

УДК 541.64:547.96
©Коллектив авторов

ПЕРОРАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ИНСУЛИНА ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Л.И. Валеев¹, Г.А. Сытов¹, Л.К. Старосельцева^{2}, И.Л. Валеев¹, Л.В. Ванчугова¹,
Т.А. Валеева³, М.В. Ульянова¹, Н.А. Платэ*

¹Учреждение Российской академии наук, Институт нефтехимического
синтеза им. А.В. Топчиева РАН, 119991 Москва, Ленинский пр., 29;
тел./факс: (495) 955 4318; эл. почта: valuev@ips.ac.ru

²Эндокринологический научный центр РАМН, 117036, Москва, ул. Д. Ульянова, 11;
тел./факс: (495) 124 4104; эл. почта: recsoft_inc@mail.ru

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский пр., 33;
тел./факс (495) 952 1384 /954 2732; эл. почта: valueva@inbi.ras.ru

В опытах на здоровых добровольцах и животных с экспериментальным сахарным диабетом показано, что при пероральном использовании разбавленных растворов инсулина отмечается достижение гипогликемического эффекта. Предположено, что использование разбавленных растворов инсулина позволит разработать новую стратегию лечения сахарного диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, инсулин, разбавленный раствор.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что жизненно важные вещества полипептидной природы (ферменты, ингибиторы, гормоны и т.п.) синтезируются внутри организма, а не попадают в него с пищей. Последнее невозможно из-за разрушения этих веществ в процессе пищеварения. Вследствие этого для устранения дефицита в организме какого либо полипептида его в виде раствора обычно вводят инъекционно, например, внутримышечно или внутривенно, минуя пищеварительный тракт.

Вместе с тем, преимущества перорального способа введения полипептидных лекарственных препаратов настолько велики, что до сих пор не прекращаются попытки ученых преодолеть воздвигнутые природой барьеры на пути проникновения таких лекарств в кровоток через пищеварительный тракт. Эти преимущества можно продемонстрировать на примере инсулина - гормона поджелудочной железы, частичная или полная недостаточность которого приводит к сахарному диабету.

В физиологических условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин секретируется в кровеносные сосуды, непосредственно соединенные с портальной веной, по которой всосавшиеся продукты пищеварения транспортируются из кишечника к печени. При этом печень осуществляет контроль количества проходящего через неё гормона. Если инсулина поступает слишком много, часть его печень инактивирует, защищая организм от избытка гормона. При инъекционном же введении инсулина такой контроль отсутствует, что и является причиной таких осложнений при сахарном диабете, как сердечно-сосудистые заболевания, расстройство функций головного мозга и т.д. [1, 2]. В связи с этим наиболее

* - адресат для переписки

оптимальным с физиологической точки зрения, является пероральное введение инсулина, моделирующее естественный путь секреции этого гормона.

К настоящему времени известны многие десятки попыток решения этой проблемы, одной из которых является использование концентрированных растворов инсулина. В работе [3] гипогликемический эффект был обнаружен при пероральном введении экспериментальным животным раствора инсулина с концентрацией 100 ед./мл. Однако при такой высокой концентрации инсулин нарушает процессы пищеварения (животные теряли в весе, вопреки увеличивающемуся количеству поглощенной пищи, а при их вскрытии в пищеварительном тракте была обнаружена не переваренная пища). Подобное уменьшение активности кишечника наблюдали и в опытах на панкреатомированных собаках [4]. В большинстве же работ отмечается, что пероральное введение раствора инсулина не сопровождается снижением концентрации глюкозы в крови.

Нами было предложено принципиально новое решение этой проблемы, которое заключается в использовании разбавленных растворов инсулина [5, 6]. В основе этого решения лежал известный факт быстрого прохождения воды через желудок в тонкий кишечник, где она и всасывается в кровь [7]. Мы предположили, что использование достаточно разбавленных растворов белков должно обеспечить быстрое прохождение этих растворов через желудок. При этом железы слизистой оболочки желудка не должны успеть прореагировать на появление белка в желудке и не должны секретировать желудочный сок, то есть появляется реальная возможность предотвратить гидролиз белка в желудке.

