

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КОМПЛЕКСНЫХ ПРОБЛЕМ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ»

На правах рукописи

Шишкова Дарья Кирилловна

**«Механизм патогенного действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий
(экспериментальное исследование)»**

14.03.03 - патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ю.А. Кудрявцева

Кемерово – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ПРИРОДА, БИОЛОГИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПАТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ КФБ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Природа и биологический смысл КФБ	12
1.2 Клиническое значение КФБ	16
1.3 Физико-химические свойства КФБ и их связь с их патогенными эффектами .	20
1.4 Патогенные эффекты КФБ <i>in vivo</i>	23
1.5 Патогенные эффекты КФБ <i>in vitro</i>	26
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1 Искусственный синтез КФБ и МФБ.....	37
2.2 Сравнение физических свойств КФБ и МФБ.....	38
2.2.1 Визуализация частиц.....	38
2.2.2 Определение распределения размерности и поверхностного заряда частиц	39
2.3 Сравнение минерального состава КФБ и МФБ	39
2.3.1 Элементный анализ	39
2.3.2 Определение функциональных групп.....	40
2.3.3 Определение химических соединений и степени кристалличности	40
2.4 Сравнение органического состава КФБ и МФБ	41
2.4.1 Определение белкового профиля	41
2.4.2 Определение липидного профиля	41
2.4.3 Определение углеводов	42
2.4.4 Определение нуклеиновых кислот.....	42
2.5 Оценка патогенного действия КФБ и МФБ на эндотелий <i>in vitro</i>	43
2.5.1 Культивирование эндотелиальных клеточных линий.....	43

2.5.2	Определение патогенного действия КФБ и МФБ для культур эндотелиальных клеток.....	45
2.5.3	Анализ интернализации бионов эндотелиальными клетками.....	46
2.5.4	Анализ проницаемости лизосом.....	48
2.5.5	Иммуноблоттинг.....	49
2.5.6	Оценка выделения провоспалительных цитокинов.....	50
2.5.7	Измерение генной экспрессии.....	51
2.6	Сравнение патогенного действия КФБ и МФБ на эндотелиальные клетки <i>in vivo</i>	53
2.7	Статистический анализ.....	55
ГЛАВА 3 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МФБ КАК ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ.....		56
ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ ДЛЯ КУЛЬТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СРАВНЕНИИ С МФБ, ПОИСК МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СУБСТРАТА ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ БИОНОВ НА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ.....		68
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ И МФБ <i>IN VIVO</i> ...		97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		107
ВЫВОДЫ.....		112
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....		113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) представляют собой минерало-органические наночастицы, синтезирующиеся в условиях перенасыщения крови ионами кальция и фосфора [10, 22]. Было предположено [22] и экспериментально доказано [10], что КФБ представляют собой один из механизмов поддержания минерального гомеостаза, препятствуя кальцификации средней оболочки артерий (медии) при гиперкальциемии и гиперфосфатемии. Поскольку как повышенный уровень кальция и фосфора [36, 48, 148], так и сниженный уровень ингибиторов эктопической кальцификации альбумина и фетуина-А [99, 149] в сыворотке крови являются признанными факторами риска развития атеросклероза, было предположено, что КФБ являются одним из триггеров этого патологического процесса, вызывая повреждение эндотелия.

Было обнаружено, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, при этом не выделяясь из не поражаемых атеросклерозом внутренних грудных артерий [10]. Показано, что искусственно синтезированные КФБ морфологически и химически идентичны выделенным из атеросклеротических бляшек, что позволило обосновать использование искусственно синтезированных КФБ для экспериментов *in vitro* и *in vivo* [10]. Проведенные эксперименты действительно продемонстрировали, что патогенное воздействие КФБ на сосуды определяется именно повреждением эндотелия, а не прямой эктопической кальцификацией или нарушением структуры и функции альбумина и фетуина-А [10].

Доказано, что повреждение эндотелия является обязательным иницирующим фактором развития атеросклероза [26, 65, 75, 92, 163], поэтому КФБ представляются перспективной мишенью для антикальцифицирующей терапии с целью первичной и вторичной профилактики атеросклероза [118, 167]. Однако с точки зрения патофизиологии и патобиохимии необходимо понять,

специфично ли повреждающее действие на эндотелий для КФБ или характерно и для других минерало-органических наночастиц. Данный вопрос приобретает особую значимость в свете широко разрабатываемых наноразмерных носителей для направленной доставки лекарственных средств [12], которые, как правило, вводятся в системный кровоток.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на то, что существует ряд исследований, показывающих повреждающее действие КФБ как в целом для культур клеток [27, 71, 122], так и в частности для эндотелиоцитов [10], природа их патогенного действия остается неизвестной: неясно, специфично оно только для данного типа бионов или же характерно и для других эндогенно формируемых наночастиц. Для оценки механизма патогенного действия КФБ в качестве группы сравнения необходимо искусственно синтезировать наночастицы, которые не могли бы быть образованы в организме человека, но которые не отличались бы от КФБ ничем, кроме собственно составляющих их минералов. Было предположено, что в качестве подобной группы сравнения могут выступить магний-фосфатные бионы (МФБ), поскольку: 1) МФБ не способны образовываться в организме человека вследствие кратно превышающей летальную дозы ионов магния (Mg^{2+}), необходимой для их синтеза; 2) по литературным данным МФБ наиболее близки к КФБ по размерности и форме [22].

Цель исследования

Установить механизм патогенного действия КФБ на эндотелий в сравнении с МФБ для определения их роли в развитии атеросклероза.

Задачи исследования

1. Оценить пригодность МФБ для анализа механизма патогенного действия КФБ путем сравнительной характеристики их физико-химических свойств.

2. Исследовать патогенные эффекты КФБ в сравнении с МФБ для культур первичных артериальных и иммортализованных венозных эндотелиальных клеток.
3. Определить механизм патогенного действия КФБ на субклеточном уровне.
4. Изучить патологические процессы, запускаемые КФБ в интиме и адвентиции брюшной аорты крыс.

Научная новизна исследования

Показано, что повреждающее действие на эндотелий специфично для КФБ и не характерно для МФБ.

Продемонстрировано, что КФБ, в отличие от МФБ, индуцируют гибель как первичных культур эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека, так и иммортализованных культур венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926.

Установлено, что механизмом патогенного действия КФБ после их интернализации эндотелиальными клетками является первичное повреждение лизосом, из которых при растворении КФБ происходит выделение ионов кальция (Ca^{2+}) в цитозоль, что опосредованно вызывает многократное повышение уровня активной (расщепленной) каспазы-3 и ее субстрата поли (АДФ-рибоза) полимеразы (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cPARP-1). Таким образом, типом клеточной смерти в результате воздействия КФБ является лизосомально-опосредованная гибель.

Доказано, что экспозиция КФБ индуцирует повышение концентрации выделяемого интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) в сравнении с контрольными клетками, в то время как экспозиция МФБ не вызывает изменения уровня секретируемых эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов. Это свидетельствует о возможном паракринном влиянии подвергшихся воздействию КФБ эндотелиальных клеток на микроокружение.

Выявлено, что в отличие от МФБ, КФБ вызывают гипертрофию интимы и воспаление адвентиции брюшной аорты крыс. Формирование неоинтимы в аорте связано с сочетанием механического повреждения эндотелия баллоном и патогенного действия КФБ, что запускает сдвиг фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактильного (для гладкомышечных клеток) и неактивного (для фибробластов) на синтетический, способствуя формированию ими экстрацеллюлярного матрикса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в определении механизма патогенного действия КФБ на эндотелий и обосновании возможной роли КФБ как одного из пусковых факторов развития атеросклероза. Новые знания могут быть использованы при разработке препаратов с хелатирующим действием, напрямую дезинтегрирующих КФБ и нейтрализующих ионы кальция.

Методология и методы исследования

Методологической основой работы было применение искусственно синтезированных КФБ и МФБ в экспериментах на первичных артериальных эндотелиальных клетках и иммортализованных венозных эндотелиальных клетках, а также для внутривенного введения нормолипидемическим крысам Wistar при предварительном механическом повреждении их брюшной аорты. Искусственный синтез КФБ и МФБ был проведен в условиях перенасыщения сывороточной культуральной среды соответствующими солями (CaCl_2 и MgCl_2 соответственно в сочетании с Na_2HPO_4). Для оценки пригодности МФБ в качестве группы сравнения для КФБ использованы сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Распределение бионов в растворе и их поверхностный заряд (дзета-потенциал) изучено методом динамического и электрофоретического рассеяния света. Оценка минерального состава проведена

методами энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии и CHNSO-анализа, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, спектроскопии комбинационного рассеяния света, рентгеновской порошковой дифрактометрии. Органический состав КФБ и МФБ исследован при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, газовой хромато-масс-спектрометрией, спектрофотометрической оценкой нуклеиновых кислот и электрофорезом в агарозном геле после окрашивания бромистым этидием. Повреждающее действие КФБ и МФБ для эндотелиальных клеток *in vitro* оценивалось посредством фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, микропланшетного колориметрического теста, проточной цитометрии. Анализ интернализации бионов проведен методами ПЭМ, СЭМ в обратно-рассеянных электронах и конфокальной микроскопией. Концентрация провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в культуральной среде измерена методом иммуноферментного анализа. Уровень экспрессии генов цитокинов *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *IL12A*, *IL12B*, *IL23*, скавенджер-рецепторов *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR* и молекул клеточной адгезии *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP*, *CDH5* оценен количественной полимеразной цепной реакцией. Для определения механизма патогенного действия КФБ и МФБ применен селективный блокатор вакуолярной H⁺-АТФазы бафиломицин А1, микропланшетный колориметрический тест, иммуноблоттинг на активную каспазу-3 (сCasp-3) и расщепляемый ей субстрат – поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1 (сPARP-1). Для оценки патогенного действия КФБ и МФБ *in vivo* использована модель ангиопластики аорты крысы с применением баллона для коронарной ангиопластики с дальнейшим окрашиванием эксплантированных брюшных аорт: 1) парафиновых срезов – гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату с дальнейшей световой микроскопией; 2) криосрезов – конъюгированными с флуорофорами антителами на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34, на CD31 и маркер гладкомышечных клеток α -гладкомышечный актин (α -

ГМА), на маркер клеток мезенхимального ряда виментин (Vim, маркер фибробластов) и α -ГМА, на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа (КоллIV) и α -ГМА с дальнейшей конфокальной микроскопией. Данные виды окрашиваний позволили оценить гипертрофию интимы и воспаление адвентиции, толщину интимы и меди (количественная оценка гипертрофии интимы), воспаление адвентиции (подсчет числа и площади скоплений лимфоцитов). Статистическая обработка полученных данных выполнена в программе GraphPad Prism. Межгрупповое сравнение проводили однофакторным дисперсионным анализом или критерием Краскела-Уоллиса. При выявлении статистически значимых различий между группами осуществляли попарное сравнение групп, применяя критерий Тьюки или критерий Данна соответственно. Различия между группами признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту

1. МФБ по физическим (форме, структуре, размерности) и химическим свойствам (поверхностному заряду, минеральному и органическому профилю) пригодны в качестве группы сравнения для изучения механизма патогенного действия КФБ.

2. КФБ, в отличие от МФБ, инициируют лизосомально-опосредованную гибель эндотелиальных клеток в культуре вследствие массивного выделения из лизосом в цитозоль активирующих каспазы ионов кальция, а также способствуют выделению эндотелиоцитами провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8.

3. Внутривенное введение КФБ, в отличие от МФБ, после ангиопластики брюшной аорты нормолипидемических крыс Wistar вызывает развитие гипертрофии интимы и воспаление адвентиции.

Степень достоверности результатов

О достоверности результатов диссертационного исследования свидетельствуют массивный объем экспериментального материала, широкий спектр выполненных исследований, неоднократно повторенные эксперименты *in*

vitro и *in vivo*, использование современных методов исследования и статистической обработки полученных результатов. Автор непосредственно участвовала в получении исходных данных и анализе результатов.

Апробация материалов диссертации

Результаты настоящего исследования были доложены и обсуждены на IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (20 февраля 2017 года, г. Москва); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы дислипидемий и атеросклероза» (6-8 декабря 2017 года, г. Кемерово); VII Российско-Казахстанском Симпозиуме «Углекислотная химия и экология Кузбасса» (7-10 октября 2018 года, г. Кемерово); Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины», (24-25 мая 2018 года, г. Томск); Восьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (16-18 октября 2018 года, г. Новосибирск); XIX Ежегодном научно-практическом семинаре молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической кардиологии» (5 июня 2019 года, г. Томск).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 7 работ в журналах, рекомендованных ВАК для публикаций основных результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата наук по специальности «патологическая физиология (биологические науки)», и 2 – в зарубежных рецензируемых изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация объемом 136 страниц печатного текста, написана на русском языке, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов

исследования, 3 глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Диссертация иллюстрирована 60 рисунками. Указатель использованной литературы содержит 2 работы отечественных и 184 работы иностранных авторов.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании исследования, определении цели и задач, анализе литературы по теме диссертации, искусственном синтезе МФБ и КФБ, экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных, обработке и интерпретации полученных данных, написании статей и диссертации.

Эксперименты по оценке физико-химических свойств МФБ и КФБ были проведены совместно с сотрудниками Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук (г. Кемерово): канд. хим. наук О.С. Ефимовой, канд. хим. наук А.Н. Поповой. Эксперименты на клеточных культурах и лабораторных животных были выполнены совместно с сотрудниками Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово): канд. мед. наук А.Г. Кутихиным, канд. биол. наук Е.А. Великановой, мл. науч. сотр. А.В. Мироновым.

ГЛАВА 1 ПРИРОДА, БИОЛОГИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПАТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ КФБ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Природа и биологический смысл КФБ

Из клинических исследований достаточно давно известно, что повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца, острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболеваниями периферических артерий) [16, 36, 48, 134, 147, 148]. Кроме того, сниженный уровень ингибиторов эктопической кальцификации фетуина-А и альбумина в крови также ассоциирован с повышенным риском развития ишемической болезни сердца [99, 149]. В то же время свободные ионы кальция и фосфора могут приводить к прямой кальцификации средней оболочки сосудов (медии), однако не вызывают собственно атеросклероза [105, 121] – хронического воспалительного процесса, характеризующегося формированием гетерогенных бляшек из клеток, внеклеточного матрикса и липидов во внутренней оболочке артерий [75, 166]. При критическом сужении артериального просвета или разрыве бляшки с последующим тромбозом происходит критическое падение уровня необходимого кровотока, что приводит к острому несоответствию объема поступающего в ткани кислорода необходимому для поддержания их жизнеспособности объему [75, 166]. Клинически это проявляется инфарктом миокарда (при нарушении сердечного кровотока), острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу (при нарушении церебрального кровотока) и заболеваниями периферических артерий [75, 166].

Ингибирование кальцификации меди в крови осуществляется за счет функционирования ряда белков, при этом три различных механизма связывания кальция представлены альбумином, остеонектином и фетуином-А [158]. Альбумин связывает ионизированный кальций посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, а остеонектин – при помощи EF-руки, специфического белкового домена [158] (рисунок 1, А). Связывание кальция фетуином-А обусловлено отрицательными зарядами β -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [158] (рисунок 1, А). Таким образом, альбумин и остеонектин связывают свободный кальций с низкой и высокой аффинностью соответственно, а фетуин-А отвечает за высокоаффинное связывание фосфата кальция [158]. Кроме альбумина, остеонектина и фетуина-А, в систему эндогенных ингибиторов внескелетной кальцификации также входят матриксный Gla-белок и Gla-богатый белок, относящиеся к семейству витамин К-зависимых белков и содержащих 5 и 15 групп γ -карбоксилированного глутамата (Gla) соответственно [63, 76, 155]. Образуемые в результате витамин К-зависимой посттрансляционной модификации (γ -карбоксилирования) Gla-группы позволяют этим белкам связывать как ионизированный кальций, так и кальций в составе различных химических соединений [20, 88, 140, 165] (рисунок 1, Б). Другой ингибитор эктопической кальцификации, трансмембранный белок Klotho является корцептором для фактора роста фибробластов-23, снижая реадсорбцию фосфатов в проксимальных канальцах почек и синтез кальцитриола (1,25-дигидроксивитамина D) [102] (рисунок 1, Г). В свою очередь, остеопротегерин является нейтрализующим рецептором для RANK-лиганда [46] и за счет этого препятствует остеокластной дифференцировке и дезинтеграции костного материала остеокластами, предотвращая развитие остеопенического синдрома [113, 114] (рисунок 1, В). Несмотря на то, что механизм антикальцифицирующего действия остеопонтин неясен, его роль в поддержании минерального гомеостаза также считается доказанной [112, 115].

Помимо указанных белков, к эндогенным ингибиторам эктопической минерализации относят неорганический пирофосфат, образующийся при гидролизе АТФ эктонуклеотидпирофосфатазами/фосфодиэстеразами, состоящий из связанных гидролизуемым эфиром двух фосфатных групп и препятствующий нуклеации аморфного фосфата кальция, его кристаллизации до гидроксиапатита, а также ингибирующий рост кристаллов гидроксиапатита путем связывания с его поверхностью [63] (рисунок 1, Д).

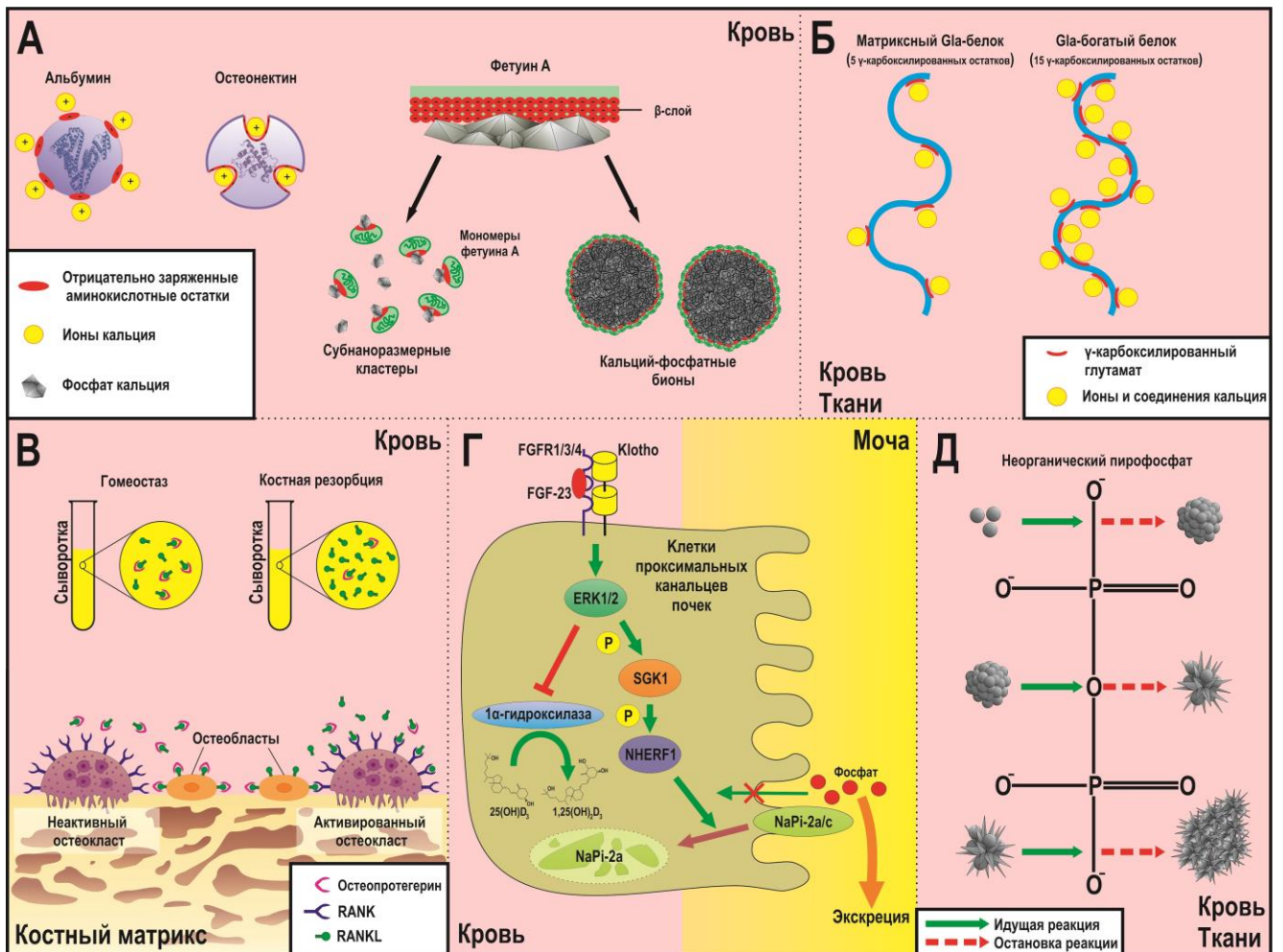


Рисунок 1 – Схематичное изображение механизмов эндогенного ингибирования эктопической минерализации в организме человека

В свою очередь, связывание фосфата кальция основным ингибитором внескелетной минерализации фетуином-А также осуществляется по двум различным механизмам [70]. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция [70]. Несмотря на

теоретическую возможность их физико-химической характеристики методами высокоразрешающей электронной микроскопии и элементного анализа, на данный момент изучение роли таких кластеров в нормальной и патологической физиологии представляется технически затруднительным вследствие их чрезвычайно малой размерности, не позволяющей проводить биологические эксперименты на должном уровне. Вторым механизмом связывания фетуином-А фосфата кальция является формирование кальций-фосфатных бионов (КФБ) – кристаллических частиц гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита 80-500 нм в диаметре, имеющих губчатую структуру и включающих в себя еще ряд белков сыворотки крови [4, 10, 22, 39, 70, 82, 158, 159]. Таким образом, при избытке ионов кальция и фосфора или нарушении их выведения КФБ способны накапливаться в крови человека [10, 22]. В целом семейство бионов представляет собой минерало-органические частицы, формирующиеся в биологических жидкостях при их перенасыщении определенными катионами и анионами [10, 22].

В экспериментах группы Кутихина [10] было показано, что при добавлении в культуральную среду КФБ не происходит кальцификации используемого для изготовления биопротезов бычьего и свиного перикарда независимо от способа его химической обработки, в то время как обогащенная солями кальция и фосфора среда приводит к формированию массивных минеральных отложений. Кроме того, внутривенное введение КФБ не вызывало минерализации интимы брюшной аорты крыс [10], что также косвенно демонстрирует их неспособность индуцировать формирование очагов эктопической (в частности, сосудистой) кальцификации. Данные результаты подтвердили гипотезу о том, что формируемые эндогенно при перенасыщении крови ионами кальция и фосфора КФБ являются механизмом защиты от прямой эктопической кальцификации тканей, в том числе препятствуя патологической минерализации элементов системы кровообращения [10, 22].

1.2 Клиническое значение КФБ

Вместе с тем было выявлено, что КФБ выделяются из приблизительно 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, оказывают прямое цитотоксическое действие на эндотелиальные клетки *in vitro*, стимулируют выделение ими провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, а при предварительном повреждении интимы брюшной аорты крыс баллоном вызывают ее гипертрофию, являющуюся характерным признаком атеросклероза [10]. Таким образом, защищая организм от «большого зла» – быстрой и массивной кальцификации сосудов [30, 68], КФБ тем не менее потенциально могут являться одним из триггеров атеросклероза.

Поскольку атеросклероз продолжает оставаться ведущей причиной смерти как в развитых, так и развивающихся странах [1, 77] а повреждение внутренней выстилки артерий (эндотелия) является обязательным условием для его развития [26, 92], изучение триггеров дисфункции и повреждения эндотелия имеет достаточно большую актуальность. Вместе с тем при повреждении стенки сосуда со стороны просвета различными агентами первичный клеточный ответ поступает в том числе, со стороны адвентиции [108]. В результате воздействия различных провоспалительных молекул [173], поступающих из системного кровотока посредством парацеллюлярного транспорта к *vasa vasorum* и лимфатическим сосудам адвентиции [86, 173], осуществляется активация адвентициальных фибробластов с формированием синтетически активных миофибробластов, пролиферация миофибробластов и их миграция из адвентиции в сторону просвета сосуда [6, 7], а также увеличивается количество макрофагов, лимфоцитов [141, 169] и *vasa vasorum* (система сосудов, ответственная за кровоснабжение стенки основного сосуда) [49], что в конечном счете ведет к образованию неоинтимы. Также стоит отметить, что при сосудистом воспалении в адвентиции образуются скопления лимфоцитов [108]. Увеличение количества *vasa vasorum* влечет за собой повышенную секрецию эндотелиальными клетками провоспалительных

цитокинов и молекул клеточной адгезии, способствующих прикреплению моноцитов к эндотелию и их миграции в интиму с последующей дифференцировкой в макрофаги и образованием пенистых клеток [108]. Все вышеуказанное позволяет предположить, что воздействие КФБ также может вызывать определенный патологический ответ не только со стороны просвета сосуда, но и в адвентиции.

Ранее сферические наночастицы гидроксиапатита были идентифицированы в коронарных артериях и аорте пациентов с атеросклерозом [109], а также аорте и подвздошных артериях больных с уремией, являющейся фактором риска развития атеросклероза [8, 175]. Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови также обусловлена повышенной склонностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью и больных артериальной гипертензией к формированию КФБ в сравнении с сывороткой условно здоровых доноров крови [145] (рисунок 2, А). Кроме того, повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хронической болезнью почек 3 и 4 стадий [146], а также у больных терминальной хронической почечной недостаточностью [23] (рисунок 2, А, Б), включая перенесших трансплантацию почки [28, 143, 144] (рисунок 2, Б). При этом пациенты с увеличенной склонностью сыворотки крови к формированию КФБ характеризуются повышенным риском смерти как от всех, так и отдельно от сердечно-сосудистых причин [28, 143, 144], а также повышенным риском развития инфаркта миокарда и заболеваний периферических артерий [23]. Последние исследования также демонстрируют, что повышенная склонность сыворотки к формированию КФБ ассоциирована с более выраженным коронарным кальцинозом и более высоким риском прогрессирования этого патологического процесса у пациентов с хронической почечной недостаточностью на различных стадиях, исключая начальную и терминальную [142]. Это косвенно подтверждается данными о том, что высокое содержание КФБ в системном кровотоке может служить суррогатным маркером коронарного атеросклероза, коррелируя как с объемом бляшки в целом, так и с объемом ее

липидного компонента, а также превалируя у пациентов с острым коронарным синдромом в сравнении с субъектами со стабильной стенокардией [15] (рисунок 2, В).

Кроме того, в последних исследованиях удалось успешно детектировать КФБ в сыворотке крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [3] и преддиализной ее стадией [85, 117] при помощи проточной цитометрии с использованием специфичных к фосфату кальция и клеточным мембранам флюоресцентных маркеров [3, 85] (рисунок 2, В) и динамического рассеяния света [117]. Проточная цитометрия при помощи аналогичного окрашивания также позволила детектировать КФБ в перитонеальном диализате пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [31]. Электронная и атомно-силовая микроскопия являются альтернативным методом детекции КФБ в осадке после центрифугирования сыворотки пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [21, 43, 71, 117], однако данные методы в силу трудоемкости и относительной малодоступности едва ли могут быть применены в клинической практике.

Идентификация КФБ как биомаркера и тем более как пускового фактора дисфункции и повреждения эндотелия требует предложения способов их элиминации из системного кровотока после выполнения ими своей защитной функции – нейтрализации избыточных ионов кальция и фосфора. В этом отношении интересны результаты рандомизированного клинического испытания ТАСТ (Trial to Assess Chelation Therapy), которое включило 1708 пациентов (50 лет и старше) с инфарктом миокарда в анамнезе, получавших (839 больных) или не получавших (869 больных) в течение 30 недель 40 внутривенных инфузий объемом 500 мл, включавших 3 г динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (1,5 г/л) как хелатирующего агента в сочетании с витаминной и электролитной смесью (рисунок 2, Г).

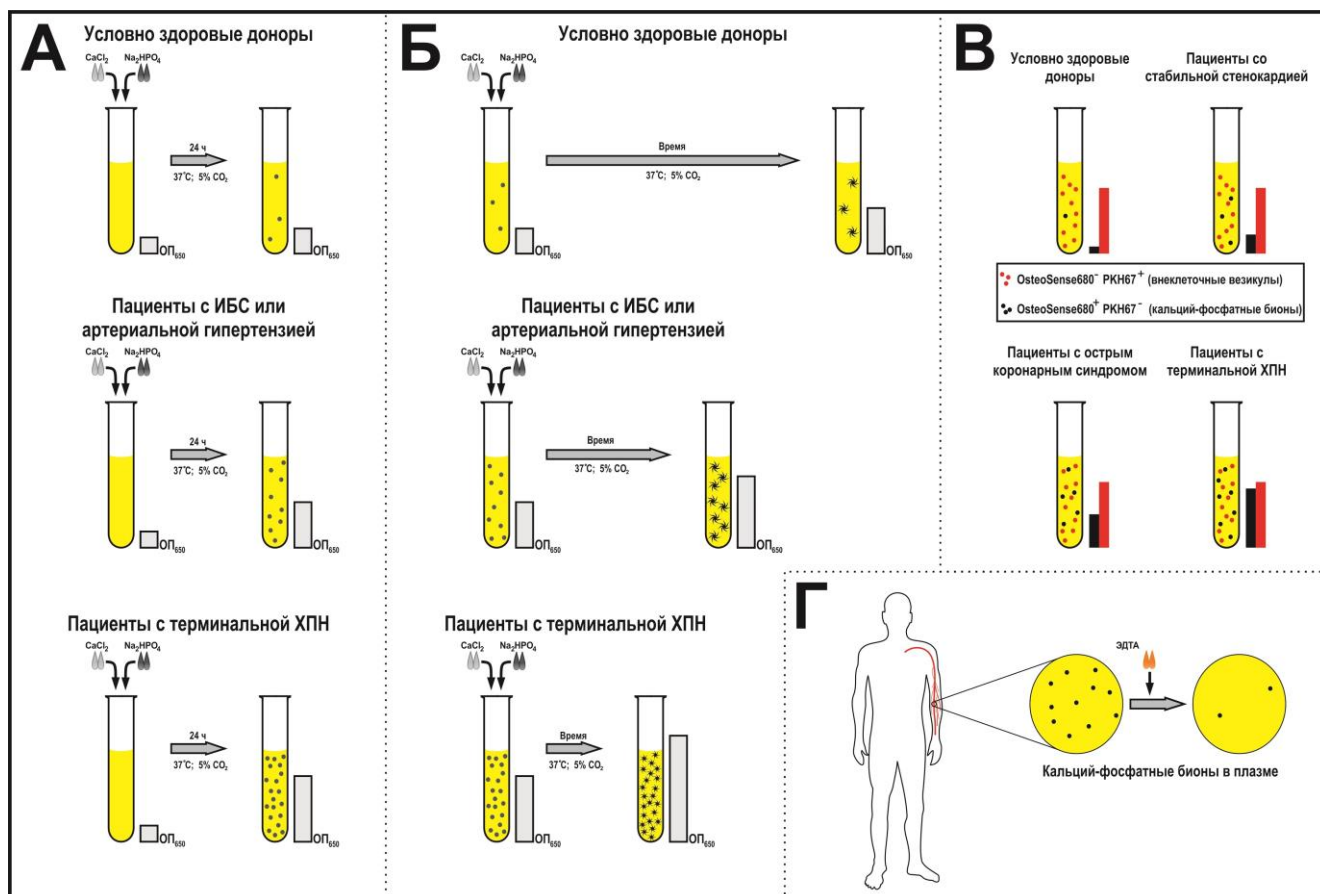


Рисунок 2 – Варианты оценки склонности крови к образованию КФБ по скорости формирования КФБ (А) и скорости их кристаллизации (Б), схема детекции КФБ методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентных маркеров, специфичных к фосфату кальция (OsteoSense 680) и клеточным мембранам (PKH67) (В), принцип действия препаратов с хелатирующим действием при их внутривенном введении (Г)

У получавших указанную терапию пациентов в 1,22 раза реже регистрировалась первичная комбинированная конечная точка (в которую входили летальный исход независимо от причины, повторный инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, коронарная реваскуляризация или госпитализация по поводу стенокардии) [60]. Данный эффект был особенно выражен на когорте пациентов с сахарным диабетом, первичная комбинированная конечная точка у которых отмечалась в 1,69 раза реже [167], и на субкогорте пациентов с сахарным диабетом и заболеваниями периферических артерий, являющихся клиническим проявлением мультифокального атеросклероза, у

которых снижение частоты первичной комбинированной конечной точки достигло 1,92 раза [168]. Эти результаты приобретают особый интерес в свете того, что пик формирования КФБ в крови приходится на первые 2 часа после приема пищи; таким образом, существует ассоциативная связь между постпрандиальной гликемией и образованием КФБ [53]. Положительным эффектом протестированного в исследовании ТАСТ режима терапии также является его безопасность [18]. В то же время низкая биодоступность динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты при пероральном употреблении (около 5%) [73] существенно ограничивает ее клиническое применение, а внутривенный путь введения лекарственных средств в регулярной терапевтической практике в настоящее время считается сопряженным с достаточно высоким риском осложнений.

Таким образом, как с позиции частной патологической физиологии и фундаментальной кардиологии, так и с клинической точки зрения представляется важным подробное изучение механизмов патогенного, а в особенности – эндотелиотоксического действия КФБ, поскольку именно эндотелиальные клетки непосредственно контактируют с находящимися в системном кровотоке минерало-органическими частицами.

1.3 Физико-химические свойства КФБ и их связь с их патогенными эффектами

Проведенные ранее эксперименты позволили предположить, что при умеренном перенасыщении крови ионами кальция и фосфора могут образовываться КФБ сферической формы, а при тяжелом перенасыщении – КФБ игольчатой формы [40, 122]. При этом известно, что форма наночастиц гидроксипатита является одним из основных факторов, определяющих их

токсичность; в частности, наночастицы игольчатой формы значительно токсичнее сферических [52, 61, 171], причем данная зависимость также характерна и для других типов наночастиц, не являясь специфичной для гидроксиапатита или форм фосфата кальция в целом [151]. Токсичность кристаллов гидроксиапатита определяется в том числе другими физико-химическими параметрами, такими, как размерность [89, 122, 171], степень кристалличности [50], площадь поверхности [177], соотношение продольного и поперечного диаметров [177], а также наличие или отсутствие белковой оболочки [71] (рисунок 3). Интересно, что значение для цитотоксичности КФБ имеют даже на первый взгляд незначительные различия их формы; так, игольчатые КФБ токсичнее палочковидных [177].

