

## БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ГИДРОГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ И ТРИПСИНА

© 2021 г. И.А. Черенков\*, \*\*, М.Д. Кривилев\*, \*\*\*, М.М. Игнатьева\*,  
Е.В. Вахрушева\*, \*\*, В.Г. Сергеев\*, \*\*

\*Удмуртский государственный университет, 426034, Ижевск, ул. Университетская, 1

\*\*Ижевская государственная медицинская академия, 426034, Ижевск, ул. Коммунаров, 281

\*\*\*Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, 426067, Ижевск, ул. Татьяны Барамзиной, 34

E-mail: ivch75@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

После доработки 29.03.2021 г.

Принята к публикации 20.07.2021 г.

Методом циклической вольтамперометрии изучено электрохимическое поведение феноксиазинового красителя толуидинового синего в желатиновом гидрогеле в присутствии трипсина, пероксидазы и их комбинации. Показано, что содержащаяся в гидрогеле пероксидаза оказывает существенное влияние на электрохимические превращения толуидинового синего в течение первых 30 с измерений. Добавление трипсина усиливает эффект пероксидазного катализа. Экспериментально обоснована возможность одновременной оценки протеолиза и окислительно-восстановительного равновесия в модельной гидрогелевой системе при анализе вольтамперных кривых циклической вольтамперометрии. Полученные результаты обосновывают схему и принципы биоэлектрохимического моделирования диффузии электроактивных молекул в межклеточном матриксе.

*Ключевые слова:* циклическая вольтамперометрия, биоэлектрохимия, гидрогели, трипсин, пероксидаза, толуидиновый синий, *in electrode*-модели.

DOI: 10.31857/S0006302921050045

Электрохимические методы стали неотъемлемым элементом современной физико-химической биологии [1–5], а в последнее десятилетие электрохимия из аналитического метода превратилась в информативный инструмент моделирования биологических процессов *in electrode* [6]. В контексте электрохимического моделирования процессов, происходящих на уровне тканей, большой интерес представляет исследование гидрогелевых сред, являющихся естественными для большинства клеток многоклеточного организма [7–11]. На наш взгляд, электрохимические эксперименты с использованием гидрогелевых сред наиболее адекватно отражают процессы, происходящие во внеклеточном матриксе, и могут служить прототипами *in electrode*-моделей биологически значимых процессов (воспаление, морфогенез, регенерация, синтез и выделение гормональных продуктов, и др.), которые во многом определяются физико-химическими свой-

ствами матрикса [11]. Такие модели оптимальны и для изучения свойств матриксов тканеинженерных конструкций, и для конструирования электрохимических биосенсоров [10, 12–14].

Одной из проблем при создании *in electrode*-моделей является то, что окислительно-восстановительные реакции, сравнительно легко воспроизводимые в электрохимическом эксперименте, в биологических средах, как правило, осложняются ферментативным катализом. При этом ферменты матрикса оказывают влияние не только на скорость собственно редокс-превращений реагентов, но и на диффузионные свойства биологического гидрогеля, определяющие их локальные концентрации.

Для сопряжения биохимических реакций с электродными целесообразно использовать медиаторы — молекулы, способные к быстрым и обратимым окислительно-восстановительным превращениям как в биологических, так и в электрохимических процессах [15]. В настоящей работе в качестве электрохимического медиатора использовали феноксиазинового красителя толуидинового синего (ТС). В предыдущих исследованиях

*Сокращения:* ТС — краситель толуидиновый синий, ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор, ЦВА — циклическая вольтамперометрия.

