

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СУББУКАЛЬНОГО ЛИПОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ С ИНСУЛИНОМ

М.А. Огай¹
З.Ф. Степанова²
Е.Т. Жиликова³

¹⁾ *Воронежский государственный университет*

²⁾ *Пятигорская государственная фармацевтическая академия*

³⁾ *Белгородский государственный университет*

e-mail: marinfarm@yandex.ru

Достоинства липосом как носителей лекарственных средств очевидны: полученные из природных фосфолипидов липосомы полностью биodeградируемы и биосовместимы, пригодны для включения в них многих фармакологических агентов, в том числе ферментов, гормонов и др. Липосомы, полученные по методу обращения фаз, в наибольшей степени предохраняют инсулин от разрушения. Нами был разработан суббукальный гель с липосомальным инсулином. Инновационный суббукальный способ введения инсулина исключает разрушение инсулина под воздействием ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), повышается комплаентность больных сахарным диабетом, и снижается риск развития осложнений. Суббукальное введение липосомального инсулина вызывает улучшение состояния крыс с тяжелым аллоксановым сахарным диабетом, снижает у них гипергликемию и увеличивает продолжительность жизни. Уменьшение гликемии отмечается через 1 ч после введения препарата, нарастая к 4 ч.

Ключевые слова: липосомы, суббукальный гель, инсулин, аллоксановый диабет, гипергликемия.

Эволюция в лечении сахарного диабета (СД), который еще в начале XX века был смертельным заболеванием, а уже в обозримом будущем перестанет считаться патологией, которая ограничивает качество жизни и создает серьезные барьеры при реализации большими своими возможностями, очевидна. В настоящее время продолжаются разработки в области новых средств инсулинотерапии. Причем они ведутся как в изыскании принципиально новых лекарственных средств (ЛФ), так и в совершенствовании старых.

Несмотря на очевидный прорыв в технологии препаратов лечения СД, сочетающих в себе последние достижения науки, они еще не могут занять ведущее место в инсулинотерапии. Это связано с тем, что еще не закончены многоцентровые испытания, доказывающие эффективность и безопасность. Кроме того, все они преимущественно обладают коротким действием, поэтому не являются полноценной альтернативой традиционным лекарственным формам инсулинотерапии и могут рассматриваться лишь как временная замена или дополнение.

Большинство разрабатываемых неинъекционных форм инсулинов — инсулины короткого действия, поэтому необходима дальнейшая работа над созданием аналогичных форм инсулинов длительного действия.

В последние годы реализован ряд более или менее удачных попыток создания орального инсулина, включая упаковку инсулина в липосомы.

При оптимальном подборе липидного состава липосомы обладают высокой емкостью для соединений белковой природы, а составляющие их липиды, в отличие от синтетических полимерных капсул, являются эндогенным материалом, который включается в обычные пути метаболизма [1].

Достоинства липосом как носителей лекарственных средств очевидны: полученные из природных фосфолипидов липосомы, в отличие от полимерных систем доставки, полностью биodeградируемы и биосовместимы, пригодны для включения в них многих фармакологических агентов, в том числе ферментов, гормонов, витаминов, антибиотиков, иммуномодуляторов, цитостатиков и др. [2, 3, 4].

Защищенность инсулина от разрушения ферментами определяется эффективностью встраивания инсулина, зависящей от метода приготовления липосом. Так, липосомы, полученные по методу обращенных фаз (упариванием органического растворителя из эмульсии липид — вода), в наибольшей степени предохраняют инсулин от разрушения [5].

Проанализировав все выше изложенное, нами был разработан суббукальный гель с липосомальным инсулином. Суббукальный способ введения инсулина исключает разрушение инсулина под воздействием ферментов ЖКТ, повышается комплаентность больных СД, и снижается риск развития осложнений.

Материал и методика. Липосомы, содержащие инсулин, были получены методом обращения фаз. Данный метод позволяет иммобилизовать от 67 до 78 % действующего вещества. Выбранный способ приготовления липосом имел следующие достоинства: он технологичен, давал возможность в производственных условиях включать в липосомы гидрофильный инсулин; позволял максимально исключить загрязнение липосом посторонней микрофлорой в процессе их получения, за счет использования хлороформа, являющегося хорошим дезинфектантом; метод давал возможность частичной автоматизации; разработанный замкнутый технологический цикл значительно может улучшить условия труда и экономические показатели производства. Лецитин в количестве 30 мг растворяли в 3 мл смеси эфира с хлороформом в соотношении 2:1 и вносили в круглодонную колбу роторного испарителя объемом 100 см³. Включаемый материал – инсулин – в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,5 добавляли в объеме 1 мл к раствору фосфолипидов в органической фазе и обрабатывали ультразвуком частотой

22 кГц и мощностью 500 Вт (аппарат УЗДН-2Т) в течение 30 секунд дважды. Образовывалась эмульсия типа «вода в масле». Колбу с эмульсией присоединяли к роторному испарителю и при вращении колбы постепенно понижали давление так, чтобы не происходило кипения органического растворителя, который полностью удаляли. Об окончании выпаривания судили по образованию геля в колбе и исчезновению запаха органического растворителя. Колбу снимали с испарителя, к образовавшемуся гелю добавляли 5 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,5) и встряхивали до образования однородной структуры суспензии.

