

УДК 616-092

Типы гибели эндотелиальных клеток при воздействии физиологических и супрафизиологических концентраций кальций-фосфатных бионов

Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

Актуальность. Формирующиеся при перенасыщении крови ионами кальция и фосфора и циркулирующие в кровотоке кальций-фосфатные бионы (КФБ) вызывают дисфункцию эндотелия вследствие гибели части артериальных эндотелиальных клеток (ЭК). **Цель исследования.** Оценить типы гибели первичных артериальных ЭК человека под воздействием физиологических и супрафизиологических концентраций сферических КФБ (СКФБ) и игольчатых КФБ (ИКФБ). **Материалы и методы.** К конфлюэнтным культурам первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека в 96-луночных планшетах были добавлены равные объемы (10 мкл на лунку) суспензий СКФБ и ИКФБ с оптической плотностью 0,08-0,10 (физиологическая концентрация) или 0,42-0,45 (супрафизиологическая концентрация) на длине волны 650 нм. Во всех экспериментальных группах также производилось селективное ингибирование каспазы-3 (Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK, 100 мкмоль/л) или ингибирование всех каспаз (Z-VAD(OMe)-FMK, 100 мкмоль/л) для оценки типа клеточной гибели (регулируемая или моментальная). Жизнеспособность клеток определялась посредством последовательного колориметрического определения их метаболической активности через 4, 24 и 48 часов после добавления КФБ. **Результаты.** При добавлении супрафизиологических концентраций КФБ уже на первой временной точке большинство (60-85%) эндотелиальных клеток погибло вне зависимости от типа добавленных КФБ и воздействия ингибиторов каспаз, при этом через 24 и 48 часов экспозиции ингибиторы каспаз оказывали некоторое цитопротективное действие на незначительное количество выживших клеток. При добавлении физиологических концентраций КФБ ингибиторы каспаз оказывали выраженное цитопротективное действие через 24 и 48 часов экспозиции, при этом ИКФБ демонстрировали существенно более высокую токсичность для ЭК в сравнении с СКФБ. Независимо от временной точки пан-каспазный ингибитор оказывал значительно более выраженное цитопротективное действие по сравнению с селективным ингибитором каспазы-3, что свидетельствует о кумулятивном эффекте ингибирования каспаз, возникающем, вероятно, вследствие запуска внутреннего пути апоптоза. **Заключение.** В супрафизиологических концентрациях КФБ вызывают моментальную гибель абсолютного большинства ЭК, однако в физиологических концентрациях ингибиторы каспаз существенно повышают выживаемость ЭК, что свидетельствует о регулируемом направлении их клеточной гибели. Дальнейшие исследования в этом направлении должны расшифровать молекулярные пути регулируемой клеточной гибели ЭК под воздействием физиологических концентраций КФБ.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы; эндотелиальные клетки; клеточная гибель; цитотоксичность; каспаза-3.

Для цитирования: Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Типы гибели эндотелиальных клеток при воздействии физиологических и супрафизиологических концентраций кальций-фосфатных бионов. Патогенез. 2020; 18(3): 19-30.

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.03.19-30

Для корреспонденции: Кутихин Антон Геннадьевич, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.04.2020.

Endothelial cell death subroutines at physiological and supraphysiological concentrations of calcium phosphate bions

Markova V.E., Shishkova D.K., Kutikhin A.G.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
Sosnovy Blvd. 6, Kemerovo 650002, Russian Federation

Background. Calcium phosphate bions (CPB) formed and circulating in the blood at its supersaturation with calcium and phosphate provoke endothelial dysfunction by causing the demise of arterial endothelial cells (ECs). **Aim.** To examine cell death subroutines of human primary arterial ECs exposed to physiological and supraphysiological concentrations of spherical CPB (CPB-S) and needle-shaped CPB (CPB-N). **Materials and methods.** Equal volumes (10 μ L) of CPB-S and CPB-N at physiological concentration (optical density at 650 nm wavelength = 0.08-0.10) or supraphysiological amounts (optical density at 650 nm wavelength = 0.42-0.45) were added to the confluent primary human coronary artery and internal thoracic artery ECs cultured in 96-well plates. In all experimental groups, we selectively inhibited caspase-3 by adding Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK (100 μ mol/L) or all caspases (Z-VAD(OMe)-FMK, 100 μ mol/L) to assess whether the CPB-induced cell death is regulated or accidental. Cell viability