мы выяснили, что ТС в нейтральных буферных растворах обладает воспроизводимым электрохимическим поведением [16], которое хорошо соответствует диагностическим критериям обратимости [17]. При этом лимитирующей стадией электрохимических превращений ТС является его диффузия к электродной поверхности. Это подтверждается экспериментами в гидрогелевых средах, когда протеолиз существенно ускоряет рост пиковых значений силы тока, повышая значения эффективного коэффициента диффузии ТС в гелевой среде [16, 18]. Пероксидаза способна использовать ТС в качестве восстановителя [19], оказывая влияние на соотношение окисленных и восстановленных форм красителя в системе, что позволяет применять ее для моделирования сдвигов окислительно-восстановительного равновесия в тканях при использовании ТС как электроактивной метки.

Таким образом, на поведение электроактивной метки в межклеточном матриксе влияет комплекс разнообразных факторов, нуждающийся в детальном изучении, в том числе и методами электрохимического моделирования. Поэтому целью настоящей работы стало исследование электрохимического поведения толуидинового синего как электроактивного медиатора в условиях модельной гидрогелевой среды при действии трипсина и пероксидазы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали планарные электродные системы (ООО НПП «Автоком», Москва, Россия), изготовленные методом трафаретной печати и включающие рабочий и вспомогательный электроды на основе графита, электрод сравнения – хлорсеребряный.

Фоновым электролитом во всех измерениях служил фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (рН 7.2), на котором готовили и все рабочие растворы. Перед измерениями электроды подвергали циклированию в буферном растворе в диапазоне потенциалов +1000...–1000 мВ для стабилизации характеристик. Для формирования гидрогеля на рабочий электрод наносили 1 мкл раствора желатина (1.5 масс.%) или 1 мкл раствора желатина, содержащего пероксидазу из корней хрена ( $RZ > 3.0$ ) с удельной активностью 250 ед/мг. После формирования на рабочем электроде гидрогеля в ячейку вносили раствор ТС (0.1 мМ) с эквимоллярным раствором пероксида водорода. В отдельной серии экспериментов для моделирования протеолиза к перечисленным реагентам добавляли трипсин из поджелудочной железы свиньи с удельной активностью 250 ед/мг до конечной концентрации в ячейке 0.001 масс. %.

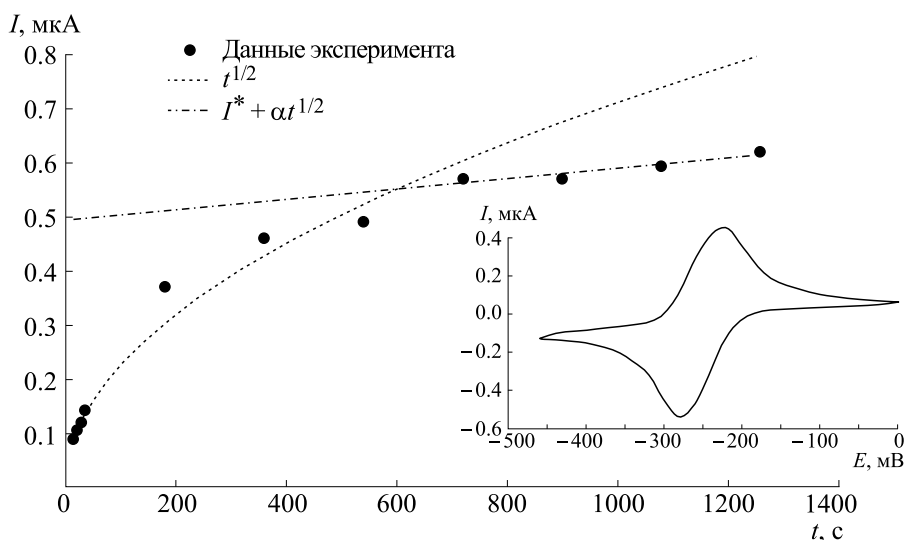
Измерения проводили методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостатемикроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия) (точность измерений потенциала  $\pm 1$  мкВ, токов –  $\pm 1$  нА). Использовали диапазон потенциалов 0...+460 мВ со скоростью развертки потенциала 130 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводили в течение 21 мин с интервалом 7 с в первую минуту, а затем каждые 3 мин. Согласно рекомендациям ИЮПАК на графиках ЦВА отрицательные токи соответствуют процессам электровосстановления, а положительные – процессам электроокисления [16]. Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отсутствии ферментов вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего, диффундирующего в желатиновом гидрогеле в среде фосфатно-солевого буферного раствора, характеризуются наличием хорошо выраженного анодного пика ( $E_{pa} = -219.8$  мВ), соответствующего электроокислению ТС, и катодного пика ( $E_{pc} = -280.2$  мВ), сопровождающего его электровосстановление. Значение  $\Delta E = 60.4$  мВ, а потенциал полуволны  $E_{1/2} = 250$  мВ (рис. 1, врезка). Пиковые значения силы тока нарастают в ходе эксперимента, достигая 0.62 мкА в анодной области (рис. 1) и –0.80 мкА – в катодной области, отражая поступление красителя к электродной поверхности.