В целом принято считать, что токсичность наночастиц является мультифакториальным феноменом и определяется их размерностью, формой, степенью кристалличности, зарядом и площадью поверхности, а также минеральным и органическим составом [14, 54, 96] (рисунок 3).

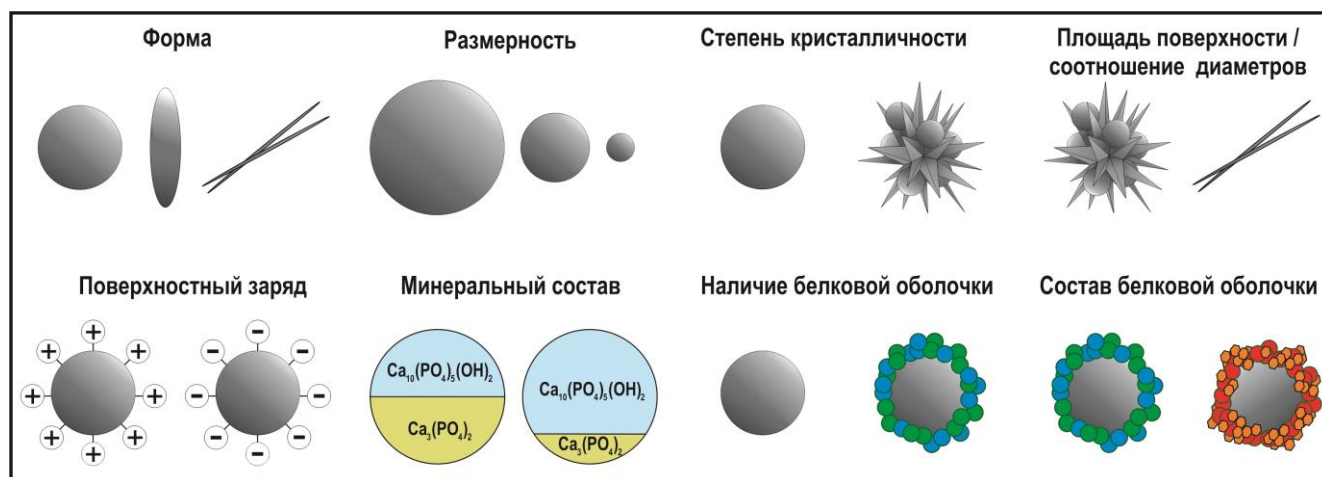


Рисунок 3 – Факторы, определяющие токсичность наночастиц гидроксиапатита

Надлежащая характеристика физических и химических свойств бионов требует сочетания современных методов визуализации и химического материаловедения, включая электронную и атомно-силовую микроскопию, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, методы элементного

анализа и определения функциональных групп, рентгеновскую дифрактометрию, аналитический электрофорез и хромато-масс-спектрометрию [14, 41, 54, 96, 110]. Важными особенностями физико-химического анализа бионов являются необходимость использования электронной и атомно-силовой микроскопии высокого разрешения, а также оценки органического профиля, так как бионы характеризуются адсорбцией макромолекул из окружающей биологической жидкости [47, 69, 184]. Кроме того, при перенасыщении окружающей среды определенными ионами может происходить смена входящих в состав бионов функциональных групп; так, искусственно синтезированные кальций-карбонатные и кальций-сульфатные бионы могут переходить в КФБ при перенасыщении среды фосфат-анионом посредством реакций ионного обмена, а также путем растворения и повторной преципитации, однако релевантность этих экспериментов происходящим *in vivo* биохимическим процессам остается неясной [5].

В то же время результаты приведенных выше работ существенно различаются в зависимости от сочетания указанных факторов. К примеру, окруженные белковой оболочкой сферические наночастицы гидроксиапатита (КФБ) менее 300 нм в диаметре не вызывали выброса активных форм кислорода или выделения провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β в экспериментах на линии макрофагов человека THP-1 [122] в сравнении с микроразмерными (более 1 мкм) частицами, в то время как сферические наночастицы гидроксиапатита без белковой оболочки диаметром около 100 нм, напротив, стимулировали выделение интерлейкина-1 β первичными полученными из костного мозга дендритными клетками мыши в сравнении с аналогичными частицами диаметром 20 и 100 мкм [171]. Частицы гидроксиапатита с меньшей степенью кристалличности были более токсичными для первичных клапанных интерстициальных и эндотелиальных клеток свиньи, чем более кристаллизированные частицы [50], однако для первичных аортальных гладкомышечных клеток человека состоящие из аморфного фосфата кальция частицы были нетоксичны, в отличие от кристаллов гидроксиапатита [27]. Кроме

того, эксперименты на иммортализованных макрофагах крысы продемонстрировали, что именно кристаллические, но не аморфные КФБ способны вызывать опосредованное сигнальным путем Толл-подобных рецепторов выделение интерлейкина- 1β и фактора некроза опухоли [38]. Различия в форме и кристалличности КФБ также влияют на их интернализацию и распределение в организме, что с целью сохранения логичности описания их токсических эффектов и их механизмов будет описано в последующих разделах.

1.4 Патогенные эффекты КФБ *in vivo*

Возможность формирования КФБ на животной модели была впервые показана при курсовом введении ингибитора костной минерализации этидроната [56]. Подкожная инъекция этидроната крысам в дозировке 8 мг/100 г массы тела приводило к повышению уровня общего кальция в 1,8 раза (до 4,3 ммоль/л), фосфора в 1,6 раза (до 5,6 ммоль/л), а матричного Gla-белка – в 25 раз (до 12 мкг/мл), что в результате приводило к образованию в системном кровотоке минерало-органических наночастиц, на 80% состоявших из фетуина-А, на 18% – из минеральной составляющей и на 2% – из матричного Gla-белка [56]. Максимальная концентрация КФБ в сыворотке наблюдалась через 6 часов после введения этидроната, при этом выведение КФБ осуществлялось в течение 24 часов [56]. Напротив, введение ингибиторов костной резорбции кальцитонина, алендроната, ибандроната и остеопротегерина предотвращало подобные эффекты этидроната, доказывая причинно-следственную связь между опосредованной функционированием остеокластов костной резорбцией, повышением уровня кальция и фосфора в крови и формированием КФБ [125, 150]. При помощи повышения дозировки этидроната до 32 мг/100 г массы тела удалось провести осаждение КФБ при помощи стандартного центрифугирования (16,000 x g), в то

время как дозировка в 8 мг/100 г массы тела позволяла седиментировать КФБ лишь при ультрацентрифугировании (164,000 x g) [124]. Осаждение КФБ также возможно с использованием модели аденин-индуцированной почечной недостаточности крыс [74] и крыс, получающих питание с очень низким содержанием белка (2,5% вместо стандартных 19%) [180], что соответствует подобным клиническим сценариям. Последующий искусственный синтез *in vitro* подтвердил роль фетуина-А в формировании КФБ, воспроизведя полученные при введении этидроната крысам результаты [126].

Флюоресцентное мечение входящего в состав КФБ фетуина-А в процессе искусственного синтеза позволило установить, что период полувыведения КФБ из системного кровотока после их формирования составляет всего лишь 45 минут, при этом КФБ частично депонируются в клетках Купфера (резидентных макрофагах печени) уже через 2 минуты после введения, и период их полувыведения в них составляет 3 минуты [45] с практически полной элиминацией через 25 минут [38]; в то же время эксперименты с различными видами КФБ указывают на длительное задерживание флюоресцентного сигнала в клетках Купфера, не ослабевающее даже через 30 минут после введения, что может зависеть от степени кристалличности и вида фосфата кальция, входящего в состав КФБ [38]. Через 25 минут после инъекции высококристаллические КФБ также наблюдались и в эндотелиальных клетках синусоидных капилляров печени [38]. В целом скорость элиминации КФБ в печени и участие эндотелиальных клеток синусоидных капилляров печени в этом процессе определялось их физико-химическими свойствами, что подчеркивает важность их изучения и детального описания протокола искусственного синтеза КФБ.

Отражаемый флюоресцентным сигналом максимум накопления КФБ в печени наблюдался через 30 минут после их внутривенного введения и составлял 31% от введенного количества частиц [45]. Кроме того, КФБ также частично депонировались в макрофагах краевой зоны селезенки, хотя и в полутора- или двукратно меньшем объеме по сравнению с печенью [45]. При этом нокаут гена скавенджер-рецептора AI/II существенно снижал эффективность выведения КФБ

из системного кровотока макрофагами печени и селезенки [45]. В свою очередь, нокаут кодирующих фетуин-А и аполипопротеин Е генов у мышей способствовал развитию каротидных атеросклеротических бляшек, сопровождавшихся колокализацией CD68-положительных макрофагов и флюоресцентно меченных КФБ [45].

Внутривенное введение КФБ нормолипидемическим крысам после баллонной ангиопластики провоцировало развитие концентрической или эксцентрической гипертрофии интимы, выражающейся в увеличении толщины отношения интимы к меди, уже через 5 недель после введения, однако эти результаты были получены на относительно небольшой выборке животных ($n = 7$ на группу) и поэтому нуждаются в подтверждении [10]. Аналогичные результаты были получены в предыдущих экспериментах на новозеландских белых кроликах, подвергшихся баллонной ангиопластике сонной артерии, однако в них объем выборки был еще меньшим ($n = 2-3$) [83] или эквивалентным ($n = 7$) [136]. Альтернативной моделью могли бы стать мыши с нокаутированными генами, кодирующими аполипопротеин Е или рецептор к липопротеинам низкой плотности, которые вследствие этого обладают врожденной склонностью к развитию атеросклероза, однако в этом случае представляется невозможным отдифференцировать атеросклеротические очаги, сформированные в результате воздействия КФБ. В то же время, возможно, имело бы смысл оценить общий объем атеросклеротического поражения при помощи тотального окрашивания аорты специфичными к липидам красителями (к примеру, Oil Red). В целом исследований по токсичности КФБ *in vivo* было проведено немного, и особенности формирования неоинтимы при их внутривенном введении, а также способность КФБ вызывать гипертрофию интимы *per se* (без предварительного повреждения артерии) остаются неясными, требуя дальнейшего изучения. Также неясно, влияют ли КФБ на развитие воспаления в адвентиции и периваскулярной жировой ткани, которое вносит существенный вклад в развитие атеросклероза наряду с происходящими в неоинтими процессами [108]. Наконец, остается

неизвестным, различается ли выраженность патогенных эффектов КФБ в сосудистых сегментах с ламинарным и турбулентным кровотоком.

1.5 Патогенные эффекты КФБ *in vitro*

Цитотоксическое действие КФБ было убедительно показано в ряде работ на различных клеточных линиях, включая эндотелиальные клетки [10], сосудистые гладкомышечные клетки [29] и макрофаги [71, 122]. Воздействие КФБ вызывало повышение уровня расщепленных форм ключевых ферментов внутреннего пути апоптоза каспазы-9 и каспазы-3, а также расщепленной формы субстрата каспазы-3 поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1 в эндотелиальных клетках [10], в то время как предварительная обработка макрофагов ингибитором каспаз z-VAD-fmk препятствовала индуцируемой КФБ клеточной гибели [71]. В соответствии с современной классификацией путей клеточной смерти [106] можно предположить, что клеточная гибель при воздействии КФБ действительно идет по внутреннему пути апоптоза, однако проведенные эксперименты не позволяют исключить и других вариантов, в частности, лизосомально-опосредованной клеточной смерти. В то же время КФБ демонстрировали меньшую токсичность для макрофагов в сравнении с кристаллами чистого гидроксиапатита, что свидетельствует в пользу протективной роли входящих в их состав белков (альбумина, фетуина-А и других), в том числе покрывающих их [71].

В качестве морфологического субстрата цитотоксичности КФБ была предположена их интернализация, что было подтверждено при помощи просвечивающей электронной микроскопии после добавления КФБ к культурам иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека [10], первичных аортальных гладкомышечных клеток свиньи [29] и иммортализованных макрофагов мыши [71]. Предварительная обработка клеток ингибитором

полимеризации актина цитохалазином D или ингибитором клатрин-опосредованного эндоцитоза хлорпромазином снижало эффективность интернализации КФБ первичными макрофагами мыши, дифференцированными из соответствующих прогениторов костного мозга, в то время как воздействие ингибитора кавеол-опосредованного эндоцитоза генистеина и ингибитора макропиноцитоза 5-(N,N-диметил)амилорида не оказывало подобного эффекта [45]. Более подробная расшифровка механизма интернализации КФБ показала, что ингибирование опосредующей передачу сигнала при Fcγ-рецептор-опосредованном эндоцитозе фосфоинозитол-3-киназы Ly294002 гидрохлоридом, блокировка активности маннозосвязывающего рецептора маннаном и связывание рецептора конечных продуктов гликирования гликированным сывороточным альбумином также не влияла на интернализацию КФБ вышеуказанной линией первичных макрофагов [45].

В то же время ингибирование скавенджер-рецепторов полиинозиновой кислотой частично препятствовало интернализации КФБ, предполагая их активную роль в этом процессе с учетом участия клатрина и полимеризации актина [45]. Блокирование широкого спектра скавенджер-рецепторов (рецепторов комплемента 3 типа, CD16/CD32, Толл-подобного рецептора 2, Толл-подобного рецептора 4, CD36 и сиалoadгезина) посредством специфических антител не выявило изменений в динамике интернализации КФБ макрофагами, как и нокаут генов, кодирующих CD36, Fcγ-рецептор, аннексины A5 и A6, а также галектины 1 и 3 [45]. Ключевая роль в интернализации КФБ принадлежала скавенджер-рецептору AI/II, нокаут гена которого либо конкурентное связывание со специфическим лигандом ацетилированным липопротеином низкой плотности снижал эффективность этого процесса макрофагами в полтора-два раза [45]. Данные результаты были в дальнейшем подтверждены другой научной группой, в экспериментах которой как полиинозиновая кислота, так и блокада скавенджер-рецептора AI/II специфическим антителом существенно снижали эффективность интернализации КФБ, частично спасали макрофаги от вызываемой КФБ клеточной гибели и снижали выделение ими фактора некроза опухоли [71]. В то

же время воздействие КФБ само по себе провоцировало дозо-и времязависимое увеличение экспрессии этого рецептора на плазматической мембране макрофагов независимо от их апоптоза, запуская таким образом механизм положительной обратной связи, обуславливающей регуляцию их ускоренной интернализации в аутокринной манере и объясняющей таким образом их высокую цитотоксичность [71]. Специфичность такого эффекта КФБ на молекулярном уровне было подтверждено его неизменностью при добавлении к клеточным культурам ингибитора каспаз z-VAD-fmk [71].

Дальнейшие эксперименты на клеточных культурах продемонстрировали, что объем интернализации КФБ может зависеть от их физико-химических свойств, в частности, формы (сферическая или веретеновидная) и степени их кристалличности [38]. Кроме того, дифференцированные из прогениторов костного мозга первичные макрофаги мыши и первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека характеризовались различной способностью к интернализации вышеуказанных типов КФБ – макрофаги были склонны к интернализации веретеновидных высококристаллических КФБ, в то время как эндотелиальные клетки, напротив, интернализировали сферические низкокристаллические КФБ [38]. Аналогичные результаты были получены на первичных макрофагах человека, дифференцированных из моноцитов, и первичных аортальных эндотелиальных клетках человека [38]. Нокаут гена скавенджер-рецептора AI/II или их блокада соответствующим антителом снижали эффективность интернализации веретеновидных высококристаллических КФБ, однако не влияли на интернализацию сферических низкокристаллических КФБ [38]. Это, в свою очередь, позволило предположить, что КФБ с разными физико-химическими свойствами связываются различными рецепторами, экспрессия которых существенно зависит от типа клеток [38]. В то же время предварительная обработка клеточных культур цитохалазином D, хлорпромазином или полиинозиновой кислотой снижала эффективность интернализации КФБ независимо от их физико-химических свойств [38]. Таким образом, за связывание разных типов КФБ могут быть ответственны различные рецепторы, однако после

этого механизм эндоцитоза и внутриклеточного метаболизма КФБ является универсальным и поэтому в значительной степени менее зависимым от типа клеток.

Центральную роль в развитии дисфункции эндотелия и нарушении сосудистого гомеостаза играет изменение паракринного профиля эндотелиальных клеток, сопровождающееся выделением провоспалительных цитокинов и сдвигом профиля секретируемых в микроокружение внеклеточных везикул [26, 75, 92, 131, 132]. В настоящее время считается доказанным усиление выделения ряда цитокинов различными типами клеток под воздействием КФБ, включая эндотелиальные [10], сосудистые гладкомышечные [27, 87, 174] и макрофаги [38, 71, 122]. При этом спектры цитокинов, повышено выделяемых указанными видами клеток, частично перекрываются: эндотелиальные клетки независимо от линии характеризуются увеличенной секрецией интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [10], сосудистые гладкомышечные клетки – интерлейкина-1 β , интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли [27, 87, 174], а макрофаги – интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли [38, 71, 122]. Нокаут гена, кодирующего Толл-подобный рецептор 4, приводил к почти полному отсутствию выделения приведенных цитокинов макрофагами как в контрольной культуре, так и при воздействии КФБ, что свидетельствует о его ключевой роли в этом процессе [38]. Интересно, что выделение цитокинов макрофагами также зависело от физико-химических свойств КФБ: сферические низкокristаллические КФБ вызывали повышенную секрецию фактора некроза опухоли, а веретеновидные высококristаллические – интерлейкина-1 β [38]. Выделение провоспалительных цитокинов различными типами клеток сосудистой стенки приводит к их паракринному влиянию друг на друга, что в конечном счете в сочетании с возможным изменением профиля секреции внеклеточных везикул создает провоспалительное микроокружение, способствующее формированию неоинтимы [26, 75, 92, 131, 132].

Одним из ведущих механизмов формирования неоинтимы является пролиферация сосудистых гладкомышечных клеток, в патологических условиях меняющих фенотип с сократительного на синтетический и вследствие этого

активно синтезирующих белки экстрацеллюлярного матрикса [138, 153], что в том числе вызывается воздействием КФБ [10]. При этом нарушения местного и системного фосфорнокальциевого гомеостаза способны приводить к биоминерализации неоинтимы, обусловленной остеогенной дифференцировкой сосудистых гладкомышечных клеток [13, 138, 153, 179]. В свою очередь, остеогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток может вызываться непосредственно повышением ионов кальция и фосфора в микроокружении [138], индуцироваться содержащими кальций и фосфаты внеклеточными везикулами, дополнительно генерирующими ионы фосфора за счет эктонуклеотидаз (к примеру, щелочной фосфатазы или 5'-нуклеотидазы) и несущими на своей мембране высокоаффинные к ионам кальция аннексины A2, A5 и A6 [35, 101, 178] или вызываться воздействием КФБ [27, 29, 43, 84, 170]. Данное направление клеточной трансдифференцировки сопровождается постепенным снижением экспрессии гладкомышечных маркеров (альфа-гладкомышечный актин, тяжелые цепи миозина гладких мышц, смузелин, кальпонин) и усилением остеогенных маркеров (остеопонтин, остеокальцин, щелочная фосфатаза, коллаген II и X типа) и управляется транскрипционными факторами RUNX2, Osterix, MSX2 и SOX9 [138]. Кроме того, при остеогенной дифференцировке сосудистых гладкомышечных клеток отмечается повышенная секреция провоспалительных цитокинов [138, 153], что также наблюдалось при воздействии на них КФБ [27, 87, 174].

В частности, добавление КФБ к первичным аортальным гладкомышечным клеткам человека приводила к дозозависимому формированию связанных с клетками кальцификатов в течение суток, причем данный процесс был сопряжен с клеточной жизнедеятельностью, сопровождался интернализацией КФБ и не был характерен для фиксированных параформальдегидом клеток [27, 43, 84]. Кальцификация первичных аортальных гладкомышечных клеток человека ускорялась в присутствии рекомбинантного фактора некроза опухоли, который также выделялся ими в результате экспозиции КФБ, и ингибировалась нокдауном гена, кодирующего этот белок, и гена соответствующего рецептора [27], а также

добавлением к клеткам донора обладающего вазо- и цитопротективным действием сульфида водорода гидросульфида натрия [84]. Элиминация КФБ из сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью предотвращала ее прокальцифицирующее влияние на первичные аортальные гладкомышечные клетки человека, также снижая выделение ими интерлейкина-1 β и циклооксигеназы-2 [43]. Напротив, добавление выделенных из сыворотки крови данных пациентов КФБ к сыворотке крови от контрольных пациентов стимулировало остеогенную дифференцировку аортальных гладкомышечных клеток и выброс ими провоспалительных цитокинов в микроокружение [32, 43]. В свою очередь, эти эффекты нейтрализовывались при добавлении к сыворотке γ -карбокситированного Gla-богатого белка [43]. В то же время эти данные являются противоречивыми, и в некоторых исследованиях КФБ не вызывали выраженной клеточно-опосредованной кальцификации как иммортализованных аортальных гладкомышечных клеток мыши, так и клеток остеосаркомы человека [170]. Более того, добавление КФБ к клеткам остеосаркомы даже замедляло их минерализацию за счет аккумуляции растворенного кальция и фосфора [170]. Динамика клеточно-опосредованной вызываемой КФБ кальцификации может также варьировать от суток [27, 43, 84] до 28 дней [29].

Несмотря на доказанную токсичность КФБ для эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клеток, их роль в нарушении сосудистого гомеостаза остается в значительной степени нерасшифрованной. В частности, остается неизвестным их влияние на некоторые клеточные популяции адвентиции (лимфоциты, фибробласты, первичные адвентициальные макрофаги), а также на периваскулярные адипоциты. Отсутствие транскриптомного или протеомного профилирования первичных сосудистых клеточных линий при воздействии на них КФБ ограничивает понимание специфичности и других характеристик молекулярного ответа на эти частицы. Неясно, вызывает ли воздействие КФБ повышение экспрессии способствующих прикреплению лейкоцитов молекул клеточной адгезии на плазматической мембране эндотелиальных клеток,

нарушение эндотелиальной механотрансдукции или развитие феноменов трансдифференцировки, к примеру, эндотелиально-мезенхимального перехода или перехода гладкомышечных клеток в миофибробласты, макрофаги или остеобласты. Также остается совершенно неисследованным изменение профиля секретлируемых в микроокружение внеклеточных везикул сосудистыми клетками под воздействием КФБ.

Резюме

К настоящему времени накоплено достаточное количество данных о функционировании системы минерального гомеостаза, обеспечивающей предотвращение эктопической кальцификации в организме человека. Доказано, что равновесие в этой системе поддерживается за счет целого ряда белков-ингибиторов, регулирующих костную резорбцию, связывающих свободные ионы кальция или нейтрализующие сформированные соединения фосфата кальция. Решающая роль в этом процессе принадлежит обладающему наибольшей авидностью и аффинностью к фосфату кальция фетуину-А, а также связывающему ионы кальция с низкой аффинностью, но присутствующему в чрезвычайно большом количестве в крови альбумину.

В случае неспособности системы минерального гомеостаза справиться с перенасыщением кальция и фосфора в крови при помощи связывания соответствующих ионов или нейтрализации фосфата кальция посредством образования субнаноразмерных кластеров в действие вступает еще один ключевой механизм поддержания фосфорнокальциевого гомеостаза – формирование КФБ. Данный механизм по своим возможностям депонирования кальция и фосфора не уступает субнаноразмерной кластеризации; в то же время, в отличие от этого механизма, КФБ не являются безвредными, обладая существенным повреждающим действием на эндотелий.

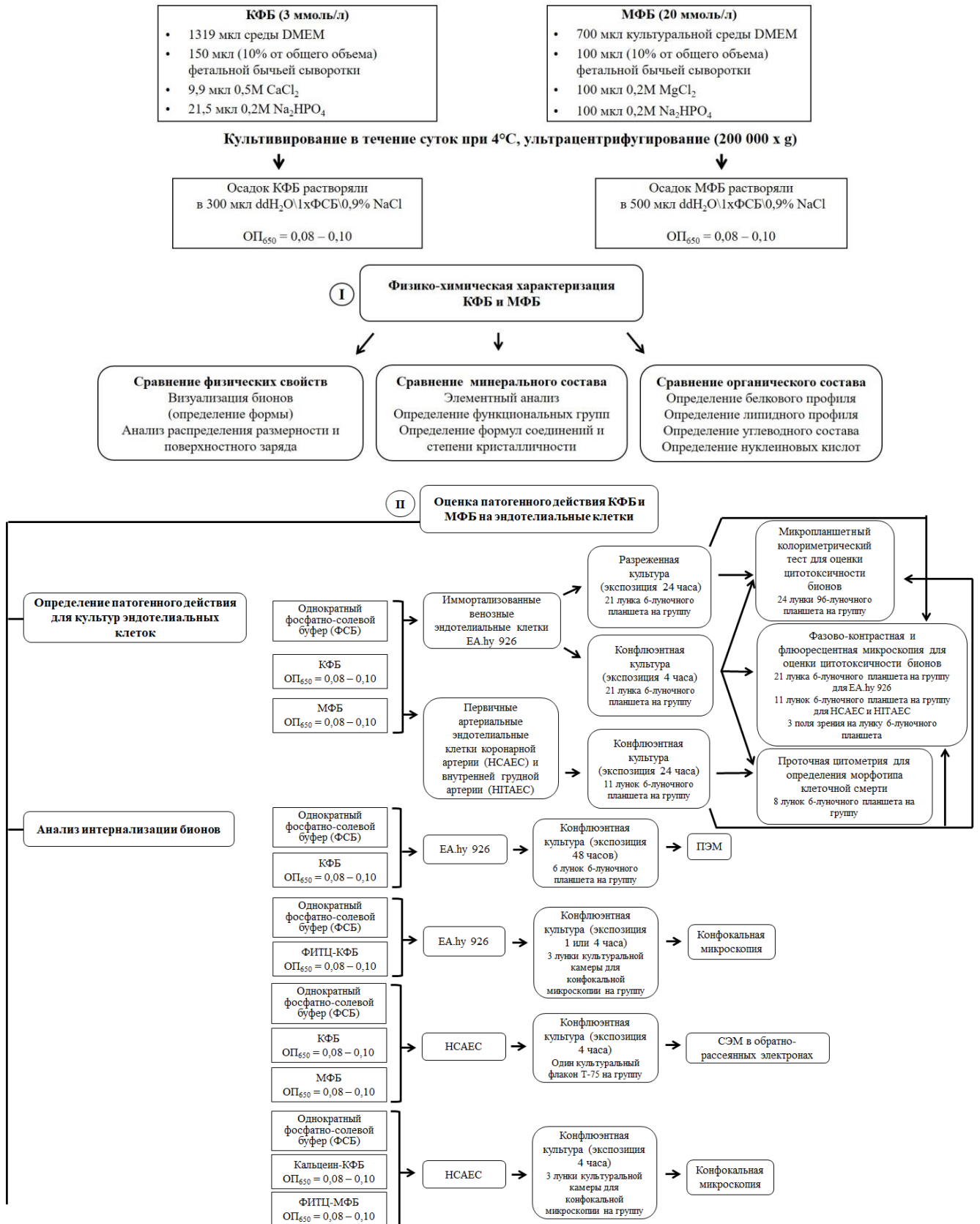
Морфологическим субстратом этого феномена является интернализация КФБ эндотелиальными клетками, что вызывает как их гибель по внутреннему пути апоптоза либо имеющим с ним общие эффекторные белки путям клеточной смерти, так и усиливает выделение провоспалительных цитокинов, что паракринно способствует созданию патологически измененного микроокружения и развитию дисфункции эндотелия. В конечном счете это может привести к нарушению целостности эндотелия, которое является доказанным пусковым фактором этиопатогенеза атеросклероза. Последствием вызванного воздействием КФБ повреждения эндотелия может быть формирование неоинтимы, являющееся неотъемлемым звеном патогенеза атеросклероза и морфологическим субстратом развития стеноза. В ряде исследований было показано, что КФБ также способны стимулировать выделение гладкомышечными клетками провоспалительных цитокинов в микроокружение и запускать сдвиг их фенотипа с контрактильного на остеогенный, однако остается неясным, насколько полученные на клеточных культурах данные релевантны происходящему *in vivo* сценарию.

Клиническая актуальность КФБ как звена патогенеза связанных с дисфункцией эндотелия заболеваний обусловлена возможностью их измерения в сыворотке крови при помощи проточной цитометрии или склонности сыворотки крови к их формированию при помощи микропланшетной турбидиметрии. Последние клинико-эпидемиологические работы предоставили достаточно убедительные данные о том, что повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ связана с увеличенным риском острых сердечно-сосудистых событий, сердечно-сосудистой смерти и, следовательно, неблагоприятным прогнозом как у пациентов с хронической почечной недостаточностью на разных стадиях, так и у других когорт, к примеру, у больных артериальной гипертензией. Кроме того, пациенты с острым коронарным синдромом и без выраженной хронической почечной недостаточности характеризуются более высоким содержанием КФБ в сыворотке крови, чем аналогичные больные со стабильной стенокардией, что может отражать связь КФБ с прогнозом ишемической болезни сердца и без почечной коморбидности. Относительный успех клинического

испытания по эффективности динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в профилактике острых сердечно-сосудистых событий после инфаркта миокарда, в особенности у больных сахарным диабетом и пациентов с заболеваниями периферических артерий, позволяет также осуществлять фармакологическое воздействие на КФБ как звено патогенеза, хотя низкая биодоступность данного химического соединения при пероральном применении существенно ограничивает возможности его клинического использования.

Несмотря на убедительные доказательства патогенного действия КФБ на эндотелий, остается неизвестным, чем обусловлено это явление – специфическим химическим составом КФБ или их корпускулярной природой, общей для всех типов эндогенных наночастиц и многих вводимых в кровь наноразмерных средств таргетной доставки лекарственных препаратов [12, 130]. Для получения ответа на данный вопрос представляется необходимым решить задачу искусственного синтеза «идеальной группы сравнения» – наночастиц, которые бы не могли быть синтезированы эндогенно в условиях человеческого организма, но которые бы не отличались от КФБ ничем, кроме собственно составляющих их минералов. Было предположено, что в качестве подобной группы сравнения могут выступить магний-фосфатные бионы (МФБ), поскольку: 1) по литературным данным МФБ наиболее близки к КФБ по размерности и форме [22]; 2) МФБ не способны образовываться в организме человека вследствие кратно превышающей летальную дозы ионов магния (Mg^{2+}), необходимой для их синтеза. Таким образом, использование МФБ в качестве контрольной группы позволяет надежно дифференцировать механизм патогенного действия КФБ на эндотелий и сопоставить его с происходящим *in vivo* сценарием. В то же время эта гипотеза нуждается в экспериментальной проверке.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



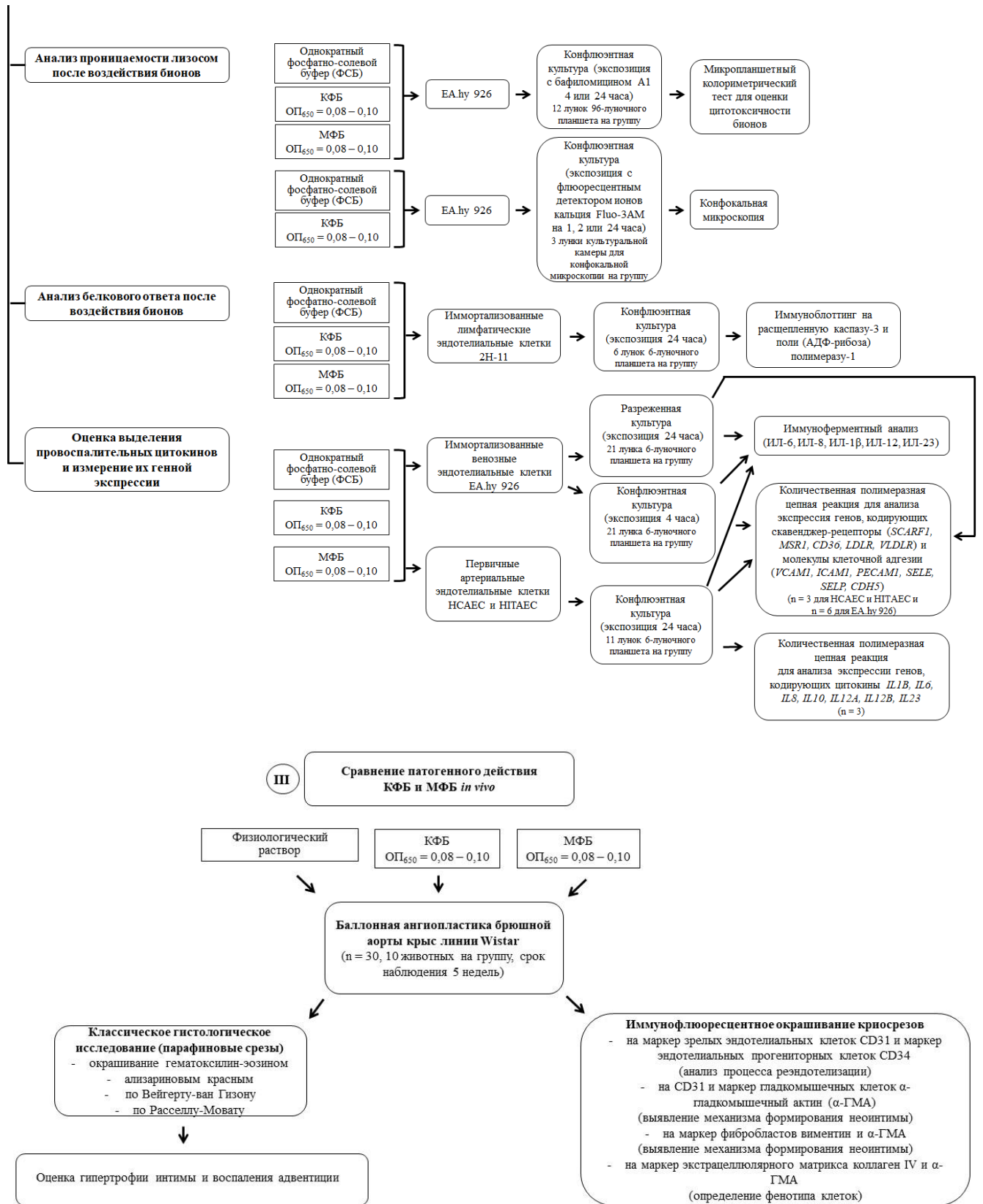


Рисунок 4 – Дизайн изучения механизма патогенного действия КФБ на эндотелий в сравнении с МФБ для определения их роли в развитии атеросклероза

2.1 Искусственный синтез КФБ и МФБ

Все эксперименты по искусственному синтезу бионов были проведены в стерильных условиях. КФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М CaCl₂ (Sigma-Aldrich, 21115) и 21,5 мкл 0,2М Na₂HPO₄ в 1319 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). МФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М MgCl₂ (Sigma-Aldrich, 63069) и 100 мкл 0,2М Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, 94046) в 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco, 41966029), содержащей 100 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Для синтеза КФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 3 миллимоль, а для МФБ – 20 миллимоль. Контроль pH осуществлялся путем предварительного добавления 5 мл N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо кислоты (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco, 15630056) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация в среде – 1%). После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов были инкубированы при +37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo) в течение 24 часов с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и +4°C в течение 1 часа (Optima MAX-XR, Beckman Coulter), что позволило обеспечить осаждение бионов всего спектра размерности. С целью получения рабочего раствора осадок КФБ растворялся в 300 мкл, а осадок МФБ – в 500 мкл бидистиллированной воды (для анализа физико-химических свойств бионов), однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4, Gibco, 10010023 – для проведения экспериментов с клеточными культурами) либо 0,9% NaCl (для проведения экспериментов на лабораторных животных), что позволяло достичь оптической плотности (ОП) в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой величиной концентрации бионов в растворе [22].

