

Glukosesensorer – centralt i behandling af diabetes

En glukosesensor kan redde hverdagen for diabetikere, og mindske risikoen for følgesygdomme

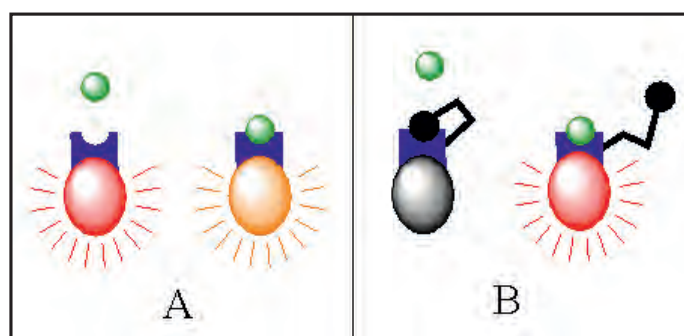
Af Jon Stefan Hansen, ph.d.-studerende, Kemisk Institut, Københavns Universitet, Thomas Hoeg-Jensen, ph.d., Novo Nordisk A/S og Jørn B. Christensen, lektor, Kemisk Institut, Københavns Universitet

En Marsbar øger energien, når blodsukkeret er lavt, som om eftermiddagen, hvor man har travlt med at skrive på sin opgave. Sukker er kroppens brændstof, men virker kun opkvikkende, når koncentrationen i blodet kontrolleres af hormonet insulin.

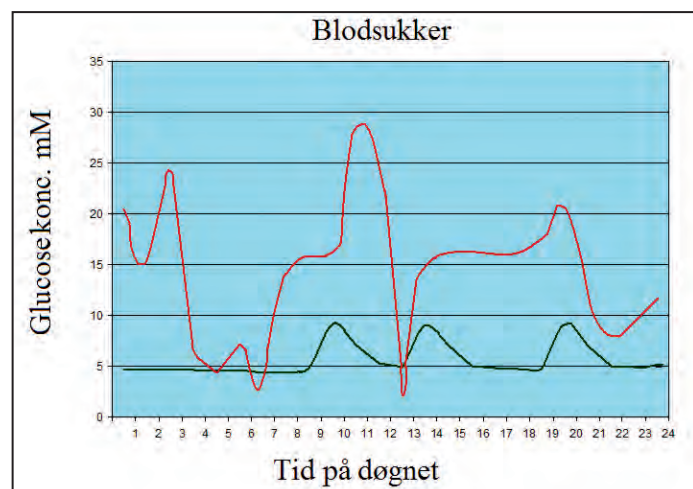
Sukkersyge eller diabetes er en kronisk sygdom, hvor sukkerkoncentrationen varierer ukontrolleret. Forhøjet blodsukker (hyperglykæmi) kan resultere i ketoacidose, hvor pH i blodet falder. For lavt blodsukker kan resultere i hypoglykæmi, i besvimelse og i værste tilfælde død. Konsekvensen af forhøjet blodsukker over flere år er skade på kroppens organer. Det kan resultere i hjertekarsygdomme, nyresvigt, tab af følesansen i arme og ben og kan nødvendiggøre amputation.

Koncentrationen af blodsukker kan svinge 2-30 mM i type 1 og 3-20 mM i type 2 diabetikere, og hyppige blodsukkertjek tillader en passende dosering af insulin og andre antidiabetika. Tatovering af en fluorescerende sensor i underhuden på sukker-

egenskaber påvirkes i sensoren, så der sker et markant skift i absorptions- og emissionsbåndene.



Figur 2. Typisk design af fluorescerende sensor. I situation A ændrer absorptions- og emissionsbåndet sig, hvilket resulterer i et farveskift. I situation B fjernes den indbyggede quencher, der virker som kontakt ved ligandbinding, og sensoren går fra "slukket" til "tændt".



Figur 1. Fiktiv graf der viser fluktuationen af blodsukker hos en type 1 diabetespatient (rød) og hos en rask person (grøn).

sygepatienten er skånsom. Sensoren skal have høj følsomhed, og kunne måle selv små ændringer af sukkerkoncentrationen. En sensor baseret på boronsyrer skal specifikt genkende D-glukose, der er det dominerende sukkerstof i blodbanen.