Анализ характера изменения анодного тока показывает (рис. 1), что процесс электроокисления ТС в среде с ограниченной диффузией (гидрогеле) имеет две стадии, отличающиеся механизмом формирования тока окисления. В интервале времени 0–720 с анодный ток возрастает за счет поступления красителя к поверхности согласно закону  $I_{pa} \sim \sqrt{t}$  до значения  $I^*$ , которое в проведенном эксперименте достигается при  $t = 720$  с. Такая зависимость соответствует диффузионно-лимитируемому характеру электрохимической реакции. Свыше  $t = 720$  с наблюдается переход к линейному характеру  $I_{pa} \sim I^* + \alpha t$ , что может быть объяснено насыщением поверхности электрода толуидиновым синим и затруднением отвода прореагировавших молекул от электрода.

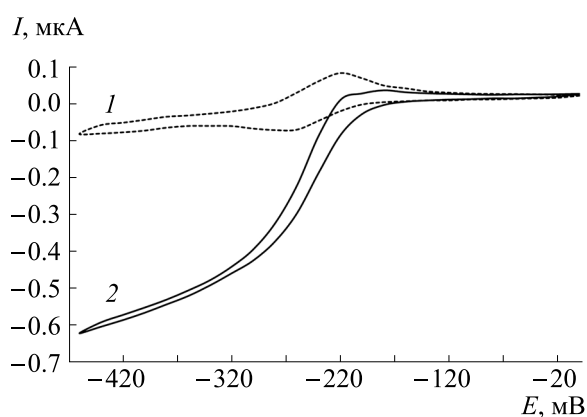
Внесение в ячейку трипсина не приводило к существенному изменению пиковых значений силы тока по сравнению с условиями гидрогеля, не содержащего фермента. При используемых соотношениях желатина и трипсина явных изменений диффузионных свойств геля, регистрируемых по скорости роста пиковых значений катодных и анодных токов, не обнаружено.



**Рис. 1.** Графики зависимости пиковых значений анодного тока от времени эксперимента в интервале 0–1260 с. На врезке: типичная вольтамперная кривая ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) на графитовом планарном электроде в среде желатинового геля, не содержащего ферментов, соответствующая моменту времени 720 с. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением пероксида водорода (0.1 мМ). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

При диффузии ТС в желатиновом гидрогеле, содержащем пероксидазу, характер вольтамперограмм наиболее существенно менялся на начальной стадии эксперимента. На 7-й–14-й секундах в анодной области ожидаемый ( $E_{pa} = -219.8$  мВ) пик электроокисления ТС (рис. 2, кривые 1) практически отсутствует (рис. 2, кривые 2), а в катодной области наблюдается выраженный рост силы тока, достигающий максимума в точке разворота развертки потенциала.

