

УДК 541.64.536.7:547.39

ФАЗООБРАТИМЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ АКРИЛАМИДА И N-(2-Д-ГЛЮКОЗ)АКРИЛАМИДА¹

© 1997 г. И. Л. Валуев, В. В. Чупов, Г. А. Сытов, Л. И. Валуев, Н. А. Платэ

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиеva Российской академии наук
117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 12.09.96 г.

Принята в печать 27.11.96 г.

Синтезированы сopolимеры акриламида и N-(2-Д-глюкоз)акриламида. Показано, что при взаимодействии этих сopolимеров с конканавалином А образуются гидрогели, степень набухания которых определяется мольным соотношением звеньев N-(2-Д-глюкоз)акриламида и конканавалина А. При изучении взаимодействия гидрогелей с растворами глюкозы обнаружено, что существует пороговая концентрация глюкозы, выше которой происходит быстрый переход гидрогеля в растворимое состояние.

Одной из актуальных проблем современной химии медико-биологических полимеров является создание макромолекулярных терапевтических систем, которые способны выделять заключенные в них физиологически активные вещества по механизму обратной связи в ответ на изменение значения pH окружающей среды, ее температуры или химического состава. Пример такой системы – так называемые глюкозочувствительные полимеры, способные выделять предварительно введененный в них инсулин в ответ на повышение концентрации глюкозы в окружающей среде, т.е. в некоторой степени моделирующие действия поджелудочной железы.

Впервые сформулированный в 1979 г. принцип создания подобных систем был основан на использовании лектинов – белков, способных избирательно и обратимо связывать углеводы [1]. В полимерную мембрану, проницаемую для инсулина и глюкозы, но не проницаемую для лектина, помещали комплекс лектина и предварительно синтезированного производного инсулина и мальтозы. Обычно использовали такой лектин как конканавалин А (Кон А) – белок с $M = 102000$, имеющий четыре центра связывания углеводов. При появлении глюкозы в окружающей среде она проникает через мембрану и вытесняет производное инсулина из его комплекса.

В дальнейшем были синтезированы производные инсулина с другими углеводами, а вместо раствора Кон А было предложено использовать белок, спитый карбодиимицидом или иммобилизован-

ный на гранулах сефарозы [2–4]. Следует отметить, что применение углеводных производных инсулина определяет основной недостаток всех этих систем – выделение инсулина происходило практически при любых, даже гипогликемических концентрациях глюкозы [5, 6]. В связи с этим возникает задача создания принципиально новых полимерных систем, способных выделять инсулин только при концентрации глюкозы выше терапевтически допустимой (около 150 мг/100 мл).

Цель настоящей работы – изучение возможности создания таких систем на примере сopolимера акриламида и N-(2-Д-глюкоз)акриламида (ГАА).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГАА синтезировали реакцией D-(+)-глюкозамина с хлорангидридом акриловой кислоты [7].

Сopolимеры акриламида ("Serva", США) и ГАА получали радикальной сополимеризацией мономеров в водных растворах. В качестве инициатора использовали окислительно-восстановительную систему персульфат аммония – тетраметилэтилендиамин, содержащую эквивалентное количество компонентов.

Состав сopolимера определяли с помощью элементного анализа по содержанию азота на приборе "Perkin-Elmer".

Константу связывания глюкозы и ГАА с активным центром Кон А рассчитывали по формуле [8]

$$K_{ca} = (C_0 - C) / [4C(C'_0 - C)],$$

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 96-03-32045).

Таблица 1. Зависимость состава сополимера акриламида и N-(2-Д-глюкоз)акриламида от состава исходной мономерной смеси

Состав исходной мономерной смеси, мол. %		Состав сополимера, мол. %	
акриламид	ГАА	акриламид	ГАА
95	5	96.08	3.92
90	10	92.39	7.61
80	20	85.55	14.45
70	30	79.43	20.57
50	50	67.43	32.57
25	75	56.90	43.10

Таблица 2. Зависимость степени набухания гидрогелей в воде от мольного соотношения ГАА : Кон А (содержание звеньев ГАА в сополимере 10.14%)

Мольное соотношение ГАА : Кон А	Степень набухания, г/г
8 : 1	29.7
7 : 1	25.4
6 : 1	22.1
5 : 1	19.3
4 : 1	15.6
3 : 1	15.9
2 : 1	15.2
1 : 1	15.5

Таблица 3. Зависимость степени набухания гидрогелей в воде от содержания звеньев ГАА в сополимере (мольное соотношение ГАА : Кон А = 4 : 1)

Содержание звеньев ГАА в сополимере, мол. %	Степень набухания, г/г
4.92	34.9
10.14	15.6
14.45	11.2

где C'_0 – начальная концентрация Кон А, C_0 и C – начальная и равновесная концентрация глюкозы или ГАА.

