

МЕДИЦИНСКИЕ
ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:547.96

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ
ПОЛИПЕПТИДОВ В РАСТВОРЕ
(Памяти Учителя)

© 2019 г. И. Л. Валуев^{a,*}, Л. В. Ванчугова^a, Л. И. Валуев^a

^a Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 13.05.2019 г.

После доработки 27.05.2019 г.

Принята к публикации 03.06.2019 г.

В статье суммированы опубликованные и новые результаты исследований, проведенных в ведущих научных учреждениях и клиниках нашей страны. Показано, что при пероральном введении разбавленных растворов инсулина не происходит разрушения гормона в желудке и значительно снижается степень его гидролиза ферментами кишечника. При этом гормон попадает в кровь, практически реализуя естественный путь поступления инсулина в кровотоки через печень.

DOI: 10.1134/S2308113919050188

“Нельзя всю жизнь продолжать дипломную работу. Или даже докторскую. Важно время от времени менять направление научного поиска. В результате приходят свежие, нестандартные решения”.

Н.А. Платэ

В этом году исполняется 85 лет со дня рождения нашего выдающегося современника Николая Альфредовича Платэ — ученого с мировым именем, многие пионерские исследования которого легли в основу создания научной школы, занявшей лидирующие позиции в ряде фундаментальных направлений науки о полимерах, талантливого педагога, человека, много сделавшего для сохранения и развития Российской академии наук. Широкому кругу читателей журнала “Высокомолекулярные соединения”, Главным редактором которого в течение многих лет был Николай Альфредович, он известен прежде всего своими основополагающими работами в области структурно-химической модификации синтетических полимеров, жидкокристаллических полимеров, полимерных мембран, теории макромолекулярных реакций и полимеров биомедицинского назначения. Среди последних наиболее известен инсулиновый проект, который явился естественным развитием фундаментальных исследований, проводимых Н.А. Платэ и сотрудниками по разработке научных основ создания и функционирования макромолекулярных систем, обеспечивающих защиту введенного в них лекарства от неблагоприятных внешних условий. Инсулин — гормон, дефицит которого приводит к сахарному

диабету, относится к наиболее интенсивно изучаемым препаратам подобного рода. Причина этого заключается в чрезвычайно широком распространении сахарного диабета, получившего название “неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.”, и существующими методами его лечения. По данным Всемирной организации здравоохранения сейчас более 300 миллионов человек в мире страдают этим заболеванием, а по прогнозам к 2025 году количество больных диабетом вырастет до 435 миллионов. 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].

Наиболее подходящим было бы пероральное (через рот) введение гормона с возможным поступлением его в печень аналогично продуктам пищеварения. Однако на таком пути возникает

принципиальное препятствие: гидролиз инсулина ферментами в желудке и тонком 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), отметим лишь, что до сих пор не существует применяемых в клинических условиях пероральных препаратов инсулина, да и других полипептидов.

Результатом инсулинового проекта было создание в Институте нефтехимического синтеза РАН запатентованного в России, США, Германии и других странах препарата Рансулин – инсулин для перорального введения. Рансулин представляет собой инсулин в полиакриламидном гидрогеле, модифицированном ингибитором протеолитических ферментов. Широкие испытания препарата (многие сотни, если не тысячи опытов, в том числе на животных и добровольцах), показали его высокую эффективность при снижении концентрации глюкозы в крови и отсутствие нежелательных побочных реакций. Фундаментальное значение таких работ заключалось в демонстрации возможности преодоления барьеров, воздвигнутых самой природой и поэтому казавшихся незыблемыми, на пути проникновения полипептидов в кровь при прохождении через пищеварительную систему [3].

Менее известны, но не менее значимы инициированные Н.А. Платэ и продолженные его учениками исследования в рамках развития таких работ. Речь идет об одном из нестандартных подходов, так любимых Николаем Альфредовичом. Оказалось, что решение фундаментальной проблемы защиты полипептидов от агрессивной среды пищеварительной системы возможно совершенно другим, более простым путем. Этот принципиально новый и необычный подход основан на известных фактах.

Первое – судьба воды в организме. Известно, что в отличие от твердых веществ поглощаемая человеком вода чрезвычайно быстро проходит через желудок и уже через 10–15 мин до 90% воды оказывается в тонком кишечнике [4]. И второе – скорость ферментативной реакции снижается с уменьшением концентрации субстрата [5]. В связи со сказанным выше возникло заманчивое предположение о возможности проникновения полипептидов в кровоток при пероральном введении их **разбавленных** растворов. При этом железы слизистой оболочки желудка не должны успевать прореагировать на появление полипептида и секретировать желудочный сок, т.е. появляется реальная возможность предотвратить гидролиз полипептида в желудке. В тонком кишечнике из-за пониженной скорости гидролиза часть молекул белка может иметь достаточное время для достижения слизистой оболочки и диффузии через нее в кровоток. Это реально, поскольку

имеются данные о принципиальной возможности диффузии инсулина через слизистые оболочки [6].