Качественные изменения кривых ЦВА на начальных этапах эксперимента, очевидно, отража-

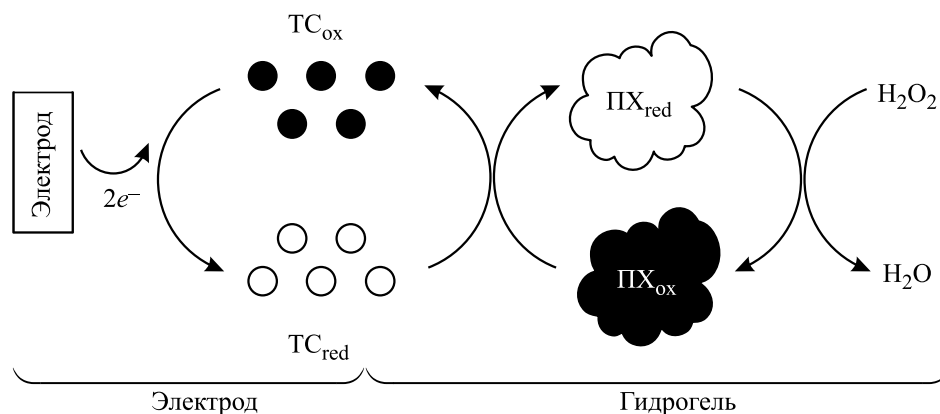


**Рис. 2.** Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля (кривые 1) и в присутствии пероксидазы (кривые 2) на 14-й секунде эксперимента. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением 0.1 мМ пероксида водорода. Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

ют эффективный пероксидазный катализ. Восстановленная форма ТС выступает в качестве второго субстрата – донора электронов для пероксидазы [19]. В результате высокой скорости ферментативного окисления ТС в приэлектродном слое повышается концентрация окисленной формы красителя, что сопровождается ростом токов электровосстановления (катодных) и отсутствием локального повышения значений силы тока электроокисления ТС в анодной области (рис. 3).

К третьей минуте эксперимента становятся заметными характерные пики ( $E_{pa} = -219.8$  мВ;  $E_{pc} = -280.2$  мВ), соответствующие электрохимическим превращениям красителя, и кривые ЦВА приобретают сходство с зависимостями, полученными при отсутствии пероксидазы (рис. 4). Вероятной причиной таких изменений кривых ЦВА во времени может служить избранная схема иммобилизации фермента на электроде. При нанесении фермента в составе геля в приэлектродной области оказывается сравнительно небольшое количество пероксидазы, которое и формирует картину ЦВА на начальных этапах.

Еще одной гипотезой, объясняющей характер изменения вольтамперных кривых, может служить представление об адсорбции красителя на поверхность электрода, ограничивающей участие в электрохимических превращениях диффундирующих из геля молекул ТС, окисленных пероксидазой. Поскольку большая часть молекул фермента находится в геле на относительно большом расстоянии от электродной поверхности, эффект ферментативного катализа существенен только



**Рис. 3.** Общая схема сопряжения электрохимического и биокаталитического процессов в эксперименте (по работе [19] с изменениями). ПХ – пероксидаза из корней хрена.

на начальных этапах эксперимента. Затем основной вклад в формирование вольтамперограмм вносят молекулы красителя, адсорбированные на электроде, состояние которых определяется электрохимическими циклами окисления-восстановления, а диффузия их от электрода затруднена гидрогелем.

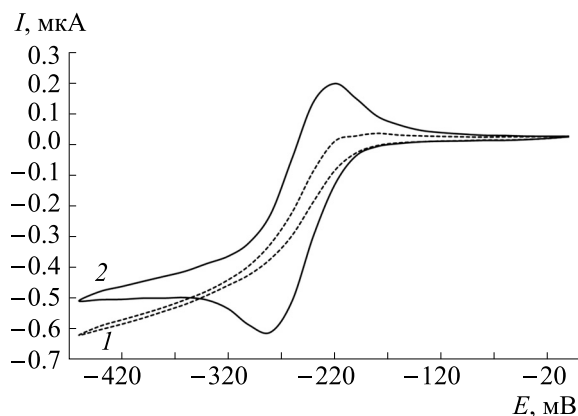
Если в растворе присутствует трипсин, то кривые ЦВА на начальных стадиях эксперимента (7-я–14-я секунды) приобретают характерную S-образную форму, соответствующую пероксидазному окислению ТС (рис. 5, кривые 2). Значения катодных токов и скорость их нарастания существенно превосходят показатели, полученные в отсутствие протеолиза (рис. 5, кривые 1).

