



УДК 547.952.057:577.152.314.088.3

**СИНТЕЗ ФОСФОНОВЫХ АНАЛОГОВ СФИНГОМИЕЛИНОВ  
И ПОЛУЧЕНИЕ АФФИННОГО СОРБЕНТА ДЛЯ ОЧИСТКИ  
СФИНГОМИЕЛИНАЗ***Тазабекова Н. Т., Бушнев А. С., Какимжанова Ж. А.,  
Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез фосфоновых аналогов 2-N-стеароил- и 2-N-(10-ундеценил) сфингомиелинов. Для получения аффинного лиганда в ходе синтеза проведено окисление по двойной связи остатка 10-ундеценивой кислоты. Получен аффинный сорбент для очистки сфингомиелиназ на основе носителя Toyopearl HW-65.

В настоящее время возрос интерес к ферментам сфинголипидного обмена, которые используются как при изучении путей метаболизма различных классов сфинголипидов, так и в диагностике тяжелых наследственных заболеваний — сфинголипидозов [1, 2]. Перспективно также применение этих ферментов при ферментной терапии подобных заболеваний [3].

Для выделения и очистки ферментов, гидролизующих сфинголипиды, используют различные методы, однако не всегда удается получить удовлетворительные результаты. Существуют определенные трудности при выделении сфингомиелиназ различного происхождения, что, по мнению ряда авторов [4, 5], связано с наличием в составе фермента комплекса субъединиц с различными молекулярными массами.

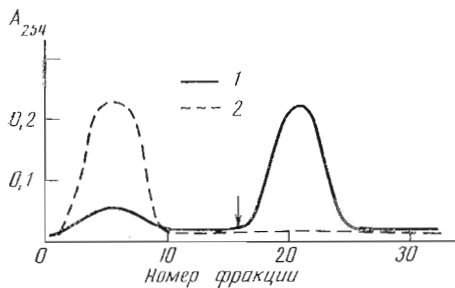
Метод аффинной хроматографии наряду с другими методами очистки, такими, как электрофорез, гель-фильтрация, обращенно-фазовая хроматография, позволяет получить ферменты высокой степени чистоты [6—8]. Известны примеры очистки  $\beta$ -галактозидаз из различных источников на аффинных сорбентах, где в качестве лигандов были использованы 4-аминофенил- $\beta$ -D-тиогалактозид и  $\epsilon$ -аминокапроил- $\beta$ -D-галактозиламин [6, 7].

На основе данных о значительном вкладе гидрофобных взаимодействий в образование фермент-субстратного комплекса была осуществлена очистка сфингомиелиназы из плаценты человека на сфингозилфосфолипид-СН-сефарозе [8]. Метод аффинной хроматографии позволил выделить сфингомиелинпереносящий белок из гепатомы-27 крысы с помощью сфингомиелин-АН-сефарозы 4В [9]. Однако представляется предпочтительным использовать в качестве лигандов нерасщепляемые аналоги субстратов, ингибиторы ферментов, такие, как тио- и фосфоносфинголипиды [7, 10], что позволяет проводить процесс очистки многократно на одном сорбенте.

Целью нашей работы являлось получение аффинного лиганда и на основе его создание аффинного сорбента для выделения и очистки сфингомиелиназ. В качестве лиганда мы предлагаем использовать фосфоновый аналог сфингомиелина (XIV) с остатком октан-1,8-дикарбоновой кислоты во втором положении сфингозинового основания, концевая карбоксильная группа которой является удобным якорем для присоединения к носителю (см. схему).

Исходным носителем для создания аффинного сорбента был выбран органический гидрофильный гель Toyopearl HW-65, обычно применяемый для гель-фильтрации. Этот носитель перспективен и для аффинной хроматографии, так как он обладает целым рядом преимуществ перед используемыми в настоящее время производными агарозы и полиакриламидными гелями: высокой механической прочностью, устойчивостью к воз-





Аффинная хроматография сфингомиелиназы из *B. cereus* на аффинном сорбенте (1); 2 — контрольный опыт на амино-Тоуорепарл HW-65; колонка 0,5×3,5 см, 1,8 мл влажного сорбента, нагрузка на колонку 1 мг белка, элюент — 10 мМ трис-НСl (рН 7,3); стрелка — начало элюции тем же буфером, содержащим 0,1% дезоксихолата натрия; объем фракций 1,2 мл

гетерогенностью реакционной среды вследствие низкой растворимости ацетата холина. Поэтому предпочтительнее применение тозилата холина, что обеспечивает выход 65–70%. Полученный в результате конденсации фосфатид (XII) окисляли и в образовавшемся соединении (XIII) удаляли бензоильную защиту, в результате чего был получен модифицированный сфингомиелин (XIV).

