

Semmelweis Egyetem, ÁOK, I. Belklinika, Budapest

Smart inzulin: az előállítás technikája és az első (experimentális) eredmények

Gerő László dr.

Összefoglalás

A közelmúltban amerikai kutatók egy olyan glukózreszponzív inzulinadagoló rendszert („smart insulin” kezelés) fejlesztettek ki, amely képes utánozni az egészséges ember béta-sejtjeinek működését. Hialuronsavból és 2-nitro-imidazolból olyan mikroszkópos, hipoxiaszenzitív falú hólyagcsákat képeztek (átmérő 118 nanométer), amelyekbe még humán rekombináns inzulint és glukóoxidáz enzimet juttattak. A hólyagcsákat apró tűkbe vitték be (hosszméret 600 mikron, alsó pórus átmérője 10 mikron), és a hólyagcsákkal feltöltött tű-sorozatot egy orvosi tapaszthoz erősítették. Amikor a tapaszt a bőrre erősítették, a tűk vége a subcutan zsírszövetbe ért. A környezet glukózkoncentrációjának emelkedése a vezikulákban a glukóoxidáz aktiválását, és így az oxigén felhasználását és következményes hipoxiát okozott. A hipoxia a hólyagcsák falának feloldódását és az inzulin kiáramlását váltotta ki. Minél magasabb a glukózkoncentráció, annál nagyobb mértékű az inzulin kiáramlás. A leírt rendszer tehát a glukózkoncentráció emelkedésével arányos inzulinválaszt provokál. Amennyiben ezt humán vizsgálatokban is bizonyítani lehet, akkor ez a módszer alkalmas lehet a diabeteses betegekben a glukózreszponzív inzulinszekréció visszaállítására.

■ **Kulcsszavak:** smart insulin, glukóoxidáz, glukózreszponzív inzulinszekréció

Smart insulin: development of the system and the first (experimental) results

Summary: A glucose-responsive insulin delivery system („smart insulin” treatment) has been recently developed by American researchers that can mimic the function of healthy human beta-cells. Glucose-responsive vesicles were let to be self-assembled from hypoxia-sensitive hyaluronic acid conjugated with 2-nitro-imidazole. These vesicles (with a diameter of 118 nanometer) were loaded with human recombinant insulin and glucose oxidase. The vesicles were packed into microneedles which were attached to a medical patch. The length of the microneedles were 600 mm and the diameter of the tip was 10 mm. When this patch was applied to the skin the needles arrived at the subcutaneous fatty tissue. Elevation of glucose concentration in the surrounding tissues activated the glucose oxidase enzyme in the vesicles and led to enhanced consumption of oxygen. The consequent hypoxia resulted in a dissolution of the vesicle wall and insulin release from the vesicles. Higher glucose concentration induced greater insulin release. Thus, the magnitude of insulin output was in correlation with the elevation of glucose level. If this system would also work in diabetic patients then glucose-responsive insulin secretion could be restored in patients suffering from diabetes mellitus.

■ **Key words:** smart insulin, glucose oxidase, glucose-responsive insulin secretion

DIABETOLOGIA HUNGARICA 25 (Nº5) 323–327. 2017. október

DOI: 10.24121/dh.2017.25

Rövidítések

GQ: glukóoxidáz (glucose oxidase); **GRV:** glukózreszponzív vezikula (glucose responsive vesicle); **HA:** hialuronsav (hyaluronic acid); **HS-HA:** hipoxiaszenzitív hialuronsav (hypoxia-sensitive hyaluronic acid); **H₂O₂:** hidrogén-peroxid (hydrogen peroxide); **2-NI:** 2-nitro-imidazol; **2-AN:** 2-amino-imidazol; **PBS:** foszfátpuffer (phosphate buffered saline)

Egészséges személyeken az éhomi vércukorszint szűk határok, 4,0–5,5 mmol/l között ingadozik, és – átmeneti emelkedést követően – étkezés után is rövid időn belül visszatér a fenti tartományba. Szervezetünkben a cukorszint alakulását komplex hormonális folyamat szabályozza, ami egyrészt a vércukorcsökkentő inzulin, másrészt a cukorszintet emelő hormonok (adrenalin, glukagon, kortizol, növekedési hormon stb.) időben és hatáserősségben jól összehangolt aktivitásának az eredménye.

