

ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Черенков И.А.*, Игнатьева М.М., Сергеев В.Г.

Удмуртский государственный университет

*ivch75@udsu.ru

В работе представлено экспериментальное обоснование возможности получения электроактивного полимера толуидинового синего в присутствии бактериального липополисахарида. Показано, что адсорбция липополисахарида на рабочем электроде не приводит к качественным изменениям кривых ЦВА. При этом отмечено снижение значений силы тока, отражающих электрохимические процессы полимеризации. Полученный полимер продемонстрировал удовлетворительную электроактивность. Полимер способен стать эффективным активатором иммунных клеток и может быть использован для исследования окислительно-восстановительных процессов, сопровождающих клеточную активацию, вызванную липополисахаридом.

Ключевые слова: электроактивные полимеры, фенотиазины, бактериальный липополисахарид, электрохимические биосенсоры.

ELECTROPOLYMERIZATION OF TOLUIDINE BLUE IN THE PRESENCE OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

Cherenkov I.A., Ignat'eva M.M., Sergeev V.G.

Udmurt state university

The results of experimental substantiation of the possibility of obtaining an electroactive toluidine blue polymer in the presence of bacterial lipopolysaccharide are presented in this article. It is shown that the adsorption of lipopolysaccharide on the working electrode does not lead to qualitative changes in the CVA curves. At the same time, a decrease in the values of the current strength reflecting the electrochemical polymerization processes was noted. The resulting polymer demonstrated satisfactory electroactivity. The polymer can become an effective activator of immune cells and can be used to study redox processes activation mediated by lipopolysaccharide.

Keywords: electroactive polymers, phenothiazines, bacterial lipopolysaccharide, electrochemical biosensors.

Введение

Электроактивные полимеры находят широкое применение в биоэлектрохимии [1–3]. Наше внимание привлекли полимерные формы фенотиазиновых красителей, для которых подробно разработаны методики получения путем электрополимеризации, позволяющие сформировать полимер непосредственно на поверхности рабочего электрода [1, 2, 4]. Фенотиазиновые полимеры, в частности, полимер толуидинового синего (поли(ТС)) – позволяют модифицировать электродную поверхность графитового электрода. Поли(ТС) формирует устойчивый электроактивный слой на поверхности, обладая высоким сродством к графиту, и содержит функциональные группы для ковалентного присоединения белков [1]. При этом полимер характеризуется относительно невысокими значениями стандартного окислительно-восстановительного потенциала и способен реагировать на изменения

редокс-статуса биологических сред [1, 4]. Например, в предыдущих работах нами была исследована реакция полимерной формы ТС на изменение окислительно-восстановительного равновесия в плазме крови [3]. С точки зрения операционных характеристик, модифицированные поли(ТС) электроды сохраняют электрохимические параметры на протяжении достаточно длительного времени (не менее нескольких месяцев), что делает поли(ТС) и родственные ему электроактивные полимеры перспективными модификаторами электродов для биосенсоров.

Еще одним интересным свойством толуидинового синего является его сродство к кислым полисахаридам, широко используемое в цито- и гистохимии [5]. В частности, ТС количественно связывается с гепарином, что позволяет использовать его для аналитических исследований, в том числе и с применением электрохимической детекции [5, 6]. Важным фактом является сродство фенотиазиновых красителей к углеводным компонентам бактериальных липополисахаридов (ЛПС) [7, 8].

ЛПС представляют собой макромолекулярные амфифильные соединения, которые присутствуют исключительно во внешней оболочке наружной мембраны грамотрицательных бактерий [9, 10] (рис. 1). Метиленовый синий и ТС дают метахроматическую реакцию с ЛПС, приводящую к формированию димеров метиленового синего и надмолекулярных агрегатов более высокого порядка для ТС. Спектральными методами выявлено более выраженное взаимодействие ЛПС с толуидиновым синим, чем с метиленовым синим [7].