Соединения, полученные двумя способами, были идентичны по данным ТСХ, ИК-, <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии, элементного анализа. Строение всех промежуточных соединений также подтверждалось аналогичными способами.

Третий этап работы заключался в иммобилизации полученного липида (XIV) на носителе. С этой целью модифицированный введенным 3-амино-2-гидроксипропиловой группы сорбент Тоуорепарл HW-65 (амино-Тоуорепарл, (XV)) [11] конденсировали со сфинголипидом (XIV) в присутствии дициклогексилкарбодимиды в диметилформамиде. Полученная степень посадки лиганда — 4 мкмоль/мл — соответствует данным для аналогичных аффинных сорбентов на основе агарозы [9, 16]. Однако для достижения той же степени посадки нами был использован минимальный избыток лиганда (XIV), что является несомненным преимуществом предлагаемого способа приготовления аффинного сорбента перед описанным [9].

Чтобы подтвердить принципиальную возможность использования полученного нами аффинного сорбента (XVI), были проведены эксперименты по очистке сфингомиелиназы из *Bacillus cereus* (см. рисунок). Отсутствие неспецифической сорбции на остаточных аминогруппах, не занятых лигандом, было доказано путем проведения контрольных экспериментов на амино-Тоуорепарл без пришитого лиганда. Как видно из приведенных на рисунке данных, на предложенном аффинном сорбенте удается в стандартных условиях [4, 5, 8] сорбировать сфингомиелиназу с удовлетворительной эффективностью (~0,5 мг белка на 1 мл влажного сорбента). Полнота специфической сорбции фермента на приготовленном нами аффинном сорбенте составила более 90%, т. е. с учетом точности выбранных методов определения (рН-стагирование и спектрофотометрический метод) была практически количественной.

### Экспериментальная часть

ТСХ проводили на слауфоле UV-254 в системах: хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (А) (систему А применяли и для колоночной хроматографии), петролейный эфир — эфир, 1 : 1 (Б). Фосфолипиды обнаруживали молибденовым синим, комплексодержащие соединения — реактивом Драгендорфа. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 мкм (Сметарол, ЧССР). ИК-спектры регистрировали на спектрометре Shimadzu IR-435 (Япония), спектры <sup>31</sup>P-ЯМР — на спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) в CDCl<sub>3</sub>, УФ-спектры — на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония). Активность сфингомиелиназы измеряли с помощью рН-метра M 63 Digital pH meter, снабженного титратором ТТТ 60 с автобюреткой АВU-12 (Radiometer, Дания) [17], субстрат — синтетический N-стеароилдигидросфингомиелин [18]. В опытах по аффинной сорбции-десорбции использована сфингомиелиназа из *B. cereus* (КФ 3.1.4.12) производства НИО «Фермент» (Вильнюс) с уд. акт. 256 ед. акт/мг белка, M<sub>r</sub> 23 000 [19].

Данные элементного анализа соединений (V)–(VII), (X), (XII), (XIV) на С, Н, Р и соединения (III) на С, Н, N, Р удовлетворительно совпали с вычисленными значениями.

*3-Бензоил-1-(β-N,N-диметиламиноэтилфосфоно)-2-стеароил-1-дезоксигас-сфинганин (VI)*. Смесь 249 мг триизопропилбензолсульфохлорида, 54 мкл диметиламиноэтанола и 200 мг фосфоновой кислоты (IV) в 25 мл пиридина перемешивали 24 ч при 20° С, затем добавляли 0,4 мл воды и перемешивали еще 1 ч. Растворители удаляли при 0,05 мм рт. ст., колоночной хроматографией остатка в системе А выделяли липид (VI), выход 173 мг (79%), т. пл. 63–64° С,  $R_f$  0,5 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 1730 ср, 1650 ср, 1550 сл, 1270 ср, 1165 сл, 1050 ср, 955 ср, 725 ср. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР ( $\delta$ ): 23,9 м.д. C<sub>47</sub>H<sub>87</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P.

*1-(β-N,N-Диметиламиноэтилфосфоно)-2-стеароил-1-дезоксигас-сфинганин (VIII)*. 351 мг соединения (VI) растворяли в 17 мл смеси хлороформ – метанол – 2 н. метилат натрия в метаноле, 5 : 5 : 1. Через 15 ч реакционную массу нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали, хроматографией остатка в системе А выделяли фосфатид (VIII), выход 225 мг (71%), т. пл. 123–125° С,  $R_f$  0,43 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 1650 ср, 1550 сл, 1265 ср, 1150 сл, 1050 ср, 800 сл, 725 ср.