Fluorescerende arylboronsyrer

Der findes mange typer kulhydratsensorer baseret på boronsyrer [1], men her fokuseres der udelukkende på de fluorescensbaserede sensorer. De består af en fluorofor, der er koblet kovalent til en receptor. Ved binding af en ligand, skal de elektroniske

Sensoren kan indeholde en quencher, som dæmper fluorescensen indtil en passende ligand binder til receptoren og derved displacerer quencheren.

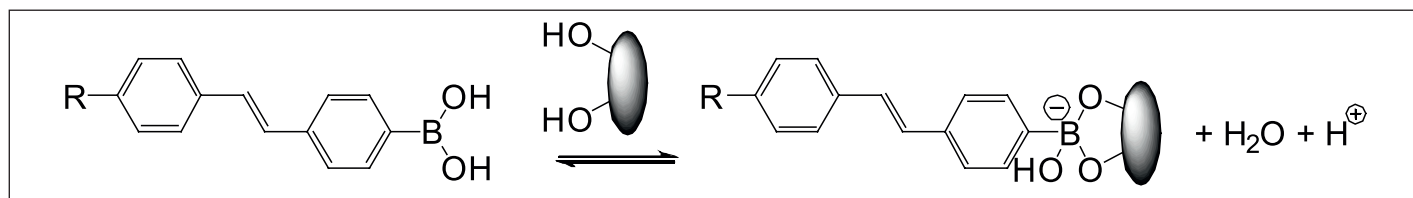
Den første fluorescerende glukosesensor blev rapporteret i 1992 [2]. Den var baseret på anthracen, og den reducerede emissionsintensiteten ved tilsætning af et saccharid. Ændringen menes at skyldes øget rehybridisering af boronsyren. Boronsyreesteren er en stærkere Lewis-syre end boronsyren selv, og derfor foreligger den i højere grad som boronat. Dette resultat blev i 1959 kvalitativt fremlagt ved undersøgelser af forskellige sacchariders binding til phenylboronsyre [3].

Fluorescenssensorer uden quencher

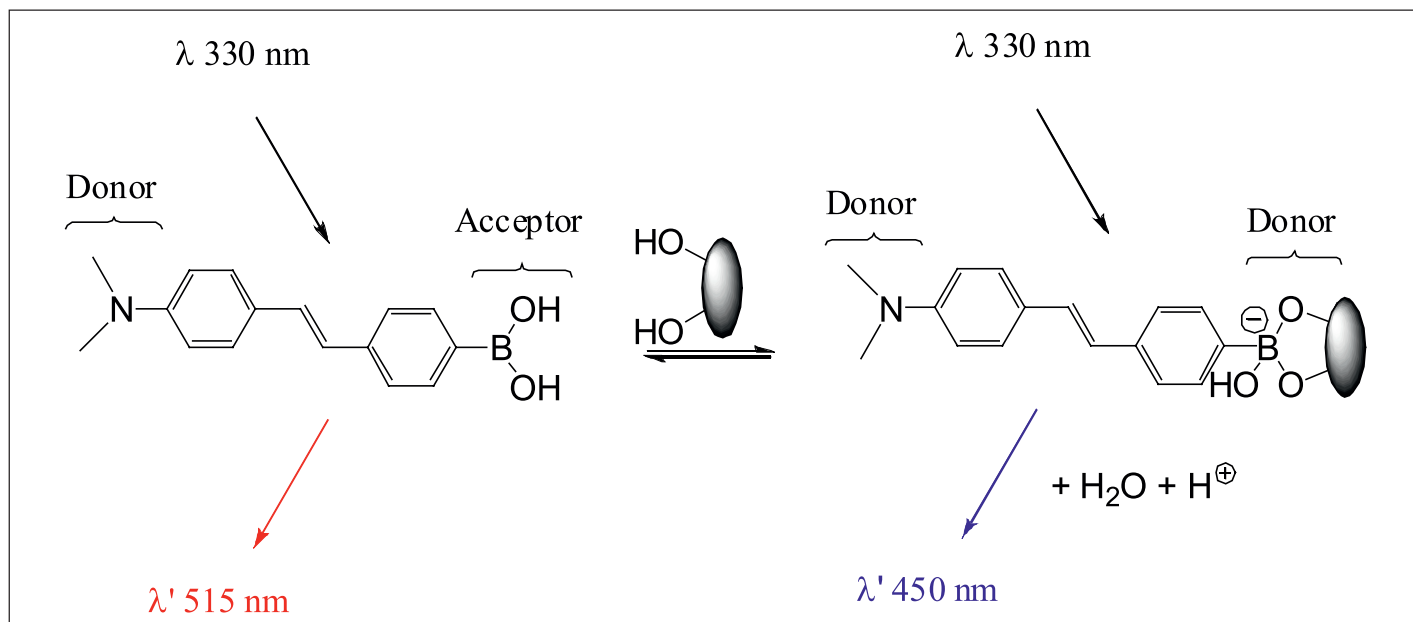
Der er syntetiseret en række fluorescerende sensorer baseret på stilben med forskellige elektrondonor- og elektronacceptorgrupper [4]. De betegnes i det følgende som donor- og acceptorgrupper. Formålet er at opnå det største skift i bølgelængden for de opnåede fluorescensbånd. Det gøres ved binding af en saccharid-ligand.

