

## МИКРОИГЛЫ КАК СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ИНСУЛИНА

Е.Г. Кузнецова<sup>1</sup>, В.А. Рыжикова<sup>1</sup>, Л.А. Саломатина<sup>1</sup>, В.А. Тукмачев<sup>2</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГУП «Научно-исследовательский институт физических проблем им. Ф.В. Лукина», Москва, Зеленоград, Российская Федерация

**Цель исследования:** доказать принципиальную возможность увеличения скорости диффузии инсулина через кожу *in vitro* с предварительной аппликацией на нее микроигл. **Материалы и методы.** В исследованиях *in vitro* была использована микроэмульсионная матричная трансдермальная терапевтическая система инсулина. Лекарственной субстанцией служил полусинтетический генноинженерный инсулин человека. Для усиления диффузионного потока лекарственного вещества были использованы аппликаторы, представляющие собой кремниевые микроиглы длиной 40 и 150 мкм на кремниевой подложке. Динамику выхода инсулина из трансдермальных терапевтических систем через неконсервированную кожу кролика изучали *in vitro* в стеклянных диффузионных ячейках Франца на анализаторе диффузии лекарственных препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания). Для отделения спектра поглощения инсулина от спектров поглощения собственных белков кожи при исследовании рабочих растворов гормона на спектрофотометре была использована методика мечения инсулина флуоресцеин изотиоцианатом. **Результаты.** Показано, что количество инсулина, прошедшее через кожу *in vitro* из трансдермальной терапевтической системы за 20 часов, составляет  $282,5 \pm 61,1$  и  $372,3 \pm 7$  мкг после предварительной аппликации микроигл размером 40 и 150 мкм соответственно. Это в 1,4 и 1,9 раза больше по сравнению с трансдермальной системой без использования микроигл. **Заключение.** Найдены условия применения микроигл (длина – 150 мкм, время предварительной аппликации – 1 ч) для повышения диффузии инсулина через кожу из модельной трансдермальной терапевтической системы.

**Ключевые слова:** трансдермальная терапевтическая система, микроиглы, диффузия инсулина.

## MICRONEEDLES AS A WAY TO INCREASE THE TRANSDERMAL INSULIN DELIVERY

E.G. Kuznetsova<sup>1</sup>, V.A. Ryzhikova<sup>1</sup>, L.A. Salomatina<sup>1</sup>, V.A. Tukmachev<sup>2</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> F.V. Lukin Federal Research Institute of Physical Problems, Moscow, Zelenograd, Russian Federation

**Aim:** to prove the possibility of increasing the diffusion of insulin through the skin *in vitro* with pre-applying microneedles. **Materials and methods.** Microemulsion for transdermal therapeutic system of insulin has been used *in vitro* studies. Genetically engineered human insulin has been used in this research. Applicators with silicon microneedles (40 and 150 microns long) have been used to enhance the diffusion flux of drug substance. The dynamics of insulin release from the transdermal therapeutic systems through the rabbit skin has been studied in glass Franz diffusion cells in analyzer diffusion of drugs HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., UK). Insulin has been labeled with fluorescein isothiocyanate to separate the insulin absorption spectrum from the spectra of native skin proteins at spectrophotometer measurements. **Results.** The amounts of insulin delivered through the skin *in vitro* after previous application of microneedles of 40 and 150 microns are  $282.5 \pm 61.1$  and  $372.3 \pm 7.0$  microgram, respectively. This is 1.4 and 1.9 times more than in the transdermal system without microneedles. **Conclusion.** The conditions for increasing the diffusion of insulin through the skin in a model transdermal therapeutic system with microneedles (length – 150 microns, duration of pre-application – 1 hour) have been found.

**Key words:** transdermal drug delivery system, microneedles, insulin diffusion.

**Для корреспонденции:** Кузнецова Евгения Геннадьевна. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 193-86-62. E-mail: kuzeugenia@gmail.com.