Измерение ОП проводилось на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм (ОП₆₅₀, мутность суспензии 0,5 МкФ соответствовала значениям оптической плотности 0,08 – 0,10). В случае необходимости получения сухого порошка для экспериментов раствор КФБ или МФБ замораживался при -40°C (Sanyo) и лиофилизировался в течение суток (FreeZone Plus 2.5, Labconco). Дизайн эксперимента представлен на рисунке 4.

2.2 Сравнение физических свойств КФБ и МФБ

2.2.1 Визуализация частиц

Визуализация бионов была проведена посредством СЭМ, ПЭМ и АСМ. Для СЭМ несколько капель суспензии КФБ или МФБ были помещены на стекло для микроскопии (Thermo Scientific) и высушены в течение 2 часов при 37°C. Далее образец был помещен на углеродный скотч и напылен золотом и палладием (толщина напыления 10-15 нм, EM ACE200, Leica), с дальнейшим выполнением непосредственно СЭМ (Hitachi SU8220, Hitachi). Для ПЭМ несколько капель суспензии КФБ или МФБ были помещены на медную сеточку с углеродным напылением с последующим проведением непосредственно ПЭМ (JEM-2100, Jeol). Для АСМ несколько капель суспензии КФБ или МФБ были помещены на диск из слюды с дальнейшим проведением непосредственно АСМ (Cypher, Asylum Research).

2.2.2 Определение распределения размерности и поверхностного заряда частиц

Распределение размерности и поверхностный заряд (дзета-потенциал) КФБ и МФБ были определены при помощи динамического и электрофоретического рассеяния света соответственно (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Перед измерением суспензия бионов была термостатирована при 25°C в течение 10 минут. Все измерения были выполнены трижды (30 последовательных сканирований на измерение) с дальнейшим расчетом среднего распределения.

2.3 Сравнение минерального состава КФБ и МФБ

2.3.1 Элементный анализ

Элементный анализ был проведен методами энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии и CHNSO-анализа. Для определения химических элементов, входящих в состав бионов был проведен элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (XFlash® 4010, Bruker) путем нанесения нескольких капель суспензии КФБ или МФБ на углеродный скотч и высушивания в течение 2 часов при 37°C. Для каждого образца были определены три квадранта с четко визуализируемыми бионами с последующим расчетом среднего атомного процента для каждого элемента. Атомно-эмиссионная спектроскопия лиофилизированного порошка КФБ или МФБ была проведена после его

растворения в азотной кислоте (HNO_3) в течение 1 часа при 80°C . CHNSO-анализ был проведен посредством каталитического окисления бионов при 1060°C .

2.3.2 Определение функциональных групп

Функциональные группы соединений, из которых состоят бионы, были определены методами инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (Инфралюм ФТ-801, Симэкс, разрешение 4 см^{-1} на длинах волн от $4,000\text{ см}^{-1}$ до 500 см^{-1}) и спектроскопии комбинационного рассеяния света (LabRam HR800, Horiba Scientific, разрешение $0,222\text{ см}^{-1}$ на от $4,000\text{ см}^{-1}$ до 100 см^{-1}). Каждый представленный спектр был рассчитан как среднее 25 последовательных сканирований лиофилизированного порошка КФБ или МФБ.

2.3.3 Определение химических соединений и степени кристалличности

Химические соединения, входящие в состав бионов, были определены путем анализа лиофилизированного порошка КФБ или МФБ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии (Bruker D8 ADVANCE, Bruker) с медной рентгеновской трубкой при 40 кВ. Дифрактометрия проводилась по 2θ углу от 20 до 120 градусов при скорости в 0,02 градуса в секунду. Полученные спектры сравнивались с базой Объединенного комитета порошковых дифракционных стандартов для идентификации химической формулы соединений. Кроме того, при помощи этого же метода посредством

сопоставления ширины получаемых пиков было проведено сравнение степени кристалличности КФБ и МФБ.

2.4 Сравнение органического состава КФБ и МФБ

2.4.1 Определение белкового профиля

Белки, входящие в состав бионов, были определены методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра (AgNO_3). Аликвоты одинакового объема (20 мкл) суспензий КФБ или МФБ с оптической плотностью 0,5 МкФ были смешаны с буфером Лэммли (Sigma, S3401) в отношении 4:1 и затем загружены на 1 мм NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris гель (Invitrogen, NP0321BOX). В качестве положительного контроля и маркера молекулярной массы белков был использован белковый стандарт Precision Plus (Bio-Rad, 1610374). Белки разделяли при 100 В в течение 1 ч. Гель был окрашен при помощи набора SilverQuest (Invitrogen, LC6070) в соответствии с инструкциями производителя. При появлении полос добавлялся стоп-раствор (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в концентрации 39 мМ). Гели были сфотографированы с использованием сканера HP Scanjet Enterprise Flow (Hewlett Packard).

2.4.2 Определение липидного профиля

Липиды были выделены из суспензий КФБ и МФБ по методу Фолча с использованием традиционного протокола и детектированы методом газовой хромато-масс-спектрометрии, которая была проведена в соответствии с ГОСТ 30418-96 «Метод определения жирнокислотного состава» с использованием капиллярной колонки MDN-1 (твердосвязанный метилсиликон, 30 м x 0,25 мм, Sigma-Aldrich, 23312) и газового хромато-масс-спектрометра GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) в соответствии со следующими параметрами: объем инжектора 1 мкл, температура инжектора 200°C, деление потока 1:10, температура интерфейса 210°C, температура детектора 200°C, скорость потока газа-носителя (He) 0,8 мл/мин, температурная программа: 100°C в течение 2 мин, 5°/мин до 120°C, 20°/мин до 260°C, затем 260°C в течение 2 мин. Были идентифицированы массы от 1,5 до 1,900 m/z (отношение массы к заряду).

2.4.3 Определение углеводов

Массовая доли углеводов в суспензиях КФБ и МФБ была определена в соответствии с ГОСТ Р 54667-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров».

2.4.4 Определение нуклеиновых кислот

Выделение ДНК и РНК из суспензий КФБ и МФБ было проведено фенол-хлороформным и тризольным методами по классическому протоколу.

Качественную оценку содержания ДНК и РНК (аликвоты по 20 мкл) осуществляли методом электрофореза (115 В) в 1% агарозном геле (1 г агарозы (Sigma, A9539) на 100 мл однократного трис-ацетатного буфера (B49, Thermo Scientific), содержащего 4 мкл бромистого этидия (Invitrogen, 15585011). Количественную оценку содержания ДНК и РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific).

2.5 Оценка патогенного действия КФБ и МФБ на эндотелий *in vitro*

Дизайн экспериментов представлен на рисунке 4.

2.5.1 Культивирование эндотелиальных клеточных линий

Для экспериментов была использована культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, предоставленная Dr. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill, США), культура иммортализованных лимфатических эндотелиальных клеток мыши линии 2H-11 (American Tissue Culture Collection, CRL-2163), а также коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC, 300K-05a) и первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (HITAEC, 308K-05a) (Cell Applications).

Клеточная линия EA.hy 926 является гибридомой, полученной путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549, и сохраняет основные

морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека [59]. Клеточная линия 2H-11 была получена путем иммортализации первичной культуры лимфатических эндотелиальных клеток мыши вирусом SV40 и также сохраняет основные морфологические и функциональные особенности лимфатических эндотелиальных клеток. Данные клеточные линии культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, 11320074), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 2% гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco, 21060017), 1% N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо кислоты (Gibco, H3537), а также антибиотик-антимикотик (Gibco, 15240062), содержащий 10,000 ЕД/мл пенициллина, 10,000 мкг/мл стрептомицина (1% L-глутамин-пенициллин-стрептомицин) и 25 мкг/мл амфотерицина В.

Первичные эндотелиальные клетки человека были получены из здоровых артерий доноров (НСАЕС – мужчина, 27 лет; НИТАЕС – мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на 2-м пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications, 212K-500), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида). Для проведения эксперимента клетки были разморожены и культивированы согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). Пересев производился по достижении 80% конфлюэнтности.

После 4-5 пассажей клетки были рассеяны в лунки 6-луночного (Techno Plastic Products, 92006) или 96-луночного культурального планшета (Techno Plastic Products, 92096), культуральные флаконы Т-75 (Techno Plastic Products, 90076) или культуральные камеры для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841) для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводились в стерильных условиях при 37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo).

2.5.2 Определение патогенного действия КФБ и МФБ для культур эндотелиальных клеток

Повреждающее действие бионов для культур эндотелиальных клеток человека было изучено при помощи добавления суспензии КФБ или МФБ (100 мкл на лунку 6-луночного планшета или 10 мкл на лунку 96-луночного планшета в зависимости от эксперимента, 0,5 МкФ) к: 1) клеточным культурам линии EA.hy 926 (около 40% конфлюэнтности в культуральной посуде (разреженная культура) и культивирование в течение 24 часов либо около 90% конфлюэнтности в культуральной посуде (конфлюэнтная культура) и культивирование в течение 4 часов); 2) вышеописанным первичным культурам артериальных эндотелиальных клеток (около 85% конфлюэнтности в культуральной посуде, культивирование в течение 24 часов). В качестве контрольной группы использовали те же линии клеток, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

Цитотоксичность бионов была оценена при помощи микропланшетного колориметрического теста (набор ab112118, 24 лунки 96-луночного планшета на группу) и сочетанного окрашивания клеток флюоресцентными красителями Hoechst 33342 (2 мкл/мл, Invitrogen, H3570) и бромистым этидием (10 мкл/мл, Invitrogen, 15585011) с дальнейшей фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопией. При экспериментах с клетками линии EA.hy 926 количество исследуемых лунок 6-луночного планшета на группу составляло 21, при экспериментах с первичными артериальными эндотелиальными клетками – 11 (подсчитывались клетки в 3 полях зрения на лунку). Посредством проточной цитометрии (набор ab14085, 8 лунок 6-луночного планшета на группу) был оценен морфотип клеточной смерти (апоптотический морфотип – аннексин V-положительные и пропидия йодид-отрицательные клетки, некротический морфотип – аннексин V-положительные и пропидия йодид-положительные клетки) под воздействием бионов.

2.5.3 Анализ интернализации бионов эндотелиальными клетками

Для оценки собственно феномена интернализации бионов эндотелиальными клетками к клеточной линии EA.hy 926 в 6-луночных планшетах ($2 \cdot 10^5$ клеток на лунку, один планшет на группу) была добавлена суспензия КФБ либо аналогичный объем чистого ФСБ (100 мкл, 0,5 МкФ) на 48 часов, после чего была проведена трипсинизация в течение 10 минут. После центрифугирования и однократной отмывки ФСБ была выполнена фиксация клеток в 2,5% глутаровом альдегиде (Sigma-Aldrich, G6257) в течение 1 часа, трехкратная отмывка в 0,1М фосфатном буфере (12 г/л NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, S5011) и 36 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 71650), pH 7,4) и постфиксация в 1% тетраоксиде осмия (Sigma-Aldrich, 75633) в течение 1 часа. После трехкратной отмывки в вышеуказанном в 0,1М фосфатном буфере клетки были заключены в 2% агарозу (Sigma, A9539), обезвожены в этаноле возрастающей концентрации (70%, 80% и трижды 95% по 15 минут), помещены в смесь эпоксидной смолы (собственно эпоксидная смола Araldite M – Sigma-Aldrich, 10951, катализатор для эпоксидной среды – 45348, отвердитель эпоксидной среды – 45346) и ацетона (соотношение 1:1) на 2 часа, инкубированы в чистой эпоксидной смоле в течение ночи и затем заключены в свежую эпоксидную смолу. После нарезки эпоксидных блоков на ультрамикротоме (LKB Bromma Nova Ultra, LKB) срезы были помещены на медные сеточки с углеродным напылением (3520C-FA, SPI), окрашены 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, 22400) и контрастированы цитратом свинца по Рейнольдсу (водный раствор, приготовленный на основе 3% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich, 228621) и $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Sigma-Aldrich, W302600)). Визуализация результата была проведена при помощи ПЭМ (JEM-2100, Jeol).

С целью подтверждения результатов ПЭМ осадок КФБ после ультрацентрифугирования ресуспендировали в меченном флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) альбумине (Invitrogen, A23015) в течение 1 часа, после чего снова ультрацентрифугировали при 200,000 x g в течение 1 часа и

добавляли 25 мкл суспензии ФИТЦ-КФБ либо аналогичный объем чистого ФСБ к клеткам линии EA.hy 926, культивированным в культуральных камерах для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841) на 1 или 4 часа с последующим добавлением лизосомального красителя LysoTracker Red (Invitrogen, L7528, 500 наномоль) на 30 минут, ядерного красителя Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) на 15 минут и конфокальной микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss).

Для оценки интернализации КФБ и МФБ к первичным эндотелиальным клеткам коронарной артерии человека, культивированным во флаконах T-75 ($8,4 \cdot 10^6$ клеток на флакон, один флакон на группу), была добавлена суспензия КФБ, МФБ или аналогичный объем чистого ФСБ (1000 мкл, 0,5 МкФ) на 4 часа, после чего проводили трипсинизацию в течение 10 минут. После центрифугирования и однократной отмывки ФСБ была выполнена фиксация клеток в 2,5% глутаровом альдегиде (Sigma-Aldrich, G6257) в течение 1 часа и трехкратная отмывка в вышеуказанном 0,1М фосфатном буфере. При последней отмывке суспензия клеток каждой группы была разделена на четыре равные объемные части (для дальнейшего получения 4 эпоксидных блоков на группу). После отмывки была проведена постфиксация в 2% фосфатно-солевом растворе тетраоксида осмия (Sigma-Aldrich, 75633) в течение 12 часов с последующим окрашиванием в 2% водном растворе тетраоксида осмия в течение 24 часов. Далее клетки были обезвожены в этаноле возрастающей концентрации: 50, 60, 70, 80%-ный этанол - все по две смены, каждая смена по 15 минут, 95%-ный этанол – 15 минут, 95%-ный этанол + 2% уранилацетат – 5 часов, 99,7%-ный изопропанол, ацетон. После дегидратации образцы были помещены в смесь вышеуказанного рабочего раствора эпоксидной смолы и ацетона (соотношение 1:1) на 6 часов, затем инкубированы в чистой эпоксидной смоле в течение 12 часов и заключены в свежую эпоксидную смолу с последующей шлифовкой и полировкой полимеризованных при 60°C эпоксидных блоков до собственно образца. Контрастирование цитратом свинца по Рейнольдсу выполнялось в течение 7 минут путем нанесения на поверхность шлифованного образца с последующей отмывкой эпоксидного блока бидистиллированной водой. Далее было проведено

напыление эпоксидных блоков углеродом (толщина напыления 10-15 нм, EM ACE200, Leica) и выполнена собственно визуализация образцов при помощи СЭМ в обратно-рассеянных электронах с напряжением 10 кВ (Hitachi S-3400N, Hitachi).

С целью подтверждения полученных результатов, осадок МФБ после ультрацентрифугирования был ресуспендирован в меченном ФИТЦ альбумине (Invitrogen, A23015), а осадок КФБ – в кальцеине (Sigma-Aldrich, C0875) в течение 1 часа, после чего проводили ультрацентрифугирование при 200,000 x g (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) в течение 1 часа с последующей трехкратной отмывкой в ФСБ. Далее 25 мкл суспензии ФИТЦ-МФБ, кальцеин-КФБ или чистого ФСБ были добавлены к первичным эндотелиальным клеткам коронарной артерии человека в культуральные камеры для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841) на 4 часа с последующим добавлением лизосомального красителя LysoTracker Red (500 наномоль, Invitrogen, L7528) на 30 минут, ядерного красителя Hoechst 33342 (2 мкл/мл, Invitrogen, H3570) на 15 минут и дальнейшей конфокальной микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss).

2.5.4 Анализ проницаемости лизосом

Для анализа влияния ацидификации лизосом на цитотоксичность бионов в культурам клеток линии EA.hy 926 в 96-луночных планшетах (80-85% конфлюэнтности) была добавлена суспензия КФБ или МФБ либо аналогичный объем чистого ФСБ (10 мкл, 0,5 МкФ, 12 лунок на группу) на 4 или 24 часа с добавлением или без добавления специфичного ингибитора вакуолярной H⁺-АТФазы бафиломицина А1 (0,1 или 1 микромоль, Abscam, ab120497), растворенного в диметилсульфоксиде (конечная концентрация диметилсульфоксида в среде 0,6%, Sigma-Aldrich, D4540). Пролиферация и жизнеспособность клеток была оценена при помощи микропланшетного

колориметрического теста путем добавления реактива ab112118 (Abcam) на 4 часа с последующими измерениями (УНИПЛАН/АИФР-01, Пикон) и расчетами согласно протоколу производителя.

Для оценки перехода ионов кальция из лизосом в цитозоль к клеткам линии EA.hy 926 в культуральные камеры для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841) было внесено 25 мкл суспензии КФБ либо аналогичный объем чистого ФСБ на 1, 2 или 4 часа с добавлением флюоресцентного детектора ионов кальция Fluo-3 AM (5 микромоль, Invitrogen, F1242) на 1 час, лизосомального красителя LysoTracker Red (500 наномоль, Invitrogen, L7528) на 30 минут и ядерного красителя Hoechst 33342 (2 мкл/мл, Invitrogen, H3570) на 15 минут с последующей конфокальной микроскопией.

2.5.5 Иммуноблоттинг

После добавления равных концентраций КФБ, МФБ или чистого ФСБ (100 мкл, 0,5 МкФ, один 6-луночный планшет на группу) к культурам клеток линии 2H-11 (80-85% конfluence) на 24 часа и отмывки от остаточной культуральной среды охлажденным ФСБ было проведено выделение белка посредством добавления к клеткам 1 мл RIPA-буфера (Thermo Scientific, 89901), дополненного коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, 78446). Для определения экспрессии белков и детекции посттрансляционных модификаций методом иммуноблоттинга 10 мкл белка (на каждую группу) были смешаны с буфером Лэммли (Sigma, S3401) в отношении 1:1 и после нагревания в кипящей воде в течение 5 минут загружены на 12-луночный гель NuPAGE® толщиной 1 мм, содержащий 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, NP0321BOX). В качестве маркера молекулярных масс был применен белковый стандарт Precision Plus (Bio-Rad, 1610374). Белки были разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в

присутствии додецилсульфата натрия при 100 В в течение 1 часа, перенос белков на мембрану осуществлялся при 30 В в течение 90 минут при 4°C. Блоттинг был проведен с антителами к расщепленной каспазе-3 (cleaved caspase-3, Abcam, ab49822) и cPARP-1 (Abcam, ab194586). В качестве контроля загрузки (белка «домашнего хозяйства») был использован гистон H3 (Abcam, ab12079). Для хемилюминесцентной детекции результата были использованы конъюгированные с пероксидазой хрена козьиные противокроличьи вторичные антитела (Abcam, ab205718). Белки были визуализированы с использованием реагента для детекции Amersham ECL Prime (Sigma, GERPN2232) и цифрового сканера хемилюминесцентных блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Количественный анализ снимков хемилюминесцентных гелей был проведен при помощи стандартного алгоритма в программе ImageJ (National Institutes of Health).

2.5.6 Оценка выделения провоспалительных цитокинов

По завершении инкубации при выполнении эксперимента по анализу цитотоксичности бионов из лунок (21 на группу при экспериментах с клетками линии EA.hy 926 и 11 на группу при экспериментах с первичными артериальными эндотелиальными клетками) была забрана культуральная среда, которая была разделена на аликвоты объемом 400-500 мкл по 4 пробиркам емкостью 1,5 мл (Eppendorf) с дальнейшим хранением при температуре -40°C до измерения профиля секретлируемых клетками провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β , ИЛ-12, ИЛ-23) методом иммуноферментного анализа посредством соответствующих наборов компании Abcam (ab46027, ab46032, ab46052, ab46143, ab64708) в соответствии с инструкциями производителя. Выбор указанных цитокинов был обусловлен их секрецией эндотелиальными клетками и центральной ролью в развитии атеросклероза [131, 132]. Каждая аликвота

культуральной среды была разморожена и использована для анализа не более одного раза. Измерение результата было проведено на микропланшетном спектрофотометре (УНИПЛАН/АИФР-01, Пикон) на длине волны 450 нм.

2.5.7 Измерение генной экспрессии

Непосредственно после окончания культивирования при выполнении эксперимента по анализу цитотоксичности бионов из лунок было проведено выделение тотальной РНК (три биологические репликаты на группу, каждая из которых содержала РНК из 6 лунок (EA.hy 926) или 3 лунок (HCAEC и HITAEC) одного планшета). Выделение РНК из клеточных суспензий было выполнено с помощью наборов RNeasy Plus (Qiagen, 73404) для конфлюэнтной культуры линии EA.hy 926 и PicoPure (Applied Biosystems, KIT0214) для культур HCAEC и HITAEC в соответствии с инструкциями производителя, а также с помощью тризола (Invitrogen, 15596018) по стандартному протоколу [42] с последующим осаждением РНК ацетатом натрия для разреженной культуры EA.hy 926. Целостность РНК была проверена электрофорезом образцов в 3% агарозном геле с последующей визуализацией с помощью системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Выделенную РНК хранили до следующего этапа эксперимента при температуре -60°C (Sanyo).

На основе выделенной РНК посредством обратной транскрипции был проведен синтез одноцепочечной кДНК при помощи набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814) согласно инструкции производителя на термоциклере Veriti (Applied Biosystems). Концентрация и качество нуклеиновых кислот оценены при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) путем измерения поглощения света при длинах волн 280

нм, 260 нм и 230 нм и расчета соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20°C (Sanyo).

Экспрессия генов, кодирующих цитокины (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *IL12A*, *IL12B*, *IL23*), скавенджер-рецепторы (*SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*) и молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP*, *CDH5*), была измерена посредством количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени с флюоресцентным красителем SYBR Green на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems). Праймеры были разработаны с использованием баз данных для поиска праймеров PrimerBank [127] и RTPrimerDB [139] и мануального скрининга в Google с последующей проверкой их качества в программах PRaTo [123] и PCR Primer Stats [157]. Синтез праймеров был выполнен ЗАО «Евроген» (Москва).

Для проведения количественной полимеразной цепной реакции была приготовлена реакционная смесь общим объемом 10 мкл, содержащую 5 мкл мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, A25777), по 500 наномоль прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. Реакцию проводили в стандартном 96-луночном оптическом планшете, содержащем, помимо 26 анализируемых образцов, 5 стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь, не содержащая кДНК). На каждый тестируемый образец, стандарт и отрицательный контроль были сделаны по три технические репликаты. Амплификацию осуществляли в течение 45 циклов по следующей схеме: денатурация – 15 секунд при 95°C , отжиг – 15 секунд при $52-56^{\circ}\text{C}$, элонгация – 1 минута при 72°C с последующей проверкой специфичности реакции посредством построения и анализа кривых плавления. Нормализация результатов была проведена с помощью трех референтных генов (генов «домашнего хозяйства») *ACTB*, *GAPDH* и *B2M* в соответствии с общепринятыми на настоящий момент рекомендациями [95]. Оценка эффективности реакции была осуществлена путем анализа графиков амплификации и стандартных кривых в программе QuantStudio Real-Time PCR Software v. 1.3 (Applied Biosystems).

2.6 Сравнение патогенного действия КФБ и МФБ на эндотелиальные клетки *in vivo*

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных [78].

Дизайн эксперимента представлен на рисунке 4. Эксперимент был выполнен на самцах крыс линии Wistar ($n = 30$) весом 200-300 г с использованием модели ангиопластики брюшной аорты баллоном для коронарной ангиопластики [2]. После введения в анестезию 3% изофлураном все животные получали ингаляционную анестезию 2% изофлураном в течение всего времени операции. Животных фиксировали в положении лежа на спине с последующей стрижкой шерсти на поверхности брюшной стенки и обработкой операционного поля 70% этанолом. Затем выполняли полную срединную лапаротомию. После изолирования полости брюшины салфетками петли кишечника отводили вправо и заворачивали в предварительно увлажненную и согретую салфетку. Вдоль корня брыжейки вскрывали задний листок брюшины и выделяли аорту от уровня почечных артерий до бифуркации. На аорту дистальнее почечных артерий и на уровне бифуркации аорты накладывали два сосудистых зажима типа «бульдог». При этом одновременно пережималась аорта и нижняя полая вена. На 3 мм проксимальнее бифуркации аорты ее пунктировали в проксимальном направлении иглой 21G с заведением баллона для коронарной ангиопластики в просвет сосуда. Затем проводили ангиопластику давлением инфляции 6 атм в течении 30 секунд. После этого баллон извлекали, просвет аорты промывали 0,9% NaCl и накладывали П-образный шов (Prolene 8-0). Место повреждения эндотелия после проведения ангиопластики находилось на 4 мм проксимальнее П-образного шва. Петли кишечника укладывали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку послойно ушивали непрерывным обвивным швом (Лавсан 4-0). Непосредственно перед ушиванием брюшную полость заполняли подогретым до 37°C 0,9% NaCl. Для изучения патогенного действия бионосов на интиму и

адвентицию аорты крыс суспензия КФБ или МФБ (900 мкл, 0,5 МкФ) или такой же объем стерильного 0,9% NaCl однократно вводилась в хвостовую вену (по 10 животных на группу). Все процедуры проводили в стерильных условиях. После операции животных помещали в клетку на теплую подстилку, осмотр крыс проводился ежедневно.

Вывод животных из эксперимента после оперативного вмешательства проходил через пять недель с последующей эксплантацией поврежденного участка брюшной аорты, который разрезали на два равных сегмента – один фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов при 4°C с последующей заливкой в парафин, а второй замораживали при -140°C (Sanyo).

Для изучения эксплантированных аорт были сделаны циркулярные срезы толщиной 8 мкм (12 серийных срезов, равномерно распределенных по всей длине соответствующего сегмента аорты, на стекло) и проанализированы: 1) классическими гистологическими методами (окраской гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату) при помощи световой микроскопии (AxioImager.A1, Carl Zeiss); 2) иммунофлюоресцентным окрашиванием (сочетанное окрашивание на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 (Abcam, ab119339) и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34 (Abcam, ab81289), на CD31 и маркер гладкомышечных клеток α -гладкомышечный актин (α -ГМА, Abcam, ab5694), на маркер фибробластов виментин (Abcam, ab7752) и α -ГМА, на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа (Abcam, ab6586) и α -ГМА, после всех окрасок проводили контрастирование ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI)) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss). Было оценено наличие или отсутствие воспалительной инфильтрации и гипертрофии интимы, отношение наиболее толстого участка интимы к наиболее тонкому для количественной оценки гипертрофии интимы, а также число и площадь скоплений лимфоцитов для

количественной оценки воспаления адвентиции в программе ImageJ (National Institutes of Health).

2.7 Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism (GraphPad Software). Тип распределения полученных данных определялся по критериям Андерсона-Дарлинга, д'Агостино-Пирсона, Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова (распределение считалось нормальным лишь при положительном результате по всем четырем критериям). Межгрупповое сравнение проводилось посредством однофакторного дисперсионного анализа (при нормальном распределении) или критерия Краскела-Уоллиса (при отличном от нормального распределении), в случае выявления статистически значимых различий между группами осуществлялось последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Тьюки или критерия Данна соответственно. Различия между группами признавались статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$. Экспрессия изучаемых генов рассчитывалась по методу Pfaffl [120] и выражалась на логарифмической шкале в виде кратности изменения относительно контрольных культур эндотелиальных клеток.

ГЛАВА 3 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МФБ КАК ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ

Несмотря на ряд опубликованных работ, продемонстрировавших цитотоксическое и, в частности, эндотелиотоксическое действие КФБ [10, 27, 71, 122], оставалось неясно, обусловлено оно их химическим составом (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит) или физической сущностью (наночастицы сферической формы и кристаллической структуры). С целью решения данной проблемы была синтезирована «идеальная группа сравнения» – МФБ, поскольку: 1) МФБ не способны образовываться в организме человека вследствие кратно превышающей летальную дозы ионов магния (Mg^{2+}), необходимой для их синтеза; 2) по литературным данным МФБ наиболее близки к КФБ по размерности и форме [22].

Идентичность морфологических свойств бионов является одним из ключевых факторов, позволяющих осуществлять адекватное сравнение их патогенного действия, поскольку ранее было выявлено, что КФБ диаметром более 300 нм обладают большей цитотоксичностью в сравнении с КФБ диаметром менее 300 нм [122], а игольчатые КФБ токсичнее сферических [171]. Поэтому с целью оценки размерности и формы МФБ и КФБ были проведены СЭМ, ПЭМ и АСМ. Результаты, полученные при использовании трех методов визуализации, показали, что как МФБ, так и КФБ представляют собой сферические частицы губчатой структуры диаметром 80-200 нм и средним диаметром около 120 нм, способные формировать кластеры из нескольких частиц (рисунок 5 – 7), что соответствует ранее полученным данным в отношении КФБ, выделенным из атеросклеротических бляшек, а также подтверждает результаты проведенных ранее экспериментов по искусственному синтезу КФБ [10].

