

Введение Современные протезы кровеносных сосудов, применяемые для лечения тромбозов, изготавливаются из расширенного политетрафторэтилена (ПТФЭ), из плетеного полиэтилентерефталата (ПЭТ) или из полиуретана. В теле человека сосуды из таких материалов запускают формирование тромба и покрываются фибриновым гелем, несмотря на их инертную природу. Образующийся гель зачастую приводит к закупорке протезов сосудов диаметром до 7 мм [1]. Основным белком плазмы крови, ответственным за формирование поверхностно индуцированных тромбов, считается фибриноген [2-5], так как именно фибриноген отвечает за поддержание адгезии тромбоцитов путем взаимодействия с $\alpha IIb\beta 3$ интегрином и их агрегацию. Концентрация фибриногена в плазме лежит в пределах 2-3 мг/мл. Фибриноген - гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, состоящий из трех пар полипептидных цепей: A α , B β и γ . Фибриноген участвует в процессах гемостаза. Будучи активированным тромбином тромбоцитов, фибриноген преобразуется в фибрин, который образует фибриллы за счет полимеризации. Фибриллы являются основой для формирования тромба, закупоривающего поврежденную часть сосуда. Несмотря на способность фибриногена и фибрина обеспечивать адгезию тромбоцитов, в живом организме фибриновый гель становится неадгезивным [1, 6, 7]. Нами был обнаружен наномасштабный процесс, регулирующий адгезию тромбоцитов и лейкоцитов к поверхности различных материалов. Так, при адсорбции мономолекулярного слоя белка адгезия клеток к материалу увеличивается, а при адсорбции последующих слоев фибриногена адгезия и лейкоцитов, и тромбоцитов резко падает [8, 9]. Данный эффект был подтвержден для стекла пластика и слюды. Мономолекулярный слой фибриногена адсорбируется на поверхность материала при его инкубации в растворах с низкой концентрацией белка (менее 1,0-1,5 мкг/мл), тогда как при больших концентрациях (более 2 мкг/мл) на поверхности материалов формируется эластичная мультимолекулярная структура, не способная обеспечивать адгезию клеток [8, 9]. Данный эффект может так же препятствовать адгезии клеток эндотелия к поверхности протеза, препятствуя формированию нового живого сосуда [10]. В данной работе было исследовано влияние адсорбции фибриногена на адгезивные свойства биоматериалов современных протезов сосудов, таких как расширенный политетрафторэтилен и полиэтилентерефталат. Адгезионные эффекты были изучены методами атомно-силовой спектроскопии, клеточной силовой спектроскопии и анализа адгезии клеток. Экспериментальная часть Исследования методом атомно-силовой спектроскопии было реализовано на атомно-силовом микроскопе MFP-3D (AsylumResearch, США), в том числе по методикам, описанным в работах [11-14]. Для проведения эксперимента применялись кантилеверы с постоянной упругости в пределах 0,010-0,015 Н/м. Константа упругости каждого кантилевера определялась методом регистрации термического шума. Перед экспериментом биоматериалы последовательно

