

УДК 543.429.22

ОЦЕНКА СКОРОСТИ И СТЕПЕНИ СОРБЦИИ ПАРОВ ВОДЫ ПОЛИМЕРАМИ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЗОНДА

Е.М. Зубанова^{1*}, Е.Н. Голубева¹, М.Я. Мельников¹, Е.А. Немец²,
В.И. Севастьянов²

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ² Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова Минздрава России; *e-mail: kate_zub@mail.ru)

Метод спинового зонда использован для оценки скорости сорбции паров воды полимерами на основе желатина. Показано, что скорость и степень набухания желатина зависят от степени его сшивки. Время набухания сшитого желатина в парах воды при 300 К в три раза превышает время набухания нативного желатина в таких же условиях.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, желатин, метод спинового зонда, сорбция.

Желатин представляет собой биополимер, образующийся в результате частичного кислотного или щелочного гидролиза белка соединительных тканей – коллагена. По структуре это полипептид, сохранивший аминокислотную последовательность коллагена. Благодаря таким свойствам, как биорезорбируемость, высокая адгезия к клеткам, низкая стоимость и легкая доступность, желатин активно используется в тканевой инженерии и в качестве среды для культивирования клеток [1, 2]. К его основным недостаткам относится высокая скорость деградации в живых системах под действием ферментов. Для уменьшения скорости деградации, улучшения механической и термической стабильности желатин подвергают сшивке под воздействием ультрафиолетового света [3] или высокой температуры [4], или используя соответствующие реагенты (глутаровый альдегид, генипин, карбодиимиды и др.) [2]. Чтобы использовать сшитый желатин в качестве среды для культивирования клеток, нужна информация о сорбционных свойствах желатина в водных растворах. Скорость набухания желатина в водных растворах и парах обычно оценивают по изменению массы набухшего образца [5]. Известно, что поглощение низкомолекулярных веществ полимерами приводит к существенному изменению их макро- и микрохарактеристик. Как правило, при этом наблюдается пластификация полимера, сопровождающаяся изменением свободного объема и подвижности полимерных

цепей [6]. Информация о динамике происходящих при этом процессов, особенно на ранних стадиях поглощения молекул воды, может быть получена с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в варианте методики спинового зонда [7, 8]. В рамках этого подхода в полимер вводят стабильный парамагнитный допант (зонд), который, согласно данным ЭПР, равномерно распределяется по объему [9, 10]. В качестве зондовых молекул наиболее часто используют нитроксильные радикалы, содержащие парамагнитный фрагмент N–O•. Высокая анизотропия магнитно-резонансных параметров нитроксильных радикалов приводит к ярко выраженной зависимости их спектров ЭПР от ориентации в пространстве, а также позволяет судить о вращательной подвижности парамагнитных молекул. Таким образом, изменение подвижности нитроксильных радикалов в результате сорбции воды биополимерными матрицами может служить характеристикой степени набухания последних.

Так, в работе [6] пленки коллагенов выдерживали в водном растворе спинового зонда (нитроксильного радикала TEMPO), затем высушивали в вакууме и регистрировали температурную зависимость спектров ЭПР полученных пленок при разной влажности. Показано, что при увеличении влажности снижается температура, при которой в спектре появляются компоненты, соответствующие быстрому вращению нитроксильного радикала. В работе [7] на ос-

новании анализа температурной зависимости спектров ЭПР нитроксильных радикалов, пришитых к цепям полимеров на основе желатина и сшитых желатинов, оценивали распределение спиновых меток по объему свободного вращения. Показано, что объем вращения нитроксильных фрагментов в несшитых желатинах больше, чем в их сшитых аналогах.

В данной работе метод ЭПР использован в рамках методики спинового зонда в целях изучения процессов поглощения паров воды несшитым и сшитым желатинами, в частности определения скорости и относительной степени сорбции паров воды.

