кислоты, на кг массы животного приводит в лучшем случае к 25 % снижению уровня глюкозы.

Пероральное введение крайне высоких доз инсулина хотя и обеспечивает в некоторых случаях положительный гипогликемический эффект, но сопровождается нежелательным эффектом ингибирования таким количеством инсулина процесса переваривания и всасывания пищи. Получающие таким образом инсулин животные теряют в весе, вопреки увеличивающемуся количеству поглощенной пищи [9]. Естественно, что этот эффект должен усиливаться в присутствии ингибиторов ферментов, участвующих в переваривании пищи.

Все эти результаты важны с двух точек зрения. Во-первых, очевидно, что разрушение инсулина происходит не только в желудке, но и, в основном, в тон-

ком кишечнике, и во-вторых, снижение уровня глюкозы при высоких дозах инсулина подтверждает принципиальную возможность проникновения инсулина через слизистую оболочку тонкого кишечника.

Гипогликемический эффект отсутствует также при пероральном введении относительно концентрированного (12 – 25 ед./мл) раствора инсулина (табл. 3). Даже при дополнительном введении весьма значительного количества ингибитора, то есть при существенном подавлении активности протеиназ в тонком кишечнике, уровень глюкозы в крови при использовании приемлемых количеств инсулина практически не изменяется.

Иная картина наблюдается при пероральном введении разбавленных растворов инсулина. В табл. 4 приведены результаты изучения зависимости эффективности действия раствора инсулина от его концентрации. Видно, что если при введении 1,0 мл раствора инсулина (доза порядка 12 ед./кг) снижение уровня глюкозы в крови не наблюдается, то для той же дозы инсулина, но растворенного в 10 – 15 мл, концентрация глюкозы в крови снижается на 30 – 40 %. Это значит, что, как и предполагалось, при пероральном введении разбавленных растворов инсулина они довольно быстро (как и вода) проникают в тонкий кишечник, не разрушаясь в желудке, и значительная часть этих растворов достигает стенок кишечника, оказываясь практически вне зоны действия панкреатических ферментов даже в отсутствие ингибиторов.

В табл. 5 приведены результаты обработки этих данных, полученные нормированием уровня изменения концентрации глюкозы на 10 ед. введенного инсулина. Видно, что основные изменения наблюдаются при концентрации инсулина порядка 25 ед. в 5,0 – 10,0 мл раствора. Дальнейшее уменьшение концентрации инсулина уже не приводит к значительному уменьшению уровня глюкозы в крови.

Доказательством проникновения инсулина в кровоток при использовании растворов с низкой концентрацией являются не только результаты измерения концентрации глюкозы, но и результаты прямого измерения концентрации инсулина в плазме крови. Так, если

Таблица 4  
Влияние перорального введения раствора 25 ед. инсулина на концентрацию глюкозы в крови кроликов (масса кроликов 2,4 – 3,0 кг).

Количество раствора, мл (доза инсулина, ед./кг)	Концентрация глюкозы, мг/100 мл (% от исх. $\pm$ 8 %),				
	исход	после введения препарата через			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
1,0 мл (9,6)	81 (100)	85 (105)	87 (107)	91 (112)	93 (115)
1,0 мл (10,5)	73 (100)	79 (108)	82 (112)	86 (118)	90 (123)
1,0 мл (11,9)	106 (100)	111 (105)	112 (106)	93 (88)	96 (91)
1,0 мл (12,7)	84 (100)	83 (99)	78 (93)	82 (98)	81 (96)
3,0 мл (9,6)	114 (100)	104 (91)	89 (78)	93 (81)	93 (81)
3,0 мл (9,8)	93 (100)	89 (96)	81 (87)	79 (85)	82 (88)
3,0 мл (10,4)	88 (100)	89 (100)	81 (92)	87 (99)	92 (105)
3,0 мл (11,2)	102 (100)	91 (89)	96 (94)	85 (83)	94 (92)
5,0 мл (9,3)	103 (100)	91 (88)	70 (68)	80 (78)	88 (85)
5,0 мл (10,5)	97 (100)	82 (85)	67 (69)	67 (69)	72 (74)
5,0 мл (10,7)	100 (100)	82 (82)	84 (84)	97 (97)	90 (90)
5,0 мл (11,7)	94 (100)	84 (89)	66 (70)	65 (70)	67 (71)
10,0 мл (8,8)	65 (100)	87 (137)	61 (94)	60 (92)	53 (82)
10,0 мл (9,3)	75 (100)	91 (121)	68 (91)	51 (68)	56 (75)
10,0 мл (9,4)	79 (100)	95 (120)	70 (89)	58 (73)	67 (85)
10,0 мл (9,7)	75 (100)	80 (107)	52 (69)	54 (72)	59 (79)
10,0 мл (12,7)	90 (100)	88 (98)	60 (67)	51 (57)	58 (64)
10,0 мл (14,0)	100 (100)	68 (68)	70 (70)	59 (59)	57 (57)
15,0 мл (7,8)	99 (100)	69 (70)	59 (60)	62 (63)	68 (69)
15,0 мл (9,2)	97 (100)	90 (93)	79 (81)	76 (78)	78 (80)
15,0 мл (10,7)	108 (100)	87 (81)	72 (67)	81 (75)	84 (78)
15,0 мл (11,4)	106 (100)	111 (105)	64 (61)	86 (81)	76 (72)
15,0 мл (12,1)	87 (100)	91 (105)	68 (78)	61 (70)	60 (69)
15,0 мл (12,4)	109 (100)	84 (77)	85 (78)	78 (72)	74 (68)