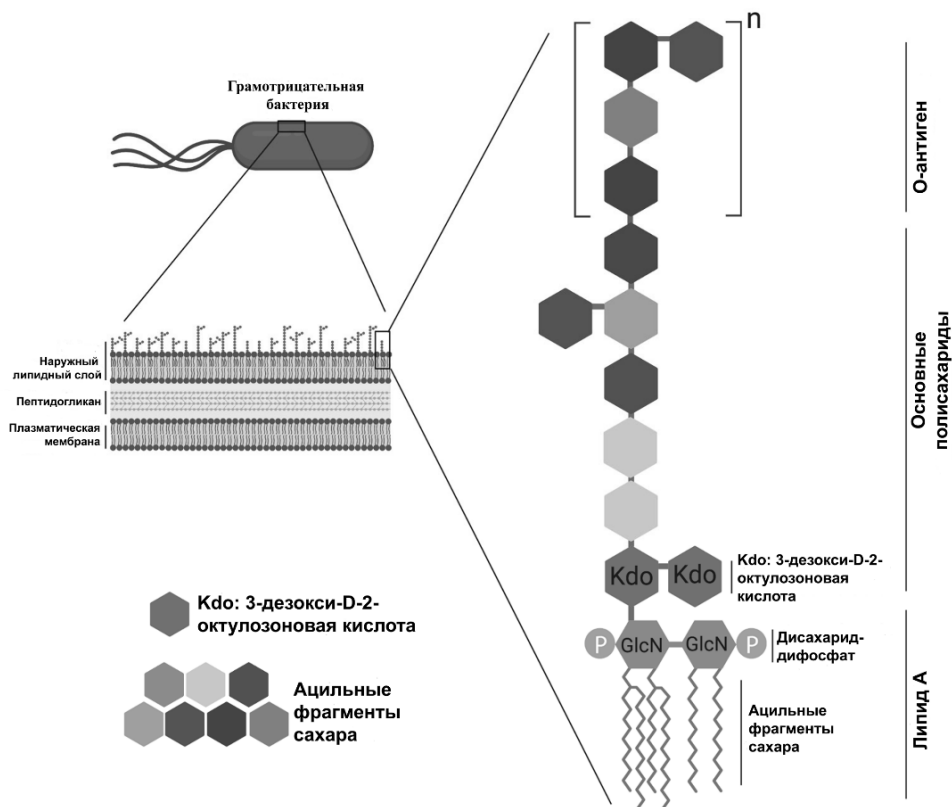


Рис. 1. Клеточная локализация и схема базовой структуры бактериальных липополисахаридов.

ЛПС состоит из трех областей: липид А, основные олигосахариды и О-антиген, включающий повторяющиеся олигосахаридные звенья с ацильными группами [9]

Учитывая амфифильную природу ЛПС, выраженное сродство ТС к ЛПС, образование надмолекулярных комплексов ЛПС-ТС, можно предполагать влияние ЛПС на процесс электрополимеризации ТС на графитовом электроде с перспективой получения гибридного электродного материала для исследования активации клеток иммунной системы, сочетающего в себе «исполнительное устройство» в виде иммобилизованных молекул ЛПС, воздействующих на рецепторы клеток, и «химический сенсор» – электроактивный полимер ТС.

Однако влияние ЛПС на процесс полимеризации фенотиазинов остается малоизученным, а готовых протоколов получения ЛПС-содержащих электроактивных полимеров нами не найдено. Поэтому целью работы стало исследование влияния бактериального липополисахарида на процесс электрополимеризации толуидинового синего и оценка электрохимической активности полученных полимеров.

Эксперимент

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

Электрохимические измерения и процесс электрополимеризации производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостатах «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия) и P-45X (ООО «Элинс», Черноголовка, Россия).

Перед исследованиями электроды промывали дистиллированной водой и подвергали электрохимической подготовке путем циклирования в диапазоне потенциалов $-1000...+1000$ мВ в среде фосфатного буферного раствора для стабилизации характеристик (10 циклов при скорости развертки потенциала 90 мВ/с).

Электрополимеризацию проводили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) в диапазоне потенциалов $-1200...+600$ мВ при скорости развертки потенциала 90 мВ/с; 20 циклов развертки. Фоновым электролитом служил фосфатный буферный раствор (рН 8; 0,1 М).

После электрополимеризации электроды промывали от красителя избытком фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) и проверяли остаточную активность полимера в среде ФСБ (рН 7,2; 0,15 М). Для этого проводили ЦВА в диапазоне потенциалов $-600...+600$ мВ при скорости развертки 90 мВ/с. Измерение включало 4 цикла развертки. Вольтамперные кривые сравнивали с данными, полученными при электрополимеризации ТС в тех же условиях, но без использования ЛПС.

Графическое представление результатов и математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы *Excel* и специализированного программного обеспечения *ES8* (версия 4.194) для потенциостата P-45X.

