

УДК 544.421.42:536.755

Валиева Л.В. Красноштанова А.А.

РАЗРАБОТКА ПЕРОРАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ИНСУЛИНА С ПОМОЩЬЮ ХИТОЗАН-АЛЬГИНАТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Валиева Лия Валерьевна, студентка 3 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии;
Красноштанова Алла Альбертовна, доктор химических, доцент, профессор кафедры биотехнологии, e-mail: aak28@yandex.ru ;
Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20

Подобрано оптимальное соотношение полиэтилена и инсулина, обеспечивающее максимальный выход пегилированного инсулина. Получены хитозан-альгинатные наночастицы, нагруженные пегилированным инсулином. Изучен процесс высвобождения инсулина из наночастиц при различных значениях pH.

Ключевые слова: наночастицы, полиэтиленгликоль, инсулин, альгинат, хитозан

DEVELOPMENT OF THE ORAL DELIVERY SYSTEM OF PROLONGED INSULIN BY CHITOSAN-ALGINATE NANOPARTICLES

Valieva L.V., Krasnoshtanova A.A.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

An optimal ratio of polyethylene to insulin was selected to ensure the maximum yield of pegylated insulin. Chitosan-alginate nanoparticles loaded with pegylated insulin were obtained. The process of releasing insulin from nanoparticles at different pH values has been studied.

Keywords: nanoparticles, polyethylene glycol, insulin, alginate, chytosan.

Введение

Сахарный диабет является важной проблемой 21 века. Эта болезнь распространена во всех странах мира, и по данным ВОЗ в мире насчитывается более 150 млн. больных диабетом. Наиболее часто встречаются инсулинозависимый (ИЗД) и инсулинезависимый (ИНЗД) тип диабета. Инсулинозависимый диабет характеризуется неспособностью поджелудочной железы продуцировать инсулин. Люди, страдающие от этого заболевания, нуждаются в ежедневных инъекциях инсулина [1].

Инсулин - это гормон пептидной природы, который образуется в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Парасимпатические нервы поджелудочной железы, глюкагон, аргинин стимулируют его выработку, в то время как адреналин, соматостатин, норадреналин, напротив, ингибируют [2]. Сахарный диабет развивается из-за недостаточной секреции инсулина островками Лангерганса. В результате все инсулинозависимые ткани организма, перестают усваивать глюкозу [3].

В настоящее время самым распространенным способом адресной доставки инсулина являются шприцы, инсулиновые помпы, а также шприц-ручки [4]. Самым удобным способом введения инсулина является пероральный [5]. Однако только 1-2% инсулина, введенного перорально, попадает в кровоток вследствие денатурации белка при кислых значениях pH (у желудочного сока 1,2) и расщепления инсулина под действием протеаз тонкого кишечника. Чтобы избежать вышеуказанных проблем инсулин можно поместить в

наноконтейнеры. В качестве материала для наноконтейнеров часто используют альгинат и хитозан. Преимущество таких наночастиц состоит в том, что максимальное высвобождение препарата происходит при pH 6,8 [6,7]. Оптимальный режим инсулинотерапии для людей, страдающих ИЗД, - это режим, состоящий из постоянных инъекций инсулина разных типов [8]. Для пролонгирования инсулина используется метод пегилрования. Сущность метода заключается в связывании молекулы белка с полиэтиленгликолем (ПЭГ) [9].

Таким образом, целью данной работы является получение хитозан-альгинатных наночастиц, нагруженных пегилированным инсулином, и изучение процесса его высвобождения.

Методики

В качестве объекта исследования в работе использовали рекомбинантный человеческий инсулин производства «Герофарм» с активностью 24 ед/мг. Пегилирование проводили с использованием метилполиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 производства Clariant AG. Для получения хитозан-альгинатных наночастиц использовали альгинат натрия низкой вязкости производства компании SIGMA Life Science и хитозан со степенью ацетилирования менее 75% производства компании ALDRICH Chemistry) Для пегилирования 7 мг препарата рекомбинатного человеческого инсулина растворяли в 70 мл 60%-го диметилформамида (ДМФА) при pH 9,5, добавляли 14,9 мг ПЭГ и выдерживали 30 мин при pH 9,5-10. Через 30 минут pH снижали до 2,5 добавлением соляной кислоты и проводили микрофльтрацию на фильтре с диаметром пор 0,45 микрон.

Для получения нагруженных наночастиц к 57,5 мл раствора альгината натрия с концентрацией 0,063% (весовых) и pH 4,3 добавляли 70 мл раствора, содержащего 7 мг пегилированного препарата рекомбинантного человеческого инсулина. К полученному раствору добавляли со скоростью 0,125 мл/мин 7,5 мл раствора 18 мМ хлорида кальция, а затем со скоростью 0,42 мл/мин - 15 мл 0,07% (весовых) раствора хитозана. Для стабилизации наночастицы перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин со скоростью 800 об/мин. Наночастицы отделяли от надосадочного раствора с помощью центрифуги Eppendorf AG 22331 со скоростью 10000 об/мин в течение 30 минут при температуре 4°C. Концентрацию инсулина в растворе определяли колориметрическим методом Лоури.