Экспериментальная часть

Стабильный нитроксильный радикал 4-оксо-2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (TEMPONE) («Sigma-Aldrich») и желатин из свиной кожи (тип А) марки «Sigma-Aldrich» (изоэлектрическая точка 7,0–9,0; число Блума 300; средняя молекулярная масса 85 кДа) использовали без дополнительной очистки. Выбор спинового зонда обусловлен его термической стабильностью в условиях эксперимента и коммерческой доступностью.

Для получения препарата желатина, не растворимого в воде, был выбран метод дегидротермосшивки, позволяющий не только эффективно повысить резистентность стабилизированных биополимеров ферментативной деструкции [11], но и минимизировать их цитотоксичность [12].

Гранулы желатина, предварительно высушенные до постоянного веса при 40 °С, инкубировали в вакуумном шкафу при остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. и температуре 120 °С в течение 24 ч. Полученный дегидротермосшитый желатин (ДГТ-желатин) использовали в последующих экспериментах.

Для введения спинового зонда TEMPONE в матрицы биополимеров образцы желатина (G1) и ДГТ-желатина (G2) выдерживали в 3×10^{-3} М растворе TEMPONE в бидистиллированной воде (100 мг желатина на 3 мл раствора). Соотношение компонентов было подобрано таким образом, чтобы в набухшем состоянии гранулы ДГТ-желатина занимали весь объем раствора. Образцы выдерживали 3 ч при 298 К, затем еще 3 ч при 313 К. В этих условиях желатин G1 полностью растворялся, ДГТ-желатин (G2) оставался в виде набухших гранул. Полученные смеси замораживали при 233 К в течение 12 ч, лиофилизировали в течение двух циклов (по 6 ч каждый) при 233 К (Labconco Freezone 2.51) и выдерживали 1 сутки в вакуумном шкафу («Binder VD53») при 10–20 мм рт. ст. и 313 К. Концентрация зонда в сухом полимере, измеренная методом ЭПР, составила $3,7 \pm 0,3$ и $4,5 \pm 0,4$ мг/г для G1 и G2 соответственно.

Полученные образцы желатина, содержащие спиновый зонд, измельчали в ступке при охлаждении жидким азотом для придания хрупкости полимеру. Затем навески массой $\sim 0,0150$ г помещали в реактор для проведения эксперимента по набуханию в парах воды. Реактор представляет собой стандартную ампулу для спектроскопии ЭПР (внутренний диаметр 3 мм) с соединенной с ней через вакуумный тефлоновый кран стеклянной пробиркой, в которую помещено $\sim 0,5$ мл дистиллированной воды. Еще один вакуумный кран отделяет устройство от окружающей среды. Систему дегазировали до 10^{-3} мм рт. ст. путем трехкратного повторения цикла «замораживание до 77 К (вакуумирование) – размораживание». После этого оба крана закрывали и помещали реактор в резонатор спектрометра. Для регистрации температурной зависимости спектров ЭПР в сухих полимерах температуру материала в ампуле поддерживали с точностью ± 1 К в интервале

Магнитно-резонансные параметры TEMPONE в сухих и набухших в парах воды образцах желатина

Желатин	$g_x \pm 0,0002$	$g_y \pm 0,0002$	$g_z \pm 0,0002$	$A_{xx} \pm 0,02$ мТл	$A_{yy} \pm 0,02$ мТл	$A_{zz} \pm 0,005$ мТл
Сухой G1	2,0092	2,0065	2,0022	0,61	0,45	3,50
Набухший G1 (10 мин) и G2 (215 мин)	2,0091	2,0064	2,0022	0,61	0,47	3,56
Равновесно набухший G1	2,0091	2,0064	2,0022	0,55	0,40	3,65
Равновесно набухший G2	2,0091	2,0056	2,0024	0,55	0,37	3,55

300–325 К с шагом 5 К. Эксперимент по сорбции паров воды проводили при температуре воды в пробирке 297 ± 1 К, что соответствует давлению насыщенного пара $3,0 \pm 0,2$ кПа. После установления температуры образца, равной 300 К, кран между ампулой и пробиркой с водой открывали. В ходе набухания полимера через определенные промежутки времени регистрировали спектры ЭПР. При сохранении формы и интенсивности линий спектра ЭПР в течение 30 мин считали желатин равновесно набухшим при заданной температуре.

