СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСИЛИТЕЛЕЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА (ИНСУЛИНА) ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ

¹ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины
(Россия, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4);

² Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер Фарм»
(Россия, Санкт-Петербург, Индустриальный пр., д. 45, лит. А, оф. 216)

Актуальность. Ингаляционное введение соединений пептидной и белковой структуры может быть перспективно при оказании неотложной медицинской помощи в чрезвычайных ситуациях, в том числе при радиационных поражениях. Разработка ингаляционных лекарственных форм для соединений пептидной и белковой структуры требует подбора вспомогательных веществ для повышения их биодоступности.

Цель – оценка влияния усилителей проницаемости на эффективность модельного соединения белковой природы (инсулина) при ингаляционном введении.

Методология. Исследования выполнены на беспородных белых крысах-самцах с начальной массой тела 180–220 г. Для изучения эффективности инсулина и усилителей проницаемости проводили интраназальное и интратрахеальное введение при помощи зонда для инстилляций MicroSprayer® IA-2B производства Penn Century (США). Перечень исследуемых усилителей проницаемости биологических мембран (Sigma-Aldrich, США): метил-бета-циклодекстрин, диметил-бета-циклодекстрин, 2-гидрокси-пропил-бета-циклодекстрин, Твин-80, метилолеат натрия, олеиновая кислота, таурохолат натрия, гликохолат натрия, плуроник Ф-68, тезит, Brij-35, сапонин, цетилпиридин.

Результаты и их анализ. Биодоступность инсулина при интраназальном введении без применения усилителей проницаемости не превышает 0,5%. Тезит, сапонин, цетилпиридин в концентрации 5% при инстиляции в трахею крысам оказывают выраженное токсическое действие. Выраженный биологический эффект инсулина регистрировали после интратрахеального введения в комплексе с диметил-бета-циклодекстрином, таурохолатом натрия и Brij-35 в концентрации 5%. Курсовое интратрахеальное введение крысам Твин-80, таурохолата натрия и Brij-35 может быть причиной возникновения инфекционных осложнений.

Заключение. Таурохолат натрия, диметил-бета-циклодекстрин и Твин-80 в концентрации 5% повышают биодоступность и увеличивают выраженность биологического эффекта инсулина при интраназальном введении. Поверхностно-активные вещества Brij-35, Твин-80 и таурохолат натрия в концентрации 0,25% способствуют увеличению длительности биологического эффекта инсулина при интратрахеальном введении. Наименьшей токсичностью при курсовом интратрахеальном введении обладают таурохолат натрия и Твин-80 в концентрации 0,25%.

Ключевые слова: усилители проницаемости, инсулин, биологический эффект, гипогликемическое действие, биодоступность, интраназальное введение, интратрахеальное введение.

Введение

Биологически активные вещества (БАВ) пептидной и белковой структуры (факторы роста, гормоны, моноклональные антитела и цитокины) в лекарственных формах для парентерального введения успешно используются в клинической практике. В то же время, их применение в качестве потенциальных медицинских средств защиты для оказания

неотложной медицинской помощи в полевых условиях и при чрезвычайных ситуациях ограничивается отсутствием лекарственных форм, пригодных для практического применения.

Большая молекулярная масса, гидрофильность, чувствительность к химическим веществам и протеолитическим ферментам делают невозможным практическое применение рассматриваемых БАВ в пероральных ле-

Иванов Игорь Михайлович – канд. мед. наук, зам. нач. 21-го отдела, Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4), e-mail: toxlabs@yandex.ru;

Никифоров Александр Сергеевич – д-р биол. наук доц., вед. науч. сотр., Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4), e-mail: nikiforov2004@mail.ru;

Трофимова Валерия Сергеевна – мл. науч. сотр., Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер Фарм» (Россия, 195279, Санкт-Петербург, Индустриальный пр., д. 45, лит. А, оф. 216), e-mail: valernik850@mail.ru;

✉ Свентицкая Алевтина Митрофановна – науч. сотр., Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер Фарм» (Россия, 195279, Санкт-Петербург, Индустриальный пр., д. 45, лит. А, оф. 216), e-mail: sventicy2008@yandex.ru;

карственных формах. Существующие парентеральные формы введения лекарственных средств (на примере инсулина) не обеспечивают надлежащего соблюдения пациентами режима терапии из-за отсутствия должного удобства [5] и также малоприменимы в полевых условиях при отсутствии медицинского персонала.