*1-(β-N,N,N-Триметиламмониетилфосфоно)-2-стеароил-1-дезоксигас-сфинганин (X)*. Смесь 255 мг соединения (VIII), 0,5 мл иодистого метила и 5 мл метанола выдерживали 5 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали, хроматографией в системе А выделяли фосфолипид (X), выход 120 мг (50%), т. пл. 198–200° С,  $R_f$  0,4 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 1650 ср, 1550 сл, 1240 ср, 1170 ср, 1070 сл, 1065 сл, 970 ср, 850 ср, 725 ср. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР ( $\delta$ ): 22,5 м.д. C<sub>41</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P·2H<sub>2</sub>O.

*3-Бензоил-2-(10-ундеценоил)-1-дезоксигас-сфинганин-1-диэтилфосфонат (III)*. К раствору 1,84 г фосфоната (I) [13] в 100 мл смеси тетрагидрофуран – пиридин, 1 : 1, при 20° С прибавляли раствор 1,61 г 10-ундеценоилхлорида в 50 мл тетрагидрофурана, выдерживали 2 ч, реакционную массу упаривали, хроматографией остатка в системе петролейный эфир – эфир, 1 : 1, выделяли фосфонат (III), выход 1,77 г (87%), масло,  $R_f$  0,5 (Б). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 1725 ср, 1655 ср, 1550 сл, 1250 сл, 1130 ср, 1050 сл, 900 сл, 725 ср. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР ( $\delta$ ): 30,45 м.д. C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>NO<sub>6</sub>P.

*3-Бензоил-2-(10-ундеценоил)-1-дезоксигас-сфинганин - 1-фосфоновая кислота (V)*. Раствор 0,9 г фосфоната (III), 0,62 г триметилхлорсилана и 0,78 г иодистого натрия в 35 мл метанола выдерживали 2 ч при 50° С, разбавляли водой, экстрагировали эфиром, промывали 0,1 н. тиосульфатом натрия, водой, упаривали, хроматографией остатка в системе А выделяли (V), выход 0,59 г (71%), масло,  $R_f$  0,65 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3250 ср, 3055 сл, 1720 ср, 1650 ср, 1550 сл, 1280 ср, 1050 ср, 726 ср. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР ( $\delta$ ): 23,2 м.д. C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>NO<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>P.

*3-Бензоил-2-(10-ундеценоил)-1-(β-N,N-диметиламиноэтилфосфоно) - 1-дезоксигас-сфинганин (VII)*. Смесь 289 мг триизопропилбензолсульфохлорида, 63 мкл диметиламиноэтанола и 200 мг фосфоновой кислоты (V) перемешивали 24 ч при 20° С, затем добавляли 0,4 мл воды и перемешивали еще 1 ч. Растворители удаляли при 0,05 мм рт. ст., хроматографией остатка в системе А получали 176 мг фосфоната (VII) (79%), масло,  $R_f$  0,5 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 3050 сл, 1730 ср, 1650 ср, 1550 сл, 1270 ср, 1170 сл, 1050 ср, 950 ср, 800 ср. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР ( $\delta$ ): 25,7 м.д. C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P.

*1-(β-N,N-Диметиламиноэтилфосфоно)-2-(10-ундеценоил) - 1-дезоксигас-сфинганин (IX)*. 80 мг соединения (VII) растворяли в 5 мл смеси хлороформ – метанол – 2 н. метилат натрия в метаноле, 5 : 5 : 1, через 20 ч нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали, из остатка хроматографией в системе А выделяли фосфатид (IX), выход 60 мг (88%), масло,  $R_f$  0,43 (А). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3300 шир, 3050 сл, 1650 ср, 1550 сл, 1270 ср, 1150 сл, 1050 ср, 800 сл, 726 ср.

*1-(β-N,N,N-Триметиламмониетилфосфоно)-2-(10-ундеценоил) - 1-дезоксигас-сфинганин (XI)*. Раствор 60 мг соединения (IX), 30 мкл иодистого метила в смеси 3 мл метанола и 3 мл хлороформа выдерживали 4 ч при 20° С. Реакционную массу упаривали, остаток хроматографировали в системе А. Выход фосфоната (XI) 55 мг (79%), масло,  $R_f$  0,4 (А) ИК-

спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3300 шир, 3050 сл, 1650 ср, 1550 сл, 1240 ср, 1170 сл, 975 ср, 840 ср, 725 ср. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta$ ): 22,03 м.д.