Спектры ЭПР регистрировали с помощью радиоспектрометра X-диапазона «Bruker EMX-500» при температуре 90–170 и 300–325 К, используя температурную приставку фирмы «Bruker». При низкой температуре (90–170 К) уровень мощности составлял 0,1 мВт, а амплитуда модуляции – 0,1 мТл. При высокой температуре (300–325 К) уровень мощности составлял 0,63 мВт, а амплитуда модуляции – 0,05 мТл. В этих условиях не наблюдалось искажения формы спектральных линий и насыщения сигнала. Концентрацию парамагнитных частиц рассчитывали путем двойного интегрирования спектра ЭПР [13].

Магнитно-резонансные параметры TEMPONE в сухих и набухших желатинах определяли путем моделирования спектров ЭПР, зарегистрированных при температуре 90–130 К, в приближении отсутствия движения нитроксильного радикала («жесткий предел» вращения).

Для моделирования использовали программное обеспечение, разработанное на кафедре химической кинетики химического факультета МГУ [14]. Форму индивидуальной резонансной линии представляли в виде конволюции гауссовой и лоренцевой функций. В ходе моделирования варьировали как магнитно-резонансные параметры (главные значения g -тензора и тензора сверхтонкого взаимодействия (СТВ)), так и параметры формы линии (полуширины гауссовой и лоренцевой функций).

Результаты и обсуждение

Форма линий спектров ЭПР TEMPONE в сухих желатинах G1 и G2 в интервалах температуры 90–170 и 295–325 К не зависит от структуры полимера. Магнитно-резонансные параметры TEMPONE в G1 и G2, полученные путем компьютерного моделирования экспериментальных спектров при 90–130 К, представлены в таблице. Они характерны для TEMPONE в полярных средах, таких как смешанные растворы глицерина и воды [15]. В интервале 300–325 К наблюдается слабая зависимость спектров ЭПР TEMPONE от температуры (рис. 1), следовательно, рост температуры в данном интервале практически не увеличивает подвижность молекул зонда.

При напуске паров воды на образец желатина форма линий спектра ЭПР постепенно меняется. На рис. 2 представлено изменение спектров ЭПР TEMPONE в G1 при 300 К в процессе поглощения паров воды во времени. При сорбции

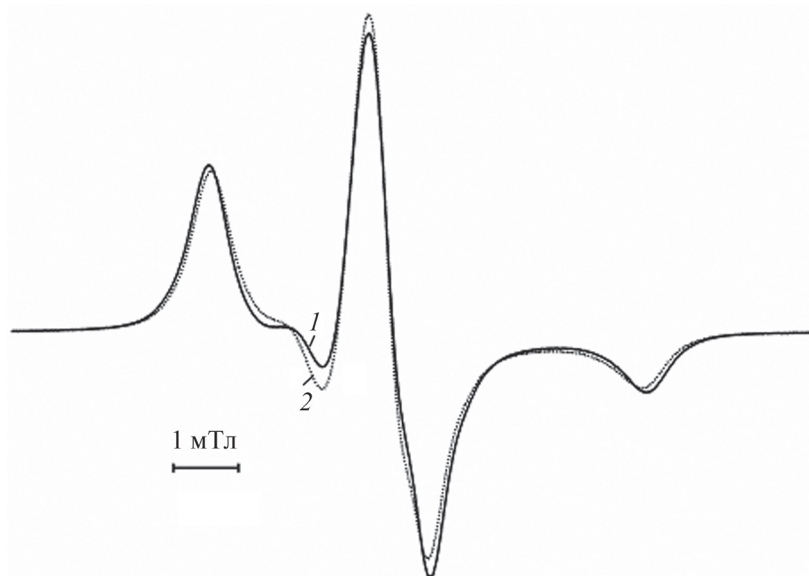


Рис. 1. Спектры ЭПР радикала TEMPONE в сухом желатине G1 при температуре 300 К (1) и 325 К (2)

