

В.П. Каліман

ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНОЇ ДІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕІН'ЕКЦІЙНОГО ІНСУЛІНУ, СТВОРЕНОГО МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МІКРОКАПСУЛЮВАННЯ

Харківський національний медичний університет, Харків

ВСТУП

Цукровий діабет є однією з визначальних проблем сучасної ендокринології. 2000 року у світі було зареєстровано 150 млн. хворих на цю патологію. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), до 2025 року очікується збільшення числа хворих на цукровий діабет до 300 млн., тобто вдвічі більше. Щорічний приріст хворих на цукровий діабет, за даними ВООЗ, складає від 3,6 до 5 млн. Нескладні математичні розрахунки дозволяють припустити, що кожні п'ять хвилин у світі реєструється новий випадок цукрового діабету [18]. Отже, сьогодні можна говорити про епідемію цього захворювання у світовому масштабі. За даними Міністерства охорони здоров'я, в Україні зареєстровано понад 1 млн. хворих на цукровий діабет, причому цей показник із кожним роком прогресивно збільшується.

На даний час існує єдиний метод лікування інсулінозалежного цукрового діабету — це замісне парентеральне введення інсуліну з метою досягнення метаболічної адаптації вуглеводного та ліпідного обмінів [1]. Сьогодні у галузі практичної охорони здоров'я використовують різні фармакопейні інсуліни, але усі вони лише парентерального застосування. Створення інноваційного оригінального інсуліну для перорального застосування з вираженим гіпоглікемічним ефектом, що максимально копіює біологічну дію ендогенного інсуліну, дозволить запропонувати хворим на цукровий діабет принципово нові якості і стиль життя та, крім того, виключити багато негативних моментів застосування ін'єкційних інсулінів. Тому розробка і впровадження у клінічну практику не парентеральних форм інсулінів, які б справляли значну гіпоглікемічну дію і відповідали вимогам сучасної фармакопеї, — перспективний напрямок фундаментальної та прикладної медицини [3–7, 19].

Метою даного дослідження було опрацювання в експерименті інноваційних лікарських препаратів, створених за авторським методом молекулярного мікрокапсулювання, на які отримано патент України № 17699 [10] і патент України № 17812 [11], та порівняння між собою їх гіпоглікемічних властивостей.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Первинною субстанцією для виготовлення лікарського препарату інсуліну у вигляді аерозолі та твердої (таблеткової) форми був напівсинтетичний людський інсулін (сер. 0060505ППС, ЗАТ «Індар»), який мікрокапсулювали за допомогою раніше описаної та добре вивченої методики [12], у даному випадку значно модифікованої. На основі цієї первинної субстанції (сер. 0060505ППС) було виготовлено експериментальний зразок мікрокапсульованого аерозоль-інсуліну згідно з патентом України № 17699 [10] та експериментальний зразок мікрокапсульованого таблеткового інсуліну згідно з патентом України № 17812 [11].

Оригінальний мікрокапсульований аерозоль-інсулін і мікрокапсульований таблетковий інсулін є інноваційними препаратами, створеними шляхом інкорпорації молекули напівсинтетичного людського інсуліну у синтетичну ліпосому. Для отримання синтетичної ліпосоми використовували високо очищену гідратовану касторову олію з наперед заданими структурно-метаболічними властивостями та низку допоміжних фармакопейних інгредієнтів. В основу методу молекулярного мікрокапсулювання покладено принцип нанотехнології [12], модифікований нами. Процес гідратації касторової олії та отримання синтетичної везикули (ліпосоми) проводили за авторською методикою, яка дозволила отримати ліпосомоподібну везикулу, побудовану відповідно до принципу амфіфільності. Отримані синтетичні ліпосоми мали всі амфіфільні властивості. Такі синтетичні везикули (мікрокапсули) мають структуру «Матрьошки», як і справжні (природні) ліпосоми [9], вони зберігають всі властивості оболонкових структур, характеризуються достатньою стійкістю до більшості ферментів, не розпізнаються ретикулоендотеліальною системою та піддаються цілковитій біологічній деградації. Крім того, такі синтетичні оболонкові структури значною мірою підвищують біодоступність солюбілізованих у них частинок, у нашому випадку — молекул інсуліну. Це дозволило солюбілізувати (мікрокапсулювати) молекулу напівсинтетичного людського інсуліну за температури, не вищої за 36,0°C, та забезпечити

ти високу фармакопейну стабільність отриманих препаратів, а також зберігати готові лікарські засоби не у ліофілізованій формі, а у кінцевій лікарській формі. Все це істотно відрізняло використану технологію [10, 11] отримання неін'єкційних препаратів інсуліну від методів і способів, запропонованих і добре вивчених раніше [14–17]. Усі інгредієнти, що входили до досліджених препаратів інсуліну, як і самі препарати, відповідали вимогам сучасної фармакопеї.