*3-Бензоил-1-( $\beta$ -N,N,N-триметиламмониеоэтилфосфоно)-2-(10'-ундеце-ноил)-1-дезоксигас-сфинганин (XII)*. Смесь 44 мг триизопропилбензол-сульфохлорида, 26 мг тозилата холина и 30 мг фосфоната (V) в 4 мл пиридина перемешивали 24 ч при 20° С, затем добавляли 0,4 мл воды и перемешивали еще 1 ч. Растворители удаляли при 0,05 мм рт. ст., остаток хроматографировали в системе А, выход фосфонолипида (XII) 24 мг (64%), масло,  $R_f$  0,41 (А). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3300 шир, 3050 сл, 1720 ср, 1650 ср, 1550 ср, 1400 шир, 970 ср, 800 ср. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta$ ): 22,96 м.д.  $\text{C}_{41}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ .

*3-Бензоил-2-(9-карбоксихонаноил)-1-( $\beta$ -N,N,N-триметиламмониеоэтилфосфоно)-1-дезоксигас-сфинганин (XIII)*. К раствору 30 мг соединения (XII) в 15 мл уксусной кислоты при 20° С добавляли 3,29 мл смеси 0,02 М  $\text{NaIO}_4$  и 0,024 М  $\text{KMnO}_4$ , 1:1, затем добавляли 0,024 М  $\text{KMnO}_4$  порциями по мере обесцвечивания. Через 5 ч, когда окраска более не изменялась, реакцию массу обесцвечивали метабисульфитом натрия, разбавляли водой до 25 мл, подкисляли 0,1 М соляной кислотой до pH 2,0, вещество экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2:1 (2×20 мл), из экстракта хроматографией в системе А выделяли липид (XIII), выход 22 мг (68%), масло,  $R_f$  0,38 (А). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3300 шир, 1720 ср, 1640 ср, 1540 сл, 1250 ср, 960 ср, 725 ср. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta$ ): 22,8 м.д.

*2-(9-Карбоксихонаноил)-1-( $\beta$ -N,N,N-триметиламмониеоэтилфосфоно)-1-дезоксигас-сфинганин (XIV)*. А. Раствор 80 мг соединения (XIII) в 6 мл смеси хлороформ — метанол — 2 н. метилат натрия в метаноле, 5:5:1, выдерживали 24 ч, нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали, из остатка хроматографией в системе А выделяли фосфонолипид (XIV), выход 53 мг (67%). Вещество идентично полученному по методу Б.

Б. Раствор 70 мг соединения (XIII) в 41 мл уксусной кислоты обрабатывали при 20° С 9 мл смеси 0,02 М  $\text{NaIO}_4$  и 0,024 М  $\text{KMnO}_4$ , 1:1, затем добавляли 0,024 М  $\text{KMnO}_4$  порциями по 2—3 мл по мере обесцвечивания. Через 6 ч реакцию массу обесцвечивали метабисульфитом натрия, разбавляли водой до 50 мл, подкисляли 0,1 М соляной кислотой до pH 2, вещество экстрагировали смесью хлороформ — метанол, 2:1 (2×20 мл), из экстракта хроматографией в системе А выделяли фосфонолипид (XIV), выход 45 мг (62,5%), масло,  $R_f$  0,34 (А). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3300 шир, 1700 ср, 1640 ср, 1550 сл, 1200 шир, 1080 ср, 975 ср, 800 сл. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta$ ): 23,7 м.д. Перед проведением элементного анализа образец соединения (XIV) обрабатывали 25% водным аммиаком, нейтрализовали ледяной уксусной кислотой, высушивали в высоком вакууме.  $\text{C}_{35}\text{H}_{77}\text{N}_4\text{O}_9\text{P}$ .

*Иммобилизация фосфоната (XIV) на амино-Toyopearl*. Влажный аминок-Тоуоркарл (XV) (157 мкл; содержание  $\text{NH}_2$ -групп 118 мкмоль/мл) [11] промывали диметилформамидом (20×5 мл), добавляли при перемешивании раствор 20 мг соединения (XIV) в 15 мл диметилформамида и 10 мг диэтилэгоксилкарбодиимида, оставляли на 48 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали, промывали диметилформамидом (30×5 мл), горячим этилацетатом (5×10 мл), водой. Получали 146 мкл влажного сорбента (XVI). Найдено, %: P 0,04 (на сухой остаток). Концентрация лиганда 4,4 мкмоль/мл сорбента.

