

УДК 541.64:547.9

ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДНЫЕ ГИДРОГЕЛИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ЧАСТИЦАМИ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ДИСПЕРСИИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ¹

© 1996 г. К. С. Казанский*, С. Г. Скуридин**, В. И. Кузнецова*, Ю. М. Евдокимов**

* Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук
117977 Москва, ул. Косыгина, 4

** Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук
117984 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 25.04.95 г.

Гидрогели, содержащие частицы холестерической ЖК-дисперсии дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с диаметром порядка 10^3 Å, получены путем фазового исключения ДНК из водно-солевых растворов под действием метакрилатных макромономеров ПЭО и последующей радикальной полимеризации. Показано, что в процессе иммобилизации частиц сохраняется характерная для них аномальная оптическая активность в виде интенсивной полосы в спектре кругового дихроизма при 275–280 нм. Амплитуда этой полосы изменяется в широких пределах в ходе гелеобразования, а также при вариации концентрации полимера в гелях при их набухании или осмотическом десвellingе. Данна полукаличественная трактовка поведения ЖК-частиц в гелях в рамках теории фазового исключения ДНК под действием ПЭГ. Рассмотрены возможности применения иммобилизованных в гелях ЖК-частиц ДНК как микрозондов, чувствительных к давлению набухания полимерной сетки, а также в качестве основы для биодатчиков нового поколения.

ВВЕДЕНИЕ

Известна способность некоторых водорастворимых полимеров образовывать путем фазового исключения из водно-солевых растворов лиотропные холестерические ЖК-дисперсии двухцепочечных ДНК [1]. Одним из таких полимеров является ПЭГ, исключающий эффект которого по отношению к ДНК детально изучен в широком диапазоне ММ и концентраций [1–3]. Как следует из данных работы [2], “критическая” концентрация ПЭГ c_n^* , необходимая для образования ЖК-дисперсии, а также характер зависимости c_n^* от ММ отвечают формированию сплошной сетки зацеплений. Иначе говоря, фазовое исключение ДНК в виде дисперсии ЖК-частиц происходит в полуразбавленных растворах ПЭГ. Имеется теория этого явления [4].

Высокая чувствительность холестерической структуры ЖК-дисперсий ДНК к различным биологически активным соединениям, взаимодействующим с ДНК, определяет интерес к этим дисперсиям как к потенциальным биодатчикам. Хотя принципы биосенсорных устройств на базе такого рода биодатчиков еще только разрабатываются [5], некоторые из возникающих здесь проблем достаточно ясны. В частности, наряду с при-

менением жидких дисперсий возможно создание датчиков пленочного типа на основе гидрогелей с иммобилизованными в них ЖК-частицами, причем второй вариант может оказаться предпочтительным, поскольку консервация ЖК-дисперсии ДНК в геле должна исключить ее нестабильность, обусловленную агрегацией и седиментацией.

Одна из возможностей иммобилизации ЖК-частиц реализована в работе [6] путем полимеризации акриламида в предварительно сформированной ЖК-дисперсии ДНК. Частицы дисперсии сохраняли при этом аномальную полосу в спектре кругового дихроизма. Образующиеся гидрогели имели, однако, недостаточную прозрачность, по-видимому, из-за несовместимости ПЭГ и поликариламида.

Как полимер с двумя концевыми группами OH, допускающий множество реакций функционализации [7], ПЭГ сам по себе открывает целый ряд возможностей для получения полимерных сеток. Одним из наиболее рациональных подходов в данном случае является синтез макромономеров ПЭО, принципы и методы которого детально разработаны [8, 9], и их последующая полимеризация в присутствии ЖК-частиц. Очевидно, что химическая модификация системы не должна, с одной стороны, нарушать весьма лабильную структуру лиотропных холестерических ЖК-частиц ДНК, с другой – препятствовать наблюдению

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 95-03-08140) и Государственной научно-технической программы “Новейшие методы биоинженерии”.

за их состоянием по аномальной оптической активности.

Наряду с применением в качестве биодатчиков [5] иммобилизованные в гелях ЖК-частицы ДНК могут быть использованы как микрозонды принципиально нового типа для исследования структуры гидрогелей и протекающих в них процессов – от набухания и десвellingа до диффузии через полимерную сетку веществ, взаимодействующих с ЖК-зондами:

Получению гидрогелей на основе метакрилатных макромономеров ПЭО и предварительному анализу поведения иммобилизованных в таких гелях ЖК-частиц ДНК посвящена настоящая работа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества

ПЭГ 4000 и ПЭГ 6000 (фирм “Merck” и “Loba Chemie”) перед синтезом макромономеров высушивали в вакууме. Содержание групп OH в ПЭГ, определенное методом ИК-спектроскопии [10], соответствовало вычисленному из ММ; например, для одного из ПЭГ 4000 экспериментальное и расчетное значения составляли соответственно 4.75×10^{-4} и 5.0×10^{-4} моль/г.

Метакрилоилхлорид непосредственно перед использованием перегоняли в токе аргона, отбирая фракцию в интервале $90 \pm 1^\circ\text{C}$; его чистоту контролировали с помощью жидкостной хроматографии.

Триэтиламин (ТЭА) после осушки металлическим Na перегоняли при $89.4 \pm 0.5^\circ$, сушили над CaH_2 до прекращения газовыделения и затем вновь отгоняли на вакуумной установке.

Бензол для синтеза макромономеров последовательно осушали KOH , металлическим Na и затем перегоняли над Na. Гептан, гексан, эфир использовали без дополнительной очистки.