Далее, проводили получение из липосомального инсулина суббукального геля с помощью вспомогательных веществ: аэросила, крахмала.

Биологические исследования разработанной лекарственной формы исследовали по показателю – раздражающее действие суббукального геля с инсулином (при 10-дневной аппликации на слизистую оболочку ротовой полости) и на содержание глюкозы в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Исследование раздражающего действия выполнено на 20 крысах-самцах линии Вистар массой 300-350 грамм, которые были разделены на 2 группы по 10 животных в каждой. Животным контрольной группы в течение 10 дней однократно прикладывали на слизистую оболочку десны тампон, смоченный физиологическим раствором. Животным опытной группы в течение 10 дней ежедневно однократно наносили суббукальный гель с инсулином на слизистую десны. После этого проводили визуальный осмотр слизистой животных опытной и контрольной групп.

Модель аллоксанового диабета была создана путём внутрибрюшинного введения аллоксана гидрата экспериментальным животным – крысам – в дозе 170 мг/кг. Диабет развился на 4-е сутки после введения препарата [6].

Забор крови проводили из хвостовой вены и измеряли уровень глюкозы в трех экспериментальных группах по шесть животных в каждой, которые получали: 1-я группа животных – инсулин с аэросилом суббукально; 2-я группа животных – липосомы без инсулина с аэросилом суббукально; 3-я группа животных – на слизистую оболочку полости рта апплицирован суббукальный гель с липосомальным инсулином.

Измерение глюкозы проводили с помощью портативного биохимического анализатора крови модели CardioChek, используя тест-полоски.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась на ПЭВМ типа ВМ РС/АТ Ре с использованием пакета прикладных программ. Проверка гипотезы о нормальности распределения вариационных рядов полученных данных осуществлялась при помощи критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона на уровне значимости $\alpha=0,05$. Статистическая достоверность изменений оценивалась с использованием теста Стьюдента для непарных выборок. Все статистические тесты проводились для двусторонней гипотезы при уровне статистической значимости – 0,05.

Результаты и их обсуждение. Проведено исследование раздражающего действия суббукального геля с инсулином. Видимых отличий слизистой десны животных опытной и контрольной группы не отмечено, не выявлено покраснения, отека слизистой и других изменений, указывающих на раздражающее действие геля.

Исследовали влияние разработанного суббукального геля с инсулином на уровень глюкозы в крови экспериментальных животных крыс с аллоксановым сахарным диабетом.

Характеристика опытных и контрольных групп животных представлена в таблице. Через 36-48 ч после введения аллоксана гидрата у животных развивались симптомы тяжелого сахарного диабета: вялость, жажда, полиурия, сухость шерсти, потеря массы тела, повышение уровня гликемии до $20,72 \pm 0,53$ натошак. Симптомы декомпенсации сахарного диабета быстро нарастали, и животные погибали от диабетической комы в первые дни после введения диабетогенного агента. Продолжительность жизни таких крыс составляла в среднем $4,2 \pm 0,6$ дней. После суббукального введения липосомального инсулина состояние животных постепенно улучшалось, как видно из таблицы, происходило снижение уровня гликемии, которое отмечается уже через 1 ч после применения разработанной лекарственной формы и достигает максимума к 4 ч.

В дальнейшем уровень сахара остается значительно ниже исходного фонового значения. В некоторых опытах гипогликемический эффект сохранялся в течение 48 ч после начала эксперимента.

В наших исследованиях при ежедневном одноразовом применении разработанной лекарственной формы жизнь больных животных сохранялась в течение всего периода наблюдения (6-7 сут).

У двух крыс, находившихся в состоянии диабетической комы (резкая вялость, сухость шерсти, слизистых, отсутствие реакции на введение препарата), хороший терапевтический эффект получен при двухразовом применении препарата в первый день (с разницей между введениями в 6 ч) с последующим переводом на одноразовое. Иногда в связи с резким падением уровня сахара в крови наблюдались симптомы гипогликемического состояния (возбуждение, агрессивность, судороги, снижение уровня глюкозы крови); после введения 20%-ного раствора глюкозы состояние животных улучшалось.

