

©Коллектив авторов

СПЕКТР И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕОБРАТИМО АДсорБИРОВАННЫХ БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ИСКУССТВЕННЫХ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ

Ю.В. Пономарева*, Л.В. Лимарева, М.Н. Милякова

Самарский государственный медицинский университет,
Самара; эл. почта: jvponomareva@mail.ru

Адсорбция белков является первой стадией взаимодействия имплантируемых материалов с тканями организма. Химический состав, свободная энергия, полярность поверхностных функциональных групп, степень гидрофильности поверхности определяют количество, состав и конформационные изменения в связываемых белках, являющихся матриксом для последующей адгезии и функциональной активности клеток, обуславливающих особенности биосовместимости имплантируемого материала. Имплантация любого материала в ткани и полости влечет за собой развитие реакции со стороны организма, первым этапом которой является адсорбция белков. Необратимо связанные с поверхностью белки претерпевают конформационные изменения, которые зависят от химического состава и нанотопографии имплантируемой поверхности. Их характер определяет адгезию и функциональное состояние мигрирующих клеток. Выполнен качественный и количественный анализ необратимо адсорбированных белков на поверхности полипропиленовых, титановых и полиэфирных с фторполимерным покрытием материалов. Для этого проведено электрофоретическое разделение белков, необратимо адсорбированных из образцов плазмы человека на исследуемые материалы. Идентификацию полученных белков проводили на хроматографе. Количественный анализ осуществляли методом мониторинга множественных реакций. На анализируемых поверхностях идентифицировано более 60 белков. Количественный анализ показал преимущественную сорбцию витронектина, альбумина, фибриногена (α -цепь), компонента C1s системы комплемента. Максимальное относительное содержание белка пришлось на витронектин. Так как биосовместимость исследуемых материалов значительно различается, было предположено, что это может быть обусловлено конформационными изменениями необратимо адсорбированного на нём витронектина.

Ключевые слова: биосовместимость, необратимая адсорбция белков, витронектин, эндопротез

DOI: 10.18097/PBMC20176305392

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень развития технологий реконструктивно-восстановительной хирургии предполагает использование протезов, имплантируемых в различные ткани и полости тела человека. Как правило, все материалы, применяемые в клинической практике, проходят многоэтапные исследования, включающие оценку физических и токсикологических свойств, а также доклиническую оценку эффективности *in vitro* и *in vivo* [1]. Последняя позволяет получить данные о биосовместимости имплантируемого материала. Однако, на этапе клинического применения протезов оптимальный терапевтический эффект достигается не во всех случаях, что может быть связано не только с рядом причин, обусловленных системными и раневыми осложнениями у пациентов, но и с особенностями индуцируемого клеточного ответа на поверхности имплантируемого материала [2]. Согласно имеющейся теории, различные белки способны конкурентно адсорбироваться на поверхности, подвергаться конформационным изменениям и формировать монослой [3], являющийся мощным фактором миграции и адгезии различных популяций клеток, что определяет направленность тканевого ответа.

Цель исследования – получить и идентифицировать спектр пептидов, необратимо адсорбирующихся на поверхностях, различающихся по химическим и физическим свойствам искусственных имплантируемых материалов.

МЕТОДИКА

На основании добровольного информированного согласия и положительного заключения локального этического комитета (протокол №9 от 10.12.2014 г.) у больных, госпитализированных в ГБУЗ СГКБ №1 им. Н.И. Пирогова, были получены образцы плазмы крови, которые разводили стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в соотношении 1:10. Для исследования были выбраны 3 типа протезов, применяемых для пластики грыж: полипропиленовый (2 варианта), титановый и полиэфирный с фторполимерным покрытием. Выбор материалов был обусловлен различиями их химического состава и физических свойств, в том числе разной интенсивности молекулярного взаимодействия их поверхности с водой (титановые – гидрофильные; полиэфирные с фторполимерным покрытием – выраженные гидрофобные; полипропиленовые – гидрофобные).