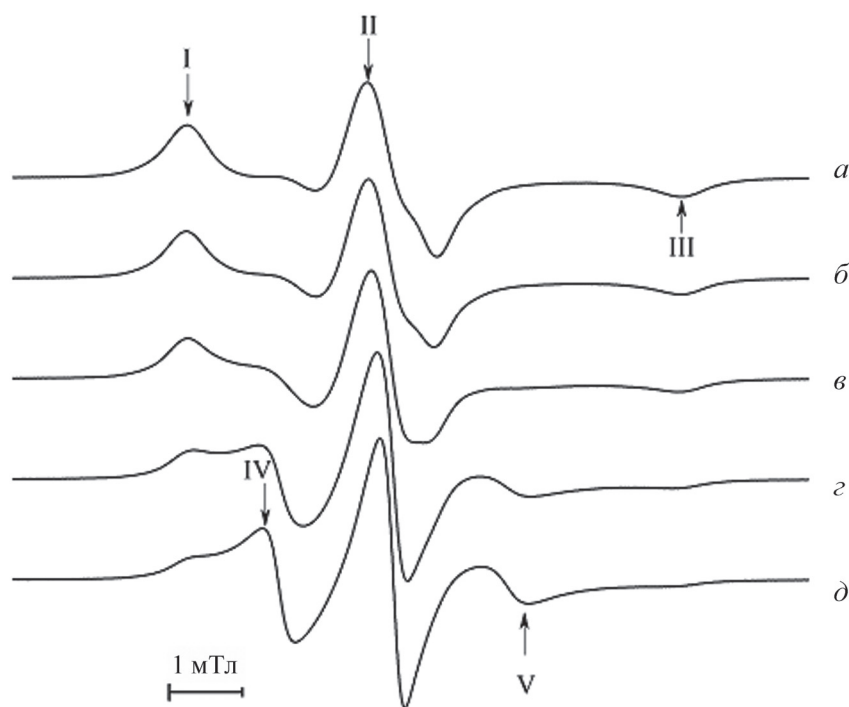


Рис. 2. Спектры ЭПР радикала TEMPONE в желатине G1 при поглощении паров воды при 300 К (время, мин: а – 0, б – 6, в – 13, г – 36, д – 120)

паров воды в спектрах уменьшается интенсивность низкопольной (I) и высокопольной (III) компонент, появляются линии (IV и V), соответствующие более быстрым движениям нитроксильного радикала.

Изменения в спектрах ЭПР TEMPONE в G1 прекращаются через 2 ч, а в случае G2 это время составляет более 8 ч. На рис. 3 представлены спектры ЭПР TEMPONE в равновесно насыщенных парах воды G1 и G2 при 300 К, нормированные на амплитуду максимальной центральной компоненты II. Спектры отличаются соотношением интенсивностей компонент, относящихся к медленному (I, III) и более быстрому (IV, V) вращению нитроксильного радикала. В спектрах набухшего желатина G1 интенсивность компонент IV и V больше, чем в аналогичных спектрах G2, что свидетельствует о большей доле подвижных радикалов. На рис. 4 представлены кинетические кривые снижения доли малоподвижных молекул зонда в G1 и G2 при выдерживании в парах воды (300 К), измеренные по амплитуде компоненты III.

В таблице представлены магнитно-резонансные параметры TEMPONE в сухих и набухших в парах воды желатинах G1 и G2. В ходе сорб-

ции желатином паров воды в основном меняются константы СТВ на ядре азота ^{14}N . В случае TEMPONE в среде желатина G1 значение A_{zz} меняется от 3,5 до 3,65 мТл, что можно объяснить образованием комплекса фрагмента $\text{N}-\text{O}^{\bullet}$ с водородными связями и повышением полярности среды [16]. Спектр ЭПР равновесно набухшего в парах воды G2 при 90 К представляет собой суперпозицию триплета и широкого синглета ($g_{iso} = 2,0065$). Появление синглета можно связать с образованием агрегатов TEMPONE, перешедших в водную фазу, при замораживании.