Действительно, в опытах *in vivo* нами было показано, что если при пероральном введении кроликам 1,0 мл раствора инсулина (доза порядка 12 ед./кг массы животного) снижения уровня глюкозы в крови не наблюдалось, то для той же дозы инсулина, но растворенного в 10-15 мл воды, концентрация глюкозы в крови снижалась на 30-40% [5]. Нами было высказано осторожное предположение о том, что обнаруженное явление может быть положено в основу усовершенствования методики лечения сахарного диабета.

Целью настоящей работы является изучение возможности перорального применения разбавленных растворов инсулина для регулирования уровня глюкозы в крови животных с экспериментальным сахарным диабетом и здоровых добровольцев.

МЕТОДИКА. Для создания экспериментального сахарного диабета крысам линии Wistar, весом 170-200 г внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина в 0,01 М цитратном буфере (рН 4,0) в количестве 150 мг/кг. Для предотвращения гипогликемии в течение первых 2-х дней крысам вводили 20%-ный раствор глюкозы. На 10-й день концентрация глюкозы натощак составляла 460-590 мг/100 мл.

Для создания экспериментального сахарного диабета кроликам-самцам Шиншилла, весом 2,0-3,1 кг внутривенно вводили 150 мг аллоксана на кг массы животного в растворе NaCl (рН 4,5). Для предотвращения гипогликемии в течение первых 2-3-х дней кроликам вводили 10%-ный раствор глюкозы. На 10-й день концентрация глюкозы натощак составляла 400-450 мг/100 мл. Исследования проводились в клиническом отделе ИМБП (Институт медико-биологических проблем) в соответствии с рекомендациями 18 Всемирной медицинской ассамблеи (Хельсинки, 1994) на 8 здоровых добровольцах обоего пола в возрасте 25-50 лет с нормальным индексом тела. Перед проведением исследования все добровольцы прошли клиническое обследование и по заключению ВЭК были признаны практически здоровыми. За месяц до начала исследований запрещался приём кортикостероидов, противозачаточных средств, антикоагулянтов и других фармпрепаратов, оказывающих влияние на углеводный и липидный обмен.

В работе был использован сухой генноинженерный человеческий инсулин фирмы "Sigma" (США) с активностью 28,1 ед./мг. Раствор инсулина готовили непосредственно перед экспериментом путём растворения навески инсулина в небольшом количестве (1-1,5 мл) водного раствора соляной кислоты (рН 3,5)

и доведением полученного раствора до нужного объема дистиллированной водой. Для определения концентрации глюкозы в крови из краевой вены уха кролика или из кончика хвоста крысы проводили заборы крови и с помощью глюкометра "One Touch Basic, LifeScan" определяли концентрацию глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Кролики с экспериментальным аллоксановым диабетом были разделены на 2 группы. В первой (экспериментальной) группе животные получали 5 мл водного раствора, содержащего 10 ед. инсулина, а во второй (контрольной) группе животные получали 5 мл воды. В кратковременном эксперименте влияние перорального введения раствора инсулина животным изучали в течение 3-х часов на 10-е сутки после развития диабета (табл. 1).

Таблица 1. Влияние перорального введения раствора (на 10-й день после инъекции аллоксана) на концентрацию глюкозы в крови кроликов с аллоксановым диабетом. Приведены крайние значения для 6-ти животных в экспериментальной группе и 4-х животных в контрольной группе.

Раствор	Концентрация глюкозы, мМ				
	Исходн.	30	60	120	180 *
Раствор инсулина, 10 ед. в 5 мл воды	25,0-22,2	19,4-17,8	11,7-12,2	11,1-12,2	12,2-14,4
Контроль, 5 мл воды	24,4-26,1	23,9-26,1	23,9-24,4	25,6-26,7	25,0-26,7

Примечание: * - время после введения раствора, мин.

В долговременном эксперименте раствор 10 ед. инсулина в 5 мл воды перорально вводили кроликам ежедневно с 10-го по 15-й день и с 22-го по 28-й день. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация глюкозы в крови кроликов с аллоксановым диабетом. Приведены крайние значения для 6-ти животных.

Концентрация глюкозы, мМ					
Исходн. *	День эксперимента				
	10	15	22	28	30
5,0-6,1	22,2-25,0	13,3-17,2	16,1-16,7	11,7-12,2	10,0-12,2

Примечание: * - концентрация глюкозы перед инъекцией аллоксана, ** - концентрация глюкозы в крови кроликов контрольной группы (4 животных) в течение всего эксперимента оставалась на уровне 22,2-27,8 мМ.