**For correspondence:** Kuznetsova Evgeniya Gennadiyevna. Address: 1, Shchukinskaya St., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 193-86-62. E-mail: kuzeugenia@gmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на фармацевтическом рынке растет число лекарственных средств (ЛС) и вакцин, которые вводятся пациентам с помощью инъекций. Но не всегда инъекционный способ введения лекарства бывает удобным для самостоятельного использования, так как часто невозможно обеспечить асептическое выполнение инъекции или требуется специализированная помощь медицинского персонала. Поэтому все более распространенными становятся разработки неинвазивных способов доставки данных лекарственных веществ (ЛВ) [1].

Трансдермальные терапевтические системы (ТТС) являются привлекательной альтернативой инъекциям, хотя преодоление рогового слоя кожи лекарственными веществами, особенно высокомолекулярными, до сих пор остается сложной задачей. Одним из возможных подходов преодоления кожного барьера является использование микроигл. Данный способ усиления чрескожного проникновения чрезвычайно актуален для макромолекул [2, 3], в том числе и для создания ТТС инсулина.

За последнее десятилетие были опробованы многие материалы для изготовления микроигл, такие как кремний [4], двуокись кремния, полимеры, стекло и другие. Размер игл обычно варьирует в диапазоне от 1,0 до 300 мкм в длину, диаметр острия около 1,0 мкм. Кремниевые микроиглы, как правило, формируют с помощью технологий микроэлектромеханических систем (МЭМС-технологии) на кремниевых подложках с толщиной 300–700 мкм. На единице площади подложки может содержаться до 1000 микроигл [5]. Микроиглы за счет эмпирически подобранной длины проходят только роговой слой и эпидермис, не затрагивая дермы, в которой находятся нервные волокна и кровеносные сосуды [6] (рис. 1).

В научной литературе встречаются сообщения о разработке систем чрескожной доставки лекар-

ственных веществ с использованием полых микроигл для различных заболеваний, например, таких как болезнь Альцгеймера [7, 8], коллаген-индуцированный артрит [9], сахарный диабет [10]. Было показано, что микроиглы повышают диффузию высокомолекулярных ЛВ в кровоток через роговой слой, обеспечивая тем самым специфическую эффективность ТТС.

Разработка конструкции ТТС с полыми микроиглами является трудной и затратной задачей. В связи с этим мы решили использовать модельную лекарственную форму, состоящую из двух частей: ТТС инсулина с микроэмульсионной системой доставки [11, 12] и аппликатора с микроиглами (рис. 2).

Цель данной работы – доказательство принципиальной возможности увеличения скорости диффузии инсулина через кожу *in vitro* с предварительной аппликацией на нее микроигл.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Состав и конструкция ТТС инсулина

В качестве образца для исследования эффективности использования микроигл *in vitro* для увеличения проницаемости кожи была использована матричная ТТС инсулина [11–13]. ЛВ в матрицу вносили в составе микроэмульсионной композиции [14].

Лекарственной субстанцией служил полусинтетический генноинженерный инсулин человека (ФС 42У-201-1103-01), синтезированный на Экспериментальном предприятии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

### Микроиглы

Для усиления диффузионного потока ЛВ были использованы аппликаторы, представляющие собой кремниевые пластины размером 10 × 10 мм с кремниевыми микроиглами с защитным слоем из нитрида кремния (толщина слоя Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> – 0,11 мкм) (рис. 2). Микроиглы были изготовлены в Научно-исследовательском институте физических проблем им. Ф.В. Лукина с использованием МЭМС-технологий. В качестве исходного материала использовали кремниевую заготовку КДБ-10(100) диаметром 100 мм. На заготовке методом фотолитографии формировали микроиглы с заданной высотой и плотностью распределения с последующим анизотропным травлением кремниевой пластины щелочным раствором. Полученную кремниевую заготовку с микроиглами разрезали на пластины нужного размера.

В экспериментах были использованы иглы длиной 40 и 150 мкм. Расстояние между микроиглами в первом случае составило 250 мкм, а во втором случае – 500 мкм.

