

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИНТЕРФЕЙСА

Черенков И.А., Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д.

Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, д. 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: ivch75@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Предложена биоэлектрохимическая модель для оценки протеазной активности, основанная на детекции токов восстановления электроактивного соединения (толуидинового синего), диффундирующего в среде желатинового геля. Электрохимическое поведение толуидинового синего в желатиновом геле характеризуется ростом пиковых значений силы тока во времени и сдвигом потенциалов пиковых значений силы тока относительно показателей, полученных в фосфатно-солевом буферном растворе. Внесение в ячейку трипсина в концентрации 0,08 % (масс.) привело к изменению характера зависимости «ток-время», отражающему снижение диффузионных ограничений. Показателями протеазного катализа в данной модели стали значения силы тока восстановления и скорость изменения силы тока. Наиболее существенные изменения вольтамперных кривых отмечены к 10-й минуте эксперимента. Развитием описанной модели может стать электрохимический сенсор протеазной активности для оценки ферментных препаратов и клеточных культур.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, трипсин, фенотиазиновые красители, гидрогели.

Электрохимические методы находят широкое применение в биологии и медицине [1, 2]. Одним из направлений биоэлектрохимии является создание молекулярных и клеточных биоэлектрохимических моделей [3], для которых важное значение имеет оценка протеазной активности [4, 5]. Субстраты и продукты протеолитических ферментов, как правило, не обладают выраженной электроактивностью, что затрудняет их прямое определение электрохимическими методами. Между тем, оценка и мониторинг протеазной активности важны для описания интенсивности воспаления в экспериментальных моделях и в клинических исследованиях [6-8]. Интерес представляют собственно электрохимические процессы в гелевых средах, поскольку гидрогели различного состава – обычный компонент многих биоэлектрохимических и тканеинженерных систем [9-11]. Активно развиваемые технологии биомедицины и тканевой инженерии ставят задачи оценки протеазной активности клеток *in situ*. Самостоятельной исследовательской задачей является изучение диффузионных свойств тканеинженерных скаффолдов в условиях разной интенсивности протеолиза для приближения их физико-химических параметров к межклеточному веществу [10-13]. Для решения этих задач применяются вольтамперметрические [4] и кондуктометрические [5] методы.

Целью настоящей работы стало исследование возможности детекции протеазной активности в модели электрохимического сенсора с использованием толуидинового синего в качестве электроактивной метки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основы для электрохимической модели использовали планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный. Перед измерениями электроды подвергали циклированию (+1000...–1000 мВ) в среде рабочего электролита для стабилизации характеристик. Затем на поверхность рабочего электрода наносили 2 мкл. раствора желатина (3 % масс.) и оставляли во влажной камере для формирования гидрогеля.

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовался диапазон потенциалов 0...+500 мВ при температуре 20-25 °С в условиях естественного насыщения электролита кислородом. Измерения проводились в течение 40-55 минут через каждые 5 минут. В качестве фоновой электролита во всех измерениях использовали фосфатно-солевой буфер (рН = 7,3). Конечная концентрация толуидинового синего (ТС) в ячейке для всех экспериментов была постоянной (10^{-3} М). Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода. На графиках положительные токи соответствуют процессам восстановления, а отрицательные токи – процессам окисления. Данные электрохимических измерений обрабатывали с помощью программ *MS Excel 2010* и *Origin 6.1*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предметом исследований на первом этапе стало электрохимическое поведение толуидинового синего в среде фосфатно-солевого буферного раствора на графитовом электроде. На рисунке 1 представлена типичная вольтамперограмма ЦВА. В диапазоне –200...+600 мВ ТС формирует два отчетливых пика. В области потенциалов +200...+300 мВ – пик восстановления, а в области +300...+100 мВ – пик окисления.

