

И. Л. Валуев, Л. К. Старосельцева, Л. И. Валуев, Л. В. Ванчугова

ПРЕПАРАТ ИНСУЛИНА ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

ФГБУН ордена Трудового Красного Знамени "Институт нефтехимического синтеза имени А. В. Топчиева Российской академии наук", Россия, 119991, Москва, Ленинский пр., 29.
* e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Изучен новый подход, обеспечивающий проникновение активного инсулина в кровотоки через пищеварительную систему при пероральном введении животным с экспериментальным диабетом разбавленных растворов инсулина. Показано, что при использовании таких растворов реализуется физиологический путь поступления инсулина в кровь.

Ключевые слова: инсулин; диабет; пероральное введение; разбавленные растворы.

Одной из 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 в связи с разрушением этих веществ протеолитическими ферментами желудка и тонкого кишечника. К наиболее интенсивно изучаемым препаратам подобного рода относится инсулин — гормон, дефицит которого приводит к сахарному диабету. Причина этого заключается в чрезвычайно широком распространении этого заболевания, получившего название "неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.", и существующими методами его лечения. По данным ВОЗ, в настоящее время около 300 млн человек в мире страдают этим заболеванием, а по прогнозам к 2025 г. количество больных диабетом вырастет до 435 млн. Лечение сахарного диабета в основном сводится к периодическим (несколько раз в сутки) инъекциям инсулина. И хотя такой способ лечения позволяет сохранить жизнь большинству больных диабетом, введение инсулина непосредственно в кровотоки имеет принципиальный недостаток. В физиологических условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин попадает в кровотоки через печень, которая и осуществляет контроль количества выделяемого в кровь гормона [1]. При инъекционном введении печень теряет такой контроль и концентрация инсулина, достигаемого всех органов, может быть больше необходимой в данный момент времени. Учитывая, что биологическое действие инсулина многогранно, в частности он является универсальным анаболическим гормоном, такой способ введения препарата может приводить к ряду серьезных осложнений, часто наблюдаемых у больных сахарным диабетом [2].

Одним из возможных путей решения проблемы является пероральное введение гормона с возможным поступлением его в печень аналогично продуктам пищеварения. Однако на этом пути возникает принципиальное препятствие — гидролиз инсулина ферментами в желудке и кишечнике. Не останавливаясь подробно на существующих подходах к решению этой

проблемы (по данным National Center for Biotechnology Information, США, только за последний год опубликовано свыше 350 работ в этом направлении), отметим, что одним из достаточно перспективных представляется подход, основанный на использовании разбавленных растворов инсулина. Ранее в опытах *in vivo* нами была экспериментально доказана возможность проникновения в кровотоки инсулина при пероральном введении его разбавленных растворов. Пероральное введение здоровым кроликам водных растворов инсулина с концентрацией порядка 2–3 ед./мл приводило к повышению концентрации инсулина в крови и снижению концентрации глюкозы [3].

Целью настоящей работы является изучение возможности перорального применения разбавленных растворов инсулина для регулирования уровня глюкозы в крови животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Экспериментальная часть

В работе был использован генно-инженерный человеческий инсулин фирмы "Sigma", США. Раствор для перорального введения животным готовили растворением в 100 мл воды 6 г композиции, содержащей 0,16 масс. % инсулина, 70 масс. % лимонной кислоты и 29,84 масс. % бикарбоната натрия.

Для получения модели аллоксанового диабета использовали кроликов-самцов Шиншилла массой 2,5–3,1 кг. После суточного голодания кроликам вводили в краевую вену уха аллоксан в дозе 150 мг на 1 кг массы тела в подкисленном 0,9 % растворе NaCl, pH = 4,5. В первые дни при разрушении β -клеток происходил выброс инсулина в русло крови, что приводило к развитию гипогликемии, поэтому кролики в течение 2–3 дней получали 10 % раствор глюкозы. В последующие 10 дней уровень глюкозы в крови повышался с исходных 90–110 мг/100 мл до 400–450 мг/100 мл, что указывало на развитие диабета.

Стрептозотоциновый диабет моделировали на крысах линии Wistar массой 170–200 г и исходным уровнем глюкозы 95–110 мг/100 мл. Стрептозотоцин вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 150 мг на 1 кг

Влияние перорального введения раствора (на 10 день после инъекции аллоксана) на концентрацию глюкозы в крови кроликов с аллоксановым диабетом

Раствор	Концентрация глюкозы, мг/100 мл, после введения раствора				
	исход	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
Раствор инсулина, 14 ед. в 7 мл воды (6 животных)*	400 – 450	330 – 350	210 – 220	200 – 220	220 – 260

* Концентрация глюкозы в крови кроликов контрольной группы (5 животных) в течение всего эксперимента оставалась на уровне 400 – 590 мг/100 мл.

