

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-40-45

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОЭМУЛЬСИОННОЙ МАТРИЧНОЙ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ИНСУЛИНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА)

Е.Г. Кузнецова, О.М. Курьева, Л.А. Саломатина, Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, В.И. Севастьянов

Отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Изучение *in vivo* специфической активности микроэмульсионной формы матричной трансдермальной терапевтической системы инсулина на экспериментальной модели сахарного диабета 1-го типа. **Материалы и методы.** Крысы-самцы ($n = 25$) линии Wistar с экспериментальным стрептозотоциновым сахарным диабетом 1-го типа были рандомизированы на подопытную и контрольную группы. Животным подопытной группы ($n = 15$) наклеивали ТТС инсулина (100 Ед) с микроэмульсионной композицией на протяжении 4 суток с ежедневной заменой препарата и контролем уровня гликемии. Крысам контрольной группы ($n = 10$) также ежедневно определяли уровень гликемии в течение всего эксперимента. Концентрацию глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра One Touch Select (США). **Результаты.** У всех животных подопытной группы средняя величина уровня глюкозы в крови до аппликации ТТС инсулина составила $28,4 \pm 2,3$ ммоль/л. Средний показатель гликемии на фоне аппликации ТТС инсулина составил $21,2 \pm 3,1$ ммоль/л ($p < 0,001$). В процентном соотношении снижение уровня глюкозы крови составило $26 \pm 8\%$ относительно исходных значений. В контрольной группе крыс гликемия оставалась стабильно высокой на протяжении всего эксперимента и составляла $28,4 \pm 1,4$ ммоль/л. **Заключение.** Достоверное снижение уровня глюкозы крови при аппликации ТТС инсулина у крыс с экспериментальным сахарным диабетом демонстрирует наличие специфической активности микроэмульсионной формы матричной ТТС инсулина.

Ключевые слова: трансдермальная терапевтическая система, инсулин, сахарный диабет 1-го типа, экспериментальная стрептозотоциновая модель.

SPECIFIC EFFICIENCY OF MICROEMULSION MATRIX TRANSDERMAL DELIVERY SYSTEM OF INSULIN (EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES MELLITUS TYPE I)

E.G. Kuznetsova, O.M. Kuryleva, L.A. Salomatina, G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, V.I. Sevastianov

Department of biomedical technologies and tissue engineering,

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Aim. To study the specific activity of the microemulsion form of the matrix insulin transdermal delivery system *in vivo* on the experimental streptozotocin model of type I diabetes. **Materials and methods.** Male rats ($n = 25$) were randomized to the experimental and control groups. TDS insulin with a microemulsion composition was applicated to the animals of the experimental group ($n = 15$) for 4 days with daily replacement of TDS and control of the glycemia level. The glycemia level of the control group rats ($n = 10$) was determined throughout

Для корреспонденции: Кузнецова Евгения Геннадьевна. Адрес: 123182, 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

the experiment. The blood glucose concentration was measured using glucometer One Touch Select (USA). **Results.** The average blood glucose level in experimental group was 28.4 ± 2.3 mmol/l before application of TDS insulin. The average glycemic index was 21.2 ± 3.1 mmol/l ($p < 0.001$) during of TDS application. The blood glucose decrease was $26 \pm 8\%$ relative to baseline values. The glycemia was 28.4 ± 1.4 mmol/l in the control group rats throughout the experiment. **Conclusion.** A significant decrease of blood glucose level with TDS insulin application in rats with experimental type 1 diabetes demonstrates the existence of the specific activity of the microemulsion matrix transdermal delivery system of insulin.

Key words: transdermal drug delivery system, insulin, diabetes type I, experimental streptozotocin model.

ВВЕДЕНИЕ

Создание трансдермальных терапевтических систем (ТТС) лекарственных веществ большой молекулярной массы, таких как гормоны и вакцины, до настоящего времени остается сложной задачей. Как известно, механизмом чрескожного переноса является пассивная диффузия. Для осуществления такого переноса молекула лекарственного вещества должна обладать определенными физико-химическими свойствами, в частности ее молекулярный вес не должен превышать 500 Да. Перенос лекарственных веществ с большей молекулярной массой через кожу посредством пассивной диффузии практически невозможен.