Равновесные концентрации глюкозы и ГАА определяли методом равновесного диализа. В ди-

ализный мешок, проницаемый для углеводов, ... непроницаемый для высокомолекулярного Кон А и его комплекса с углеводами, помещали раствор Кон А. Во внешний сосуд заливали раствор углевода. Отношение объема диализного мешка к объему внешнего сосуда составляло 10 : 1. Начальную и равновесную концентрации глюкозы и ГАА определяли при помощи фенолсерной кислоты [9].

Степень набухания гидрогелей вычисляли по формуле

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

где m_h – масса равновесно набухшего геля, m_c – масса сухого геля.

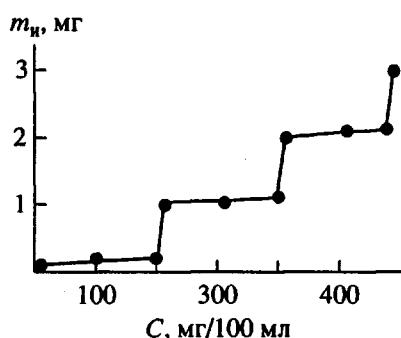
Концентрацию инсулина в растворе измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость состава сополимеров акриламида (M_1) и ГАА (M_2) от состава исходной мономерной смеси представлена в табл. 1. Видно, что во всех случаях сополимер обогащен звеньями акриламида. Константы сополимеризации r_1 и r_2 , рассчитанные по методике [10], оказались равными 1.12 ± 0.11 и 0.024 ± 0.012 . Это означает, что при невысоком содержании ГАА в исходной мономерной смеси цепи сополимеров включают достаточно длинные полиакриламидные блоки и единичные вкрапления звеньев ГАА. Такое распределение звеньев ГАА в сополимере является наиболее благоприятным для взаимодействия с Кон А, поскольку в этом случае должны исключаться стерические препятствия для реакции остатка глюкозы с одним из четырех активных центров Кон А.

При смешивании водных растворов синтезированных сополимеров и раствора Кон А практически мгновенно происходит образование гидрогелей. Для приготовления гидрогелей были использованы сополимеры с содержанием ГАА 5–15%. Концентрация сополимера составляла 10%, а мольное отношение ГАА (в сополимере) : Кон А варьировали от 8 : 1 до 1 : 1.

Зависимость степени набухания полученных гидрогелей от исходного соотношения ГАА : Кон А приведена в табл. 2. Видно, что с увеличением количества Кон А, выполняющего роль четырехфункционального сшивющего агента, степень набухания гидрогелей сначала уменьшается, а затем при мольном соотношении ГАА : Кон А = 4 : 1 перестает изменяться. Причина этого, вероятно, заключается в том, что при данном соотношении ГАА : Кон А происходит насыщение лектина остатками глюкозы и, следовательно, избыток Кон А



Зависимость количества выделившегося инсулина m_i от концентрации глюкозы C в окружающей среде.

не вступает в реакцию с сополимером. Таким образом, плотность сетки гидрогеля при мольных соотношениях ГАА : Кон А $\leq 4 : 1$ не зависит от концентрации Кон А, а определяется только лишь содержанием звеньев ГАА в сополимере (табл. 3).

При изучении взаимодействия полученных гидрогелей с растворами глюкозы различной концентрации обнаружено, что существует пороговая концентрация, ниже которой никаких видимых изменений с гидрогелем не происходит. При концентрациях глюкозы выше пороговой наблюдается быстрый переход гидрогеля в растворимое состояние. Это означает, что комплекс [Кон А-ГАА] распадается с образованием комплекса [Кон А-глюкоза] и водорастворимых макромолекул сополимера ГАА и акриламида. Чем выше содержание звеньев ГАА в сополимере, тем выше значение пороговой концентрации (табл. 4). Наличие пороговой концентрации, вероятно, обусловлено кооперативным эффектом, возникающим при взаимодействии двух полифункциональных макромолекул – Кон А и сополимера ГАА и акриламида. Следует отметить, что пороговая концентрация глюкозы оказалась даже несколько выше, чем можно было бы ожидать, исходя из значений констант связывания Кон А с

Таблица 4. Зависимость пороговой концентрации глюкозы от содержания звеньев ГАА в сополимере (мольное соотношение ГАА : Кон А = 4 : 1)

Содержание звеньев ГАА в сополимере, мол. %	Пороговая концентрация глюкозы, мг/100 мл
4.92	180
10.14	380
14.45	565

глюкозой и Кон А с ГАА, равных 3.7×10^3 и 1.1×10^2 л/моль соответственно.