Amikor az endogén inzulinelválasztás abszolút vagy relatív értelemben elégtelenné válik, exogén inzulin bevitelére van szükség. Ezzel azonban az ún. minute-to-minute szabályozás, azaz a vércukorszint emelkedésére szinte azonnal fokozódó inzulinszekréció nem utánozható. Az inzulinanalógokkal jobban megközelíthető a fiziológiás inzulinelválasztás, mint a tradicionális humán inzulinokkal, de a fiziológiás „fine-tuning” nem érhető el. Gyakorlatilag az inzulin beadása után a „tapasztalat” szerint étkezünk, és így próbáljuk a vércukorszint csökkenését vagy túlzott emelkedését kivédeni. A hyperglykaemiás periódusok és hypoglykaeiai epizódok kialakulása azonban elkerülhetetlen.

A tökéletes normoglykaemia csak „visszacsatolásos” rendszerrel lenne elérhető. Ún. closed-loop rendszerű, az inzulint az aktuálisan mért vércukorszint szerint adagoló pumpák ugyan már megjelentek a piacon, de ezek a készülékek rendkívül drágák, a hozzáférés nehéz és tömeges elterjedésükre egyelőre nem lehet számítani. A sikeres sebészi pancreastranszplantáció ugyan hosszú

évekre tökéletes szénhidrát-anyagcserét biztosít inzulinkezelés nélkül is, de ez a beavatkozás a beteget jelentősen megterheli, s emiatt csak kis számú, szelektált csoporton alkalmazható. További korlátozást jelent a donorhiány, valamint az a tény, hogy a szervátültetés után tartós immunszuppresszív terápiára van szükség – annak minden káros következményével. A Langerhans-szigetek transzplantációja kisebb beavatkozás, de a beültetett szigetek túlélése viszonylag rövid, és a beavatkozás szintén immunszuppresszív kezeléssel jár. Mesterséges béta-sejtek kifejlesztése őssejtekből, pluripotens sejtekből egyelőre experimentális stádiumban van.¹

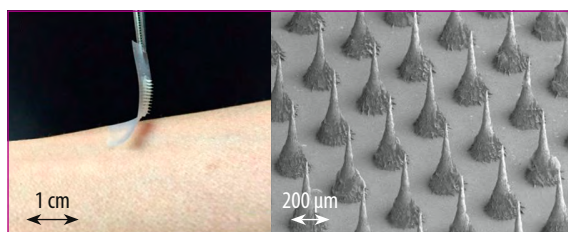
A „smart inzulin” kezelés elvi háttere

A közelmúltban egyesült államokbeli kutatók egy új módszert dolgoztak ki, amelynek segítségével a vércukorszint aktuális ingadozásait követő inzulinmennyiség juttatható a szervezetbe. A terápia kivitelezéséhez a bőrfelületre olyan „tapaszt” helyeznek, amelynek alsó (a bőr felé néző) felszínén a bőrön áthatoló apró tűk helyezkednek el. A tűk végében van a speciális, mikroszkopikus nagyságú hólyagocskákba helyezett inzulin. A környezet cukorszintjének emelkedésekor az emelkedés nagyságával arányos mennyiségű inzulin kerül át a tűkből a subcutan zsírszövetbe. A reakció kifejezetten gyors, a szervezetbe jutó inzulin így képes szabályozni az étkezést (vagy a cukorterhelést) követő vércukorszint-emelkedést.

Az inzulint tartalmazó glukózreszponzív rendszer kialakítása

Az inzulinadagoló rendszer fontos eleme egy olyan, a bőrfelületre helyezhető tapaszt, amelynek alsó (a bőrfelület felé néző) oldalán apró, szuperhegyes „tűk” állnak ki. A tapaszt bőrre helyezésekor a tűk áthatolnak a bőrön, és hegyük a bőr alatti zsírszövetbe ér. A megfigyelések (a betegek visszajelzése) szerint a tapaszt felhelyezése fájdalomtalan.