Существует несколько вариантов преодоления кожного барьера [1]. Одним из них является использование физических способов увеличения проницаемости кожи, таких как ионофорез, сонофорез, электропорация, радиочастотные импульсы [2]. Из новейших разработок в области увеличения проницаемости кожи можно отметить воздействие микроигл и холодной плазмы на кожу. В настоящее время доказана способность холодной плазмы увеличивать кожную проницаемость без ее повреждения и усиливать трансдермальный перенос больших молекул, например, белки [3]. Кроме того, ученые ведут разработки конструкций полых микроигл как резервуара высокомолекулярных лекарственных веществ в трансдермальных системах [4].

Химический способ преодоления кожного барьера высокомолекулярными лекарственными веществами (ЛВ) может заключаться в модифицировании молекул ЛВ или в использовании так называемых активаторов переноса (химические соединения, биологически активные вещества природного происхождения), которые изменяют термодинамические и кинетические параметры кожи и лекарственных веществ. Химические переносчики могут либо образовывать брешы в липидном слое кожи, создавая тем самым пути для диффузии ЛВ, либо, воздействуя на липиды, приводить к нарушению высокоупорядоченной липидной структуры рогового слоя [5].

Следует отметить, что помимо химической природы вещества, используемого для усиления чрескожного транспорта ЛВ, имеет большое значение и

то, в каком именно виде оно применяется: в виде раствора или в составе более сложной композиции, в частности эмульсии.

Простота производства и высокая растворяющая способность, возможность введения лекарственных веществ и активаторов переноса как липофильной, так и гидрофильной природы являются несомненным преимуществом использования эмульсий в составе трансдермальных терапевтических систем. Кроме того, при введении ЛВ в эмульсии в ряде случаев становится возможным избежать их гидролиза, разложения или окисления [6].

Разработанный нами состав микроэмульсионной композиции для ТТС позволяет осуществлять диффузию высокомолекулярных лекарственных веществ через неповрежденную кожу. В качестве высокомолекулярного ЛВ был выбран инсулин (5500 Да), скорость диффузии которого через неконсервированную кожу кролика *in vitro* соответствует базальной секреции инсулина поджелудочной железой здорового человека [7].

Целью работы является изучение *in vivo* специфической активности микроэмульсионной формы матричной ТТС инсулина на экспериментальной модели сахарного диабета 1-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТТС инсулина

Для исследований *in vivo* были изготовлены лабораторные образцы ТТС с ранее разработанной микроэмульсионной композицией инсулина [8]. Каждый образец площадью 10 см² содержал 100 Ед гормона. 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.

Животные

В качестве подопытных животных было использовано 25 крыс-самцов линии Wistar массой тела 230–250 г, полученных из питомника ООО «Крол-Инфо», Орехово-Зуевский район, деревня Новая. Эксперименты проводили согласно правилам, при-

нятым 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».

Модель сахарного диабета

Для оценки эффективности ТТС инсулина с микроэмульсионной композицией в экспериментах *in vivo* была использована стрептозотоциновая модель сахарного диабета. Стрептозотцин, обладающий избирательным токсическим действием в отношении β -клеток поджелудочной железы, вводили каждому животному внутривенно по 12 мг/кг/сут в течение 5 дней подряд (суммарная доза – 70 мг/кг). Как показали ранее проведенные исследования [9, 10], дробное введение стрептозотцина вызывает окончательную гибель β -клеток, обусловленную развитием аутоиммунного процесса, характерного для сахарного диабета 1-го типа у людей.

Алгоритм проведения исследования эффективности ТТС инсулина

Для исключения случаев спонтанной реверсии у животных с экспериментальным сахарным диабетом в исследованиях использовали только крыс со стабильным диабетическим статусом [11]. У всех животных уровень гипергликемии через 2 недели после последнего введения стрептозотцина составлял не менее 25 ммоль/л. Подопытные животные со стойким экспериментальным сахарным диабетом были рандомизированы на опытную ($n = 15$) и контрольную ($n = 10$) группы.

Крысам подопытной группы предварительно было проведено удаление волосяного покрова на коже спины при помощи крема для депиляции (VeroLine, Россия). Затем на обработанный участок кожи помещали ТТС инсулина и дополнительно фиксировали бинтами (Omnifix Elastic, Hertmann) для более плотного контакта, а также предотвращения ее удаления самими животными. Исследование функциональной эффективности лабораторных образцов ТТС инсулина проводили на протяжении 4 суток с ежедневной заменой исследуемой лекарственной формы. Всем экспериментальным животным опытной группы до начала аппликации ТТС инсулина, во время аппликации и после снятия образца измеряли уровень глюкозы в крови 1 раз в сутки в одно и то же время.

