

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. Курьлева, 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 applied 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  $28.4 \pm 2.3$  mmol/l before application of TDS insulin. The average glycemic index was  $21.2 \pm 3.1$  mmol/l ( $p < 0.001$ ) during of TDS application. The blood glucose decrease was  $26 \pm 8\%$  relative to baseline values. The glycemia was  $28.4 \pm 1.4$  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 см<sup>2</sup> 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. Шенкина 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. Стрептозотоцин, обладающий избирательным токсическим действием в отношении  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, вводили каждому животному внутривентриально по 12 мг/кг/сут в течение 5 дней подряд (суммарная доза – 70 мг/кг). Как показали ранее проведенные исследования [9, 10], дробное введение стрептозотоцина вызывает окончательную гибель  $\beta$ -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 стрептозотоцина 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 ( $\sigma$ ). 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-

**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

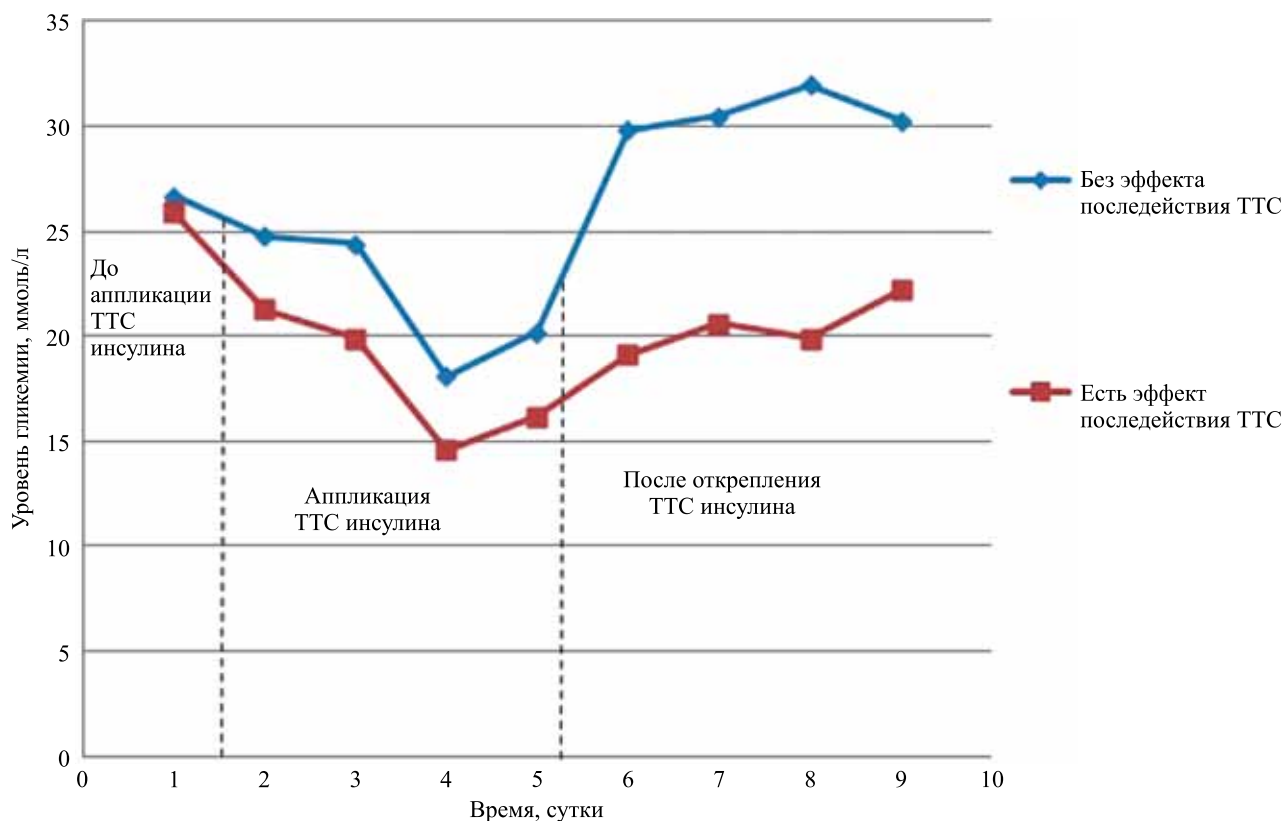


Рис. 1. Динамика гликемии у крыс № 6 и № 7 во время аппликации ТТС и после ее удаления

