

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА АДСОРБЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫХ ЭМУЛЬСИЙ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ТРИБЛОКСОПОЛИМЕРАМИ

© 2017 г. В.К. Жалимов, Н.И. Кукушкин, Ю.В. Грицына*

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: student-iam@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.16 г.

После доработки 08.07.16 г.

Исследован состав белков плазмы крови, адсорбированных на поверхности перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных различными триблоксополимерами, и проанализировано их количественное соотношение. Полученные результаты позволили охарактеризовать три типа адсорбции белков на поверхности капель эмульсии. В первом случае при адсорбции превалирует появление белков-опсоинов. Как мы считаем, данный тип адсорбции проявляется на плотном и малоподвижном слое триблоксополимеров. Второй тип – адсорбция на плотном и подвижном слое, когда адсорбируются преимущественно низкомолекулярные белки (моноадсорбция), а адсорбция основывается на гидрофобном эффекте. Третий тип адсорбции – адсорбция на рыхлом слое триблоксополимеров. В этом случае наблюдается адсорбция большого количества белков с молекулярными массами от ~10 до ~500 кДа, при этом общая белковая масса распределена по большому количеству белков.

Ключевые слова: адсорбция, эмульсия, белки плазмы крови.

В настоящее время широко распространено использование дисперсных форм лекарственных препаратов. Такой подход позволяет значительно расширить круг лекарственных веществ для внутривенного введения и делает возможным создание, например, плазмозаменителей – средств для парентерального питания и направленной доставки препаратов [1–3]. Однако при применении мелкодисперсных лекарственных форм возникает явление опсонизации частиц препарата белками плазмы. Это явление приводит к ускорению захвата частиц клетками ретикулоэндотелиальной системы и ускоренному выведению их из кровотока [4–6]. Введение большой чужеродной поверхности в кровоток может также приводить к возникновению различных реакций организма. Тип и величина реакции часто зависят от количества и состава плазменных белков, адсорбирующихся на частицах [7,8]. Кроме того, известно, что адсорбция белков на гидрофобной поверхности приводит,

как правило, к изменению их исходной конформации и, следовательно, изменяет их активность и стабильность [9–14].

Одним из способов подавить адсорбцию белков плазмы и замедлить поглощение микрочастиц клетками ретикулоэндотелиальной системы является покрытие поверхности микрочастиц неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ), представляющими собой триблоксополимеры (ТБС) на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полипропиленгликоля (ППГ) [15,16]. Однако полностью противостоять неспецифической адсорбции белков из сложных биологических сред путем использования неионогенных ТБС к настоящему времени не удалось [17]. В связи с этим становится важным изучение того, как зависит адсорбция белков от используемых ПАВ, что позволит спрогнозировать адсорбцию на поверхностях, стабилизированных ими.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использованы неионогенные ПАВ, представляющие собой три-

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активные вещества, ТБС – триблоксополимеры, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ППГ – полипропиленгликоль, ПФУ – перфторуглероды.

блоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида: проксанол 268 (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия), Pluronic P84 и Pluronic 123 (Fluka Chemistry, Швейцария), Pluronic F68, Pluronic F127 и Pluronic F108 (Fluka Analytical, Швейцария). Молекулы этих ПАВ имеют структуру ПЭГ-ППГ-ПЭГ.

В качестве ядра частицы использовали смесь перфторуглеродов (ПФУ) ПФД и ПФМЦП (ЗАО «ПиМ-Инвест», Россия).

В работе использовали стандартную клиническую цитратную плазму.

Приготовление субмикронных эмульсий. Для получения эмульсий ПФУ в водной среде использовали смесь ПФД и ПМЦП в объемном соотношении 2 : 1. Стабилизаторами служили перечисленные выше триблоксополимерные ПАВ, имеющие различные молекулярные массы и размер гидрофобного и гидрофильного блоков.