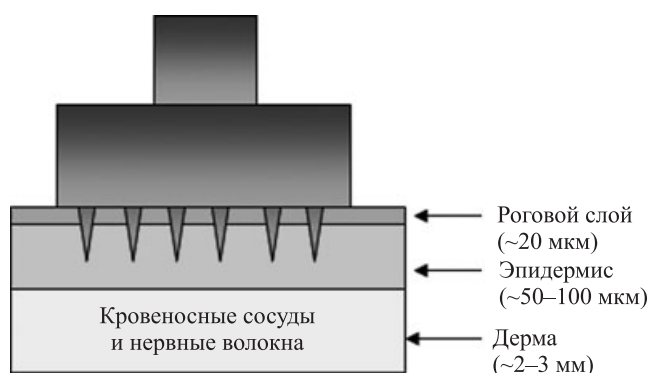


Рис. 1. Схематичное представление проникновения микроигл в верхние слои кожи

Fig. 1. Schematic representation of the microneedles penetration in the upper layers of the skin

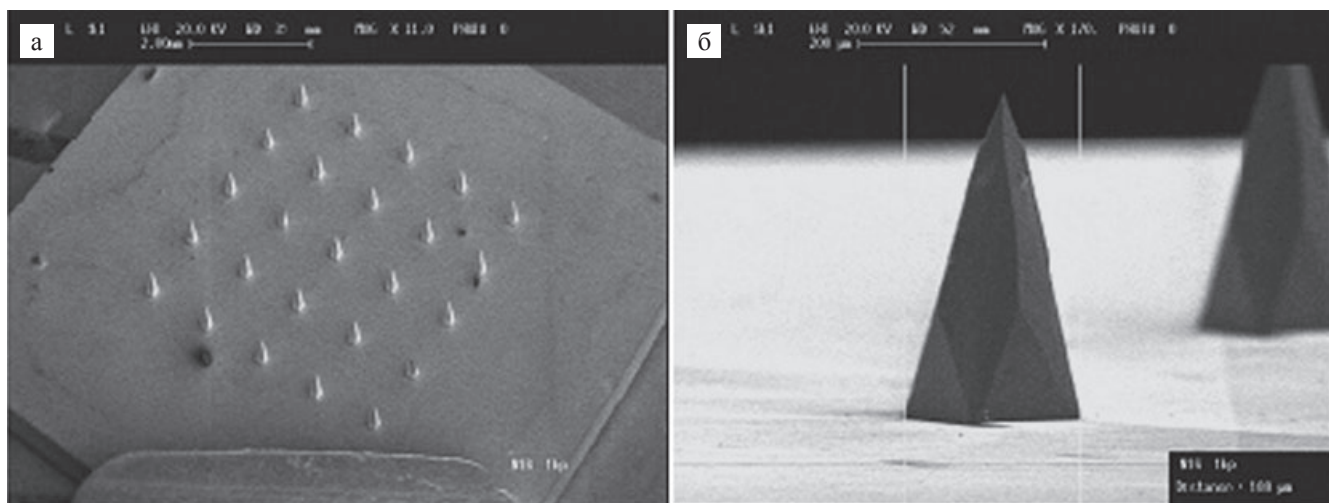


Рис. 2. Микрофотография кремниевых игл для трансдермальных терапевтических систем: а – аппликатор с микроиглами; б – отдельная микроигла

Fig. 2. SEM-image of the silicon needles for transdermal delivery systems: а – applicator with microneedles; б – single microneedle

### Экспериментальные животные

Животные получены из вивария ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» МЗ РФ. Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986). Содержание животных осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям содержания животных».

В экспериментах по изучению диффузии инсулина из ТТС *in vitro* были использованы кролики породы Новозеландский белый мужского пола массой 2,1–2,4 кг.

### Мечение инсулина

Для отделения спектра поглощения инсулина от спектров поглощения собственных белков кожи при исследовании рабочих растворов гормона на спектрофотометре была использована методика мечення инсулина флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ). Максимум поглощения ФИТЦ фиксируется при длине волны 495 нм. Так как ФИТЦ связывается с лизиновыми остатками белка в щелочной среде при pH 9,2 [15], мечение инсулина проводили в 0,2 М растворе  $\text{NaHCO}_3$ , подщелаченным 1 н NaOH до pH 9,2. Конъюгат и непрореагировавшую метку разделяли на хроматографической колонке PD-10, заполненной гелем Sephadex G-25 M (Pharmacia, Швеция).

