

ДИФFUЗИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В АЛЬГИНАТ-ЖЕЛАТИНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕПСИНА

Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г.

Удмуртский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 13.07.20

Аннотация. Исследование посвящено электрохимическим процессам в гидрогелевых средах. В работе рассматривается электрохимическая модель диффузии электроактивного фенотиазинового красителя толуидинового синего (ТС) в среде комбинированного альгинат-желатинового геля при пепсиновом протеолизе. Представлены данные циклической вольтамперометрии (ЦВА) красителя в кислой среде. Проведен расчет коэффициента диффузии ТС. Показаны качественные и количественные изменения кривых ЦВА по отношению к данным, полученным в нейтральной среде. Методом ЦВА изучена диффузия красителя в гидрогелях различного состава. Проведены расчеты коэффициента диффузии ТС в гелевых средах при различных соотношениях альгинат/желатин. Выяснено влияние состава гидрогеля на характер вольтамперных кривых, характеризующих окислительно-восстановительные превращения электроактивной метки. Электрохимическое поведение толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле с соотношением компонентов 1:3 в присутствии пепсина характеризуется значением разности потенциалов пиков окисления и восстановления $\Delta E = 120,3$ мВ, а также соотношением пиковых токов: $I_p^{ox}/I_p^{red} = 1,08$ при $I_p^{red} = 8,99$ мкА и $I_p^{ox} = 9,70$ мкА, что приближает систему к обратимому электрохимическому поведению. Внесение пепсина приводит к ускорению диффузии красителя, количественно выраженному в динамике значений силы тока и соответствующему росту значения эффективного коэффициента диффузии. Разработанная модель может быть использована для имитации *in electrode* элементов воспалительных реакций, исследования качества ферментных препаратов, оценки диффузионных свойств различных гелеобразователей и их устойчивости к протеолизу.

Ключевые слова: толуидиновый синий, пепсин, желатин, альгинат, циклическая вольтамперометрия.

Одним из направлений биоэлектрохимии является создание электрохимических моделей биологических процессов [1, 2]. При моделировании систем с участием иммобилизованных в гидрогеле клеток или использовании тканеинженерных конструкций возникает необходимость учета влияния диффузионных ограничений гелевых сред на электрохимические процессы [2-5]. Фундаментальным аспектом проблемы является интерес к гидрогелям как к возможной первооснове жизни [6] и эквивалентам биологических тканей [4, 7]. В ряде случаев на диффузию электроактивных компонентов в гидрогелях оказывают влияние ферменты, продуцируемые иммобилизованными клетками, в частности протеазы [4, 8, 9]. Практической точки зрения, оценка протеазной активности важна, например, для моделирования воспаления и канцерогенеза в клинических и экспериментальных исследованиях [10, 11], моделировании резорбции тиреоглобулина в щитовидной железе [12, 13], оценки качества ферментных препаратов и т. д.

Особый интерес, на наш взгляд, представляет исследование протеазной активности в модели электрохимического сенсора с использованием электроактивной метки, диффундирующей к поверхности электрода через белковый гидрогель-субстрат протеазы [2, 8]. Ранее нами был предложен модельный электрохимический интерфейс для оценки активности трипсина, включающий планарный графитовый электрод с нанесенным желатиновым гидрогелем и толуидиновый синий в качестве электроактивной метки [2]. Возник вопрос об универсальности толуидинового синего как электроактивной метки при низких значениях pH, а также возможности применения более стабильного комплексного альгинат-желатинового гидрогеля.

Целью данной работы стало исследование электрохимического поведения толуидинового синего в среде желатин-альгинатного гидрогеля при воздействии пепсина.

В экспериментах использовались планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный (рис. 1).



Рисунок 1. Планарная электродная система: 1 – рабочий электрод, 2 – вспомогательный электрод, 3 – электрод сравнения

Перед измерениями электроды подвергали циклированию (+1200...–1200 мВ) в буферном растворе для стабилизации характеристик. Затем на поверхность рабочего электрода наносили рабочие растворы и проводили измерения. Для формирования гидрогеля на рабочий электрод перед измерением наносили 2 мкл смеси желатина (3% масс.) и альгината натрия (2% масс.) в необходимых соотношениях. Для полимеризации альгината использовали 2 М раствор хлорида кальция, наносимый непосредственно на электрод при подготовке. Избыток раствора через некоторое время удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Для формирования нейтральной среды использовали фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2), кислую среду создавали с помощью буферного раствора глицин-НСl (рН=2,2). В глициновом буфере проводили эксперименты с пепсином.

