

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА САЛЬМОНЕЛЛЫ НА ДИФФУЗИЮ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В АЛЬГИНАТНОМ ГИДРОГЕЛЕ

Новаковская М.В., Игнатъева М.М., Черенков И.А.

Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: gvomavl@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0544

Аннотация. В работе рассматриваются данные электрохимических экспериментов по исследованию диффузии толуидинового синего в альгинатном гидрогеле с непосредственным добавлением липополисахарида разных концентраций в систему. С помощью метода циклической вольтамперометрии были зафиксированы изменения силы тока, протекающего через электрохимическую ячейку, на которую накладывалось напряжение, изменяющееся во времени. Была выявлена зависимость окислительно-восстановительных превращений фенотиазинового красителя в модельных растворах эндотоксина. Показано, что присутствие бактериального токсина в альгинатном гидрогеле оказывает значительное влияние на электрохимическое поведение красителя - в диапазоне концентраций липополисахарида 0,1-10 мкг/мл. На всех полученных вольтамперограммах зафиксированы качественные изменения по сравнению с контрольным образцом. Внесённый липополисахарид, выделенный из бактерий *Salmonella typhi* способствовал повышению и анодного, и катодного токов, а также сдвигу значений потенциалов как при непосредственном его добавлении в ячейку, так и через 30 минут диффузии. В зависимости «ток-время» для восстановительного процесса замечено повышение катодных пиковых значений с увеличением концентрации эндотоксина в электрохимической системе. Полученные данные указывают на важность учёта качественного состава гидрогелевой среды, а также вводимых в неё дополнительных компонентов при проведении биоэлектрохимического эксперимента.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, альгинат, гидрогель, толуидиновый синий, липополисахарид.

Применение электрохимических методов анализа для решения биомедицинских задач является перспективным современным направлением. Используя подходы электрохимии, можно количественно оценить внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы [1], определить активность ферментов [2,3], исследовать взаимодействие биологически значимых молекул на поверхности электрода [4]. Современные электрохимические методы позволяют без существенного повреждающего воздействия на образец провести качественное и количественное определение электроактивных компонентов, их распределение и окислительно-восстановительное состояние в модельном гидрогелевом матриксе [5,6].

Многие клеточные популяции реагируют на присутствие ЛПС активацией окислительно-восстановительных процессов [7], которые можно оценить электрохимическими методами. Перспективным выглядит использование ЛПС как стимулятора в клеточных биоэлектрохимических модельных системах. Однако известна способность ЛПС непосредственно связываться с фенотиазиновыми красителями, в частности с толуидиновым синим [8], что может оказать влияние на результат биоэлектрохимического эксперимента не связанное с клеточной активностью. Целью настоящей работы стало исследование влияния бактериального липополисахарида на электрохимическое поведение толуидинового синего в среде альгинатного гидрогеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались планарные электродные системы (ООО «КолорЭлектроникс»), включающие рабочий и вспомогательный электроды (графитовые), а также электрод сравнения – хлорсеребряный. Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов +1000...-1000 мВ в среде ФР для стабилизации характеристик. Для формирования гидрогелевой среды на поверхности рабочего электрода использовали альгинат натрия на физиологическом растворе (ФР, pH = 6,83, ООО «Гротекс»), которые готовили непосредственно перед экспериментом. В готовые образцы добавляли ЛПС *Salmonella typhi* («Пиругенал») различной концентрации. 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 рабочем электроде контролировали с помощью цифрового микроскопа «Биолаб В-3 LCD». 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 35 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 30 минут с интервалами в 5 минут. Концентрация толуидинового синего во всех измерениях была постоянной и составила 0,1 мМ. Фоновым электролитом служил ФР. Согласно рекомендациям традиционной номенклатуры, на графиках ЦВА отрицательные токи соответствуют процессам электроокисления, а положительные – процессам электровосстановления [9].