Неорганические вещества имели квалификацию ч. д. а. (NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), х. ч. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ч. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$); последний был переосажден из воды.

Предварительно очищенный препарат ДНК эритроцитов цыплят (“Reanal”) подвергали ультразвуковой деполимеризации, после чего его ММ составляла $(5-8) \times 10^5$. В работе использовали два образца (ДНК-1, ДНК-2), несколько различающиеся по оптической активности образуемых ими ЖК-дисперсий. Все растворы, содержащие ДНК, готовили в 0.01 М фосфатном буфере (рН 6.67).

Синтез и характеристика макромономеров

Макромономеры ПЭО получали по аналогии с работой [11] путем реакции метакрилоилхлорида

с ПЭГ в присутствии ТЭА как катализатора и реагента, связывающего HCl. Глубину превращения p и, следовательно, среднечисленную функциональность продукта \bar{f}_n регулировали, варьируя концентрацию групп OH, соотношение реагентов и продолжительность реакции.

Процедура синтеза состояла в следующем. В реактор с мешалкой, продутый аргоном, вводили расчетные количества ПЭГ и бензола, после чего для окончательной осушки системы отгоняли 1–2 мл азеотропа. В охлажденный до $4-6^\circ\text{C}$ реактор вводили ТЭА, а затем медленно (в течение 2 ч) подавали раствор метакрилоилхлорида в бензole; после этого реакционную смесь перемешивали при той же температуре еще в течение 1.5–2 ч. В ходе реакции образуется осадок соли ТЭА. Реактор нагревали до комнатной температуры и оставляли на ночь. Концентрация групп OH в реакционной смеси составляла 0.06–0.07 моль/л, концентрация метакрилоилхлорида и ТЭА соответственно в 1.5 и 1.2 раза выше. Для предотвращения полимеризации метакрилатных групп в систему вводили около 0.2% гидрохинона в расчете на ПЭГ.

Продукт реакции отделяли от осадка соли ТЭА путем фильтрования реакционной смеси через плотный стеклянный фильтр и осаждали в избыtkе гептана. После фильтрования и промывки гексаном или эфиром полимер высушивали в вакууме. Выход продукта составлял 78–83% от расчетного.

Функциональность макромономеров определяли спектральными методами.

В УФ-спектре метакриловых эфиров имеется интенсивная полоса при 210 нм (ϵ – от 6700 до 8100 л/моль см [12]), которая и была использована для измерений. Спектры поглощения водных растворов регистрировали на спектрофотометре “Specord UV-VIS” (“Carl Zeiss”). Коэффициент поглощения $\epsilon_{209} = 8130$ л/моль см определяли с использованием 2-гидроксиэтилметакрилата как близкого аналога концевой группы. Величину \bar{f}_n рассчитывали из оптической плотности D_{209} по формуле

$$\bar{f}_n = D_{209}(M_{\text{ПЭГ}} + fM_F)/\epsilon_{209}lc_n, \quad (1)$$

где $M_{\text{ПЭГ}}$ и M_F – ММ исходного ПЭГ и метакрилатной группы, c_n – концентрация макромономера, l – длина кюветы; число функциональных групп в молекуле макромономера f для простоты расчетов принято равным 1.5, что вносит погрешность не выше 0.5%. Величину \bar{f}_n находили, усредняя результаты нескольких измерений; закон Бера удовлетворительно соблюдался как для 2-гидроксиэтилметакрилата, так и для макромономеров. На рис. 1 дана иллюстрация процедуры определения функциональности из УФ-спектра.

В качестве контрольной использовали аналогичную методику, базирующуюся на полосе 1726 см⁻¹ в ИК-спектре метакрилатов [13]. Спектры растворов в CCl₄ регистрировали на спектрофотометре FTS-7 ("Bio-Rad") в кюветах из NaCl; величина ϵ , также измеренная для 2-гидроксиэтилметакрилата как эталона, составляла 530 л/моль см. Результаты обоих методов различались не более чем на 5%.

Характеристики использованных в работе макромономеров ПЭО приведены в табл. 1. Содержание непрореагировавшего ПЭГ P_0 и мольная доля разветвителя (диметакрилата ПЭГ) в функционализированном полимере n_2 , приведенные в двух последних столбцах, рассчитаны при условии равной реакционной способности концевых групп: $P_0 = (1 - p)^2$; $n_2 = p/(2 - p)$, где $p = \bar{f}_n/2$.

Получение и анализ гидрогелей

Холестерические ЖК-дисперсии ДНК формировали согласно работе [14] путем смешения примерно равных объемов двух растворов – ДНК и макромономера ПЭО, приготовленных в 0.01 М фосфатном буфере с добавлением 0.6–1.0 М NaCl в раствор полимера. Концентрации ДНК и полимера подбирались из соображений надежной регистрации аномальной полосы в спектре кругового дихроизма. Концентрацию ДНК в исходном растворе контролировали спектрофотометрически на приборе "Specord M-40" ("Carl Zeiss") с использованием известной величины $\epsilon_{260} = 6600$ л/моль см.

Полимеризацию проводили под действием инициирующей системы Na₂S₂O₈–Na₂S₂O₃ (от 0.4 до 1.4 г/л каждого компонента) при 30°C и концентрациях полимера c_n от 0.14 до 0.25 г/мл. Конструкция реакционных ячеек обеспечивала получение гидрогелей в форме плоских слоев толщиной 1–5 мм. В ряде случаев в параллельных опытах получали гидрогели той же концентрации, не содержащие частиц ДНК.

