

УДК 577.152.14.

ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ГЛЮКОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ

© 2013 г. И. Л. Валуев*, Л. И. Валуев*, Л. В. Ванчугова*, И. В. Обыденнова*, Т. А. Валужева**

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991, e-mail: valuev@ips.ac.ru

**Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, 119071

Поступила в редакцию 10.09.2012 г.

Изучена тромборезистентность глюкозочувствительных полимерных гидрогелей, моделирующих одну из функций поджелудочной железы, а именно способность выделять инсулин в ответ на появление глюкозы в окружающей среде. Гидрогели синтезировали сополимеризацией гидроксиэтилметакрилата с N-акрилоилглюкозамином в присутствии сшивающего агента с последующей обработкой конканавалином А. Показано, что введение в состав гидрогеля остатков глюкозы не приводило к существенному изменению количества адгезированных гидрогелем тромбоцитов и степени денатурации взаимодействующих с гидрогелем белков плазмы крови. Следствием чего была неизменность биологической активности инсулина после выделения из гидрогеля. Высказано предположение, что применение глюкозочувствительных гидрогелей позволит разработать новую стратегию лечения сахарного диабета.

DOI: 10.7868/S0555109913030161

Использование результатов фундаментальных исследований для решения конкретных задач по обеспечению максимально комфортных условий жизнедеятельности человека, особенно связанных с охраной его здоровья, является главной задачей любой прикладной науки. Одной из наиболее сложных таких задач является создание систем, способных моделировать отдельные функции органов живого организма, например выделять в окружающую среду по сигналу самого организма биологически активные вещества по мере возникновения в них потребности.

Примером таких систем служат глюкозочувствительные гидрогели, моделирующие одну из функций поджелудочной железы, а именно способность выделять инсулин (гормон белковой природы, отсутствие которого приводит к сахарному диабету) в ответ на появление глюкозы в окружающей среде [1–3]. Такие гидрогели представляют собой трехмерные сополимеры N-акрилоилглюкозамина (АГА), дополнительно сшитые между собой конканавалином А (Кон А) – белком, имеющим четыре места связывания глюкозы. При появлении глюкозы в окружающей среде она вытесняет остатки АГА из их комплекса с Кон А, что приводит к повышению степени набухания гидрогеля и выделению предварительно введенного в гидрогель инсулина. Выделение инсулина происходит при строго определенной концентрации глюкозы, значение которой можно регулировать изменением количества остатков ненасыщенного производного глюкозы в сополимере.

Практическое использование таких гидрогелей, естественно, подразумевает их длительное пребывание в контакте с кровью без иницирова-

ния ее свертывания, что обычно происходит при взаимодействии крови с любым чужеродным материалом.

Цель работы – изучение тромборезистентности полимерных гидрогелей, содержащих иммобилизованные в их объеме производные глюкозы.

МЕТОДИКА

Гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), сшивающий агент – тридекаэтиленгликольдиметакрилат (ТГМ-13), конканавалин А, глюкозу и инсулин фирмы “Sigma-Aldrich” (США) использовали без дополнительной очистки.

N-акрилоилглюкозамин (АГА) синтезировали реакцией D-(+)-глюкозамина с хлорангидридом акриловой кислоты [4].

Гидрогели в виде пленки толщиной 0.5 мм получали полимеризацией между двух стекол водного раствора, содержащего 55% ГЭМА, 1.5% ТГМ-13 и 0.3, 1.0 или 2.0% АГА, используя в качестве инициатора систему N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин–персульфат аммония. Полученные гидрогели затем инкубировали с 0.1%-ным раствором Кон А в течение 2 ч. В качестве контроля были использованы пленки, полученные в отсутствие АГА.

Оценку тромборезистентности проводили по общепринятым методикам, определяя количество адгезированных тромбоцитов и оценивая константу скорости активации системы комплекта как показателя степени денатурации белков в результате взаимодействия с полимером [5].

Таблица 1. Тромборезистентность глюкозосодержащих гидрогелей

Содержание АГА в гидрогеле, мас. %	Адгезия тромбоцитов, шт./100 мкм ² ± 0.3	k^* , $c^{-1} \text{ см}^{-2} \times 10^6 \pm 0.2$
0	2.1	3.3
0.3	2.3	2.7
1.0	1.8	2.4
2.0	2.0	1.9

* Константа скорости активации системы комплемента.