Den neutrale boronsyre har acceptoregenskaber, mens det anioniske boronat har donoregenskaber. Disse egenskaber af boronsyrefunktionen kan kontrolleres ved justering af pH. Ved at koble en donor på 4'-positionen, såsom en dimethylamino-gruppe, vil der ved et givent pH-interval være et donor-acceptorpar, hvor der kan ske intern ladningsoverførsel.

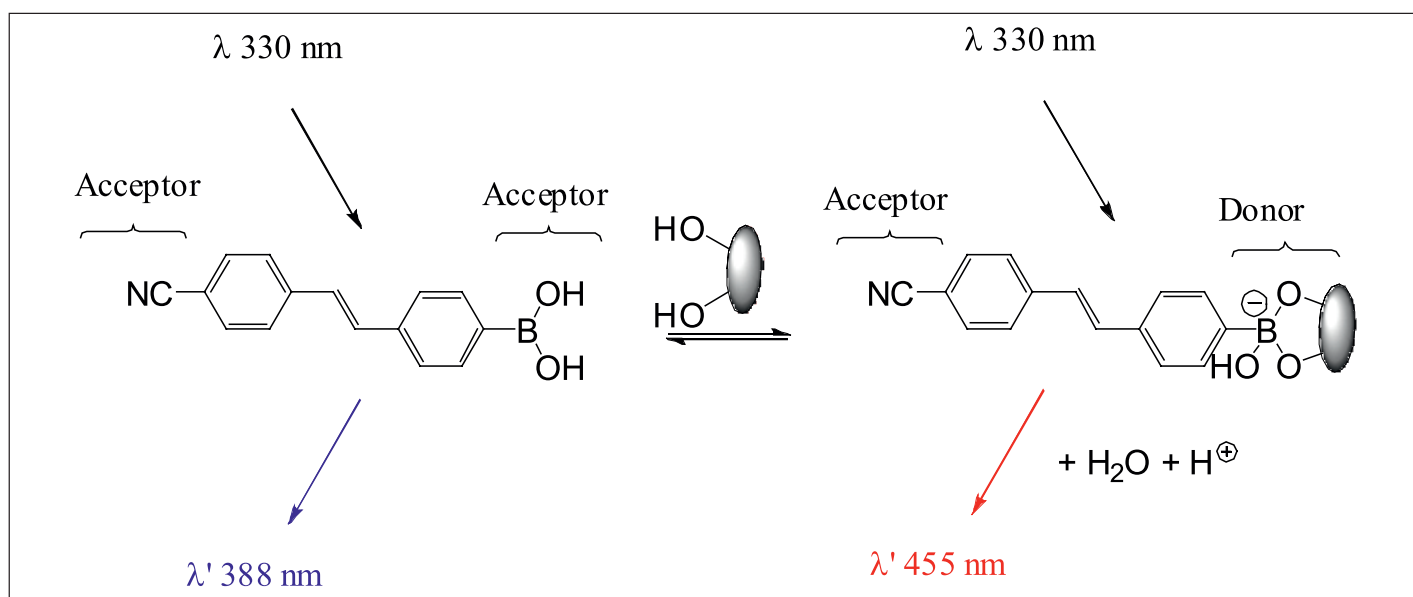
Denne effekt medfører, at en anslået elektron kan relaxere, hvilket forårsager et rødsift i fluorescensemissionen. Ved



Figur 3. Stilbenbaserede boronsyrer, hvor R-gruppen er enten donor eller acceptor.