Использовали 4%-й раствор каждого из ТБС в солевом буфере следующего состава: 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 8 мМ NaHCO₃, 1,5 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ глюкозы. Затем 10 мл смеси указанных ПФУ диспергировали в 90 мл раствора того или иного ТБС путем многократного пропускания через гомогенизатор высокого давления «Донор-1» (Институт биофизики клетки РАН и Экспериментальный завод научного приборостроения РАН, Пушкино Московской области) при давлении 70–80 МПа до получения эмульсий с частицами (каплями) нужного размера (200–280 нм). Полученные субмикронные эмульсии ПФУ, стабилизированные указанными выше ТБС, были использованы для изучения их адсорбционных характеристик.

Определение качественного состава белков, адсорбирующихся на поверхности каплей перфторуглеродных эмульсий. Состав адсорбирующихся на каплях ПФУ белков, а также их количественное процентное соотношение определяли методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Для этого 100 мкл каждой из эмульсий инкубировали с плазмой крови человека в соотношении 1 : 10 в течение 30 мин при 37°C. Известно, что такая инкубация является достаточной для того, чтобы практически полностью завершился процесс адсорбции белков на поверхности каплей [18]. После этого капли осаждали центрифугированием (18000 g, 15 мин). Супернатант удаляли, а осадок реэмульгировали в 1 мл 0,2%-го раствора ТБС, использованного для приготовления данной эмульсии. Данную процедуру повторяли трижды. К осадку каплей эмульсий ПФУ с адсорбированными на них белками, полученному после трехкратной отмывки, добавляли

смесь метанола, воды и хлороформа в объемном соотношении 1 : 1 : 2. Смесь интенсивно перемешивали до полного растворения осадка каплей ПФУ эмульсий и центрифугировали (18000 g, 10 мин). Под действием метанола и хлороформа происходила денатурация белков, адсорбированных на каплях эмульсий ПФУ. В результате центрифугирования формировались четыре фазы: первая верхняя фаза – водный раствор метанола, вторая фаза – слой денатурированного белка на границе раздела водной фазы и хлороформа, третья фаза – хлороформ, четвертая фаза – смесь ПФУ. Жидкие фазы аккуратно отбирали, осадок денатурированного белка подсушивали при 37°C в течение 60 мин. После этого исследуемый образец растворяли в буфере для внесения в гель (9,5 М мочевины, 2% (w/v) CHAPS, амфолины – 0,4% (pH 3–10 (Biogad, Швеция)) и 1,6% (pH 5–7 (LKB Bromma, Швеция)), 5% β-меркаптоэтанола). После полного растворения образца при температуре 4°C его наносили на разделяющий гель первого направления.

Для геля первого направления были использованы стеклянные трубки с внутренним диаметром 2,3 мм и длиной 7 см. Гель первого направления имел следующий состав: 9 М мочевины, 4% акриламида, 2% CHAPS, амфолины (0,4% pH 3–10, 1,6% pH 5–7), 0,07% ТЕМЕД (Fluka, Швейцария), 0,1% персульфата аммония (Carl Roth, Германия). Разделение во втором направлении проводили на стеклах размером 8 × 10 см и толщиной 0,75 мм в градиенте акриламида 9–16% на трис-буфере (375 мМ трис-HCl, pH 8,8), содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, 0,1% персульфата аммония и 0,07% ТЕМЕД. Для окрашивания гелей применяли коллоидный краситель кумасси G-250 [19].

Оценка количественного содержания белков. Окрашенные гели сканировали с разрешением 600 точек на дюйм при 48-битном цветовом представлении. Полученные изображения обрабатывали с помощью программ ImageJ и Adobe Photoshop CS3 в соответствии с работой [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Двухмерные электрофореграммы адсорбированных на эмульсиях белков представлены на рис. 1. Соотнеся эти данные с общедоступными базами данных по двумерным электрофорезам, а также опираясь на ранее проведенную нами идентификацию некоторых белков методом MALDI-TOF [20], мы смогли идентифицировать большинство адсорбированных на каплях эмульсии белков, а также провели их количественную оценку (см. рис. 2). На осно-