Концентрация глюкозы в крови кроликов с аллоксановым диабетом, мг/100 мл

Исход*	День эксперимента				
	10	15	22	27	31
90 – 110**	400 – 450	270 – 310	330 – 380	210 – 220	180 – 220

* Концентрация глюкозы перед инъекцией аллоксана;

** концентрация глюкозы в крови кроликов контрольной группы (4 животных) в течение всего эксперимента оставалась на уровне 400 – 500 мг/100 мл.

Влияние перорального введения раствора (на 10 день после инъекции стрептозотоцина) на концентрацию глюкозы в крови крыс (8 животных) со стрептозотоциновым диабетом

Раствор	Концентрация глюкозы, мг/100 мл, после введения раствора, мин				
	исход	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Раствор инсулина, 10 ед. в 5 мл воды (8 животных)*	520 – 590	410 – 460	340 – 370	280 – 310	240 – 300

* Концентрация глюкозы в крови крыс контрольной группы (6 животных) в течение всего эксперимента оставалась на уровне 460 – 490 мг/100 мл.

массы тела в цитратном буфере (0,01 М), рН 4,0. В первые 2 дня крысам вводили 20 % раствор глюкозы. На 6 день уровень глюкозы в крови животных повысился до 230 – 400 мг/100 мл, а на 10 день — до 460 – 590 мг/100 мл.

Оценку гипогликемического эффекта препаратов инсулина проводили измерением концентрации глюкозы в крови. Кровь забирали из краевой вены уха

кролика или кончика хвоста крысы. Концентрацию глюкозы определяли с помощью глюкометра “One Touch Basic, LifeScan”. Концентрацию инсулина в плазме крови и в гомогенизате ткани печени определяли спектрофотометрически, используя инсулин, меченный флуоресцеином, или радиоиммунным методом, используя наборы РИО-ИНС-ПГ 125, Беларусь.

Результаты и их обсуждение

Для приготовления раствора инсулина была использована композиция, содержащая инсулин, твердую органическую кислоту и бикарбонат натрия [4]. При растворении в воде органическая кислота и бикарбонат натрия взаимодействуют между собой с выделением углекислого газа, пузырьки которого обеспечивают перемешивание раствора и быстрое растворение инсулина. Использование промышленно выпускаемых препаратов инсулина для получения раствора невозможно вследствие того, что такие препараты содержат 2,5 мг/мл стабилизатора — мета-крезола, который при попадании в рот разъедает слизистые поверхности, вызывает боль, тошноту и рвоту (при попадании в желудок пороговой является концентрация мета-крезола 0,002 мг/л) [5].

Концентрация глюкозы в крови крыс (7 животных) со стрептозотоциновым диабетом

День	Время суток, ч	Концентрация глюкозы, мг/100 мл		
		перед введением инсулина	1 ч после введения инсулина	контроль (без инсулина)
16	12	600 – 620	420 – 450	540 – 550
	17	480 – 500	300 – 330	–
17	12	340 – 360	180 – 210	500 – 530
	17	260 – 280	150 – 170	–
18	12	210 – 220	150 – 160	640 – 660
	17	230 – 250	140 – 160	–
20	12	200 – 220	110 – 130	–
	17	190 – 210	100 – 120	690 – 710

Кролики с экспериментальным аллоксановым диабетом были разделены на 2 группы. В первой группе животные получали 7 мл водного раствора, содержащего 14 ед. инсулина, а во второй (контрольной) группе животные получали 7 мл воды. Результаты кратковременного эксперимента, проведенного на 10 сут после начала введения аллоксана, представлены в табл. 1. Видно, что пероральное введение 14 ед. инсулина в виде разбавленного раствора с концентрацией 2 ед./мл приводило к достоверному снижению уровня глюкозы в крови животных почти на 50 %.

В долговременном эксперименте раствор 14 ед. инсулина в 7 мл воды перорально вводили животным (7 кроликов) ежедневно с 10-го по 15-й день и с 22-го по 27-й день. Результаты приведены в табл. 2.

Видно, что ежедневное введение раствора инсулина в течение первых 5 дней после развития экспериментального диабета приводило к снижению уровня глюкозы в крови, который частично восстанавливался на 22 день после прекращения введения инсулина. Ежедневное введение раствора инсулина в течение последующих 5 дней (с 22-го по 27-й день) сопровождалось повторным снижением уровня глюкозы, который практически не изменялся после прекращения введения раствора до окончания эксперимента.

Результаты кратковременного эксперимента на крысах со стрептозотоциновым диабетом (8 животных) приведены в табл. 3.

Видно, что и в случае стрептозотоцинового диабета пероральное введение разбавленного раствора инсулина приводило к значительному снижению уровня глюкозы в крови экспериментальных животных.