Видно, что пероральное введение разбавленного раствора инсулина приводит к стабильному снижению уровня глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом как в кратковременном, так и долговременном эксперименте. Практически важными представляются результаты долговременного эксперимента. После одного месяца приема раствора инсулина уровень глюкозы в крови уменьшался приблизительно в два раза и в дальнейшем не изменялся даже без дополнительного введения инсулина.

Аналогичные результаты были получены на крысах со стрептозотоциновым диабетом (табл. 3 и 4).

ПЕРОРАЛЬНЫЙ ИНСУЛИН ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Таблица 3. Влияние перорального введения раствора (на 10-й день после инъекции стрептозотоцина) на концентрацию глюкозы в крови крыс со стрептозотоциновым диабетом. Приведены крайние значения для 8-и животных в экспериментальной группе и 4-х животных в контрольной группе.

Раствор	Концентрация глюкозы, мМ				
	Исходн.	30	60	90	120*
Раствор инсулина, 12 ед. в 6 мл воды	28,9-32,8	17,8-25,6	15,6-17,2	14,4-16,7	13,3-16,7
Контроль (6 мл воды))	25,6-26,7	26,1-26,7	24,4-25,6	25,6-26,7	26,1-26,7

Примечание: * - время после введения раствора, мин.

Таблица 4. Концентрация глюкозы в крови крыс со стрептозотоциновым диабетом. Приведены крайние значения для 5-ти животных в экспериментальной группе и 3-х животных в контрольной группе*.

День	Время суток, час	Концентрация глюкозы, мМ		
		Перед инъекцией инсулина	1 час после инъекции инсулина	Контроль (без инсулина)
18-й	12	31,7-33,9	22,8-26,1	27,8-30,6
	17	25,0-27,8	15,0-18,3	28,3-30,6
19-й	12	15,6-17,8	10,0-11,7	27,8-31,1
	17	13,3-15,0	7,2-8,3	31,1-32,8
20-й	12	10,0-11,7	7,8-8,3	34,4-36,1
	17	12,2-13,9	6,7-7,8	33,9-36,1
21-й	12	10,0-11,1	5,6-6,7	38,9-43,3
	17	8,9-10,0	6,1-7,2	38,9-43,3

Примечание: *- На 18-й день после инъекции стрептозотоцина крысам в 12 и 17 часов перорально вводили раствор 12 ед. инсулина в 6 мл воды и измеряли концентрацию глюкозы.

Поскольку движущей силой процесса всасывания инсулина в кровь в данном случае является градиент концентрации инсулина в просвете кишечника, то эффективность всасывания гормона определяется видом животного. Известно, что в максимальной степени инсулин всасывается в кишечнике грызунов, диаметр которого равен 3-4 мм. По мере увеличения диаметра эффективность всасывания понижается [3]. В связи с этим представляло определенный интерес выявить возможность использования разбавленных растворов для решения главной задачи - снижения концентрации глюкозы в крови человека.

Было проведено две серии экспериментов. В первой серии пяти добровольцам натощак перорально вводили инсулин (доза порядка 0,7-0,8 ед./кг) в виде раствора с концентрацией 1,8 ед./мл. Максимальное снижение концентрации глюкозы в крови при этом составляло примерно 30% (табл. 5). Удивительно, но этот эффект находится на уровне эффекта снижения концентрации глюкозы при пероральном введении раствора инсулина здоровым кроликам [5], но достигается при существенно меньшей дозе инсулина (0,7-0,8 ед./кг вместо 10-12 ед./кг для кроликов).

Таблица 5. Влияние перорального введения 30 мл водного раствора инсулина (1,8 ед./мл) на концентрацию глюкозы в крови добровольцев.

Доброволец	Концентрация глюкозы в крови, мМ (% от исх.)				
	0	30	60	90	120 мин*
1	5,2 (100)	4,7 (90)	4,2 (81)	3,8 (73)	4,1 (79)
2	4,5 (100)	4,2 (93)	3,8 (84)	3,2 (71)	3,6 (80)
3	7,2 (100)	6,3 (88)	5,6 (78)	5,1 (71)	5,3 (74)
4	4,8 (100)	4,3 (90)	3,7 (77)	3,4 (71)	3,6 (75)
5	4,9 (100)	4,8 (98)	3,9 (80)	3,6 (74)	3,8 (78)

Примечание: * - время после введения раствора.

