

УДК 577.152.14:541.64

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ГИДРОГЕЛЬ – НОСИТЕЛЬ ПЕРОРАЛЬНОГО ИНСУЛИНА

© 2021 г. Л. И. Валуев¹ *, И. Л. Валуев¹, Л. В. Ванчугова¹, И. В. Обыденнова¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 07.09.2020 г.

После доработки 15.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Изучено влияние структуры мукоадгезивного инсулинсодержащего полимерного гидрогеля на скорость выделения гормона. Показано, что уменьшение размеров пор гидрогеля приводило к увеличению скорости выделения инсулина, что способствовало сокращению времени достижения положительного эффекта при пероральном введении препарата и сохранении физиологического пути проникновения гормона в кровь через печень.

Ключевые слова: диабет, инсулин, гидрогель полиакриламида

DOI: 10.31857/S0555109921020185

Создание полимерных носителей белков, существенно повышающих их устойчивость к протеолизу и тем самым обеспечивающих возможность перорального введения лекарственных препаратов на их основе относится к одной из наиболее сложных и главное практически значимых проблем современной прикладной биохимии и химии высокомолекулярных соединений.

Среди веществ полипептидной природы самое широкое распространение получил инсулин – гормон, дефицит которого приводит к сахарному диабету. По данным Национального Центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, США) инсулин считается самым изучаемым гормоном: более 300 тысяч цитирований, и только за последний год опубликовано свыше 350 работ, посвященных созданию пероральных форм инсулина.

Причина повышенного внимания к этому гормону заключается в чрезвычайно широком распространении сахарного диабета, получившего название “неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.”. В настоящее время по данным ВОЗ в мире около 300 млн человек страдают этим заболеванием, а по прогнозам к 2025 г. количество больных диабетом вырастет до 435 млн.

В естественных условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин попадает в кровь через печень, которая и осуществляет контроль за распределением гормона в организме [1]. При инъекциях (а это практически единственный способ лечения сахарного диабета) такой контроль отсут-

ствует, что может приводить к ряду осложнений, часто наблюдаемых у больных диабетом.

Единственной возможностью подключения печени к распределению инсулина является пероральное введение гормона [2]. Не останавливаясь подробно на существующих подходах к решению проблемы защиты инсулина от действия протеолитических ферментов пищеварительной системы, отметим, что в последние годы основное внимание уделяется защитным системам на основе, так называемых, мукоадгезивных полимеров, обеспечивающих адгезию препарата на слизистую оболочку с последующим его выделением. Дополнительно такие системы обычно содержат ингибиторы протеиназ [3] или соединения, повышающие проницаемость слизистой оболочки для гормона [4]. В качестве полимерной основы используют хитозан и его производные, альгинаты, полилактоиды, полиакриламиды, карбоксиметилцеллюлозу, полиакриловую кислоту полиэтиленоксид, и т.д. [5–8].

Следует отметить, что, несмотря на целый ряд положительных результатов испытаний синтезированных препаратов на животных, до настоящего времени не существует реально применяемых в клинических условиях препаратов инсулина для перорального применения.

Весьма обнадеживающие результаты получены при изучении, в том числе и на добровольцах, созданного учеными Российской академии наук под руководством Н.А. Платэ препарата Рансулин [9, 10]. Это инсулин, включенный в полиакриламидный гидрогель, модифицированный овомукоидом, роль которого заключалась в ингибировании

нию активности ферментов пищеварительной системы (трипсина и α -химотрипсина) и приданию гидрогелю мукоадгезивности. К недостаткам Рансулина следует отнести длительный период времени между приемом препарата и моментом достижения максимального снижения уровня глюкозы в крови.

Цель работы – изучение возможности модификации полиакриламидного гидрогеля – носителя инсулина для увеличения скорости выделения гормона на начальном этапе.