Дослідні зразки препаратів було виготовлено в лабораторних умовах з урахуванням вимог сучасної фармакопеї. Інсулін, виготовлений у вигляді аерозолі або пігулки (експериментальні дослідні зразки), перед проведенням експерименту зберігали за кімнатної температури без дотримання температурних режимів зберігання, що вимагаються для фармакопейних ін'єкційних інсулінів.

Гіпоглікемічну дію дослідних зразків таблеткового та аерозоль-інсуліну вивчали на моделі алоксанового діабету.

Експеримент проводили на щурах лінії Вістар із масою 190–200 г на сьомий день після введення алоксану. Експериментальний алоксановий діабет у піддослідних тварин викликали відповідно до методичних рекомендацій «Експериментальне моделювання цукрового діабету для вивчення специфічного ефекту нових антидіабетичних речовин» [13]. До експерименту відбирали лише тварин, у яких після розвитку стабільного алоксанового діабету рівень глюкози в крові натще був у межах 12,0–13,5 ммоль/л. Усіх щурів утримували на однаковому раціоні, а перед постановкою експерименту тварини голодували протягом щонайменше 6 годин. Кров для досліджень забирали з хвостової вени тварини. Глюкозу у крові визначали глюкозооксидазним методом (кат. №НР009,02) за допомогою наборів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

В усіх щурів з експериментально викликаним алоксановим діабетом визначали початковий (базальний) рівень глюкози в крові перед постановкою експерименту (нульова хвилина). Потім, через 20 хв., 40 хв., 60 хв., 1,5 години, 2 години, 2,5 години та 3 години знов забирали кров для визначення вмісту глюкози. Одержані дані порівнювали з початковими даними і між групами.

Піддослідних тварин розподілили на чотири групи по 6–8 щурів у кожній.

1-а група. Контрольна група. Щури з експериментальним алоксановим діабетом, яких не годували протягом експерименту і не вводили препаратів інсуліну. Цю групу, у свою чергу, поділили на дві підгрупи: перша підгрупа — дослідні тварини з алоксановим діабетом, яким протягом експерименту нічого не вводили; друга підгрупа — дослідні тварини з алоксановим діабетом, яким

вводили воду в об'ємі, ідентичному об'єму досліджуваного препарату.

2-а група. Щури з експериментальним алоксановим діабетом, яким перорально вводили дослідний зразок таблеткового інсуліну у дозі 2 МО. Щурів не годували протягом експерименту.

3-а група. Щури з експериментальним алоксановим діабетом, яким перорально вводили дослідний зразок аерозоль-інсуліну у дозі 2 МО. Щурів не годували протягом експерименту.

4-а група. Щури з експериментальним алоксановим діабетом, яким назально вводили дослідний зразок аерозоль-інсуліну у дозі 2 МО. Щурів не годували протягом експерименту.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики та регресивно-кореляційного аналізу за допомогою пакету прикладних програм Excel [8]. Маніпуляції з експериментальними тваринами проводили відповідно до затверджених правил «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Вихідна концентрація глюкози у крові (нульова хвилина) в усіх експериментальних щурів з алоксановим діабетом коливалася в межах $12,8 \pm 0,31$ ммоль/л.

Дослідження вмісту глюкози в крові щурів з алоксановим діабетом у контрольній групі показало незначне його підвищення на початку експерименту, що було більш вираженим у другій підгрупі. Підвищення рівня глюкози у крові тварин контрольної групи на початку експерименту можна пояснити дією стресу, що спричинював додатковий викид контрісулярних гормонів. У цілому концентрація глюкози у крові тварин контрольної групи протягом усього експерименту коливалася незначно. Глікемічний профіль тварин контрольної групи наведено на рис. 1.