Уровень мечення инсулина ФИТЦ  $F$  определяли по формуле:

$$F = (\varphi A_{495}) / (C_0 \xi_{495}^{\text{ФИТЦ}}),$$

где  $\varphi$  – множитель, учитывающий отношение молекулярных масс инсулина к ФИТЦ;  $A_{495}$  – поглощение конъюгата инсулин-ФИТЦ при длине волны 495 нм ( $\text{см}^{-1}$ );  $C_0$  – концентрация меченого инсулина в растворе (мг/мл);  $\xi_{495}^{\text{ФИТЦ}}$  – коэффициент экстинкции ФИТЦ при 495 нм, равный 196 мл/мг·см.

Во всех экспериментах уровень мечення составлял 0,8–1,2.

### Изучение скорости диффузии инсулина в ячейках Франца

Образцы кожи взрослых кроликов готовили по ранее описанной методике.

Диффузию инсулина из ТТС через неконсервированную кожу кролика изучали *in vitro* в стеклянных ячейках Франца [16] при непрерывном перемешивании при 32 °C на анализаторе диффузии лекарственных препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания) (рис. 3) с последующей регистрацией спектров поглощения рабочих растворов на спектрофотометре UV-2600 (Shimadzu, Япония).

### Метод электронной сканирующей микроскопии (СЭМ)

Исследование поверхности аппликатора с микроиглами проводили на сканирующем электронном микроскопе «JEOL JSM-T330» (JEOL, Япония) при увеличении 1000 и ускоряющем напряжении 5 кВ.

Токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления на установке JFC-1100 (JEOL, Япония). Время напыления – 8–10 минут, величина постоянного тока – 5–7 мА. В качестве напыляемого материала использовали платино-палладий-вольфрамовый комплекс.



Рис. 3. Анализатор диффузии лекарственных препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания)

Fig. 3. Diffusion analyzer of drugs HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., UK)

## Алгоритм проведения исследований модельной системы ТТС с микроиглами

При исследовании диффузии инсулина через кожу *in vitro* на образец неконсервированной кожи кролика накладывали аппликатор с микроиглами, с последующим закреплением данной конструкции между фланцами донорской и приемной камер диффузионной ячейки. Через определенное время аппликатор удаляли и на кожу накладывали ТТС инсулина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование прочности микроигл

Как известно, кремниевые микроиглы достаточно хрупкие, поэтому существовала опасность закрытия микроканалов в коже сломанными концами микроигл. Методом СЭМ были проведены исследования целостности микроигл до и после аппликации в течение 1 ч, которые показали, что микроиглы полностью сохраняют свою форму. На рис. 4 представлена типичная фотография микроиглы до и после эксперимента.

### Время предварительного воздействия микроигл

В эксперименте *in vitro* было проверено влияние различного времени предварительной аппликации микроигл длиной 40 мкм на диффузию инсулина из ТТС через неконсервированную кожу кролика. Были выбраны следующие временные интервалы: 1, 2 и 4 часа. Результаты данного эксперимента представлены в таблице.

Как видно из таблицы, влияние микроигл на диффузию инсулина из ТТС через кожу наблюдается после 1 ч их предварительной аппликации. Меж-