Таким образом, использование метода спиновой зонды для несшитого и сшитого желатина позволяет различать эти полимеры по времени и степени набухания в парах воды, оцениваемой как доля подвижных молекул зонда. Различие степени набухания рассматриваемых в работе желатинов проявляется не только в разном соотношении амплитуд компонент, соответствующих подвижным и заторможенным парамагнитным частицам (рис. 4), но и в различии величин магнитно-резонансных параметров нитроксильного радикала, в частности значений A_{zz} , которые легко определить экспериментально по расстоянию между крайними компо-

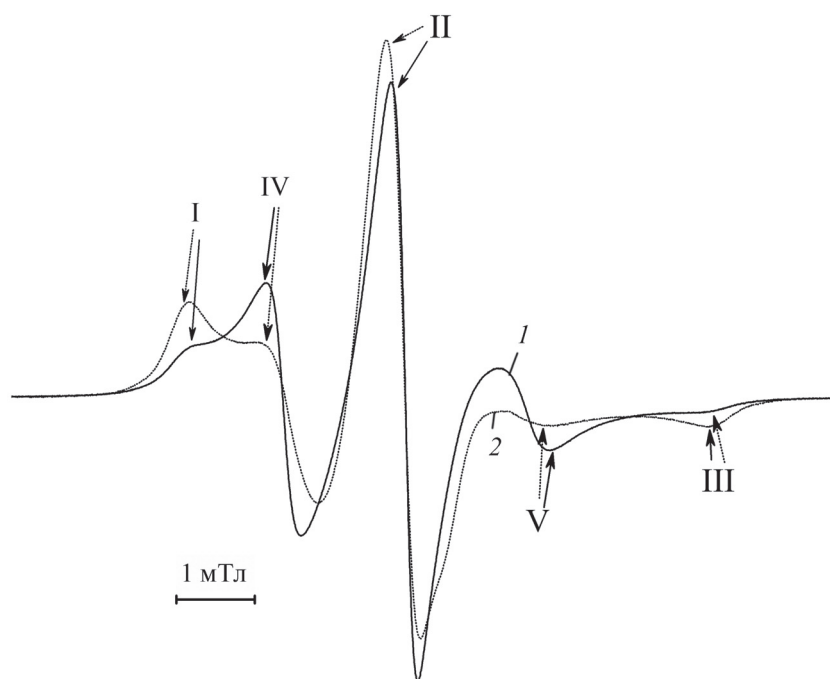


Рис. 3. Спектры ЭПР TEMPONE в равновесно набувшем в парах воды G1 (сплошная линия) и G2 (пунктирная линия) при 300 К

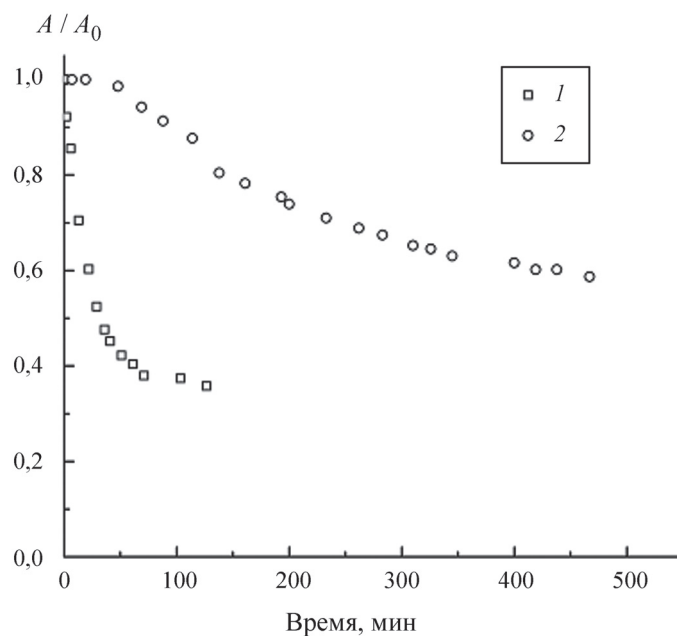


Рис. 4. Зависимость амплитуды высокопольной компоненты III, нормированной на амплитуду компоненты III в сухом полимере, от времени набухания в парах воды при 300 К (1 – желатин, 2 – ДГТ-желатин)