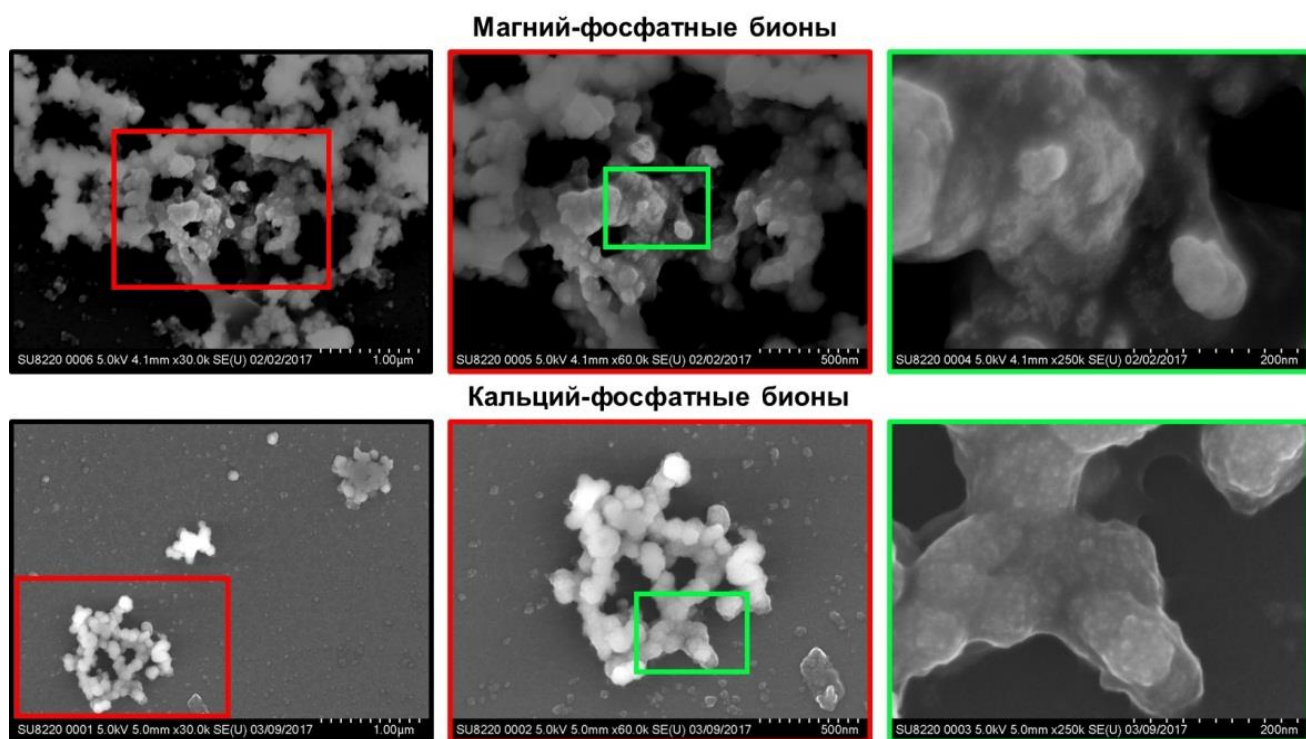


Рисунок 5 – Сканирующая электронная микроскопия МФБ и КФБ

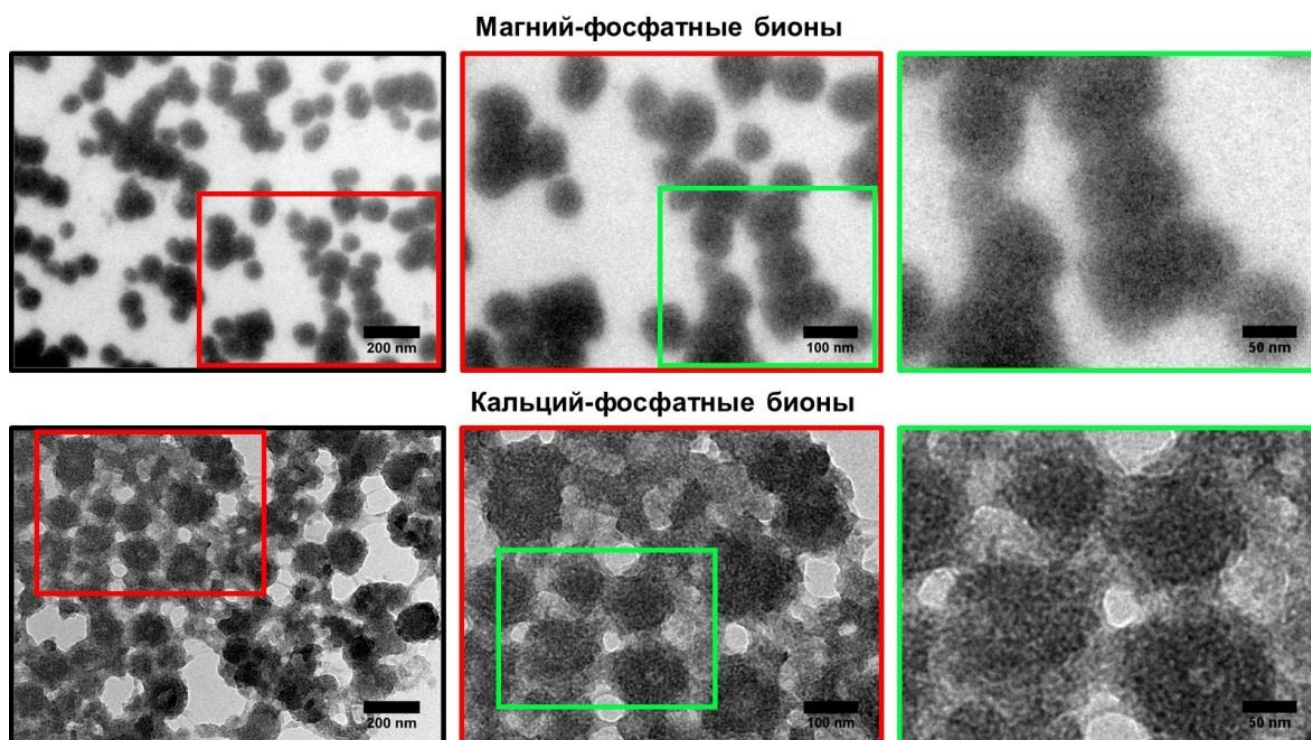


Рисунок 6 – Просвечивающая электронная микроскопия МФБ и КФБ

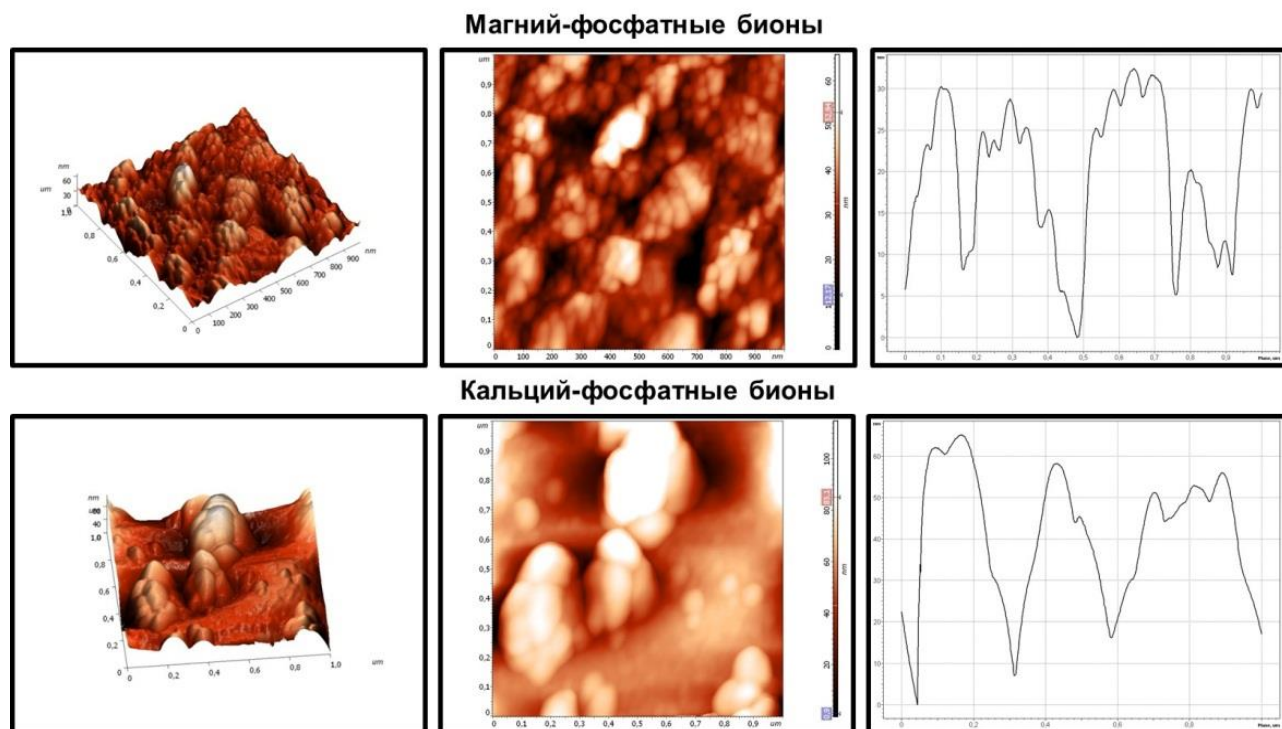


Рисунок 7 – Атомно-силовая микроскопия МФБ и КФБ

Стоит отметить, что, хотя и электронная, и атомно-силовая микроскопия позволяют детально оценить размерность и форму наночастиц, оценка распределения их размерности при помощи количественного анализа изображений может приводить к артефактам вследствие их неравномерного распределения по поверхности подложки, что в том числе может вести к избыточному рассеянию или агрегации частиц. Поэтому для анализа распределения размерности бионов в растворе был применен метод динамического рассеяния света, а также метод электрофоретического рассеяния света для измерения поверхностного заряда (дзета-потенциала) частиц, определяющего их склонность к агрегации. Данные эксперименты подтвердили данные, полученные при визуализации МФБ и КФБ, причем как в отношении диаметра отдельных частиц, так и в отношении формирования кластеров до 1000 нм в диаметре (рисунок 8). Поверхностный заряд МФБ и КФБ варьировал от -19 до -24 мВ, что подтвердило склонность бионов к агрегации (рисунок 9).

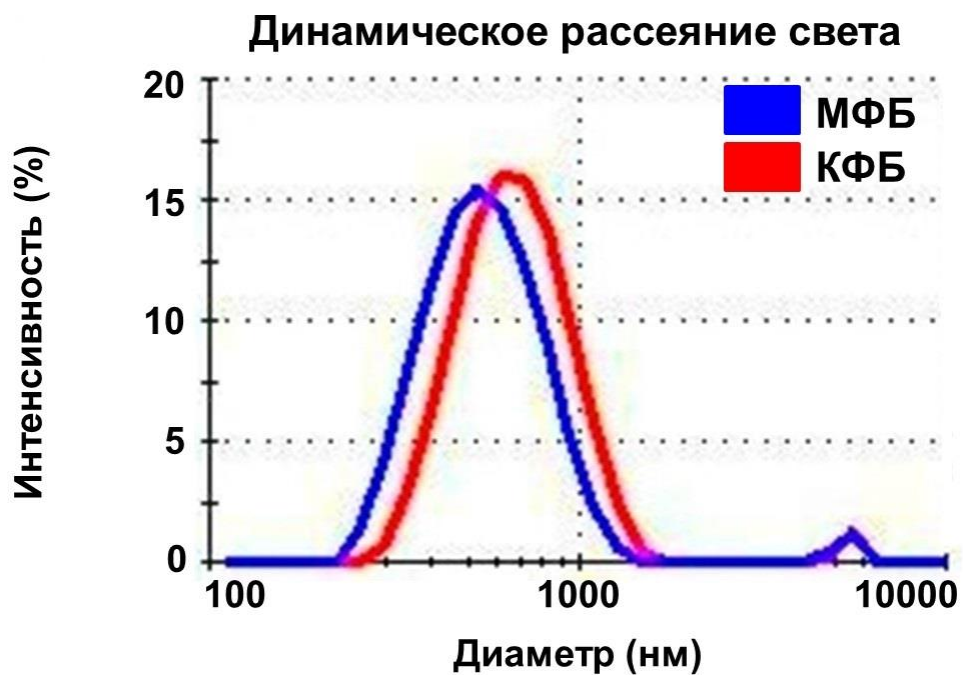


Рисунок 8 – Распределение размерности МФБ и КФБ на анализаторе наночастиц Zetasizer Nano ZS

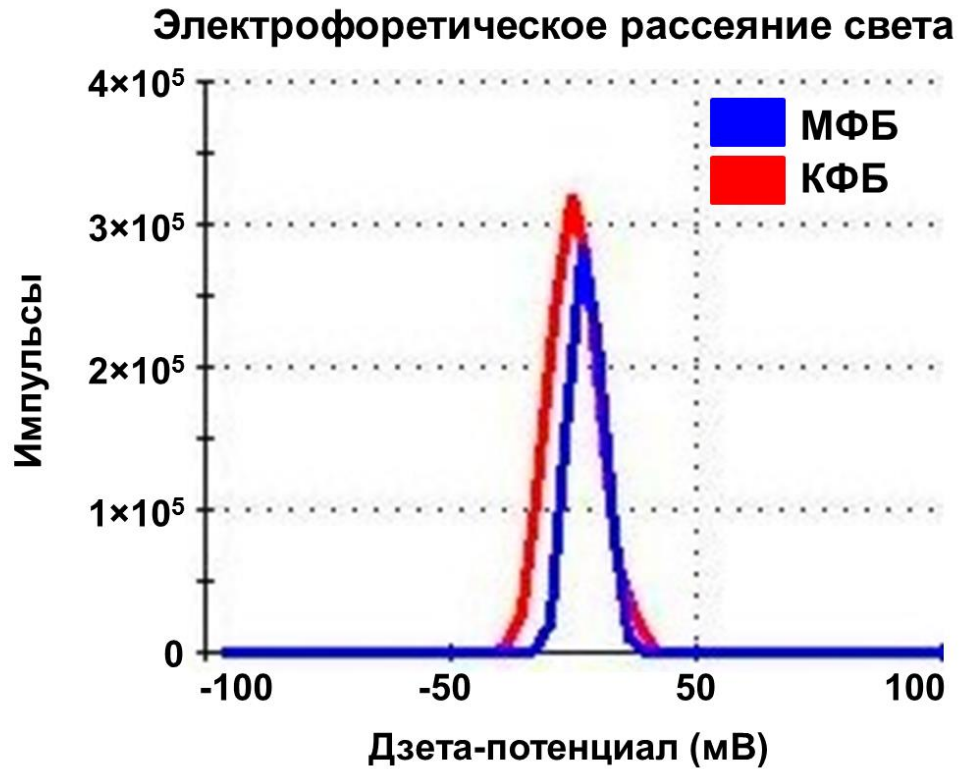


Рисунок 9 – Анализ поверхностного заряда МФБ и КФБ на анализаторе наночастиц Zetasizer Nano ZS

Не менее важным параметром сравнения МФБ и КФБ является их химический состав (минеральный и органический профиль). В идеале для оценки механизма патогенного действия КФБ их элементный состав, функциональные группы и профиль входящих в их состав органических компонентов должны быть максимально схожими с таковыми у МФБ. С целью сравнительного анализа элементного состава МФБ и КФБ были выполнены энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (рисунок 10), CHNSO-анализ (рисунок 11) и атомно-эмиссионная спектроскопия (рисунок 12). Данные методы показали сопоставимые результаты и позволили обнаружить, что КФБ состоят из углерода, кислорода, водорода, азота, кальция и фосфора, а МФБ – из тех же самых элементов, включая магний, при этом содержание кальция в них не превышает 1% в сравнении с 15% у КФБ (рисунок 10 – 12).

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

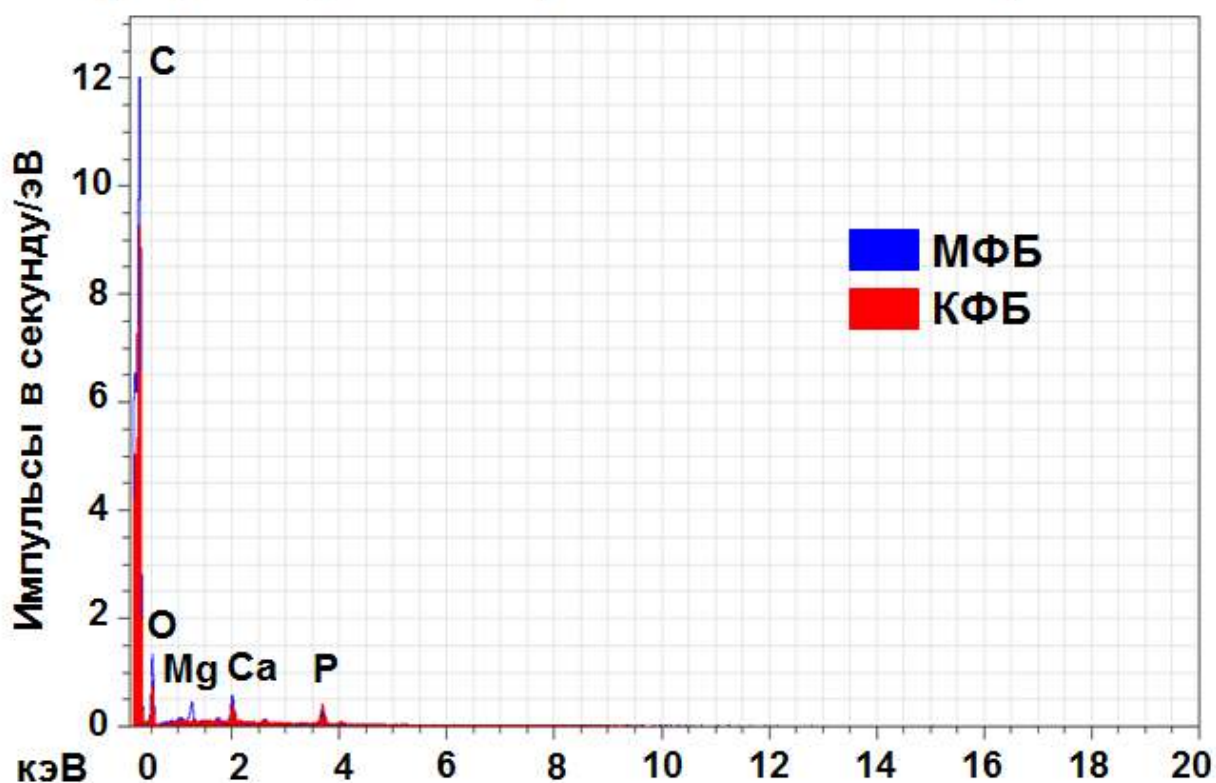


Рисунок 10 – Анализ элементного состава МФБ и КФБ (энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия)

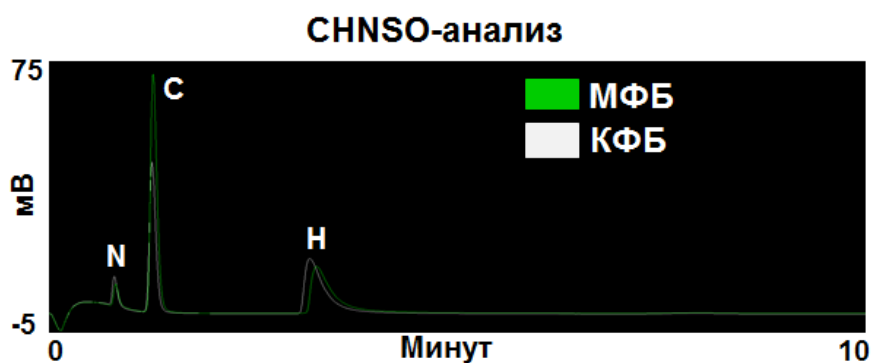


Рисунок 11 – Анализ элементного состава МФБ и КФБ (CHNSO-анализ)

Более того, количественное содержание всех вышеуказанных элементов, за исключением кальция, в МФБ было схожим с КФБ (рисунок 12).

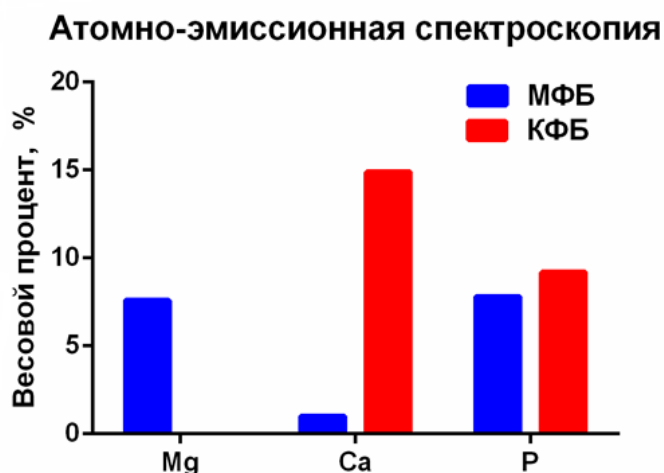


Рисунок 12 – Анализ процентного соотношения элементов МФБ и КФБ (атомно-эмиссионная спектроскопия)

Таким образом, по элементному составу МФБ отличались от КФБ лишь минимальным содержанием кальция и наличием магния. Следующим этапом изучения минерального профиля МФБ и КФБ стала идентификация функциональных групп. При помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (рисунок 13) и спектроскопии комбинационного рассеяния света (рисунок 14) было обнаружено, что как МФБ, так и КФБ содержат фосфатные (PO_4^{3-}), карбонатные (CO_3^{2-}) и гидроксильные (OH^-) группы.

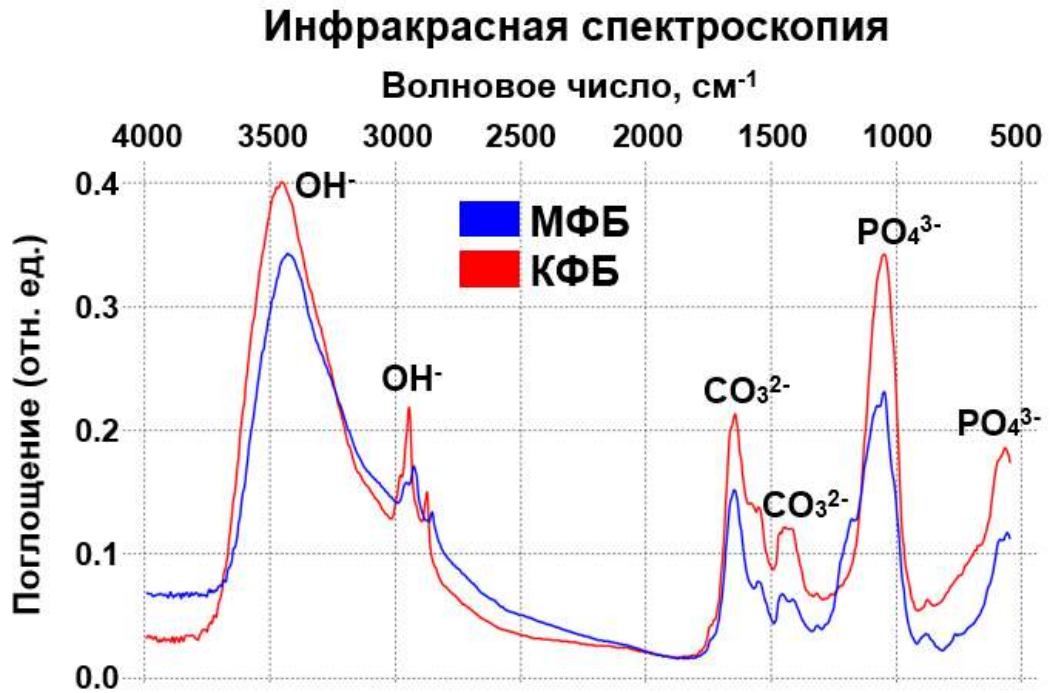


Рисунок 13 – Исследование функциональных групп МФБ и КФБ (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье)

Спектроскопия комбинационного рассеяния света

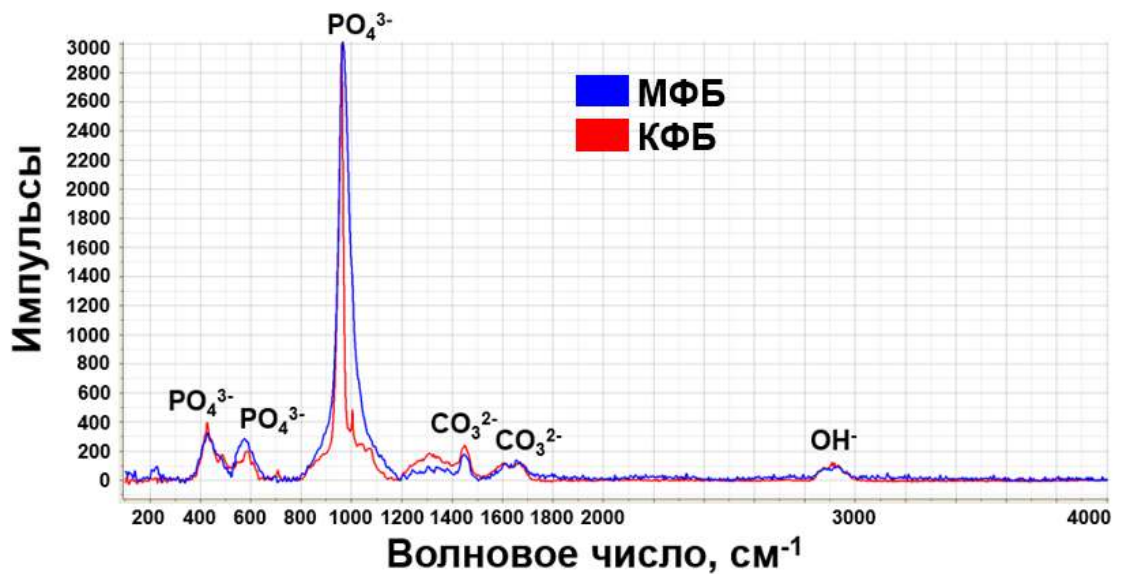


Рисунок 14 – Исследование функциональных групп МФБ и КФБ (спектроскопия комбинационного рассеяния света)

Посредством рентгеновской порошковой дифрактометрии было выявлено, что МФБ состоят из магния фосфат гидрата ($\text{Mg}_2(\text{P}_2\text{O}_7)\text{H}_2\text{O}$) и хантита ($\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$), а КФБ – из гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонат-гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$) (рисунок 15). Совпадение ширины пиков соединений указало на сходную степень кристалличности МФБ и КФБ (рисунок 15).

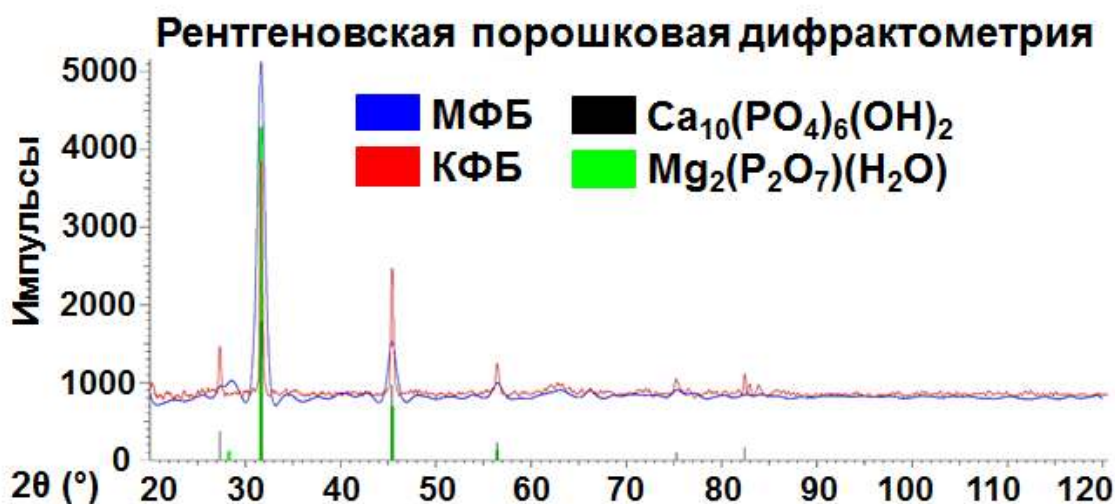


Рисунок 15 – Анализ компонентов неорганической составляющей МФБ и КФБ (рентгеновская порошковая дифрактометрия)

Все примененные методы химического анализа позволили сделать вывод, что МФБ и КФБ (помимо различий в содержании магния и кальция) отличаются лишь формулой входящих в их состав химических соединений. При этом в ряде исследований было убедительно показано, что КФБ содержат в своем составе ряд сывороточных белков [10, 22, 47, 129], которые играют протективную роль, ослабляя повреждающие эффекты гидроксиапатита [71]. Другие классы биологических макромолекул (липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты) также теоретически могут определять патогенные эффекты бионов. Поэтому, помимо анализа минерального профиля, было решено провести анализ органического профиля КФБ и МФБ.

Используя электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра, было

выявлено, что МФБ и КФБ характеризуются присутствием белков с одинаковыми молекулярными массами и незначительными различиями в количественном содержании одних и тех же белков (рисунок 16).

Электрофорез + окрашивание AgNO_3

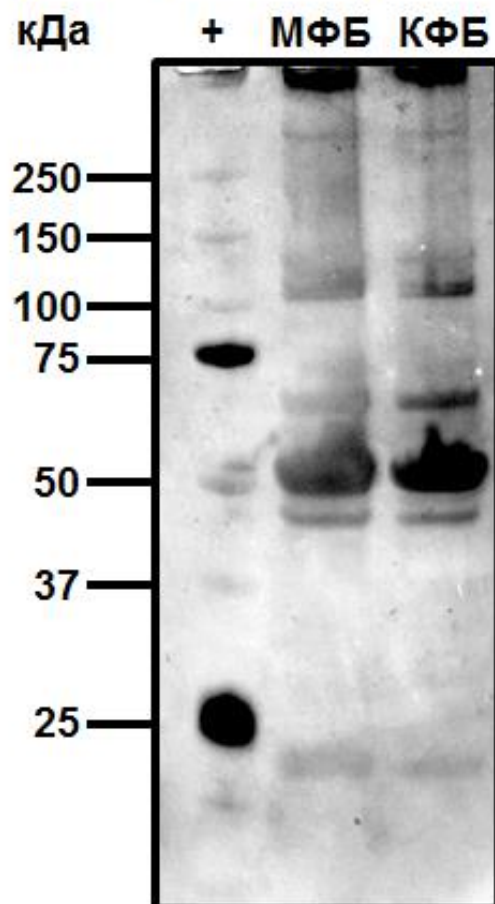


Рисунок 16 – Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с окрашиванием нитратом серебра белкового профиля МФБ и КФБ

Принимая во внимание, что все идентифицированные белки могут происходить лишь из фетальной бычьей сыворотки, необходимой для искусственного синтеза бионов, был проведен эмпирический анализ соответствия молекулярных масс сывороточным белкам. Таким способом, а также на основании проведенного ранее иммуноблоттинга [10] было предположено, что в состав как МФБ, так и КФБ входили альбумин (66,5 кДа) и фетуин-А (48,4 кДа),

которые, по данным литературы, являются основными белками, характерными для бионов [22, 47, 129].

Для более подробного анализа белкового профиля МФБ и КФБ необходимо проведение жидкостной хромато-масс-спектрометрии, которая является достаточно дорогостоящим и технически сложным методом, требующим длительной оптимизации пробоподготовки образцов.

За исключением белков, ни МФБ, ни КФБ не содержали никаких других классов биологических макромолекул: не было выявлено ни липидов (рисунок 17), ни углеводов (не показано на рисунке вследствие того, что метод их определения не подразумевает какого-либо графика), ни нуклеиновых кислот (рисунок 18, 19), что является логичным вследствие отсутствия данных классов молекул в фетальной бычьей сыворотке или иных компонентах среды для искусственного синтеза бионов. Таким образом, можно заключить, что МФБ и КФБ обладают сходным органическим профилем.

Газовая хромато-масс-спектрометрия

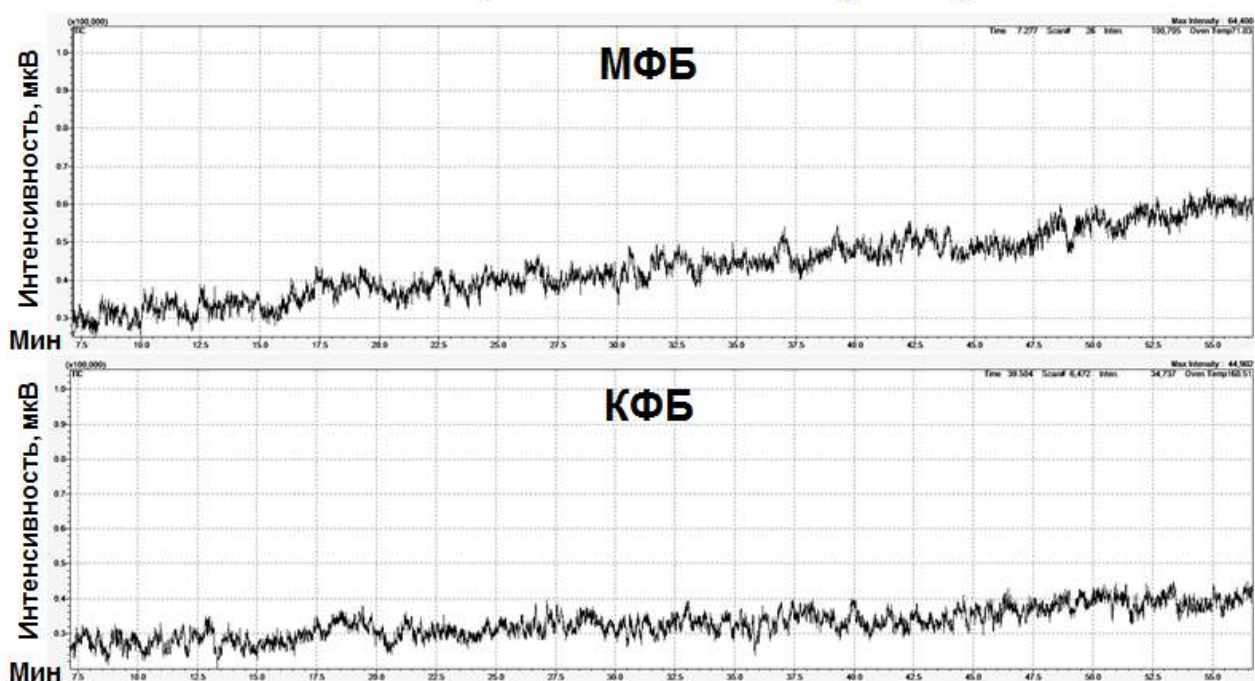


Рисунок 17 – Анализ липидного профиля МФБ и КФБ

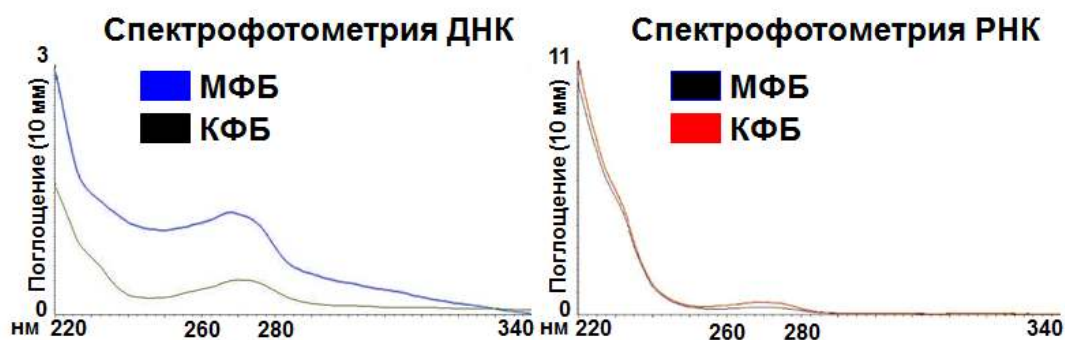


Рисунок 18 – Анализ содержания нуклеиновых кислот в МФБ и КФБ методом спектрометрии

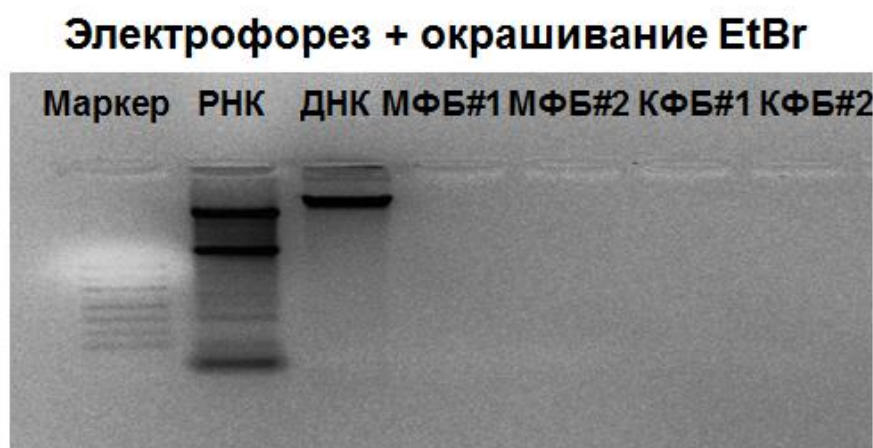


Рисунок 19 – Анализ содержания нуклеиновых кислот в МФБ и КФБ методом электрофореза в 1% агарозном геле

Резюме

МФБ имеют схожие с КФБ морфологические свойства, белковый и минеральный профиль. Различие данных типов бионов заключается лишь в разном содержании магния и кальция, что определяет различие в формуле составляющих их химических соединений: МФБ состоят из магния фосфат гидрата ($Mg_2(P_2O_7)H_2O$) и хантита ($Mg_3Ca(CO_3)_4$), а КФБ – из гидроксиапатита ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) и карбонат-гидроксиапатита ($Ca_{10}(PO_4)_3(CO_3)_3(OH)_2$). По

результатам проведенного физико-химического анализа МФБ могут применяться в биологических экспериментах для оценки механизма патогенного действия КФБ *in vitro* и *in vivo*.

ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ ДЛЯ КУЛЬТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СРАВНЕНИИ С МФБ, ПОИСК МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СУБСТРАТА ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ БИОНОВ НА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Известно, что высокая конfluenceность культуры эндотелиальных клеток определяет ее устойчивость к повреждающим агентам [62, 64, 176], поэтому эксперименты по исследованию патогенного действия бионов *in vitro* были проведены на двух моделях immortalized венозных эндотелиальных клеток: разреженной и конfluenceнтной. Начальные эксперименты по изучению патогенных эффектов КФБ проводились именно на immortalized венозных эндотелиальных клетках, так как они относительно просты в культивировании. В разреженной модели клетки культивировались до 40% конfluenceнтности и далее экспонировались бионами в течение 24 часов. В конfluenceнтной модели клетки культивировались до 90% конfluenceнтности и затем экспонировались бионами в течение 4 часов.