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовались диапазоны потенциалов -800...+800 мВ (отн. Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала от 11 до 98 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 40 минут с интервалом в 5 минут. На графиках положительные токи соответствуют процессам электровосстановления, а отрицательные токи – процессам электроокисления. Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода.

В нейтральной среде толуидиновый синий характеризуется близким к обратимому электрохимическим поведением [2]. При проведении ЦВА в кислой среде (фоновый электролит – буфер глицин НСl, рН = 2,2) происходят качественные изменения вольтамперных кривых ЦВА. В диапазоне значений потенциалов от -800 до 800 мВ ТС в кислой среде формирует пики восстановления и окисления, наблюдаемые при 90 мВ и -100 мВ соответственно. Значения пиковых значений силы тока восстановления составили 5,9 мкА. Для сравнения, в нейтральном электролите, при сохранении прочих условий эксперимента, значения потенциалов пиков составили $E_{p^{ox}} = 235$ мВ; $E_{p^{red}} = 294,9$ мВ; $\Delta E = 59,9$ мВ, а значение силы тока восстановления, при соответствующей скорости развертки потенциала, не превышало 3 мкА [2]. Характерный вид кривой ЦВА ТС в среде глицинового буфера представлен на рисунке 2а.

При анализе зависимости пиковых значений силы тока от скорости развертки потенциала обнаружена линейная зависимость значений силы тока от корня квадратного скорости развертки потенциала, аппроксимирующаяся уравнением:

$$I_{p^{red}} = 0,72\sqrt{v}, \quad (1)$$

Коэффициент $R^2 = 0,99$, что позволяет говорить о диффузионном контроле электрохимического процесса – поступление красителя к электродной поверхности лимитирует формирование тока.