Для определения количества адгезированных тромбоцитов на поверхность гидрогеля наносили плазму, обогащенную тромбоцитами. Гидрогель и плазму инкубировали при 20°C в течение 10 мин. Образцы промывали 0.9%-ным раствором NaCl для удаления неадгезированных тромбоцитов и белков, а затем образцы обрабатывали 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в течение 1 ч и последовательно промывали водой, 20, 70, 90 и 100%-ным этанолом. Образцы высушивали и покрывали медью. На поверхности образца выбирали 20 площадок (28 × 28 мкм) и в каждой площадке определяли количество тромбоцитов с использованием метода сканирующей электронной микроскопии.

Для определения константы скорости активации системы комплемента свежую человеческую сыворотку инкубировали с гидрогелем при 37°C в течение 60 мин. Затем измеряли время полулизиса эритроцитов барана человеческой сывороткой до и после ее контакта с гидрогелем и рассчитывали константу скорости активации системы комплемента. В качестве контроля была использована поверхность гидратцеллюлозной мембраны Купрофан ($k = 1.8 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1} \text{ см}^{-2}$) [5].

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 "Johson & Johson" (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первой стадией взаимодействия крови с чужеродной поверхностью является адсорбция белков. Затем на поверхности материала происходит адгезия тромбоцитов и их агрегация с разрушением клеточной мембраны и выделением в окружающую среду внутреннего содержимого клеточных гранул, которое, в свою очередь, ускоряет адгезию этих форменных элементов. Коэффициент диффузии белков в плазме крови ($\sim 10^{-6} - 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$) значительно выше, чем коэффициент диффузии тромбо-

цитов ($\sim 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$), поэтому контакт клеток крови с поверхностью происходит, как правило, с участием адсорбированных молекул белка [5]. При этом в многочисленных экспериментах, в том числе на животных, было установлено, что определяющим для адгезии тромбоцитов является состав адсорбционного слоя белка (соотношение между количеством альбумина и фибриногена). Повышение концентрации альбумина на поверхности полимера в значительной степени предотвращает адгезию тромбоцитов, в то время как увеличение концентрации фибриногена в адсорбционном слое приводит к повышению количества адгезированных тромбоцитов [6, 7]. Предполагают, что этот эффект обусловлен биоспецифическим взаимодействием полисахаридного участка молекулы фибриногена с ферментом — гликозилтрансферазой, локализованной на мембране тромбоцита.

Подтверждением этого предположения является тот факт, что в природных кровеносных сосудах ингибиторы гликозилтрансферазы, например глюкозамин, взаимодействуя с этим ферментом и подавляя его активность, эффективно предотвращают адгезию тромбоцитов к стенкам поврежденного сосуда [8–10].

Естественно, возникал вопрос, в какой мере химически связанное с гидрогелем производное глюкозы способно повышать адгезию тромбоцитов на его поверхности за счет взаимодействия с гликозилтрансферазой на мембране тромбоцита.

Проведенные исследования показали, что иммобилизация глюкозамина практически не изменяет характер взаимодействия тромбоцитов с поверхностью гидрогеля (табл. 1). Причина этого, скорее всего, связана с невозможностью взаимодействия иммобилизованного глюкозамина с мембраной тромбоцита из-за возникающих при этом стерических препятствий.

В проявлении полимером тромборезистентных свойств важная, если не определяющая, роль принадлежит степени изменения нативной конформации белков крови в результате их контакта с поверхностью полимера. В настоящее время индикатором конформационных изменений белков принято считать систему комплемента [5]. У человека эта система состоит из 21 белка глобулиновой природы. Компоненты этой системы свободно циркулируют в крови в форме неактивных предшественников, которые активируются, в том числе и в результате взаимодействия с чужеродным материалом, и приобретают свойства ферментов. Ферментативную активность оценивают, измеряя время полулизиса эритроцитов барана плазмой крови. Из табл. 1 видно, что введение в состав гидрогеля остатков глюкозы приводило к некоторому уменьшению константы скорости активации системы комплемента, т.е. способствовало сохранению белками нативной конформации.