Такой экспериментальный протокол был обусловлен тем, что immortalized по гибридной технологии клетки линии EA.hy 926 характеризуются быстрой пролиферацией и при культивировании с 90% конfluenceнтностью в течение 24 часов начинают погибать от гиперконfluenceнтности, а не только от воздействия повреждающего фактора. Поэтому после экспериментов с клеточной линией EA.hy 926 и для преодоления недостатка моделирования конfluenceнтного монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* были использованы первичные артериальные эндотелиальные клетки, которые вследствие медленного роста могут быть экспонированы бионами в течение достаточно долгого времени даже при высокой конfluenceнтности. В то же время такие клеточные линии характеризуются сложностью в культивировании после выделения и высокой стоимостью при заказе коммерчески доступных

стандартизированных культур, что существенно затрудняет проведение таких экспериментов и требует предварительных экспериментов на классических и широко распространенных иммортализованных эндотелиальных клеточных линиях, таких, как использованная в данной работе линия EA.hy 926.

По результатам фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопии после сочетанного окрашивания Hoechst 33342 (живые клетки) и бромистым этидием (мертвые клетки) обнаружено, что экспозиция КФБ приводит к увеличению доли мертвых клеток линии EA.hy 926 в сравнении с экспозицией МФБ как на разреженной (рисунок 20, 21), так и на конфлюэнтной модели культивирования (рисунок 22, 23).



Рисунок 20 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для разреженной культуры иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки). Увеличение x 200

Флуоресцентная микроскопия

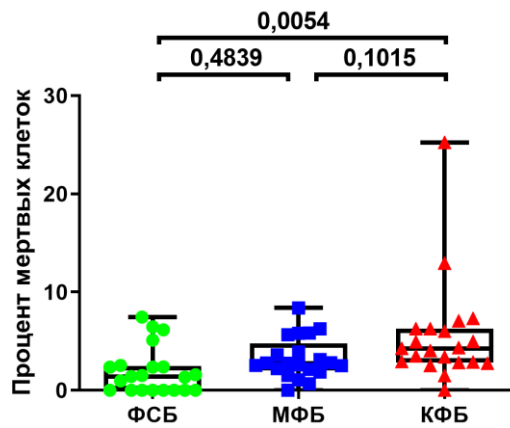


Рисунок 21 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для разреженной культуры immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Конфлюэнтная культура венозных эндотелиальных клеток человека EA.hy 926

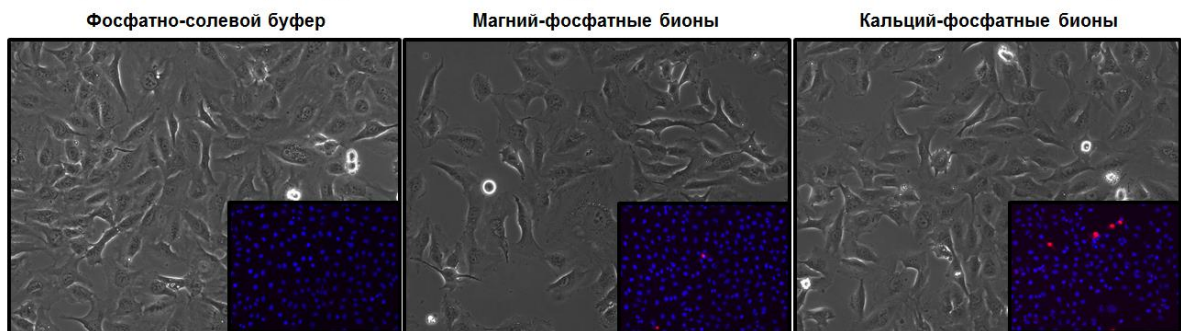


Рисунок 22 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – NucleoStain 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки). Увеличение x 200

Флюоресцентная микроскопия

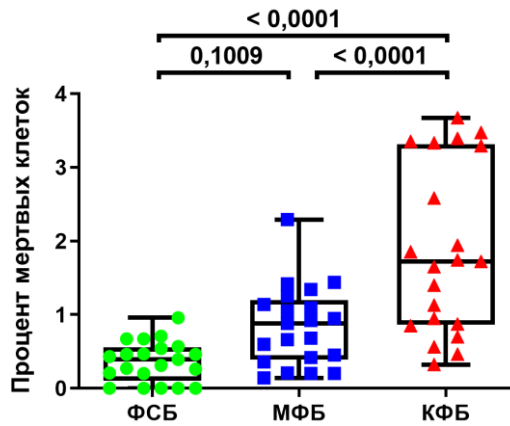
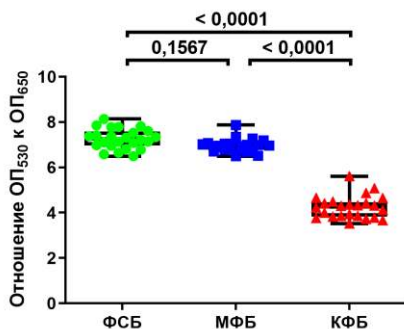


Рисунок 23 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Аналогичные результаты были получены посредством микропланшетного колориметрического теста на цитотоксичность (рисунок 24). Количество жизнеспособных клеток EA.hy 926 при экспозиции МФБ статически значимо не отличалось от такового в контрольных культурах (рисунок 24).

Колориметрический тест на токсичность для разреженной культуры EA.hy 926



Колориметрический тест на токсичность для конфлюэнтной культуры EA.hy 926

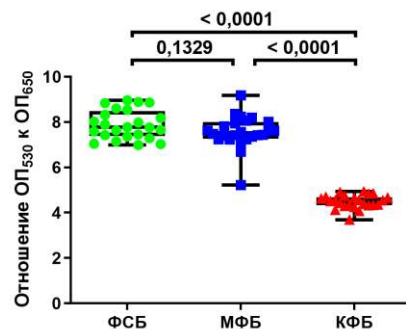


Рисунок 24 – Колориметрический тест на токсичность МФБ и КФБ для разреженной и конфлюэнтной культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Оптическая плотность на длине волны 530 нм (ОП₅₃₀) отражает нормальную жизнеспособность клеток, на

длине волны 650 нм (ОП₆₅₀) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 96-луночного планшета

В процессе сравнения повреждающего действия бионов на культуры клеток EA.hy 926 различной конфлюэнтности выявлено, что конфлюэнтная культура более устойчива к экспозиции бионами по сравнению с разреженной (рисунок 25). Стоит отметить, что на обеих моделях культивирования зафиксирована повышенная гибель клеток под воздействием КФБ в сравнении с МФБ (рисунок 25).

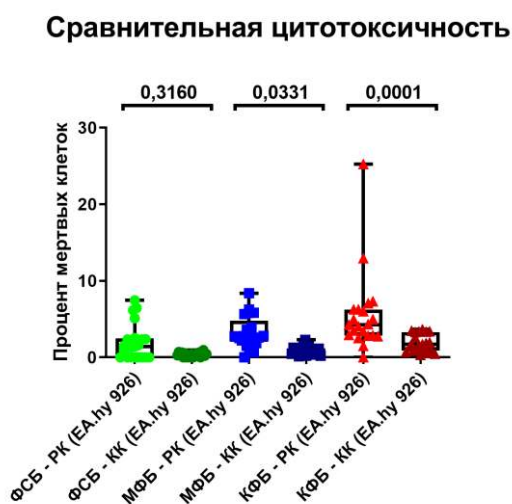


Рисунок 25 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для разреженных (РК) и конфлюэнтных (КК) культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Известно, что физиология эндотелия различных сосудов (в частности, вен и артерий) существенно отличается [17, 25, 80]. Поскольку атеросклероз представляет собой патологию именно артериального русла, для надлежащего подтверждения патогенного действия бионов на эндотелий необходимо проведение экспериментов на первичных артериальных эндотелиальных клетках, конфлюэнтные культуры которых к тому же могут быть экспонированы бионами в течение относительно длительного времени в связи с их достаточно медленным

ростом. Так как различные артерии в силу своих анатомических и физиологических особенностей характеризуются разной склонностью к развитию атеросклероза [51, 90, 183], для анализа патогенного действия бионов на артериальные эндотелиальные клетки были выбраны две клеточных линии: первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека, которая поражается атеросклерозом достаточно часто [51], и первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека, которая относительно устойчива к развитию атеросклероза [90, 183].

При проведении экспериментов на первичных эндотелиальных клетках посредством фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопии и при помощи микропланшетного колориметрического теста было обнаружено, что КФБ, но не МФБ, вызывают гибель как эндотелиальных клеток коронарной (рисунок 26, 27, 30), так и внутренней грудной артерии человека (рисунок 28 – 30).



Рисунок 26 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки). Увеличение x 200

Флуоресцентная микроскопия

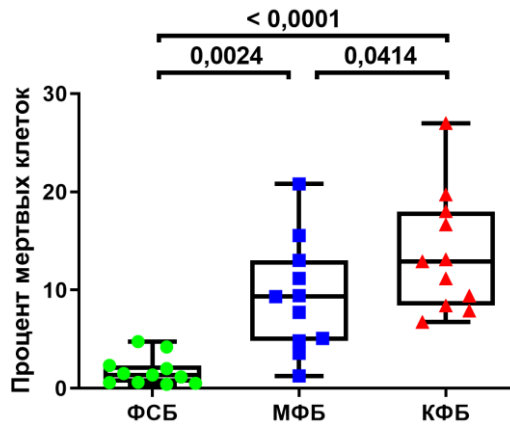


Рисунок 27 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека

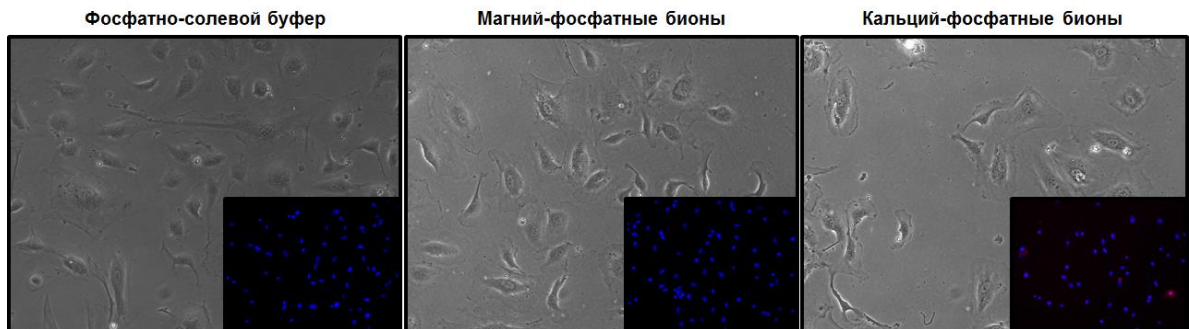


Рисунок 28 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека. Синяя окраска – NucleoStain 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки). Увеличение $\times 200$

Флюоресцентная микроскопия

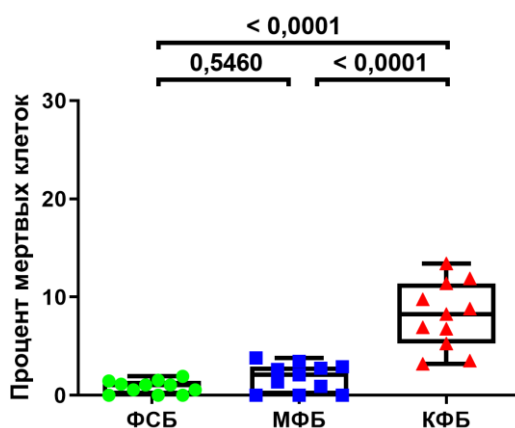
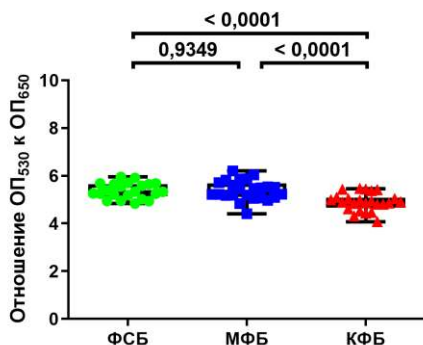


Рисунок 29 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конfluenceнтной культуры первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Колориметрический тест на токсичность для конfluenceнтной культуры НСАЕС



Колориметрический тест на токсичность для конfluenceнтной культуры НТАЕС

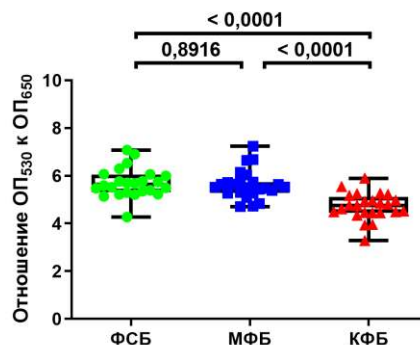


Рисунок 30 – Колориметрический тест на токсичность МФБ и КФБ для конfluenceнтной культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС, рисунок слева) и внутренней грудной (НТАЕС, рисунок справа) артерии. Оптическая плотность на длине волны 530 нм (ОП₅₃₀) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм (ОП₆₅₀) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 96-луночного планшета

При сравнении повреждающего действия КФБ и МФБ на эндотелиальные клетки коронарной и внутренней грудной артерии выявлено, что оба типа бионов существенно более токсичны для эндотелиоцитов коронарной артерии в сравнении с внутренней грудной (рисунок 31), причем гибель клеток наблюдается при воздействии КФБ и отсутствует при экспозиции МФБ.

Сравнительная цитотоксичность

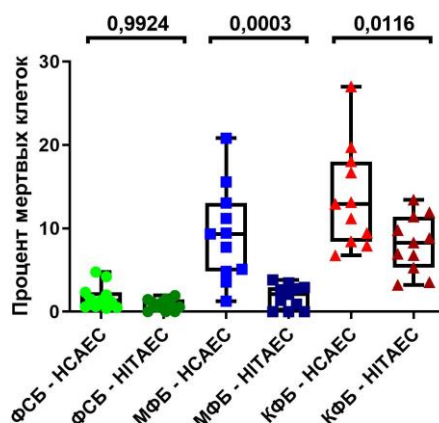


Рисунок 31 – Сравнительная токсичность МФБ и КФБ для конфлюэнтной культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной (НГТАЕС) артерии. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета

Меньшая чувствительность первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии к воздействию бионов в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии может объясняться повышенной экспрессией ими эндотелиальной синтазы оксида азота и повышенным выделением монооксида азота (NO) [67, 81, 98], который обладает выраженным сосудорасширяющим и атеропротективным действием, а также препятствует развитию тромбоза [172, 182].

Гибель эндотелиальных клеток под воздействием различных повреждающих факторов может проходить по апоптотическому [137] или некротическому [181] морфотипу. При помощи проточной цитометрии была изучена временная динамика клеточной гибели под воздействием бионов. В

эксперимент были взяты только КФБ, так как по результатам, полученным посредством фазово-контрастной и флюоресцентной микроскопии, а также микропланшетного колориметрического теста на цитотоксичность (рисунок 20 - 31), МФБ не оказывали патогенного эффекта на эндотелий и были сопоставимы с контрольной группой. Обнаружено, что все три линии эндотелиальных клеток в результате воздействия КФБ гибнут постепенно, при этом после 24 часов экспозиции были детектированы как апоптотический морфотип (отражаемый аннексин V-положительными клетками и пропидия иодид-отрицательными клетками), так и некротический морфотип (отражаемый аннексин V- и пропидия иодид-положительными клетками) (рисунок 32), что согласуется с полученными ранее результатами [10].

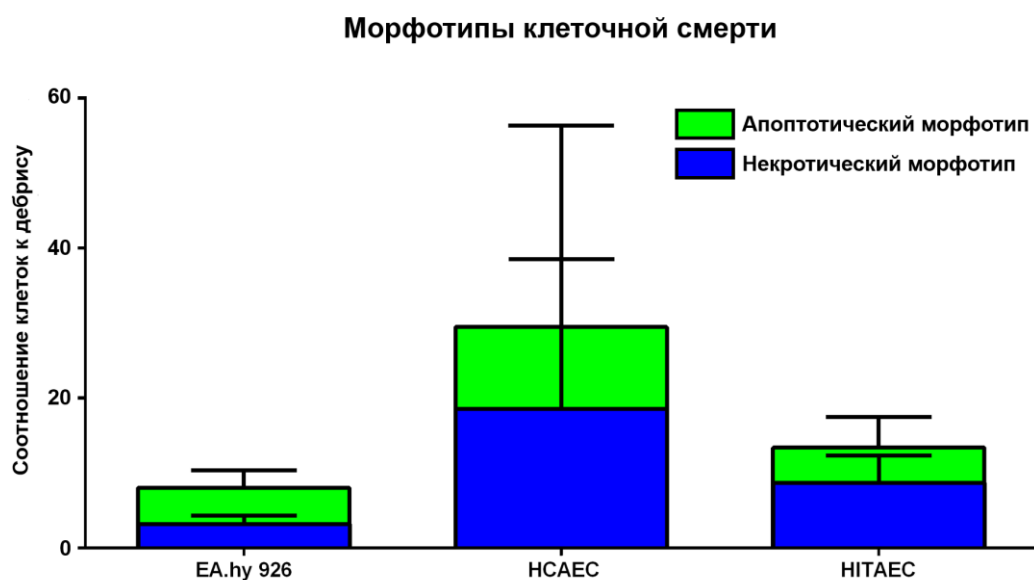


Рисунок 32 – Оценка морфотипа клеточной смерти при воздействии КФБ на культуры immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной (HITAEC) артерии человека. Апоптотический морфотип – аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, некротический морфотип – аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки

Благодаря исследованиям ряда авторов было показано цитотоксическое [27, 38, 71] действие КФБ. Проведенный выше эксперимент подтвердил

специфичность патогенного действия КФБ на эндотелиальные клетки, однако механизм такого эффекта оставался неясным. Предыдущие исследования позволили предположить, что морфологическим субстратом патогенного действия КФБ является их интернализация эндотелиальными клетками [10], однако данное явление не было показано применительно к другим эндогенным минерало-органическим наночастицам. Поэтому следующим этапом работы было исследовать феномен интернализации МФБ и КФБ эндотелиальными клетками.

По результатам ПЭМ и конфокальной микроскопии было выявлено, что КФБ интернализируются эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 уже через 1 час после их добавления к культурам (рисунок 33, 34) и ко-локализованы с лизосомами (рисунок 34).

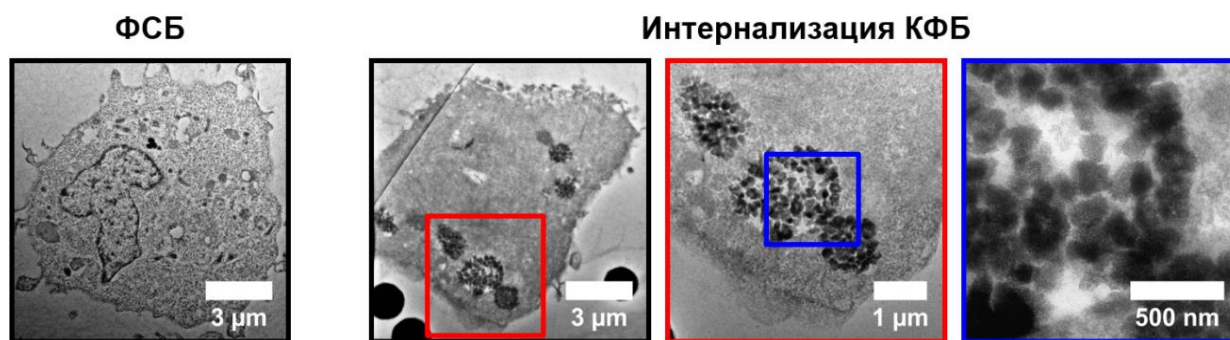


Рисунок 33 – ПЭМ культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, подвергшихся воздействию ФСБ (контроль) или КФБ в течение 48 часов. Вставки показывают интернализированные КФБ

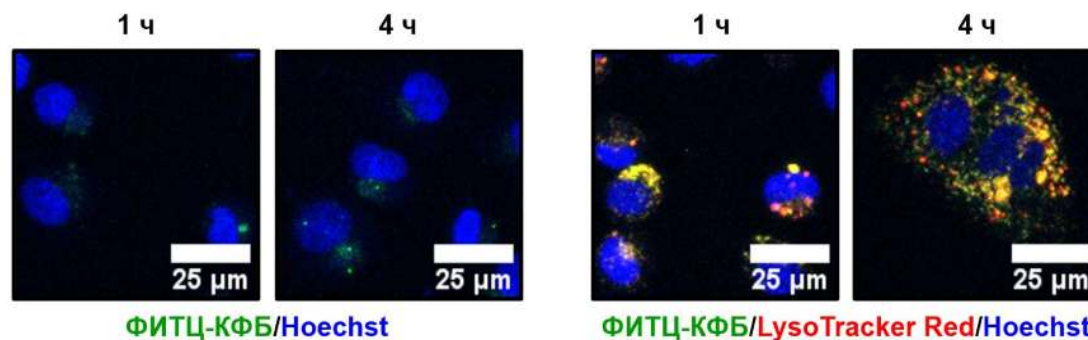


Рисунок 34 – Конфокальная микроскопия культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, подвергшихся

воздействию ФИТЦ-КФБ в течение 1 или 4 часов и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red (индикатором pH) и ядерным красителем Hoechst 33342. Через 4 часа после добавления КФБ наблюдалось выделение Ca^{2+} из лизосом в цитозоль (появление зеленого окрашивания в цитозоле, отсутствующее через 1 час после добавления КФБ)

Для подтверждения полученных результатов посредством СЭМ в обратно-рассеянных электронах были изучены эпоксидные блоки с заключенными в них первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии, которые были экспонированы МФБ, КФБ или чистым ФСБ в течение 4 часов. В цитоплазме подвергшихся воздействию бионов клеток визуализировались множественные черные электронно-плотные включения, которых не наблюдалось ни в контрольных клетках, ни в межклеточном пространстве, при этом плазматическая мембрана всех клеток была интактна (рисунок 35).

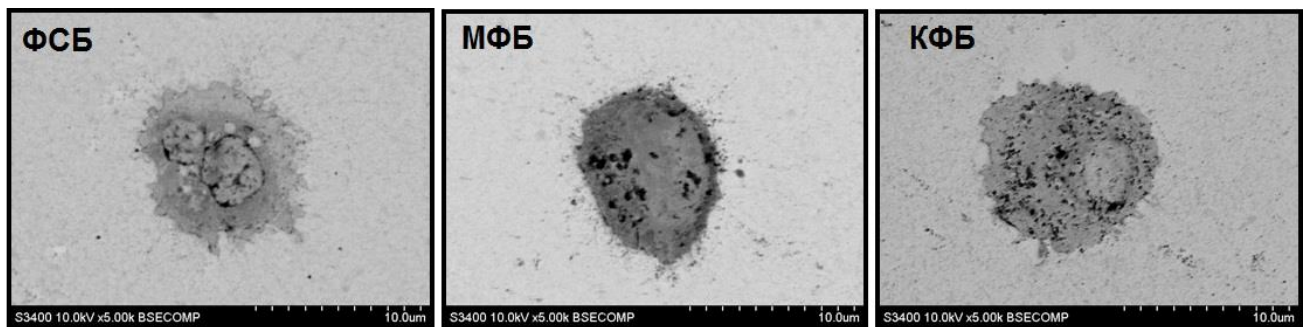


Рисунок 35 – СЭМ первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека после экспозиции ФСБ, МФБ и КФБ в течение 4 часов. Увеличение $\times 5000$

При конфокальной микроскопии спустя 4 часа после добавления ФИТЦ-МФБ (зеленое свечение) было детектировано преимущественно красное свечение (LysoTracker Red), отображающее лизосомы, и слабое желтое свечение (наложение красного и зеленого цветов), свидетельствующее о присутствии меченных ФИТЦ-МФБ внутри лизосом (рисунок 36). Слабую флюоресценцию можно объяснить тем, что в состав МФБ входит легко растворимый в кислой

среде лизосом магний фосфат гидрат, детекция которого затруднена вследствие быстрой химической диссоциации.

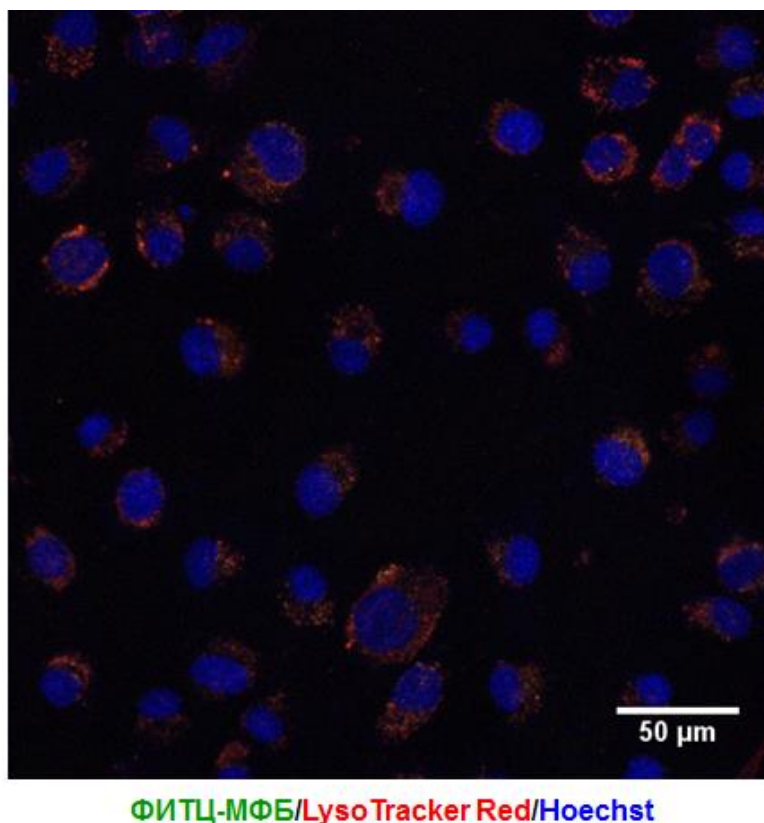
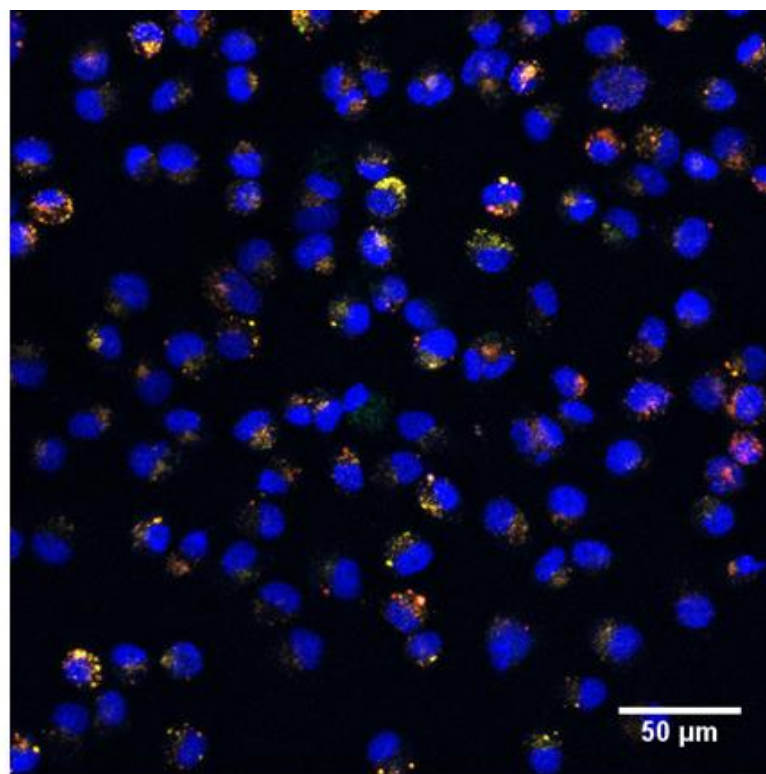


Рисунок 36 – Конфокальная микроскопия первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека после экспозиции с ФИТЦ-МФБ в течение 4 часов и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342. Увеличение x 200

Для анализа интернализации КФБ эндотелиальными клетками был использован кальцеин (специфичный флюоресцентный краситель соединений кальция), который дает зеленый спектр свечения. При анализе интернализации КФБ через 4 часа после их добавления к эндотелиальным клеткам методом конфокальной микроскопии было выявлено, что КФБ, состоящие из малорастворимого гидроксиапатита, после интернализации также оказываются в лизосомах (желтая флюоресценция) (рисунок 37). В отличие от визуализации интернализации МФБ, внутри клеток после экспозиции клеток КФБ одновременно наблюдалась зеленая и красная флюоресценция, что можно

объяснить смещением флюоресцентно детектируемых ионов кальция (Ca^{2+}) из лизосом в цитозоль (рисунок 37).



кальцеин-КФБ/LysoTracker Red/Hoechst

Рисунок 37 – Конфокальная микроскопия первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, подвергшихся воздействию меченных кальцеином КФБ в течение 4 часов и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342. Увеличение $\times 200$

Таким образом, полученные данные подтверждают процесс интернализации всех типов бионов как иммортализованными венозными, так и первичными артериальными эндотелиальными клетками человека. Визуально интактная плазматическая мембрана (рисунок 33, 35) позволила выдвинуть гипотезу о том, что КФБ могут вызывать один из вариантов запрограммированной гибели клеток, а не приводить к их некрозу.

Основываясь на имеющихся данных об интернализации КФБ эндотелиальными клетками, можно предположить три гипотезы о запуске клеточной гибели: 1) прямой механический разрыв лизосом под воздействием

нерастворенных кристаллов гидроксиапатита с последующим разрывом лизосом и выходом кислого лизосомального содержимого в цитозоль; 2) нарушение осмотического баланса между лизосомами и цитозолем вследствие массивного выделения в лизосомальную среду ионов кальция и фосфора при растворении КФБ, что ведет к поступлению в лизосомы воды по осмотическому градиенту с дальнейшим перерастяжением и разрывом лизосом; 3) после интернализации КФБ растворяются в кислой среде лизосом с последующим выделением в цитозоль ионов кальция, которые приводят к активации каспазы-3.

При рассмотрении первой гипотезы (механического разрыва лизосом) можно предположить, что КФБ, состоящие из малорастворимого гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонат-гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$), могут физически разрывать лизосомальную мембрану и приводить к выходу кислого лизосомального содержимого в цитозоль, что могло бы запустить процесс клеточной гибели. Однако в случае с МФБ такое явление было бы невозможно, так как в состав данного типа бионов входит легкорастворимый магнезия фосфат гидрат ($\text{Mg}_2(\text{P}_2\text{O}_7)(\text{H}_2\text{O})$). Предполагая второй возможный механизм патогенного действия бионов (по осмотическому градиенту), КФБ могут частично диссоциировать в лизосомальной среде, что потенциально может приводить к ее перенасыщению ионами кальция и фосфора и нарушению осмолярности [34, 103, 104]. Однако в случае подобного явления МФБ обладали бы не меньшим повреждающим действием, чем КФБ, вследствие значительно более высокой растворимости. Согласно третьей гипотезе, при растворении КФБ (но не МФБ) в лизосомах существенно повышается концентрация ионов кальция в цитозоле, вследствие чего увеличивается проницаемость внешней мембраны митохондрий и по каскаду внутреннего пути апоптоза через каспазу-9 активируется запускающая клеточную гибель каспаза-3 [10, 33, 55, 91, 152].

Таким образом можно заключить, что разрыв лизосом (механический или посредством осмотического градиента) либо выход ионов кальция в цитозоль запускает каскад событий внутреннего пути апоптоза [160, 161, 162]. Для проверки предполагаемых гипотез был проведен эксперимент на культурах клеток

линии EA.hy 926, определяющий цитотоксичность бионов в присутствии бафиломицина A1 (соединения, ингибирующего вакуолярную H^+ -АТФазу [24], и, следовательно, предотвращающего ацидификацию лизосомального содержимого [19]). Воздействие бафиломицина A1 частично спасало эндотелиальные клетки от вызванной КФБ гибели независимо от времени воздействия (4 или 24 часа) и дозы (0,1 или 1 микромоль) (рисунок 38). В то же время, МФБ, состоящие из магния фосфат гидрата, который обладает более высокой растворимостью, чем характерный для КФБ гидроксиапатит (рисунок 15), не обладали патогенностью для эндотелиальных клеток независимо от присутствия бафиломицина A1 (рисунок 38).

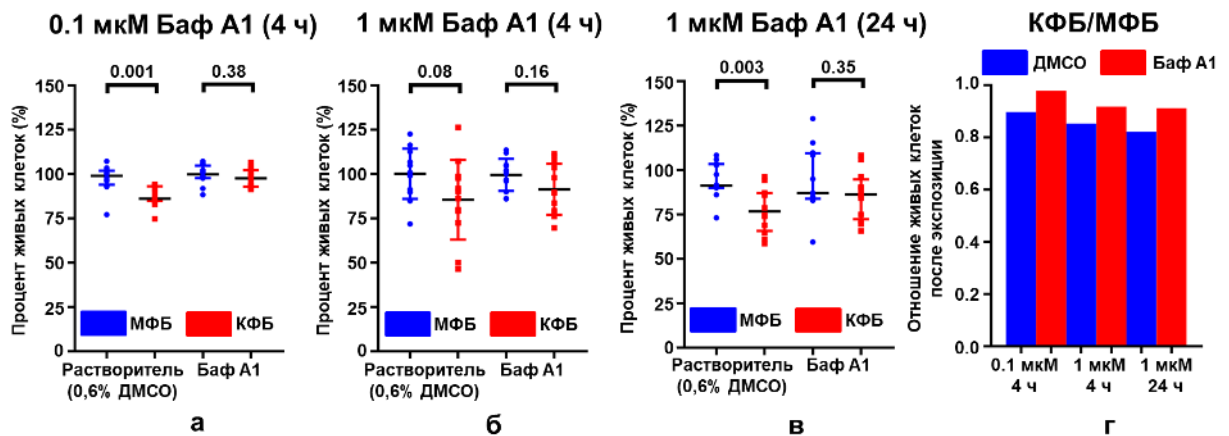


Рисунок 38 - Культуры immortalized венных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 подверглись воздействию растворителя (0,6% диметилсульфоксид, ДМСО) или различных концентраций растворенного в диметилсульфоксиде бафиломицина A1 (а, б, в, г) с параллельным добавлением МФБ или КФБ в течение 4 (а, б, г) или 24 часов (в, г) с последующим колориметрическим анализом жизнеспособности и пролиферативной активности клеток ($n = 12$ лунок на группу). График (г) демонстрирует отношение доли жизнеспособных клеток при воздействии КФБ к таковой при воздействии МФБ в зависимости от добавления бафиломицина A1 и времени воздействия бионов

При анализе результатов, полученных методом конфокальной микроскопии на клетках EA.hy 926 после часовой инкубации с КФБ, при окрашивании

флюоресцирующим сенсором ионов кальция Fluo-3 AM (зеленое окрашивание) и индикатором pH LysoTracker Red (красное окрашивание) было выявлено значительное количество ионов кальция, расположенных как в лизосомах (соответствующий наложению зеленого и красного желтый цвет, отражающий ко-локализацию ионов кальция и лизосом), так и в цитозоле. В контрольных клетках лизосомы не содержали ионов кальция (красное свечение), которые в небольшом количестве были изолированно локализованы в цитозоле (зеленое окрашивание). Таким образом, уже через 1 час после добавления КФБ к эндотелиальным клеткам наблюдалось их растворение в лизосомах и смещение флюоресцентно детектируемых ионов кальция из лизосом в цитозоль (рисунок 39). Следовательно, было предположено, что гибель эндотелиальных клеток связана именно с растворением КФБ и сопутствующим высвобождением ионов кальция из лизосом в цитозоль.