МЕТОДИКА

В работе использовали инсулин (активность 25 ед./мг) фирмы “Novo Nordisk” (Дания), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (БИС), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, меркаптоуксусную кислоту (МУК) (“Serva”, Германия), сывороточный альбумин человека (ММ 67 000 Да), алкогольдегидрогеназа из дрожжей (молекулярная масса 141 000 Да, “Sigma”, США). Овомукоид выделяли из белка яиц утки по методике, описанной в работе [6].

Для получения ненасыщенного производного овомукоида 100 мг овомукоида растворяли в 20 мл 0.5 М бикарбоната аммония, рН 8.0. Раствор охлаждали до 0–5°C, добавляли 0.01 мл хлорангидрида акриловой кислоты и смесь перемешивали в течение 15 мин.

Гидрогель синтезировали путем радикальной полимеризации при комнатной температуре водного раствора, содержащего 0.3% ненасыщенного производного овомукоида, 9.0% акриламида и 0.9% БИС. Реакцию полимеризации проводили под действием окислительно-восстановительного катализатора (персульфата аммония-N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) в присутствии 0.01–0.12% МУК. Образующийся гидрогель измельчали через сито с диаметром пор 1 мм и промывали 0.5 М бикарбонатом аммония, рН 8.0, до полного удаления не прореагировавших соединений.

Степень набухания гидрогелей оценивали гравиметрически и рассчитывали по формуле: $S_r = m_1/m_2 - 1$, где m_1 и m_2 – массы равновесно набухшего и лиофильно высушенного гидрогеля соответственно.

Для изучения проницаемости к 2 мл геля, набухшего в 0.5 М бикарбонате аммония, рН 8.0, добавляли 4 мл раствора белка в том же буфере. Смесь оставляли при 4°C до установления постоянного значения оптической плотности раствора белка при 280 нм (обычно не более 48 ч). Концентрацию белка в исходном растворе и после его инкубации с гелем оценивали с использованием калибровочной зависимости, построенной для каждого из указанных выше белков. Учитывая соотношения объемов используемых фаз, рас-

считывали количество пор, доступных для белка, принимая за 100% их количество, доступных для воды.

Инсулинсодержащие препараты получали насыщением гидрогелей раствором инсулина.

Концентрацию глюкозы в крови кроликов-самцов Шиншилла, массой 2.0–3.1 кг, определяли с помощью глюкометра One Touch (“Johnson & Johnson”, США). Концентрацию инсулина в плазме крови и в гомогенизате ткани печени крыс Wistar массой 170–200 г определяли радиоиммунным методом, используя коммерческие наборы РИО-ИНС-ПГ 125 (Республика Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные широкомасштабные испытания Рансулина на трех видах животных (кролики, крысы и мыши) и добровольцах, наряду с отчетливым гипогликемическим действием препарата, выявили одну его особенность, отличающего его от инъекционно вводимого гормона. Если после подкожной инъекции раствора инсулина максимальное снижение уровня глюкозы в крови обычно достигается через 45 мин, то при пероральном введении Рансулина это время увеличивалось до 65–80 мин, что может существенно ограничить его клиническое применение.

Очевидно, что определяющий вклад в скорость выделения инсулина из гидрогеля, при прочих равных условиях, вносят структурные особенности гидрогеля, в частности размеры пор и характер их распределения.

Наиболее распространенным способом получения ПААГ является радикальная сополимеризация акриламида и бифункционального сшивателя – N,N'-метиленабисакриламида в водном растворе под действием окислительно-восстановительной каталитической системы [11]. При этом структура полученных гидрогелей характеризовалась широким распределением пор по размерам. Проведение сополимеризации в присутствии, так называемого, передатчика цепи, ограничивающего молекулярную массу сополимера, образующегося на первой стадии процесса, приводила к существенному изменению структуры гидрогеля. Значительно (почти в два раза) сокращалось количество больших пор, проницаемых для белков с молекулярной массой (ММ) выше 100 000 Да, и несколько уменьшается количество пор, проницаемых для белка с ММ 67 000 Да.

