

## ДИФФУЗИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ГИДРОГЕЛЕВЫХ СРЕДАХ: ДАННЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ЗАДАЧИ ДЛЯ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Емельянова А.Ю., Игнатьева М.М., Черенков И.А., Кривилев М.Д.

Удмуртский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 13.07.2021

**Аннотация.** В работе обобщены данные электрохимических экспериментов по исследованию диффузии толуидинового синего в гидрогелевых средах на основе биосовместимых гелеобразователей (желатина и альгината) и их комбинаций. Приведены расчеты коэффициентов диффузии на основании данных электрохимических экспериментов. Экспериментальные данные использованы для расчетов диффузионной задачи в модели, описывающей связь геометрии гелевой капли, коэффициента диффузии с временем формирования отклика и насыщением поверхности электрода электроактивными молекулами. Показаны ограничения диффузионной модели для описания экспериментальных данных. Сформулированы направления дальнейшего развития модели.

**Ключевые слова:** толуидиновый синий, циклическая вольтамперометрия, альгинат, желатин, гидрогели, COMSOL Multiphysics

Для создания органов-на-чипе, тканеинженерных конструкций, а также для моделирования гистофизиологических процессов, происходящих в межклеточном матриксе, необходимы сравнительно простые и информативные модели, которые позволяют количественно описать диффузионные, адсорбционные и биокаталитические свойства гидрогелевых сред [1-3]. Представляется перспективным использовать для этого электрохимические методы, в последние десятилетия все шире применяемые для решения биомедицинских задач [4-6].

В предыдущих работах мы представили результаты серии экспериментов, иллюстрирующих концепцию биоэлектрохимического моделирования [7,8]. На некоторых ее аспектах хотелось бы остановиться подробнее.

Как правило, для биоэлектрохимических систем используют электроактивную молекулу-медиатор, способную к электрохимическим окислительно-восстановительным превращениям на поверхности рабочего электрода [9]. Медиатор должен обладать обратимым электрохимическим поведением, которое характеризуется воспроизводимыми вольтамперными кривыми циклической вольтамперометрии (ЦВА). В биоэлектрохимическом моделировании в гидрогелевых средах медиатору отводится две основных роли. Во-первых, с помощью анализа вольтамперных зависимостей можно оценить диффузионные свойства среды, отражающие проницаемость гидрогеля для конкретного медиатора. Например, для катионного красителя толуидинового синего (ТС) диффузия красителя зависима от наличия и количества анионных групп в составе геля. Учитывая, что углеводные компоненты межклеточного матрикса представляют собой полианионы [10], ТС как компонент электрохимической модели позволит количественно оценить их содержание. Используя анионные или незаряженные медиаторы в одной и той же среде с последующим сопоставлением вольтамперограмм можно получить представление о составе гидрогелевого матрикса в отношении анионных и катионных групп без существенных повреждающих воздействий на образец.

Учитывая обратимое электрохимическое поведение медиатора, можно провести расчет эффективного коэффициента диффузии, используя уравнение Рейндса-Шевчика. Такие данные востребованы для детализации фармакокинетики лекарственных средств. Токи ЦВА для диффузионно контролируемого электрохимического процесса пропорциональны коэффициенту диффузии, а, следовательно, могут быть использованы для оценки проницаемости среды, а если анализируется белоксодержащий гидрогель, то и для оценки протеолиза – поскольку активность протеаз снимает диффузионные ограничения и способствует ускорению роста пиковых значений силы тока [7,8]. Еще одной задачей медиатора в биоэлектрохимической модели является оценка окислительно-восстановительного равновесия среды. Как правило, медиатор способен к окислительно-восстановительным превращениям не только в электрохимических процессах, но и под действием ферментов (оксидаз, дегидрогеназ и др.). Это приводит к изменению соотношения окисленной и восстановленной форм медиатора независимо от электродных процессов и отразится на характере вольтамперных кривых ЦВА. Отметим, что многие фармакологические субстанции и биологически активные молекулы обладают электроактивностью и могут непосредственно использоваться в биоэлектрохимических моделях [11,12]. Таким образом, анализ электрохимического поведения медиатора в гидрогелях методом ЦВА может дать информацию о составе и свойствах среды и позволяет моделировать ряд биологически значимых процессов.