У тварин другої групи з алоксановим діабетом після перорального введення 2 МО інсуліну у вигляді пігулки визначено вірогідне ($p < 0,05$) зниження рівня глюкози у крові. Через 20 хв. показник знизився на 10% і склав $11,57 \pm 0,23$ ммоль/л, а через 40 хв. — вже на 35% ($8,37 \pm 0,24$ ммоль/л). Приблизно на цьому рівні глікемія була і через 60 хв., а у подальшому почала плавно підвищуватися. До кінця 2-ї години вміст глюкози у крові був зниженим лише на 5% і складав $12,19 \pm 0,23$ ммоль/л, через три години він не відрізнявся від початкового.

У тварин третьої групи після перорального введення 2 МО інсуліну у вигляді аерозолі також зафіксовано вірогідне ($p < 0,05$) зниження рівня глюкози в крові. Вже через 20 хв. глікемія знизилася на 15% і складала $10,88 \pm 0,25$ ммоль/л, через 40 хв. — приблизно на 35% ($8,35 \pm 0,23$ ммоль/л), через 60 хв. концентрація глюкози у

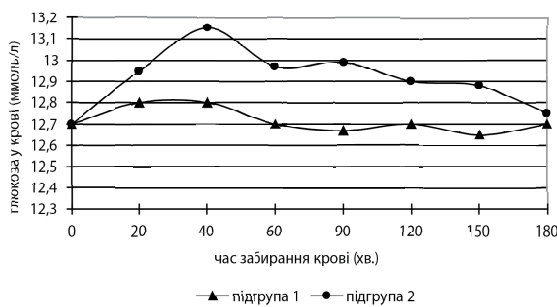


Рис. 1. Глікемічний профіль тварин контрольної групи.

крові почала збільшуватися і на початок другої години була на рівні початкових величин.

У тварин четвертої групи після назального введення 2 МО інсуліну у вигляді аерозолі відбувалося вірогідне ($p < 0,05$) зниження рівня глюкози у крові вже на 20-й хвилині на 12% ($11,30 \pm 0,27$ ммоль/л), через 40 хв. глікемія дорівнювала $8,41 \pm 0,25$ ммоль/л, тобто приблизно на 35% нижче від початкового рівня, через 60 хв. — $10,27 \pm 0,28$ ммоль/л, приблизно на 20% нижче від початкового рівня. У подальшому концентрація глюкози у крові прогресивно збільшувалася до початкових величин.

Глікемічний профіль усіх досліджених груп тварин наведено на рис. 2.

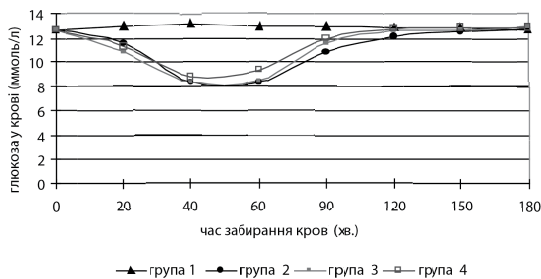


Рис. 2. Глікемічний профіль щурів з алоксановим діабетом.

Слід відзначити, що поведінка усіх щурів другої, третьої та (меншою мірою) четвертої груп після введення інсуліну впродовж першого періоду експерименту була помітно загальмованою, що можна пояснити різким падінням вмісту глюкози у крові через високу дозу інсуліну (2 МО), натомість жодного випадку коми не було. По закінченні експерименту активність всіх щурів відновлювалася.

ВИСНОВКИ

1. Отримано та апробовано в експерименті мікрокапсульований інсулін, який справляв помітний гіпоглікемічний ефект за неін'єкційного введення.

2. Застосування інноваційної методики молекулярного мікрокапсулювання напівсинтетичного людського інсуліну дозволяє отримати готові лікарські форми — аерозоль і пігулки — зі значним гіпоглікемічним ефектом.

3. Використання нанотехнологічного методу у процесі мікрокапсулювання молекули інсуліну дозволяє уникати дотримання суворого температурного режиму для зберігання препаратів.