Аналогичная закономерность наблюдалась и при получении препарата Рансулин сополимеризацией в присутствии ненасыщенного производного овомукоида (табл. 1). Из табл. 1 видно, что увеличение количества передатчика цепи приводило к повышению степени набухания гидрогеля, а главное, к более равномерному распределению

Таблица 1. Свойства инсулинсодержащих гидрогелей

№ пп	МУК $\times 10^3$, моль/л	Степень набухания, г воды/г полимера рН 7.2 ($\pm 8\%$)	Доступность пор для белка, % от общего количества пор, ($\pm 6\%$)		Распределение инсулина между гелем и раствором, ($\pm 2\%$)**	Выделение инсулина при рН 7.2, % от исх. ($\pm 4\%$) через		
			ММ белка 6.7×10^4	ММ белка 14.1×10^4		20 мин	45 мин	60 мин
1	0	10	80	53	52/48	40	61	66
2*	0	25	86	62	51/49	46	65	74
3	2.0	12	73	47	57/43	51	64	70
4	4.0	17	66	39	56/44	62	70	74
5	8.0	20	68	36	60/40	65	73	80
6	10.0	24	70	29	58/42	69	80	85

* Гидрогель получен при концентрации БИС 0.6%.

Таблица 2. Зависимость концентрации инсулина в плазме крови и экстрактах ткани печени крыс от способа введения препарата. (Доза инсулина 15 ед./кг. Приведены минимальные и максимальные значения для 4 животных)

Среда	Препарат, способ введения	Концентрация инсулина, мкЕд./мл			
		Исход	30 мин	60 мин	90 мин
Плазма крови	Раствор инсулина, инъекция	28–42	310–340	430–470	390–420
	1 перорально	33–40	64–75	90–105	128–145
	5 перорально	23–30	80–95	132–139	128–140
Экстракт ткани печени	Раствор инсулина, инъекция	32–37	49–62	74–83	90–104
	1 перорально	30–37	163–176	214–254	152–184
	5 перорально	44–49	223–240	210–233	160–175

пор по размерам за счет снижения количества больших пор, проницаемых для белков с ММ 100000 Да и выше. Повышение доли пор меньшего размера, то есть увеличение поверхности полимера, разделяющей поры, сопровождалось некоторым ростом количества инсулина, которое поглощалось гидрогелем из раствора гормона.

Изменение характера распределения приводило к значительному изменению кинетики выделения инсулина из гидрогеля в раствор. Чем уже распределение пор по размерам (за счет снижения количества больших пор), тем выше скорость выделения инсулина в раствор. При этом оказалось, что именно распределение пор по размерам, а не степень набухания гидрогеля, определяла в данном случае скорость выделения гормона. Выделение инсулина из гидрогелей с близким распределением пор (образцы 1 и 2), но различающихся степенью набухания, происходила с практически одинаковой скоростью.

В табл. 2 приведены результаты измерения концентрации инсулина в плазме крови и экстрактах ткани печени крыс при пероральном введении синтезированных препаратов и при инъекциях раствора инсулина. Видно, что, во-первых, как и было предположено в работе [2] и экспериментально показано в работе [12], при пероральном введении синтезированных гидрогелей, в от-

личие от инъекций, инсулин полностью повторял физиологический путь движения гормона в организме, т.е., первоначально он накапливался в печени и только затем поступал в кровоток. Во-вторых, максимальная концентрация инсулина в крови для инъекционного гормона и перорально введенного модифицированного препарата (№ 5) достигалась практически в одно и то же время (около 60 мин). При использовании немодифицированного гидрогеля это время составляло 90 мин.

В табл. 3 приведены результаты изучения гипогликемической активности синтезированных препаратов. Из таблицы видно, что использование модифицированного гидрогеля действительно обеспечивало сокращение времени достижения максимального эффекта снижения концентрации глюкозы в крови, приближая его к аналогичному параметру, достигаемому при инъекционном введении раствора инсулина.