Многие вопросы биоэлектрохимического моделирования можно решать с помощью расчетных моделей, учитывающих диффузионные параметры и геометрию электрода и гидрогелевой капли. Расчетные методы необходимы для рационального планирования биоэлектрохимического эксперимента. Их применение позволит

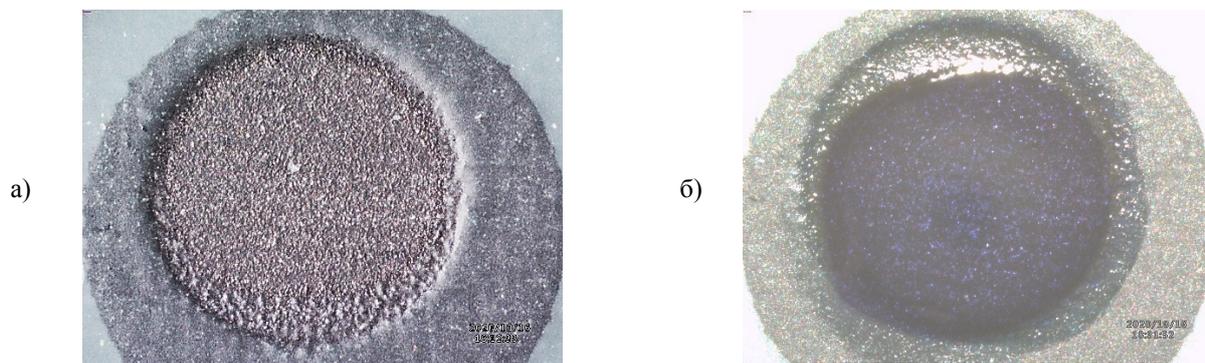


Рисунок 1. Поверхность рабочего электрода (а) с каплей гидрогеля (б)

оптимизировать объем и концентрацию гидрогеля, облегчить подбор медиатора с необходимыми диффузионными и электрохимическими свойствами, определить концентрации медиатора в системе, каталитическую активность биологических компонентов (ферментов и клеток).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды (графитовые), а также электрод сравнения – хлорсеребряный. Для формирования гидрогелевой среды на поверхности рабочего электрода использовали альгинат натрия и желатин в виде 3% (масс.) растворов на забуференном физиологическом растворе (ЗФР), которые готовили непосредственно перед экспериментом.

Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов +1200...–1200 мВ в среде ФСБ для стабилизации характеристик. Для полимеризации альгината использовали 2 М раствор хлорида кальция, наносимый непосредственно на рабочий электрод при подготовке. Избыток раствора через некоторое время удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Наличие и локализацию гелевой капли на электроде контролировали с помощью цифрового микроскопа «Биолаб В-3 LCD» (рис. 1).

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовался диапазон потенциалов 0...–450 мВ (отн. Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала 100 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 50 минут с интервалами в 5 минут. Концентрация толуидинового синего во всех измерениях была постоянной и составила 0,1 мМ. Фоновым электролитом служил ФСБ.

Для моделирования диффузии ТС в капле гидрогеля использованы возможности пакета COMSOL Multiphysics 5.5, интерактивной среды для моделирования и расчетов различных физических задач, основанных на дифференциальных уравнениях в частных производных.

В соответствии с геометрией рабочего электрода была выбрана аксиально-симметричная расчетная область (*Axial 2D*). Форму капли наносимого на электрод гидрогеля определяли как полуэллипсоид, высота которого зависит от объема наносимого гидрогеля и площади рабочего электрода ( $S = 3 \times 10^{-6} \text{ м}^2$ , в модели задавали через радиус рабочей области электрода,  $R = 9,75 \times 10^{-4} \text{ м}$ ). Так, для гидрогелей объемами 0,1, 0,5 и 1 мкл высоты капли равны  $5,02 \times 10^{-5}$ ,  $2,51 \times 10^{-4}$  и  $5,02 \times 10^{-4} \text{ м}$  соответственно. Геометрия капли представлена на рисунке 2.