На вольтамперограммах, согласно требованиям ИЮПАК, положительные значения силы тока соответствуют процессу электроокисления, а отрицательные – электровосстановления. Потенциалы приведены относительно хлорсеребряного электрода.

Результаты и их обсуждение

Процесс электрополимеризации толуидинового синего, выполняемый в режиме циклической вольтамперометрии, сопровождается формированием характерных вольтамперных кривых (рис. 2). Как известно, для всех фенотиазиновых мономеров процесс электрополимеризации начинается с адсорбции молекул на поверхности электрода с последующим необратимым окислением при высоких ($+1200$ мВ) потенциалах [4]. В этой области на вольтамперограмме формируется характерный пик (рис. 2 (I) А). Значение этого процесса заключается в формировании в ходе электроокисления радикалов ТС, включающихся в процесс электрополимеризации. На первых циклах можно выделить характерные пики, сопровождающие окислительно-восстановительные превращения мономера ТС (рис. 2 (I) Б). Их параметры соответствуют квазиобратимому электрохимическому поведению, характерному для фенотиазиновых красителей. По мере циклирования токи в этой области снижаются. Одновременно в диапазоне $-400...+400$ мВ начинается рост пиков, соответствующих формированию полимерной формы ТС (рис. 2 (I) В).

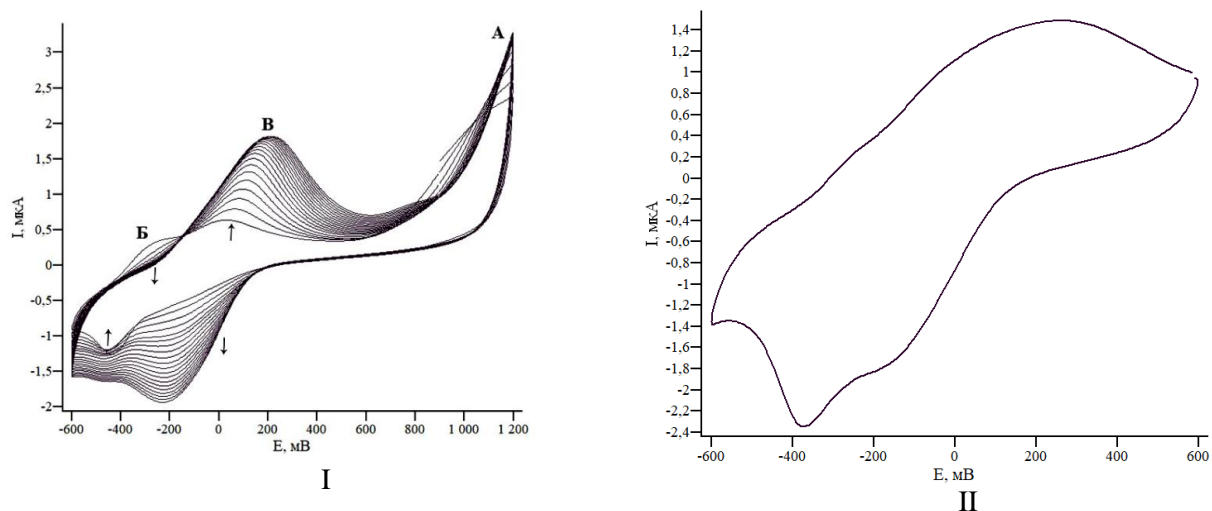


Рис. 2. (I) Типичная вольтамперная кривая процесса электрополимеризации ТС на планарном графитовом электроде. Фоновый электролит – фосфатный буферный раствор (pH 8; 0,1 М), концентрация ТС 0,1 мМ, скорость развертки потенциала 90 мВ/с. А – пик необратимого окисления ТС; Б – окислительно-восстановительные превращения мономерной формы ТС; В – окислительно-восстановительные превращения поли(ТС). Стрелки показывают направление изменений силы тока в соответствующих диапазонах потенциалов.
 (II) Электрохимическая активность полученного полимера в фосфатно-солевом буферном растворе; скорость развертки потенциала 90 мВ/с

После промывания электрода избытком буферного раствора оценивали показатель «остаточной активности» полимера – вольтамперную характеристику в среде нейтрального буферного раствора, не содержащего ТС (рис 2 (II)).