A tűk átmérője a hegyes végén (tehát a subcutan szövetben) mindössze 10 μm , felfelé (a tapaszt felé) azonban a tű tölcsérszerűen kiszélesedik, itt



1. ábra. Az orvosi tapaszt a tűkkel a bőrre helyezés előtt (balra), illetve a tapaszton lévő tűsor részlete kinagyítva (jobbra). A tű méretei: hossza 600 μm , szélessége a tapasztnál 150 μm , a hegyénél 10 μm (Yu J et al.² alapján, módosítva)

az átmérő 150 μm , a tű hossza mintegy 600 μm (1. ábra). A tű falának anyaga egy szilikon öntőformában kialakított, metilén-bisz-akrilamiddal kezelt („keményített”) hialuronsav váz. A fal szilárdságát és stabilitását még UV-besugárzással (keresztbekötések kialakításával) is fokozzák. A tűket egy orvosi tapaszt alsó (a bőr felé néző) felületéhez erősítik, ahol 6×6 mm-es felületre 11×11 darab tű jut. A vizsgálatok szerint a tűk hegye és fala megfelelően stabil volt a bőr penetrációjához.

Minden egyes tűbe beviszik a hialuronsav-2-nitro-imidazol falú hólyagszákat, amelyekben humán rekombináns inzulin és glukóoxidáz enzim van vizes oldatban. Centrifugálással a hólyagszákat a tű hegyébe juttatják. A tű végébe került, inzulin-tartalmú hólyagcsák átmérője 118 nanométer. A 2-nitro-imidazol fal erősen hidrofób – ezért képes szilárd falat képezni a vizes oldatban lévő „inzulin + glukóoxidáz” körül. Ugyanakkor a 2-nitro-imidazol erősen hipoxiaszenzitív is. Előzetes *in vitro* vizsgálatokban a hólyagszak 4 °C-on tartva 1 hónapon át stabilnak bizonyultak.

Amikor a környezet glukózkonzentrációja emelkedik, és a glukóz a tű hegyén át a tűbe jutva érintkezésbe jut a hólyagszákkal, akkor a glukóoxidáz enzim aktiválódik, és oxidálja a glukózt: oxigén és víz felvételével glukonsav és H_2O_2 keletkezik az alábbi képlet szerint:



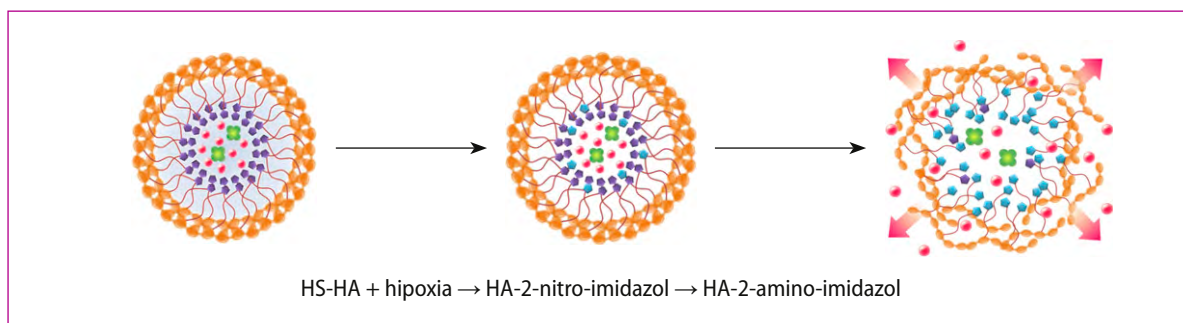
Az oxigén felhasználása miatt hipoxia alakul ki a hólyagszakban, s ennek hatására a hólyagszak fa-

lában lévő 2-nitro-imidazol átalakul 2-amino-imidazollá, és ezzel az addig hidrofób tulajdonságú fal hidrofíllé válik, stabilitása a vizes közegben megszűnik, a hólyagszak fala disszociál. A hólyagszak így szétesik, és a benne lévő inzulin kiáramlik a szövetekbe (2. ábra).

A GRV működése *in vitro*

Az inzulin szekréciójának vizsgálatára a leírt módon előállított, inzulinnal kitöltött hólyagszakat glukózmentes foszfátpufferban, illetve 5,5 mmol/l és 22,2 mmol/l (100 mg/dl és 400 mg/dl) glukózkonzentrációjú oldatban inkubálták. Az inkubáló-folyadék inzulinkonzentrációját eleinte óránként, később ritkábban mérték, összesen 24 órán át. A foszfátpuffer alig váltott ki inzulinkirárlást, az 5,5 mmol-os oldat mellett (azaz a kb. „normálisnak” tekinthető glukózsint mellett) ennél határozottan magasabb inzulinszinteket nyertek. A 22,2 mmol-os (tehát kifejezetten magas) glukózkonzentráció jelentősen tovább emelte a mért inzulinértékeket (gyakorlatilag minden mért időpontban szignifikánsan magasabb volt a kumulatív inzulinkonzentráció [$p < 0,05$]). A hólyagszak tehát glukózdependens módon és mennyiségben enged kiáramlani az inzulint (ezért az elnevezés: glukózeszponzív vezikula, GRV).