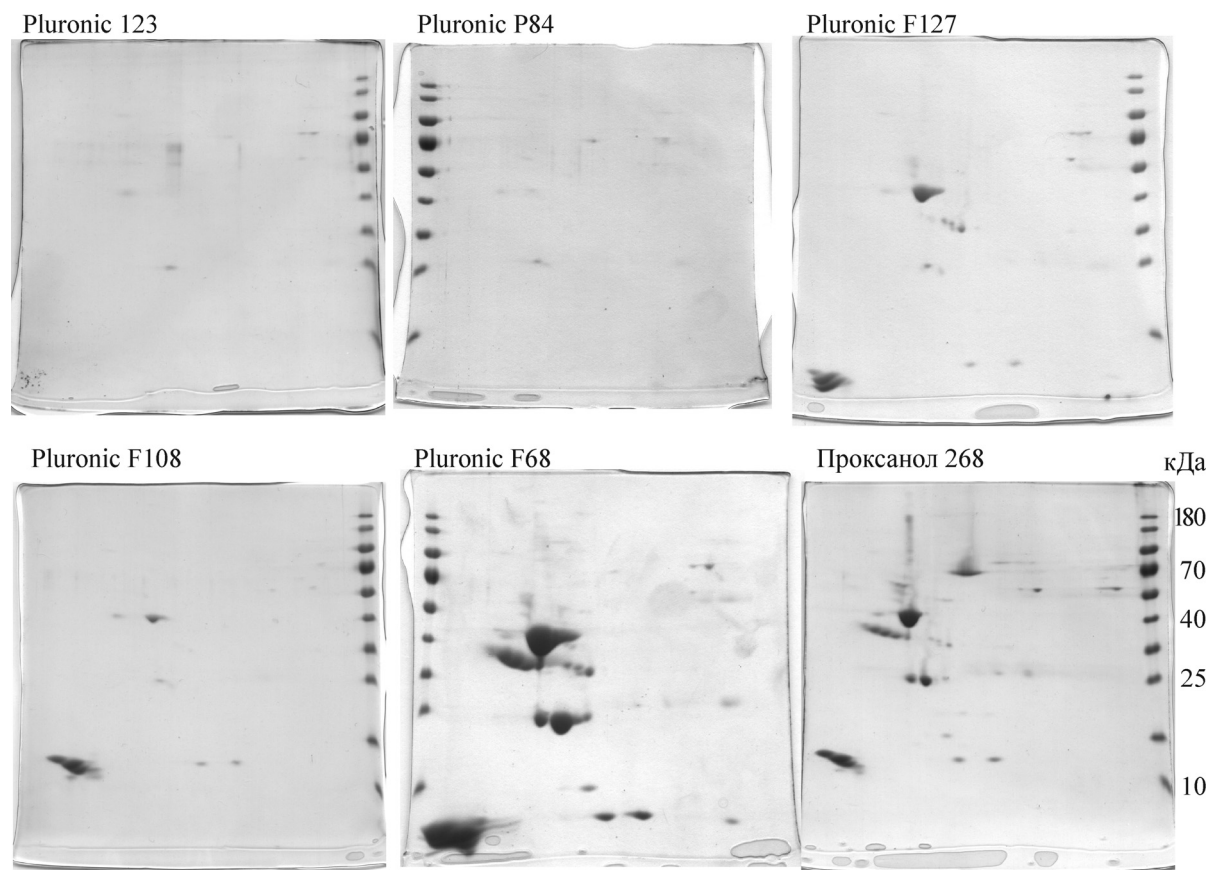


Рис. 1. Окрашенные коллоидным красителем кумасси G-250 гели второго направления. Положение геля первого направления: слева рI 3, справа рI 10. Для всех гелей использован окрашенный маркер PageRuler™ 10–180 кДа (Thermo Scientific, США).

вании полученных данных можно сделать вывод, что на эмульсиях, стабилизированных с использованием Pluronic 123 и Pluronic 84, наблюдается адсорбция наименьшего количества белков (пяти и трех соответственно), причем можно отметить, что адсорбируются преимущественно иммуноглобулины и фибриноген, т.е. белки-опсоины. При этом доля липопротеинов на эмульсии, стабилизированной Pluronic 123, крайне мала, а на эмульсии, стабилизированной Pluronic 84, белки, не относящиеся к опсоиновому ряду, вовсе отсутствуют. Данный факт может говорить о том, что слой ТБС на поверхности капель этих двух эмульсий обладает достаточно высокой плотностью, что не позволяет белкам подойти непосредственно к гидрофобной капле ПФУ (именно это является необходимым условием формирования гидрофобного взаимодействия белка с каплей ПФУ). Адсорбция же опсоинов может быть обусловлена такими силами, как электростатическое взаимодействие, либо эффект Лондона и, следовательно, для проявления такой адсорбции

не требуется проникновения белков сквозь слой ТБС на поверхность частицы.