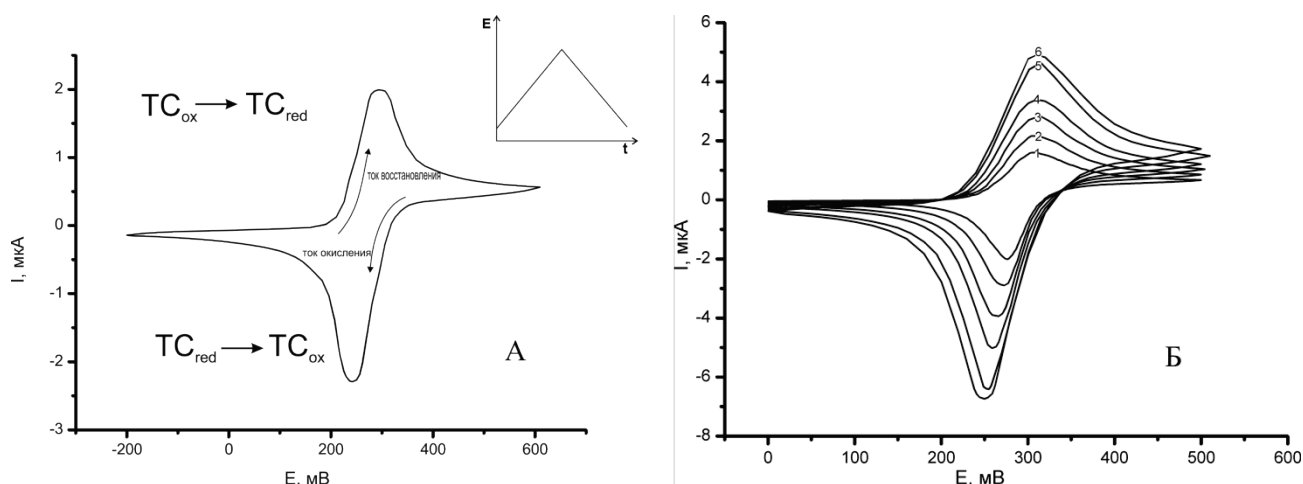


Рисунок 1. Вольтамперные кривые циклической вольтамперометрии, характеризующие электрохимическое поведение толуидинового синего в среде фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,3): А – типичная вольтамперная зависимость с характерными пиками окисления/восстановления и соответствующими редокс-переходами красителя (на врезке – изменения потенциала в ходе измерения); Б – вольтамперные кривые редокс-превращений толуидинового синего при различных скоростях сканирования потенциала: 1 – 10 мВ/с, 2 – 25 мВ/с, 3 – 45 мВ/с, 4 – 60 мВ/с, 5 – 95 мВ/с, 6 – 130 мВ/с

Формирование пиков обусловлено электрохимическими окислительно-восстановительными реакциями, происходящими на поверхности электрода. Фенотиазиновые красители характеризуются хорошей адсорбцией на углеродных материалах [14]. Адсорбированные молекулы, при достижении в ходе сканирования соответствующих потенциалов, отдают или принимают электроны, формируя характерные пики, регистрируемые в ходе измерения (рис. 1А).

По данным ЦВА, ТС характеризуется обратимым электрохимическим поведением, что подтверждается близкими по абсолютным значениям пиками окисления ($I_p^{ox} = 2,18$ мкА) и восстановления ($I_p^{red} = 1,79$ мкА), $I_p^{ox}/I_p^{red} = 1,2$, а также близкими значениями потенциалов пиков ($E_p^{ox} = 235$ мВ; $E_p^{red} = 294,9$ мВ; $\Delta E = 59,9$ мВ). Определение зависимости пиковых значений силы тока от скорости сканирования потенциала показало близкий к линейному рост значений силы тока при повышении скорости сканирования (рис. 1Б). При этом отношение токов окисления к токам восстановления изменяется незначительно. Зависимость тока восстановления (I) от скорости развертки потенциала (v) аппроксимируется уравнением:

$$I = 0,46\sqrt{v} - 0,13,$$

с коэффициентом достоверности аппроксимации $R^2 = 0,99$, что позволяет связать рост показателей силы тока с диффузионными процессами.

Таким образом, для системы «толуидиновый синий-графитовый электрод» в условиях физиологических значений ионной силы и pH раствора характерно электрохимическое поведение, близкое к нернстовскому переносу заряда, при котором ток лимитируется диффузией электроактивного вещества и значением потенциала рабочего электрода, а не скоростью электрохимической реакции. Это позволяет использовать показатели силы тока для оценки диффузии красителя в белковом гидрогеле.