Figur 4. Til venstre findes donor-acceptorpar og til højre to donorer i samme molekyle, ved binding af en saccharid-ligand.



Figur 5. Til venstre findes to acceptorer og til højre donor-acceptorpar i samme molekyle, ved binding af en saccharid-ligand. Denne sensor binder både D-glukose og D-fruktose med ligevægtskonstanter, der er ca. 4 gange så store som sensoren i figur 4.

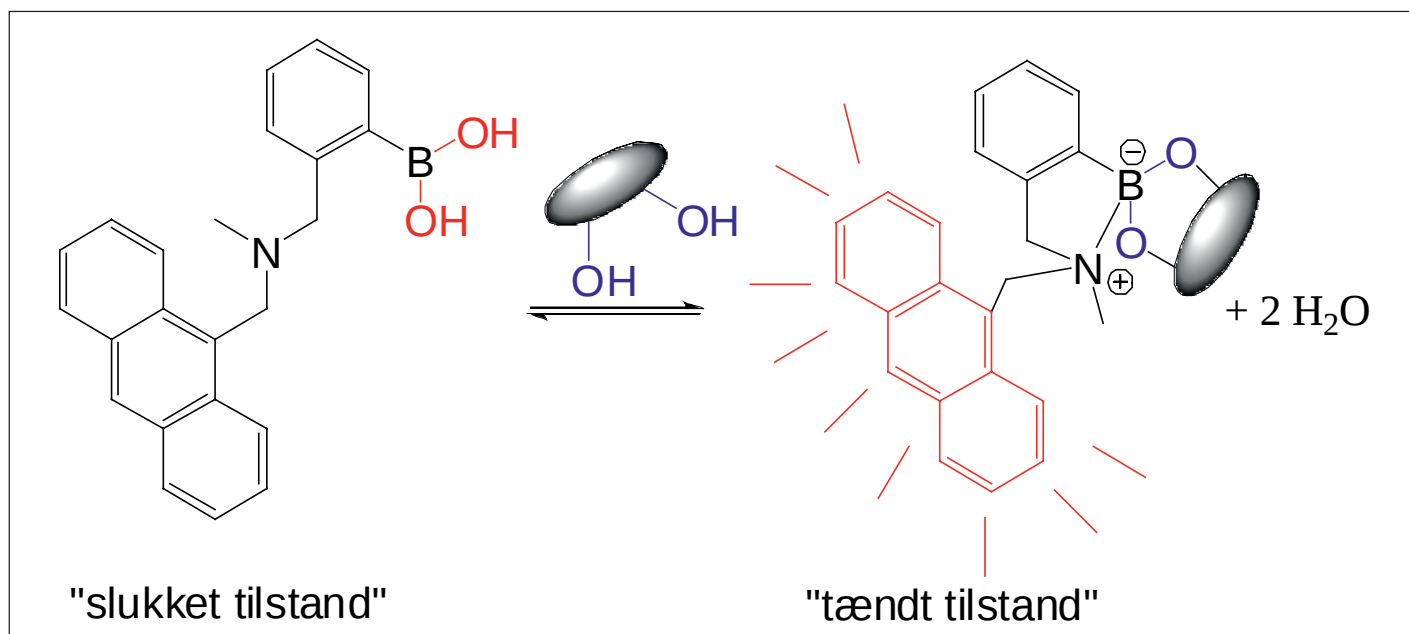
binding af en saccharid-ligand, vil boronsyren omdannes til det korresponderende boronat. Tilstedeværelsen af to donorgrupper i samme molekyle medfører et blåskift af fluorescenceemissionen. Det skyldes, at den anslåede elektron ikke kan relaxere på samme måde som før, hvor der var både donor- og acceptoregenskaber i det samme molekyle.