В течение всего эксперимента крысам контрольной группы также ежедневно определяли уровень гликемии.

Концентрацию глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крысы, измеряли с помощью глюкометра One Touch Select (Life Scan Johnson & Johnson, США).

Статистическая обработка данных

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартное отклонение (σ). Статистическая обработка результатов эксперимента проведена с помощью стандартного пакета Microsoft Excel 2007. Достоверность отличий между группами данных оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе крыс ($n = 10$) гликемия оставалась стабильно высокой на протяжении всего эксперимента и составляла $28,4 \pm 1,4$ ммоль/л.

Результаты исследования уровня глюкозы в крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом при аппликации ТТС инсулина ($n = 15$) представлены в таблице. Приведены данные о гликемии животных опытной группы до, во время аппликации лекарственной формы и после ее открепления.

Как видно из таблицы, средняя величина уровня глюкозы в крови у крыс до аппликации ТТС инсулина составила $28,4 \pm 2,3$ ммоль/л. У всех животных опытной группы на фоне аппликации ТТС инсулина наблюдали снижение уровня глюкозы в крови. Средний показатель гликемии составил $21,2 \pm 3,1$ ммоль/л, что достоверно ниже по сравнению с исходным значением ($p < 0,001$). В процентном соотношении снижение уровня глюкозы крови составило $26 \pm 8\%$. Максимальное снижение зафиксировано на уровне 38% (крыса № 5), минимальное – 13% (крыса № 14).

Через 1 и 3 суток после снятия ТТС инсулина средний уровень глюкозы в группе подопытных животных повысился с $21,2 \pm 3,1$ ммоль/л до $24,6 \pm 6,8$ ммоль/л и $24,2 \pm 7,0$ ммоль/л соответственно, что является статистически достоверным ($p < 0,05$).

Заметим, что у некоторых крыс после открепления образцов ТТС отмечали более медленный рост гликемии. В качестве примера на рис. 1 приведен график изменения гликемии для двух животных (№ 6 и № 7).

На графике видно, что уже после первых суток аппликации ТТС инсулина у обоих животных происходило снижение концентрации глюкозы в крови. У крысы № 6 (нижняя кривая) среднее снижение уровня гликемии на фоне аппликации транс-

Таблица

Уровень глюкозы в крови подопытных животных
Blood glucose level in animals of the experimental group

№ крысы	Уровень глюкозы до аппликации ТТС, ммоль/л	Средний уровень глюкозы на фоне аппликации (n = 4), ммоль/л	Уровень глюкозы через сутки после открепления ТТС, ммоль/л	Уровень глюкозы через 3 суток после открепления ТТС, ммоль/л	Снижение уровня глюкозы во время аппликации ТТС по сравнению с исходным значением, %
1	31,6	22,8	29	27,2	28
2	26,9	22,8	20,7	20,3	15
3	30,6	22,8	23,7	25,2	26
4	28,4	18,2	17,3	27,5	36
5	25,1	15,6	15,9	11,1	38
6	25,9	18,0	19,1	20,6	31
7	26,7	21,9	29,8	30,5	18
8	27,4	18,0	22,9	18,8	34
9	27,8	19,6	19,3	21,8	30
10	31,7	25,9	33,3	33,3	18
11	28,3	22,8	33,3	33,3	19
12	27,0	19,2	14,8	13,1	29
13	26,5	20,9	23,7	21,2	21
14	31,1	27,0	33,3	33,3	13
15	31,4	22,0	33,3	26,1	30
Среднее значение, ммоль/л	28,4	21,2	24,6	24,2	26
σ, ммоль/л	2,3	3,1	6,8	7,0	8