Являясь амфифильной молекулой, ЛПС может влиять на способность ТС взаимодействовать с графитовым электродом по двум вероятным механизмам. Адсорбция ЛПС на поверхности углерода [11] может приводить к блокированию электродной поверхности и снижать эффективность электрохимических превращений ТС, сопровождающих процесс полимеризации. С другой стороны, связывание ТС с углеводными компонентами адсорбированных молекул ЛПС может приводить к образованию агрегатов молекул ТС и повышать его концентрацию в приэлектродном слое, что может способствовать электрополимеризации.

Для оценки влияния ЛПС на процесс электрополимеризации раствор липополисахарида (100 мкг/мл) наносили на поверхность рабочего электрода. После нанесения раствора электроды выдерживали во влажной камере для адсорбции ЛПС, не допуская полного высыхания. Электрод промывали избытком буферного раствора, наносили раствор ТС и проводили электрополимеризацию.

В литературе описаны сорбционные свойства углеродных материалов в отношении бактериальных эндотоксинов [11, 12], что позволяет предполагать формирование слоя адсорбированных молекул ЛПС на электродной поверхности. Учитывая амфифильный характер ЛПС, на поверхность графита ориентируются остатки жирных кислот, а в раствор экспонируются полисахаридные звенья молекулы, что создает предпосылки для взаимодействия с ТС.

Адсорбция липополисахарида на рабочем электроде не привела к качественным изменениям вольтамперной кривой, характеризующей процесс электрополимеризации ТС (рис. 3 (I)). При этом заметно снизились значения токов, сопровождающих необратимое окисление ТС. В первых циклах значения токов составили $2,4 \pm 0,2$ мкА для процесса полимеризации без ЛПС (поли(ТС)-контроль) и $1,3 \pm 0,3$ мкА для полимеризации на электроде с ЛПС (поли(ТС)-ЛПС). В ходе дальнейшего циклирования отмечен рост токов в этой области, достигающий к 20-му циклу $3,2 \pm 0,3$ мкА для поли(ТС)-контроль и $2,1 \pm 0,4$ для поли(ТС)-ЛПС. В области потенциалов, соответствующей превращению мономерной формы ТС (см. рис. 2 (I Б) и рис. 3 (I Б), для поли(ТС)-ЛПС также отмечается снижение силы тока как в катодной, так и в анодной областях. Присутствие ЛПС снижает и токи,

сопровождаящие рост полимера. В этой области на начальных циклах развертки нередко отмечаются «шумовые» колебания токов, соответствующих восстановлению полимера, отсутствующие в контрольных образцах (см. *рис. 2* (I В) и *рис. 3* (I В)). Возможно, колебания токов сопровождают сорбционные взаимодействия молекул ТС и ЛПС. Таким образом, ЛПС, адсорбированный на рабочем электроде, оказывает существенное влияние на все показатели электрополимеризации ТС, регистрируемые в ходе ЦВА.