Таким образом, совокупность всех полученных результатов позволяла сделать вывод, что при пероральном введении инсулина в гидрогеле с узким распределением пор по размерам не только реализовался естественный путь поступления инсулина в кровь через печень, но и время достижения максимального эффекта существенно приближалось ко времени, достигаемому при инъекциях раствора гормона. Принимая во внимание

Таблица 3. Зависимость концентрации глюкозы в крови кроликов от времени перорального введения препарата. (Средние значения для 6 животных. Исходная концентрация глюкозы 90–114 мг/100 мл.)

Препарат	Концентрация глюкозы в крови, % от исх. ($\pm 8\%$)				
	30 мин*	45 мин*	65 мин*	80 мин*	90 мин*
1	90	78	66	64	70
2	96	80	62	50	57
3	88	64	57	65	65
4	83	62	55	62	67
5	85	56	60	63	74
6	82	60	56	68	76
Инсулин, инъекция	46	34	30	44	50

* Время после введения препарата.

положительные результаты испытания препаратов на животных, можно сделать осторожный вывод о том, что синтезированные препараты после всесторонних медико-биологических испытаний при лечении сахарного диабета могут быть альтернативой инъекциям инсулина.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Авторы выражают искреннюю благодарность Л.К. Старосельцевой за помощь в организации 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. Control. Release. 1997. V. 46. № 1. P. 89–94.
2. *Wong C.Y., Martinez J., Dass C.R.* // J. Pharm. Pharmacol. 2016. V. 68. № 9. P. 1093–1108.
3. *Banerjee A., Wong J., Gogoi R., Brown T., Mitragotri S.* // J. Drug Target. 2017. V. 25. № 7. P. 608–615.
4. *Banerjee A., Hee Lee J., Samir Mitragotri S.* // Bioeng. Transl. Med. 2016. V. 1. № 3. P. 338–346.
5. *Su F.-Y., Lin K.-J., Sonaje K., Wey S.-P., Yen T.-C., Ho Y.-C., Panda N., Chuang E.-Y., Maiti B., Sung H.-W.* // Biomaterials. 2012. V. 33. № 9. P. 2801–2811.
6. *Chuang E.-Y., Lin K.-J., Su F.-Y., Mi F.-L., Maiti B., Chen C.-T., Wey S.-P., Yen T.-C., Juang J.-H., Sung H.-W.* // J. Control Release 2013. V. 172. № 2. P. 513–522.
7. *Sheng J., He H., Han L., Qin J., Chen S., Ru G., Li R., Yang P., Wang J., Yang V.C.* // J. Control. Release. 2016. V. 233. № 2. P. 181–187.
8. *Li X., Guo S., Zhu C., Zhu Q., Gan Y., Rantanen J., Rahbek U.L., Hovgaard L.* // Biomaterials. 2013. V. 34. № 37. P. 9678–9684.
9. *Григорьев А.И., Платэ Н.А., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Гончарова А.Г.* // Клиническая медицина. 2005. Т. 83. № 1. С. 32–35.
10. *Платэ Н.А., Княжев В.А., Валуев Л.И.* // Вестник РАН. 2001. Т. 71. № 10. С. 899–914.
11. *Ванчугова Л.В., Валуев Л.И., Валуев И.Л., Талызенков Ю.А.* // Высокомолекулярные соединения. 2013. Т. 55. № 2. С. 225–228
12. *Валуев Л.И., Валуев И.Л., Старосельцева Л.К., Ванчугова Л.В.* // Хим.-фарм. журн. 2019. Т. 53. № 4. С. 20–23.

Modified Hydrogel – Carrier of Oral Insulin

L. I. Valuev*, I. L. Valuev^a, L. V. Vanchugova^a and I. V. Obydenнова^a

^aA.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

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

The effect of the structure of a mucoadhesive insulin-containing polymeric hydrogel on the rate of hormone release was studied. It has been shown that a decrease in the pore size of the hydrogel leads to an increase in the rate of insulin release, which contributes to a reduction in the time to achieve a positive effect upon oral administration of the drug while maintaining the physiological pathway of the hormone penetration into the blood through the liver.

Keywords: diabetes, oral insulin, polyacrylamide hydrogel