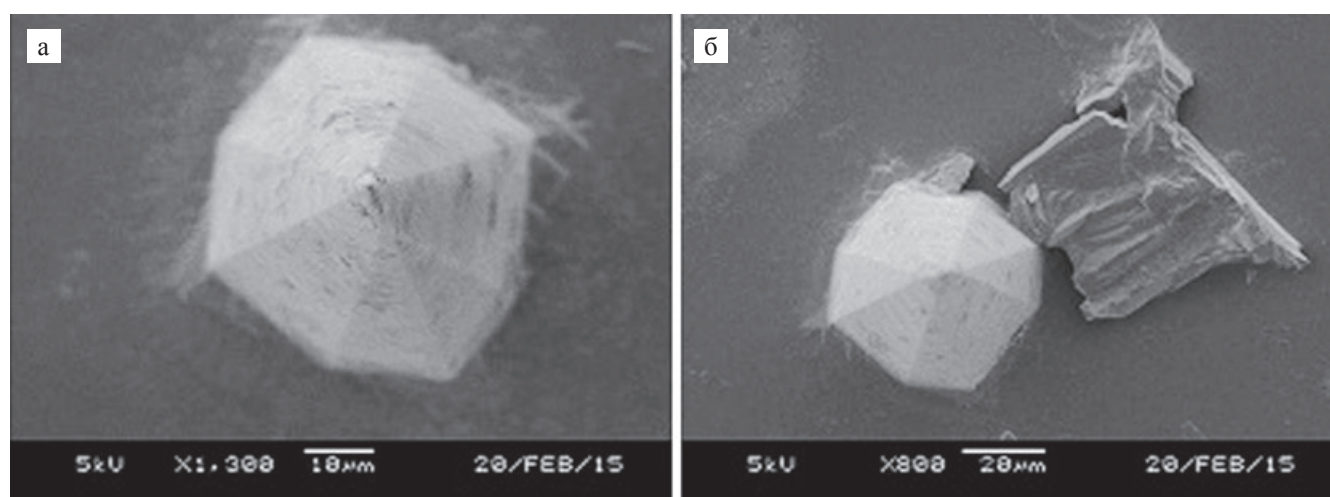


Рис. 4. Микрофотография кремниевой микроиглы: а – до эксперимента; б – после эксперимента

Fig. 4. SEM-image of the silicon needle: а – before the experiment; б – after the experiment

Таблица

**Исследование диффузии инсулина из ТТС при различном времени воздействия микроигл на кожу**

**Reserch of insulin diffusion from TDS at various time of pre-application microneedles to the skin**

| Время воздействия микроигл | Масса инсулина, прошедшего через кожу за 24 часа, мкг/см <sup>2</sup> * ±σ (n = 5) |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Без микроигл (контроль)    | 168,6 ± 82,1                                                                       |
| Менее 1 ч                  | 170,6 ± 67,5                                                                       |
| 1 ч                        | 329,5 ± 69,5                                                                       |
| 2 ч                        | 363,2 ± 78,2                                                                       |
| 4 ч                        | 224,3 ± 86,3                                                                       |

Примечание. \* – 40 мкг = 1,0 Ед.

ду значениями массы гормона, прошедшего через кожу в течение 1, 2 и 4 часов после аппликации микроигл (соответственно  $329,5 \pm 69,5$ ;  $363,2 \pm 78,2$  и  $224,3 \pm 86,3$  мкг), нет статистически достоверных отличий ( $p > 0,5$ ). Можно предположить, что в условиях проведенного эксперимента для повышения специфической активности ТТС инсулина важно не время аппликации микроигл на кожу, а сам факт образования микроканалов.

При проведении дальнейших экспериментов *in vitro* было выбрано время воздействия микроигл на кожу, равное 1 часу.

**Исследование проникновения инсулина через кожу *in vitro* после предварительной аппликации микроигл**

Была проведена серия экспериментов по изучению диффузии инсулина из ТТС *in vitro* через неконсервированную кожу в течение 20 часов после

предварительного воздействия на нее аппликатора с микроиглами длиной 40 мкм и 150 мкм в течение 1 ч. В качестве контроля исследовали диффузию инсулина из ТТС через неконсервированную кожу без предварительной аппликации микроигл.

На рис. 5 представлена диффузия инсулина из ТТС через кожу *in vitro*.

Из представленной диаграммы следует, что через 4 ч от начала эксперимента масса инсулина, продиффундировавшего через кожу с контактной площадью 0,95 см<sup>2</sup> после предварительной аппликации микроигл длиной 40 мкм, составляет  $13,4 \pm 4,3$  мкг, что в 1,5 раза больше, чем в контрольных образцах ( $9,6 \pm 5,3$  мкг,  $p < 0,5$ ). Через 17 и 20 часов масса инсулина в системе с использованием таких микроигл составляет  $170,7 \pm 75,7$  и  $282,5 \pm 61,1$  мкг соответственно, что в 1,4 раза больше, чем в системе без игл ( $p < 0,5$ ).