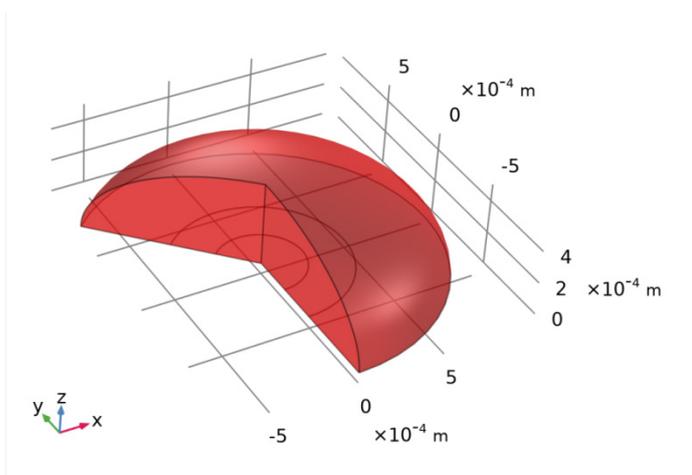


Рисунок 2. Геометрические параметры гидрогелевой капли, наносимой на рабочий электрод

Рассмотрен вариант простой диффузии, подчиняющейся закону Фика (использован физический интерфейс *Transport of Diluted Species* раздела *Chemical Species Transport*), в отсутствие как конвективного переноса, так и движения электроактивной метки в электрическом поле. Таким образом, в данной модели рассматривается исключительно диффузионная задача, гель представлен пассивным, а процесс диффузии описывается следующими уравнениями:

$$\partial C/\partial t + \nabla J = R$$

$$J = -D\nabla C$$

Коэффициенты диффузии  $D$  задаются в параметрах модели и характеризуют проницаемость гидрогелей разных концентраций. Для системы без гелеобразователя использован коэффициент диффузии ТС в водных растворах приведенный в литературе ( $D_{\text{зФР}} = 1,42 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ) [13], а для альгинатного гидрогеля – рассчитанные на основании экспериментальных данных ЦВА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вольтамперные кривые, характеризующие электрохимическое поведение ТС подробно описаны нами в предыдущих работах [7,8]. В диапазоне потенциалов 0...-450 мВ они имеют два отчетливых пика, соответствующих электровосстановлению и электроокислению ТС. По модулю значения пиковых токов близки, а соответствующие им потенциалы сближены, что может служить критериями обратимого электрохимического процесса [14]. Для таких условий применимо уравнение Рендлса-Шевчика:

$$I_p = -0,446cA \sqrt{\frac{n^3 F^3 v D}{RT}},$$

где  $I_p$  – пиковые значения силы тока (А);  $c$  – концентрация ТС (моль/м<sup>3</sup>);  $A$  – площадь рабочего электрода (м<sup>2</sup>);  $n$  – число электронов, участвующих в электрохимической реакции;  $F$  – постоянная Фарадея (Кл/моль),  $v$  – скорость развертки потенциала (В/с),  $D$  – коэффициент диффузии (м<sup>2</sup>/с),  $R$  – универсальная газовая постоянная (Дж/моль·К),  $T$  – температура (К) [14], Позволяющее по значениям пиковых токов рассчитать коэффициент диффузии красителя.

Расчетное значение коэффициента диффузии ТС в среде желатинового гидрогеля составило  $0,4 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ , что заметно ниже оценочных значений коэффициента диффузии ТС для водных сред, полученных по данным расчетов на основе приближения Стокса-Эйнштейна, приведенных в литературе ( $1,42 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ) [13]. Гидрогель альгината, стабилизированный ионами кальция, существенно замедляет диффузию красителя ( $D = 0,08 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ ). Смешивая при подготовке гелевой среды растворы альгината и желатина в равных пропорциях, удается повысить коэффициент диффузии ( $D = 0,7 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$ ), а инкубация этой смеси с ионами кальция способствует существенному повышению коэффициента диффузии ( $D = 1 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$ ), приближая его к расчетным значениям, полученным для водных растворов. При этом время формирования сигнала в среде желатинового гидрогеля (появление пиков на вольтамперных кривых после внесения раствора ТС) составило около 30 с, и за время эксперимента не происходило выхода показателей силы тока на постоянные значения, соответствующие насыщению электродной поверхности. В среде альгинатного гидрогеля различаемые токи также появились на первом цикле (30 с), а через 300 секунд показатели пиковых токов приняли относительно постоянное значение, что можно рассматривать как установление равновесия у электродной поверхности. При этом максимальные значения токов в среде альгината не достигали показателей, полученных в гидрогеле желатина.