В долговременном эксперименте на 16 день после инъекции стрептозотина крысам в 12 и 17 часов дня перорально вводили раствор 10 ед. инсулина в 5 мл воды и измеряли концентрацию глюкозы (табл. 4). Видно, что введение крысам раствора инсулина в 12 часов дня на 16 день после иницирования диабета

приводило к снижению уровня глюкозы, который несколько восстанавливался к 17 часам, а затем повторно снижался после приема раствора инсулина. Повторение этой процедуры на 17, 18 и 20 день сопровождалось долговременным снижением уровня глюкозы до практически постоянного значения.

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о том, что пероральное введение разбавленных растворов инсулина обеспечивает достоверное снижение уровня глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом.

Как уже отмечалось, принципиальным преимуществом перорального введения инсулина, по сравнению с инъекцией, может быть моделирование физиологического пути поступления гормона в кровь. Известно, что в физиологических условиях вырабатываемый поджелудочной железой инсулин поступает в печень, участвуя там в регуляции различных биосинтетических процессов [1, 6], и лишь затем он попадает на периферию через большой круг кровообращения. Экзогенный инсулин, введенный под кожу, сохраняет нефизиологически высокую концентрацию в месте введения.

Можно предположить, что при пероральном введении инсулин из кишечника всасывается в кровь и затем системой воротной вены он будет доставлен в печень, как и обычные продукты пищеварения. То есть при таком способе введения, как и в случае экзогенного инсулина, печень подключается к "правильному" распределению гормона в организме.

Для проверки этого предположения были измерены концентрации инсулина в крови и тканях печени после инъекционного введения актрапида или перорального введения раствора инсулина крысам (табл. 5 и 6).

Видно, что действительно, в отличие от подкожных инъекций, при пероральном введении препаратов инсулин первоначально накапливается в печени и только затем поступает в кровоток.

Т а б л и ц а 5

Зависимость концентрации инсулина в плазме крови крыс от способа введения препарата*

Доза инсулина и способ введения	Концентрация инсулина в плазме крови, мкед./мл				
	исход	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин
15 ед./кг, инъекционно	28 – 42	310 – 340	390 – 420	430 – 470	390 – 420
15 ед./кг, перорально	33 – 40	64 – 75	82 – 88	90 – 105	128 – 145

* Приведены минимальные и максимальные значения для 5 животных.

Т а б л и ц а 6

Зависимость концентрации инсулина в экстрактах ткани печени крыс от способа введения препарата*

Доза инсулина и способ введения	Концентрация инсулина в экстрактах ткани печени, мкед./мл			
	исход	30 мин	60 мин	90 мин
15 ед./кг, инъекционно	32 – 37	49 – 62	74 – 83	90 – 104
15 ед./кг, перорально	30 – 37	163 – 176	214 – 254	152 – 184

* Для каждого времени измерения было использовано 4 крысы. Приведены минимальные и максимальные значения.

Таким образом, совокупность всех полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что при пероральном введении разбавленных растворов инсулина не происходит разрушения гормона пищеварительными ферментами, а он всасывается в кровь, реализуя естественный путь поступления в кровь через печень. Принимая во внимание положительные результаты испытания растворов инсулина на животных с экспериментальным диабетом, можно предположить, что применение этого препарата может быть перспективной альтернативой инъекциям инсулина при лечении сахарного диабета.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику И. И. Дедову и академику А. И. Григорьеву за помощь в организации работы с животными.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН при финансовой поддержке ФАНО (тема 3, шифр на-

учного направления 45, государственная регистрация АААА-А18-118011990207-1).

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Saffran, B. Pansky, G. Colin Budd, F. E. Williams, *J. Control. Rel.*, **46**(1), 89 – 98 (1997).
2. П. Дж. Уоткинс, *Сахарный диабет*, БИНОМ, Москва (2006), сс 40 – 48.
3. Н. А. Платэ, Л. К. Старосельцева, Л. И. Валуев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(4), 105 – 108 (2006); *Pharm. Chem. J.*, **40**(4), 224 – 227 (2006).
4. Патент РФ № 2519099, *Бюл. изобрет.*, № 16 (2014).
5. Н. В. Лазарев, Э. Н. Левина (ред.), *Вредные вещества в промышленности*, Т. 1, Химия, Москва (1976), сс. 409 – 410.
6. Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл, *Биохимия человека*, Мир, Москва (1993), сс. 247 – 254.

Поступила 16.04.18

INSULIN PREPARATION FOR THE REGULATION OF BLOOD GLUCOSE LEVEL

I. L. Valuev, L. K. Starosel'tseva, L. I. Valuev, and L. V. Vanchugova

A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119991 Russia

A new approach has been studied that ensures the penetration of active insulin into the bloodstream through the digestive system by oral administration of dilute insulin solutions to animals with experimental diabetes. It is shown that, using such solutions, it is possible to realize the physiological pathway of insulin delivery to the blood.

Keywords: insulin; diabetes mellitus; peroral administration; dilute solutions.