Процесс диффузии ТС в желатиновом геле описывается серией вольтамперограмм ЦВА, полученных с интервалом 5 минут после внесения красителя, и характеризуется ростом пиковых значений силы тока во времени при постоянной скорости сканирования потенциала (рис. 2, 3).

Желатиновый гель в используемой концентрации достаточно хорошо проницаем для электроактивной метки – практически сразу после внесения раствора красителя на вольтамперограммах отмечаются характерные пики окисления/восстановления (рис. 2А). Электрохимические превращения ТС в среде желатинового гидрогеля зависят от диффузионных ограничений. По сравнению с процессами, происходящими в отсутствие желатина, отмечается сдвиг значений потенциалов, соответствующих пикам окисления и восстановления, и увеличение разности между ними ($E_p^{ox} = 210$ мВ; $E_p^{red} = 255,2$ мВ; $\Delta E = 45,2$ мВ). При этом рост пиковых значений силы тока превышает показатели, полученные в среде фосфатно-солевого буферного раствора, достигая абсолютных значений $I_p^{ox} = 7,55$ мкА и $I_p^{red} = 4,45$ мкА. Изменяется соотношение пиковых токов в среде желатинового гидрогеля: $I_p^{ox}/I_p^{red} = 1,7$. Сила тока растет во времени, отражая диффузию ТС к поверхности электрода (рис. 3А). К 10-й минуте эксперимента скорость изменений силы тока снижается (рис. 3Б). Отметим, что подобные свойства демонстрируют и другие фенотиазиновые красители – например, метиленовый синий в среде агарозного геля [9].

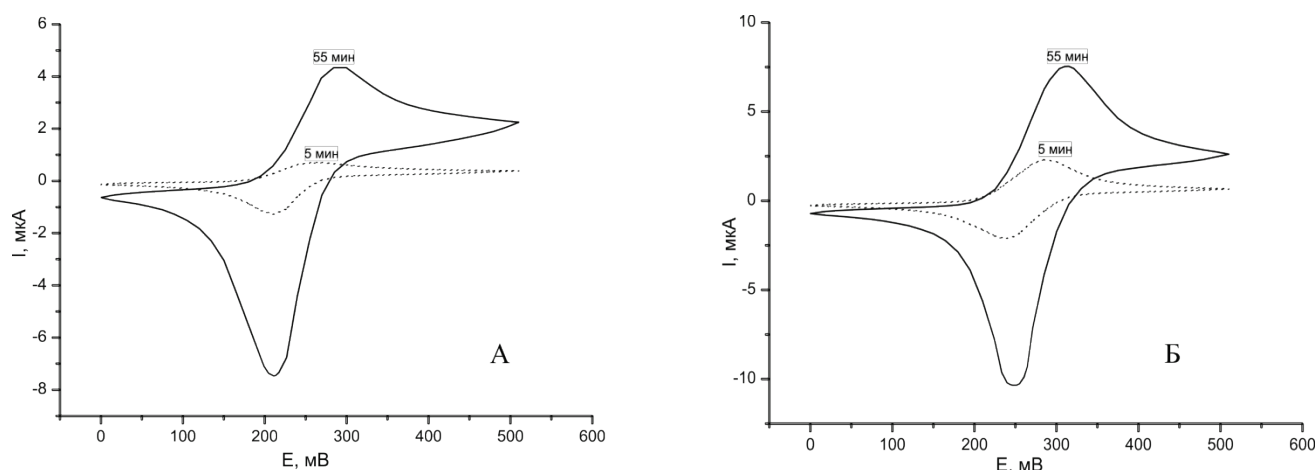


Рисунок 2. Вольтамперные кривые циклической вольтамперометрии, характеризующие электрохимическое поведение толуидинового синего в среде желатинового геля (3 % масс.) во времени. А – при отсутствии раствора трипсина; Б – при внесении раствора трипсина. Показаны первый (5 мин.) и последний (55 мин.) циклы