Для предотвращения ингибирования полимеризации кислородом ее и все предшествующие ей процедуры (перегонку воды, приготовление и смешение растворов, введение инициаторов, заполнение ячеек) осуществляли в атмосфере чистого аргона.

Аномальную оптическую активность ДНК в жидкостных дисперсиях и пленках гелей измеряли при помощи дихрографа "Mark III" ("Jobin-Yvon") при длине волны около 275 нм, нормируя ее с учетом концентрации ДНК в образце и его оптической длины и выражая в виде $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_D$, где ϵ_L и ϵ_D – коэффициенты поглощения (л/моль см) для лево- и правополяризованного света соответственно. Изменение $\Delta\epsilon$ в ходе гелеобразования регистрировали путем сравнения оптической активности

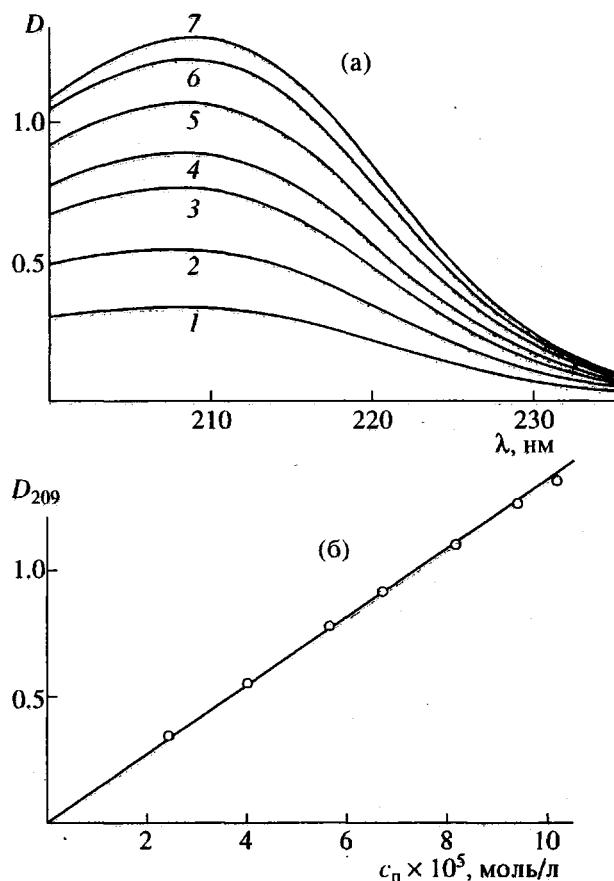


Рис. 1. Определение функциональности макромономеров ПЭО из УФ-спектров. а – спектры поглощения макромономера Б при концентрации $c \times 10^5 = 2.4$ (1), 4.0 (2), 5.6 (3), 6.7 (4), 8.2 (5), 9.4 (6) и 10.2 моль/л (7); б – зависимость оптической плотности при 209 нм от концентрации макромономера.

образовавшегося гидрогеля и пробы, взятой из смеси до введения инициаторов, или мониторингом прямо в кювете дихрографа. В опытах по набуханию и десвельлингу гелей, содержащих ЖК-частицы ДНК, динамику изменения $\Delta\epsilon$ регистрировали, помещая пленку геля в соответствующий раствор непосредственно в оптической ячейке.

Равновесное набухание гидрогелей w (мл/г) измеряли весовым методом и рассчитывали по формуле

$$w = w_i(m/m_i)(\rho_i/\rho), \quad (2)$$

Таблица 1. Характеристики метакрилатных макромономеров ПЭО, используемых в синтезе гидрогелей

Серия	ММ ПЭГ	\bar{f}_n	P_0	n_2
А	4000	1.29 ± 0.03	0.126	0.48
Б	4000	1.66 ± 0.02	0.029	0.71
В	6000	1.86 ± 0.03	0.005	0.87

Таблица 2. Характеристики гидрогелей ПЭО, содержащих ЖК-частицы ДНК

Серия	Опыт, №	c_n , г/мл	$-\Delta\epsilon_0^*$	$-\Delta\epsilon_\infty^*$	w , мл/г
А	1	0.154	110	77	—
	2	0.195	75	112	11.7
Б	1	0.146	104	2	10.3
	2	0.165	129	~0	—
	3	0.188	128	94	7.9
	4	0.228	~0	91	—
	5	0.243	17	84	7.0
В	1	0.180	149	137	9.4
	2	0.201	135	132	20.9

* Оптическая активность до ($\Delta\epsilon_0$) и после ($\Delta\epsilon_\infty$) полимеризации.

где индекс i относится к исходному состоянию геля (после синтеза), m и ρ – соответственно масса и плотность образца; последнюю рассчитывали из соображений аддитивности, используя величину удельного объема ПЭО в воде (0.83 мл/г [15]). Исходное набухание $w_i = 1/c_n$ в ряде случае контролировали высушиванием гидрогелей после синтеза. В формуле (2) не учитываются потери зольной фракции, которые не превышали 1–3%.

В табл. 2 приведены характеристики гидрогелей, которые обсуждаются в работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизация ЖК-частиц ДНК в геле ПЭО состоит из двух стадий – фазового исключения ДНК под действием макромономера ПЭО с образованием дисперсии этих частиц и собственно полимеризации, приводящей к гидрогелю.