Во второй серии экспериментов, полностью имитирующих жизненную ситуацию, трём добровольцам перорально вводили раствор инсулина на фоне сахарной нагрузки. Каждый из добровольцев получал 15 г сахарозы через 10 минут после введения раствора инсулина. И в этом случае проявлялся эффект действия инсулина - скорость снижения концентрации глюкозы в крови после перорального введения раствора инсулина была существенно большей, по сравнению со скоростью снижения концентрации глюкозы в отсутствии инсулина (табл. 6).

Таблица 6. Концентрация глюкозы в крови здоровых добровольцев после перорального введения 50 мл водного раствора 50 ед. инсулина (1) или 50 мл воды (2). На 10 минуте добровольцы получили 15 г сахарозы. Приведены средние значения для 3-х добровольцев.

Концентрация глюкозы, мМ (% от исх.)				
Исходн., 0 мин	10 мин	60 мин	90 мин	120 мин
4,6 (100%) ¹⁾	7,1 (154%)	4,6 (100%)	3,4 (74%)	3,9 (85%)
4,3 (100%) ²⁾	6,9 (160%)	6,0 (140%)	4,7 (109%)	5,2 (121%)

Таким образом, пероральное введение разбавленных растворов инсулина обеспечивает достижение гипогликемического эффекта у здоровых добровольцев и животных с экспериментальным сахарным диабетом. Можно предположить, что обнаруженный эффект может быть положен в основу новой стратегии лечения сахарного диабета.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 07-03-00030), Фонда содействия отечественной науки и Программы фундаментальных исследований отделения химии и наук о материалах РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Марри Р., Греннер Д., Мейес П. и др.* (1993) Биохимия человека, М.: Мир, с. 284-297.
2. *Sekigami T., Shimoda S., Nishida K. et al.* (2004) *J. Artif. Organs*, **7**, №2, 91-100.
3. *Saffran M., Pansky B., Collin Budd G et al.* (1997) *J. Controlled release*, **46**, 89-98.
4. *Saffran M., Field J.B., Pefla J. et al.* (1991) *J. Endocrinol.*, **131**, 267-278.
5. *Платэ Н.А., Старосельцева Л.К., Валуев Л.И. и др.* (2006) *Хим.-фарм. журнал*, **40**, № 4, 47-50.
6. *Валуев И.Л., Старосельцева Л.К., Валуев Л.И. и др.* (2007) *Прикл. биохимия и микробиология*, **43**, №1, 114-117.
7. *Jensen B.* (1980) *The Principles of Physiology*. New-York: Appleton-Century-Crofts, 823-825.

Поступила: 29. 09. 2008.

ORAL INSULIN PREPARATIONS FOR THE REGULATION OF THE GLUCOSE LEVEL IN THE BLOOD

L.I. Valuev¹, G.A. Sytov¹, L.K. Starosel'tseva², I.L. Valuev¹, L.V. Vanchugova¹, T.A. Valueva³, M.V. Ul'yanova¹, N.A. Plate

¹A.V. Topchiev Institute of petrochemical synthesis, Russian Academy of Sciences. Leninsky pr., 29, Moscow, 119991 Russia; tel./fax: (495) 955 4318; e-mail: valuev@ips.ac.ru

²Scientific Center of Endocrinology, Russian Academy of Medical Sciences, D. Ul'yanova ul., 11, Moscow, 117036 Russia; tel./fax: (495) 124 4104; e-mail: recsoft_inc@mail.ru

³A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences. Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia; tel./fax: (495) 952 1384 / 954 2732; e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Oral administration of diluted solutions of insulin results in the absorption of the hormone into bloodstream. After oral administration of diluted insulin solutions to healthy volunteers and animals with experimental diabetes insulin does not undergo hydrolytic degradation under the action of proteolytic enzymes and its absorption is sufficient to produce the hypoglycemic effect. This approach gives a chance of creating of novel strategy for diabetes treatment.

Key words: diabetes, insulin, diluted solution.