Альтернативным методом применения соединений с большой молекулярной массой является ингаляционный. В ряде работ показаны эффективность применения и безопасность ингаляционных форм БАВ для лечения системных заболеваний [6, 8, 10]. Однако и в случае ингаляционного применения БАВ белковой и пептидной природы остаются проблемные вопросы, связанные с их биодоступностью и безопасностью активного начала и вспомогательных веществ, входящих в состав ингаляционных рецептур.

БАВ белковой и пептидной природы рассматривают в качестве перспективных средств противорадиационной защиты, при этом ингаляционный путь введения пептидов может быть привлекательной альтернативой инъекционному пути. Для повышения биодоступности макромолекул целесообразно использовать усилители проницаемости, в качестве которых могут выступать вспомогательные вещества, обладающие поверхностно-активными свойствами [2].

Одним из методических подходов в скрининге эффективности вспомогательных веществ может быть применение модельного БАВ белковой природы, обладающего ярко выраженным биологическим свойством, легко доступным для регистрации простыми методами. В качестве такого агента целесообразно рассматривать инсулин, характеризующийся быстро развивающимся гипогликемическим эффектом при подкожном введении. Модели интраназального и интратрахеального введения гормона были выбраны для скринингового исследования эффективности ряда средств из числа усилителей проницаемости биологических барьеров.

Цель – изучить влияние усилителей проницаемости на эффективность модельного БАВ белковой природы (на примере инсулина) при ингаляционном введении.

Материал и методы

Исследования выполнили на беспородных белых крысах-самцах с начальной массой тела 180–220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животных

содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 дней. Эксперименты осуществляли в соответствии с принципами биоэтики и согласно требованиям нормативно-правовых документов о порядке проведения исследовательских работ с применением животных [1, 3, 4].

Перечень исследуемых усилителей проницаемости биологических мембран (Sigma-Aldrich, США): метил-бета-циклодекстрин, диметил-бета-циклодекстрин, 2-гидрокси-пропил-бета-циклодекстрин, Твин-80, метилолеат натрия, олеиновая кислота, таурохолат натрия, гликохолат натрия, плюронион Ф-68, тезит, Brij-35, сапонин, цетилпиридин.

Для изучения эффективности инсулина и усилителей проницаемости проводили интраназальное и интратрахеальное введение при помощи зонда для инстилляций MicroSprayer® IA-2B производства Penn Century (США). Крысам контрольной группы вводили 0,9% изотонический раствор NaCl.

Растворы готовили путем внесения навесок энхансеров и последующего разведения изотоническим раствором NaCl до необходимой концентрации раствора инсулина короткого действия [раствор для инъекций 100 МЕ/мл Актрапид® НМ Пенфилл® (Actrapid® НМ Penfill®), производитель Novo Nordisk Production, SAS (Франция)].

Растворы энхансеров и инсулина готовили *ex tempore*, чтобы исключить возможность снижения их активности при хранении, и вводили одновременно (в одном шприце), однократно.

Следует отметить, что воздействие дозавок на пептидный гормон в настоящей работе не учитывали, однако выбор концентраций энхансеров проводили с учетом данных литературы о том, что в использованных концентрациях они не оказывают существенного влияния на активность белков и пептидов [7, 9].

В ходе эксперимента формировали группы животных по 6 особей в каждой. Перед интратрахеальным введением препаратов животное фиксировали корнцангом либо на деревянной подложке таким образом, чтобы голова, шея и грудная клетка находились в одной плоскости, а дыхательные пути были свободно проходимы. При помощи ларингоскопа для мелких животных осматривали область голосовой щели, вводили зонд на глубину до нижней тре-

ти трахеи и путем энергичного нажатия на поршень шприца распыляли аэрозоль.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 2005 для Windows. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с группой контроль проводили статистическую обработку по непараметрическому тесту Манна–Уитни. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с фоном использовали непараметрический критерий для парных сравнений Вилкоксона [1]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ и менее.

Результаты и их анализ

Проведено сравнительное исследование биодоступности модельного БАВ белковой структуры при различных путях введения (подкожно, интраназально, инстилляцией в трахею) на примере однократного введения инсулина. В качестве критерия биологической активности рассматривали целевой эффект препарата – снижение уровня глюкозы в крови. Результаты исследования гипогликемического эффекта инсулина через 30 мин после введения представлены в табл. 1.

Установлено, что при интраназальном и интратрахеальном введении инсулин оказывает менее выраженное действие, чем при подкожном. При интраназальном введении препарата в дозах до 1 ЕД/животное снижение уровня глюкозы (по сравнению с фоновым показателем) не достигало статистической значимости. Снижение концентрации глюкозы после введения инсулина в максимальной исследованной дозе (10 ЕД/животное) составило $(1,1 \pm 0,12)$ мкмоль/мл, что было сопоставимо с результатами, полученными после подкожного введения инсулина в дозе 0,05 ЕД – $(1,4 \pm 0,09)$ мкмоль/мл. При интратрахеальном введении препарата схожие зна-

чения $(1,3 \pm 0,12)$ мкмоль/л были зарегистрированы уже в дозе 0,5 ЕД (см. табл. 1).