Для качественной идентификации всех прочно связанных с поверхностью белков после отмывки от красителя раствором гидрокарбоната аммония и ацетонитрилом (1:1) при 50°C, фрагменты геля дегидрировали в 100% ацетонитриле (20 мин), обрабатывали раствором трипсина в 50 мМ гидрокарбонате аммония (1 мг на 50 мг белка 16 ч. при 37°C). Останавливали реакцию 0,1% трифторуксусной кислотой, экстрагировали пептиды из геля в условиях ультразвуковой бани,

разделяли на хроматографе Dionex Ultimate 3000 с использованием колонки AcclaimPepMap C18, 2 мкм, 100 Å, 75 мкм × 15 см (“Thermo Scientific”, США). Подвижная фаза А: 94,9% – вода, 5% – ацетонитрил, 0,1% – муравьиная кислота; фаза В: 94,9% – ацетонитрил, 5% – вода, 0,1% – муравьиная кислота. Хроматографическое разделение проходило в несколько этапов: 0-5 мин – 2% фазы В, 5-160 мин – градиент от 2% до 55% В, 160-165 мин – от 55% до 90% В, 165-180 мин – 90% В, 180-190 мин – от 90% до 2% В, 190-195 мин – 2% В. Скорость потока – 300 нл/мин, температура разделения – 40°C. В качестве детектора использовали масс-спектрометр maXis Impact (“Bruker”, Германия), оснащённый источником ионов CaptiveSpray. Получали спектр положительно-заряженных ионов, поток газа в источнике составлял 3 л/мин с температурой 150°C, напряжение 1600 В, диапазон детекции 50-2200 m/z , частота снятия спектров 10 Гц с автоматической фрагментацией ионов в режиме MS/MS. Для получения масс-листов масс-спектры обрабатывали в программе DataAnalysis 4.1 с использованием предустановленного скрипта для анализа продолжительных хроматограмм. По полученным масс-листам идентифицировали белки с помощью программы Mascot 2.4.0. Параметры поиска: база данных – SwissProt-*Homo sapiens*, фермент – трипсин, пропущенные сайты разрезания – 1, фиксированная модификация – карбамидометилирование, переменная модификация – окисление метионина, точность масс MS – 50 ppm, точность масс MS/MS – 0,6 Да. Для повышения количества белков, которые могут быть использованы для количественной валидации, FDR доводили до 2% с помощью алгоритма Mascot Percolator. Идентифицированными считали белки, для которых обнаружено не менее двух уникальных пептидов с Mascot Score выше порогового. Полную идентификацию всех адсорбированных белков проводили для полипропилена 2.

Для относительного количественного анализа трипсинолиз адсорбированных белков проводили непосредственно на поверхности покрытых с использованием коммерческого детергента RapiGest (“Waters”, США) в концентрации 1 мг/мл. Детекцию пептидов осуществляли методом мониторинга множественных реакций (MRM – Multiple Reaction Monitoring) на масс-спектрометре Q-TRAP 6500 (“AB Sciex”, США), комбинированном с жидкостным хроматографом Infinity1290 (“Agilent”, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке Titan C18, 1,9 мкм, 10 см × 2,1 мм (“Supelco”, США) в несколько этапов: 0-0,1 мин – от 3% до 10% фазы В, 0,1-3 мин – от 10% до 11% В, 3-13 мин – от 11% до 19%, 13-13,5 мин – от 19% до 20%, 13,5-13,6 мин – от 20% до 23%, 13,6-16,7 мин – от 23% до 25%, 16,7-18,5 мин – от 25% до 95%, 18,5-21,9 мин – 95% В, 21-23 мин – от 95% до 3% В, 23-25 мин – 3% В. Подвижная фаза А: 94,9% – вода, 5% – ацетонитрил, 0,1% – муравьиная кислота; фаза В: 94,9% – ацетонитрил, 5% – вода, 0,1% – муравьиная кислота. Скорость потока – 0,4 мл/мин, температура разделения – 40°C.

Детектировали положительно заряженные ионы, полученные с помощью ионизации электроспреем в источнике Turbo Spray IonDrive. Температура источника составляла 500°C, напряжение на капилляре – 5200 В, давление газа завесы – 35 psi, давление газа-распылителя – 60 psi, давление вспомогательного (турбо) газа – 60 psi.