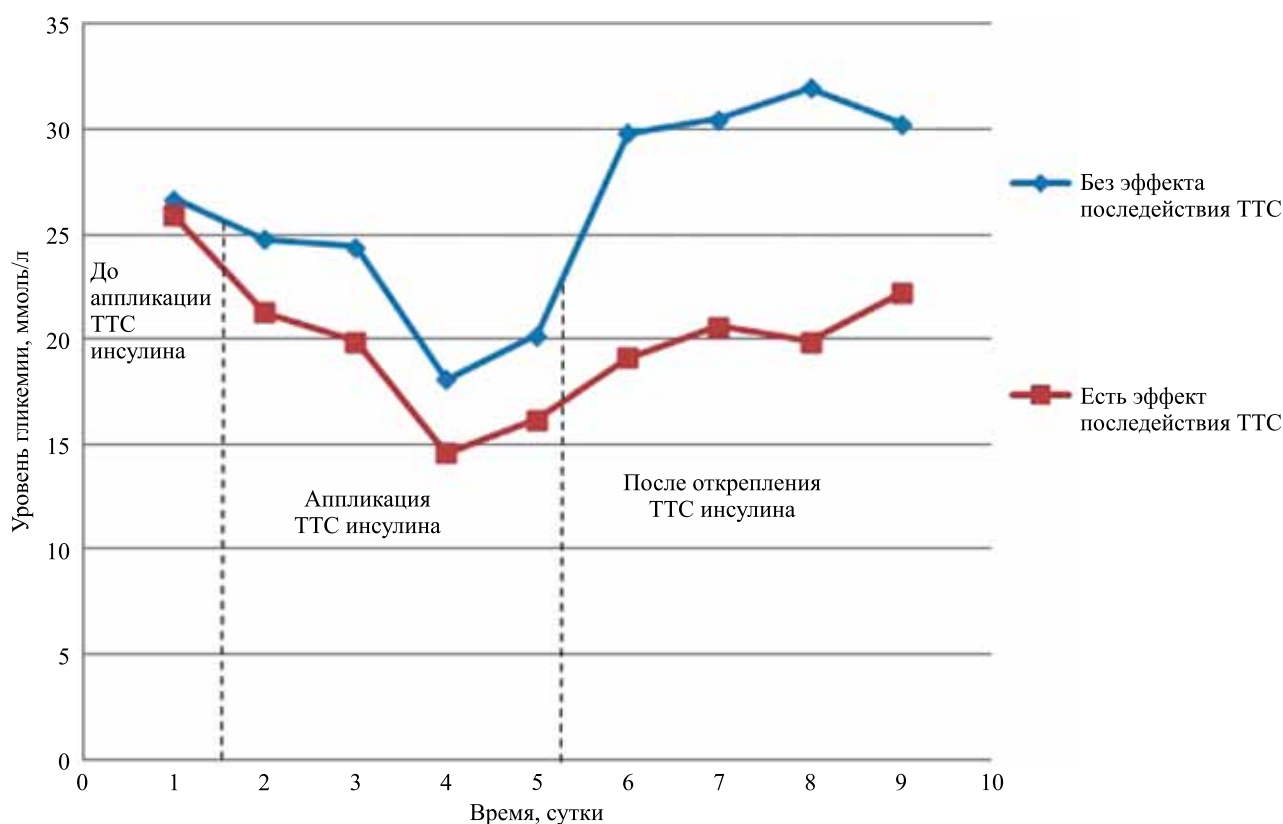


Рис. 1. Динамика гликемии у крыс № 6 и № 7 во время аппликации ТТС и после ее удаления

Fig. 1. Glycemia dynamics in rats No. 6 and No. 7 during TDS application and after its removal

