

УДК 541.64:547.455.623

ГЛЮКОЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ СИСТЕМЫ¹

© 2011 г. И. Л. Валуев, Л. В. Ванчугова, Л. И. Валуев

Учреждение Российской академии наук

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

119991 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 23.11.2010 г.

Принята в печать 30.12.2010 г.

Изучено влияние конканавалина А на структуру полимерных гидрогелей, получаемых реакцией радикальной сополимеризации акриламида, N-(2-D-глюкоз)акриламида и N,N'-метилена-бис-акриламида. Показано, что конканавалин А в составе его комплекса с N-(2-D-глюкоз)акриламидом вступает в реакцию сополимеризации, выполняя роль макромолекулярного сшивающего агента. Это обеспечивает уменьшение степени набухания гидрогелей в водных растворах с увеличением концентрации конканавалина А в исходной мономерной смеси. При введении глюкозы в водный раствор разрушается комплекс конканавалина А со звеньями N-(2-D-глюкоз)акриламида вшитом сополимере и существенно увеличивается степень набухания гидрогелей. Разрушение комплекса происходит при строго определенной концентрации глюкозы в растворе, зависящей от содержания звеньев N-(2-D-глюкоз)акриламида в сополимере. Это явление может быть использовано для контролируемого выделения в раствор предварительно введенного в гидрогель инсулина путем изменения концентрации глюкозы в растворе.

Современный уровень развития науки и техники ставит ряд задач по созданию нового поколения полимерных веществ и материалов. В настоящее время недостаточно придать полимерам те или иные химические или физико-механические свойства, во многих случаях требуется создавать полимеры, направленно изменяющие свои свойства в процессе эксплуатации. К таким полимерам, получившим название “умные”, относятся материалы, способные изменять свои свойства по механизму обратной связи в ответ на изменение определенных параметров окружающей среды. Применение таких материалов в медицине открывает большие возможности в плане создания устройств, способных моделировать отдельные функции некоторых органов и тканей живого организма, т.е. активно функционировать в такой сложной многокомпонентной среде, как живой организм. Активное функционирование подразумевает способность воспринимать информацию, поступающую извне, и изменять свои свойства в соответствии с ней.

Одной из наиболее перспективных областей применения этих материалов является создание систем для контролируемого выделения биологически активных веществ из специально создан-

ных депо по мере возникновения в них потребности. Примером таких систем могут служить глюкозочувствительные полимеры, способные в некоторой степени моделировать одну из функций поджелудочной железы, а именно, выделять инсулин (гормон белковой природы с $M \sim 6 \times 10^3$, отвечающий за утилизацию глюкозы в живом организме) в ответ на повышение концентрации глюкозы в окружающей среде.

Впервые принцип создания подобных систем был сформулирован в 1979 г. [1] и в дальнейшем был развит в работах [2–5]. Он был основан на использовании лектинов – белков, способных избирательно и обратимо связывать углеводы. В полимерную мембрану, проницаемую для глюкозы и инсулина, но не проницаемую для лектинов, помещали комплекс лектина, в качестве которого наиболее часто использовали имеющий четыре места связывания глюкозы конканавалин А (Кон А), и специально синтезированного сахарсодержащего производного инсулина. При появлении глюкозы в окружающей среде она проникала через мембрану и вытесняла производное инсулина из его комплекса с лектином. Широкого распространения такие системы не нашли, и основная причина заключалась в снижении биологической активности инсулина в процессе его модификации сахарами, а также в том, что выделение производных инсулина происходило при любых, в том числе и физиологически приемлемых, концентрациях глюкозы в растворе [6–8].

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 10-03-00029) и Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

E-mail: ivaluev@ips.ac.ru (Валуев Иван Львович).

Большие надежды возлагали на глюкозочувствительные полимеры — мембраны, проницаемость которых изменялась бы в зависимости от концентрации глюкозы [9–11], или полимерные гидрогели, степень набухания которых зависела бы от наличия глюкозы [12, 13]. Однако и в этом случае не удавалось создать системы, выделяющие строго определенное количество инсулина при заданных концентрациях глюкозы.