В настоящей статье суммированы опубликованные [7–10] и новые результаты исследований, проведенных в ведущих научных учреждениях и клиниках нашей страны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе применяли генноинженерный человеческий инсулин фирмы "Sigma" (США).

Для получения модели аллоксанового диабета использовали кроликов-самцов Шиншилла массой 2.5–3.1 кг. После суточного голодания кроликам вводили аллоксан в дозе 150 мг на 1 кг массы тела в подкисленном 0.9%-ном растворе NaCl, pH 4.5. 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. Стрептозотин вводили крысам внутривентриально в дозе 150 мг на 1 кг массы тела в цитратном буфере (0.01 М), pH 4.0. На шестой день уровень глюкозы в крови животных повысился до 230–400 мг/100 мл, а на десятый день – до 460–590 мг/100 мл.

Оценку гипогликемического эффекта препаратов инсулина проводили путем измерения 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 предварительно меченого флуоресцеином инсулина в плазме крови и в гомогенизате ткани печени определяли спектрофотометрически или радиоиммунным методом, используя наборы РИО-ИНС-ПГ 125 (Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты изучения эффективности действия инсулина при пероральном введении кроликам кристаллического препарата. Для сравнения здесь же приведены результаты контрольных экспериментов (без инсулина или при инъекционном введении гормона).

Как и следовало ожидать, никакого изменения концентрации глюкозы в крови при пероральном введении инсулина не происходило, т.е. он не попадал в кровоток, а разрушался в пищеварительной системе. Практически аналогичный результат был получен при пероральном введении кроликам кристаллического инсулина в желатиновых капсулах, покрытых желудочнонерастворимым покрытием на основе ацетилфталлилцеллюлозы. В этом случае растворение покрытия происходило непосредственно в тонком кишеч-

Таблица 1. Влияние способа введения инсулина на концентрацию глюкозы в крови здоровых кроликов (начальная концентрация глюкозы 80–140 мг/100 мл)

Способ введения инсулина	Доза, ед/кг	Концентрация глюкозы в крови, % от исходной			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
Контроль (14 кроликов)	—	101 ± 12	99 ± 8	102 ± 10	108 ± 12
Инъекция (9 кроликов)	5	59 ± 6	53 ± 9	52 ± 11	58 ± 4
Перорально, кристаллический инсулин (19 кроликов)	4–24	100 ± 13	99 ± 13	99 ± 9	104 ± 10
Перорально, кристаллический инсулин в желудочнонерастворимой капсуле (6 кроликов)	19	108 ± 9	104 ± 9	97 ± 10	104 ± 8

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 указано время после введения препарата.

Таблица 2. Влияние перорального введения кроликам раствора 25 ед. (1.0 мг) инсулина на концентрацию глюкозы в крови (начальная концентрация глюкозы 75–115 мг/100 мл)

Объем раствора, мл	Количество кроликов	Концентрация глюкозы в крови, % от исходной			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
1.0	6	105 ± 11	112 ± 10	98 ± 12	116 ± 12
3.0	5	89 ± 9	92 ± 11	86 ± 8	88 ± 10
5.0	8	85 ± 12	69 ± 11	72 ± 9	72 ± 10
10.0	7	82 ± 9	68 ± 10	53 ± 12	58 ± 8
15.0	7	91 ± 7	72 ± 10	59 ± 9	60 ± 11

нике. Однако появление там твердого инсулина также не сопровождалось заметным изменением концентрации глюкозы в крови.

Совершенно иная картина наблюдалась при пероральном введении разбавленных растворов инсулина. В табл. 2 суммированы результаты изучения зависимости эффективности действия раствора инсулина от его концентрации.

Видно, что, если при введении 1.0 мл раствора инсулина снижения уровня глюкозы в крови не наблюдалось, то для той же дозы инсулина, но растворенного в 10 мл, концентрация глюкозы в крови уменьшалась на 30–40%. Дальнейшее снижение концентрации раствора уже не оказывало существенного влияния на эффективность действия инсулина. Это значит, что, как и предполагалось, при пероральном введении разбавленные растворы инсулина довольно быстро (как и вода) проникают в тонкий кишечник, не разрушаясь в желудке, и значительная часть растворов достигает стенок кишечника, оказываясь практически вне зоны действия панкреатических ферментов.