Полученные данные позволяют сделать косвенное (на основании изменения выраженности фармакологического эффекта) заключение о том, что биодоступность гормона при интраназальном введении не превышает 0,5% (0,05 ЕД составляет 0,5% 10 ЕД), а при интратрахеальном – составляет не менее 10% (0,5 ЕД составляет 10% 0,05 ЕД).

При исследовании влияния усилителей проницаемости на биодоступность инсулина при однократном интраназальном введении крысам (в дозе 1 ЕД/животное, введенной в объеме 0,1 мл/животное) установлено, что таурохолат натрия, диметил-бета-циклодекстрин и Твин-80 способствуют увеличению выраженности гипогликемического действия гормона в 2–3 раза (табл. 2). Достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня глюкозы в крови у животных в группах введения инсулина в комплексе с диметил-бета-циклодекстрином и таурохолатом натрия по сравнению с контролем – $(0,5 \pm 0,17)$ мкмоль/мл – составило $(1,4 \pm 0,14)$ и $(1,5 \pm 0,11)$ мкмоль/мл соответственно.

На основании полученных результатов было сделано косвенное заключение о том, что биодоступность инсулина при интраназальном введении с наиболее активным усилителем проницаемости – таурохолатом натрия (концентрация 5%) составила 5% при снижении уровня глюкозы в дозе 1 ЕД – $(1,5 \pm 0,11)$ мкмоль/мл, что соответствовало эффекту гормона в дозе 0,05 ЕД при подкожном введении – $(1,4 \pm 0,09)$ мкмоль/мл.

Дальнейшие исследования проводились с применением интратрахеального введения модельного БАВ и усилителей абсорбции. Результаты исследования усилителей проницаемости при однократной инстилляцией в трахею крысам (в дозе 5 ЕД/животное, ве-

Таблица 1

Снижение концентрации глюкозы в крови через 30 мин после введения инсулина (мкмоль/мл)

Доза инсулина, ЕД/животное	Путь введения (количество погибших животных)		
	подкожный	интраназальный	интратрахеальный
0,01	$0,9 \pm 0,18$ (0)	–	–
0,05	$1,4 \pm 0,09^*$ (0)	–	–
0,10	$1,7 \pm 0,29^*$ (0)	$0,2 \pm 0,21$ (0)	$0,4 \pm 0,05$ (0)
0,25	$1,9 \pm 0,29^*$ (0)	$0,2 \pm 0,23$ (0)	$1,1 \pm 0,21$ (0)
0,50	$2,1 \pm 0,40^*$ (0)	$0,2 \pm 0,14$ (0)	$1,3 \pm 0,12^*$ (0)
1,00	$2,9 \pm 0,23^*$ (1)	$0,5 \pm 0,17^*$ (0)	$2,5 \pm 0,19^*$ (0)
5,00	$3,4 \pm 0,16^*$ (4)	$0,9 \pm 0,11^*$ (0)	$2,2 \pm 0,21^*$ (1)
10,00	$3,3 \pm 0,15^*$ (6)	$1,1 \pm 0,12^*$ (0)	$2,2 \pm 0,16^*$ (5)

* Различия по сравнению с фоном через 30 мин после введения при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние усилителей проницаемости в концентрации 5% на гипогликемический эффект инсулина в дозе 1 ЕД/животное при интраназальном введении в объеме 0,1 мл/животное, мкмоль/мл (%)

Усилитель проницаемости	Этап регистрации		
	фон	через 30 мин	снижение от фона
Контроль	5,2 ± 0,16	4,7 ± 0,07*	0,5 ± 0,17 (9,4)
Твин-80	5,1 ± 0,18	4,0 ± 0,07*#	1,1 ± 0,11 (21,2)
Диметил-бета-циклодекстрин	5,1 ± 0,15	3,7 ± 0,08*#	1,4 ± 0,14Δ (26,9)
Олеиновая кислота	5,1 ± 0,10	4,3 ± 0,09*#	0,8 ± 0,11 (15,4)
Таурохолат натрия	5,1 ± 0,11	3,6 ± 0,21*#	1,5 ± 0,11Δ (30,8)
Vrij-35	6,2 ± 0,06	5,1 ± 0,13*#	1,1 ± 0,13 (17,5)

Здесь и в табл. 3–5: * различия по сравнению с фоном при $p < 0,05$; # различия по сравнению с контролем при $p < 0,05$; Δ различия по сравнению с контролем по показателю «снижение от фона» при $p < 0,05$.