Преодолеть данный недостаток нам удалось при использовании гидрогелей на основе сополимеров акриламида с N-(2-D-глюкоз)акриламидом (ГАА), сшитых Кон А. Выделение предварительно введенного в гидрогель инсулина происходило при строго определенной концентрации глюкозы в окружающей среде, значение которой можно было регулировать изменением количества остатков ненасыщенного производного глюкозы в сополимере [14]. Однако и эта система не была лишена недостатков, главным из которых было полное разрушение гидрогелей в растворе глюкозы с выделением в окружающую среду не только активного гормона, но и Кон А, а также водорастворимого сополимера акриламида с ГАА.

Целью настоящей работы является создание глюкозочувствительных гидрогелей, способных выделять содержащийся в их объеме инсулин в ответ на строго определенное повышение концентрации глюкозы в окружающей среде без выделения всех составляющих гидрогель компонентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Акриламид, N,N-метилен-бис-акриламид (БИС), Кон А, глюкозу и инсулин фирмы “Sigma-Aldrich” (США) использовали без дополнительной очистки.

ГАА синтезировали реакцией D-(+)-глюкозоамина с хлорангидридом акриловой кислоты [15].

Гидрогели получали сополимеризацией акриламида, ГАА (либо макромолекулярного комплекса Кон А–ГАА) и БИС в водном растворе, используя в качестве инициатора окислительно-восстановительную систему N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин–персульфат аммония.

Степень набухания гидрогелей S_r находили по формуле

$$S_r = (m_n - m_c) / m_c,$$

где m_n и m_c — масса равновесно набухшего гидрогеля и высушенного до постоянной массы.

Концентрацию белков (инсулина или Кон А) в растворе определяли методом УФ-спектроскопии на приборе “Hitachi-3400” (Япония) при длине волны 280 нм. Предварительно была построена калибровочная зависимость оптической плотности раствора от концентрации белка.

Концентрацию глюкозы в растворе находили при помощи фенолсерной кислоты [16].

Электронно-микроскопические исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе “Jeol” (Япония). Лиофильно высушенные образцы препарировали по методике [17].

Биологическую активность инсулина оценивали путем измерения концентрации глюкозы в крови кроликов или крыс после инъекционного введения раствора инсулина в количестве 0.2 мг/кг массы кролика или 0.6 мг/кг массы крысы. Концентрацию глюкозы определяли с использованием глюкометра “Johnson&Johnson”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация поставленной в работе задачи — предотвращение выделения растворимых компонентов глюкозочувствительной системы — достигалась использованием в качестве глюкозосодержащего компонента гидрогелей на основе сополимеров акриламида с ГАА, сшитых БИС. При изучении зависимости степени набухания гидрогелей от их состава было обнаружено, что введение в состав сополимеров до 10 мол. % ГАА практически не влияет на этот параметр; а зависимость степени набухания от исходной концентрации мономеров и сшивающего агента соответствует аналогичной зависимости для гидрогелей на основе акриламида: увеличение исходной концентрации мономеров и/или сшивающего агента приводит к уменьшению равновесной степени набухания [18]. Сополимеризация всех компонентов системы протекала практически на 100% (масса сополимера соответствовала массе исходных веществ), и, следовательно, состав сшитого сополимера мало отличался от состава исходной мономерной смеси. Согласно значениям констант сополимеризации акриламида (M_1) и ГАА (M_2) $r_1 = 1.12 \pm 0.11$ и $r_2 = 0.024 \pm 0.012$ [14], при невысоком содержании ГАА сшитые полимерные цепи состоят из длинных полиакриламидных последовательностей с единичными вкраплениями звеньев ГАА.