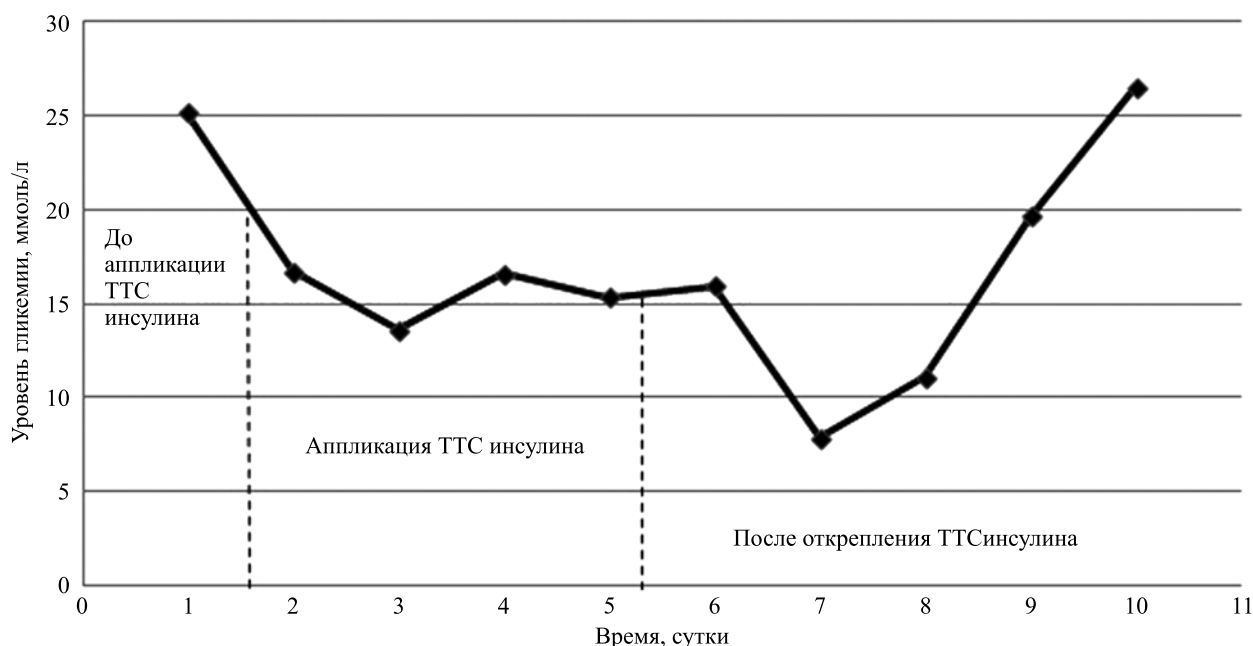


Рис. 2. Эффект «медового месяца» у крысы № 5 после удаления ТТС инсулина

Fig. 2 «Honeymoon» effect in rat No. 5 after insulin TTS removal

дермальной системы составило 30,5%, а у крысы № 7 (верхняя кривая) – 18% по сравнению с исходными значениями. В следующие 4 суток после открепления образца среднее увеличение уровня глюкозы в крови у крысы № 6 составило 12%, а у крысы № 7 – 29% по сравнению с уровнем во время аппликации ТТС.

Сравнивая динамику уровня гликемии у крыс № 6 и № 7, можно предположить наличие в ряде случаев эффекта последствия ТТС инсулина. Это, вероятно, обусловлено накоплением гормона в коже или подкожной клетчатке животного и формированием своеобразного депо инсулина, что может быть связано с индивидуальными физиологическими особенностями животного, например, уровнем метаболизма. Такой эффект наблюдали у 8 экспериментальных животных из 15.

Известно, что после клинической манифестации у большинства пациентов с инсулинзависимым сахарным диабетом в сроки от 1 до 6 месяцев отмечается преходящее снижение потребности в инсулине, связанное с улучшением функции оставшихся бета-клеток [12]. Клиническая ремиссия, или «медовый месяц», – это период наиболее благоприятного течения инсулинзависимого сахарного диабета, развивающийся в первые месяцы после установления диагноза, когда потребность в экзогенном инсулине быстро снижается, а у некоторых пациентов возможна даже отмена инсулина. Во время проведения исследования специфической активности ТТС инсулина на крысах мы наблюдали подобный эффект у одного животного (крыса № 5). На рис. 2 пред-

ставлена динамика гликемии у крысы № 5 на фоне аппликации ТТС инсулина и после ее удаления.

Как видно из рис. 2, на фоне аппликации ТТС инсулина у крысы на вторые сутки наблюдается выраженное снижение уровня глюкозы в крови с 25,1 до 16,7 ммоль/л, еще через сутки – до 13,6 ммоль/л. Содержание глюкозы в крови оставалось примерно на том же уровне в течение последующих двух суток. После открепления ТТС на вторые сутки гликемия составила 7,9 ммоль/л, что может свидетельствовать о практической нормализации глюкозного метаболизма. Так как у крыс метаболические и регенераторные процессы происходят намного быстрее, чем у людей, то сроки наступления и длительность ремиссии сахарного диабета на фоне проведенной инсулинотерапии у этих животных могут исчисляться не неделями (как у человека), а несколькими днями. Этот феномен можно назвать «крысиным» медовым месяцем сахарного диабета. У крысы № 5 он закончился через 5 суток, о чем свидетельствовал рецидив гипергликемии до 26,5 ммоль/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по изучению специфической активности микроэмульсионной формы матричной ТТС инсулина показали достоверное снижение уровня глюкозы крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Снижение уровня глюкозы крови у подопытных животных составило $26 \pm 8\%$ относительно исходных значений. Полученные данные демонстрируют возможность использования микроэмульсионной формы матричной ТТС