Роль трипсина в формировании таких вольтамперограмм, вероятно, сводится к ускорению

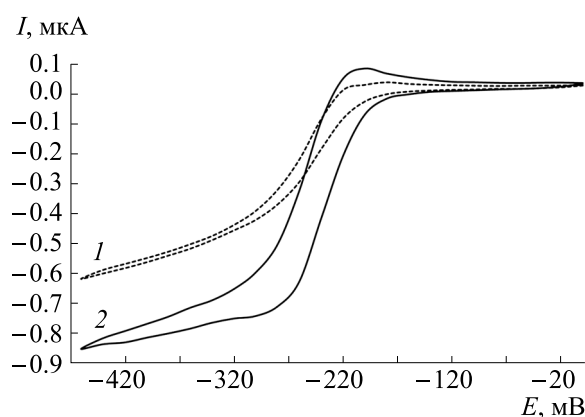
диффузии субстратов пероксидазы (ТС и пероксида водорода) и самого фермента к приповерхностному слою электрода, где его каталитическая активность начинает более существенно влиять на электрохимические превращения ТС.

Протеолиз желатина облегчает диффузию ТС в направлении раствора, что повышает вероятность электровосстановления окисленных пероксидазой молекул. Подтверждением ускорения диффузионных процессов служит формирование в условиях протеолиза более выраженного пика в анодной области ( $E \approx -200$  мВ), соответствующего электроокислению ТС.

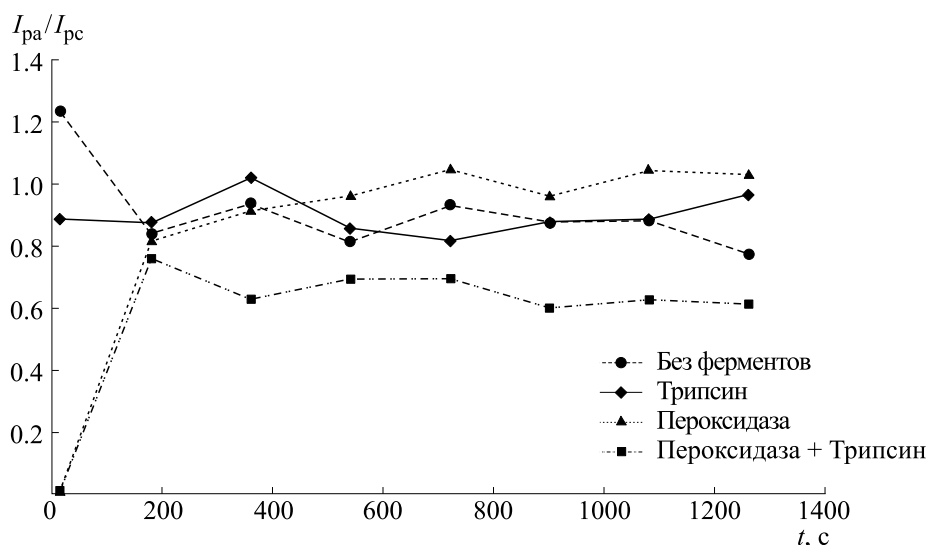
Информативным показателем, характеризующим процессы, происходящие на электроде, оказалось соотношение пиковых значений силы тока (рис. 6). Для идеально обратимого электрохимического процесса этот показатель стремится к



**Рис. 4.** Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля в присутствии пероксидазы: на 14-й секунде эксперимента (кривые 1) и через 3 мин (кривые 2) после начала измерений. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2) с добавлением 0.1 мМ пероксида водорода. Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.