Для того, чтобы иметь возможность сравнивать представленность различных белков в одном образце, параллельно после аналогичной пробоподготовки анализировали образцы плазмы условно-здорового донора. Представленность белков в образце оценивали в программе MultiQuant 3.0.2 по площади пиков MRM-переходов, специфичных для каждого исследованного пептида. Для каждого белка было проанализировано 1-2 пептида, по 3 фрагмента (табл. 1). Качественный и количественный анализ белков на протезирующих материалах выполняли на базе научно-исследовательской лаборатории “Омиксные технологии” Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Статистический анализ выполнен в пакете прикладных программ: Microsoft Excel 2010 с использованием непараметрических критериев, при уровне значимости $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В среднем на электрофореграммах с двух видов полипропиленовых поверхностей было получено по 10 фракций белков. С полиэстеровых с фторполимерным покрытием материалов были получены фракции с молекулярными массами, идентичными полипропиленовым, однако фракции с молекулярной массой 19 и 29 кДа были выражены слабее, а с молекулярной массой 56 и 46 кДа – сильнее. На электрофореграмме белков, полученных с титановых образцов, наиболее выраженными были фракции с молекулярной массой 56, 63, 73 кДа, остальные либо не визуализировались, либо были представлены в следовом количестве. Отмечена значительная индивидуальная вариабельность относительного содержания белков отдельных фракций, полученных с полипропиленовых и полиэстеровых с фторполимерным покрытием материалов.

Качественный анализ идентифицировал более 60 белков, среди которых: альбумин, ингибиторы протеаз: альфа-1-антитрипсин, альфа-1-антихимотрипсин, плазменный ингибитор сериновых протеаз; альфа-2-HS-гликопротеин; аполипопротеины: А-I, А-IV, В-100, С-III, С-IV, Е; витронектин; гельзолин; гемоглобин β -цепь; гемопексин; иммуноглобулины: κ , λ , А1, G1, G2, G3; ингибиторы интер- α -трипсина: Н₁, Н₂, Н₄; карбоксипептидаза N; коагуляционные факторы: II и V; ингибитор C₁-комплемента; кининоген; компоненты системы комплемента: C_{1q}, C_{1r}, C_{1s}, C₃, C_{4-A}, C₅, C₈, C₉, комплемент C₄-связывающий белок; плазменный калликреин; плазминоген; сывороточная параоксаназа/арилэстераза I; транстиретин; фибриноген (α -, β - и γ -цепи); фибронектин. Следует отметить, что качественный спектр адсорбированных

Таблица 1. Параметры MRM

Белок		Пептид	Родительский ион (<i>m/z</i>)	Дочерние ионы (<i>m/z</i>)
Альбумин		LVNEVTEFAK	575,3	595,3, 937,5, 469,2*
Фибриноген α-цепь		GSESGIFTNTK	570,8	463,3*, 610,3, 780,4
		GLIDEVNQDFTNR	761,0	894,4, 652,5, 993,5
Фибронектин		HTSVQTTSSSGSPFTDVR	621,9	537,2, 734,2, 791,4
		SSPVVIDASTAIDAPSNLR	638,3	586,3, 772,4*, 443,2
Витронектин		FEDGVLPDPYPR	711,8	647,3, 762,3, 875,4*
		DVWGIEGPIDAAFTR	824,0	948,0, 1076,8, 890,5
Компоненты системы комплемента	C _{1s}	SNALDIIFQTDLTGQK	883,4	1037,8, 1151,0, 762,4
		TNFDNDIALVR	639,5	458,3, 216,1*, 915,5
	C _{1qC}	FQSVFTVTR	542,8	476,2, 623,4*, 722,4
		TNQVNSGGVLLR	629,7	815,8, 914,9, 701,4
	C ₃	TGLQEVEVK	501,7	603,3*, 731,4, 422,7
		VPVAVQGEDTVQSLTQGDGVAK	1100,3	775,7, 1604,9, 975,8
	C _{4b}	VGDTLNLNLR	557,8	515,3*, 629,4, 742,5
	C _{8a}	AMAVEDIISR	552,8	203,0, 274,1, 732,1
		MESLGITSR	497,3	261,5, 533,8, 733,0*
	C ₉	AIEDYINEFSVR	728,9	751,9*, 864,9, 508,2
DVVLTTTFVDDIK		734,2	1039,9, 1152,2, 938,8	
Иммуноглобулин G		DTLMISR	418,2	506,3*, 619,4

Примечание: * - переходы, отобранные для количественного анализа.

белков составлял лишь незначительную часть плазменного протеома, для которого к настоящему времени идентифицировано более 12 тысяч протеинов.