промывались метанолом, этанолом и деионизованной водой, и сушились в потоке аргона. Для атомно-силовой спектроскопии образцы инкубировались в растворах фибриногена в натрий фосфатном буфере с различными концентрациями при температуре 37 °C в течении трех часов. Концентрация фибриногена в растворе (EnzymeResearchLaboratories, США) определялась с помощью УФ-спектроскопии по методике, описанной в работе [9]. Снятие силовых кривых проводилось так же при температуре 37 °C в натрий фосфатном буфере. Максимальная прижимная сила составляла 600 пН, скорость подвода-отвода зонда - 2мкм/с. Для каждого образца было снято не менее 12000 силовых кривых. Для определения сил адгезии силовые кривые анализировались программным обеспечением IgorPro 6 (Wavemetrics, США). Для расчета среднего значения силы адгезии распределение сил по поверхности аппроксимировалось логнормальным распределением. Для клеточной силовой спектроскопии использовались клетки почки эмбриона человека линии 293, трансфицированные лейкоцитарными интегринами (HEK 293 Mac-1). В эксперименте использовались безыгольные кремний-нитридные кантилеверы с постоянной упругости 0,035 Н/м. Для обеспечения иммобилизации клетки поверхность кантилеверов модифицировалась (3-аминопропил)триэтоксисиланом, бис-сульфосукцинимидилсубератом и конканавалином-А. Эксперименты проводились в сбалансированном буфере Хенкса с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Максимальная сила нажима на клетку составляла 1 нН, клетка удерживалась на поверхности образца 2 минуты, затем отводилась со скоростью 2 мкм/с. Для метода анализа адгезии клеток использовалась культура клеток линии U937 (American Tissue Culture Collection, США). Клетки были предварительно окрашены флуоресконом. Перед проведением эксперимента образцы биоматериалов промывались метанолом, этанолом и деионизованной водой. Образцы инкубировались в натрий-фосфатном буфере с различным содержанием фибриногена в течение 3-х часов при температуре 37 °C. Затем раствор фибриногена удалялся, и в чашки добавлялось 3мл сбалансированного буфера Хенкса с 0.1% бычьего сывороточного альбумина с клетками U937 (1x10⁶/мл). Образцы инкубировались 30 минут 37 °C. Чтобы удалить не закрепившиеся на поверхности образцов клетки, биоматериалы промывались натрий-фосфатным буфером. Для каждого образца снимались 5 произвольных участков поверхности с помощью микроскопа Leica DM4000B (Leica Microsystems, США). Подсчитывалось общее количество обнаруженных клеток для всех образцов. График зависимости количества клеток от концентрации фибриногена нормировался на максимальное количество обнаруженных клеток. Результаты и обсуждения На Рис. 1 а, б представлены зависимости силы адгезии зонда АСМ к полиэтилентерефталату (ПЭТ) и политетрафторэтилену (ПТФЭ) от концентрации фибриногена. Атомно-силовая спектроскопия показала, что силы адгезии иглы

кантилевера к чистым ПЭТ и ПТФЭ сравнимы друг с другом и составляют $1,05 \pm 0,3$ нН и $1,1 \pm 0,4$ нН, соответственно. В случае ПЭТ инкубация растворе фибриногена с концентрациями меньше 1 мкг/мл не приводит к значительным изменениям силы адгезии, то есть формирование жестко связанного мономолекулярного слоя белка на поверхности ПЭТ слабо влияет на силу адгезии. В случае же с ПТФЭ адсорбция небольшого количества молекул фибриногена на поверхность биоматериала приводит к значительным изменениям силы адгезии. При концентрации фибриногена 0,3 мкг/мл сила адгезии уменьшается в 2 раза, а при концентрации 1 мкг/мл среднее значение силы адгезии уменьшается на 90% относительно не модифицированного биоматериала. Подобное уменьшение адгезии наблюдается и на ПЭТ при концентрациях фибриногена больше 5 мкг/мл. В диапазоне концентраций от 1 до 2 мкг/мл на поверхности ПЭТ формируется эластичный бимолекулярный слой фибриногена, что также подтверждается увеличением длины взаимодействия зонда с поверхностью. Наличие эластичной матрицы на поверхности ПЭТ приводит к уменьшению силы адгезии на 80%. В сравнении с ПЭТ, ПТФЭ более гидрофобный, что приводит к более слабому взаимодействию белковых молекул с поверхностью биоматериала. Таким образом, резкий спад силы адгезии к ПТФЭ при адсорбции мономолекулярного слоя фибриногена может быть следствием отрыва молекул фибриногена, слабо взаимодействующих с поверхностью, гидрофильным зондом АСМ. а) б) Рис. 1 - а) атомно-силовая спектроскопия ПЭТ, покрытого фибриногеном; б) атомно-силовая спектроскопия ПТФЭ, покрытого фибриногеном