Известно [19], что иммобилизация белков в объеме полимерного гидрогеля на стадии его получения путем сополимеризации с гидрофильным мономером и сшивающим агентом сопровождается повышением пористости и, как следствие, ростом степени набухания. Эта закономерность наблюдалась и для гидрогелей, полученных сополимеризацией акриламида и БИС в присутствии Кон А, но в отсутствие ГАА. Однако при сополимеризации акриламида с БИС и ГАА, напротив, добавление Кон А приводило к существенному уменьшению степени набухания синтезируемых гидрогелей (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость степени набухания гидрогелей на основе сополимеров акриламида, ГАА и БИС, полученных в присутствии 0.1 мас. % Кон А, от их состава

Состав исходной мономерной смеси, г/100 г раствора			Степень набухания*, г воды/г сухого геля		Пороговая концентрация глюкозы**, мг/100 мл
акриламид	ГАА	БИС	в воде	в 1%-ном растворе глюкозы	
1.0	0	0.005	44.3	44.9***	—
		0.01	40.1	40.5***	—
		0.02	33.6	33.3	—
0.95	0.05	0.005	27.5	46.3***	93
		0.01	21.0	41.8***	96
		0.02	15.3	33.9	90
0.9	0.1	0.005	27.2	46.0***	176
		0.01	21.4	40.1***	168
		0.02	14.8	32.7	166
3.0	0	0.015	31.5	31.4	—
		0.03	27.7	27.3	—
		0.06	20.1	20.5	—
2.85	0.15	0.015	18.6	33.1	97
		0.03	13.7	28.2	92
		0.06	9.2	20.0	95
2.7	0.3	0.015	18.9	32.2	182
		0.03	14.0	27.4	177
		0.06	9.7	20.7	172
5.0	0	0.025	15.3	15.0	—
		0.05	10.0	9.9	—
		0.1	6.1	6.4	—
4.75	0.25	0.025	9.6	15.3	96
		0.05	7.2	10.2	90
		0.1	4.0	6.6	91
4.5	0.5	0.025	9.8	15.0	175
		0.05	7.0	9.7	170
		0.1	3.8	6.3	168

* Точность определения $\pm 2\%$ и ** 3% .

*** При добавлении глюкозы Кон А выделялся в раствор.

Природа данного явления очевидна и заключается в способности лектинов избирательно связывать углеводы. При добавлении в реакционную смесь Кон А образуются комплексы Кон А–ГАА, содержащие до четырех молекул ГАА (константа связывания Кон А с ГАА равна 1.1×10^2 л/моль), которые впоследствии и вступают в реакцию радикальной сополимеризации, выполняя роль макромолекулярного сшивающего агента [14]. При этом из-за большой разницы в молекулярных массах Кон А и ГАА (почти на три порядка) система практически всегда содержит чрезвычайно высокий мольный избыток ГАА по сравнению

с Кон А, т.е. в исходной смеси сосуществуют свободный ГАА и комплекс Кон А с четырьмя молекулами ГАА. В результате сополимеризации образуется гидрогель, в котором часть сшивков имеют ковалентную природу (сшивание при помощи БИС), а часть сшивков образована за счет специфического взаимодействия Кон А–звено ГАА. Количество сшивков второго типа практически не зависело от содержания звеньев ГАА в сополимере (табл. 1), а являлось функцией количества Кон А в исходной реакционной смеси (рис. 1).

Электронно-микроскопические исследования лиофилизированных образцов гидрогелей показали, что участие макросшивающего агента в про-

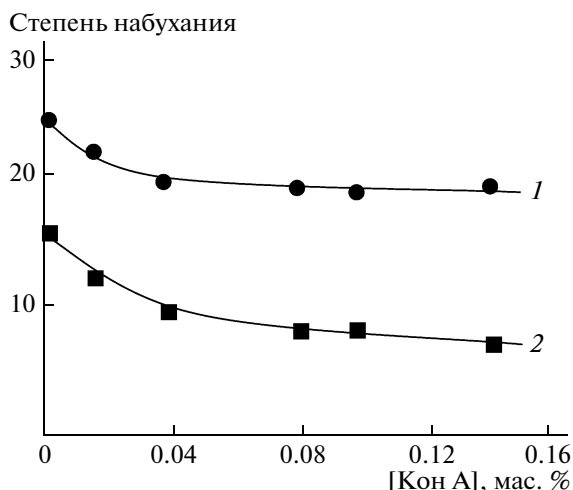


Рис. 1. Зависимость степени набухания глюкозосодержащих гидрогелей от концентрации Кон А. Исходная концентрация акриламида 2.7 мас. %, ГАА – 0.3 мас. %; концентрация БИС 0.015 (1) и 0.06% (2).