Около 70% всех обнаруженных белков и полипептидных цепей найдены в соответствующих их молекулярной массе фракциях. Ряд белков и полипептидов были локализованы, как в соответствии с их молекулярной массой, так и во фракциях с меньшей молекулярной массой, что свидетельствовало об их возможном протеолизе (витронектин, комплемент C₃, C₅, кининоген). Ряд белков был идентифицирован во фрагментах геля с молекулярной массой большей, чем масса нативного белка (C_{4-A}, C₄-связывающий белок). Кроме того, ряд белков обнаружен как во фракциях, соответствующих их молекулярной массе, так и во фракциях с молекулярной массой меньшей и большей, чем молекулярная масса интактного белка (альбумин, цепи фибриногена, аполипопротеины A-I, A-IV, E).

Значимость идентификации спектра необратимо адсорбирующихся белков на поверхностях имплантируемых нерезорбируемых материалов заключается в их способности к инициации реакции на инородное тело, влиянию на особенности её течения, формирование гранулемы инородного тела (за счёт макрофагов) и исход [4]. Это определяет не только способность протеза к интеграции, но и его терапевтический потенциал, направленный не только на устранение грыжи, но и снижение числа осложнений, связанных с его имплантацией [5]. Особую роль в этих процессах отводят белкам, содержащим RGD-последовательности: фибриноген,

фибронектин и витронектин, иммуноглобулин G, компонент комплемента C₃, принимающий участие в каскадной активации комплемента и продукции хемотаксических агентов C_{4-5b} и C_{3a} [6]. По данным ранее проведенных исследований *in vitro* показано, что среди перечисленных белков, именно витронектин, единственный белок, способный поддерживать длительную адгезию макрофагов и высокий процент их слияния с формированием гигантских клеток инородных тел, несмотря на то, что первоначальная адгезия наблюдается ко всем адсорбированным белкам [7]. Можно предположить, что при длительных экспозициях именно прочно адсорбированный витронектин будет презентировать клеткам адгезивные эпитопы для интегринов, которые считаются ключевыми в развитии ряда осложнений, связанных с имплантацией протезирующих материалов [8].

Результаты количественного анализа представлены в таблице 2. Получены достоверные отличия ($p < 0,05$) количества адсорбированных белков в парах сравниваемых поверхностей: полиэстер с фторполимерным покрытием – полипропилен 2 (кроме альбумина); титан – полипропилен 2; титан – полипропилен 1; титан – полиэстер с фторполимерным покрытием (кроме C_{1q}). Полиэстер с фторполимерным покрытием и полипропилен 1 адсорбировали на своей поверхности разное количество ($p < 0,05$) витронектина, фибронектина, иммуноглобулина G, компонентов системы комплемента C_{1q}, C_{8α} и C₉ [9, 10]. Достоверной разницы в адсорбции белков между двумя материалами на основе полипропилена не обнаружено.

Таблица 2. Адсорбция белков плазмы крови на поверхностях протезов для герниопластики из различных материалов (в площадях пиков MRM-переходов/10³; n=6).

Белки (пептиды)		Вид протеза			
		Титановый	Полиэстеровый с фторполимерным покрытием	Полипропиленовый 1	Полипропиленовый 2
Альбумин		44,60±11,2	36,30±4,65	142,00±99,40	36,70±24,80
Фибриноген α-цепь		7,92±1,57	33,60±4,15	42,5±10,30	27,50±4,67
Иммуноглобулин G		16,40±2,21	22,90±1,81	40,30±6,10	15,10±2,19
Витронектин		1370,00±193	201,00±32,4	59,80±11,40	26,90±3,78
Фибронектин		1,64±0,34	1,40±0,23	3,06±0,34	1,62±0,39
Компоненты системы комплемента	C ₃	3,77±1,76	2,99±0,45	4,31±0,60	2,58±0,34
	C _{4β}	4,95±0,90	3,47±0,59	5,36±0,65	2,99±0,54
	C _{1s}	8,32±1,37	9,92±1,28	10,2±0,53	6,75±1,03
	C _{1q}	112±24,8	16,0±3,08	6,37±0,66	2,88±0,29
	C _{8α}	0,54±0,26	0,71±0,24	1,56±0,60	0,52±0,09
	C ₉	3,31±0,91	2,45±0,79	5,06±0,95	2,42±0,86