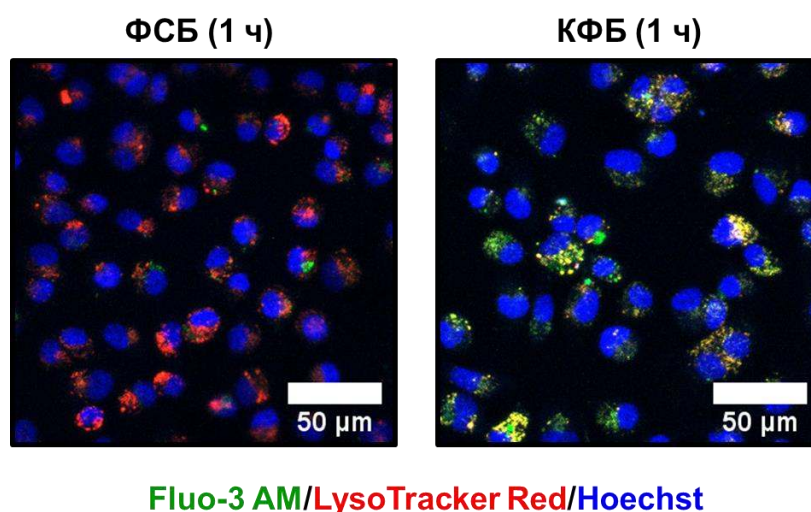


Рисунок 39 – Конфокальная микроскопия культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, подвергшихся воздействию ФСБ (контроль) или КФБ в течение 1 часа и окрашенных красителем ионов кальция Fluo-3 AM, лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342

Известно, что повышение уровня ионов кальция в цитозоле является одним из триггеров повышения проницаемости внешней мембраны митохондрий, что в

конечном итоге приводит к активации запускающей клеточную гибель каспазы-3 путем ее расщепления [91]. Уровни расщепленных форм как каспазы-3 [93, 111], так и ее субстрата PARP-1 [186] (что отражает инактивацию этого белка, ответственного за репарацию ДНК) [93, 111] увеличивались в несколько раз через 24 часа после добавления КФБ, но не МФБ или ФСБ в эксперименте на эндотелиальной клеточной линии 2Н-11 (рисунок 40).

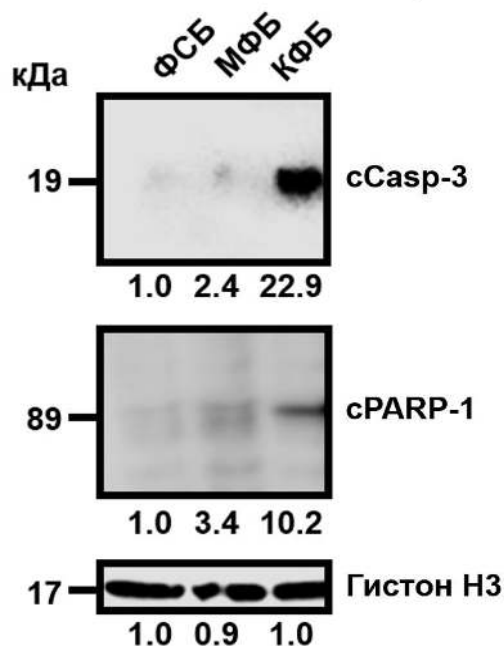


Рисунок 40 – Эндотелиальные клетки лимфатического эндотелия мыши линии 2Н-11 в культуре подверглись воздействию ФСБ (контроль), МФБ и КФБ в течение 24 часов с дальнейшим выделением общего белка и иммуноблоттингом на указанные белки. В качестве контроля загрузки белка был оценен уровень белка «домашнего хозяйства» гистон Н3. Числовые значения показывают плотность полос относительно контрольной группы (ФСБ)

Кроме того, ранее было продемонстрировано повышение уровня расщепляющей каспазу-3 расщепленной формы каспазы-9 [10, 152] (что также свидетельствует об ее активации) [111, 93] при воздействии КФБ. В целом эти результаты указывают на лизосомально-опосредованную гибель клеток (тип клеточной гибели, отличаемый от остальных по первичному повышению

проницаемости лизосом и активации каспазы-9 и каспазы-3) как вероятный механизм вызываемой КФБ клеточной смерти [106].

Данные результаты согласуются с теми, что были получены ранее на сосудистых гладкомышечных клетках [33, 55], однако противоречат другим работам, в которых было предположено, что КФБ вызывают разрыв лизосом вследствие создания осмотического градиента между лизосомами и цитозолем [34, 103, 104]. Стоит отметить, что разрыв лизосом в этих исследованиях определялся либо окрашиванием акридиновым оранжевым [34], либо ПЭМ [103, 104]. Оба данных метода не являются оптимальными для надежной детекции разрыва лизосом – акридиновый оранжевый недостаточно специфичен в качестве индикатора рН и не всегда демонстрирует стабильные результаты применительно к окрашиванию лизосом (репрезентативное изображение в работе [34] показывает полное отсутствие лизосом в клетке через 4 часа после добавления КФБ, что напрямую противоречит окрашиванию LysoTracker Red в наших экспериментах (рисунок 37, 39)), а визуализация разрыва лизосом методом ПЭМ весьма условна, что подтверждается полученными в этих исследованиях репрезентативными изображениями [103, 104].

Одним из пусковых механизмов развития атеросклероза является ауто- и паракринная секреция провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и других) эндотелиальными клетками [94, 107, 131, 132, 164]. При этом ранее была продемонстрирована повышенная секреция эндотелиоцитами ИЛ-6 и ИЛ-8 в результате экспозиции КФБ [10]. Поскольку ИЛ-6 и ИЛ-8 являются основными провоспалительными цитокинами, которые секретируются в ответ на формирующиеся в крови КФБ, представилось необходимым сравнить уровень секреции данных цитокинов эндотелиальными клетками и при экспозиции МФБ.

При анализе результатов, полученных на разреженной клеточной модели, было выявлено, что экспозиция МФБ не вызывала изменения уровня секретируемых эндотелиальными клетками ИЛ-6 и ИЛ-8, в то время как экспозиция КФБ индуцировала повышение концентрации данных цитокинов в сравнении как с контрольной культурой, так и с экспозицией МФБ (рисунок 41).

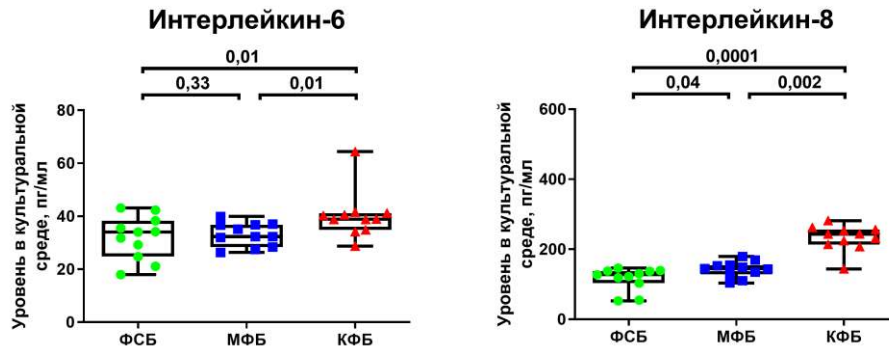


Рисунок 41 – Выделение цитокинов иммортализованными венозными эндотелиальными клетками человека линии EA.hy 926 на разреженной клеточной модели под воздействием ФСБ, МФБ и КФБ

Эксперименты, выполненные на конфлюэнтной клеточной модели, продемонстрировали схожие результаты с разреженной моделью: экспозиция КФБ индуцировала повышение уровня выделяемого ИЛ-6 в сравнении с МФБ и контрольными клетками и увеличение уровня выделяемого ИЛ-8 в сравнении с экспозицией МФБ (рисунок 42).

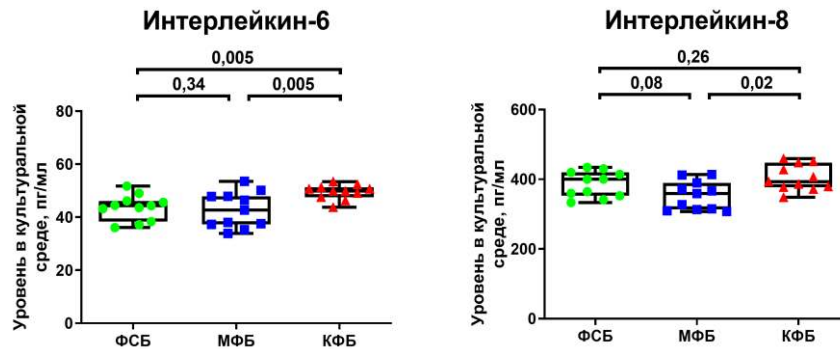


Рисунок 42 – Выделение цитокинов иммортализованными венозными эндотелиальными клетками человека линии EA.hy 926 на конфлюэнтной клеточной модели под воздействием ФСБ, МФБ и КФБ

Таким образом, в отличие от МФБ, КФБ повышали выделение ИЛ-6 и ИЛ-8 как на разреженной, так и на конфлюэнтной клеточной модели, что согласуется с

ранее полученными результатами и подтверждает роль данных цитокинов в провоспалительном действии КФБ [10].

Добавление КФБ к конфлюэнтным культурам первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии с экспозицией в течение 24 часов индуцировало повышение секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 в сравнении с МФБ и контрольными клетками (рисунок 43).

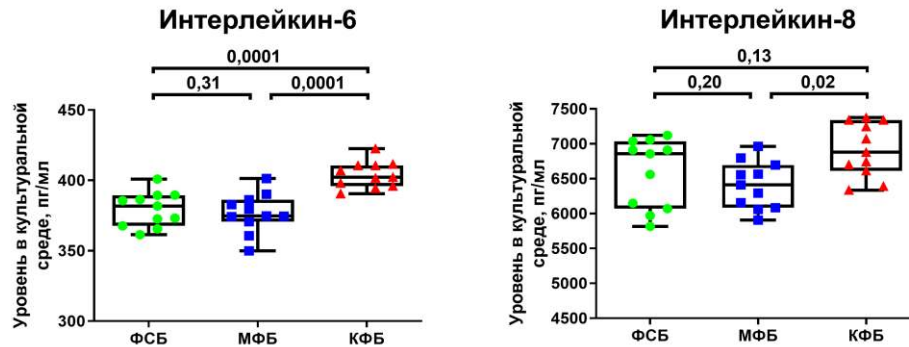


Рисунок 43 – Выделение цитокинов конфлюэнтной культурой первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека под воздействием ФСБ, МФБ и КФБ

Аналогичные результаты были получены при добавлении КФБ к конфлюэнтным культурам НТАЕС с аналогичным временем экспозиции (рисунок 44).

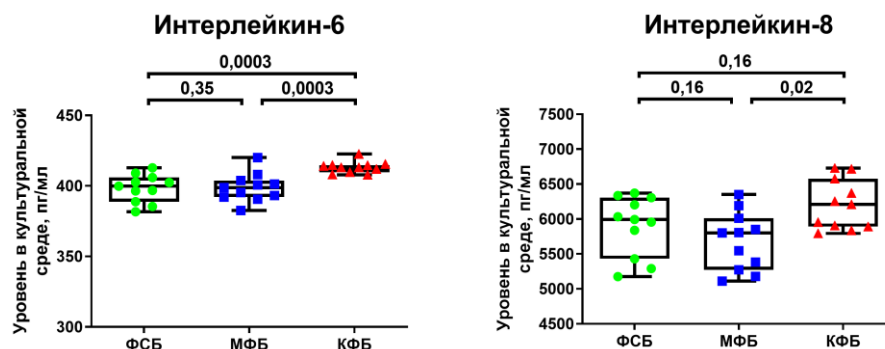


Рисунок 44 – Выделение цитокинов конфлюэнтной культурой первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека под воздействием ФСБ, МФБ и КФБ

Исследование экспрессии генов, кодирующих выбранные для анализа цитокины (*IL6* и *IL8*), выявило также повышение экспрессии генов *IL1B*, *IL12A* и *IL23* при экспозиции КФБ в сравнении с МФБ и контрольными культурами в первичных эндотелиальных клетках как коронарной (рисунок 45), так и внутренней грудной артерии (рисунок 46). Несмотря на то, что экспрессия генов *IL1B*, *IL12A* и *IL23* была повышена при экспозиции бионами, кодируемые ими белки не были детектированы в культуральной жидкости. Таким образом, можно заключить, что экспрессия генов цитокинов в эндотелиальных клетках не всегда отражает уровень их секреции.

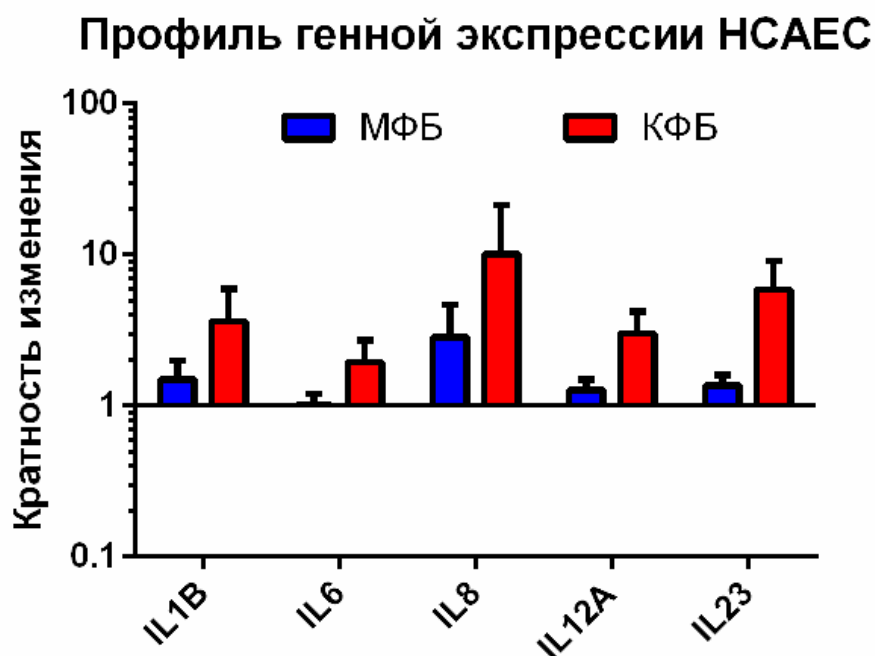


Рисунок 45 – Уровень экспрессии генов цитокинов в конфлюэнтной культуре первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (НСАЕС) при воздействии ФСБ, МФБ и КФБ

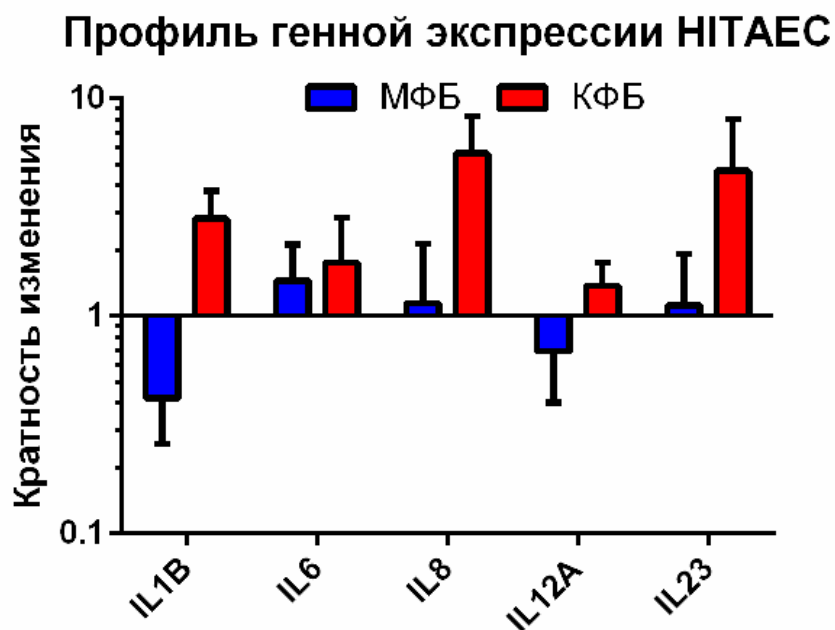


Рисунок 46 – Уровень экспрессии генов цитокинов в конфлюэнтной культуре первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (НІТАЕС) при воздействии ФСБ, МФБ и КФБ

В одной из предыдущих работ было показано, что экспозиция монокультур первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека частицами гидроксиапатита не приводит к повышению синтеза ИЛ-6, однако при их совместном культивировании с моноцитами или при добавлении культуральной жидкости от экспонированных частицами гидроксиапатита моноцитов к вышеуказанным культурам эндотелиальных клеток уровень ИЛ-6 в культуре существенно повышался [97]. Тем не менее, в проведенных экспериментах повышение ИЛ-6 при экспозиции монокультур сосудистых эндотелиальных клеток КФБ (минеральным компонентом которых являются гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит) стабильно достигало статистической значимости.

Наиболее вероятной причиной различий результатов может быть дозировка добавляемого повреждающего агента (100 мкг/мл в случае с искусственно синтезированным гидроксиапатитом и 0,5 МкФ в нашем исследовании). В случае с бионами (а не чистым гидроксиапатитом) оценить их концентрацию в единицах массы на единицу объема не представляется возможным, поскольку обязательным

условием их искусственного синтеза является присутствие сывороточной среды, а высушивание (в том числе лиофильное) может необратимо повлиять на структуру входящих в состав бионов белков, отсутствующих в чистом гидроксипатите независимо от метода его получения.

Полученные результаты демонстрируют, что КФБ при добавлении к культурам артериальных эндотелиальных клеток способны индуцировать развитие провоспалительного ответа, выражаемого в увеличении экспрессии генов *IL6* и *IL8* и секреции соответствующих цитокинов. Стоит отметить, что уровень генной экспрессии не всегда объективно отражает выделение цитокинов эндотелиальными клетками, поэтому для надежности результатов необходимо сочетать методы оценки генной экспрессии и секреции цитокинов (к примеру, количественную полимеразную цепную реакцию и иммуноферментный анализ).

К числу основных маркеров повреждения эндотелия относится увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии на плазматической мембране эндотелиальных клеток с соответствующим повышением адгезии клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелиальным клеткам [26, 75]. Поэтому была изучена экспрессия генов основных молекул клеточной адгезии *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP* и *CDH5*, а также генов скавенджер-рецепторов *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR* и *VLDLR* [135, 156] в культурах эндотелиальных клеток, экспонируемых МФБ и КФБ.

Экспозиция клеток МФБ или КФБ не вызывала значительных (более чем трехкратных) изменений экспрессии изученных генов по сравнению с контрольными клетками, хотя между разреженной и конфлюэнтной культурами наблюдались некоторые различия, в частности, относительно генов скавенджер-рецепторов *SCARF1* и *CD36* (рисунок 47, 48).

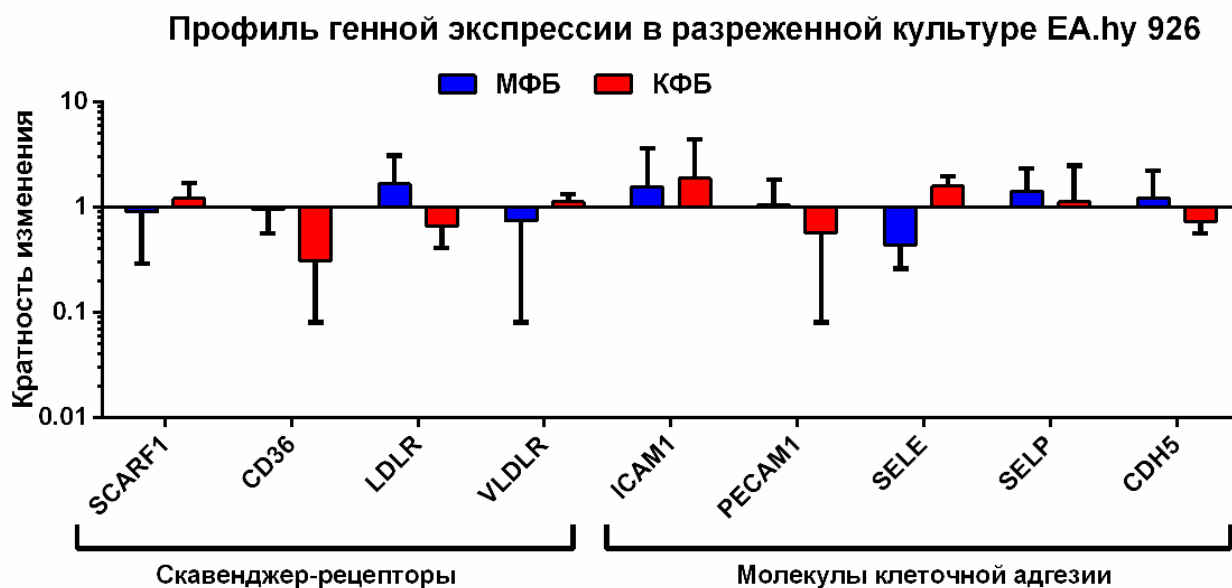


Рисунок 47 – Профиль генной экспрессии разреженной культуры иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 под воздействием МФБ и КФБ (нормализация относительно чистого ФСБ и генов «домашнего хозяйства»)

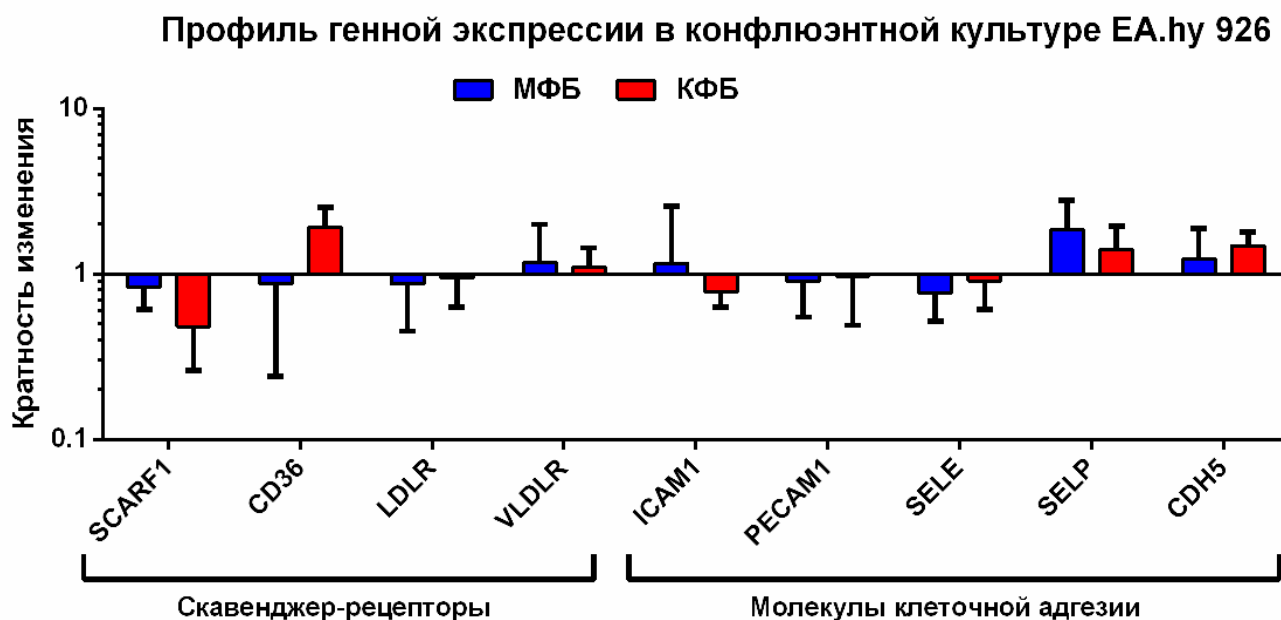


Рисунок 48 - Профиль генной экспрессии конфлюэнтной культуры иммортализованных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 под воздействием МФБ и КФБ (нормализация относительно чистого ФСБ и генов «домашнего хозяйства»)

Культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека в целом характеризовались более выраженным ответом на экспозицию бионами по сравнению с линией EA.hy 926. Так, воздействие на культуры КФБ приводило к ярко выраженному снижению (от 3 до 6 раз) экспрессии генов *CD36* и *SELP* и увеличению от 2 до 6 раз экспрессии гена *ICAM1* в первичных эндотелиальных клетках как коронарной, так и внутренней грудной артерии по сравнению с контролем (рисунок 49, 50). МФБ практически не влияли на экспрессию изученных генов в культуре первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии (рисунок 49), но в то же время усиливали экспрессию гена *PECAM1* и снижали экспрессию генов *SELP* и *CDH5* в культуре первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии (рисунок 50).

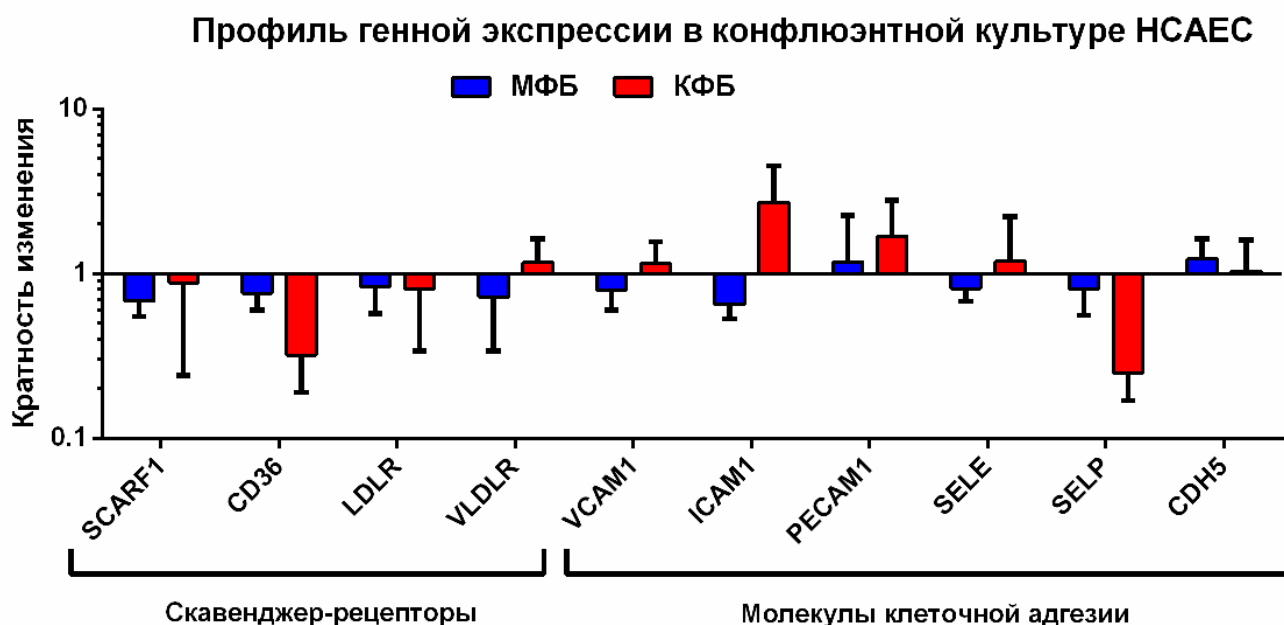


Рисунок 49 – Профиль генной экспрессии первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC) под воздействием МФБ и КФБ (нормализация относительно чистого ФСБ и генов «домашнего хозяйства»)

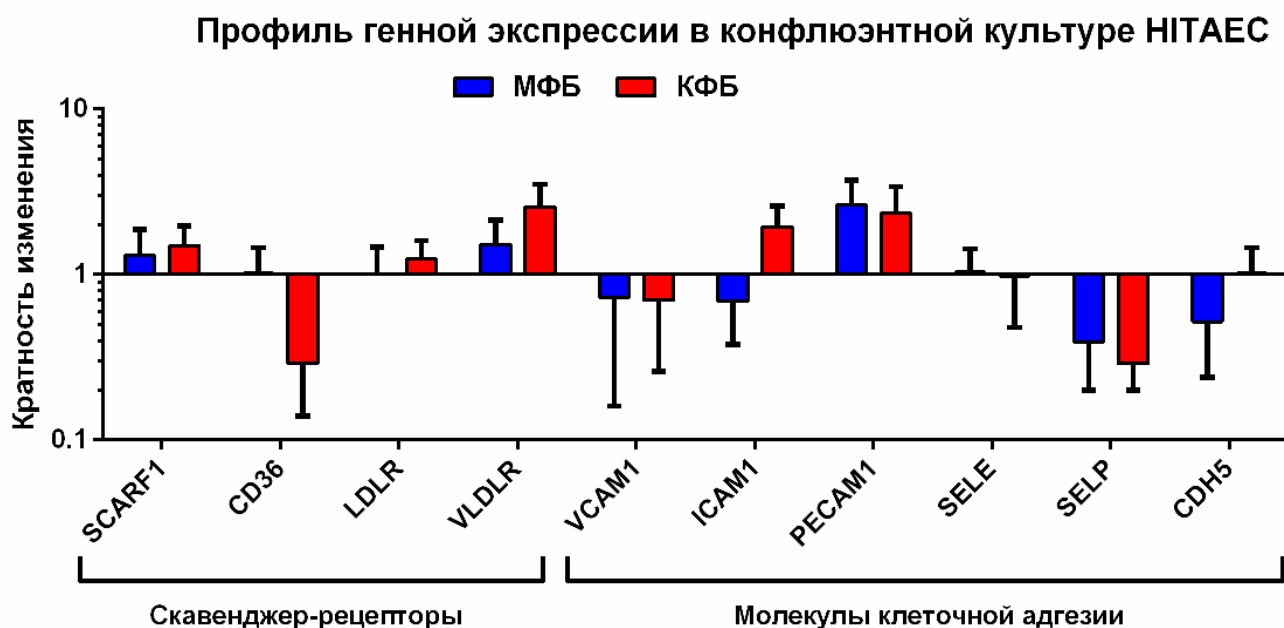


Рисунок 50 – Профиль генной экспрессии первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (НІТАЕС) под воздействием МФБ и КФБ (нормализация относительно чистого ФСБ и генов «домашнего хозяйства»)

В результате проведенного эксперимента было установлено, что КФБ вызывают однонаправленные эффекты, проявляющиеся в увеличении экспрессии гена *ICAM1*, кодирующего одноименную молекулу клеточной адгезии, и снижении экспрессии генов *SELP* и *CD36* в культурах эндотелиальных клеток двух артерий – коронарной (поражаемой атеросклерозом) [51] и внутренней грудной (относительно устойчивой к развитию атеросклероза) [183]. Интересным является тот факт, что ген *SELP*, кодирующий белок Р-селектин, характеризовался сниженной экспрессией в культурах артериальных эндотелиальных клеток, экспонированных бионами, несмотря на свидетельства о его роли как маркера атеросклероза [128].

Другим механизмом патогенного действия бионов может являться изменение функциональной активности скавенджер-рецепторов, которые локализуются на поверхности клетки и отвечают за распознавание и удаление не только модифицированных липопротеинов, но и целого ряда других агентов, обладающих повреждающим действием на эндотелий [37]. В проведенном

эксперименте только ген *CD36*, кодирующий один из отвечающих за связывание липопротеинов низкой плотности скавенджер-рецептор [116], экспрессировался значительно слабее в культурах первичных артериальных эндотелиальных клеток, экспонированных КФБ.

Резюме

КФБ, но не МФБ, обладают патогенным действием на иммортализованные венозные эндотелиальные клетки человека линии EA.hy 926, а также первичные эндотелиальные клетки коронарной и внутренней грудной артерии. При помощи СЭМ в обратно-рассеянных электронах после добавления МФБ и КФБ к эндотелиальным клеткам была детектирована интактная клеточная мембрана и многочисленные черные электронно-плотные включения в цитоплазме, отражающие интернализацию МФБ и КФБ. Конфокальная микроскопия после конъюгации бионов с флюорофорами позволила определить, что после интернализации МФБ и КФБ оказываются в лизосомах. Добавление в культуральную среду ингибитора вакуолярной H^+ -АТФазы бафиломицина А1 позволяло эндотелиальным клеткам избежать индуцируемой малорастворимыми КФБ гибели независимо от его дозы и времени экспозиции, при этом высокорастворимые МФБ не обладали патогенным действием независимо от добавления бафиломицина А1. Экспозиция КФБ вызывала лизосомально-опосредованную клеточную гибель эндотелиальных клеток вследствие массивного выделения в цитозоль опосредованно активирующих каспазы ионов кальция, при этом добавление МФБ к клеткам не оказывало значимого повреждающего действия. Выявлено, что КФБ, в отличие от МФБ, повышают как экспрессию генов *IL6* и *IL8*, так и выделение соответствующих цитокинов культурами эндотелиальных клеток. Таким образом, патогенность КФБ для культур эндотелиальных клеток определяется их минеральным составом

(гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит), вызываемой ими лизосомально-опосредованной клеточной гибелью после интернализации и выделением провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в микроокружение.

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ КФБ И МФБ *IN VIVO*

Существуют два основных механизма возникновения гипертрофии интимы. Первый механизм предполагает, что факторы сердечно-сосудистого риска инициируют повреждение эндотелия и каскад провоспалительных событий, что приводит к инфильтрации интимы моноцитами, впоследствии дифференцирующимися в макрофаги, которые поглощают окисленные липопротеины низкой плотности, образуя пенистые клетки [26, 75, 92, 166]. В дальнейшем происходит деградация базальной мембраны вследствие действия матриксдеградирующих ферментов; поврежденный эндотелий и макрофаги синтезируют множество хемокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию гладкомышечных клеток из меди и фибробластов из адвентиции в интиму с их дальнейшей пролиферацией и постепенным переходом на синтетический фенотип, сопровождающийся активным синтезом ими белков экстрацеллюлярного матрикса, что в конечном счете приводит к образованию неоинтимы [75, 79, 166, 185]. Таким образом, целостность и функциональная активность эндотелия играют ключевую роль в его устойчивости к атерогенезу [26, 75, 92, 166]. По второму механизму воспаление сосуда начинается с адвентиции и постепенно переходит на медию и интиму. В пользу существования второго механизма свидетельствует значительное количество макрофагов и лимфоцитов, локализованных в адвентиции [100, 108].