цессе синтеза приводит к формированию более однородной пористой структуры, в которой макропоры оформлены более четко. Так, если ковалентно-сшитый гидрогель, полученный при исходном содержании акриламида 4.75 мас. %, ГАА – 0.25 мас. % и БИС – 0.05 мас. %, характеризуется средним размером пор 4.9 мкм (среднеквадратичное отклонение 2.7 мкм), то гидрогель аналогичного состава, но синтезированный в присутствии 0.1 мас. % Кон А, имеет средний размер пор 4.0 мкм (среднеквадратичное отклонение 1.1 мкм). Эти данные хорошо коррелируют с результатами исследования структуры полиакриламидных гидрогелей, содержащих ненасыщенные производные альбумина [19].

При изучении взаимодействия синтезированных гидрогелей с растворами глюкозы было установлено, что, как и следовало ожидать, для гелей, образованных только при помощи ковалентных сшивок (гидрогелей, полученных в отсутствие Кон А, а также гидрогелей, не содержащих углеводных остатков), добавление глюкозы не приводило к изменению их степени набухания.

Для гидрогелей, которые наряду с ковалентными содержали еще и сшивки, образованные за счет специфического взаимодействия Кон А с звеньями ГАА, добавление в раствор 1% глюкозы резко увеличивало значение равновесной степени набухания (табл. 1). Это означает, что появившаяся в окружающей среде глюкоза диффундировала в объем гидрогеля и вытесняла звенья ГАА из их комплекса с лектином. При этом уменьшалось количество межцепных сшивок, что и вызывало значительное увеличение степени набухания, которая стремилась к значениям, характерным для гидрогелей акриламид–БИС,

полученным в присутствии Кон А, но в отсутствие ГАА.

Необходимо отметить, что после разрушения специфических сшивок Кон А оказывался физически иммобилизованным в объеме гидрогеля и при достаточно высоком содержании ковалентных сшивок из гидрогеля не вымывался. При разрушении комплекса глюкоза–Кон А промыванием гидрогеля дистиллированной водой глюкоза удалялась из системы, что приводило к восстановлению специфических сшивок и, как следствие, к уменьшению степени набухания гидрогелей.

При изучении зависимости степени набухания от концентрации глюкозы было установлено, что разрушение комплекса ГАА–Кон А в каждом конкретном случае происходит по принципу “все или ничего”, т.е. только при достижении концентрации глюкозы строго определенного (порогового) значения, которое зависит только от содержания ГАА в сополимере (табл. 1). Такой же эффект наблюдался ранее для продуктов взаимодействия Кон А с водорастворимыми сополимерами ГАА и акриламида и был обусловлен кооперативным эффектом, возникающим при взаимодействии полифункциональных молекул Кон А и сополимера акриламида и ГАА [14].

При использовании синтезированных гидрогелей в качестве матрицы для контролируемого выделения инсулина они были насыщены раствором гормона (концентрация инсулина составляла 1.5 мг/мл) на стадии их получения. Было установлено, что диффузия инсулина в гидрогелях со степенью набухания ниже 18 сильно затруднена, и введенный в его объем гормон практически не вымывался в окружающую среду. При появлении в окружающей среде глюкозы в концентрациях ниже пороговой для гидрогелей определенного состава никаких изменений в системе не происходило. При превышении предельного значения концентрации глюкозы наблюдалось достаточно быстрое (для изученных систем в течение 20–30 мин) увеличение степени набухания, что обеспечивало выделение гормона в окружающей среде.

Заключительным этапом работы был поиск ответа на вопрос: сохраняет ли выделяющийся инсулин биологическую активность? С этой целью исходный и выделившийся инсулин инъекционно вводили двум видам животных (кроликам и крысам) и определяли уровень глюкозы в крови в течение 120 мин (табл. 2). Видно, что гипогликемические эффекты, достигаемые при введении животным исходного и выделившегося из гидрогеля инсулина, практически не различимы, что свидетельствует об отсутствии нежелательных изменений структуры инсулина в процессе его прохождения через стадии образования гидрогеля и его разрушения.