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

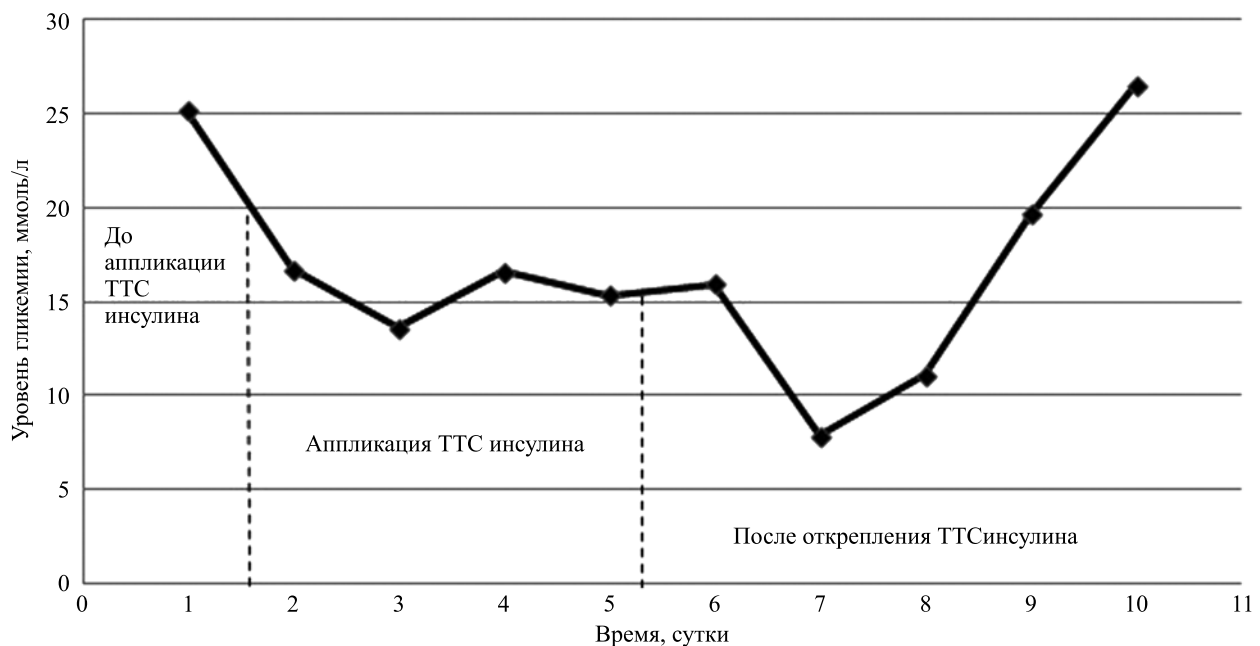


Рис. 2. Эффект «медового месяца» у крысы № 5 после удаления ТТС инсулина

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 et 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. 20.05.2013. АНО «ИМБИИТ». Mikrojemul'sionnye kompozitsii dlja 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, Бабикова РА.* Культуры островковых клеток поджелудочной железы и их трансплантация. *Материалы III Всесоюзного совещания «Культивирование клеток животных и человека»*. Пушкино; 1992; 16–23. *Blyumkin VN, Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Tkachenko AV, Petrova IA, Babikova RA.* Kulturyi ostrovkovyih kletok podzheludochnoy zhelezyi i ih transplantatsiya. *Materialy III Vsesouznogo soveshaniya «Kultivirovanie kletok zhivotnyih 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 инсулинзависимого сахарного диабета. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1994; 4: 356–363. *Skaletskiy NN, Fateeva NL, Suhih GT, Molnar EM.* Transplantatsiya kultur ostrovkovyih kletok fetalnoy podzheludochnoy zhelezyi v lechenii insulinzavisimogo saharnogo diabeta. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsinyi*. 1994; 4: 356–363.
12. *Смирнова ОМ, Горельшьева ВА, Дедов ИИ.* Фазы ремиссии при впервые выявленном инсулинзависимом сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 1999; 1: 9–12. *Smirnova OM, Gorelyisheva 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