На электрофореграмме белков, адсорбированных на поверхности частиц, стабилизированных Pluronic 127, можно видеть, что дополнительно к белкам-опсоинам появляется также значительное количество аполипопротеина Е (АроЕ), аполипопротеина А4 (АроА4), а также плотного пятна из неразделившихся белков в низкомолекулярной области (общая масса перечисленных компонентов составляет 87,8% от массы всех адсорбированных на данной эмульсии белков). Ранее мы показали [21], что адсорбция данных белков происходит за счет гидрофобного взаимодействия. Таким образом, можно сделать вывод, что плотность слоя ТБС на поверхности частиц данной эмульсии снижается. При снижении плотности ТБС на поверхности частицы белки получают возможность пройти через данный слой и приблизиться к поверхности перфторуглеродного ядра капель эмульсии, при этом, как было нами доказано, эти белки вступают с ним в гидрофобное взаимодействие.

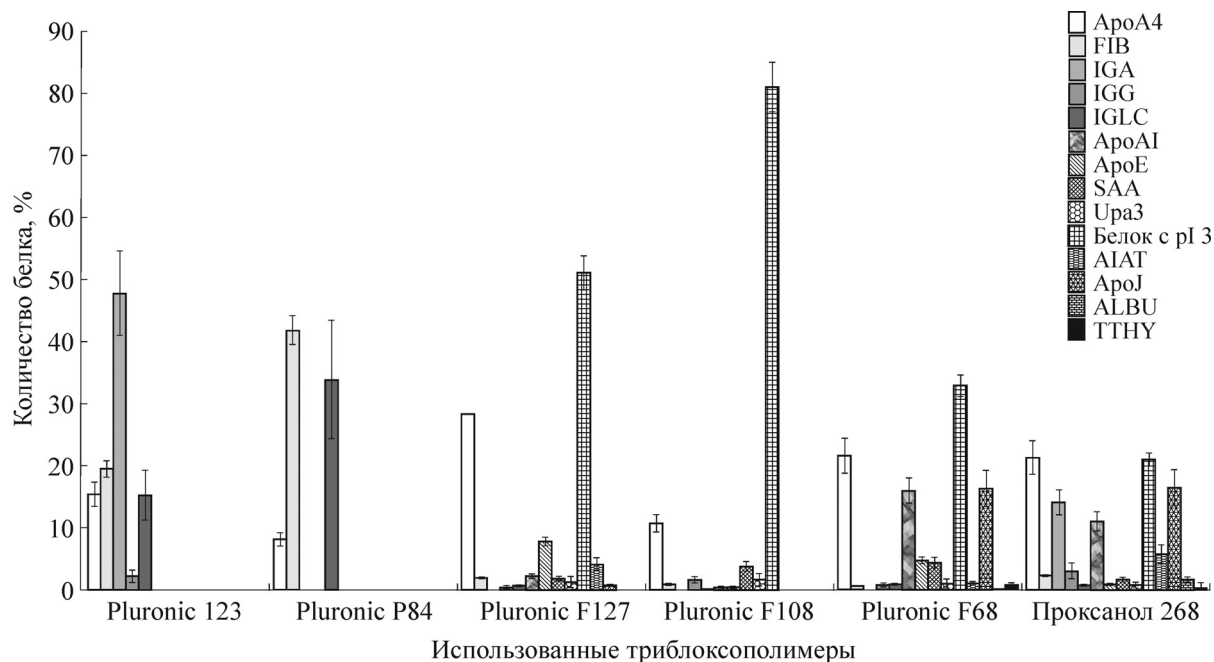


Рис. 2. Процентное содержание отдельных белков, рассчитанное от общего количества белков, адсорбированных на выбранной эмульсии ($n = 3$, разброс выражает стандартное отклонение). Низкомолекулярные белки с рI 3–4 не удалось идентифицировать из-за крайне низкой степени их разделения.