For sensoren i figur 4 er ligevægtskonstanten for binding til D-glukose og D-fruktose bestemt til henholdsvis 10 M^{-1} og 400 M^{-1} i en fosfatbuffer ved pH 8, der overvejende består af methanol.

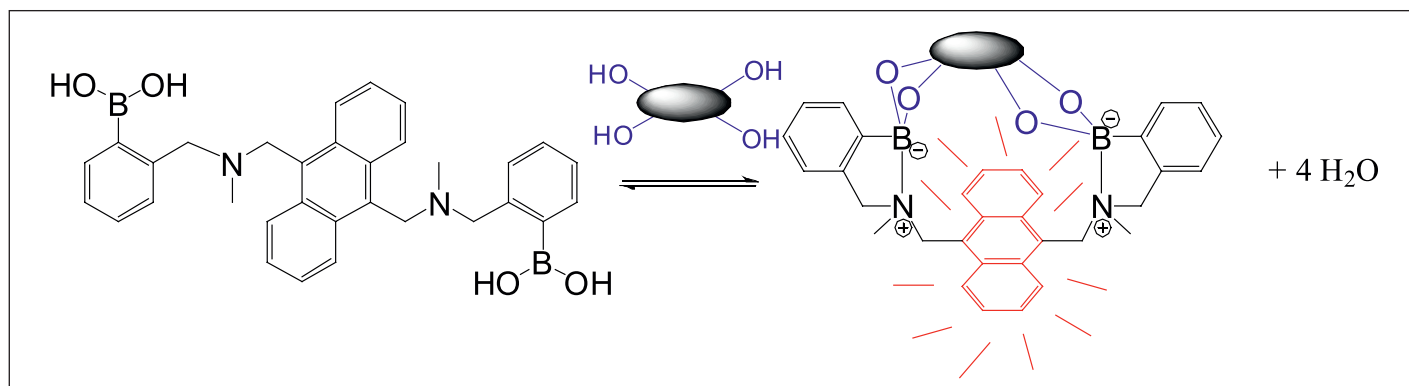
Ved at indbygge en acceptor, f.eks. en cyanogruppe i 4'-positionen, vil sensoren indeholde to acceptorgrupper ved et givent pH-interval. Ved binding af et saccharid vil boronattet dannes, således at der opnås et donor-acceptorpar. Så sker et rødsift i emissionen, som følge af at den største relaxation af den anslåede elektron sker med både donor og acceptor i molekylet.

Fluorescenssensorer med indbyggede quencher

Den indbyggede quencher i en boronsyre-baseret sensor, kan



Figur 6. Anthracenbaseret system, hvor binding af et kulhydrat medfører stor forøgelse af fluorescensemission.



Figur 7. Videreudvikling af det anthracenbaserede system, hvor designet er indrettet til selektiv binding af D-glukose.

være en *ortho*-methylaminogruppe, da det frie elektronpar i aminer kan quenche fluorescens.

Der er blevet udviklet et anthracenbaseret system, der ved kulhydratbinding øger fluorescensen mærkbart [5].

Ved kulhydratbinding opnås en boronsyreester, der er en stærkere Lewis-syre end boronsyren og derfor i højere grad er på sin

tetraedriske boronatform. Disse forhold gør det mere favorabelt for det frie elektronpar på nitrogen at danne en nitrogen-bor-binding, da geometrien af boronatet ikke ændrer sig. Dermed er det frie elektronpar ikke længere tilgængeligt og kan ikke quenche fluorescensen - sensoren er "tændt".

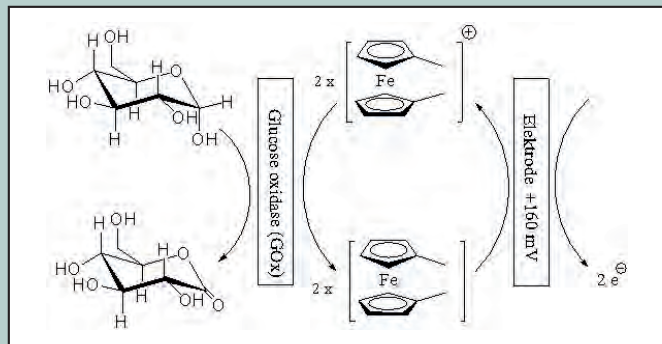
Videreudvikling af det anthracenbaserede system til et diboronsyresystem, har resulteret i selektivitet for binding af D-glukose [6]. Systemet fluorescerer først ved binding af fire hydroxygrupper. Først da vil begge aminogrupeer indgå i en nitrogen-bor-binding.