Капиллярный электрофорез проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105М».

Экспериментальная часть

На первом этапе работы необходимо было определить оптимальное соотношение ПЭГ:инсулин, обеспечивающее максимальное связывание инсулина при минимальном избытке ПЭГ, который является дорогостоящим реагентом. Для этого проводили процесс пегилирования инсулина при мольных соотношениях инсулин:ПЭГ 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10. Эффективность процесса оценивали методом капиллярного электрофореза. Электрофореграммы для каждого из полученных образцов представлены на рис. 1.

Исходя из электрофореграмм, можно сделать вывод, что оптимальным мольным соотношением инсулин:ПЭГ является 1:2,5, т.к. оно обеспечивает полное связывание инсулина с ПЭГ. Отсутствие избытка инсулина в растворе позволило упростить процесс пегилирования за счет отсутствия стадии удаления избытка ПЭГ.

На следующем этапе работы были получены нагруженные инсулином наночастицы по изложенной выше методике. Было установлено, что степень включения инсулина составляет не менее 80%, что обеспечивает физиологическую дозу лекарственного препарата.

Далее был изучен процесс высвобождения пегилированного инсулина при различных значениях pH среды. Эксперимент проводили, моделируя pH среды желудочно-кишечного тракта человека [10]. Высвобождение инсулина из наночастиц изучали в двух режимах: последовательном и параллельном. Построение параллельного профиля высвобождения инсулина из альгинат-хитозановых наночастиц предполагает внесение равных порций наночастиц в раствор соляной кислоты с pH 1,2 (моделирует pH желудка), и выдерживание их в данном растворе 90 мин; в фосфатный буфер с pH 4,2 (время выдерживания 30 мин); в фосфатный буфер с pH 5,6 (время выдерживания 30 мин); в фосфатный буфер с pH 6,0 (время выдерживания 20 мин); в фосфатный буфер с pH 7,2 (время выдерживания 20 мин). Наночастицы от надосадочной жидкости отделяли

центрифугированием при температуре 4 °C при 10000 об/мин в течение 30 мин. Концентрацию инсулина в надосадочной жидкости измеряли методом Лоури. На рис. 2 представлены данные зависимости степени высвобождения инсулина от времени пребывания наночастиц, нагруженных инсулином в каждом из вышеперечисленных буферных растворов.

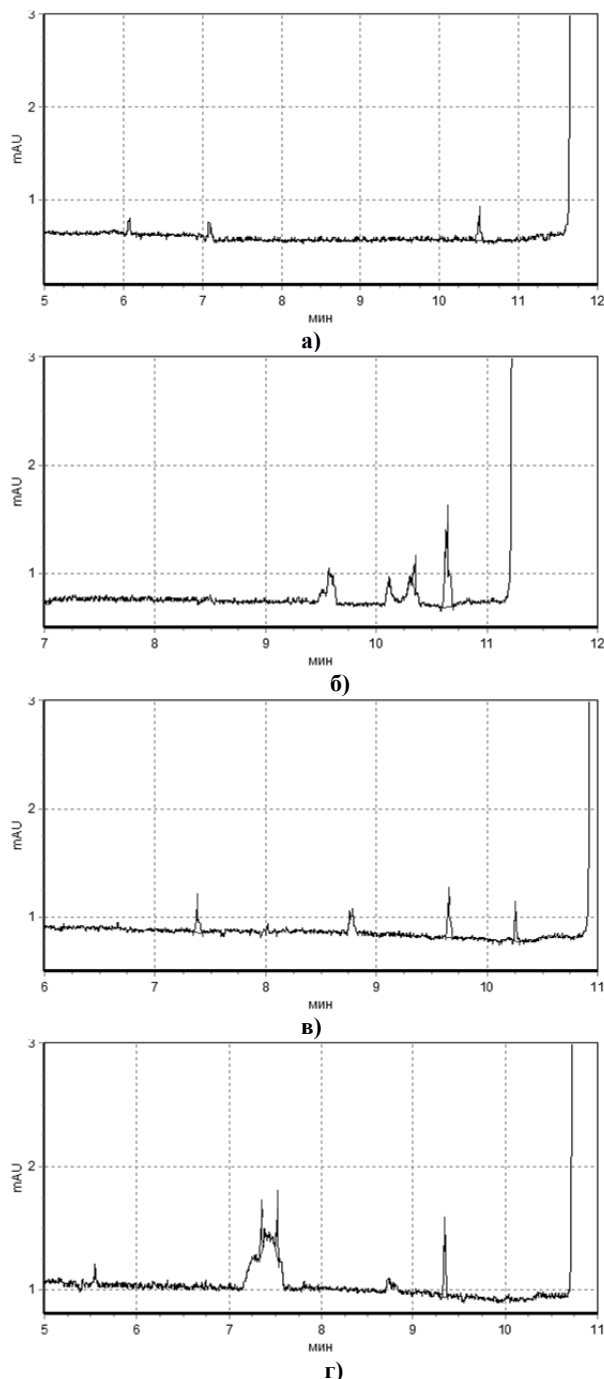


Рис. 1. Электрофореграммы пегилированного инсулина, полученного при различных мольных соотношениях инсулин:ПЭГ : а) 1:1, б) 1:2,5, в) 1:5, г) 1:10.