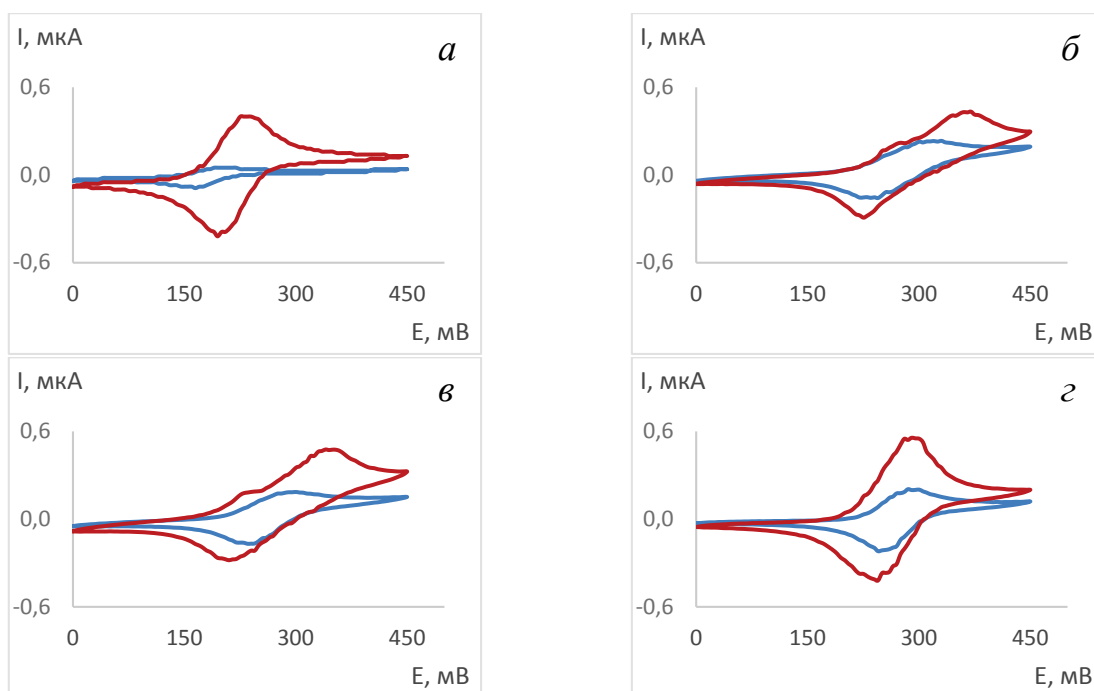


Рисунок 1. Вольтамперограммы ЦВА толуидинового синего в момент начала измерения (синий) и через 30 минут (красный) в среде альгинатного гидрогеля 2% без добавления ЛПС (а), в присутствии ЛПС разных концентраций: 0,1 мг/мл (б), 1 мг/мл (в), 10 мг/мл (г). Графитовый электрод. Фоновый электролит ФР pH 6,83. Скорость развертки потенциала 35 мВ/с. Усреднённые данные по 5 экспериментам

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В серии экспериментов ЛПС добавляли в ячейку непосредственно перед измерениями. Такая схема имитирует стимуляцию клеток на электроде *in situ*. Анализируемыми параметрами были пиковые значения силы тока, отражающие окисление или восстановление ТС, соответствующие им значения потенциалов, а также изменения токов во времени - показатель диффузионных свойств гидрогелевой среды. В контрольном эксперименте (рис. 1а) без добавления ЛПС получена вольтамперограмма, отражающая близкое к обратимому поведение ТС – к 30 минуте эксперимента на ЦВА отчетливо фиксируется пик восстановления (при $E = +200$ мВ) и пик окисления ($E = +164,8$ мВ) абсолютные значения токов относительно базовой линии оказались равными, а значения потенциалов сближены ($\Delta E = 35,2$ мВ), что соответствует критериям обратимого электрохимического поведения ТС в условиях эксперимента. Диффузия в гидрогелевой среде обуславливает рост катодных токов в процессе измерений с $+0,05$ мкА до $+0,4$ мкА, а анодных – с $-0,08$ мкА до $-0,45$ мкА (табл. 1).

На всех циклических вольтамперных кривых после добавления ЛПС наблюдались качественные изменения по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). Внесение липополисахарида, по нашим данным, способствует повышению значений катодного и анодного тока на первых секундах эксперимента, что может быть вызвано формированием комплексов ТС и ЛПС [8,10] на электродной поверхности, облегчающих электрохимические превращения ТС. Возможность формирования полимерных комплексов ЛПС-ТС может объяснить и сдвиги потенциалов, наблюдаемые в экспериментах.