Таблица 2. Зависимость концентрации глюкозы в крови от времени после подкожного введения инсулина (0.2 или 0.6 мг на кг массы кролика или крысы соответственно)

Животное	Препарат	Концентрация глюкозы в крови* (мг/100 мл) через определенное время, мин					
		0	15	30	60	90	120
Кролики	Исходный	124	96	65	60	44	42
	Выделившийся	116	102	58	56	40	40
Крысы	Исходный	145	126	84	62	51	56
	Выделившийся	132	112	78	56	50	50

Примечание. Приведены средние значения для трех опытов на животных.

* Точность определения $\pm 5\%$.

Таким образом, гидрогели, образованные за счет сшивания полимерных цепей по двум различным механизмам (ковалентному и за счет специфического взаимодействия лектин–углевод), представляют собой глюкозочувствительные системы, моделирующие одну из функций поджелудочной железы, т.е. системы, способные выделять инсулин при строго определенной концентрации глюкозы в окружающей среде. Наличие ковалентных сшивок предотвращает при этом выделение в раствор иных побочных веществ.

Авторы выражают искреннюю благодарность Л.К. Старосельцевой за организацию и помощь в проведении экспериментов на животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brownlee M., Cerami A.* // Science. 1979. V. 206. № 10. P. 1190.
2. *Ravaine V., Ancla C., Catarqi B.* // J. Control. Release. 2008. V. 132. № 11. P. 2.
3. *Yeong S.Y., Kim S.W., Holmberg D.L., McRea Y.C.* // J. Control. Release. 1985. V. 1. № 2. P. 143.
4. *Kim S.W., Pai C.M., Makino K., Semionoff L.A., Holmberg D.L., Gleeson Y.M., Wilson D.E., Mack E.Y.* // J. Control. Release. 1990. V. 11. № 2. P. 193.
5. *Makino K., Mack E.Y., Okano T., Kim S.W.* // J. Control. Release. 1990. V. 12. № 3. P. 235.
6. *Sato S., Yeong S.Y., McRea Y.C., Kim S.W.* // J. Control. Release. 1984. V. 1. № 1. P. 67.
7. *Taylor M.J., Tanna S., Sahota T.* // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. № 10. P. 4215.
8. *Валуев Л.И., Валуев И.Л., Сытов Г.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 4. С. 371.
9. *Albin G., Horbett T.A., Ratner B.D.* // J. Control. Release. 1985. V. 2. № 2. P. 153.
10. *Chaudhary A., Raina M., Harma H., Hanninen P., McShane M.J., Srivastava R.* // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 104. № 6. P. 1075.
11. *Qi W., Yan X., Fei J., Wang A., Cui Y., Li J.* // Biomaterials. 2009. V. 30. № 14. P. 2799.
12. *Taylor M.J., Tanna S., Sahota T.S., Voermans B.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2006. V. 62. № 1. P. 94.
13. *Kashyap N., Viswanad B., Sharma G., Bhardwaj V., Ramarao P., Ravi Kumar M.N.* // Biomaterials. 2007. V. 28. № 11. P. 2051.
14. *Валуев И.Л., Чупов В.В., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А.* // Высокомолек. соед. Б. 1997. Т. 39. № 4. С. 751.
15. *Iyakura Y., Imai Y., Vagu Y.* // J. Polym. Sci. A-1. 1968. V. 6. № 6. P. 1625.
16. *Dudois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.* // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350.
17. *Платэ Н.А., Вакула А.В., Валуев Л.И., Волков А.В.* // Высокомолек. соед. Б. 1981. Т. 23. № 3. С. 190.
18. *White M.S., Dorion J.H.* // J. Polym. Sci. 1961. V. 55. № 3. P. 731.
19. *Синани В.А., Валуев Л.И., Чупов В.В., Платэ Н.А.* // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2088.