*Очистка сфингомиелиназы из Bacillus cereus*. Сфингомиелиназу из *B. cereus* (1 мг белка, 256 ед. акт.) растворяли в 0,2 мл 10 мМ трис-НСI (pH 7,3) и наносили на колонку с аффинным сорбентом (XVI) (1,8 мл влажного сорбента, диаметр 0,5 см и высота 3,5 см), предварительно уравновешенную вышеуказанным буфером. Колонку промывали 10 мл того же буфера, затем 10 мл того же буфера, содержащего 0,1 М NaCl, собирая фракции по 1,2 мл при скорости элюции 0,5 мл/мин. Окончательно колонку элюировали вышеуказанным буфером, содержащим 0,1% дезоксихолата натрия. Фракции 17—25 объединяли, проверяли на сфингомиелиназную активность. По данным pH-статирования, активность составляла 238 единиц.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Spence M. W., Clarke J. T. R., Cook H. W. J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 14, p. 8595-8600.
2. *Brady R. O. Metabolism*, 1977, v. 26, № 3, p. 329-345.
3. *Groth C. G., Collste H., Dreberg S., Hakansson G., Lundgren G., Svennerholm L. Acta paediatr. scand.*, 1977, v. 68, № 4, p. 475-479.
4. *Watanabe K., Sakuragawa N., Arima M., Satoyoshi E. J. Lipid Res.*, 1983, v. 24, № 5, p. 596-603.
5. *Pentchew P. G., Brady R. O., Gal A. E., Hibbert S. R. Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 488, № 2, p. 312-321.
6. *Ben-Yoseph Y., Shapira E., Edelman D., Burton B. K., Nadler H. L. Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, v. 184, № 2, p. 373-379.
7. *Steers E., Cuatrecasas P., Pollard H. J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 1, p. 196-200.
8. *Jones C. S., Shankaran P., Callahan J. W. Biochem. J.*, 1981, v. 195, № 2, p. 373-382.
9. *Dyatlovitskaya E. V., Timofeeva N. G., Yakimenko E. F., Barsukov L. I., Muzya G. I., Bergelson L. D. Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 123, № 2, p. 311-315.
10. *Rosenthal A. F., Geyer R. P. J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, v. 80, № 19, p. 5240-5241.
11. *Matsumoto I., Ito Y., Seno N. J. Chromatogr.*, 1982, v. 239, p. 747-754.
12. *Карнышев И. Н., Бушнев А. С., Василенко И. А., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1146-1150.
13. *Бушнев А. С., Тазабекова Н. Т., Николаевская И. В., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 4, с. 553-555.
14. *Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Смирнов Л. И., Фурсенко И. В. Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 9, с. 1346-1354.
15. *Мологковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д. Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 586-600.
16. А. с. 1057095 (СССР). Способ получения биоспецифических фосфолипидо-содержащих сорбентов/Барсуков Л. И., Музы Г. И., Бергельсон Л. Д. Оpubл. в Б. И., 1983, № 44, МКИ ВО IV 20/22.
17. *Tomita M., Taguchi R., Ikezawa H. Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 704, № 1, p. 90-99.
18. *Звонкова Е. Н., Мицнер Б. И., Бушнев А. С., Эллер К. И., Солдатова С. А., Евстигнеева Р. П. Химия природ. соединений*, 1974, вып. 5, с. 553-558.
19. *Герасимене Г. Б., Макарюнайте Ю. П., Кулене В. В., Глемжа А. А., Янулайте-не К. К. Прикл. биохимия и микробиология*, 1985, т. 21, вып. 2, с. 184-189.

Поступила в редакцию

5.VI.1986

После доработки

1.IX.1986

### SYNTHESIS OF SPHINGOMYELIN PHOSPHONATE ANALOGUES AND PREPARATION OF AN AFFINITY SORBENT FOR THE SPHINGOMYELINASE PURIFICATION

TAZABEKOVA N. T., BUSHNEV A. S., KAKIMZHANOVA Zh. A., ZVONKOVA E. N.,  
EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Phosphonate analogues of 2-N-stearoyl- (I) and 2-N-(undec-10-enoyl)-sphingomyelins (II) have been synthesised. Compound (II) was used as a starting product for preparation of a sorbent for sphingomyelinase affinity chromatography. The double bond of the unsaturated undec-10-enoyl moiety of the phosphonate analogue (II) was oxidized, and the modified (II) was coupled to amino-Toyopearl HW-65 to give a sorbent containing 4  $\mu$ moles of ligand per milliliter of the swollen resin.