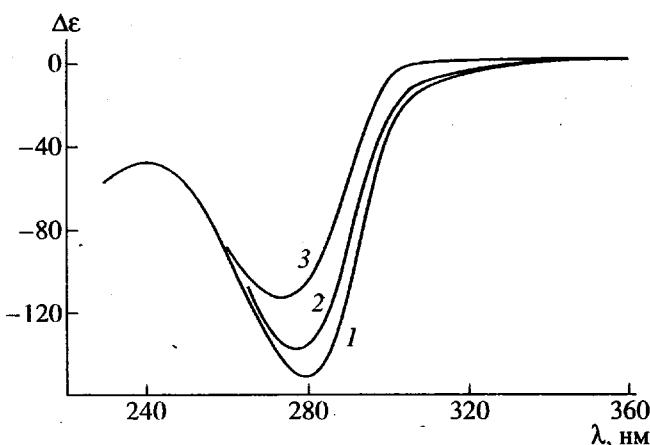


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма растворов (1, 2) и гидрогеля (3), содержащих ЖК-частицы ДНК. 1 – ПВГ 4000, 2 – макромономер А, 3 – гидрогель (серия А, опыт 2). $c_n = 0.190$ г/мл.

Высокая чувствительность свойств холестерических ЖК-частиц ДНК к состоянию окружающей среды, в частности к ионному составу и диэлектрической проницаемости раствора, состоянию воды, плотности физической сетки макромолекул ПЭО и ряду других факторов [1], делает отнюдь не очевидным сохранение упаковки молекул ДНК при химической модификации системы. Так, макромономер ПЭО отличается от обычно используемого ПЭГ наличием в предельном случае двух гидрофобных метакрилатных групп, что может изменить условия фазового исключения ДНК. Не менее серьезных изменений можно ожидать при переходе от сетки зацеплений в растворе к ее комбинации с химической сеткой в образующемся геле.

На рис. 2 приведены спектры ЖК-дисперсии ДНК, сформированной под действием макромономера ПЭО, до и после полимеризации в сравнении со спектром "стандартной" дисперсии, полученной с применением ПЭГ. Как видно, интенсивная отрицательная полоса, характерная для холестерической ЖК-фазы ДНК [1], сохраняется в ходе иммобилизации.

Зависимости амплитуды этой полосы от концентрации полимера в растворе, представленные на рис. 3а и 3б, показывают, что на стадии образования ЖК-дисперсии замена концевых ОН-групп ПЭГ на метакрилатные практически не влияет на эффективность полимера в фазовом исключении ДНК. Этот результат вполне закономерен, поскольку доля метакрилатных групп в макромономерах составляет 1.5–2.2 мол. %, а их абсолютная концентрация в растворе в изученном интервале составов не превышает 0.1 моль/л. Иначе говоря, введение гидрофобных групп в таких количествах вряд ли может изменить диэлектрические и поверхностно-активные свойства системы и, следовательно, условия формирования ЖК-частиц.

Сложнее обстоит дело при переходе от растворов к гелям. Как показывают данные табл. 2, в ходе гелеобразования имеют место случаи практически полного сохранения оптической активности (серии А, В; серия Б, опыт 3), а также значительные по величине и разные по знаку изменения активности вплоть до ее полного исчезновения (серия Б, опыты 1 и 2). Это видно также из рис. 3в, где зависимость $\Delta\epsilon(c_n)$ для гелей (например, кривая для серии Б) существенно отличается от кривых для растворов как по амplitude, так и по положению на оси концентраций.

Следует отметить, что если в случае растворов в области $c_n < c_n^*$ молекулы ДНК находятся в изотропном состоянии, то их состояние в гелях ниже c_n^* не столь ясно и в данной работе не анализируется. Необходимо, однако, подчеркнуть, что сни-

жение или даже потеря оптической активности ЖК-фазы при переходе в гель не связаны с какими-то необратимыми повреждениями ДНК, например с ее денатурацией. На это указывает практически полное восстановление структуры ЖК-частиц при выдерживании гидрогелей в растворах ПЭГ с концентрацией, обеспечивающей максимальную оптическую активность. На физической природе такого восстановления мы остановимся несколько ниже.

Резюмируя эту часть работы, подчеркнем, что при фазовом исключении ДНК в виде дисперсии ЖК-частиц макромономеры ПЭО столь же эффективны, как и исходные ПЭГ, причем практически независимо от функциональности. Вместе с тем при переходе от растворов к гелям оптическая активность ЖК-дисперсии несколько изменяется, но при оптимизации условий возможно получение гидрогелей с включенными в них ЖК-частицами, по оптической активности не уступающих соответствующим растворам. Важно отметить, что ЖК-фаза в гидрогелях оказывается весьма стабильной, и если потеря ими воды исключена, то оптические характеристики ЖК-частиц не изменяются по меньшей мере в течение нескольких месяцев.

Анализ поведения ЖК-частиц ДНК в растворах ПЭГ и предварительные опыты с гелями позволяют ожидать, что данные частицы окажутся чувствительными к состоянию окружающего полимерного геля и в связи с этим могут быть использованы как внутренние зонды совершенно нового типа. Обладая существенно большими размерами (диаметр частиц в растворах около 3700 Å [1]), чем традиционные парамагнитные или люминесцентные зонды, ЖК-частицы ДНК потенциально могут "ощущать" структурную ситуацию соответствующего масштаба, что представляет фундаментальный интерес.

Рассмотрим некоторые из возможных аспектов применения такого рода зондов.