Поскольку в данном случае движущей силой процесса абсорбции является градиент концентрации инсулина в просвете кишечника, эффективность всасывания гормона определяется видом животного организма. Так, при переходе от грызунов к кроликам и человеку (диаметр кишечника 3–4 мм, около 2 см и 4–6 см соответственно) [1] количество поступающего в кровь инсулина и степень сниже-

ния концентрации глюкозы в крови, естественно, уменьшаются (табл. 3). Поглощенному инсулину предстояло пройти более длинный путь до слизистой оболочки кишечника, в течение которого он подвергался деструкции под действием ферментов. Большее снижение уровня глюкозы в крови может быть достигнуто простым увеличением количества раствора инсулина.

Как известно [1, 3], 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 сначала поступает в печень, участвуя там в регуляции различных биосинтетических процессов [6], и лишь затем он попадает на периферию через большой круг кровообращения. Экзогенный инсулин, введенный под кожу, сохраняет не физиологически высокую концентрацию в месте введения, что часто приводит к различным осложнениям, характерным для больных сахарным диабетом.

В табл. 4 приведены результаты измерения концентрации инсулина в сыворотке крови и экстрактах ткани печени крыс после инъекционного и перорального введения разбавленного раствора инсулина.

Видно, что в отличие от подкожных инъекций при пероральном введении препаратов, инсулин

Таблица 3. Влияние перорального введения раствора инсулина на концентрацию глюкозы в крови

Доза инсулина, ед.	Объем раствора, мл	Количество испытуемых	Концентрация глюкозы в крови, % от исходной			
			30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
25	5.0	5 крыс	55 ± 7	44 ± 11	29 ± 8	26 ± 10
25	5.0	8 кроликов	85 ± 12	69 ± 11	72 ± 9	72 ± 11
25	15.0	5 добровольцев	94 ± 12	90 ± 11	86 ± 9	82 ± 10
40	25.0	4 добровольца	88 ± 10	73 ± 9	66 ± 11	74 ± 12

Таблица 4. Зависимость концентрации инсулина в плазме крови (числитель) и экстрактах ткани печени крыс (знаменатель) от способа введения препарата (доза инсулина 15 ед./кг; приведены минимальные и максимальные значения для 7 животных)

Способ введения	Концентрация инсулина, мкед./мл			
	0 (исходная)	30 мин	60 мин	90 мин
Инъекционно	$\frac{28-42}{32-37}$	$\frac{310-340}{49-62}$	$\frac{430-470}{74-83}$	$\frac{390-420}{90-104}$
	$\frac{33-40}{30-37}$	$\frac{64-75}{163-176}$	$\frac{90-105}{214-254}$	$\frac{128-145}{152-184}$

Таблица 5. Концентрация глюкозы в крови крыс (7 животных) со стрептозотоциновым диабетом

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

действительно первоначально накапливается в печени и только затем поступает в кровоток.

Поступающий в кровь инсулин сохраняет активность и способен выполнять свою физиологическую функцию при лечении сахарного диабета. Результаты применения растворов инсулина для лечения кроликов с аллоксановым экспериментальным сахарным диабетом представлены в табл. 5.

Ежесуточное введение раствора инсулина в течение первых пяти суток после развития экспериментального диабета приводило к снижению уровня глюкозы в крови (с 400–450 до 270–310 мг/100 мл), который частично восстанавливался на 20-й день после прекращения введения инсулина (330–380 мг/100 мл). Ежедневное введение раствора инсулина в течение последующих пяти суток (с 22-х по 26-е) сопровождалось по-

вторным снижением уровня глюкозы до 210–220 мг/100 мл, который практически не изменялся после прекращения введения раствора до окончания эксперимента (30 дней). В то же время концентрация глюкозы в крови кроликов контрольной группы без введения инсулина (4 животных) в течение всего эксперимента оставалась на уровне 400–500 мг/100 мл.

Положительные результаты были получены и при лечении крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом (табл. 5). В долговременном эксперименте на 16-е сутки после инъекции стрептозотина крысам в 12 и 17 ч перорально вводили раствор 10 ед. инсулина в 5 мл воды и измеряли концентрацию глюкозы.

Введение крысам раствора инсулина в 12 ч на 16-е сутки после инициирования диабета приводило к снижению уровня глюкозы, который не-

сколько восстанавливался к 17-и ч, а затем повторно снижался после приема раствора инсулина. Повторение этой процедуры на 17-е, 18-е и 20-е сутки сопровождалось долговременным снижением уровня глюкозы до практически постоянного значения.

Следует отметить, что обнаруженное явление характерно и для других, отличающихся от инсулина ($M = 5.7 \times 10^3$) полипептидов, например, глюкагона полипептида с $M = 3.5 \times 10^3$, появление которого в крови в отличие от инсулина приводит к повышению концентрации глюкозы. В контрольных экспериментах при пероральном введении 0.5–1.0 мг глюкагона в 1 мл воды каких-либо изменений концентрации глюкозы не наблюдали. В то же время введение 1.0 и 0.5 мг полипептида, растворенных в 10 мл воды, сопровождалось увеличением концентрации глюкозы в крови на 25 и 60% соответственно. Видно, что и в данном случае определяющим фактором являлась концентрация полипептида, а не его количество. Так, введение 0.5 мг глюкагона в 10 мл приводило к более ярко выраженному эффекту, чем 1.0 мг в том же количестве растворителя.