Из полученных нами данных хорошо видно, что максимальная адсорбция (51,2% от массы всех адсорбированных белков) наблюдается у кислых низкомолекулярных пептидов. Вероятно, в связи с тем, что данные белки обладают небольшими размерами, они относительно легко проникают сквозь слой ТБС и образуют прочную гидрофобную связь с ядром частицы. Белки ApoA4 и ApoE также в большом количестве проникают сквозь слой ТБС. В связи с тем, что данные белки имеют более крупный размер, на поверхности эмульсии они представлены в значительно меньшем количестве, чем низкомолекулярные пептиды. На поверхности эмульсии, стабилизированной Pluronic 108, также видна основанная на гидрофобном эффекте адсорбция различных белков. Однако на этой эмульсии доля низкомолекулярных кислых пептидов составляет уже 80,9% от общей доли адсорбированных белков, где 10,6% приходится на ApoA4. Возможной причиной данного эффекта может быть то, что слой ТБС на частицах эмульсии, стабилизированной Pluronic 108, становится более термодинамически подвижным, это означает, что при той же плотности ПАВ на поверхности микрочастиц акты адсорбции/десорбции молекул ТБС происходят чаще. С другой стороны, при десорбции молекулы ТБС (а важно отметить, что средний размер молекулы Pluronic 108 равен 14600 Да), вероятно, на небольшой временной промежуток в

слое ТБС образуется пустое, незаполненное молекулами ПАВ пространство, в которое могут пройти молекулы белка. В результате равновесная доля данного адсорбированного белка будет возрастать. При этих условиях более интенсивная адсорбция низкомолекулярных пептидов происходит, вероятно, в связи с тем, что в силу небольших размеров этих пептидов для них большее значение имеет лабильность слоя ТБС, а не его общая плотность. Проникая в большом количестве сквозь слой ТБС, данные пептиды занимают свободные от ПАВ места (ввиду лабильности ТБС) на поверхности капли ПФУ, что приводит к снижению количества остальных белков. В пользу данной гипотезы говорит также следующий факт: несмотря на то, что на этой эмульсии количество таких относительно крупных белков, как ApoA4 и ApoE, в сравнении с эмульсией, стабилизированной Pluronic 127, снижается в 2,7 и 20,8 раза соответственно, количество сывороточного амилоидного белка А (13,5 кДа), наоборот увеличивается в 2,2 раза.

Общая масса белков, адсорбированных на эмульсиях, стабилизированных Pluronic 68 и проксанолом 268, распределяется на значительно большее количество белков, чем в описанных ранее эмульсиях. Например, в эмульсии, стабилизированной Pluronic 68, основная масса белка (95,4% от общего количества адсорбированных белков) распределена по шести белкам,

причем количество самого представленного белка составляет лишь 32,9%, а в эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, основная масса белка (95,9%) распределяется уже между десятью белками, а количество самого представленного белка не превышает 21,3%. При этом важно отметить, что число адсорбированных на данных эмульсиях белков также значительно увеличивается. Столь кардинальное изменение состава адсорбированных белков, а также изменения их количественных соотношений можно интерпретировать следующим образом: слой ТБС на данных эмульсиях теряет свою плотность, что приводит к тому, что в большом количестве начинают адсорбироваться более крупные белки, обладающие большим сродством к поверхности гидрофобного ядра частиц эмульсии. При этом данные белки начинают активно конкурировать за сорбционную поверхность с более низкомолекулярными белками, в результате чего доля небольших (до 15 кДа) белков в общей адсорбции на эмульсии, стабилизированной Pluronic 68, составляет 37,1%, а на эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, падает до 22,6%. Также снижение плотности слоя ТБС приводит к адсорбции большого количества новых высокомолекулярных белков, таких как кластерин и иммуноглобулин А.