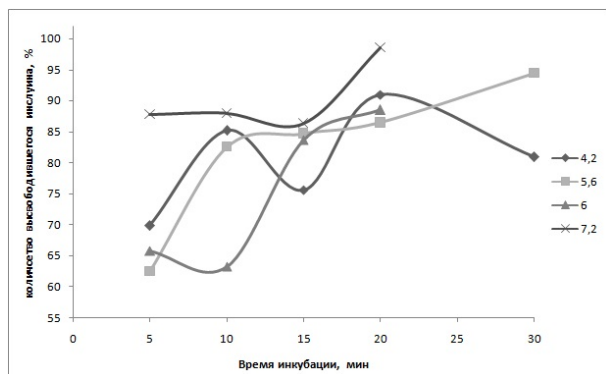


Рис.2 Параллельный профиль высвобождения инсулина

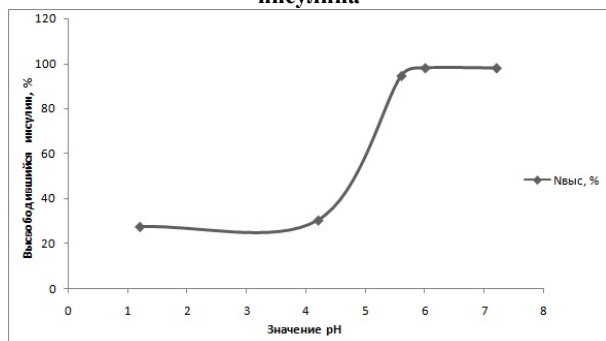


Рис.3. Последовательный профиль высвобождения инсулина

Из представленных данных видно, что в кислой среде желудка высвобождение инсулина начинается через 20 мин после внесения. Это позволяет большей части инсулина без потери активности перейти в следующие отделы ЖКТ. При более высоких значениях pH среды инсулин высвобождается на 65-90% уже через 5 мин инкубации.

Последовательный режим высвобождения инсулина из хитозан-альгинатных наночастиц предполагает моделирование этапов прохождения наночастиц через желудочно-кишечный тракт человека. Эксперимент проводили следующим образом. Наночастицы, нагруженные инсулином, вносили в соляную кислоту (pH 1,2) и выдерживали 60 мин (среднее время пребывания пищи в желудке). Затем эти же наночастицы вносили последовательно в фосфатные буферы при pH 4,2; 5,6; 6,0 и 7,2, соответственно на 10, 15, 20 и 30 минут. Результаты показаны на рис. 3. Из полученных данных следует, что практически полное высвобождение инсулина наблюдается при значениях pH выше 5,0, что соответствует кислотности тонкого кишечника человека.

Выводы:

1. Методом капиллярного электрофореза определено оптимальное мольное соотношение ПЭГ: к инсулин, обеспечивающее полное связывание инсулина с полимером. Его значение составило 2,5: 1
2. Показано, что 98% инсулина высвобождается из хитозан-альгинатных наночастиц в тонком кишечнике при pH 7,2, откуда всасывается в кровоток, что обеспечивает его минимальные потери в кислой среде желудка.

Список литературы

1. Балаболкин М.И. Состояние и перспективы борьбы с сахарным диабетом // Проблемы эндокринологии. 1997. Т. 43, № 6, С.3-9
2. Михайлов В.В. Основы патологической физиологии: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2001. – 704 с.
3. Балаболкин М. И. Сахарный диабет М.: Медицина, 1994
4. Майоров А. Ю. Техника инъекций и средства введения инсулина.// Интернет-журнал «Лечащий врач». <http://www.lvrach.ru/2005/08/4532886/>
5. Зубаерова Д.Х., Ларионова Н.И. Неинвазивные системы доставки инсулина. // Биомедицинская химия, 2008, Т.54, №3, с. 249-265.
6. Хотиченко Ю.С. Углеводные биополимеры для адресной доставки белковых препаратов, нуклеиновых кислот и полисахаридов // ТМЖ. 2014. №2 (56)
7. Wong T.W. Alginate graft copolymers and alginate-co-excipient physical mixture in oral drug delivery // J. Pharm. Pharmacol. 2011. Vol. 63. P. 1497–1512
8. Дедов И. И., Петеркова В. А., Кураева Т. Л. Опыт применения аналога человеческого инсулина ультракороткого действия (Апидра) у детей.// Сахарный диабет. 2003 №4 с. 22-27
9. И.П. Баранова, О.А. Зыкова, Л.И. Краснова, М.Г. Романцов, М.В. Никольская, Л.Н. Афгаева. Ремаксол в коррекции нежелательных явлений противовирусной терапии хронического гепатита С. // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013, Том 76 №11 с. 44-46
10. Алмазов В. А. Клиническая патофизиология : Учеб.пособие для студентов вузов /С.-Петербург.гос. мед. ун-т им. И. П. Павлова М. : ВУНМЦ, 1999