Повышение степени проникновения в кровь при снижении концентрации раствора характерно и для более высокомолекулярного гормона роста – соматотропина ($M = 22 \times 10^3$). Пероральное введение кроликам раствора 1.0 мг гормона в 1.0 мл воды не сопровождалось изменением его концентрации в крови, а раствор 1.0 мг гормона в 6.0 мл воды повышал концентрацию гормона с 0.1–0.2 нм/мл до 1.8–2.0 нг/мл. Известно, что одним из продуктов гидролиза соматотропина является полипептид, обладающий инсулиноподобной активностью, и его появление в крови должно было бы приводить к уменьшению концентрации глюкозы. Неизменность концентрации глюкозы после перорального введения гормона свидетельствует о том, что он проникает в кровь в нативном состоянии.

Естественно, что при создании новой лекарственной формы всегда встает вопрос об удобствах ее применения. Очевидно, что с этой точки зрения раствор – не самая удобная форма. Поэтому была разработана твердая композиция, которая включала инсулин, водорастворимую органическую кислоту, бикарбонат натрия и инертный наполнитель. Композицию применяют путем ее растворения в воде до достижения требуемой концентрации инсулина. При растворении органическая кислота и бикарбонат натрия взаимодействуют между собой с выделением углекислого газа, пузырьки которого обеспечивают перемешивание раствора и быстрое растворение инсулина. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнители, облегчающие процесс формирования таблетки или ее применение (создание удобного для применения объема), вещества, придающие требуемый цвет и вкус всей

композиции, а также вещества, ускоряющие процесс проникновения полипептидов через слизистую оболочку тонкого кишечника.

Таким образом, совокупность всех полученных результатов позволяет сделать вывод, что при пероральном введении разбавленных растворов инсулина не происходит разрушения гормона в желудке и значительно снижается степень его гидролиза пищеварительными ферментами кишечника. Гормон всасывается в кровь, практически реализуя естественный путь поступления инсулина в кровоток через печень. Большая часть полученных результатов аналогична достигнутому при использовании препарата “Рансулин” [1], но при этом существенно упрощается как технология получения, так и применения новой лекарственной формы инсулина. Принимая во внимание положительные результаты испытания растворов инсулина на животных с экспериментальным диабетом, можно высказать осторожное предположение: после необходимой, трудоемкой и долговременной доработки, включая выбор оптимального состава композиции, а главное, проведение всех стадий доклинических и клинических испытаний, рассмотренный подход может быть альтернативой инъекциям инсулина при лечении сахарного диабета, особенно с учетом “правильного” пути поступления гормона в кровоток.

Авторы выражают искреннюю благодарность Л.К. Старосельцевой и А.С. Аметову, И.И. Дедову и А.И. Григорьеву за помощь в организации проведения работы с животными.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saffran M., Pansky B., Colin Budd G., Williams F.E.* // J. Controlled Release. 1997. V. 46. № 1. P. 89.
2. *Аметов А.С.* Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
3. *Valuev I.L., Valuev L.I., Vanchugova L.V., Obydennova I.V.* // Polymer Science A. 2018. V. 60. № 4. P. 495.
4. *Jensen D.* The Principles of Physiology. New York: Appleton-Century-Crofts, 1980. P. 823.
5. Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И.В. Березина, К. Мартинка. М.: МГУ, 1982.
6. *Lee V.H.L.* // CRC Critical Revs Therapeutic Drug Carrier Systems. 1988. V. 5. № 2. P. 69.
7. *Платэ Н.А., Валуйев Л.И., Старосельцева Л.К., Сытов Г.А., Ульянова М.В., Валуйев И.Л., Ванчугова Л.В., Талызенков Ю.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 114.
8. *Платэ Н.А., Валуйев Л.И., Старосельцева Л.К., Сытов Г.А., Ульянова М.В., Валуйев И.Л., Ванчугова Л.В.* // Хим.-фармацевт. журн. 2006. Т. 40. № 1. С. 47.
9. *Plate N.A., Valuev L.I., Staroseltseva L.K., Valuev I.L., Vanchugova L.V., Sytov G.A., Valueva T.A.* // J. Drug Delivery Sci. Technol. 2007. V. 17. № 3. P. 169.
10. *Валуйев Л.И., Ванчугова Л.В., Сытов Г.А., Валуйев И.Л.* // Технология живых систем. 2009. Т.6. № 7. С. 24.