Примечание: для каждого вида протезов жирным шрифтом выделены по 4 белка с максимальной площадью пиков MRM-переходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведённый качественный анализ показал, что независимо от состава и свойств, анализируемые имплантируемые материалы способны необратимо адсорбировать на своей поверхности более 60 белков. Результаты количественного анализа выявили, что в пуле адгезированных белков максимально представлен витронектин, а также фибриноген α цепь, альбумин, IgG, а также компоненты C_{1s} и C_{1q} системы комплемента, являющиеся лигандами витронектина. Результаты исследования показали, что отличия в биосовместимости рассмотренных протезирующих материалов потенциально зависят от необратимо адсорбирующегося и подвергающегося конформационным изменениям на их поверхности витронектина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ЛИОСЕЛЛ». Особая благодарность А.В. Лайкову, научному сотруднику НИЛ «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии (директор А.П. Киясов) Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Radu E.V., Coman I.S., David O.I., Bedereag Ș.I., Sinescu R.D., Grigorean V.T., Popescu M., Lupașcu C.D., Straja N.D., Florescu I.P. (2016) Rom. J. Morphol. Embryol., 7(1), 131-137.
2. Baylyn K., Rodríguez-Camarillo P., Elías-Zúñiga A., Díaz-Elizondo J.A., Gilkerson R., Lozano K. (2017) Membranes (Basel), 7(3), 1-23.
3. Васин С.Л., Немец Е.А., Перова Н.В., Розанова И.Б., Севастьянов В.И., Шехтер А.Б. (1999) Биосовместимость (Севастьянов В.И., ред.), М.: Информ. центр ВНИИ геосистем, 368 с.
4. Lee W.H., Loo C.Y., Rohanizadeh R. (2014) Colloids Surf. B Biointerfaces, 1(122), 823-834.
5. Junge K., Binnebosel M., von Trotha K.T., Rosch R., Klinge U., Neumann U.P., Lynen Jansen P. (2012) Langenbecks Arch. Surg., 397(2), 255-270
6. Nilsson B., Ekdahl K.N., Mollnes T.E., Lambris J.D. (2007) Mol. Immunol., 44(1-3), 82-94.
7. McNally A.K., Jones J.A., Mac Ewan S.R., Colton E., Anderson J.M. (2008) J. Biomed. Mater. Res. A, 86(2), 535-543.
8. Reed N.I., Jo H., Chen C., Tsujino K., Arnold T.D., DeGrado W.F., Sheppard D. (2015) Sci. Transl. Med., 7(288), 288ra79. DOI:10.1126/scitranslmed.aaa5094
9. Engberg A.E., Rosengren-Holmberg J.P., Chen H., Nilsson B., Lambris J.D., Nicholls I.A., Ekdahl K.N. (2011) J. Biomed. Mater. Res. A, 97(1), 74-84.
10. Tsai I.Y., Tomczyk N., Eckmann J.I., Composto R.J., Eckmann D.M. (2011) Colloids Surf. B Biointerfaces, 84(1), 241-252.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 19. 09. 2017.

**THE RANGE AND POTENTIAL CONTRIBUTION OF IRREVERSIBLY ADSORBED PROTEINS
ON THE SURFACE OF ARTIFICIAL IMPLANTS**

J.V. Ponomareva, L.V. Limareva, M.N. Milyakova

Samara State Medical University,
Samara, Russia; e-mail: jvponomareva@mail.ru

Protein adsorption is the first stage of the interaction between prosthetic materials with tissues of the body. They undergo conformational changes depending on the chemical composition and the nanotopography surface. Adsorbed proteins induce adhesion and alter the functional state of migrating cells. Plasma samples from patients were incubated with such matrices as titanium, polypropylene or polyester with fluoropolymer coating meshes. Bound peptides were analyzed by electrophoresis. Qualitative analysis of the peptides extracted from the gel was performed by chromatography-mass spectrometry. Quantitative analysis was performed by the MRM method. More than 60 proteins were identified on the analyzed surfaces. Quantitative analysis showed preferential adsorption of vitronectin, albumin, fibrinogen α -chain, C_{1s} component of the complement system. Vitronectin had the maximum relative protein content. Since biocompatibility of the analyzed materials varies considerably this variability may be attributed to conformational changes occurring with vitronectin during its irreversible adsorption.

Key words: biocompatibility, irreversible protein adsorption, vitronectin, mesh