Экспериментальные данные использовали для расчетов в диффузионной модели с разными объемами геля на электроде и разными коэффициентами диффузии. В связи с тем, что объем наносимого раствора электроактивной метки во много раз больше объема геля, на боковой границе полуэллипсоида была задана постоянная концентрация ТС в объеме наносимого раствора, использованная во всех электрохимических экспериментах  $C_{\text{ТС}} = 10^{-4} \text{ М}$ . В то же время в остальном объеме геля на начальный момент времени задана нулевая концентрация ТС.

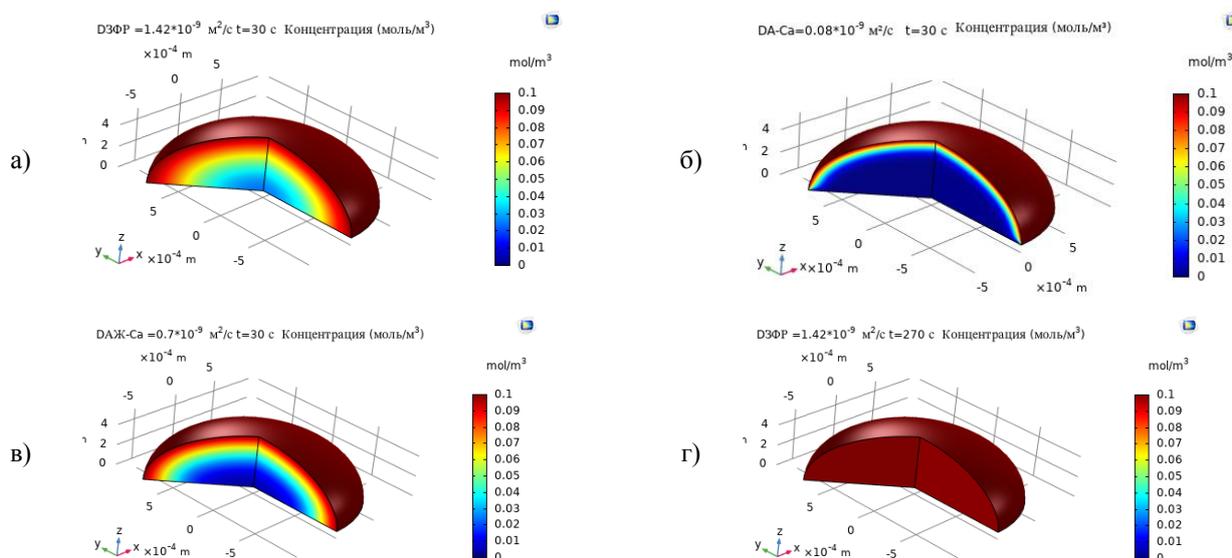
$$C_{\text{ТС}0} = 0.$$

Для ограничения переноса массы на нижней границе полуэллипсоида (гель у поверхности электрода) задано граничное условие *No Flux*.

Можно отметить, что согласно уравнению Рейндлса-Шевчика, время выхода тока на пиковые значения совпадает со временем насыщения поверхности электрода красителем, что в модели является временем выравнивания концентрации на поверхности рабочего электрода. Вследствие этого при расчете времени выхода тока на плато в качестве секущей точки был выбран центр поверхности рабочего электрода. Для оценки времени возникновения токов на электроде выбрана точка, удаленная от края капли на  $0,01R$ .

На модели проведены параметрические исследования поведения ТС в геле в зависимости как от коэффициента диффузии, так и от геометрии капли, в частности, для расчетных коэффициентов  $D_{\text{зФР}}$  (в среде буферного раствора),  $D_{\text{А-Са}}$  (в среде альгината кальция) и  $D_{\text{АЖ-Са}}$  (в среде альгинат-желатинового геля), и для объемов равных 0,1, 0,5, 1 мкл. Расчеты проводились для временного интервала 50 минут с шагом 1 с.