Таблица 5  
Зависимость максимального изменения уровня глюкозы в крови кроликов при пероральном введении раствора 25 ед. инсулина от концентрации этого раствора\*

Количество раствора для 25 ед. инсулина, мл	Максимальное изменение уровня глюкозы, % от исх.
1,0	+ (6 $\pm$ 7)
3,0	– (15 $\pm$ 5)
5,0	– (27 $\pm$ 7)
10,0	– (30 $\pm$ 4)
15,0	– (32 $\pm$ 8)

\* Масса кроликов 2,4 – 3,0 кг, исходная концентрация глюкозы 65 – 114 мг/100 мл, у 24 кроликов измеряли исходный уровень глюкозы и уровень глюкозы через 30, 60, 90 и 120 мин после введения раствора инсулина, максимальное изменение уровня глюкозы нормировано на 10 ед. введенного инсулина.

при пероральном введении кроликам раствора 25 ед. инсулина в 1 мл раствора (0,9 % раствор NaCl) концентрация инсулина в крови практически не изменяется, то при пероральном введении такого же количества инсулина, но растворенного в 10 мл раствора, концентрация инсулина в крови увеличивается в 4 – 6 раз. Инъекция 1 мл раствора 20 ед. инсулина приводит к 10 – 14-кратному увеличению концентрации инсулина в крови.

Таким образом, приведенные в работе результаты свидетельствуют о том, что пероральное введение разбавленных растворов инсулина может обеспечить достаточно быстрый и относительно эффективный его транспорт в тонкий кишечник и последующую диффузию их в кровотоки. Степень проникновения препарата, а следовательно и его терапевтический эффект в этом случае, естественно, ниже, чем при инъекционном введении, но не драматически.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Код проекта 04-03-08005-офи\_а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Y. Taki, S. Yamashita, T. Sakane, et al., *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioac. Mater.*, Nice (1994), Abstr. 814 – 815.
2. M. Saffran, in: *Targeting of Drugs: The Challenge of Peptides and Proteins*, G. Gregoriadis (ed.), Plenum Press, New York (1992), pp. 89 – 95.
3. Л. И. Валуев, И. Л. Валуев, Г. А. Сытов, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **32**(4), 371 – 381 (1996).
4. D. Jensen, *The Principles of Physiology*, Appleton-Century-Crofts, New-York (1980), pp. 823 – 825.
5. М. Тривен, *Иммобилизованные ферменты*, Мир, Москва (1983), сс. 136 – 140.
6. V. H. L. Lee, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **5**(2), 69 – 97 (1988).
7. М. Н. Шульгин, Т. А. Валуева, А. Я. Кестере и др., *Биохимия*, **46**(3), 473 – 480 (1981).
8. I. Morishita, M. Morishita, K. Takayama, et al., *Inter. J. Pharmaceutics*, **91**, 29 – 37 (1993).
9. F. Williams and M. Saffran, *Drug Delivery*, **3**, 81 – 85 (1996).

Поступила 07.06.05

## INSULIN SOLUTION FOR PERORAL ADMINISTRATION

N. A. Platé<sup>1</sup>, L. K. Starosel'tseva<sup>2</sup>, L. I. Valuev<sup>1</sup>, G. A. Sytov<sup>1</sup>, M. V. Ul'yanova<sup>1</sup>, I. L. Valuev<sup>1</sup>, and L. V. Vanchugova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>2</sup> Scientific Endocrinological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

A new approach is developed in order to overcome the degradation of insulin by digestive enzymes and its delivery to the blood through the gastrointestinal tract. The approach is based on the administration of diluted insulin solutions. It is shown that the administration of insulin solutions leads to an increase of the insulin concentration and a decrease in the glucose concentration in the blood