Таблица

Содержание глюкозы в крови экспериментальных животных до (фон) и после применения разработанной лекарственной формы – суббукального липосомального геля, ммоль/л

Вводимое вещество	Содержание глюкозы, ммоль/л. n=6				
	фон	1 час	4 часа	18-21 часа	24 часа
Инсулин с аэросилом	$20,72 \pm 0,33$	$21,13 \pm 0,75$	$19,45 \pm 0,56$	$19,23 \pm 0,47$	$19,38 \pm 0,31$
Липосомы без инсулина с аэросилом	$21,17 \pm 0,68$	$21,72 \pm 0,79$ $p \geq 0,05$	$18,45 \pm 0,39$ $p \leq 0,05^*$	$20,30 \pm 0,46$ $p \leq 0,05^*$	$22,52 \pm 0,30$ $p \leq 0,05^*$
Суббукальный гель с липосомальным инсулином	$21,57 \pm 0,69$	$14,42 \pm 0,38$ $p \leq 0,05^*$ $p_1 \leq 0,05^*$	$8,03 \pm 0,18$ $p \leq 0,05^*$ $p_1 \leq 0,05^*$	$10,43 \pm 0,64$ $p \leq 0,05^*$ $p_1 \leq 0,05^*$	$11,54 \pm 0,33$ $p \leq 0,05^*$ $p_1 \leq 0,05^*$

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю – инсулина с аэросилом; p_1 – достоверность различий по отношению к препарату сравнения – липосом без инсулина с аэросилом; * – различия достоверны.

Из таблицы видно, что суббукальное введение инсулина или липосом без инсулина не оказывало такого действия на уровень гликемии, как введение суббукальной таблетки с липосомальным инсулином.

В наших исследованиях «чистые» липосомы (без инсулина) оказывали незначительный гипогликемический эффект (5-6%-ное снижение уровня глюкозы в крови крыс с диабетом к 4 часу эксперимента).

Заключение. Липосомы, полученные по методу обращения фаз (упариванием органического растворителя из эмульсии липид – вода), в наибольшей степени предохраняют инсулин от разрушения

Суббукальное введение липосомального инсулина вызывает улучшение состояния крыс с тяжелым аллоксановым сахарным диабетом, снижает у них гипергликемию и увеличивает продолжительность жизни. Уменьшение гликемии отмечается через 1 ч после введения препарата, нарастая к 4 ч.

Литература

1. Владимирский, М. А. Липосомы: применение в биологии и медицине / М.А. Владимирский, Г.А. Ладыгина, Р.М. Петюшенко. – М.: Наука, 1985. – С. 77–78.
2. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой /Л.И. Андреева // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 41-43.
3. Варпоховская, В.И. Новые системы доставки лекарственных средств / В.И. Варпоховская // Ремедиум – 1999. – № 2 – С. 62.-66.
4. Каплун, А.П. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ / А.П. Каплун, Ле Банг Шон, Ю.М. Краснопольский // Вопросы мед. химии – 1999. – № 1. – С. 42-48.
5. Байков, Б. А. Цитология / Б.А. Байков, С.И. Галкина, А.А. Нейфах. – 1985. – Т. 27, № 9. – С. 1021-1025.
6. Экспериментальный сахарный диабет / под ред. В.Г. Баранова. – Л.: Наука, 1983 . – 237 с. РАЗРАБОТКА.

ENGINEERING AND RESEARCH OF SUBBUKALIC LIPOSOMALIC GEL WITH INSULIN

M.A. Ogaj¹
E.F. Stepanova²
E.T. Zhiljakova³

¹⁾ *Voronezh State University*

²⁾ *Pyatigorsk state pharmaceutical Academy*

³⁾ *Belgorod State University*

e-mail: marinfarm@yandex.ru

The value of liposomes as carriers of medical products are obvious: while received from natural phospholipid liposomes completely biodegradable and biocompatible, and are suitable for inclusion of many pharmacological agents in them, including enzymes, hormones, etc. The liposomes received through method of turned phases, degree protect insulin from destruction to the greatest. We developed subbucal gel with liposomic insulin. Innovative subbukal way of introduction of insulin excludes destruction of insulin under the influence of enzymes gastroenteric path, raises compliance of the diabetes patients and decreases the risk of the development of complications. Subbukalic introduction of insulin liposomes causes the improvement of a condition of rats with heavy alloxane diabetes, reduces their hyperglycemia and increases life expectancy. The reduction of glycemia is marked in an hour after preparation injection, and raises to the fourth hour.

Key words: liposomes, subbukal gel, insulin, alloxane diabetes, a hyperglycemia.