Для моделирования повреждения интимы была применена классическая модель ангиопластики брюшной аорты [2]. В проведенном эксперименте через пять недель после введения бионов в хвостовую вену крыс в предварительно поврежденных баллоном участках брюшных аорт было отмечено отсутствие выраженного ремоделирования у крыс, которым были внутривенно введены МФБ, и наличие гипертрофии интимы у крыс, которым внутривенно вводились КФБ (рисунок 51).



Рисунок 51 – Окрашивание брюшных аорт крыс гематоксилин-эозином с фокусом на неоинтиму. Увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу – $\times 200$

Окрашивание ализариновым красным исследуемых участков брюшных аорт показало полное отсутствие кальцификации во всех образцах, еще раз подтвердив гипотезу о том, что патогенное действие КФБ обусловлено их эндотелиотоксичностью, а не прямой кальцификацией сосудистых тканей (рисунок 52).



Рисунок 52 – Окрашивание брюшных аорт крыс ализариновым красным. Увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу – $\times 200$

Окрашивание на коллаген и эластин (по Вейгерту-ван Гизону) позволило провести детекцию внутренней эластической мембраны, которая отделяет внутреннюю оболочку артерий (интиму) от средней оболочки (медии), и таким образом подтвердить гипертрофию интимы брюшной аорты у крыс, которым внутривенно вводились КФБ, в то время как введение МФБ не оказывало патогенного действия (рисунок 53).

Окрашивание по Вейгерту-ван Гизону



Рисунок 53 – Окрашивание брюшных аорт крыс по Вейгерту-ван-Гизону. Увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу – $\times 200$

Пентахромное окрашивание на фибрин и все компоненты сосудистой ткани (коллаген, эластин, гладкую мышечную ткань и основное вещество) по Расселлу-Мовату позволило подтвердить локализацию внутренней эластической мембраны и оценить состояние всех компонентов сосудистой стенки в отдельности (рисунок 54).

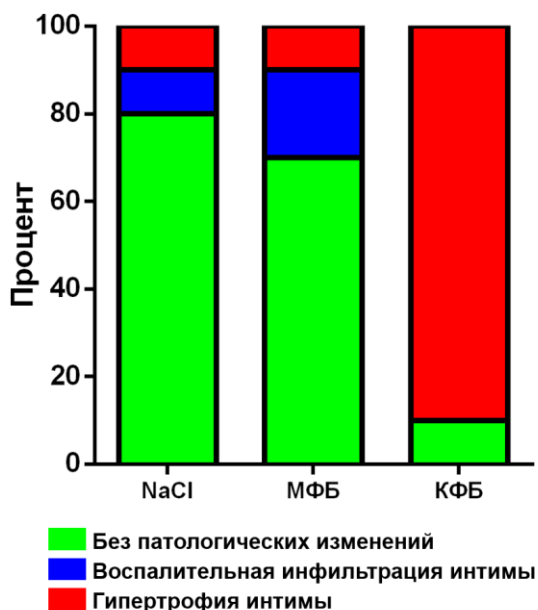
Окрашивание по Расселлу-Мовату



Рисунок 54 – Окрашивание брюшных аорт крыс по Расселлу-Мовату. Увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу – $\times 200$

Качественная и количественная оценка гипертрофии интимы показала, что частота и выраженность патологического ремоделирования сосудистой стенки (в частности, гипертрофии интимы) брюшной аорты у животных, которым внутривенно вводили КФБ, многократно и статистически значимо отличалась как от контрольной группы крыс, которым вводили физиологический раствор, так и от животных, которым вводили МФБ (рисунок 55).

Общий анализ ремоделирования



Оценка гипертрофии интимы

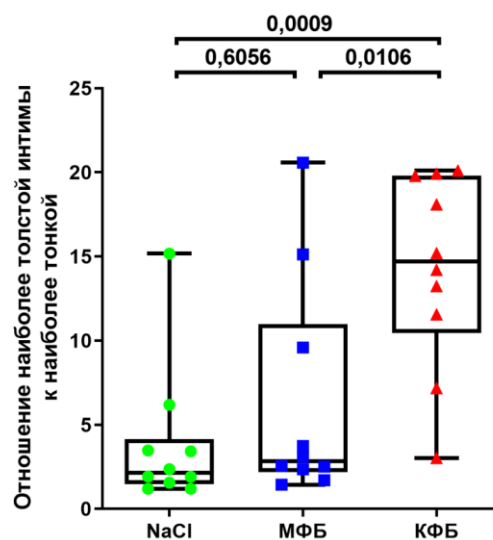


Рисунок 55 – Анализ степени ремоделирования сосудистой стенки брюшной аорты крыс. NaCl – 0,9% раствор NaCl, МФБ - магний-фосфатные бионы, КФБ – кальций-фосфатные бионы

При сочетанном окрашивании на CD31 и CD34 был выявлен монослой CD31⁺CD34⁻ клеток, указывающий на то, что реэндотелизация брюшной аорты после повреждения баллоном в ходе ангиопластики и последующей внутривенной инъекции бионов осуществляется по механизму миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток с неповрежденного эндотелия, а не по механизму адгезии и дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока. Сочетанное окрашивание на CD31 и α -ГМА выявило значительное количество CD31⁻ α -ГМА⁺ клеток, свидетельствующих о том, что гипертрофия интимы обусловлена миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток из меди, в то время как сочетанное окрашивание на виментин и α -ГМА также показало присутствие миофибробластов (виментин- и α -ГМА-положительных клеток), предположительно образовавшихся в результате активации фибробластов базальной мембраны и мигрировавших фибробластов адвентиции. При сочетанном окрашивании на α -ГМА и коллаген IV типа обнаружено, что

неоинтима содержит большое количество коллагена IV типа, локализованного в экстрацеллюлярном матриксе вокруг клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и миофибробластов), детектируя их синтетическую активность (рисунок 56).

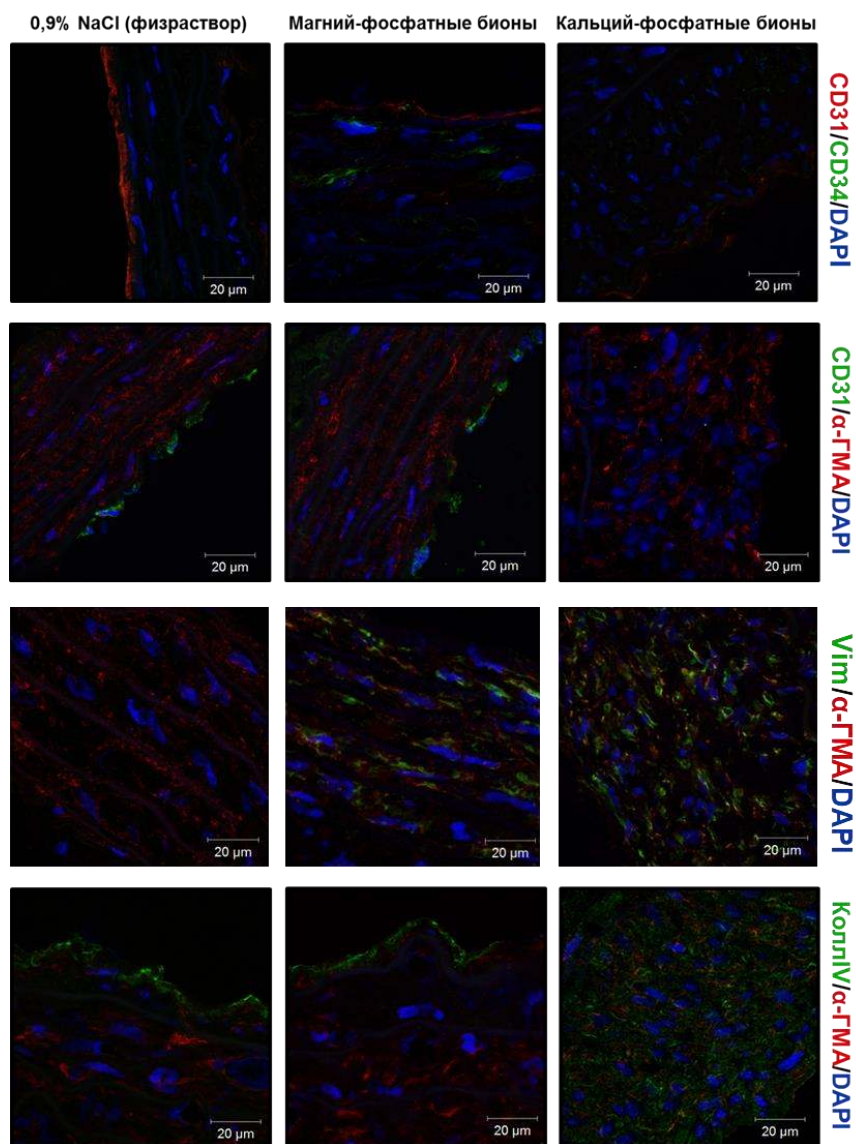


Рисунок 56 – Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов брюшных аорт крыс. CD31 – маркер зрелых эндотелиальных клеток, CD34 – маркер эндотелиальных прогениторных клеток, α -гладкомышечный актин (α -ГМА) – маркер гладкомышечных клеток, виментин (Vim) – маркер фибробластов, коллаген IV типа (КоллIV) – маркер экстрацеллюлярного матрикса, DAPI – ядерный краситель 4',6-диамидино-2-фенилиндол

Поскольку внутривенное введение КФБ после ангиопластики брюшной аорты вызывало гипертрофию интимы, характеризующуюся большим количеством гладкомышечных клеток, миофибробластов и белка экстрацеллюлярного матрикса коллагена IV типа в неоинтимае, можно предположить, что воздействие КФБ запускает по меньшей мере некоторые характерные для атерогенеза процессы. Присутствие коллагена IV типа, локализованного вокруг множественных гладкомышечных клеток и миофибробластов в неоинтимае, указывало на их синтетический фенотип, характерный для ранних стадий развития атеросклероза.

В ряде исследований говорилось о прогениторных (CD34⁺) клетках, циркулирующих в крови и обладающих способностью адгезироваться к поврежденным участкам эндотелия, где они дифференцируются в зрелые эндотелиальные клетки, тем самым играя ведущую роль в регенерации функционально активного эндотелия после повреждения [11, 57, 66, 133]. В то же время встречаются работы, показывающие, что процесс восстановления поврежденного эндотелия опосредован исключительно миграцией и пролиферацией зрелых (CD31⁺CD34⁻) эндотелиальных клеток с соседних участков здорового эндотелия [44, 72]. Выявленный монослой зрелых CD31⁺CD34⁻ клеток свидетельствует в пользу того, что реэндотелизация брюшной аорты крыс после ангиопластики и экспозиции поврежденного сегмента КФБ проходит именно по такому механизму репарации. При этом неоинтима также подвергалась реэндотелизации зрелыми CD31⁺CD34⁻ клетками.

При повреждении стенки сосуда со стороны просвета различными агентами первичный клеточный ответ поступает в том числе и со стороны адвентиции [108]. В результате воздействия различных провоспалительных молекул [173], поступающих из системного кровотока к *vasa vasorum* и лимфатическим сосудам адвентиции [86, 173], осуществляется активация адвентициальных фибробластов с формированием синтетически активных миофибробластов, их пролиферация и миграция из адвентиции в сторону просвета сосуда [6, 7], а также увеличивается количество макрофагов, лимфоцитов [141, 169] и *vasa vasorum* [49], что в

конечном счете ведет к образованию неоинтимы. Также стоит отметить, что при воспалении в адвентиции отмечается формирование скоплений лимфоцитов [108]. Увеличение количества *vasa vasorum* влечет за собой повышенную секрецию эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, способствующих прикреплению моноцитов к эндотелию и их миграции в интиму с последующей дифференцировкой в макрофаги и образованием пенистых клеток [108].

В ряде экспериментальных исследований стимуляция ангиогенными факторами приводило к разветвлению и истончению *vasa vasorum* по типу опухолевой микрососудистой сети и, соответственно, к формированию неоинтимы даже при отсутствии механического повреждения эндотелия; при этом ингибирование синтеза факторов роста приводило к нормализации микрососудистой сети [9, 154]. Увеличение количества *vasa vasorum* адвентиции обеспечивает эндотелиальный субстрат для эндотелиально-мезенхимального перехода. Благодаря этому процессу происходит миграция и накопление гладкомышечных клеток, что приводит к отложению экстрацеллюлярного матрикса, а также накоплению лейкоцитов и тромбоцитов из-за экспрессии различных молекул адгезии.

В брюшных аортах крыс, которым внутривенно вводили КФБ, было идентифицировано статистически значимо большее количество скоплений лимфоцитов, расположенных в адвентиции вдоль брюшной аорты (рисунок 57, 58). Экспозиция МФБ не оказала значимого повреждающего действия на брюшную аорту крыс, о чем свидетельствует сопоставимое с контрольной группой (0,9% NaCl) количество и площадь лимфоцитарных скоплений (рисунок 58).



Рисунок 57 – Окрашивание брюшных аорт крыс гематоксилин-эозином с фокусом на адвентиции. Увеличение $\times 50$, вставки в правом верхнем углу – $\times 200$

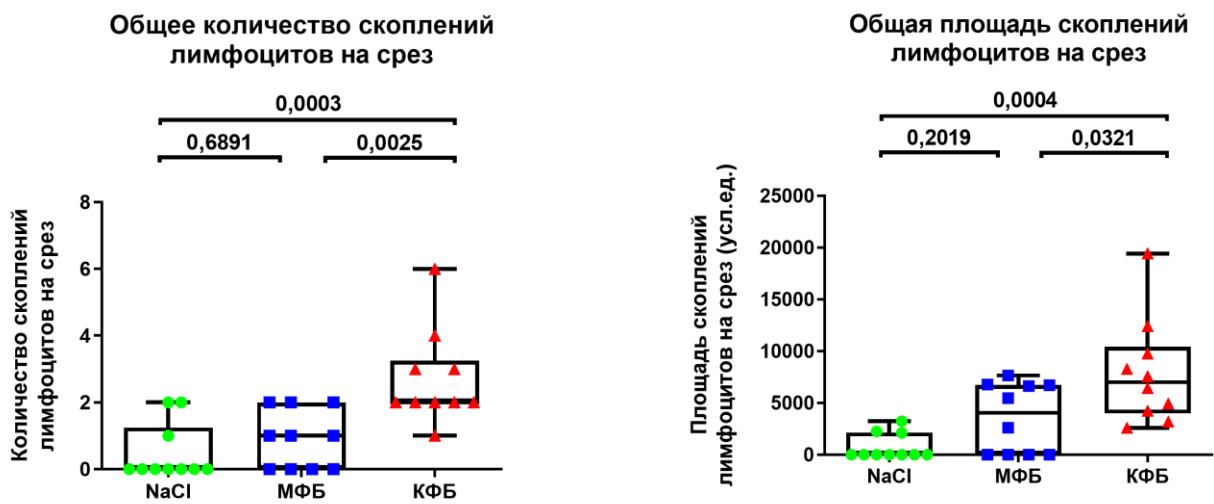


Рисунок 58 – Анализ количества и общей площади скоплений лимфоцитов в адвентиции в зависимости от типа бионов. NaCl – 0,9% раствор NaCl, МФБ – магний-фосфатные бионы, КФБ – сферические кальций-фосфатные бионы

Обнаружено, что при наличии гипертрофии интимы количество и площадь лимфоцитарных скоплений в адвентиции увеличивается независимо от типа бионов, что подтверждает их связь с развитием сосудистого воспаления (рисунок 59).

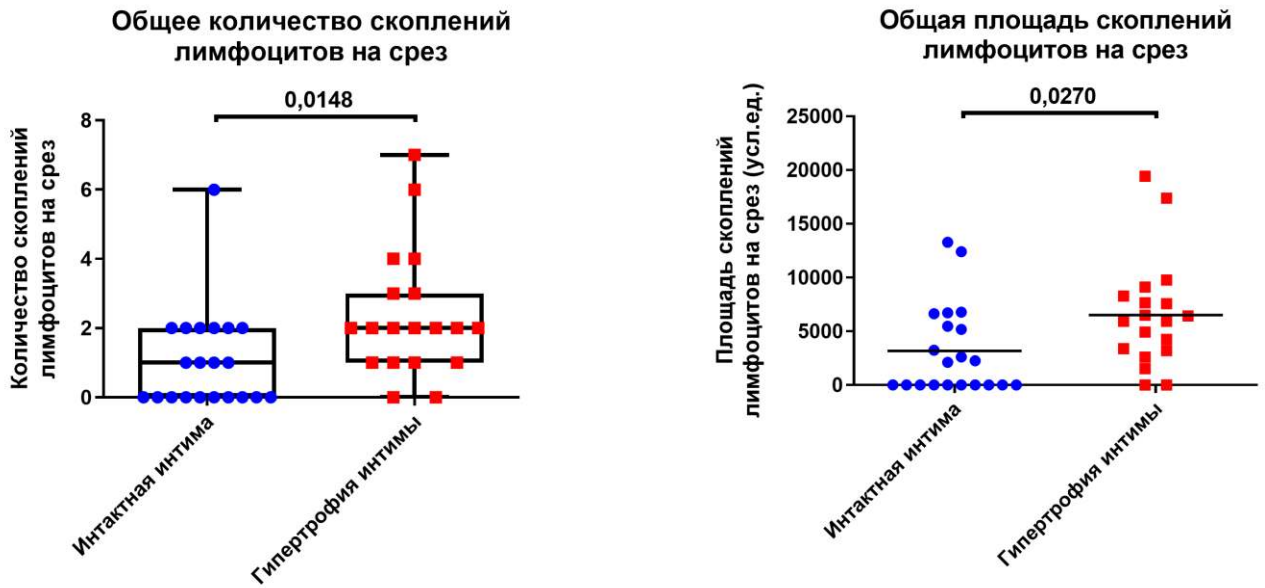


Рисунок 59 – Анализ количества и общей площади скоплений лимфоцитов в адвентиции сосудов с интактной интимой и гипертрофией интимы независимо от типа бионов

Визуализируемые в выполненном эксперименте скопления лимфоцитов, расположенные в адвентиции, выступают в качестве депо лимфоцитов, ответственных за воспалительный ответ. Единичное присутствие скоплений лимфоцитов в адвентиции крыс, которым внутривенно вводили 0,9% NaCl и МФБ, можно объяснить механическим повреждением эндотелия в процессе баллонной ангиопластики. В то же время в адвентиции крыс, брюшные аорты которых экспонировались КФБ, визуализировались множественные скопления лимфоцитов. Общая площадь лимфоцитарных скоплений достоверно увеличивалась в группе КФБ, что, вероятнее всего, связано с дополнительным к механическому повреждению повреждающим действием КФБ на сосуд. Например, при баллонной ангиопластике коронарных артерий свиней было показано, что именно адвентиция является основным местом для развития острого воспаления после механического повреждения сосуда [119]. В клинической практике у пациентов с тяжелым коронарным атеросклерозом воспалительная клеточная инфильтрация начинается с адвентиции и постепенно

переходит на гипертрофированный участок интимы с параллельным формированием адвентициальных скоплений лимфоцитов [58].

Резюме

Выявлено, что даже однократное внутривенное введение КФБ, но не МФБ, при индуцированном повреждении брюшной аорты вызывает развитие гипертрофии интимы и ассоциированное с ней воспаление адвентиции (формирование скоплений лимфоцитов), характерные для начальных стадий развития атеросклероза. Формирование неоинтимы в аорте связано с индуцированным КФБ повреждением эндотелия, что запускает сдвиг фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактного (для гладкомышечных клеток) и неактивного (для фибробластов) на синтетический и сопровождается обильным формированием данными клетками экстрацеллюлярного матрикса. Отсутствие выраженных патологических изменений в аорте при внутривенном введении МФБ даже после ее предварительного повреждения в результате ангиопластики доказывает специфичность патогенного действия КФБ *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из эпидемиологических исследований известно, что перенасыщение крови ионами кальция и фосфора ассоциировано с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца, острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболеваниями периферических артерий) [36, 48, 99, 148, 149]. Ингибирование характерной для атеросклероза эктопической кальцификации происходит по различным механизмам: к примеру, альбумин связывает ионы кальция посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, а фетуин-А связывает фосфаты за счет отрицательных зарядов β -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [158]. В свою очередь, связывание фосфата кальция фетуином-А также осуществляется по двум различным механизмам. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция [70], а вторым – формирование КФБ, представляющих собой кристаллические частицы гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита от 80 до 500 нм в диаметре [10, 22, 70].

Ранее было продемонстрировано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, но не из устойчивых к развитию атеросклероза внутренних грудных артерий [10]. При этом искусственно синтезированные КФБ были морфологически и химически идентичны выделенным из атеросклеротических бляшек [10]. Серия экспериментов *in vitro* и *in vivo* показала, что патогенное воздействие КФБ на сосуды определяется именно их патогенным действием на эндотелий, а не прямой кальцификацией сосудистой ткани или нарушением структуры и функции альбумина и фетуина-А [10]. Тем не менее, механизм патогенного действия КФБ до настоящего времени оставался неясным.

В данной работе были синтезированы и охарактеризованы МФБ, идентичные КФБ по физическим (форма, структура, размерность) и химическим свойствам (поверхностный заряд, минеральный и органический состав), однако состоящие из легкорастворимого магнезия фосфат гидрата, а не из характерного для КФБ малорастворимого гидроксиапатита. По этой причине МФБ были выбраны в качестве подходящей группы сравнения для оценки механизма патогенного действия КФБ на эндотелий.

КФБ, в отличие от МФБ, вызывали гибель как первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека (Cell Applications), так и immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Устойчивость культур к повреждающему действию КФБ определялась степенью их конфлюэнтности (конфлюэнтные культуры были более устойчивы, чем разреженные) и типом клеточной линии (эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии продемонстрировали более высокую устойчивость в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии).

Оба типа бионов поглощались эндотелиальными клетками человека уже через 1 час после их добавления к культурам и были локализованы в лизосомах; спустя 4 часа после добавления КФБ наблюдалось выделение ионов кальция из лизосом в цитозоль, сопровождавшееся многократным повышением уровня расщепленных форм каспазы-3 и ее субстрата PARP-1. Добавление в культуральную среду ингибитора вакуолярной H^+ -АТФазы бафиломицина А1, препятствующего ацидификации лизосомального содержимого, позволяло эндотелиальным клеткам избежать индуцируемой малорастворимыми КФБ гибели независимо от дозы препарата и времени экспозиции. В то же время легкорастворимые МФБ не обладали повреждающим действием независимо от добавления бафиломицина А1.

При воздействии бионов на immortalized венозные эндотелиальные клетки и первичные эндотелиальные клетки коронарной и внутренней грудной артерии человека МФБ не вызывали изменения уровня выделяемых эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов, в то время как КФБ

индуцировали как повышение концентрации выделяемых ИЛ-6 и ИЛ-8, так и увеличение экспрессии кодирующих их генов *IL6* и *IL8* в сравнении с контрольной культурой.

Внутривенное введение КФБ, но не МФБ после механического повреждения брюшной аорты крыс баллоном для коронарной ангиопластики вызывало ее гипертрофию (формирование неоинтимы), которая была обусловлена изменением фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактильного (для гладкомышечных клеток) и неактивного (для фибробластов) на синтетический. Каскад провоспалительных событий запускался со стороны как внутренней, так и внешней оболочки аорты, что выражалось в увеличении количества скоплений лимфоцитов в адвентиции.

Отсутствие эндотелиотоксических или провоспалительных эффектов у МФБ при их добавлении к иммортализованным венозным и первичным артериальным эндотелиальным клеткам, а также при их внутривенном введении крысам даже при предварительном повреждении брюшной аорты демонстрирует специфичность патогенного воздействия КФБ на эндотелий, что связано с механизмом их патогенности на субклеточном уровне. После интернализации эндотелиоцитами как КФБ, так и МФБ оказываются в лизосомах, однако при растворении состоящих из гидроксиапатита КФБ в кислой лизосомальной среде из лизосом в цитозоль выделяется значительное количество ионов кальция, что опосредованно через повышение проницаемости внешней мембраны митохондрий активирует эффекторные каспазы. Данный механизм нарушается при добавлении к клеткам специфичного ингибитора вакуолярной H^+ -АТФазы бафиломицина А1, который препятствует ацидификации лизосом и, следовательно, растворению в них КФБ. В то же время при растворении содержащих незначительное количество кальция и состоящих из магний фосфат гидрата МФБ выделения ионов кальция из лизосом в цитозоль не происходит, что обуславливает отсутствие цитотоксичности данного типа наночастиц независимо от добавления бафиломицина А1.

В целом предложенный механизм патогенного действия КФБ на эндотелий можно представить следующим образом: перенасыщение сыворотки крови ионами Ca^{2+} и PO_4^{3-} в совокупности с нейтрализующим их белком фетуином-А приводит к самопроизвольной агрегации КФБ в крови. КФБ физически повреждают артериальный эндотелий в результате интернализации в клетку, способствуя образованию неоинтимы, характеризующейся инфильтрацией моноцитами/макрофагами, а также миграцией гладкомышечных клеток, что сопровождается продукцией внеклеточного матрикса. Этот процесс способствует развитию адвентициального воспаления (увеличивается количество и площадь скоплений лимфоцитов). После интернализации эндотелиальными клетками, КФБ инициируют их гибель вследствие массивного выделения в цитоплазму опосредованно активирующих каспазы ионов Ca^{2+} , вызывая лизосомально-зависимую клеточную смерть и способствуя выделению цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 (рисунок 60).

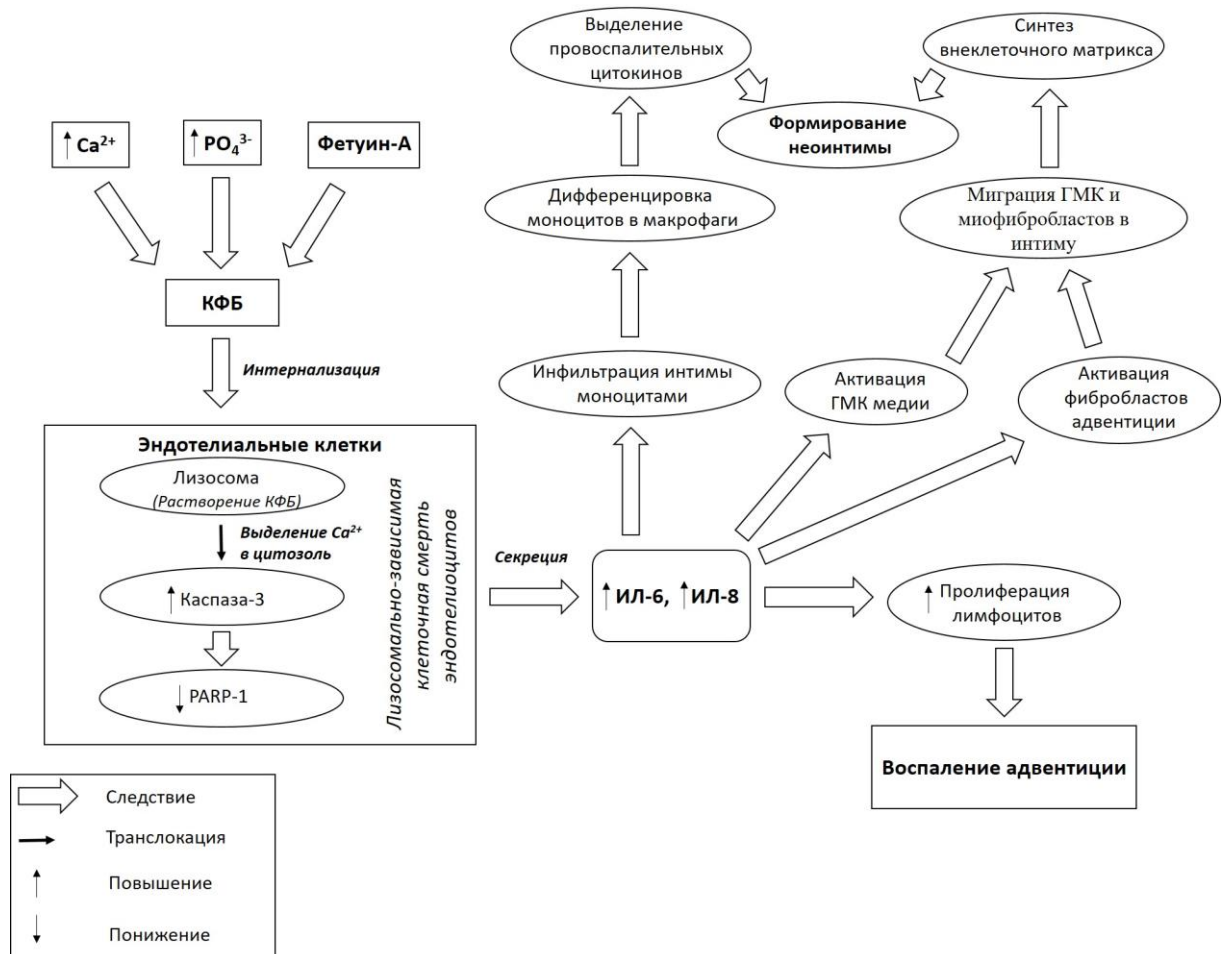


Рисунок 60 – Схема патогенного действия КФБ на эндотелиальные клетки

Выявленный механизм патогенного действия КФБ свидетельствует о возможной перспективности разработки препаратов, направленных на их дезинтеграцию в системном кровотоке. Ранее в одном из клинических испытаний была продемонстрирована определенная эффективность внутривенного введения динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в течение года (40 инъекций) с целью вторичной профилактики ишемической болезни сердца [18, 167]. В частности, было показано, что данный режим терапии на 18% снижает вероятность наступления комбинированной конечной точки (смерть, повторный инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, необходимость в коронарной реваскуляризации или госпитализации по поводу стенокардии) в течение последующих 5 лет, при этом в когорте пациентов с сахарным диабетом такая терапия позволяла снизить риск наступления данных исходов на 41%, в том числе летального исхода – на 43% [18]. Результаты проведенных экспериментов позволяют представить патогенетическое обоснование эффективности указанного протокола, применимость которого в клинической практике ограничена вследствие низкой биодоступности этилендиаминтетрауксусной кислоты из желудочно-кишечного тракта. Тем не менее, нельзя исключать возможности разработки новых препаратов с хелатирующим действием, которые могут быть апробированы для первичной и вторичной профилактики связанных с атеросклерозом сердечно-сосудистых заболеваний на основании дезинтеграции ими специфического триггера повреждения эндотелия.

ВЫВОДЫ

1. КФБ и МФБ имеют идентичные морфологические свойства (форму, структуру, размерность), органический и минеральный состав, за исключением различий в содержании магния и кальция, а также компонентов неорганической составляющей (малорастворимый гидроксиапатит в КФБ и легкорастворимый магниевый фосфат гидрат в МФБ).

2. Патогенное действие КФБ для культур эндотелиальных клеток определяется их минеральным составом, а не корпускулярной природой. Добавление КФБ к культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток и иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека вызывает их гибель и сопровождается увеличением выделения провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, при этом экспозиция МФБ не оказывает патогенного действия.

3. Как КФБ, так и МФБ интернализируются эндотелиальными клетками, оказываясь в лизосомах, однако исключительно КФБ инициируют гибель клеток вследствие своего растворения в кислой среде лизосом и последующего выделения в цитозоль опосредованно активирующих каспазы ионов кальция. В свою очередь, МФБ не обладают повреждающим действием на эндотелиальные клетки, поскольку при их растворении в лизосомах не происходит выделения ионов кальция.

4. КФБ, в отличие от МФБ, вызывают развитие гипертрофии интимы и воспаления адвентиции брюшной аорты крыс при ее предварительном механическом повреждении. Формирование данных патологических изменений характеризуется сдвигом фенотипа клеток мезенхимального ряда в неоинтиму с контрактильного и неактивного на синтетический.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ИЛ – интерлейкин

КФБ – кальций-фосфатные бионы

МкФ – стандарт МакФарланда

МФБ – магний-фосфатные бионы

ОП – оптическая плотность

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

cCasp-3 – cleaved caspase-3 (расщепленная каспаза-3)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

cPARP-1 – расщепленная поли (АДФ-рибоза) полимеразы

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидино-2-фенилиндол)

DMEM – среда Игла, модифицированная по Дульбекко

HCAEC – human coronary artery endothelial cells (первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека)

HITAEC – human internal thoracic endothelial cells (первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека)

α -ГМА – α -гладкомышечный актин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутихин, А. Г. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза / А. Г. Кутихин, М. Ю. Сеницкий, А. В. Понасенко // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – № 1 (6). – С. 92 – 101. DOI: 10.17802/2306–1278–2017–1–92–101
2. Экспериментальная модель ангиопластики аорты крысы баллонным катетером, выделяющим паклитаксел / М. А. Синьков, Д. Е. Филиппев, В. В. Севостьянова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 9 (156). – С. 392–395.
3. A novel fluorescent probe-based flow cytometric assay for mineral-containing nanoparticles in serum / E. R. Smith, T. D. Hewitson, M. M. X. Cai, et al. // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 5686. DOI: 10.1038/s41598-017-05474-y
4. A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study / C. N. Rochette, S. Rosenfeldt, A. Heiss, et al. // Chembiochem. – 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 735–740. DOI: 10.1002/cbic.200800719
5. A story told by a single nanoparticle in the body fluid: demonstration of dissolution-precipitation of nanocrystals in a biological system / C. Y. Wu, D. Young, J. Martel, et al. // Nanomedicine (Lond). – 2015. – Vol. 10, № 17. – P. 2659–2676. DOI: 10.2217/nnm.15.88
6. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries / Y. Shi, J. E. O'Brien, A. Fard, et al. // Circulation. – 1996. – Vol. 94, № 7. – P. 1655–1664. DOI: 10.1161/01.CIR.94.7.1655
7. Adventitial remodeling after coronary arterial injury / Y. Shi, M. Pieniek, A. Fard, et al. // Circulation. – 1996. – Vol. 93, № 2. – P. 340–348. DOI: 10.1161/01.CIR.93.2.340

8. Analysis of calcifications in patients with coral reef aorta / G. Schlieper, D. Grotemeyer, A. Aretz, et al. // *Ann Vasc Surg.* – 2010. – Vol. 24, № 3. – P. 408–414. DOI: 10.1016/j.avsg.2009.11.006
9. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia / R. Khurana., Z. Zhuang, S. Bhardwaj, et al. // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110, № 16. – P. 2436–2443. DOI: 10.1161/01.CIR.0000145138.25577.F1
10. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions / A. G. Kutikhin, E. A. Velikanova, R. A. Mukhamadiyarov, et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 27255. DOI: 10.1038/srep27255
11. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro / M. Hristov, W. Erl, S. Linder, et al. // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, № 9. – P. 2761–2766. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3614
12. Are nanotheranostics and nanodiagnosics-guided drug delivery stepping stones towards precision medicine? / R. Blau, A. Krivitsky, Y. Epshtein, et al. // *Drug Resist. Updat.* – 2016. – Vol. 27. – P. 39–58. DOI: 10.1016/j.drug.2016.06.003
13. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate / C. M. Shanahan, M. H. Crouthamel, A. Kapustin, et al. // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109, № 6. – P. 697–711. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234914
14. Assessing nanoparticle toxicity / S. A. Love, M. A. Maurer-Jones, J. W. Thompson, et al. // *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* – 2012. – Vol. 5. – P. 181–205. DOI: 10.1146/annurev-anchem-062011-143134
15. Association of calciprotein particles measured by a new method with coronary artery plaque in patients with coronary artery disease: A cross-sectional study / J. Nakazato, S. Hoshide, M. Wake, et al. // *J Cardiol.* – 2019. – May 15. pii: S0914-5087(19)30115-7. DOI: 10.1016/j.jjcc.2019.04.008
16. Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study / J. P. Linefsky, K. D. O'Brien, R.