денной в объеме 0,1 мл/животное) показали, что некоторые из изучаемых препаратов способны оказывать выраженное токсическое действие. После введения тезита, сапонина, цетилпиридина в концентрации 5% отмечали гибель 100% животных в ранние сроки после введения, при патоморфологическом исследовании особей данных групп был выявлен отек лёгких.

Среди исследованных усилителей проницаемости наиболее выраженный эффект регистрировали после введения инсулина в комплексе с диметил-бета-циклодекстрином (снижение уровня глюкозы от фона на 60,3%), таурохолатом натрия (60,0%) и Vrij-35 (58,6%). В сравнении с контрольной группой при данной концентрации инсулина снижение глюкозы было на 17,2, 16,9 и 15,5% соответственно. Следует отметить, что использование перечисленных средств не приводило к гибели животных в группе, несмотря на выраженный гипогликемический эффект

(табл. 3). Выраженным влиянием на биодоступность инсулина обладали метил-бета-циклодекстрин, 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин, олеиновая кислота, плюроник Ф-68, однако после применения этих средств частота гибели животных в экспериментальных группах составила 17–33%.

Полученные данные указывали на то, что большинство усилителей проницаемости в выбранной для исследования концентрации (5%) при ингаляционном введении вызывают разрушение биологических мембран и характеризуются собственным токсическим эффектом, что приводит к утяжелению состояния животных, вплоть до гибели. В связи с этим изучение эффективности этих средств продолжали, снизив их концентрацию до 0,5% и исключив из опыта наиболее токсичные соединения. Так как инсулин в дозе 5 ЕД/животное обладал собственным токсическим свойством (см. табл. 1), доза гормона была снижена до 0,5 ЕД/животное.

Таблица 3

Влияние усилителей проницаемости в концентрации 5% на гипогликемический эффект инсулина в дозе 5 ЕД/животное при интратрахеальном введении крысам в объеме 0,1 мл/животное, мкмоль/мл (%)

Усилитель проницаемости	Этап регистрации			Погибшие/ всего в группе
	фон	через 30 мин	снижение от фона	
Контроль	5,1 ± 0,12	2,9 ± 0,13*	2,2 ± 0,21 (43,1)	0/6
Метил-бета-циклодекстрин	6,0 ± 0,29	3,0 ± 0,09*	3,0 ± 0,21Δ (50,0)	1/6
Диметил-бета-циклодекстрин	5,8 ± 0,17	2,5 ± 0,08*#	3,5 ± 0,21Δ (60,3)	0/6
2-Гидроксипропил-бета-циклодекстрин	5,4 ± 0,07	2,1 ± 0,04*#	3,1 ± 0,02Δ (59,6)	1/6
Твин-80	5,3 ± 0,17	2,5 ± 0,04*#	2,8 ± 0,12Δ (52,8)	0/6
Метилолеат натрия	5,3 ± 0,09	2,3 ± 0,08*#	3,0 ± 0,01Δ (56,6)	5/6
Олеиновая кислота	6,1 ± 0,19	2,7 ± 0,2*	3,4 ± 0,06Δ (55,7)	2/6
Таурохолат натрия	5,6 ± 0,1	2,2 ± 0,05*#	3,4 ± 0,04Δ (60,0)	0/6
Гликохолат натрия	5,6 ± 0,13	2,8 ± 0,12*	2,8 ± 0,43 (50,0)	2/6
Плюроник Ф-68	5,5 ± 0,04	2,4 ± 0,08*#	3,1 ± 0,1Δ (56,4)	2/6
Тезит	5,6 ± 0,25	–	–	6/6
Vrij-35	5,7 ± 0,10	2,5 ± 0,11*#	3,2 ± 0,15Δ (58,6)	0/6
Сапонин	5,7 ± 0,17	–	–	5/6
Цетилпиридин	5,7 ± 0,18	–	–	6/6

Таблица 4

Влияние усилителей проницаемости в концентрации 0,5 % на гипогликемический эффект инсулина в дозе 0,5 ЕД/животное при интратрахеальном введении в объеме 0,1 мл/животное, мкмоль/мл (%)