4. Отримані дані дозволяють припустити, що оригінальний мікрокапсульований інсулін може у найближчому майбутньому перейти зі стадії експериментальних і передклінічних досліджень на етап прикладної медицини, а подальша робота у цьому напрямі дозволить запропонувати системі охорони здоров'я препарат принципово нового класу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. Диабетология. — М.: Медицина, 2000. — 672 с.
2. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. — 2003. Т. 8, №1. — С. 142–145.
3. Каліман В.П. Гипогликемическое действие перорально введенного инсулина у крыс с аллоксановым диабетом // Ендокринологія. — 2008. — Т. 13, №2. — С. 242–247.
4. Каліман В.П. Применение липосомального спрей-инсулина в качестве гипогликемической терапии при инсулинозависимом сахарном диабете // Экспериментальная и клиническая медицина. — 2008. — №2. — С. 85–87.
5. Каліман В.П. Таблетированный инсулин — миф или реальность / Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса. — Москва, 19–22 мая 2008 г. — С. 324.
6. Каліман В.П. Гипогликемическое действие таблетированного инсулина, полученного методом молекулярного микрокапсулирования // Клиническая фармация в Украине. Материалы VIII всеукраинской научно-практической конференции за участю международных специалистов. — Харьков, 6–7 листопада 2008 р. — С. 42–43.
7. Каліман В.П. Спрей-инсулин — на пути от фундаментальных исследований к прикладной медицине // Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса. — Москва, 19–22 мая 2008 г. — С. 322–324.
8. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
9. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. — М.: Медицина, 1983. — 384 с.
10. Патент 17699U UA, МПК 7 A61D 9/00. Гипоглікемічний засіб у формі спреї-інсуліну для лікування інсулінозалежного діабету / Каліман В.П., Каліман П.А. та ін. (UA): 3. № 200603215. Заяв. 27.03.2006; Опубл. 16.10.2006. Бюл. № 10.
11. Патент 17812U UA, МПК 7 A61K 31/00. Гипоглікемічний засіб у формі таблетованого інсуліну / Каліман В.П., Каліман П.А. (UA): 3. № 200603976; Заявл. 10.04.2006; Опубл. 10.10.2006, Бюл. № 10.
12. Патент 75030C UA, МПК 7 A61K 9/08, 9/10, 38/00. Спосіб одержання стабільного водного розчину препарату / Биков В.А., Щербина Н.В., Верба І.Е. (RU): — 3. № 200511349; Заявл. 30.11.2005; Опубл. 15.03.2006; Бюл. № 3.

13. Полторак В.В., Блох К.О., Малащенко А.М. Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ (Метод. рекоменд.). — Харьков, 1991. — 20 с.
14. Стефанов А.В., Лишко В.К., Шевченко А.В., Ефимов А.С., Ховако В.В. Гипогликемический эффект инсулина, включенного в липосомы, при оральном введении животным с различными типами экспериментального диабета // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, №2. — С. 58–64.
15. Стефанов А.В., Лишко В.К., Шевченко А.В., Ефимов А.С., Ховако В.В. Стабильность и всасываемость липосом с включенным инсулином в тонком кишечнике // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, №2. — С. 64–69.
16. Стефанов А.В., Кононенко И.Н., Лишко В.К., Шевченко А.В. Влияние инсулина в липосомах, введенного per os, на уровень сахара в крови крысы в норме и при экспериментальном диабете // Укр. биохим. журн. — 1980. — Т. 52, №4. — С. 495–498.
17. Ховако В.В. Изучение сахароснижающего действия инсулина, заключенного в липосомы, при пероральном введении экспериментальным животным / Автореф. дисс. к.м.н. — К., 1988.
18. Wild S., Roglic G., Green A. et al. Global Prevalence of Diabetes // Diabetes care. — 2004. V. 27, №5. — P. 124–127.
19. Hiroshi I., Kohei K. Future treatment of insulin therapy // Japan. J. Clin. Experim. Med. — 2002. — V. 79, №11. — P. 1995–1999.

РЕЗЮМЕ

**Исследование экспериментального
неинъекционного инсулина, созданного методом
молекулярного микрокапсулирования
В.П. Калиман**

В статье приводятся экспериментальные данные по изучению и сравнению гипогликемического действия опытного образца микрокапсулированного неинъекционного инсулина на модели аллоксанового диабета, обсуждается перспектива его использования для лечения инсулинзависимого сахарного диабета в форме аэрозоль-инсулина и таблетированного инсулина.

Ключевые слова: синсулин, аэрозоль-инсулин, таблетированный инсулин, сахарный диабет.

SUMMARY

**Investigation of experimental non-injected insulin
made by method of molecular microcapsulation
V.P. Kaliman**

Article deals with experimental data studying and comparing of antihyperglycemic activity of prototype microcapsulated non-injected insulin using alloxan-induced diabetes rat model. Perspectives of its application for treatment of insulin dependent diabetes mellitus as spray and tebleted forms are discussed.

Key words: insulin, spray insulin, diabetes mellitus, microcapsulation.

Дата надходження до редакції 10.01.2010 р.