Katz, et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2011. – Vol. 58, № 3. – P. 291–297. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.11.073

17. Atkins, G. B. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity / G. B. Atkins, M. K. Jain, A. Hamik // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 7. – P. 1476–1484. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.228999

18. Avila, M. D. Chelation therapy after the trial to assess chelation therapy: results of a unique trial / M. D. Avila, E. Escolar, G. A. Lamas // *Curr. Opin. Cardiol.* – 2014. – Vol. 29, № 5. – P. 481–488. DOI:10.1097/HCO.0000000000000096

19. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type $H^{(+)}$ -ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells / T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moriyama, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 26. – P. 17707–17712.

20. Berkner, K. L. Vitamin K-dependent carboxylation / K. L. Berkner // *Vitam. Horm.* – 2008. – Vol. 78. – P. 131–156. DOI: 10.1016/S0083-6729(07)00007-6

21. Biochemical transformation of calciprotein particles in uraemia / E. R. Smith, T. D. Hewitson, E. Hanssen, et al. // *Bone.* – 2018. – Vol. 110. – P. 355–367. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.023

22. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids / C. Y. Wu, L. Young, D. Young, et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, № 9. – P. e75501. DOI: 10.1371/journal.pone.0075501

23. Blood calcification propensity, cardiovascular events, and survival in patients receiving hemodialysis in the EVOLVE trial / A. Pasch, G. A. Block, M. Bachtler, et al. // *Clin J Am Soc Nephrol.* – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 315–322. DOI: 10.2215/CJN.04720416

24. Bowman, E. J. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells / E. J. Bowman, A. Siebers, K. Altendorf // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1988. – Vol. 85, № 21. – P. 7972–7976. DOI: 10.1073/pnas.85.21.7972

25. Brothers and sisters: molecular insights into arterial–venous heterogeneity / J. Aitsebaomo, A.L. Portbury, J.C. Schisler, et al. // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103, № 9. – P. 929–939. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184937
26. Cahill, P. A. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health / P.A. Cahill, E.M. Redmond // *Atherosclerosis.* – 2016. – Vol. 248. – P. 97–109. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007
27. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α / P. Aghagolzadeh, M. Bachtler, R. Bijarnia, et al. // *Atherosclerosis.*– 2016. – Vol. 251. – P. 404–414. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044
28. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients / C. A. Keyzer, M. H. de Borst, E. van den Berg, et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 239–248. DOI: 10.1681/ASN.2014070670
29. Calcifying nanoparticles promote mineralization in vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis / L. W. Hunter, J. E. Charlesworth, S. Yu, et al. // *Int J Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9. – P. 2689–2698. DOI: 10.2147/IJN.S63189
30. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment / S. U. Nigwekar, D. Kroshinsky, R. M. Nazarian et al. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2015. – Vol. 66, № 1. – P. 133–146. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.01.034
31. Calciprotein particle formation in peritoneal dialysis effluent is dependent on dialysate calcium concentration / M. M. X. Cai, E. R. Smith, A. Kent, et al. // *Perit Dial Int.* – 2018. – Vol. 38, № 4. – P. 286–292. DOI: 10.3747/pdi.2017.00163
32. Calcium phosphate crystals from uremic serum promote osteogenic differentiation in human aortic smooth muscle cells / Y. Liu, L. Zhang, Z. Ni. // *Calcif. Tissue Int.* – 2016. – Vol. 99, № 5. – P. 543–555. DOI: 10.1007/s00223-016-0182-y.
33. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization / A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, et al. // *Circ. Res.* –2008. – Vol. 103, № 5. – P. e28–e34. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181305

34. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity / Z. Liu, Y. Xiao, W. Chen, et al. // *J Mater Chem B*. – 2014. – Vol. 2. – P. 3480–3489. DOI: 10.1039/C4TB00056K
35. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization / A. N. Kapustin, J. D. Davies, J. L. Reynolds, et al. // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109, № 1. – P. e1–12. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.238808
36. Calcium–phosphate levels and cardiovascular disease in community–dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study / R.N. Foley, A.J. Collins, A. Ishani, et al. / *Am. Heart J.* – 2008. – Vol. 156, № 3. – P. 556–563. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.05.016
37. Canton, J. Scavenger receptors in homeostasis and immunity / J. Canton, D. Neculai, S. Grinstein // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, № 9. – P. 621–634. DOI: 10.1038/nri3515
38. Cellular clearance and biological activity of calciprotein particles depend on their maturation state and crystallinity / S. Köppert, A. Büscher, A. Babler, et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1991. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01991
39. Chang, J. C. Regulatory inhibition of biological tissue mineralization by calcium phosphate through post-nucleation shielding by fetuin-A / J. C. Chang, R. M. Miura // *J Chem Phys.* – 2016. – Vol. 144, № 15. – P. 154906. DOI: 10.1063/1.4946002
40. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria / J. D. Young, J. Martel, D. Young et al. // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, № 5. – P. e5421. DOI: 10.1371/journal.pone.0005421
41. Characterization of the calcification of cardiac valve bioprostheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy / C. Delogne, P. V. Lawford, S. M. Habesch, et al. // *J Microsc.* – 2007. – Vol. 228, Pt 1. – P. 62–77. DOI: 10.1111/j.1365–2818.2007.01824.x

42. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 162, № 1. – P. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
43. Chronic kidney disease circulating calciprotein particles and extracellular vesicles promote vascular calcification: a role for GRP (Gla-Rich Protein) / C. S. B. Viegas, L. Santos, A. L. Macedo, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2018. – Vol. 38, № 3. – P. 575–587. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310578
44. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury / M. K. Hagensen, M. K. Raarup, M. B. Mortensen, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – Vol. 93, № 2. – P. 211–212. DOI: 10.1093/cvr/cvr342
45. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A / M. Herrmann, C. Schäfer, A. Heiss, et al. // *Circ. Res.* – 2012. – Vol. 111, № 5. – P. 575–584. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261479
46. Collin-Osdoby, P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin / P. Collin-Osdoby // *Circ. Res.* – 2004. – Vol. 95, № 11. – P. 1046–1057.
47. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J. Martel, D. Young, A. Young, et al. // *Anal. Biochem.* – 2011. – Vol. 418, № 1. – P. 111–125. DOI: 10.1016/j.ab.2011.06.018
48. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community / T. E. Larsson, H. Olauson, E. Hagström, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30, № 2. – P. 333–339. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.196675
49. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia / J. Herrmann, L.O. Lerman, M. Rodriguez-Porcel, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – Vol. 51, № 4. – P. 762–766. DOI: 10.1016/S0008-6363(01)00347-9

50. Crystallinity of hydroxyapatite drives myofibroblastic activation and calcification in aortic valves / J. M. Richards, J. A. M. R. Kunitake, H. B. Hunt, et al. // *Acta Biomater.* – 2018. – Vol. 71. – P. 24–36. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.02.024
51. Current Understanding of Atherogenesis / R.A. Brown, E. Shantsila, C. Varma, et al. // *Am. J. Med.* – 2017. – Vol. 130, № 3. – P. 268–282. DOI: 10.1016/j.amjmed.2016.10.022
52. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent / X. Zhao, S. Ng, B. C. Heng, et al. // *Arch. Toxicol.* – 2013. – Vol. 87, № 6. – P. 1037–1052. DOI: 10.1007/s00204-012-0827-1
53. Daily variability in serum levels of calciprotein particles and their association with mineral metabolism parameters: A cross-sectional pilot study / H. Yamada, M. Kuro-O, S. E. Ishikawa, et al. // *Nephrology (Carlton)*. – 2018. – Vol. 23, № 3. – P. 226–230. DOI: 10.1111/nep.12994
54. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties / A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov, et al. // *Nanoscale Res Lett.* – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. 44. DOI: 10.1186/s11671-018-2457-x
55. Diethyl citrate and sodium citrate reduce the cytotoxic effects of nanosized hydroxyapatite crystals on mouse vascular smooth muscle cells / C. Y. Zhang, X. Y. Sun, J. M. Ouyang, et al. // *Int J Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 8511–8525. DOI: 10.2147/IJN.S145386
56. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats / P. A. Price, G. R. Thomas, A. W. Pardini, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 6. – P. 3926–3934.
57. Disrupted endothelial cell layer and exposed extracellular matrix proteins promote capture of late outgrowth endothelial progenitor cells / J. Zhao, C. G. Mitrofan, S. L. Appleby, et al. // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1406304. DOI: 10.1155/2016/1406304

58. Distribution of inflammatory cells in adventitia changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery / M. Watanabe, A. Sangawa, Y. Sasaki, et al. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2007. – Vol. 14, № 6. – P. 325–331. DOI: 10.5551/jat.E489
59. Edgell, C. J. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization / C. J. Edgell, C. C. McDonald, J. B. Graham // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1983. – Vol. 80, № 12. – P. 3734–3737.
60. Effect of disodium EDTA chelation regimen on cardiovascular events in patients with previous myocardial infarction: the TACT randomized trial / G. A. Lamas, C. Goertz, R. Boineau, et al. // *JAMA.* – 2013. – Vol. 309, № 12. – P. 1241–1250. DOI: 10.1001/jama.2013.2107
61. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts / Z. Xu, C. Liu, J. Wei, et al. // *J Appl Toxicol.* – 2012. – Vol. 32, № 6. – P. 429–435. DOI: 10.1002/jat.1745
62. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells / P. A. van Setten, V. W. van Hinsbergh, T. J. van der Velden, et al. // *Kidney Int.* – 1997. – Vol. 51, № 4. – P. 1245–1256.
63. Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the COST action EuroSoftCalcNet / M. Bäck, T. Aranyi, M.L. Cancela, et al. // *Front Cardiovasc Med.* – 2019. – Vol. 5. – P. 196. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00196
64. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state / U. Rauen, T. Noll, H. M. Piper, et al. // *Cryobiology.* – 1994. – Vol. 31, № 2. – P. 144–153.
65. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: a state of the art review / M. Veerasamy, A. Bagnall, D. Neely, et al. // *Cardiol Rev.* – 2015. – Vol. 23, № 3. – P. 119–129. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000047
66. Endothelial progenitor cell mobilization after percutaneous coronary intervention / S. Banerjee, E. Brilakis, S. Zhang, et al. // *Atherosclerosis.* – 2006. – Vol. 189, № 1. – P. 70–75. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.026

67. Expression and function of endothelial nitric oxide synthase messenger RNA and protein are higher in internal mammary than in radial arteries / G. W. He, L. Fan, K. L. Grove, et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2011. – Vol. 92, № 3. – P. 845–850. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.063
68. Extraosseous calcification in end-stage renal disease: from visceral organs to vasculature / F. M. Molenaar, F. E. van Reekum, M. B. Rookmaaker, et al. // *Semin Dial.* – 2014. – Vol. 27, № 5. – P. 477–487. DOI: 10.1111/sdi.12177
69. Fatty acids and small organic compounds bind to mineralo-organic nanoparticles derived from human body fluids as revealed by metabolomic analysis / J. Martel, C.Y. Wu, C.Y. Hung, et al. // *Nanoscale.* – 2016. – Vol. 8, № 10. – P. 5537–5545. DOI: 10.1039/c5nr08116e
70. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition / A. Heiss, V. Pipich, W. Jahnen-Dechent, et al. // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 99, № 12. – P. 3986–3995. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.10.030
71. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage / E. R. Smith, E. Hanssen, L. P. McMahon, et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e60904. DOI: 10.1371/journal.pone.0060904.
72. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy / M. K. Hagensen, J. Shim, E. Falk, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 808–813. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221184
73. Foreman, H. The metabolism of C14 labeled ethylenediaminetetraacetic acid in human beings / H. Foreman, T. T. Trujillo // *J. Lab. Clin. Med.* – 1954. – Vol. 43, № 4. – P. 566–571.
74. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure / I. Matsui, T. Hamano, S. Mikami, et al. // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75, № 9. – P. 915–928. DOI: 10.1038/ki.2008.700

75. Gimbrone, M.A. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis / M. A. Gimbrone, G. García-Cardena // *Circ. Res.* – 2016. – Vol. 118, № 4. – P. 620–636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
76. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system / C. S. Viegas, M. S. Rafael, J. L. Enriquez, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. 399–408. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304823
77. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / M. Naghavi, A. A. Abajobir, C. Abbafati, et al. // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390. – P. 1151–1210. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32152-9
78. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2011. DOI: 10.17226/12910
79. Hansson, G. K. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword / G. K. Hansson, P. Libby // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6, № 3. – P. 508–519. DOI: 10.1038/nri1882
80. Hauser, S. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research / S. Hauser, F. Jung, J. Pietzsch // *Trends Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35, № 3. – P. 265–277. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007
81. He, G. W. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries / G. W. He, Z. G. Liu // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104, № 12, Suppl 1. – P. I344–I349. DOI: 10.1161/hc37t1.094930.
82. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles / A. Heiss, T. Eckert, A. Aretz et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 21. – P. 14815–14825. DOI: 10.1074/jbc.M709938200

83. Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: proof of principle / M. A. Schwartz, J. C. Lieske, V. Kumar, et al. // *Int J Nanomedicine*. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 243–248.
84. Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via KEAP1/NRF2/NQO1 activation / P. Aghagolzadeh, R. Radpour, M. Bachtler, et al. // *Atherosclerosis*. – 2017. – Vol. 265. – P. 78–86. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.012
85. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease / Y. Miura, Y. Iwazu, K. Shiizaki, et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1256. DOI: 10.1038/s41598-018-19677-4
86. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution / M. Gössl, N. M. Malyar, M. Rosol, et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 5. – P. H2019–H2026. DOI: 10.1152/ajpheart.00399.2003
87. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6 / A. Callegari, M. L. Coons, J. L. Ricks, et al. // *J. Vasc. Res.* – 2014. – Vol. 51, № 2. – P. 118–131. DOI: 10.1159/000358920
88. Insights into the association of Gla-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and γ -carboxylation status / M. S. Rafael, S. Cavaco, C.S. Viegas, et al. // *Mol Nutr Food Res.* – 2014. – Vol. 58, № 8. – P. 1636–1646. DOI: 10.1002/mnfr.201300941
89. Interaction of hydroxyapatite nanoparticles with endothelial cells: internalization and inhibition of angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway / X. Shi, K. Zhou, F. Huang, et al. // *Int J Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 5781–5795. DOI: 10.2147/IJN.S140179
90. Internal mammary artery atherosclerosis: an ultrastructural study of two cases / I. Perrotta, A. Sciangula, G. Concistrè, et al. // *Ultrastruct Pathol.* – 2014. – Vol. 38, № 3. – P. 199–203. DOI: 10.3109/01913123.2013.868568

91. Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12 / S. Kumar, S. Kasseckert, S. Kostin, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 73, № 1. – P. 172–180. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.09.018
92. Jensen, H.A. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis / H. A. Jensen, J. L. Mehta // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2016. – Vol. 14, № 9. – P. 1021–1033. DOI: 10.1080/14779072.2016.1207527
93. Julien, O. Caspases and their substrates / O. Julien, J. A. Wells // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24, № 8. – P. 1380–1389. DOI: 10.1038/cdd.2017.44
94. Kleemann, R. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice / R. Kleemann, S. Zadelaar, T. Kooistra // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 79, № 3. – P. 360–376. DOI: 10.1093/cvr/cvn120
95. Kozera, B. Reference genes in real-time PCR / B. Kozera, M. Rapacz // *J. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 54, № 4. – P. 391–406. DOI: 10.1007/s13353-013-0173-x
96. Lai, D. Y. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward / D. Y. Lai // *Wiley Interdiscip Rev. Nanomed Nanobiotechnol.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 1–15. DOI: 10.1002/wnan.162
97. Liu, X. Potential proinflammatory effects of hydroxyapatite nanoparticles on endothelial cells in a monocyte-endothelial cell coculture model / X. Liu, J. Sun // *Int J Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1261–1273. DOI: 10.2147/IJN.S56298
98. Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study / M. Gaudino, A. Toesca, N. Maggiano, et al. // *Cardiovasc. Surg.* – 2003. – Vol. 125, № 6. – P. 1510–1515. DOI: 10.1016/S0022-5223(03)00029-1.
99. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses / J. Danesh, P. Whincup, M. Walker, et al. // *BMJ.* – 2000. – Vol. 321, № 7255. – P. 199–204. DOI: 10.1136/bmj.321.7255.199
100. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent / E. Galkina, A. Kadl, J. Sanders, et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, № 5. – P. 1273–1282. DOI: 10.1084/jem.20052205

101. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques / S. E. New, C. Goettsch, M. Aikawa, et al. // *Circ. Res.* – 2013. – Vol. 113, № 1. – P. 72–77. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301036
102. Mencke, R. The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology / R. Mencke, J. L. Hillebrands; NIGRAM consortium // *Ageing Res. Rev.* – 2017. – Vol. 35. – P. 124–146. DOI: 10.1016/j.arr.2016.09.001
103. Mesoporous hydroxyapatite as a carrier of olanzapine for long-acting antidepressant treatment in rats with induced depression / Y. J. Shyong, M. H. Wang, L. W. Kuo, et al. // *J Control Release.* – 2017. – Vol. 255. – P. 62–72. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.399
104. Mesoporous hydroxyapatite as olanzapine carrier provides a long-acting effect in antidepressant treatment / Y. J. Shyong, M. H. Wang, H. C. Tseng, et al. // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, № 21. – P. 8463–8474. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00714
105. Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model / T. Sonou, M. Ohya, M. Yashiro, et al. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2015. – Vol. 22, № 11. – P. 1197–1206. DOI: 10.5551/jat.28647
106. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, et al. // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
107. Moss, J. W. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets / J. W. Moss, D. P. Ramji // *Future Med Chem.* – 2016. – Vol. 8, № 11. – P. 1317–1330. DOI: 10.4155/fmc-2016-0072
108. Mulligan–Kehoe, M. J. Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries / M. J. Mulligan–Kehoe, M. Simons // *Circulation.* – 2014. – Vol. 129, № 24. – P. 2557–2566. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189

109. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification / S. Bertazzo, E. Gentleman, K. L. Cloyd, et al. // *Nat Mater.* – 2013. – Vol. 12, № 6. – P. 576 – 583. DOI: 10.1038/nmat3627
110. Natural and prosthetic heart valve calcification: morphology and chemical composition characterization / R. F. Weska, C. G. Aimoli, G. M. Nogueira, et al. // *Artif Organs.* – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 311–318. DOI: 10.1111/j.1525–1594.2009.00858.x
111. Old, new and emerging functions of caspases / S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, et al. // *Cell Death Differ.* – 2015. – Vol. 22, № 4. – P. 526–539. DOI: 10.1038/cdd.2014.216
112. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification / S. A. Steitz, M. Y. Speer, M. D. McKee, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161, № 6. – P. 2035–2046.
113. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis / H. Min, S. Morony, I. Sarosi, et al. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192, № 4. – P. 463–474.
114. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification / N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, et al. // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, № 9. – P. 1260–1268.
115. Paloian, N. J. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification / N. J. Paloian, E. M. Leaf, C. M. Giachelli // *Kidney Int.* – 2016. – Vol. 89, № 5. – P. 1027–1036. DOI: 10.1016/j.kint.2015.12.046
116. Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis / Y. M. Park // *Exp. Mol. Med.* – 2014. – Vol. 46. – P. e99. DOI: 10.1038/emm.2014.38
117. Patients with advanced chronic kidney disease and vascular calcification have a large hydrodynamic radius of secondary calciprotein particles / W. Chen, V. Anokhina, G. Dieudonne, et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2019. – Vol. 34, № 6. – P. 992–1000. DOI: 10.1093/ndt/gfy117

118. Peguero, J. G. Chelation therapy and cardiovascular disease: connecting scientific silos to benefit cardiac patients / J. G. Peguero, I. Arenas, G. A. Lamas // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 232–240. DOI: 10.1016/j.tcm.2014.06.002
119. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries / E. Okamoto, T. Couse, H. De Leon, et al. // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104, № 18. – P. 2228–2235. DOI: 10.1161/hc4301.097195
120. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29, № 9. – P. e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
121. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin / M. M. El-Abbadi, A. S. Pai, E. M. Leaf, et al. // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75, № 12. – P. 1297–1307. DOI: 10.1038/ki.2009.83
122. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids / H. H. Peng, C. Y. Wu, D. Young, et al. // *Small.* – 2013. – Vol. 9, № 13. – P. 2297–2307. DOI: 10.1002/smll.201202270
123. PRaTo: a web-tool to select optimal primer pairs for qPCR / A. Nonis, M. Scortegagna, A. Nonis, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 415, № 4. – P. 707–708. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.148
124. Price, P. A. Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex / P. A. Price, T. M. Nguyen, M. K. Williamson // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 24. – P. 22153–22160.
125. Price, P. A. Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: biochemical evidence for the cancellous bone-remodeling compartment / P. A. Price, J. M. Caputo, M. K. Williamson // *J. Bone Miner. Res.* – 2002. – Vol. 17, № 7. – P. 1171–1179.

126. Price, P. A. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex / P. A. Price, J. E. Lim // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 24. – P. 22144–22152.
127. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update / X. Wang, A. Spandidos, H. Wang, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – P. D1144 – D1149. DOI: 10.1093/nar/gkr1013
128. P-selectin and subclinical and clinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) / S. J. Bielinski, C. Berardi, P. A. Decker, et al. // *Atherosclerosis.* – 2015. – Vol. 40, № 1. – P. 3 – 9. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.036
129. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis / J.D. Young, J. Martel, L. Young, et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. e4417. DOI: 10.1371/journal.pone.0004417
130. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications / W. C. T. Matea, T. Mocan, F. Tabaran, et al. // *Int J Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 5421–5431. DOI: 10.2147/IJN.S138624
131. Ramji, D. P. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets / D. P. Ramji, T. S. Davies // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2015. – Vol. 26, № 6. – P. 673–685. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
132. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis / H. Ait-Oufella, S. Taleb, Z. Mallat, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, № 5. – P. 969–979. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207415
133. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair / C. Schmidt-Lucke, L. Rössig, S. Fichtlscherer, et al. // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111, № 22. – P. 2981–2987. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340
134. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community / R. Dhingra, L. M. Sullivan, C. S. Fox, et al. //

Arch. Intern. Med. – 2007. – Vol. 167, № 9. – P. 879–885. DOI: 10.1001/archinte.167.9.879

135. Relationship between circulating VCAM–1, ICAM–1, E–selectin and MMP9 and the extent of coronary lesions / J. C. D. Santos, M. S. Cruz, R. H. Bortolin, et al. // Clinics (Sao Paulo). – 2018. – Vol. 73. – P. e203. DOI: 10.6061/clinics/2018/e203

136. Role of calcifying nanoparticle in the development of hyperplasia and vascular calcification in an animal model / N. Cenizo Revuelta, J. A. Gonzalez-Fajardo, M. A. Bratos, et al. // Eur J Vasc Endovasc Surg. – 2014. – Vol. 47, № 6. – P. 640–646. DOI: 10.1016/j.ejvs.2014.03.002

137. Role of caspases in Ox–LDL–induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells / J. Chen, J.L. Mehta, N. Haider et al. // Circ. Res. – 2004. – Vol. 94, № 3. – P. 370–376. DOI: 10.1161/01.RES.0000113782.07824.BE

138. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness / A. L. Durham, M. Y. Speer, M. Scatena, et al. // Cardiovasc. Res. – 2018. – Vol. 114, № 4. – P. 590–600. DOI: 10.1093/cvr/cvy010

139. RTPrimerDB: the portal for real–time PCR primers and probes / S. Lefever, J. Vandesompele, F. Speleman, et al. // Nucleic Acids Res. – 2009. – Vol. 37. – P. D942–D945. DOI: 10.1093/nar/gkn777

140. Schurgers, L. J. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization / L. J. Schurgers, J. Uitto, C. P. Reutelingsperger // Trends Mol Med. – 2013. – Vol. 19, № 4. – P. 217–226. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.12.008

141. Sequential patterns of chemokine– and chemokine receptor–synthesis following vessel wall injury in porcine coronary arteries / A. Jabs, E. Okamoto, J. Vinten–Johansen, et al. // Atherosclerosis. – 2007. – Vol. 192, № 1. – P. 75–84. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.050

142. Serum calcification propensity and coronary artery calcification among patients with CKD: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) study / J. D.

Bundy, X. Cai, J. J. Scialla, et al. // *Am. J. Kidney Dis.* – 2019. – Vol. 73, № 6. – P. 806–814. DOI: 10.1053/j.ajkd.2019.01.024

143. Serum calcification propensity and fetuin-A: biomarkers of cardiovascular disease in kidney transplant recipients / A. Bostom, A. Pasch, T. Madsen, et al. // *Am. J. Nephrol.* – 2018. – Vol. 48, № 1. – P. 21–31. DOI: 10.1159/000491025

144. Serum calcification propensity is a strong and independent determinant of cardiac and all-cause mortality in kidney transplant recipients / D. O. Dahle, A. Asberg, A. Hartmann, et al. // *Am. J. Transplant.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 204–12. DOI: 10.1111/ajt.13443

145. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease / M. Pruijm, Y. Lu, F. Megdiche, et al. // *J. Hypertens.* – 2017. – Vol. 35, № 10. – P. 2044–2052. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001406

146. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD / E. R. Smith, M. L. Ford, L. A. Tomlinson, et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2014. – Vol. 25, № 2. – P. 339–348. DOI: 10.1681/ASN.2013060635

147. Serum calcium and cardiovascular risk factors and diseases: the Tromso study / R. Jorde, J. Sundsfjord, P. Fitzgerald, et al. // *Hypertension.* – 1999. – Vol. 34, № 3. – P. 484 – 490. DOI: 10.1161/01.HYP.34.3.484

148. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years / L. Lind, E. Skarfors, L. Berglund, et al. // *J Clin Epidemiol.* – 1997. – Vol. 50, № 8. – P. 967–973. DOI: 10.1016/S0895–4356(97)00104–2

149. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis / Z. L. Sun, Q. Y. Xie, G. L. Guo, et al. // *Biomed Res Int* – 2014. – № 2014. – P. 691540. DOI: 10.1155/2014/691540

150. Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat / P. A. Price, M. K. Williamson, T. M. Nguyen, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 3. – P. 1594–1600.

151. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells / B. Zhang, P. Sai Lung, S. Zhao, et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 7315. DOI: 10.1038/s41598-017-07588-9
152. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells / Y. Yuan, C. Liu, J. Qian, et al. // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, № 4. – P. 730–740. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.088
153. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis / S. Allahverdian, C. Chaabane, K. Boukais, et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2018. – Vol. 114, № 4. – P. 540–550. DOI: 10.1093/cvr/cvy022
154. Soluble Flt-1 gene transfer ameliorates neointima formation after wire injury in flt-1 tyrosine kinase-deficient mice / J. Koga, T. Matoba, K. Egashira, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29, № 4. – P. 458–464. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.183772
155. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein / G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 386, № 6620. – P. 78–81.
156. Srivastava, R. A. A novel anti-inflammatory natural product from *Sphaeranthus indicus* inhibits expression of VCAM1 and ICAM1, and slows atherosclerosis progression independent of lipid changes / R. A. Srivastava, S. Mistry, S. Sharma // *Nutr Metab (Lond).* – 2015. – Vol. 12. – P. 20. DOI: 10.1186/s12986-015-0018-1
157. Stothard, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences / P. Stothard // *Biotechniques.* – 2000. – Vol. 28, № 6. – P. 1102–1104. DOI: 10.7939/R3FQ9QK0V
158. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles / A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 15. – P. 13333–13341. DOI: 10.1074/jbc.M210868200
159. Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids / A. Heiss, W. Jahnen-Dechent,

H. Endo. et al. // *Biointerphases*. – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 16–20. DOI: 10.1116/1.2714924

160. Sun, X. Y. Calcium oxalate toxicity in renal epithelial cells: the mediation of crystal size on cell death mode / X. Y. Sun, Q. Z. Gan, J. M. Ouyang // *Cell Death Discov.* – 2015. – Vol. 1. – P. 15055. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.55

161. Sun, X. Y. Shape-dependent cellular toxicity on renal epithelial cells and stone risk of calcium oxalate dihydrate crystals / X. Y. Sun, J. M. Ouyang, K. Yu // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 7250. DOI: 10.1038/s41598-017-07598-7

162. Sun, X. Y. Size-dependent cellular uptake mechanism and cytotoxicity toward calcium oxalate on Vero cells / X. Y. Sun, Q. Z. Gan, J. M. Ouyang // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 41949. DOI: 10.1038/srep41949

163. Tabas, I. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis / I. Tabas, G. García-Cardena, G. K. Owens // *J. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 209, № 1. – P. 13–22. DOI: 10.1083/jcb.201412052

164. Tedgui, A. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways / A. Tedgui, Z. Mallat // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86, № 2. – P. 515–581. DOI: 10.1152/physrev.00024.2005

165. Tesfamariam, B. Involvement of vitamin K-dependent proteins in vascular calcification / B. Tesfamariam // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2019. – Vol. 24, № 4. – P. 323–333. DOI: 10.1177/1074248419838501

166. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis / A. Yurdagul, A. C. Finney, M. D. Woolard, et al. // *Biochem. J.* – 2016. – Vol. 473, № 10. – P. 1281–1295. DOI: 10.1042/BJ20150844

167. The effect of an EDTA-based chelation regimen on patients with diabetes mellitus and prior myocardial infarction in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT) / E. Escolar, G.A. Lamas, D.B. Mark, et al. // *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 15–24. DOI: 10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663

168. The effect of EDTA-based chelation on patients with diabetes and peripheral artery disease in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT) / F. Ujueta, I.

A. Arenas, E. Escolar, et al. // *J. Diabetes Complicat.* – 2019. – Vol. 33, № 7. – P. 490–494. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2019.04.005

169. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice / M. P. Moos, N. John, R. Gräbner, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25, № 11. – P. 2386–2391. DOI: 10.1161/01.ATV.0000187470.31662.fe

170. The role of secondary calciprotein particles in the mineralisation paradox of chronic kidney disease / M. M. X. Cai, E. R. Smith, S. J. Tan, et al. // *Calcif. Tissue Int.* – 2017. – Vol. 101, № 6. – P. 570–580. DOI: 10.1007/s00223-017-0313-0

171. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation / F. Lebre, R. Sridharan, M. J. Sawkins, et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 2922. DOI: 10.1038/s41598-017-03086-0

172. Thirty years of saying no: sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator / P. M. Vanhoutte, Y. Zhao, A. Xu, et al. // *Circ. Res.* – 2016. – Vol. 119, № 2. – P. 375–396. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306531

173. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury / J. B. Michel, O. Thaumat, X. Houard, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 6. – P. 1259–1268. DOI: 10.1161/ATVBAHA.106.137851

174. Tumour necrosis factor-alpha in uraemic serum promotes osteoblastic transition and calcification of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinases and activator protein 1/c-FOS-mediated induction of interleukin 6 expression / D. Zickler, C. Luecht, K. Willy, et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2018. – Vol. 33, № 4. – P. 574–585. DOI: 10.1093/ndt/gfx316

175. Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia / G. Schlieper, A. Aretz, S. C. Verberckmoes, et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 21, № 4. – P. 689 – 696. DOI: 10.1681/ASN.2009080829

176. Use of in vitro models of bovine corneal endothelial cells to determine the relative toxicity of viscoelastic agents / L. K. Nguyen, R. W. Yee, S. C. Sigler, et al. // *J Cataract Refract Surg.* – 1992. – Vol. 18, № 1. – P. 7–13.

177. Vascular biosafety of commercial hydroxyapatite particles: discrepancy between blood compatibility assays and endothelial cell behavior / C. Santos, S. Turiel, P. Sousa Gomes, et al. // *J Nanobiotechnology.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 27. DOI: 10.1186/s12951-018-0357-y

178. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion / A. N. Kapustin, M. L. Chatrou, I. Drozdov, et al. // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, № 8. – P. 1312–1323. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012

179. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification / V. P. Iyemere, D. Proudfoot, P. L. Weissberg, et al. // *J. Intern. Med.* – 2006. – Vol. 260, № 3. – P. 192–210. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x

180. Very low protein diet enhances inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremic rats / S. Yamada, M. Tokumoto, N. Tatsumoto, et al. // *Life Sci.* – 2016. – Vol. 146. – P. 117–123. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.050

181. Vissers, M. C. Fatty acid chlorohydrins and bromohydrins are cytotoxic to human endothelial cells / M. C. Vissers, A. C. Carr, C. C. Winterbour // *Redox Rep.* – 2001. – Vol. 6, № 1. – P. 49–55. DOI: 10.1179/135100001101536030

182. Walford, G. Nitric oxide in vascular biology / G. Walford, J. Loscalzo // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – Vol. 1, № 10. – P. 2112–2118. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00345.x

183. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? / F. Otsuka, K. Yahagi, K. Sakakura, et al. // *Ann Cardiothorac Surg.* – 2013. – Vol. 2, № 4. – P. 519–526. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.

184. Wu, C. Y. Comprehensive organic profiling of biological particles derived from blood / C. Y. Wu, J. Martel, J. D. Young // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 11310. DOI: 10.1038/s41598-018-29573-6

185. Xu, J. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases / J. Xu, G. P. Shi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1842, № 11. – P. 2106–2119. DOI:10.1016/j.bbadis.2014.07.008

186. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase / M. Tewari, L. T. Quan, K. O'Rourke, et al. // *Cell.* – 1995. – Vol. 81, № 5. – P. 801–809.