При удалении глюкозы из раствора путем диглиза комплекс [Кон А-глюкоза] разрушается, что приводит к обратному переходу сополимера из раствора в гидрогель. Вновь образовавшийся гидрогель по своим водопоглотительным свойствам ничем не отличается от исходного и может быть использован повторно. Аналогичный эффект наблюдался в работе [11].

С точки зрения выделения требуемого количества инсулина при достижении определенной концентрации глюкозы интерес могут представлять смеси сополимеров с различным содержанием ГАА. Для проверки этого предположения был поставлен следующий эксперимент. В жесткий сосуд объемом 3 мл, имеющий отверстие диаметром 2 мм, помещали смесь предварительно насыщенных раствором инсулина гидрогелей на основе сополимеров различного состава. Были использованы сополимеры с содержанием ГАА 4.92, 10.14 и 14.45 моль %. Количество гидрогеля каждого типа составляло 1 мл; в каждый гидрогель было введено 1.3 мг инсулина. Затем сосуд помещали в стакан с 10 мл буферного раствора pH 3.5. Диффузия инсулина из сосуда в отсутствие глюкозы не превышала 15 мкг за 10 ч. При добавлении к буферному раствору глюкозы она диффундирует в сосуд с гидрогелями, и при концентрациях глюкозы выше пороговых для каждого типа гидрогеля происходит переход геля в раствор с выделением содержащегося в нем инсулина. Динамика выделения инсулина представлена на рисунке. Видно, что чем больше концентрация глюкозы в окружающей среде, тем большее количество инсулина выделяется из системы.

Таким образом, полученные гидрогели представляют собой глюкозочувствительные системы, способные выделять содержащиеся в них вещества, например инсулин, при вполне определенной концентрации глюкозы в окружающей среде. Значение этой концентрации можно регулировать, изменения количество остатков ненасыщенного производного глюкозы в сополимере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brownlee M., Cerami A. // Science. 1979. V. 206. № 6. P. 1190.
2. Jeong S.Y., Kim S.W., Eenink M.J.D., Feijen J. // J. Controlled Release. 1984. V. 1. № 1. P. 57.
3. Jeong S.Y., Kim S.W., Holmberg D.L., McRea J.C. // J. Controlled Release. 1985. V. 2. № 2. P. 143.
4. Makino K., Mack E.J., Okano T., Kim S.W. // J. Controlled Release. 1990. V. 12. № 3. P. 235.
5. Brownlee M., Cerami A. // Diabetes. 1983. V. 32. P. 499.

6. Sato S., Jeong S.Y., McRea J.C., Kim S.W. // J. Controlled Release. 1984. V. 1. № 1. P. 67.
7. Ivakura Y., Imai Y., Vagu Y. // J. Polym. Sci. A-1. 1968. V. 6. № 6. P. 1625.
8. Платэ Н.А., Чупов В.В., Валуев Л.И., Бурдыгина И.А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 4. С. 1010.
9. Dudois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350.
10. Езрилев А.И., Брохина И.Л., Роскин Б.С. // Высокомолек. соед. Б. 1969. Т. 11. № 8. С. 1670.
11. Samuel J., Park L., Park K. // Polym. Prepr. 1994. V. 35. P. 391.

Phase-Reversible Hydrogels Based on Acrylamide-N-(2-D-Glucose)acrylamide Copolymers

I. L. Valuev, V. V. Chupov, G. A. Sytov, L. I. Valuev, and N. A. Platé

*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 29, Moscow, 117912 Russia*

Abstract—The copolymers of acrylamide with N-(2-D-glucose)acrylamide were synthesized. It was shown that the reaction of these copolymers with concanavalin A yields hydrogels, whose degree of swelling is controlled by the molar ratio between the units of N-(2-D-glucose)acrylamide and concanavalin A. For the reaction of the resulting hydrogels with a glucose solution, it was found that there exists a threshold concentration of glucose, above which the hydrogel transforms quickly into a soluble state.