**Рис. 5.** Вольтамперные кривые ЦВА толуидинового синего (0.1 мМ) в среде желатинового геля в присутствии пероксидазы хрена (кривые 1), при добавлении трипсина (кривые 2) на 14-й секунде эксперимента. Фоновый электролит – ФСБ (рН 7.2). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.



**Рис. 6.** Изменения соотношения пиковых значений анодных и катодных токов при разных условиях эксперимента. Фоновый электролит — ФСБ (pH 7.2) с добавлением пероксида водорода (0.1 мМ). Скорость развертки потенциала 130 мВ/с.

единице [17]. В условиях наших экспериментов соотношение токов определялось прежде всего присутствием пероксидазы или трипсина, либо их комбинации, а также диффузионными ограничениями, накладываемыми гидрогелевой средой.

В среде гидрогеля с естественным насыщением кислородом соотношение пиковых значений силы тока  $I_{pa}/I_{pc}$  в начале измерений составило 1.2, что может быть объяснено преобладанием на начальном этапе окисленной формы ТС. К концу эксперимента этот показатель выравнивался, и среднее значение в серии измерений составляло 0.9.

Трипсиновый протеолиз, не оказывая существенного влияния на пиковые значения силы тока, отражался на их соотношении. Оно оказалось близким к единице и более стабильным в ходе эксперимента, чем в отсутствие трипсина, что может быть объяснено меньшими диффузионными ограничениями.

Особенно выраженное влияние на соотношение  $I_{pa}/I_{pc}$  оказывает пероксидаза. Вследствие ферментативного окисления в начальный момент времени соотношение токов резко смещалось в сторону электровосстановления ТС. К третьей минуте показатель выравнивался и сохранялся близким к единице до конца эксперимента.

В присутствии трипсина эффект пероксидазного катализа отражался на значениях силы тока до конца эксперимента. Соотношение  $I_{pa}/I_{pc}$  оказалось низким в начале эксперимента, затем сместилось к единице, а с девятой минуты для всех циклов было стабильным ( $\approx 0.6$ ). Этот пока-

затель близок к критериям так называемого  $EC'$ -процесса (каталитической электродной реакции) [17], но в условиях диффузионных ограничений белкового гидрогеля его удается достичь только с помощью протеолиза.

Таким образом, комбинированное действие трипсина и пероксидазы в желатиновом гидрогеле усиливает ферментативное окисление ТС и облегчает его регистрацию методом циклической вольтамперометрии. При создании моделей биологических тканей *in electrode* или при использовании электрохимических методов *in vivo* необходимо учитывать, что протеолиз, как правило, не приводящий к образованию электроактивных продуктов, может оказывать существенное влияние на результаты электрохимического эксперимента.

## ВЫВОДЫ

1. Диффузия толуидинового синего в желатиновом гидрогеле (1.5 масс. %) в отсутствие ферментов может быть оценена как серия вольтамперных кривых ЦВА с логарифмическим ростом пиковых значений силы тока (от 0.0072 мкА до 0.8 мкА в анодной области ( $E_{pa} = -219.8$  мВ); от  $-0.0089$  мкА до  $-0.62$  мкА — в катодной ( $E_{pc} = -280.2$  мВ)).

2. Внесение в желатиновый гидрогель пероксидазы приводит к формированию на начальных этапах эксперимента катодных токов, достигающих  $-0.6$  мкА, и снижению анодных токов до 0.004 мкА.

3. Трипсин, вносимый одновременно с субстратами пероксидазы, приводит к повышению

на 14-й секунде катодных токов до  $-0.85$  мкА и стабильному снижению соотношения  $I_{pa}/I_{pc}$  до 0.6 с девятой минуты эксперимента.