Гелеобразование

Для выяснения характера и причин изменения активности ЖК-частиц при гелеобразовании (табл. 2) проведены опыты с непрерывной регистрацией спектра кругового диахроизма в ходе трехмерной полимеризации при разных начальных концентрациях макромономера. Как видно из приведенных на рис. 4 кинетических кривых, после прохождения гель-точки (от 75 до 90 мин) оптическая активность может вести себя совершенно по-разному – расти, почти не изменяться или падать. Общая тенденция этих изменений, однако, заключается в том, что формирование ковалентно связого геля снижает эффективность полимера как исключающего агента, в результа-

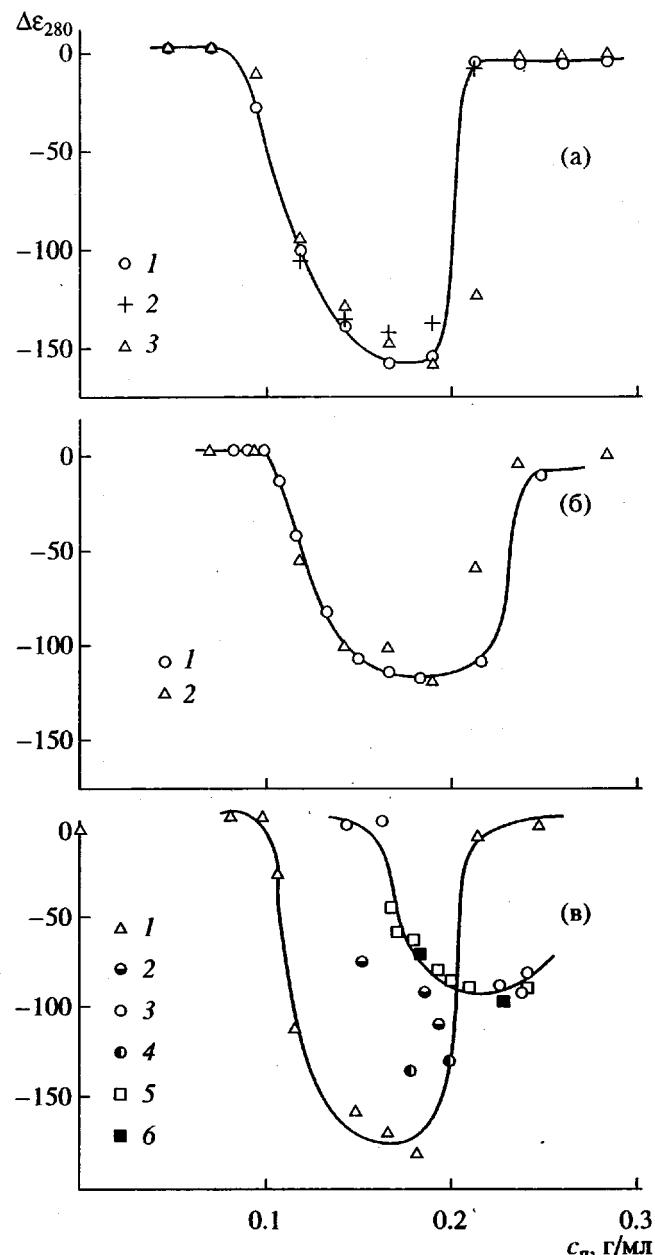


Рис. 3. Зависимости оптической активности ЖК-частиц ДНК ($\Delta\epsilon$) от концентрации полимера c_p в растворах и гидрогелях: а – растворы ПЭГ 4000 (1), макромономеров А (2) и Б (3); б – растворы ПЭГ 6000 (1) и макромономера В (2); в – гидрогели серий А (2), Б (3) и В (4) после синтеза, 5 – гидрогель серии Б, опыт 5 в процессе набухания, 6 – гидрогель Б, опыт 2 после десвellingа. Для сравнения показана кривая для ПЭГ 4000 (1); а, в – ДНК-1, б – ДНК-2; концентрация NaCl 0.5 (а) и 0.3 моль/л (б, в).

те чего диаграмма $\Delta\epsilon(c_p)$ для гидрогелей оказывается смещенной к более высоким концентрациям (рис. 3в).

В терминах существующей теории фазового исключения ДНК под действием ПЭГ [4] этот

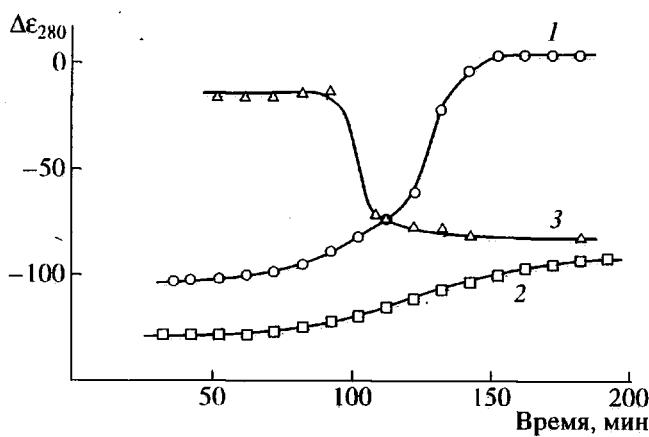


Рис. 4. Изменение оптической активности ЖК-частиц ДНК в ходе образования гелей серии Б, опыты 1 (1), 3 (2) и 5 (3).