На 30-й минуте эксперимента отмечено более выраженное влияние ЛПС на электрохимические показатели превращений ТС. Пиковые значения катодных токов оказались ниже контрольных для концентраций ЛПС 0,1 и 1 мг/мл, а при добавлении 10 мг/мл – выше (табл. 2). Существенно ниже оказались анодные токи при содержании ЛПС в ячейке 0,1 и 1 мг/мл. При этих концентрациях наблюдали максимальное значение разности потенциалов пиков (ΔE). Такие показатели приближают процесс электрохимических превращений ТС в

Таблица 1. Пиковые значения силы тока для процессов электровосстановления (I_{pc}) и электроокисления (I_{pa}) и соответствующие потенциалы при добавлении ЛПС

Концентрация ЛПС	I_{pc} , мкА	I_{pa} , мкА	I_{pc}/I_{pa}	E_{pc} , мВ	E_{pa} , мВ	ΔE
0	0,05	-0,08	0,63	200	164,8	35,2
0,1 мг/мл	0,17	-0,19	0,89	315	235	80
1 мг/мл	0,15	-0,17	0,88	290	244,8	45,2
10 мг/мл	0,19	-0,21	0,9	290	250,3	39,7

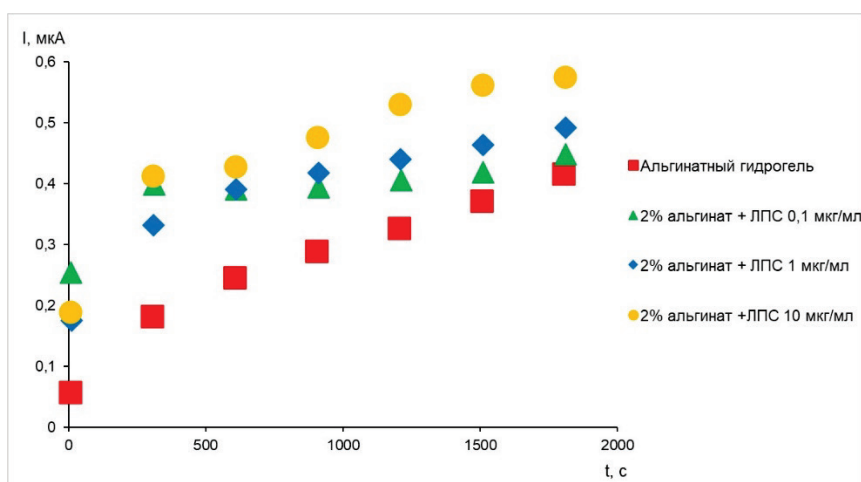


Рисунок 2. Изменения пиковых значений силы тока восстановления ТС (0,1 мМ) в среде альгината с ЛПС Графитовый электрод. Фоновый электролит ФР рН 6,83. Скорость развертки потенциала 35 мВ/с. Усреднённые данные по 5 измерениям

Таблица 2. Пиковые значения силы тока для процессов электровосстановления (I_{pc}) и электроокисления (I_{pa}) и соответствующих потенциалов при непосредственном добавлении ЛПС разных концентраций спустя 30 минут диффузии красителя

Концентрация ЛПС	I_{pc} , мкА	I_{pa} , мкА	I_{pc}/I_{pa}	E_{pc} , мВ	E_{pa} , мВ	ΔE
0	0,4	- 0,45	0,89	235	194,7	40,3
0,1 мкг/мл	0,35	- 0,18	1,94	365,1	225,3	139,8
1 мкг/мл	0,36	-0,15	2,4	340	214,9	125,1
10 мкг/мл	0,53	-0,42	1,26	290	244,8	45,2

присутствии малых концентраций ЛПС с критериями необратимости. При относительно высоких концентрациях ЛПС (10 мкг/мл) электрохимические показатели приближаются к контрольным значениям (табл. 2).

Обращает на себя внимание увеличение токов, характеризующих процесс электровосстановления ТС в присутствии ЛПС с концентрациями 0,1 и 1 мкг/мл. Возможным объяснением асимметрии вольтамперных кривых может быть большее сродство окисленной – катионной формы ТС к липополисахариду.