Метод анализа адгезии клеток показал, что адгезия лейкоцитов U937 к ПЭТ, покрытому мономолекулярным слоем фибриногена, то есть при концентрации 0,6-1,5 мкг/мл, существенно больше адгезии клеток к биоматериалу при наличии на его поверхности мультимолекулярной матрицы фибриногена (при концентрации больше 5 мкг/мл) (Рис. 2 а). Таким образом, жестко связанный с поверхностью биоматериала мономолекулярный слой фибриногена обеспечивает механотрансдукцию в клетках достаточную для того, чтобы клетки распластывались на поверхности биоматериала и приобретали способность делиться (Рис. 2 б). В то же время, формирование мультимолекулярной матрицы при увеличении концентрации белка, неспособной обеспечить достаточную механотрансдукцию, приводит к уменьшению адгезии клеток на 80% и препятствует закреплению клеток на биоматериале. Как следствие, клетки сохраняют сферическую форму и не приобретают способность делиться (Рис. 2 б). а) б) Рис. 2 - а) относительная адгезия клеток U937 к ПЭТ, покрытому фибриногеном. График нормирован на максимальное значение адгезии б) микроскопическое изображение клеток U937 на поверхности ПЭТ покрытого фибриногеном

При исследовании биоматериалов методом клеточной силовой спектроскопии было обнаружено, что средняя величина силы адгезии клеток НЕКМас-1 к не модифицированному ПЭТ (970 ± 710

пН) практически в 2 раза больше средней силы адгезии клеток НЕКМас-1 к чистому ПТФЭ (500 ± 150 пН) (Рис. 3 а, б). Как и в случае с иглой АСМ, адсорбция фибриногена на ПТФЭ даже при низких концентрациях приводит к уменьшению силы адгезии. В случае с ПЭТ данные клеточной силовой спектроскопии согласуются с данными анализа адгезии клеток: при концентрации фибриногена 0,6 мкг/мл сила адгезии клеток с интегринами Мас-1 к ПЭТ увеличивается в два раза по сравнению с чистым биоматериалом. Для обоих биоматериалов характерно уменьшение силы адгезии клеток на 80% при их инкубации в растворе фибриногена с концентрацией 20 мкг/мл. Очевидно, что такое уменьшение адгезии происходит так же вследствие формирования эластичной мультимолекулярной матрицы фибриногена на поверхности биоматериалов. Рис. 3 - а) клеточная силовая спектроскопия ПЭТ, покрытого фибриногеном; б) клеточная силовая спектроскопия ПТФЭ, покрытого фибриногеном

Концентрация фибриногена в плазме крови здорового человека лежит в диапазоне 2-3 г/л. Так как концентрация белка велика, при контакте биоматериала кровью наиболее вероятно образование на его поверхности эластичной мультимолекулярной матрицы фибриногена. Данная матрица приводит к резкому ухудшению интегринзависимой адгезии клеток. Данный эффект может препятствовать адгезии и дальнейшему росту клеток на поверхности протеза сосуда, в том числе клеток эндотелия. Поскольку эндотелиальные клетки не способны закрепиться на поверхности графта из ПЭТ или ПТФЭ, то и образования нового живого сосуда не происходит. Выводы

Несмотря на то, что именно фибриноген является медиатором интегринзависимой адгезии клеток, адсорбция мультимолекулярного слоя молекул фибриногена резко уменьшает адгезию клеток к биоматериалам современных графтов сосудов, таким как плетеный полиэтилентерефталат и расширенный политетрафторэтилен. Адгезия мономолекулярного слоя фибриногена приводит к уменьшению адгезии и клеток, и зонда АСМ к политетрафторэтилену. Данный эффект возможен из-за слабого взаимодействия белковых молекул с сильно гидрофобной и химически инертной поверхностью ПТФЭ. Адсорбция мультимолекулярного слоя фибриногена на поверхности протезов сосудов препятствует росту клеток эндотелия на поверхности графта и образованию естественного сосуда.