нентами спектра ЭПР, зарегистрированного при 90 К. Этот подход может быть использован для оценки степени деградации сшитого желатина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-06059).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thiele J., Ma Y., Bruekers S.M.C., Ma S., Huck W.T.S. // *Adv. Mat.* 2014. Vol. 26. P. 125.
2. Vlierberghe S., Dubruel P., Schacht E. // *Biomacromolecules* 2011. Vol. 12. P. 1387.
3. Benton J.A., DeForest C.A., Vivekanandan V., Anseth K.S. // *Tissue Eng. Part A.* 2009. Vol. 15. P. 3221.
4. Haugh M.G., Jaasma M.J., O'Brien F.J. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009. Vol. 89A. P. 363.
5. Lou X., Chirila T.V. // *J. Biomater. Appl.* 1999. Vol. 14. P. 184.
6. Адрианов К.А. Синтез и модификация полимеров. М., 1976.
7. Nagamura T., Woodward A.E. // *Biopolymers.* 1977. Vol. 16. P. 907.
8. Podlpec R., Gorgieva S., Jurašin D., Urbančič I., Kokol V., Štrancar J. // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014. Vol. 6. P. 15980.
9. Кузнецов А.Я. Метод спинового зонда (основы и применение). М., 1976.
10. Вассерман А.М., Коварский А.Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров. М., 1986.
11. Delgado L.M., Bayon Y., Pandit A., Zeugolis D.I. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2015. Vol. 21B. P. 298.
12. Nemets E.A., Pankina A.P., Sevastianov V.I. // *Inorg. Mater. Appl. Res.* 2017. Vol. 8. P. 718.
13. Chumakova N.A., Ivanova T.A., Golubeva E.N., Kokorin A.I. // *Appl. Magn. Reson.* 2018. Vol. 49. P. 511.
14. Vorobiev A.Kh., Chumakova N.A. Simulation of Rigid-Limit and Slow-Motion EPR Spectra for Extraction of Quantitative Dynamic and Orientational Information. Nitroxides – Theory, Experiment and Applications. 2012. P. 57.
15. Hoff A.J. Advanced EPR: Applications in Biology and Biochemistry // Elsevier Science. 1989.
16. Soetbeer J., Gast P., Walish J. J., Zhao Y., George C., Yang C., Swager T.M., Griffin R.G., Mathies G. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Vol. 20 P. 25506.

Поступила в редакцию 10.05.2020

Получена после доработки 12.05.2020

Принята к публикации 20.05.2020

SORPTION OF WATER VAPOR BY GELATIN-BASED POLYMERS: ESTIMATION OF RATE AND SORPTION DEGREE USING SPIN PROBE METHOD

E.M. Zubanova^{1*}, E.N. Golubeva¹, M.Ya. Melnikov¹, E.A. Nemets²,
V.I. Sevastianov²

(¹ Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department; ² Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation; *e-mail: kate_zub@mail.ru)

Spin-probe method is applied for the estimation of rate and sorption degree of water vapor by gelatin-based polymers. The rate and the sorption degree of gelatins are shown to be influenced by their cross-linking extent. The time of cross-linked gelatin swelling in water vapor at 300 K is three times higher than the time of native gelatin swelling in the same conditions.

Key-words: electron paramagnetic resonance, gelatin, spin-probe method, sorption.

Сведения об авторах: *Зубанова Екатерина Михайловна* – мл. науч. сотр. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», химический факультет, канд. хим. наук (kate_zub@mail.ru); *Голубева Елена Николаевна* – вед. науч. сотр. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», химический факультет, докт. хим. наук, профессор (legol@mail.ru); *Мельников Михаил Яковлевич* – зав. кафедрой химической кинетики химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», докт. хим. наук, профессор (melnikov46@mail.ru); *Немец Евгений Абрамович* – вед. науч. сотр. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии, докт. биол. наук (evgnemets@yandex.ru); *Севастьянов Виктор Иванович* – руководитель отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, профессор, докт. биол. наук (viksev@yandex.ru).