Внесение в ячейку раствора трипсина в концентрации 0,08 % (масс.) привело к изменению характера зависимости «ток-время» (рис. 2, 3). Очевидно, внесение трипсина существенно облегчает диффузию ТС в желатиновом геле, что отражается в характере вольтамперных кривых. Происходит сдвиг значений потенциалов ($E_{p^{ox}} = 239,9$ мВ; $E_{p^{red}} = 285,1$ мВ), при этом ΔE остается без изменений (45,2 мВ). Абсолютные значения силы тока через 5 минут после начала измерений превышают показатели, полученные в среде желатинового гидрогеля: $I_{p^{red}} = 2,44$ мкА (без трипсина 1,01 мкА); $I_{p^{ox}} = 2,39$ мкА (без трипсина 1,33), а соотношение $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}}$ становится равным 0,97, что может служить показателем снижения диффузионных ограничений и приближения электрохимического процесса к условиям обратимости.

Показатели зависимости « $I_{p^{red}}$ – время» стабилизируются быстрее, чем в отсутствие фермента, однако скорость изменения силы тока в присутствии трипсина неравномерна (рис. 3).

Таким образом, модификация поверхности планарного графитового электрода белковым гидрогелем формирует диффузионный барьер для электроактивной метки (толуидинового синего), который нарушается в процессе протеолиза. Уменьшение диффузионных ограничений вследствие протеолиза способствует повышению значений силы тока восстановления электроактивной метки. При избранном режиме измерений протеазная активность наиболее существенно влияет на показатели силы тока восстановления в первые 10 минут измерения.

Развитием предложенной модели может стать электрохимический сенсор протеазной активности для оценки ферментных препаратов, изолированных клеток и органотипических культур. Изменяя состав гидрогеля, можно оценивать специфичность протеазного катализа в отношении определенных белков. Используя электроактивные метки с разными диффузионными и адсорбционными свойствами, можно оценивать физико-химические свойства гидрогелевых сред различного состава.

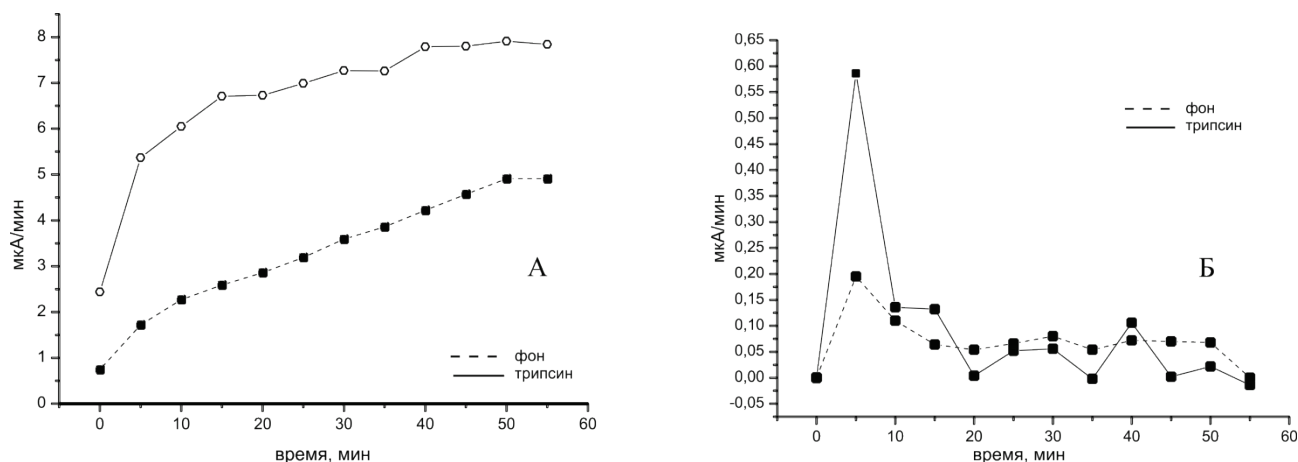


Рисунок 3. Изменение пиковых значений силы тока восстановления толуидинового синего в среде желатинового геля во время эксперимента и влияние на этот процесс трипсина. А – рост пиковых токов восстановления; Б – скорость изменения силы тока во время эксперимента

Список литературы / References:

1. Heiskanen A., Emnéus J. Monitoring of Cellular Dynamics with Electrochemical Detection Techniques. *Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I*, ed. Eliaz N., 2011, vol. 52, no. 52, pp. 1-104.
2. Goldin M.M., Khubutia M.Sh., Evseev A.K., Goldin M.M., Pinchuk A.V., Pervakova, El.I., Tarabrin Y.A., Hall P. J. Noninvasive Diagnosis of Dysfunctions in Patients After Organ Transplantation by Monitoring the Redox Potential of Blood Serum. *Transplantation*, 2015, vol. 99, no. 6, pp. 1288-1292.
3. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. Электрохимические методы в биомедицинских исследованиях. *Биомедицинская химия*, 2015, т. 61, № 2, с. 188-202. [Shumyanceva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods for biomedical investigations. *Biomedicinskaya himiya*, 2015, vol. 61, no. 2, pp. 188-202. (In Russ.)]
4. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta, Elsevier*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
5. Ionescu R.E., Fillit C., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S. Urease-gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity. *Biosens. Bioelectron. Elsevier*, 2008, vol. 24, no. 3, pp. 489-492.
6. Karpenko M.N., Abdurasulova I.N., Klimenko V.M. Calpain Activity in Spinal Cord Cells from Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis of Different Grades. *Neurosci. Behav. Physiol. Springer*, 2011, vol. 41, no. 3, pp. 252-258.
7. Ricci S.D.V., Oriente F., F.P., Di C.A. Substrate-zymography: A still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, vol. 54, no. 8, pp. 1281-1290.
8. Deshmukh A.A., Weist J.K., Leight L. Detection of proteolytic activity by covalent tethering of fluorogenic substrates in zymogram gels. *Biotechniques*, 2018, vol. 64, no. 5, pp. 203-210.
9. Черенков И.А. Кропачева Т.Н. Первозчиков Е.А. Сергеев В.Г. Электрохимическая оценка метаболической активности клеток родококков, иммобилизованных на планарном графитовом электроде. *Технологии живых систем*, 2015, т. 12, № 2, с. 12-19. [Cherenkov I.A. Kropacheva T.N. Perevozchikov E.A. Sergeev V.G. Electrochemical assessment of metabolic activity of rhodococcal cells immobilized on planar graphite electrode. *Tekhnologii zhivyyh sistem*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 12-19. (In Russ.)]
10. Fonseca K.B., Bidarra S. J., Oliveira M. J., Granja P. L., Barrias C. C. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 1674-1682.
11. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Y. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: Adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2014, vol. 25, no. 3, pp. 857-871.
12. Bahmanzadeh S., Ruzgas T., Sotres J. Proteolytic degradation of gelatin-tannic acid multilayers. *J. Colloid Interface Sci.*, 2018, vol. 526, pp. 244-252.
13. Sánchez P., Pedraz J.L., Orive G. Biologically active and biomimetic dual gelatin scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V.*, 2017, vol. 98, pp. 486-494.
14. Karyakin A.A., Karyakina, E.E., Schmidt H.-L. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers. *Electroanalysis*, 1999, vol. 11, no. 3, pp. 93-110.

MODELING PROTEASE ACTIVITY USING THE ELECTROCHEMICAL INTERFACE**Cherenkov I.A., Raevskih K.S., Sergeyev V.G., Krivilev M.D.**

Udmurtia State University

Universitetskaya str., 1, Ijevsk, 426034, Russia; e-mail: ivch75@yandex.ru

Abstract. A bioelectrochemical model for assessment of protease activity which based on detection of reduction currents of electroactivity compounds (toluidine blue), diffusing through gelatin gel, was come up. The electrochemical behavior of toluidine blue in gelatin gel is characterized by increase in the peak values of current in time and shift in potential of peak values of the current relative to the parameters obtained in the phosphate buffered saline. Introduction of trypsin in the electrochemical cell in concentration of 0,08 % (wt.) led to a change in nature of current-time relationship, which reflects a decrease in diffusion limitation. An indicator of protease catalysis in this model were the values of the reduction current and the rate of change in the current. The most significant changes in the current-potential curve were observed by the 10th minute of experiment. The development of the described model can be an electrochemical sensor of protease activity for the evaluation of enzyme preparations and cell cultures.

Key words: *cyclic voltammetry, trypsin, phenothiazine dyes, hydrogels.*