was evaluated by sequential colorimetric determination of metabolic activity at 4, 24, and 48 hours of incubation with CPB. **Results.** At supraphysiological CPB concentrations, the majority (60-85%) of ECs died regardless of CPB type and caspase inhibitors, albeit at 24- and 48-hour time points the latter had minor cytoprotective action. However at physiological CPB levels, caspase inhibitors rescued a considerable proportion of ECs after 24 or 48 hours of exposure, and CPB-N had significantly higher toxicity than CPB-S. Regardless of the time point, the cytoprotective effect of the pan-caspase inhibitor was significantly higher than that of the selective caspase-3 inhibitor indicating a cumulative caspase inhibition and suggesting that cell death was precipitated by an intrinsic apoptosis pathway. **Conclusion.** At supraphysiological concentrations, CPB cause instant cell death; yet at physiological amounts, caspase inhibitors rescue the majority of ECs testifying to the regulated cell death. Further studies in this field should decipher the molecular pathways of CPB-induced regulated cell death of ECs.

Keywords: calcium phosphate bions; endothelial cells; cell death; cytotoxicity; caspase-3.

For citation: Markova V.E., Shishkova D.K., Kutikhin A.G. [Endothelial cell death subroutines at physiological and supraphysiological concentrations of calcium phosphate bions]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(3): 19-30 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.03.19-30

For correspondence: Kutikhin Anton Gennadievich, **e-mail:** antonkutikhin@gmail.com

Funding. This study was supported by the Complex Program of Basic Research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences as a part of the Basic Research Topic of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases #0546-2015-0011 "Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors".

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 03.04.2020

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) представляют собой минерало-органические наночастицы, формирующиеся в крови человека при ее перенасыщении ионами кальция (Ca^{2+}) и фосфора (PO_4^{3-}) в результате их взаимодействия с основным ингибитором внескелетной кальцификации фетуином-А [1, 2]. Агрегируя избыточные ионы кальция и фосфора, КФБ обеспечивают их выведение из кровотока, таким образом предотвращая кальцификацию внутренних органов, в том числе сосудов [3]. В то же время, защищая организм от «большого зла» – критически нарушающей целостность тканей эктопической кальцификации, КФБ тем не менее обладают и патогенными эффектами на организм вследствие их поглощения эндотелиальными клетками (ЭК) [1, 4]. В норме сыворотка крови человека содержит лишь незначительную концентрацию КФБ (определяемых при помощи флуоресцентно меченного бисфосфоната), однако у пациентов с хронической почечной недостаточностью наблюдается устойчивое повышение уровня данных частиц в крови вследствие снижения скорости клубочковой фильтрации и нарастающей потери белка, в том числе альбумина, выполняющего функцию ингибитора внескелетной кальцификации [3].

После интернализации КФБ оказываются в лизосомах и подвергаются частичному растворению в кислой среде, что вызывает массивную транслокацию ионов кальция в цитозоль и далее в митохондрии, вызывая пермеабиллизацию их внешней мембраны [5, 6]. Это, в свою очередь, способствует транслокации про-апоптотических белков SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi и цитохрома c из митохондрий в цитозоль, где SMAC/DIABLO и HtrA2/Omi ингибируют X-связанный ингибитор апоптоза (XIAP), высвобождая связанную с ним каспазу-9, а цитохром C запускает сборку активирующей каспазу-9 апоп-

тосомного комплекса [7]. Каспаза-9 в дальнейшем активирует каспазу-3, которая, в свою очередь, активирует бета-субъединицу фактора фрагментации ДНК (DFFB) и инактивирует один из ключевых белков репарации ДНК поли [АДФ-рибоза] полимеразу 1 (PARP-1), таким образом способствуя нарушению целостности ДНК и клеточной гибели [7].