Усилитель проницаемости	Этап регистрации		
	фон	через 30 мин	снижение от фона
Контроль	5,5 ± 0,09	4,2 ± 0,15*	1,3 ± 0,12 (23,6)
Твин-80	5,5 ± 0,19	3,7 ± 0,12*#	1,8 ± 0,09 (32,7)
Brij-35	5,5 ± 0,15	3,3 ± 0,15*#	2,2 ± 0,26 (40,0)
Таурохолат натрия	5,5 ± 0,20	3,6 ± 0,10*#	1,9 ± 0,16 (34,5)
2-Гидроксипропил-бета-циклодекстрин	5,6 ± 0,08	3,9 ± 0,08*	1,7 ± 0,03 (30,4)
Диметил-бета-циклодекстрин	5,5 ± 0,14	3,9 ± 0,18*	1,6 ± 0,14 (29,1)
Олеиновая кислота	5,6 ± 0,09	4,4 ± 0,10*	1,2 ± 0,1 (21,4)

В табл. 4 представлены результаты исследования влияния усилителей проницаемости на выраженность гипогликемического действия инсулина при однократном интратрахеальном введении крысам в дозе 0,5 ЕД/животное, введенном в объеме 0,1 мл/животное. Установлено, что наиболее выраженное влияние на биодоступность гормона оказывали Brij-35, Твин-80 и таурохолат натрия, хотя по показателю «снижение от фона» достоверных различий между контрольной и опытными группами не было выявлено. Выраженность снижения уровня глюкозы в крови у животных в группе введения гормона в комбинации с данными усилителями абсорбции составила 32,7, 40,0 и 34,5% соответственно, что соответствовало эффектам гормона в дозах 0,10, 0,25 и 0,50 ЕД при подкожном введении. Циклодекстрины и олеиновая кислота в концентрации 0,5% не оказали заметного влияния на биологический эффект инсулина.

На основании полученных результатов для дальнейшего исследования эффективности были выбраны Твин-80, Brij-35 и таурохолат натрия. Из соображений безопасности концентрация усилителей проницаемости была снижена до 0,25%. Изучение биологического эффекта модельного белкового БАВ проводили в динамике, оценивая содержание глюкозы в крови через 30 мин и 2 ч после однократного интратрахеального введения в дозе 0,25 ЕД/животное в объеме 0,1 мл/животное (табл. 5).

К концу периода наблюдения содержание глюкозы в крови у животных опытных групп не достигало фоновых значений. Наиболее выраженный гипогликемический эффект наблюдали в группе животных с усилителем проницаемости Твин-80 – через 30 мин после введения уровень глюкозы в крови относительно фона снизился на 37,5%. Введение инсулина в комплексе с Brij-35 приводило к эффективному снижению уровня глюкозы в крови, различия с фоновыми и контрольными значениями были достоверными. Таурохолат натрия в указанной концентрации не усиливал биодоступность гормона. При регистрации показателей через 2 ч после введения отмечали, что во всех опытных группах снижение уровня глюкозы от фона было сходным и составляло 0,7–0,9 мкмоль/л, а в контрольной группе – (0,2 ± 0,25) мкмоль/л. Следовательно, исследованные усилители абсорбции способствовали пролонгированию биологического эффекта введения гормона.

Исследованные усилители обладали примерно равной эффективностью по критерию увеличения биодоступности инсулина, поэтому представлялось целесообразным провести сравнительное исследование их безопасности при курсовом ежедневном введении (табл. 6).

Следует отметить, что интратрахеальное введение 0,9% изотонического раствора NaCl в объеме 0,1 мл/животное в течение 14 сут характеризовалось возникновением единичных

Таблица 5

Влияние усилителей проницаемости в концентрации 0,25% на гипогликемический эффект инсулина в дозе 0,25 ЕД/животное при интратрахеальном введении в объеме 0,1 мл/животное, мкмоль/мл (%)

Усилитель проницаемости	Этап регистрации			Снижение от фона	
	фон	через 30 мин	через 2 ч	через 30 мин	через 2 ч
Контроль	5,6 ± 0,19	4,7 ± 0,07*	5,4 ± 0,25	0,9 ± 0,14 (16,1)	0,2 ± 0,25 (3,6)
Твин-80	5,6 ± 0,14	4,1 ± 0,04*#	4,9 ± 0,12*	2,1 ± 0,16 (37,5)	0,7 ± 0,23 (12,7)
Brij-35	5,6 ± 0,15	4,5 ± 0,19*	4,8 ± 0,22*	1,5 ± 0,15 (26,8)	0,8 ± 0,30 (14,1)
Таурохолат натрия	5,6 ± 0,11	3,5 ± 0,24*#	4,7 ± 0,22*	1,0 ± 0,18 (19,6)	0,9 ± 0,21 (16,3)

Таблица 6

Процент гибели животных после курсового (в течение 14 сут) ежедневного ингаляционного введения 0,25% усилителей проницаемости в объеме 0,1 мл/животное

Группа	Этап регистрации, сутки		
	7-е	14-е	21-е
Интактные	0 + 17	0 + 17	0 + 17
Контроль	0 + 17	17 ± 17	17 ± 17
Твин-80	0 + 17	17 ± 17	33 ± 21
Таурохолат натрия	0 + 17	0 + 17	0 + 17
Brij-35	0 + 17	33 ± 21	67 ± 21

случаев гибели животных в группе. Вероятно, это было обусловлено травматичностью процедуры введения и возможностью возникновения инфекционных осложнений.