Denne sensor har meget stor affinitet for D-glukose ift. D-fruktose (ca. en størrelsesorden) i den anvendte methanol/vandige buffer ved fysiologisk pH.

Den achirale anthracenbaserede diboronsyre er blevet resyntetiseret og undersøgt under de samme betingelser som beskrevet [7]. Det er påvist, at det er furanoseformen af D-glukose, der er bundet, snarere end pyranoseformen som tidligere foreslået. Pyranoseformen findes kun i meget kort tid ved binding under helt vandfri betingelser.

Efterfølgende er der udviklet diboronsyrer med binaphtholgrupper [8], der ud over at fungere som fluoroforer også er chirale. Chiraliteten kan favorisere binding af en type kulhydrat frem for et andet. Eksempelvis observeres der en tydelig bindingsforskel mellem de udviklede sensorer og henholdsvis D- og L-glukose.

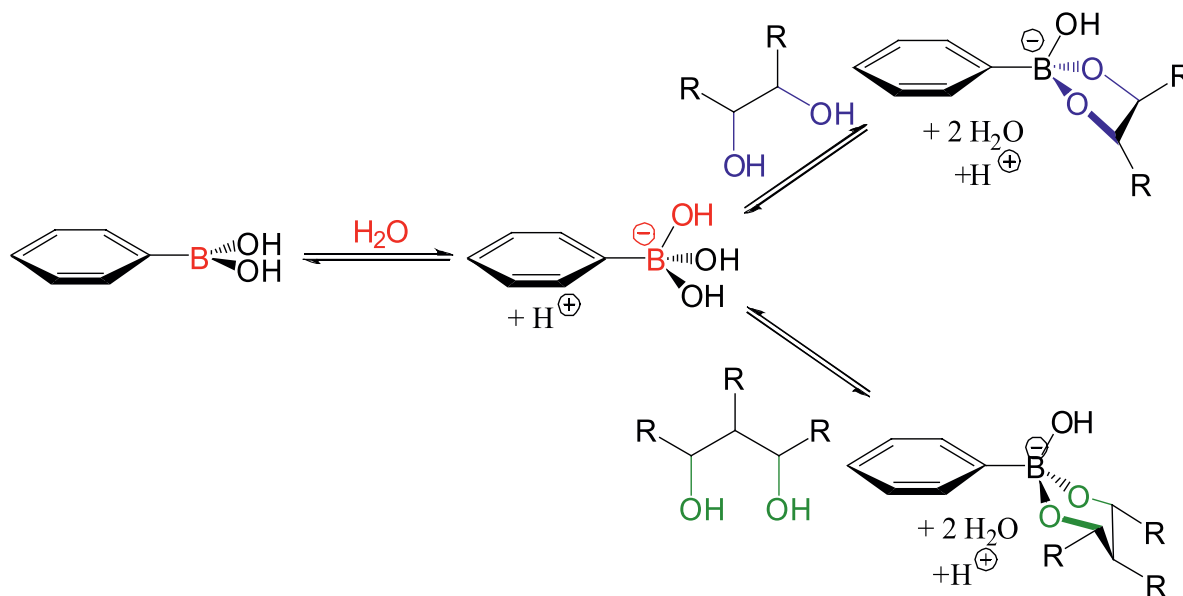
En blodsukkertest foretages på en bloddråbe. Denne placeres på en elektrokemisk biosensorstrimmel, der måler koncentrationen af sukker via en enzymatisk reaktion med glukoseoxidase.[9,10] Besværet kan undgås ved adgang til non-invasive metoder.



Arylboronsyrer bruges ofte i kulhydratgenkendelse, da de er små og fleksible sammenlignet med andre klasser af kulhydratbindere, såsom lectiner eller syntetiske makrocycliske forbindelser.