Az inzulinszekréciót nem befolyásolta a pH, de kifejezetten befolyásolta mind a glukózkonzentráció, mind a GRV-be bevitt glukóoxidáz mennyi-



2. ábra. Glukózeszponzív hólyagszak keresztmetszeti képe. Bal oldalon: ép hólyagszak, hidrofób fallal (sárga: hialuronsav, sötétzöld: 2-nitro-imidazol, piros: inzulin, zöld: glukóoxidáz); középen: a hólyagszak átalakulása a hipoxia hatására: megjelenik a 2-amino-imidazol (világoszölddel jelölve); jobb oldalon: a hipoxia hatására a hólyagszak fala disszociál és az inzulin kiáramlik a hólyagszakból a környezetbe (Yu J et al.² alapján, módosítva)

sége. A szerzők megvizsgálták, hogy a GRV működését mennyiben módosítja, ha a GO_x -nek csak a fél adagját viszik be a hólyagcsákba, s azt találták, hogy az elválasztott inzulin így szignifikánsan kevesebb volt. Az elválasztott inzulin mennyisége tehát a hólyagcsákba vitt GO_x mennyiségével is módosítható.

A GRV működése in vivo körülmények között (experimentális adatok)

A GRV működését tanulmányozták kísérleti állatokban is. Egerekben kis dózisu streptozotocin ismételt adásával az 1-es típusú diabetesnek megfelelő cukorbetegséget idéztek elő, majd az állatok borotvált hátára GRV-tapaszt helyeztek fel. A „tűk” helyzetét utólag (az állatok leölése után történt boncolás során) ellenőrizték, azok minden esetben a bőr alatti zsírszövetbe értek. A GRV-k egy részét teljes, másik csoportját fél adag glukóz-oxidáz enzimmel töltötték fel, és voltak csak inzulin tartalmazó (enzim nélküli) GRV-k is.

A diabeteses állatok kiindulási vércukorszintje átlagosan 33,3 mmol/l volt. A tapasz felhelyezése után ez a szint szignifikáns mértékben csökkent ($p < 0,05$), átlagosan 10,0 mmol/l körüli értékre. Ez a jelentős mértékű előnyös változás (több mint 20,0 mmol/l nagyságrendű cukorszintcsökkenés) azokra az esetekre vonatkozott, ahol 1 egységnyi GO_x -t tartalmaztak a hólyagcsák. Ezután lassan, fokozatosan újra emelkedett a vércukorszint, de csak kb. 10 óra múlva érte el a kiindulási szintet. Fél egységnyi GO_x szignifikánsan kisebb mértékben csökkentette a vércukorszintet, mint az 1 egységnyi GO_x -tartalmú hólyagcsák. Az enzim nélküli, csak inzulin tartalmazó hólyagcsák bevitel nem befolyásolta a vércukorszintet.

Az inzulingörbék a fentieknek megfelelően alakultak: az egységnyi GO_x bevitel után az inzulinszint meredeken emelkedett, egészen kb. 1100 $\mu E/ml$ szintig (!), majd lassan csökkent, de még 10 óra elteltével is a kiindulási szint felett volt. A fél egységnyi enzimet kapók csoportjában szignifikánsan kisebb mértékű volt az inzulinszint emelkedése, maximum kb. 400 $\mu E/ml$.

Egy másik kísérletsorozatban az állatok egy részén 1 órával a tapasz felhelyezése után intraperitoneális glukózterhelést végeztek. Azokon a dia-

beteses állatokon, amelyek 1 egységnyi GO_x -et kaptak, a cukorterhelés csak enyhe cukorszint-emelkedést váltott ki, viszonylag gyors (az ip. glukózinjekció beadása után már kb. 30 perccel induló) vércukorszint-csökkenéssel – a görbe lefutása hasonlított az egészséges állatokon végzett ip. glukózterhelés vércukorgörbéjéhez.