сдвиг отвечает снижению давления полимерной фазы на ЖК-частицу при переходе от раствора к гелю, что в свою очередь приводит к увеличению расстояния между жесткоцепными молекулами ДНК в холестерической структуре и в конечном итоге к потере оптической активности. Попытаемся дать оценку возможного концентрационного сдвига.

Если рассмотреть, например, "критическую" точку появления холестерической ЖК-фазы при повышении концентрации полимера в системе, то условием равновесия в этой точке является равенство осмотических давлений внутри (Π) и вне (π) частицы ДНК

$$\Pi(\Phi^*) = \pi(\phi_s^*) = \pi(\phi_g^*), \quad (3)$$

где ϕ_s^* и ϕ_g^* – объемные доли полимера соответственно в растворе и в геле, обеспечивающие сжатие частицы ДНК до критического состояния, в котором объемная доля ДНК составляет Φ^* и величина $\Delta\epsilon \neq 0$. Для полуразбавленного раствора и геля, согласно работе [16],

$$\pi(\phi_s^*) = (RT/V_s)B(\phi_s^*)^2 \quad (4)$$

$$\pi(\phi_g^*) = (RT/V_s)B(\phi_g^*)^2 - (RT/V_m)(\phi^*/\bar{x}_c)(\phi_0/\phi_g^*)^{2/3}, \quad (5)$$

где B – второй вириальный коэффициент, V_s и V_m – мольные объемы растворителя и мономерного звена, \bar{x}_c – средняя длина цепей сетки, ϕ_0 отвечает гелю в состоянии начала отсчета (in the reference state). Предполагая, что $\Delta\Phi^* = \phi_g^* - \phi_s^* \ll \phi_s^*$; $\phi_g^* + \phi_s^* \approx 2\phi_s^*$, а также пренебрегая по-

следним сомножителем во второй, эластической составляющей давления сетки (5), получим

$$\Delta\Phi^* \approx (V_s/V_m)(2B\bar{x}_c)^{-1} = (V_s/2B)n_c \quad (6)$$

(n_c – плотность сетки). Поскольку для ПЭО в водном растворе $V_m \approx 36.5$ мл/моль [15], $V_m/V_s \approx 2$, а параметр B лежит в интервале 0.05–0.1, для $\bar{x}_c \approx 100$ –150 крайние оценки приводят к $\Delta\Phi^* \approx 0.02$ –0.05 (или $\Delta c_n \approx 0.017$ –0.04 г/мл), что по порядку величины согласуется со сдвигом кривых на рис. 3в.

Элементарные оценки показывают, таким образом, что из-за наличия отрицательного эластического вклада в давление набухания гидрогеля, последний может поддерживать ЖК-частицу ДНК в холестерическом, оптически активном состоянии при более высоких, чем в растворе, концентрациях.

Из простейших соображений ясно, что ситуации в геле и в растворе должны сближаться при уменьшении концентрации узлов химической сетки, т.е. в случае макромономеров с более высокой ММ и низкой функциональностью. На это прямо указывает и соотношение (6). Предварительные данные подтверждают такую тенденцию: на рис. 3в точки для гелей в сериях А и В действительные лежат ближе к кривой $\Delta\epsilon(c_n)$ для растворов. Величины равновесного набухания (табл. 2), отражающие более низкую плотность узлов сетки в этих гелях по сравнению с гелями серии Б, вполне коррелируют с тенденциями в $\Delta\epsilon$. Здесь, очевидно, возможен более строгий анализ корреляции между $\Delta\Phi^*$ и n_c , согласно уравнению (6), в том числе с привлечением данных по модулю упругости, эквивалентному эластической составляющей давления набухания. На данном этапе работы это, однако, вряд ли оправдано.

Таким образом, в ходе трехмерной радикальной полимеризации ЖК-частицы ДНК как микрозонды обнаруживают чувствительность к наступлению гель-точки, процессу формирования полимерной сетки и, в некоторой степени, к ее плотности сшивания.

Важно отметить, что введенные в гидрогель ЖК-зонды лишь незначительно возмущают полимерную сетку. Оценки показывают, что при используемой концентрации ДНК (около 10^{-5} г/мл) ее частицы находятся в среднем на расстояниях около 50–100 диаметров и занимают менее 0.003% объема геля. С другой стороны, отдельная частица ЖК-дисперсии ДНК значительно превосходит по размерам клубки ПЭО. Измерения вязкости макромономеров на основе ПЭГ 4000 приводят к величинам $[\eta] \approx 0.15$ дL/g, откуда, пользуясь обычным подходом [17], получим для размера клубка ~ 60 Å. В контакте с поверхностью ЖК-частицы может находиться, таким образом, порядка 10^4 таких клубков, и их встраивание

в химическую сетку с полифункциональными узлами вряд ли может остаться незамеченным для весьма лабильной ЖК-структуры зондов.

Набухание и десвеллинг

Чувствительность к гелеобразованию – лишь один из аспектов применения ЖК-зондов. Другую возможность предоставляет поведение ЖК-частиц в обратимых циклах набухание–десвеллинг, в которых можно в достаточно широких пределах варьировать концентрацию полимера в геле и, следовательно, его давление набухания.

Методически наиболее просто наблюдать за ЖК-зондами в процессе набухания. На рис. 5 показаны кривые $\Delta\epsilon(t)$ для образцов серии А. Как видно, оптическая активность следует кривой фазового разделения и в зависимости от начальной величины c_n проходит через максимум или просто спадает до нуля, поскольку в конечном состоянии система оказывается ниже “критической” точки существования ЖК-фазы; в данном случае равновесное набухание гидрогеля отвечает $c_n \approx 0.07$ – 0.08 г/мл.