Установлено, что ингаляционное введение Brij-35 и Твин-80 также сопровождалось гибелью животных, частота которой при регистрации через 14 сут после начала курса соответствовала показателям в контрольной группе. Гибель крыс в этих группах регистрировали и в течение 7-дневного восстановительного периода (15–21-е сутки эксперимента). Таким образом, частота гибели после введения Твин-80 составила (33 ± 21)%, Brij-35 – (67 ± 21)%. После введения таурохолата натрия гибель животных в течение всего периода наблюдения не отмечали.

Все экспериментальные группы, включая контроль растворителя, характеризовались снижением массы тела в течение всего периода наблюдения по сравнению с интактной группой (табл. 7). Прирост массы тела у интактных животных при регистрации показателя на 7-, 14-е и 21-е сутки эксперимента составил 8,0, 18,1 и 19,2% соответственно. В группе контроля растворителя прирост массы тела в соответствующие сроки составил 1,1, –0,1 и 6,4% соответственно.

Максимальные достоверные отличия от показателей у интактных животных регистрировали к моменту завершения курса введения на 14-е сутки в группах контроль, Твин-80 (0,25%) и Brij-35 (0,25%). Через 7 сут после завершения курса отмечали увеличение массы тела животных в опытных группах, однако прирост исследуемого показателя не достигал уровня в интактной группе.

При оценке влияния курсового введения усилителей проницаемости на динамику потребления животными пищи и воды отмечали снижение исследуемых показателей в контрольной и опытных группах по сравнению с интактными животными на 7-е и 14-е сутки введения. Через 5 сут после завершения курса (21-е сутки периода наблюдения) наиболее низкие показатели потребления пищи и воды регистрировали у животных, которым вводили Brij-35.

Выводы

1. Среди исследованных усилителей проницаемости, примененных интраназально в концентрации 5%, наиболее выраженное влияние на биодоступность инсулина оказывали таурохолат натрия, диметил-бета-циклодекстрин и Твин-80. Указанные усилители

Таблица 7

Динамика массы тела животных после курсового (в течение 14 сут) ежедневного ингаляционного введения 0,25% усилителей проницаемости в объеме 0,1 мл/животное (г)

Группа	Показатель	Срок регистрации показателей, сутки			
		фон	7-е	14-е	21-е
Интактные	Масса	230,0 ± 15,9	248,3 ± 12,0	271,7 ± 8,2*	274,2 ± 12,8*
	Различия с фоном, %		8,0	18,1	19,2
Контроль	Масса	228,3 ± 15,7	230,8 ± 13,3	228 ± 9,9#	243,0 ± 9,5
	Различия с фоном, %		1,1	–0,1	6,4
Твин-80	Масса	232,5 ± 13,9	237,5 ± 10,2	219,2 ± 9,8#	245,0 ± 7,0
	Различия с фоном, %		2,2	–5,7	5,4
Таурохолат натрия	Масса	224,2 ± 12,7	232,5 ± 9,2	243,3 ± 7,1#	250,8 ± 8,4
	Различия с фоном, %		3,7	8,5	11,9
Brij-35	Масса	223,3 ± 13,4	220,8 ± 14,9	191 ± 12,5#	220,0 ± 28,6
	Различия с фоном, %		–1,1	–14,5	–1,5

* Различия по сравнению с фоном при $p < 0,05$; # различия по сравнению с интактной группой при $p < 0,05$.

проницаемости способствуют увеличению в 2–3 раза выраженности биологического эффекта гормона (1 ЕД/животное) при совместном интраназальном введении.

2. Тезит, сапонин, цетилпиридин в концентрации 5% при инстилляции в трахею крысам оказывают выраженное токсическое действие. В ранние сроки после введения отмечали гибель животных (предположительно от отека легких).

3. После интратрахеального введения инсулина (5 ЕД/животное) в комплексе с диметил-бета-циклодекстрином, таурохолатом натрия и Brij-35 в концентрации 5% регистрировали выраженный биологический эффект – снижение уровня глюкозы от фона на 60,3, 60,0 и 58,6%, от контроля на 17,2, 16,9 и 15,5% соответственно. Использование перечисленных средств не приводило к гибели животных в группе.