При этом отметим, что увеличение длины микроигл еще более усиливает диффузию инсулина. При аппликации микроигл длиной 150 мкм количество продиффундировавшего гормона составляет  $17,9 \pm 8,6$ ;  $230,4 \pm 13,2$  и  $372,3 \pm 7$  мкг через 4, 17 и 20 часов соответственно. Это примерно в 1,9 раза больше по сравнению с ТТС без использования микроигл.

Положительная динамика увеличения диффузии инсулина через кожу после аппликации микроигл сохраняется на протяжении 20 ч. Следовательно, сформированные микроиглами в роговом слое каналы остаются открытыми в течение всего времени эксперимента.

**ВЫВОДЫ**

Проведенные эксперименты *in vitro* показали, что предварительная аппликация микроигл повышает диффузию инсулина через кожу в течение

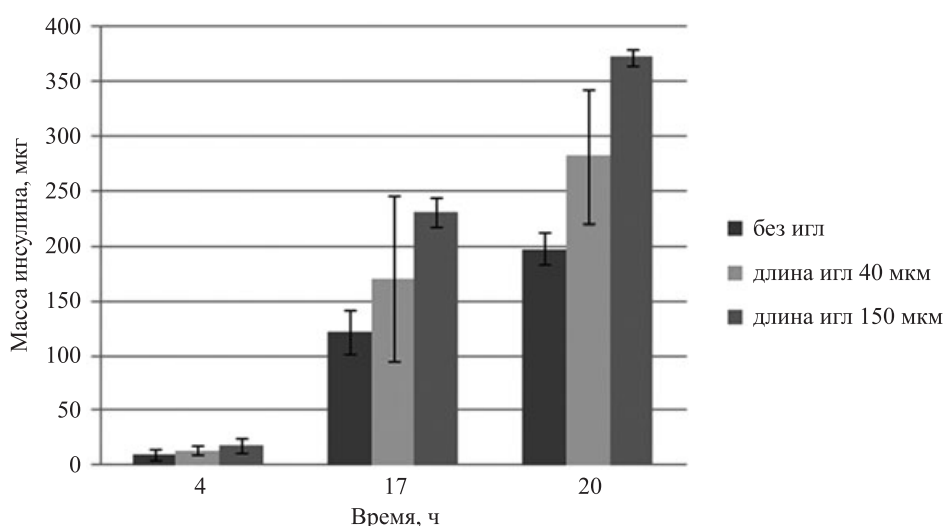


Рис. 5. Диффузия инсулина из ТТС через неконсервированную кожу кролика *in vitro* (n = 9)

Fig. 5. Insulin diffusion from TDS through unpreserved rabbit skin *in vitro* (n = 9)

20 ч без нарушения целостности микроигл после их воздействия. Выбраны длина и время предварительной аппликации микроигл (150 мкм и 1 ч соответственно), обеспечивающие заметное повышение диффузии инсулина через кожу из модельной трансдермальной терапевтической системы. Следующим шагом исследований, доказывающих эффективность чрескожного переноса высокомолекулярных ЛВ, является разработка технологии изготовления полых микроигл и включение их в конструкцию ТТС.