Зависимость «ток-время» для пиковых значений токов восстановления показала заметное превышение их значений на начальных этапах эксперимента в присутствии липополисахарида, не зависящее от его концентрации. К 15-й минуте эксперимента показатели токов сближаются с контрольными значениями, а с 20-й минуты заметно зависят от концентрации ЛПС.

Таким образом, присутствие липополисахарида сальмонеллы в модельном альгинатном гидрогеле оказывает существенное влияние на параметры электрохимических превращений толуидинового синего. Присутствие ЛПС повышает значения токов электровосстановления ТС, что необходимо учитывать при расчете эффективного коэффициента диффузии ТС по данным электрохимического эксперимента. Полученные данные говорят о важности учета качественного состава гидрогелевой среды при проведении биоэлектрохимического эксперимента.

Список литературы / References:

1. 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.
2. 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.
3. 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., Sergeev V.G. Diffusion of toluidine blue in alginate-gelatin hydrogel under the influence of pepsin. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 481-485. (In Russ.)]
4. Lopes P., Dyrnesli H., Lorenzen N., Otzen D., Ferapontova E.E. Electrochemical analysis of the fibrillation of Parkinson's disease α -synuclein. *Analyst*, 2014, vol. 139, no. 4, pp. 749-756.
5. Mozumder M.S., Mairpady A., Mourad A.H.I. Polymeric nanobiocomposites for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res., Part B Appl. Biomater.*, 2017, vol. 105, no. 5, pp. 1241-1259.
6. Черенков И.А. Кривилев М.Д., Игнатьева М.М., Вахрушева Е.В., Сергеев В.Г. Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толуидинового синего в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипсина. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 5, с. 865-870. [Cherenkov I.A., Krivilev M.D., Ignat'eva M.M., Vahrusheva E.V., Sergeev V.G.

Bioelectrochemical modeling of toluidine blue diffusion in a hydrogel in the presence of peroxidase and trypsin. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 5, pp. 733-737. (In Russ.)]

7. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и Клетки*, 2016, т. 11, № 1, с. 9-17. [Sarbaeva N.N., Ponomareva J.V., Milyakova M.N. Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. *Genes and Cells*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]

8. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. The Interaction of Lipopolysaccharides with Phenothiazine Dyes. *Lasers Surg. Med.*, 2003, vol. 33, no. 5, pp. 311-319.

9. *Электроаналитические методы*. Ред. Шольц Ф., М.: Бинوم "Лаборатория знаний", 2010, 326 с. [*Electroanalytical methods*. ed. Sholz F., M.: Binom "Laboratorija znaniy", 2010, 326 p. (In Russ.)]

10. Ribatti D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, vol. 176, no. 1., pp. 55-60.

INFLUENCE OF SALMONELLA LIPOPOLYSACCHARIDE ON THE DIFFUSION OF TOLUIDINE BLUE IN ALGINATE HYDROGEL

Novakovskaya M.V., Ignatieva M.M., Cherenkov I.A.

Udmurt State University

Universitetskaya str., 1, Izhevsk, 426034, Russia; e-mail: gvomavl@gmail.com

Received 24.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0544

Abstract. The paper considers the data of electrochemical experiments to study the diffusion of toluidine blue in an alginate hydrogel with the direct addition of lipopolysaccharide of different concentrations into the system. Using the method of cyclic voltammetry, changes in the strength of the current flowing through an electrochemical cell were recorded, on which a voltage varying over time was applied. The dependence of redox transformations of phenothiazine dye in model solutions of endotoxin was revealed. It has been shown that the presence of bacterial toxin in alginate hydrogel has a significant effect on the electrochemical behavior of the dye - in the range of lipopolysaccharide concentrations of 0.1-10 mcg/ml. Qualitative changes in comparison with the control sample were recorded on all received voltammograms. The introduced lipopolysaccharide isolated from *Salmonella typhi* bacteria contributed to an increase in both the anode and cathode currents, as well as a shift in potential values both when it was directly added to the cell and after 30 minutes of diffusion. Depending on the "current-time" for the recovery process, an increase in cathode peak values was observed with an increase in the concentration of endotoxin in the electrochemical system. The data obtained indicate the importance of taking into account the qualitative composition of the hydrogel medium, as well as the additional components introduced into it during the bioelectrochemical experiment.

Key words: cyclic voltammetry, alginate, hydrogel, toluidine blue, lipopolysaccharide.