4. Brij-35, Твин-80 и таурохолат натрия в концентрации 0,5% оказывают выраженное влияние на биодоступность инсулина в дозе 0,5 ЕД/животное при интратрахеальном введении.

5. Интратрахеальное введение инсулина в дозе 0,25 ЕД/животное в комплексе с 0,25% усилителями проницаемости Brij-35, Твин-80 и таурохолатом натрия приводит к пролонгированию его биологического эффекта.

6. Курсовое интратрахеальное введение растворов крысам может быть причиной возникновения инфекционных осложнений. Среди исследованных усилителей проницаемости наименьшей токсичностью обладают таурохолат натрия и Твин-80 в концентрации 0,25%.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи. Поступила 10.10.2018 г.

Для цитирования. Иванов И.М., Никифоров А.С., Трофимова В.С., Свентичкая А.М. Сравнительное исследование влияния усилителей проницаемости на эффективность модельного белка (инсулина) при ингаляционном введении // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2018. № 4. С. 76–83. DOI 10.25016/2541-7487-2018-0-4-76-83

Литература

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз. 1963. 152 с.
2. Быкова А.Ф., Иванов И.М., Гребенюк А.Н. Проблемы и перспективы ингаляционного применения веществ пептидной и белковой структуры в качестве потенциальных медицинских средств противорадиационной защиты // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2018. № 2. С. 60–69. DOI10.25016/2541-7487-2018-0-2-60-69
3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012. 48 с.
4. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики: приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н. URL: http://disuria.ru/_id/1/168_Pr199nMZ010416.pdf.
5. Agu R.U., Ugwoke M.I., Armand M. [et al.]. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides // *Respir. Res.* 2001. Vol. 2. P. 198–209.
6. Guntur V.P., Dhand R. Inhaled insulin: extending the horizons of inhalation therapy // *Respir Care.* 2007. Vol. 52. P. 911–922.
7. Johansson F., Hjertberg E., Eirefelt S. Mechanisms for absorption enhancement of inhaled insulin by sodium taurocholate // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002. Vol. 17, N 1/2. P. 63–71.
8. Mastrandrea L.D., Quattrin T. Clinical evaluation of inhaled insulin // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58. P. 1061–1075.
9. Mesiha M.S., El-Bitar H.I. Hypoglycaemic effect of oral insulin preparations containing Brij 35, 52, 58 or 92 and stearic acid // *J. Pharm. Pharmacol.* 1981. Vol. 33, N 11. P. 733–734.
10. Siekmeier R., Scheuch G. Inhaled insulin – does it become reality // *J. Physiol. Pharmacol.* 2008. Vol. 59, N 6. P. 81–113.

Comparative research of effects of permeability enhancers on the effectiveness of model protein (insulin) administered via the inhalation route

Ivanov I.M.¹, Nikiforov A.S.¹, Trofimova V.S.², Sventickaya A.M.^{1,2}

¹ State Scientific Research Testing Institute of the Military Medicine (Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia);

² LLC «Innovative Pharmaceutical Company “Silver Pharm”» (Industrialny Ave., 45, St. Petersburg, 195279, Russia)

Igor Mikhailovich Ivanov – PhD Med. Sci., Deputy head of department, State Scientific Research Testing Institute of the Military Medicine (Lesoparkovaya Str. 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: toxlabs@yandex.ru;

Aleksandr Sergeevich Nikiforov – Dr. Biol. Sci. Associate Prof., Leading Research Associate, Federal state budgetary institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (Lesoparkovaya Str. 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: nikiforov2004@mail.ru;

Valeriya Sergeevna Trofimova – Junior Research Associate, LLC «Innovative Pharmaceutical Company “Silver Pharm”» (Industrialny Ave., 45, St. Petersburg, 195279, Russia), e-mail: valernik850@mail.ru;

✉ Alevtina Mitrofanovna Sventitskaya – Research Associate, LLC «Innovative Pharmaceutical Company “Silver Pharm”» (Industrialny Ave., 45, St. Petersburg, 195279, Russia), e-mail: sventiciy2008@yandex.ru;

Abstract

Relevance. Inhalation administration of compounds with peptide and protein structure may be promising in provision of emergency medical assistance in emergency situations, including radiation injuries. The development of inhalation dosage forms for compounds with peptide and protein structure requires the selection of excipients to increase their bioavailability.

Intention. To assess effects of permeability enhancers on the effectiveness of a model biologically active substance of protein nature (insulin) by inhalation.