4. Исследование вольтамперного поведения толуидинового синего в модельном белковом гидрогеле позволяет оценить его диффузионные свойства и пероксидазную активность с учетом влияния протеолиза.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-79-20012).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Heiskanen and J. Emnéus, in *Modern aspects of electrochemistry*, Ed. by N. Eliaz **52**, 1 (2011).
2. Y. Cao, J. Yu, B. Bo, et al., *Biosens. Bioelectron.* **45**, 1 (2013).
3. E. González-Fernández, N. Avlonitis, A. F. Murray, et al., *Biosens. Bioelectron.* **84**, 82 (2016).
4. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика* **63** (6), 1088 (2019).
5. M. Stoytcheva, R. Zlateva, S. Cosnier, et al., *Electrochim. Acta* **76**, 43 (2012).
6. В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Е. В. Супрун и др., *Биомед. химия* **61** (2), 188 (2015).
7. J. T. Trevors and G. H. Pollack, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89** (1), 1 (2005).
8. K. V. Fonseca, S. J. Bidarra, M. J. Oliveira, et al., *Acta Biomater.* **7** (4), 1674 (2011).
9. B. Sarker, R. Singh, R. Silva, et al., *PLoS One* **9** (9), 1 (2014).
10. M. T. Spang and K. L. Christman, *Acta Biomater.* **68**, 1 (2019).
11. S. Park, S. Lim, P. Siriviriyakul, et al., *Phys. Rev. E* **101** (5), 052414 (2020).
12. G. G. Giobbe, C. Crowley, C. Luni, et al., *Nat. Commun.* **10** (1), 1 (2019).
13. J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, et al., *JACC Basic to Transl. Sci.* **4** (6), 659 (2019).
14. D. Buenger, F. Topuz, and J. Groll, *Prog. Polym. Sci.* **37** (12), 1678 (2012).
15. E. Katz, A. N. Shipway, and I. Willner, in *Encyclopedia of Electrochemistry*, Ed. by G. S. Wilson (Wiley-VCH GmbH, Weinheim, 2002), pp. 559–626.
16. И. А. Черенков, К. С. Раевских, В. Г. Сергеев и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **3** (2), 422 (2018).
17. *Электроаналитические методы*, под ред. Ф.М. Шольца (Бином «Лаборатория знаний», М., 2010).
18. И. А. Черенков, Л. С. Березина, М. Д. Кривилев и др., *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **5** (3), 481 (2020).
19. K. Thenmozhi and S. S. Narayanan, *Mater. Sci. Eng. C.* **70**, 223 (2017).

## Bioelectrochemical Modeling of Toluidine Blue Diffusion in a Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Trypsin

I.A. Cherenkov\*, \*\*, M.D. Krivilev\*, \*\*\*\*, M.M. Ignat'eva\*, E.V. Vahrusheva\*, \*\*, and V.G. Sergeev\*, \*\*

\*Udmurt State University, Universitetskaya ul. 1, Izhevsk, 426034 Russia

\*\*Izhevsk State Medical Academy, ul. Kommunarov 281, Izhevsk, 426034 Russia

\*\*\*Udmurt Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Tatiany Baramzinoj 34, Izhevsk, 426067 Russia

The electrochemical properties of toluidine blue, a phenothiazine dye, in a gelatin hydrogel in the presence of trypsin, peroxidase, and their combination have been studied by means of cyclic voltammetry. It was shown that peroxidase present in the hydrogel has a significant effect on the electrochemical transformations of toluidine blue during the first 30 seconds of measurements. The addition of trypsin enhances the effect of peroxidase catalysis. The feasibility of simultaneous assessment of proteolysis and redox equilibrium in a model hydrogel system in the analysis of voltammetric curves of cyclic voltammetry has been experimentally validated. The obtained results demonstrate that the scheme and principles of bioelectrochemical modeling of the diffusion of electroactive molecules in the intercellular matrix work reasonably well.

*Keywords:* cyclic voltammetry, bioelectrochemistry, hydrogels, trypsin, peroxidase, toluidine blue, in electrode-models