Отсутствие драматических изменений в характере адгезии тромбоцитов и степени денатурации

Таблица 2. Зависимость концентрации глюкозы в крови от времени после подкожного введения инсулина (0.2 мг/кг массы кролика или 0.6 мг/кг массы крысы). Приведены средние значения для 3-х животных

Животное	Препарат	Концентрация глюкозы в крови, мг/100 мл $\pm 5\%$					
		0	15*	30*	60*	90*	120*
Кролик	Исходный	124	96	65	60	44	42
	Выделившийся	116	102	58	56	40	40
Крыса	Исходный	145	126	84	62	51	56
	Выделившийся	132	112	78	56	50	50

* Время после инъекции инсулина (мин).

белков крови обеспечивает неизменность биологической активности инсулина, выделяющегося из гидрогеля (табл. 2). Видно, что инъекционное введение раствора исходного и выделившегося из гидрогеля инсулина приводило к практически одинаковому снижению уровня глюкозы в крови подопытных животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой тромборезистентности глюкозочувствительных полимерных гидрогелей, что позволяет высказать надежду на возможность их практического использования в качестве модели поджелудочной железы, обеспечивающей выделение необходимого количества инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови. Это, в свою очередь, может открыть достаточно интересные перспективы в плане разработки новой стратегии лечения сахарного диабета.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Л.К. Старосельцевой (Эндокринологический научный центр РАМН) за организацию и помощь в проведении экспериментов на животных.

Работа была выполнена в рамках программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-00123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kashyap N., Viswanad B., Sharma G., Bhardwaj V., Ramarao P., Ravi Kumar M.N. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 11. P. 2051–2060.
2. Валуев И.Л., Чупов В.В., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // *Высокомолек. соед.* 1997. Т. 39Б. № 4. С. 751–754.
3. Валуев И.Л., Ванчугова Л.В., Валуев Л.И. // *Высокомолек. соед.* 2011. Т. 53А. № 5. С. 691–695.
4. Ivakura Y., Imai Y., Vagu Y. // *J. Polym. Sci. A-1*. 1968. V. 6. № 6. P. 1625.
5. Биосовместимость / Ред. В.И. Севастьянов. М.: “Информационный центр ВНИИгеосистем”, 1999. 367 с.
6. Kim S.W., Lee R.D., Coleman D., Oster H., Andrade J.D., Olsen D.B. // *Trans. Amer. Soc. Art. Int. Org.*, 1974. V. 20. P. 449–454.
7. Jorgensen K.A., Stoffersen E. // *Thromb. Res.* 1980. V. 17. P. 13–18.
8. Jamieson G.A. // *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1973. V. 9. № 2. P. 202–205.
9. Jamieson G.A., Smith D.F., Kosow D.P. // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1975. V. 33. № 3. P. 668–671.
10. Smith D.F., Kosow D.P., Jamieson G.A. // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1975. V. 34. № 1. P. 334–337.

Thromboresistance of Glucose-Containing Hydrogels

I. L. Valuev^a, L. I. Valuev^a, L. V. Vanchugova^a, I. V. Obydenнова^a, and T. A. Valueva^b

^a Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^b Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: valuev@ips.ras.ru

Received September 10, 2012

Abstract—The thromboresistance of glucose-sensitive polymer hydrogels, modeling one of the functions of the pancreas, namely, the ability to secrete insulin in response to the introduction of glucose into the environment, has been studied. Hydrogels were synthesized by the copolymerization of hydroxyethyl methacrylate with N-acryloyl glucosamine in the presence of a cross-linking agent and subsequently treated with concanavalin A. Introduction of glucose residues into the hydrogel did not result in significant changes in either the number of trombocytes adhered to the hydrogel or the degree of denaturation of blood plasma proteins interacting with the hydrogel. Consequently, the biological activity of insulin did not change after release from the hydrogel. The use of glucose-sensitive hydrogels is supposed to contribute to the development of a novel strategy for the treatment of diabetes.