Methods. The experiments were carried out in outbred white male rats with initial weight of 180–220 g. To assess the effectiveness of insulin and permeability enhancers, they were administered via intranasal and intratracheal routes using a MicroSprayer® IA-2B instillation probe (Penn Century, USA). The list of biological membrane permeability enhancers under investigation (Sigma-Aldrich, USA) includes the following substances: methyl- β -cyclodextrin, dimethyl- β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Tween-80, sodium methyl oleate, oleic acid, sodium taurocholate, sodium glycocholate, Pluronic F-68, tesit, Brij-35, saponin, cetylpyridine.

Results and Discussion. Insulin bioavailability without permeability enhancers does not exceed 0.5% when administered intranasally. When assessing effects of multiple doses of permeability enhancers on food and water consumption in animals over time, decreased parameters under study were observed in the control and experimental groups compared to intact animals. Multiple intratracheal administration of solutions to rats can lead to some infectious complications.

Conclusion. Such excipients as sodium taurocholate, dimethyl- β -cyclodextrin and Tween-80 in a concentration of 5 % increase bioavailability and intensity of biological effects of insulin when administered intranasally. The surfactants Brij-35, Tween-80 and sodium taurocholate in a concentration of 0.25 % increase the duration of biological effects of insulin when administered intratracheally. Sodium taurocholate and Tween-80 in a concentration of 0.25 % have the lowest toxicity during multiple intratracheal administration.

Keywords: permeability enhancers, insulin, biological effect, hypoglycemic effect, bioavailability, intranasal administration, intratracheal administration.

References

1. Belen'kii M.L. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo effekta [Elements of quantitative evaluation of the pharmacological effect]. Leningrad. 1963. 152 p. (In Russ.).
2. Bykova A.F., Ivanov I.M., Grebenyuk A.N. Problemy i perspektivy ingalyatsionnogo primeneniya veshchestv peptidnoi i belkovoï struktury v kachestve potentsial'nykh meditsinskikh sredstv protivoradiatsionnoi zashchity [Problems and prospects of inhalation application of peptide and protein compounds as potential medical radiation protective agents]. *Mediko-biologicheskie i social'no-psihologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychajnykh situatsiyah* [Medico-biological and socio-psychological problems of safety in emergency situations]. 2018. N 2. Pp. 60–69. DOI 10.25016/2541-7487-2018-0-2-60–69. (In Russ.).
3. Direktiva 2010/63/EU Evropeiskogo parlamenta i soveta Evropeiskogo Soyuza po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh [Directive 2010/63/EU of the European parliament and the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes]. Sankt-Peterburg. 2012. 48 p. (In Russ.).
4. Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchei laboratornoi praktiki : prikaz Ministerstva zdrazvookhraneniya Rossii 01.04.2016 N 199n [On approval of laboratory practice rules : Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 01.04.2016 N 199n]. (In Russ.).
5. Agu R.U., Ugwoke M.I., Armand M. [et al.]. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir. Res.* 2001. Vol. 2. Pp. 198–209.
6. Guntur V.P., Dhand R. Inhaled insulin: extending the horizons of inhalation therapy. *Respir Care.* 2007. Vol. 52. Pp. 911–922.
7. Johansson F., Hjertberg E., Eirefelt S. Mechanisms for absorption enhancement of inhaled insulin by sodium taurocholate. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002. Vol. 17, N 1-2. Pp. 63–71.
8. Mastrandrea L.D., Quattrin T. Clinical evaluation of inhaled insulin. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58. Pp. 1061–1075.
9. Mesiha M.S., El-Bitar H.I. Hypoglycaemic effect of oral insulin preparations containing Brij 35, 52, 58 or 92 and stearic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 1981. Vol. 33, N 11. Pp. 733–734.
10. Siekmeier R., Scheuch G. Inhaled insulin – does it become reality. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008. Vol. 59, N 6. Pp. 81–113.

Received 10.10.2018

For citing: Ivanov I.M., Nikiforov A.S., Trofimova V.S., Sventitskaya A.M. Sravnitel'noe issledovanie vliyaniya usilitelei pronitsaemosti na effektivnost' model'nogo belka (insulina) pri ingalyatsionnom vvedenii. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psihologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychajnykh situatsiyakh*. 2018. N 4. Pp. 76–83. (In Russ.)

Ivanov I.M., Nikiforov A.S., Trofimova V.S., Sventitskaya A.M. Comparative research of effects of permeability enhancers on the effectiveness of model protein (insulin) administered via the inhalation route. *Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*. 2018. N 4. Pp. 76–83. DOI 10.25016/2541-7487-2018-0-4-76-83