В предложенном виде модель позволяет произвести расчеты распределения красителя в капле на поверхности рабочего электрода (рис. 3), провести оценку времени появления красителя на поверхности электрода и ее насыщения электроактивными молекулами.



**Рисунок 3.** Распределение красителя в капле среды  $V=1$  мкл для различных коэффициентов диффузии, соответствующих отсутствию геля (а), гидрогелю альгината кальция и альгинат-желатиновому гелю (в) через 30 с., а также после установления равновесия (г). Изображения получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

При расчёте времени насыщения электродной поверхности медиатором для различных объемов капли получены данные, приведенные в таблице 1. Для объемов 0,5 и 1 мкл., расчётные показатели времени насыщения заметно выше экспериментальных значений. По-видимому, для условий буферного раствора без гидрогелевой среды существенный вклад вносят конвекционные процессы.

Обращает на себя внимание расхождение расчетных показателей времени насыщения поверхности ТС для альгинатного геля с экспериментальными данными. При ЦВА именно альгинатный гель обеспечивал относительно быструю стабилизацию токов.

Для капли объемом 0,1 мкл наблюдаем быстрое установление равновесия во всех случаях, так, к моменту завершения первого цикла ЦВА, по всему объему капли концентрация ТС постоянна и равна  $C_{ТС}=10^{-4}$  М.

Были проведены расчеты концентрации ТС на поверхности рабочего электрода для условий разных коэффициентов диффузии. Такие расчеты показывают ориентировочное «время ответа» электрохимической системы (табл. 2).

Полученные данные показывают, что в пределах одной секунды на электроде может быть достигнута концентрация ТС, доступная для регистрации методом ЦВА, для всех исследованных гидрогелей. При этом для малого объема геля различия со средой буферного раствора незначительны, а нанесение большего объема гидрогеля (особенно с низким коэффициентом диффузии ТС) позволяет уже на начальных этапах эксперимента различить среды с разной проницаемостью.

**Таблица 1** Ожидаемое время (с) насыщения поверхности рабочего электрода толуидиновым синим для различных сред и объемов капли гидрогеля. Данные получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

$D$ (м²/с)	$V$ (мкл)	0,1	0,5	1
Буферный раствор ( $1,42 \times 10^{-9}$ )		4	99	270
Альгинат-желатиновый гель ( $0,7 \times 10^{-9}$ )		10	192	547
Альгинат кальция ( $0,08 \times 10^{-9}$ )		85	2975	>3600

**Таблица 2** Концентрация толуидинового синего (мкмоль/л) при  $t = 1$  с. в точке поверхности рабочего электрода, удаленной от края капли на  $0,01R$ , для различных сред и объемов капли гидрогеля. Данные получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

$D$ (м²/с)	$V$ (мкл)	0,1	0,5	1
Буферный раствор ( $1,42 \times 10^{-9}$ )		100	92	87
Альгинат-желатиновый гель ( $0,7 \times 10^{-9}$ )		99	86	81
Альгинат кальция ( $0,08 \times 10^{-9}$ )		96	48	44

Таким образом, при решении относительно простой диффузионной задачи, удалось получить удовлетворительное соответствие данных экспериментальным показателям. В существующем виде модель позволяет предсказать скорость поступления красителя к электроду для разных типов гидрогелей, оценить время формирования отклика системы (при условии диффузионного контроля электрохимического процесса), влияния геометрии гелевой капли, концентрации электроактивного вещества. При этом можно сформулировать направления совершенствования модели:

- необходимо ввести в модель описание адсорбции электроактивного вещества компонентами гидрогеля. Например, катионные красители (ТС) взаимодействуют с полианионными гелеобразователями (альгинатом), что вносит существенный вклад в формирование результирующего сигнала и может служить фактором, объясняющим результаты расхождения экспериментальных данных и результатов моделирования для системы «альгинат-ТС»;
- для воспроизведения условий сдвига окислительно-восстановительного равновесия требуется введение параметра «соотношение окисленной и восстановленной формы медиатора» как в объеме раствора, так и на поверхности электрода;
- для имитации гистофизиологических процессов необходима возможность внесения в гидрогель «неоднородностей», определяющих локальные изменения окислительно-восстановительных и диффузионных свойств гидрогеля, отражающие активность клеток.