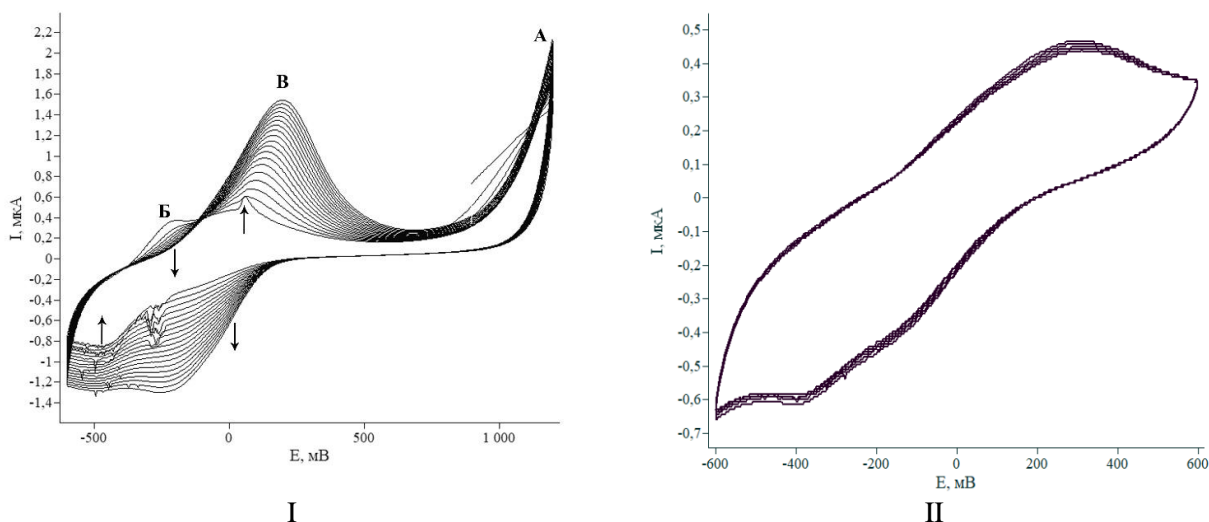


Рис. 3. (I) Типичная вольтамперная кривая процесса электрополимеризации ТС на планарном графитовом электроде с адсорбированными молекулами липополисахарида. Фоновый электролит – фосфатный буферный раствор (рН 8; 0,1 М), концентрация ТС 0,1 мМ, скорость развертки потенциала 90 мВ/с. А – пик необратимого окисления ТС; Б – окислительно-восстановительные превращения мономерной формы ТС; В – окислительно-восстановительные превращения поли(ТС). Стрелки показывают направление изменений силы тока в соответствующих диапазонах потенциалов.
(II) Электрохимическая активность полученного полимера в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,2; 0,15 М); скорость развертки потенциала 90 мВ/с

Для показателей остаточной активности полимера ТС, полученного в присутствии ЛПС, адсорбированного на электроде (*рис. 3* (II)), следует отметить снижение катодных и анодных токов по сравнению с контрольными образцами (*рис. 2* (II)). При этом ЦВА полученного полимера демонстрирует устойчивую воспроизводимость вольтамперных кривых с выраженными пиками окисления и восстановления.

Выводы

Таким образом, в присутствии ЛПС на электроде возможно получение полимерной формы толуидинового синего с воспроизводимыми электрохимическими характеристиками. Влияние эндотоксина в исследованной концентрации на процесс электрополимеризации заключается в некотором ограничении электрохимических превращений ТС без качественных изменений вольтамперных кривых. Модифицированные описанным способом электроды могут быть использованы для исследования активации клеток, имеющих рецепторы к ЛПС, с одновременной регистрацией изменений окислительно-восстановительного равновесия с помощью электроактивного полимера.

Библиография

1. Pauliukaite R., Ghica M.E., Barsan M.M., Brett C.M.A. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors // *Anal. Lett.* 2010. V. 43, N 10-11. P. 1588–1608.
2. Barsan M.M., Pinto E.M., Brett C.M.A. Methylene blue and neutral red electropolymerisation on AuQCM and on modified AuQCM electrodes: an electrochemical and gravimetric study // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V. 13, N 12. P. 5462–5471.

3. Черенков И.А., Сергеев В.Г., Никитина Е.С., Иванова И.Л. Применение амперометрического датчика на основе поли(толуидинового синего) для изучения образцов плазмы крови пациентов с болезнью Паркинсона // Биомедицинская радиоэлектроника. 2018. № 4. С. 52–54.
4. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Schmidt H.-L. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers // *Electroanalysis*. 1999. V. 11, N 3. P. 93–110.
5. Ribatti D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2018. V. 176, N 1. P. 55–60.
6. Peng X.Y., Luo H.Q., Li N.B. Voltammetric study on the interaction of heparin with toluidine blue, and its analytical application // *Microchim. Acta*. 2006. V. 156, N 3-4. P. 297–302.
7. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. The Interaction of Lipopolysaccharides with Phenothiazine Dyes // *Lasers Surg. Med.* 2003. V. 33, N 5. P. 311–319.
8. Новаковская М.В., Игнатъева М.М., Черенков И.А. Влияние липополисахарида сальмонеллы на диффузию толуидинового синего в альгинатном гидрогеле // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2022. Т. 7, № 3. С. 458–461.
9. Mazgaeeen L., Gurung P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, N 2. P. 379.
10. Maeshima N., Fernandez R.C. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013. V. 3. P. 1–13.
11. Акимбеков Н.Ш., Дигель И., Херас С., Тастамбек К.Т., Савицкая И.С., Уалиева П.С., Мансуров З.А., Жубанова А.А. Адсорбция бактериального липополисахарида на поверхности карбонизованной рисовой шелухи на основе результатов серийных экспериментов // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. 2014. Т. 60, № 1/2. С. 144–148.
12. Hung M.-C., Yuan S.-Y., Chang S.I., Liao J.-W., Ko T.-H., Cheng C.-L. Evaluation of active carbon fibers used in cell biocompatibility and rat cystitis treatment // *Carbon*. 2014. V. 68. P. 628–637.