*Работа выполнена при финансировании Минздрава России в рамках выполнения государственного задания «Разработка и экспериментальное исследование трансдермальных терапевтических систем (ТТС) высокомолекулярных лекарственных веществ» (№ гос. регистрации 115102010017).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shah RB, Patel M, Shah VN. Insulin delivery methods: Past, present and future. *Int. J. Pharm. Investig.* 2016; Jan–Mar 6 (1): 1–9. doi: 10.4103/2230-973X.176456.
2. Daugimont L, Baron N, Vandermeulen GL, Pavsej N, Miklavcic D, Jullien M-C, Cabodevila G, Mir LM. Hollow Microneedle Arrays for Intradermal Drug Delivery and DNA Electroporation. *J. Membrane Biol.* 2010; 236: 117–125.
3. Chen MC, Ling M, Kusuma SJ. Poly- $\gamma$ -glutamic acid microneedles with a supporting structure design as a potential tool for transdermal delivery of insulin. *Acta Biomater.* 2015; 24: 106–116.
4. O'Mahony C. Structural characterization and *in vivo* reliability evaluation of silicon microneedles. *Biomed. Microdevices.* 2014; 16 (3): 333–343. doi: 10.1007/s10544-014-9836-6.
5. Silpi C, Manish B, Kumar TR. Microneedles in transdermal drug delivery: an unique painless option. *International research journal of pharmacy.* 2011; 2 (4): 72–78.
6. Tuan-Mahmood T-M, McCrudden MTC, Torrisi BM, McAlister E, Garland MJ, Singh TRR, Donnelly RF. Microneedles for intradermal and transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013; December 18, 50 (5): 623–637. doi:10.1016/j.ejps.2013.05.005.
7. Kim JY, Han MR, Kim YH, Shin SW, Nam SY, Park JH. Tip-loaded dissolving microneedles for transdermal delivery of donepezil hydrochloride for treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* August 2016; 105: 148–155.
8. Kearney MC, Caffarel-Salvador E, Fallows SJ, McCarthy HO, Donnelly RF. Microneedle-mediated delivery of donepezil: Potential for improved treatment options in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016; Jun 103: 43–50. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.026.
9. Qiu Y, Li C, Zhang S, Yang G, He M, Gao Y. Systemic delivery of artemether by dissolving microneedles. *Int. J. Pharm.* 2016; Jul 11, 508 (1–2): 1–9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.006.
10. Zaric M, Ibarzo Yus B, Kalcheva PP, Klavinskis LS. Microneedle-mediated delivery of viral vectored vaccines. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 2016; Sep 7: 1–11. doi: 10.1080/17425247.2016.1232247.
11. Севастьянов ВИ, Саломатина ЛА, Кузнецова ЕГ, Яковлева НВ, Шумаков ВИ. Трансдермальные системы введения инсулина. *Медицинская техника.* 2003; 2: 21–24. Sevast'yanov VI, Salomatina LA, Kuznetsova EG, Jakovleva NV, Shumakov VI. Transdermal'nye sistemy vvodenija insulina. *Medicinskaja tehnika.* 2003; 2: 21–25. [In Russ, English abstract].
12. Севастьянов ВИ, Саломатина ЛА, Кузнецова ЕГ, Собко ОМ, Шумаков ВИ. Матричные и резервуарные трансдермальные терапевтические системы инсулина на основе нетканых и полимерных материалов. *Перспективные материалы.* 2004; 4: 44–48. Sevast'yanov VI, Salomatina LA, Kuznetsova EG, Sobko OM, Shumakov VI. Matrix and reservoir transdermal therapeutic systems of insulin on nonwoven and polymeric substances base. *Perspektivnye Materialy.* 2004; 4: 44–48. [In Russ, English abstract].
13. Kuznetsova EG, Kuryleva OM, Salomatina LA, Sevastianov VI. Transdermal delivery of insulin from synthetic matrix: experimental investigation and clinical studies. *The International Journal of Artificial Organs.* 2005; 28 (9): 896.
14. Пат. 2481822 РФ, АНО «ИМБИИТ». Микроэмульсионные композиции для создания трансдермальных и трансмукозальных форм фармацевтических средств и косметических препаратов и способ их получения / Заявитель и патентообладатель Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий» – заявка № 2012106092; заявл. 21.02.2012; опублик. 20.05.2013. АНО «ИМБИИТ». Mikrojemul'sionnye kompozicii dlja sozdanija transdermal'nyh i transmukozal'nyh form farmaceuticheskikh sredstv i kosmeticheskikh preparatov i sposob ih poluchenija. Patent RF, no. 2481822, 2012.
15. Haugland RP. Covalent fluorescent probes. *Excited of Biopolymers*, ed. By Steiner R.F. Plenum Press. N.Y. and London. 1983; 833–836.
16. Ryzhikova VA, Tikhobayeva AA, Salomatina LA, Kursakov SV, Kuznetsova EG, Kuryleva OM, Sevastianov VI. Effect of the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems. *Inorganic Materials: applied research.* 2014; 5 (5): 498–503.

*Статья поступила в редакцию 28.10.2016 г.  
The article was submitted to the journal on 28.10.2016*