Резюмируя, можно сделать вывод, что адсорбцию белков на поверхности перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных различными ТБС, условно можно разделить на три типа. Первый тип адсорбции – адсорбция на эмульсиях, стабилизированных ТБС, формирующих плотный и малоподвижный поверхностный слой. Для данного типа характерна адсорбция преимущественно белков опсоиновой группы, в то время как адсорбция по механизму гидрофобного взаимодействия практически не выражена. Второй тип адсорбции наблюдается при использовании ТБС, формирующего плотный, но достаточно подвижный слой на поверхности каплей эмульсии. При этом наблюдается адсорбция значительного количества низкомолекулярных (до 15 кДа) белков, основанная на гидрофобном эффекте. Третий тип адсорбции наблюдается, когда используемый ТБС формирует рыхлый стабилизирующий слой на поверхности частиц эмульсии. В данном случае наблюдается адсорбция большого количества белков с молекулярными массами от ~10 до ~500 кДа, при этом различия в массовом

соотношении между белками становятся менее выраженными.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 14-03-31785.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Maevsky, G. R. Ivanitsky, K. N. Makarov, et al., U.S. Patent No. 6,562,872 B1, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2003).
2. E. Rollerova, S. Scsukova, J. Jurcovicova, et al., *Endocr. Regul.* **45**, 49 (2011).
3. L. Illum and S. S. Davis, *J. Parent. Sci. Technol.* **36**, 242 (1982).
4. Y. Tabata and Y. Ikada, *Biomaterials* **9**, 356 (1988).
5. R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, et al., *Science* **263**, 1600 (1994).
6. G. Kaul and M. Amiji, *Pharm. Res.* **19**, 1061 (2002).
7. M. Frank and L. Fries, *Immunol. Today* **12**, 322 (1991).
8. R. J. Johnson, in: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ed. by B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons (Elsevier Acad. Press, Amsterdam, 2004), pp. 318–328.
9. M. Karlsson, J. Ekeröth, H. Elwing, and U. Carlsson, *J. Biol. Chem.* **280**, 25558 (2005).
10. L. T. Allen, M. Tosetto, I. S. Miller, et al., *Biomaterials* **27**, 3096 (2006).
11. C. Czeslik, C. Royer, T. Hazlett, and W. Mantulin, *Biophys. J.* **84** (4), 2533 (2003).
12. C. Reichhart and C. Czeslik, *Colloids Surf. B*, **75** (2), 612 (2010).
13. T. Zoungrana, G. H. Findenegg, and W. Norde, *J. Colloid Interface Sci.* **190** (2), 437 (1997).
14. A. W. Sonesson, T. H. Callisen, H. Brismar, and U. M. Elofsson, *Colloids Surf. B* **61** (2), 208 (2008).
15. D. E. Owens and N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.* **307**, 93 (2006).
16. S. M. Moghimi, I. S. Muir, L. Illum, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 157 (1993).
17. Y. Li, A. J. Keefe, M. Giarmarco, et al., *Langmuir* **28**, 9707 (2012).
18. А. Н. Склифас, В. К. Жалимов, А. А. Темнов и Н. И. Кукушкин, *Биофизика* **57**, 317 (2012).
19. G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, et al., *Electrophoresis* **25**, 1327 (2004).
20. M. Natale, B. Maresca, P. Abrescia, and E. M. Bucci, *Proteomics Insights* **4**, 37 (2011).
21. В. К. Жалимов, А. Н. Склифас и Н. И. Кукушкин, *Биофизика* **57**, 308 (2012).

Study of the Nature of Plasma Protein Adsorption on Surface of Perfluorocarbon Emulsions Stabilized by Different Triblock Copolymers

V.K. Zhalimov*, N.I. Kukushkin*, and Yu.V. Gritsyna**

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The composition of plasma proteins adsorbed on the surface of perfluorocarbon emulsions stabilized by different triblock copolymers and their quantitative ratio were analyzed. The obtained results allowed us to describe three types of protein adsorption on the surface of emulsion drops: appearance of opsonin proteins prevails during adsorption. As we consider, this type of adsorption appears on a dense and inactive layer of triblock copolymers; the second type of adsorption occurs on a dense and mobile layer (predominantly low molecular weight proteins are adsorbed (monoadsorption)) and adsorption is based on the hydrophobic effect; the third type of adsorption occurs on a loose layer of triblock copolymers. In this case adsorption of a large amount of proteins with molecular weight from ~10 to ~500 kDa is observed, while the molecular weight is distributed over a large number of proteins.

Key words: adsorption, emulsion, plasma proteins