Зависимость оптической активности ЖК-частиц от концентрации полимера в набухающем геле можно получить в количественной форме, регистрируя одновременно $\Delta\epsilon$ и w ; на кривой для гелей на рис. 3 в приведены точки, относящиеся к одному из таких опытов. Видно, что вся совокупность данных, полученная в опытах по образованию и набуханию гелей данной серии, вполне удовлетворительно описывается единой кривой $\Delta\epsilon(c_n)$.

Эта зависимость может быть в принципе использована для трансформации кривых $\Delta\epsilon(t)$ в функцию $c_n(t)$, которая в свою очередь дает основу для расчета коэффициента кооперативной диффузии фрагментов сетки D_c , определяющего темп набухания гидрогеля. Такие оценки применительно к данным рис. 5 приводят к значению $D_c \approx 2 \times 10^{-6}$ см²/с, что с учетом некоторой неопределенности в толщине образца вполне соглашается с известными из литературы данными. Параллельное исследование динамики набухания того же геля в виде диска, выполненное весовым методом, привело к величине $D_c = 1.8 \times 10^{-6}$ см²/с.

В гидрогелях, оказавшихся сразу после гелеобразования или в результате набухания в области $c_n < c_n^*$, давление набухшей сетки уже не может поддерживать внутри ЖК-частицы величину Φ^* , необходимую для существования холестерической структуры. Как было упомянуто выше, “сжать” молекулы ДНК до восстановления этой структуры можно, поместив гидрогель в раствор ПЭГ с концентрацией, обеспечивающей максимум оптической активности (рис. 3). Динамика такого восстановления показана на рис. 6. Как

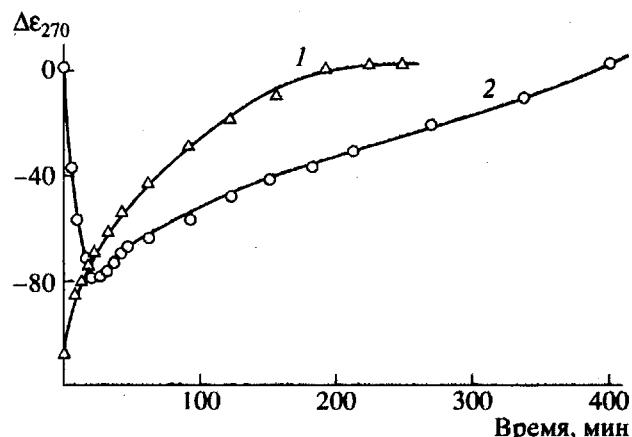


Рис. 5. Изменение оптической активности ЖК-частиц ДНК при набухании геля серии А (опыт 2) из исходного состояния (1) и после высыпивания до $c_n = 0.250$ г/мл (2).

видно, по масштабу времени она сопоставима с набуханием гелей, т.е. имеет ту же диффузионную природу.

Как оказалось, в этом случае действует двоякий механизм. С одной стороны, происходит типичный осмотический десвеллинг гидрогеля [18]: сжатие образца из-за снижения активности растворителя во внешнем растворе повышает концентрацию полимера в геле, и это способствует “сборке” оптически активных ЖК-частиц. С другой стороны, клубки ПЭГ, сравнимые по размерам с ячейками сетки, частично диффундируют внутрь геля, дополнительно повышая концентрацию полимера. Анализ распределения ПЭГ между внешним раствором и образцом геля показал, что при исходной концентрации полимера в геле 0.10 г/мл его концентрация возрастает до 0.16 г/мл из-за обратного осмоса растворителя и еще до 0.18 г/моль за счет проникновения клубков внутрь образца. В опытах с растворами более высокомолекулярных ПЭГ (например, с $M = 20000$) имеет место чисто осмотическое сжатие. В принципе характер увеличения оптической активности при десвеллинге может быть свидетельством того, что при $c_n < c_n^*$ в гелях частицы ДНК находятся в нематическом ЖК-состоянии.

Поведение ЖК-частиц в опытах по обратимому набуханию или десвеллингу с очевидностью диктует необходимость количественной трактовки амплитуды аномальной полосы ЖК-дисперсий ДНК в гелях. Известно, что оптическая активность холестерических ЖК-частиц может изменяться по ряду причин, в частности, из-за изменения шага спиральной структуры, а также в связи с переходом в нематическое или даже в изотропное состояние, хотя последнее маловероятно. Вместе с тем ясно, что зависимость $\Delta\epsilon(c_n)$ физически обусловлена влиянием давления полимерной

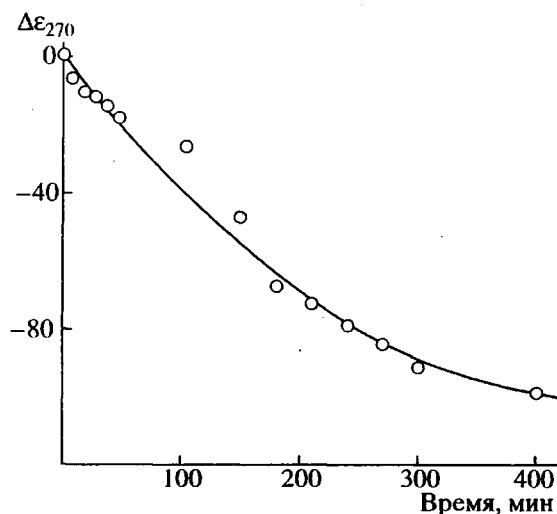


Рис. 6. Восстановление оптической активности ЖК-частиц при осмотическом десвельинге образца 2 серии Б в растворе ПЭГ 4000. $c_n = 0.170$ г/мл.