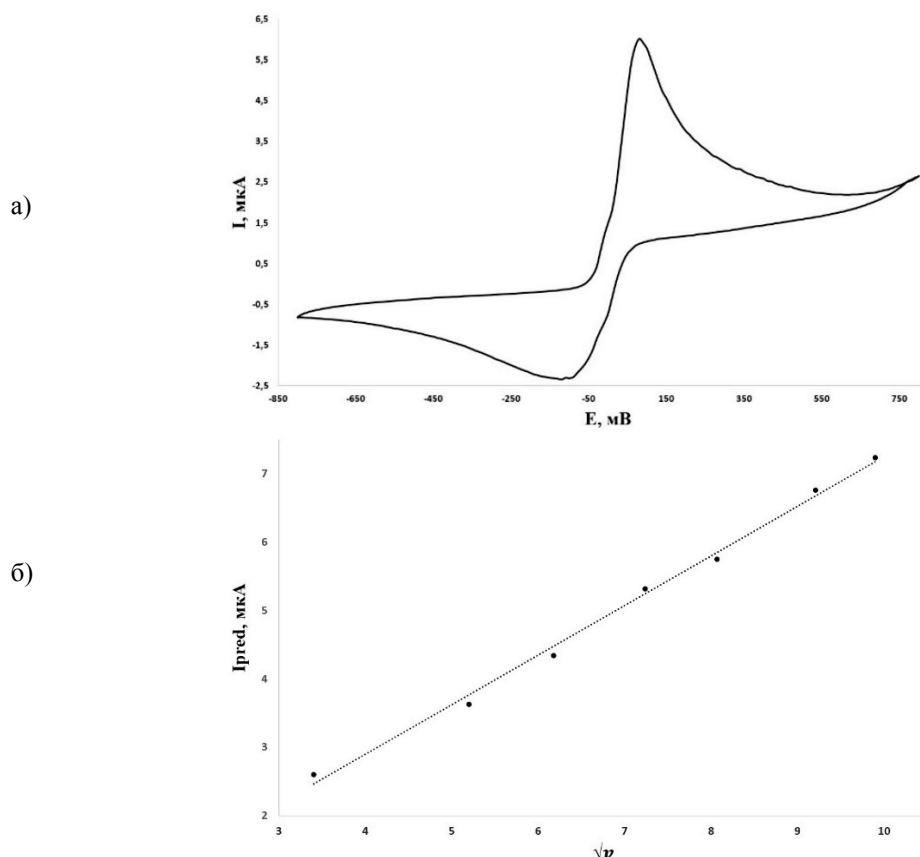


Рисунок 2. Типичная вольтамперограмма ЦВА раствора толуидинового синего (1мМ) в среде глицинового буферного раствора рН 2,2 при скорости сканирования потенциала 65 мВ/с (а); зависимость значений силы тока восстановления от корня квадратного скорости сканирования потенциала

На основе уравнения Рендлса-Шевчика:

$$I_p = -0,446cA\sqrt{\frac{n^3F^3vD}{RT}}, \quad (2)$$

где I_p – пиковые значения силы тока (А); c – концентрация толуидинового синего (моль/м³); A – площадь рабочего электрода (м²); n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции; F – постоянная Фарадея (Кл/моль), v – скорость развертки потенциала (В/с), D – коэффициент диффузии (м²/с), R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль·К), T – температура (К) [14], был рассчитан коэффициент диффузии красителя. Значение коэффициента диффузии ТС в среде глицинового буферного раствора составило $0,81 \times 10^{-9}$ см²/с, что сопоставимо с оценочными значениями коэффициента диффузии ТС полученными по данным расчетов на основе приближения Стокса-Эйнштейна приведенными в литературе ($1,42 \times 10^{-9}$ м²/с) [15]. Интересно, что расчеты коэффициента диффузии на основании вольтамперограмм ЦВА для нейтральной среды дают значения $0,67 \times 10^{-9}$ м²/с.

В среде альгинат-желатинового геля значение коэффициента диффузии, вычисленное на основе анализа кривых ЦВА в начальный момент времени составило $0,03 \times 10^{-9}$ м²/с. Это позволяет говорить о существенных диффузионных ограничениях, формируемых гелем.

Внесение пепсина приводит к существенному повышению коэффициента диффузии ($0,1 \times 10^{-9}$ м²/с), который, впрочем, не достигает значений, соответствующих буферному раствору. Очевидно, что субстратом пепсина в комбинированном гидрогеле «альгинат-желатин» является белок, а альгинатная часть недоступная протеолизу способствует частичному сохранению диффузионных ограничений. К концу эксперимента (около 40 мин.) электрохимическое поведение толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле с соотношением компонентов 1:3 в присутствии пепсина характеризуется значением разности потенциалов пиков окисления и восстановления $\Delta E = 120,3$ мВ, а также соотношением пиковых токов: $I_p^{ox}/I_p^{red} = 1,08$ при $I_p^{red} = 8,99$ мкА и $I_p^{ox} = 9,70$ мкА, что приближает систему к обратимому электрохимическому поведению. Повышение относительного содержания альгината в гидрогеле приводит к замедлению роста токов восстановления во времени при моделировании пепсинового протеолиза на электроде.

Варьируя параметры электрохимической модели (количественный состав геля, концентрацию фермента и/или красителя) можно симитировать *in electrode* диффузию в различных гидрогелевых средах при различных значениях pH, используя в качестве электроактивного компонента модели толуидиновый синий. Анализ данных циклической вольтамперометрии позволяет провести расчеты эффективного коэффициента диффузии, отражающего подвижность молекул красителя при изменении гидрогеля в ходе протеолиза.

Список литературы / References:

1. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods in biomedical studies. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 228-243.
2. Черенков И.А. Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д. Моделирование протеазной активности с использованием электрохимического интерфейса. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 2, С. 422–426. [Cherenkov I.A., Raevskich K.S., Sergeev V.G. Krivilyov M. D. Modeling protease activity using the electrochemical interface. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 422-426. (In Russ.)]
3. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta, Elsevier*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
4. 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.
5. Черенков И.А., Кропачева Т.Н., Перевозчиков 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.)]
6. Trevors J.T., Pollack G.H. Hypothesis: The origin of life in a hydrogel environment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. vol. 89, no. 1. pp. 1-8.
7. Mishra S., Scarano F.J., Calvert P. Entrapment of *Saccharomyces cerevisiae* and 3T3 fibroblast cells into blue light cured hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2012, vol. 100 A, no. 10, pp. 2829-2838.
8. González-Fernández E., Avlonitis N., Murray A. F., Mount A.R., Bradley M. Methylene blue not ferrocene: Optimal reporters for electrochemical detection of protease activity. *Biosens. Bioelectron. Elsevier*, 2016, vol. 84, pp. 82-88.
9. Deng D., Hao Y., Yang S., Han Q., Liu L., Xiang Y., Tu F., Xia N. A signal-on electrochemical biosensor for evaluation of caspase-3 activity and cell apoptosis by the generation of molecular electrocatalysts on graphene electrode surface for water oxidation. *Sensors Actuators, B Chem. Elsevier*, 2019, vol. 286, pp. 415-420.
10. Allavena P., Garlanda C., Borrello M. G., Sica A., Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 3-10.
11. Сергеев В.Г., Сергеева Т.Н., Чучков В.М. Клеточные механизмы хронического нейровоспаления. *Морфологические ведомости*, 2014, № 4, с. 31-36. [Sergeyeva T.N., Sergeev V.G., Chuchkov V.M. Cell

mechanisms of chronic neuroinflammation. *Morfologicheskie vedomosti*, 2014, no. 4, pp. 31-36. (In Russ.)]

12. Oda K., Luo Y., Yoshihara A., Ishido, Y., Sekihata K., Usukura K., Sue M., Hiroi N., Hirose T., Suzuki K. Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in thyrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier*, 2017, vol. 483, no. 1, pp. 541-546.

13. Dunn J.T., Dunn D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*, 2001, vol. 11, no. 5, pp. 407-414.

14. *Электроаналитические методы*, ред. Шольц Ф. М.: Бином «Лаборатория знаний», 2010, 326 с. [*Electroanalytical methods*, ed. Scholz F. M: Binom "Laboratoriya znaniy", 2010, 326 p. (In Russ.)]

15. Goudie M.J. et al. Investigation of Diffusion Characteristics through Microfluidic Channels for Passive Drug Delivery Applications. *J. Drug Deliv.*, 2016, vol. 2016, pp. 1-9.

DIFFUSION OF TOLUIDINE BLUE IN ALGINATE-GELATINE HYDROGEL UNDER THE INFLUENCE OF PEPSIN

Cherenkov I.A., Berezina L.S., Krivilyov M. D., Sergeyev V.G.

Udmurt State University

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

Abstract. The research is related to electrochemical processes in hydrogel media. An electrochemical model of electroactive phenothiazine dye toluidine blue (TB) diffusion in the medium of a combined alginate-gelatin gel during pepsin proteolysis was studied. The data of cyclic voltammetry (CVA) of the dye in an acidic medium are presented. The TB diffusion coefficient was calculated. It was shown, the curves of cyclic voltammetry had qualitative and quantitative changes compared to data in neutral medium. The dye diffusion in hydrogels with various compositions was studied using the CVA method. Calculations of the TB diffusion coefficient in gel media with different alginate/gelatin ratios were performed. The influence of the hydrogel composition on the character of volt-ampere curves that characterize the redox transformations of an electroactive label was elucidated. The electrochemical characteristics of toluidine blue in an alginate-gelatin hydrogel with a 1:3 component ratio in the presence of pepsin had the value of the potential difference of the oxidation and reduction peaks as $\Delta E = 120,3$ mV, as well as the ratio of peak currents: $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}} = 1,08$ at $I_{p^{red}} = 8,99$ μA and $I_{p^{ox}} = 9,70$ μA . The ratio shows that the system is close to reversible electrochemical behavior. The addition of pepsin leads to an acceleration of dye diffusion. It is quantified in a dynamic of current values and an increase in the value of the effective diffusion coefficient. The model can be used to simulate some elements of inflammatory reactions in electrode, to study the quality of enzyme preparations, to evaluate the diffusion properties of various gel-forming agents and their resistance to proteolysis.

Key words: toluidine blue, pepsin, gelatin, alginate, cyclic voltammetry.