для чрескожной доставки высокомолекулярных лекарственных веществ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Harneet M, Tarun G, Amit KG, Goutam R. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery*, 2016; 23 (2): 564–578. doi: 10.3109/10717544.2014.935532.
2. Ashok KT, Bharti S, Subheet J. Innovations in Transdermal Drug Delivery: Formulations and Techniques. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*. 2007; 1: 23–36.
3. Kalghatgi S, Antonakas DP, Tsai T-Ch, Gray RL at al. Transdermal delivery of DNA Vaccines using non-thermal plasma // Patent US no. 2015/0151135 A1.
4. Chanda S, Bagga M, Tiwari RK. Microneedles in transdermal drug delivery: an unique painless option. *International research journal of pharmacy*. 2011; 2 (4): 72–78.
5. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009; 1788 (11): 2362–2373. doi: 10.1016/j.bbame.2009.08.015.
6. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2006; 123–126: 369–385.
7. Кузнецова ЕГ, Рыжикова ВА, Саломатина ЛА, Севастьянов ВИ. Исследование характеристических параметров микроэмульсионной композиции для трансдермальной доставки инсулина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2 (19): 34–40. Kuznetsova EG, Ryzhikova VA, Salomatina LA, Sevastyanov VI. Issledovanie harakteristicheskikh parametrov mikroemulsionnoy kompozitsii dlya transdermalnoy dostavki insulina. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2017; 2 (19): 34–40.
8. 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; опубл. 20.05.1013. АНО «ИМБИИТ». Mikrojemul'sionnye kompozitsii dlya sozdaniya transdermal'nyh i transmukozal'nyh form farmaceuticheskikh sredstv i kosmeticheskikh preparatov i sposob ih polucheniya. Patent RF, no. 2481822, 2012.
9. Блюмкин ВН, Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Ткаченко АВ, Петрова ИА, Бабинова РА. Культуры островковых клеток поджелудочной железы и их трансплантация. *Материалы III Всесоюзного совещания «Культивирование клеток животных и человека»*. Пушино; 1992; 16–23. Blyumkin VN, Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Tkachenko AV, Petrova IA, Babikova RA. Kulturyi ostrovkovykh kletok podzheludochnoy zhelezeyi i ih transplantatsiya. *Materialy III Vsesouznogo soveshaniya «Kultivirovanie kletok zhivotnykh i cheloveka»*. Puschino; 1992; 16–23.
10. Великий ДА, Закирьянов АР, Клименко ЕД, Кобозева ЛП, Мичунская АБ, Поздняков ОМ. Коррекция аутоиммунных механизмов развития сахарного диабета 1-го типа методами клеточной терапии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010; 9: 34–42. Velikiy DA, Zakiryaynov AR, Klimenko ED, Kobozeva LP, Michunskaya AB, Pozdnyakov OM. Korrekt-siya autoimmunnykh mehanizmov razvitiya saharnogo diabeta 1-go tipa metodami kletochnoy terapii. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskih nauk*. 2010; 9: 34–42.
11. Скалецкий НН, Фатеева НЛ, Сухих ГТ, Молнар ЕМ. Трансплантация культур островковых клеток фетальной поджелудочной железы в лечении инсулин-зависимого сахарного диабета. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1994; 4: 356–363. Skaletskiy NN, Fateeva NL, Suhikh GT, Molnar EM. Transplantatsiya kultur ostrovkovykh kletok fetalnoy podzheludochnoy zhelezeyi v lechenii insulinzavisimogo saharnogo diabeta. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsinyi*. 1994; 4: 356–363.
12. Смирнова ОМ, Горелышева ВА, Дедов ИИ. Фазы ремиссии при впервые выявленном инсулинзависимом сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 1999; 1: 9–12. Smirnova OM, Gorelysheva VA, Dedov II. Fazyi remis-sii pri vpervyie vyiyavlennom insulinzavisimom sahar-nom diabete. *Saharnyy diabet*. 1999; 1: 9–12.

Статья поступила в редакцию 22.06.2017 г.
The article was submitted to the journal on 22.06.2017