Arylboronsyrer undergår spontant og reversibelt esterdannelse

ved reaktion med 1,2-dioler eller 1,3-dioler [3]. Den optimale bindingsaffinitet opnås, når aarylboronsyren forelægger som sin korresponderende base, aarylboronatet. Det betyder, at syrestyrkekonstanten for boronsyren skal være mindre end pH i det medium, den er i kontakt med, for at bindingen bliver optimal.



Perspektiv

Designet af kulhydratsensorer er en syntetisk udfordring, fordi kulhydrater er polyoler, der indeholder chirale centre. Det gør det svært at tune egenskaberne af en given kulhydratbinder. I blodbanen findes foruden D-glukose også D-fruktose og L-laktat, der vil kunne binde til en boronsyrebase sensor. For monoboronsyrer er der en præference for binding af D-fruktose frem for D-glukose. Det udgør et praktisk problem, selvom D-glukose er det dominerende kulhydrat i blodbanen (≈ 5 mM) sammenlignet med D-fruktose (< 0.1 mM, selv efter et frukto-serigt måltid). Præferencen for binding af D-fruktose menes at ske fordi D-fruktose kan binde tridentat, mens D-glukose kun binder bidentat.

En optisk D-glukosesensor letter hverdagen for en sukker-sygepatient, fordi den overflødig gør udtagning af en dråbe blod. Monitorering af glukose i blodbanen kan ske ved at

måle direkte på proben via en fiber, som sidder i huden (så lys ikke skal gennemtrænge huden). Dette koncept bruges af Glumetrics, fordi synligt lys i nogen grad absorberes af huden.

Der er endnu nogle barrierer, der skal overkommes. Eksempelvis indeholder mange sensorer ikke særligt hydrofile grupper, hvilket er en ulempe, når de skal være i kontakt med blodet. Dertil kommer udfordringen med fotostabilitet, idet sensoren med tiden nedbrydes ved lyspåvirkning. Uønsket oxidation er et andet praktisk problem.

E-mail-adresser

Jon Stefan Hansen: jonhansen@kemi.ku.dk

Thomas Høeg-Jensen: TSHJ@novonordisk.com

Jørn B. Christensen: jbc@kemi.ku.dk

Referencer

- James, T.D.; Phillips, M.D.; Shinkai, S. *Boronic Acids in Saccharide Recognition – Monographs in Supramolecular Chemistry*, RSC Publishing, Cambridge, 2006. Wang, J. *Chemical Reviews*, 2008, 108, 814-825.
- Yoon, J.; Czarnik, A.W. *Journal of American Chemical Society*, 1992, 114, 5874-5875.
- Lorand, J.P.; Edwards, J.O. *Journal of Organic Chemistry*, 1959, 24, 769-774.
- DiCesare, N.; Lakowicz, J.R.; *Journal of Physical Chemistry A*, 2001, 105, 6834-6840.
- James, T.D.; Sandanayake, K.; Shinkai, S. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, 1994, 477-478.
- James, T.D.; Sandanayake, K.R.A.S.; Iguchi, R.; Shinkai, S. *Journal of American Chemical Society*, 1995, 117, 8982-8987.
- M. Bielecki, H. Eggert, J.C. Norrild, *Journal of Chemical Society, Perkin Transition 2*, 1999, 449-455.
- Zhao, J.Z.; Fyles, T.M.; James, T.D. *Angewandte Chemie International Edition English*, 2004, 43, 3461-3464.
- Wang, J. *Chemical Reviews*, 2008, 108, 814-825.
- Smith, J.L., *The Pursuit of Noninvasive Glucose: "Hunting the Deceitful Turkey"*, Copyright 2006 by John L. Smith, http://www.mendoza.com/noninvasive_glucose.pdf

Optisk måling af blodglukose via en fluorescerende sensor i en kontaktlinse. Koncentrationen af glukose i tårer er ca. 10 gange lavere end i blod. Kontaktlinsen korrigerer samtidig synet hos mange diabetikere, der har nedsat syn, angiveligt pga. glykosylering af proteiner i blodbanen.