фазы, будь то раствор или гель, на состояние холестерических ЖК-частиц, и установление этой связи экспериментальными или теоретическими методами существенно повысит информационность применения ЖК-зондов в тестировании гелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты и их трактовка показывают, таким образом, что наблюдения за оптической активностью ЖК-зондов в ходе образования или при обратимых изменениях степени набухания геля позволяют следить за давлением набухшей сетки. В сочетании с традиционными макроскопическими измерениями степени набухания, модуля упругости и давления набухания такой "взгляд изнутри" может быть источником уникальной информации о структуре гелей и протекающих в них процессах.

Большой интерес может представить использование ЖК-зондов, распределенных в объеме гидрогеля, для исследования связывания и диффузии веществ, взаимодействующих тем или иным образом с ДНК, – солей металлов, красителей, антибиотиков, белков. Спектральные эффекты, проявляющиеся при таких взаимодействиях, например, появление новых интенсивных полос в спектре кругового диахроизма, детально изучены на примере ЖК-дисперсий ДНК в растворах [1]. В случае гидрогелей эти же эффекты могут быть использованы для прямого наблюдения за динамикой проникновения веществ в пленку образца и, следовательно, для анализа механизма их транспорта и определения коэффициентов диффузии. Известно (например, работа [19]), что проницаемость гидрогелей по отношению к

частицам разного размера является важным дополнительным источником информации об их структуре.

Несомненно, что полученные в работе гидрогели с ЖК-частицами ДНК в качестве чувствительных элементов, а также закономерности их поведения в процессе образования или при изменении состояния геля могут быть основой дизайна новых биосенсорных систем в рамках ранее сформулированного подхода [5, 14].

Авторы благодарят С.А. Дубровского за конструктивные замечания, а также Г.В. Ракову, Н.В. Антощенко и Л.К. Пахомову за участие в экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евдокимов Ю.М. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1991. Т. 55. № 9. С. 1804.
2. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г. // Биофизика. 1981. Т. 26. № 2. С. 222.
3. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Акименко Н.М. // Высокомолек. соед. А. 1984. Т. 26. № 11. С. 2403.
4. Гросберг А.Ю., Жестков А.В. // Биофизика. 1985. Т. 30. № 2. С. 233.
5. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Чернуха Б.А. // Биотехнология. 1992. № 5. С. 103.
6. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. № 1. С. 232.
7. Harris J.M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. New York; London: Plenum Press, 1992.
8. Казанский К.С., Кубиса П., Пенчек Ст. // Успехи химии. 1987. Т. 56. № 8. С. 1360.
9. Kazanskiy K.S., Ptitsyna N.V. // Makromol. Chem. 1989. В. 190. № 2. С. 255.
10. Чуканов Р.В., Кумпаненко И.В., Казанский К.С., Энтилис С.Г. // Высокомолек. соед. А. 1976. Т. 18. № 8. С. 1793.
11. Gramain Ph., Frère Y. // Polym. Commun. 1986. V. 27. № 1. P. 16.
12. Anguade H.E., Ortega I. // J. Am. Chem. Soc. 1951. V. 73. № 4. P. 1564.
13. Masson P., Beinert G., Franta E., Rempp P. // Polym. Bull. 1982. V. 7. № 1. P. 17.
14. Yevdokimov Yu.M., Skiridin S.G., Lortkipanidze G.B. // Liquid Cryst. 1992. V. 12. № 2. P. 1.
15. Hert M., Strazielle C. // Eur. Polym. J. 1973. V. 9. № 6. P. 543.
16. Flory P.J. Principles of Polymer Chemistry. Ithaca, New York: Cornell Univ. Press, 1953. Ch. XIII.
17. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физикохимию растворов полимеров. М.: Наука, 1978. Гл. 5.
18. Horvay F., Zrinyi M. // Macromolecules. 1982. V. 15. № 5. P. 1306.
19. Протозанова Е.Е., Архипович Г.Н., Лившиц М.А., Казанский К.С. // Высокомолек. соед. А. 1996. Т. 38. № 2. С. 315.

Poly(ethylene oxide) Hydrogels Containing Immobilized Particles of an LC Dispersion of Desoxyribonucleic Acid

K. S. Kazanskii*, S. G. Skuridin**, V. I. Kuznetsova*, and Yu. M. Evdokimov**

* Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
ul. Kosyginia 4, Moscow, 117977 Russia

** Engel'gardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences
ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

Abstract—Hydrogels containing immobilized particles of a cholesteric LC dispersion of desoxyribonucleic acid with a particle size of about 10³ Å in diameter were prepared by phase segregation of DNA from aqueous saline solutions induced by PEO-based methacrylate macromonomers and subsequent radical polymerization. The immobilization of DNA particles did not destroy the abnormal optical activity manifested as an intense band at 275–280 nm in the circular dichroism spectrum. The amplitude of this band significantly varied during the gel formation and also during the swelling or osmotic deswelling which are associated with the variation of polymer concentration in the gels. We suggest a semiquantitative interpretation of the behavior of LC particles in the gels which rests on the theory of phase segregation of DNA by PEG. Applications of gel-entrapped LC particles of DNA as microscopic probes sensitive to the swelling pressure of polymer network or as a principal element of biosensors of essentially new type are discussed.