#### Список литературы / References:

1. Giobbe G.G., Crowley C., Luni C., Campinoti S., Khedr M., Kretzschmar K., De Santis M.M., Zambaiti E., Michielin F., Meran L., Hu Q., van Son G., Urbani L., Manfredi A., Giomo M., Eaton S., Cacchiarelli D., Li V., Clevers H., Bonfanti P., De Coppi P. Extracellular matrix hydrogel derived from decellularized tissues enables endodermal organoid culture. *Nature communications*, 2019, vol. 10, № 1, p. 5658. doi: 10.1038/s41467-019-13605-4
2. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
3. 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.*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 1674-1682.
4. Tsivadze A.Y., Batishchev O.V., Andreev V.N., Petrikov S.S., Goroncharovskaya I.V., Evseev A.K., Shabanov A.K., Goldin M.M. Voltammetric analysis in blood serum in patients with severe combined trauma. *Doklady Physical Chemistry*, 2019, vol. 486, no. 1. pp. 67-69.
5. Андреев В.Н., Евсеев А.К., Гараева Г.Р., Гольдин М.М. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови. *Молекулярная медицина*, 2013, № 4, С. 37-40. [Andreev V.N., Evseev A.K., Garaeva G.R., Goldin M.M. Blood serum redox potential and antioxidant activity comparison. *Molekulyarnaya medicina*, 2013, no. 4, pp. 3740. (In Russ.)]
6. 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.
7. 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.)]
8. Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г. Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле при воздействии пепсина. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3, с. 481-485. [Cherenkov I.A., Berezina L.S., Krivilyov M. D., Sergeyev V.G. Diffusion of toluidine blue in alginate-gelatine hydrogel under the influence of pepsin. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 481-485. (In Russ.)]
9. Rawson F.J., Downard A.J., Baronian K.H. Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, p. 5216.
10. Серов В.В., Шехтер А.Б. *Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология)*. М.: Медицина, 1981, 312 с. [Sеров V.V., Shechter A.B. *Connective tissue (functional morphology and general pathology)*. М.: Medicine, 1981, 312 p. (In Russ.)]
11. Kumar S.A., Chen S.L., Chen S.M. Amperometric sensor for detection of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide using a poly (pyronin B) film modified electrode. *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, no. 12, pp. 1379-1386.
12. Huang J., Zeng Q., Bai S., Wang L. Application of Coal in Electrochemical Sensing. *Anal. Chem.*, 2017, vol. 89, no. 16, pp. 8358-8365.
13. Goudie M.J., Ghuman A.P., Collins S.B., Pidaparti R.M., Handa H. Investigation of diffusion characteristics through microfluidic channels for passive drug delivery applications. *J. Drug Deliv.*, 2016. doi: 10.1155/2016/7913616
14. *Электроаналитические методы*, ред. Шольц Ф. М.: Бином «Лаборатория знаний», 2010, 326 с. [Electroanalytical methods, ed. Scholz F., M: Binom "Laboratoriya znanij", 2010, 326 p. (In Russ.)]

**TOLUIDINE BLUE DYE DIFFUSION IN HYDROGEL MEDIA: ELECTROCHEMICAL EXPERIMENTS  
DATA AND TASKS FOR NUMERICAL SIMULATION****Emelyanova A.Yu., Ignat'eva M.M., Cherenkov I.A., Krivilyov M.D.**

Udmurt State University

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

**Abstract.** This work summarizes the electrochemical experiments data in the study of toluidine blue dye diffusion in hydrogel media based on biocompatible gelling agents (such as gelatin and alginate) and their combinations. Diffusion coefficient calculations based on electrochemical experiments findings are shown. Experimental data is used for diffusion simulation study in a model describing connection of gel drop geometry and diffusion coefficient to the response generation time and electrode surface saturation with electroactive molecules. Diffusion model restrictions for describing experimental data are shown. Further model development directions are formulated.

**Key words:** *toluidine blue, cyclic voltammetry, alginate, gelatin, hydrogels, COMSOL Multiphysics.*