Egy harmadik kísérletsorozatban azt is vizsgálták, hogy a diabeteses egereken a GRV ismételt beültetése képes-e tartósan stabilizálni az állatok vércukorszintjét. Az 1 egységnyi GO_x -töltetű vezikulákkal (inzulin 5 mg/tskg) kezelt diabeteses állatok vércukorszintje 11,0 mmol körüli értékre csökkent, és ez a szint kb. 3 órán át stabilnak bizonyult. Egy második tapasz felhelyezése tovább hosszabbította ezt az állapotot, de nem okozott hypoglykaemiát. Ezzel szemben azonos mennyiségű (5 mg/tskg) inzulin ismételt adása hypoglykaemiához vezetett.

Biokompatibilitási vizsgálatok

A GRV fala nagyrészt hialuronsavból áll. A szervezetben a hialuronsav több szövetben is előfordul, tehát a HA nem szövetidegen anyag. A GRV anyagát számos toxicitási vizsgálatnak vetették alá, és a különböző koncentrációk semmiféle toxikus reakciót nem váltottak ki.

A GRV (és a benne lévő inzulin + glukóz-oxidáz) a tapasz felhelyezését követően nem okozott a környezetben gyulladást, nem váltott ki semmiféle immunológiai vagy egyéb adverz reakciót.²

A módszer (potenciális) előnyei

Az inzulináramlás mennyisége és sebessége ebben a hipoxia vezérelte rendszerben felülmúlta a hasonló glukózszenzitív rendszereket, amelyek pl. a pH változásával próbálták felszabadítani a lekötött inzulint. Ez különösen vonatkozik az *in vivo* körülményekre, ahol a pH változását szinte azonnal pufferolja az élő környezet. Az inzulin koncentrációjának gyors adaptív változása nem csak azt biztosítja, hogy a postprandialis cukorszint-emelkedés ne legyen eltúlzott, hanem egyúttal a hypoglykaemia veszélyét is minimálisra csökkenti.

Egy másik előny, hogy az inzulin felszabadulásának kinetikáját befolyásolni lehet a GO_x enzim mennyiségének változtatásával. További előnyt jelent, hogy mind a „tű”, mind a vezikulák falának anyaga hialuronsav-alapú, amely kifejezetten biokompatibilis anyag. A kezelési rendszer kifejlesztése korunk nanotechnikájának egyik gyönyörű példája.^{3,4}

A szerzők a potenciális előnyök közül kiemelik még, hogy mind a hypo-, mind a hyperglykaemia gyakorisága jelentősen csökkenhet (a súlyos hypoglykaemia előfordulásának valószínűsége gyakorlatilag nulla), s ennek következtében a glukózvariabilitás szintén minimalizálódik, és a vércukorszint monitorozása szükségtelenné válhat. A glukózszint gyakori napszakos önellenőrzését felválthatja a napi 1-2-szeri vércukorszint-meghatározás. Mindez elsősorban az 1-es típusú diabeteses, de inzulinnal kezelt 2-es típusú cukorbeteg terápiajában is óriási előnyt jelentene mind a szénhidrát-anyagszere stabilizálása, mind a napi életvitel szempontjából.

A felsorolt előnyök természetesen még csak az experimentális eredmények alapján feltételezettek, megerősítésükhöz klinikai vizsgálatok pozitív eredményei szükségesek.

Irodalom

1. Gerő L: Langerhans-sziget transzplantáció, mesterséges β -sejt-transzplantáció 1-es típusú diabetesben. Magyar Tudomány 2015; 176: 864-875.
2. Yu J, Zhang Y, Ye Y, DiSanto R, Sun W, Ranson D, et al.: Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery. Proc Natl Acad Sci 2015; 112: 8260-8265. doi:10.1073/pnas.1505405112
3. Weishe O, Langer R: Diabetes: a smart insulin patch. Nature 2015; 524: 39-40. doi:10.1038/524039a
4. Welseh O, Tang BC, Whitehead KA, Anderson DG, Langer R: Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities. Nature Rev Drug Discov 2015; 14: 45-54. doi:10.1038/nrd4477

Közlésre érkezett: 2017. május 8.

Közlésre elfogadva: 2017. május 18.

A szerző levelezési címe

Dr. Gerő László

Semmelweis Egyetem, ÁOK, I. sz. Belklinika

1083 Budapest, Korányi S. u. 2/a

E-mail: gero@bel1.sote.hu