В процессе своего формирования КФБ претерпевают физико-химическую трансформацию, которая сопровождается переходом их изначально аморфной структуры в кристаллическую, и сменой их формы со сферической на игольчатую [3, 8]. Вместе с тем временные аспекты циркуляции КФБ от момента своего формирования в организме до интернализации ЭК остаются не до конца выясненными, хотя из сыворотки пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью были выделены как аморфные сферические КФБ (СКФБ), так и игольчатые кристаллические КФБ (ИКФБ) [9]. Поэтому на данном этапе понимания проблемы представляется актуальным изучать как СКФБ, так и ИКФБ. Важно отметить, что физико-химические характеристики (форма, размерность, склонность к агрегации, химический состав) выделенных из атеросклеротических бляшек человека и искусственно синтезированных КФБ практически идентичны [1], что предоставляет обоснование для использования искусственно синтезированных КФБ в экспериментальной работе.

Исследования *in vitro* продемонстрировали определенные предпосылки к различию механизма интернализации и патологических последствий воздействия СКФБ и ИКФБ на молекулярном уровне. Нокаут гена сквенджер-рецептора AI/II или его блокада соответствующим антителом снижали эффективность интернализации ИКФБ, однако не влияли на интернализацию СКФБ [10]. Кроме того, ИКФБ усиливали выделение ЭК фактора некроза опухоли- α , а СКФБ – интерлейкина-1 β , что может указывать на более высокую рас-

творимость СКФБ в лизосомах и более выраженную кальций-зависимую активацию инфламмосомного пути [10]. В свою очередь, ингибитор вакуолярной H^+ -АТФазы бафиломицин А1 спасал ЭК от клеточной гибели, индуцированной СКФБ, но не ИКФБ, предполагая более низкую растворимость последних или вовлечение иного пути клеточной смерти [5]. Таким образом, представляется актуальным более детальное изучение механизмов клеточной гибели под воздействием СКФБ и ИКФБ.

Целью данного исследования было определить соотношение регулируемой каспазами и моментальной клеточной гибели под воздействием физиологических и супрафизиологических концентраций СКФБ и ИКФБ.

Материалы и методы исследования

Искусственный синтез бионов. Сферические КФБ (СКФБ) были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, 21115) и 21,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, 94046) в 1320 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Gibco, 41966029), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Игольчатые КФБ (ИКФБ) были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл $CaCl_2$ (0,5 моль/л, Sigma-Aldrich, 21115) и 37,5 мкл Na_2HPO_4 (0,2 моль/л, Sigma-Aldrich, 94046) в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Для синтеза СКФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 3 ммоль/л, для синтеза ИКФБ – 7,5 ммоль/л. Контроль pH осуществлялся путем предварительного добавления 5 мл N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислоты (Gibco, 15630056) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация в среде – 1%). В целом искусственный синтез бионов соответствовал ранее разработанным оригинальным протоколам [11, 12].

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов были инкубированы при $+37^\circ C$, 5% CO_2 и высокой влажности (МСО-18AIC, Sanyo) в течение 24 часов с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и $+4^\circ C$ в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) для осаждения бионов всего спектра размерности. С целью получения рабочего раствора осадок СКФБ растворялся в 1000 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4, Gibco, 10010023), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой величиной концентрации бионов в растворе. Для эксперимента по оценке цитотоксичности КФБ отдельно готовили образцы СКФБ и ИКФБ, растворенные в 500 мкл ФСБ, что по-

зволяло достичь мутности суспензии в 2 МкФ.

Визуализация СКФБ и ИКФБ проводилась посредством:

1) сканирующей электронной микроскопии (S8220, Hitachi) после нанесения суспензии бионов на двусторонний углеродный скотч (Ted Pella, 16084-7), высушивания при $37^\circ C$ в течение 30 мин и вакуумного напыления золотом и палладием (EM ACE200, Leica);

2) просвечивающей электронной микроскопии (JEM-2100, Jeol) после нанесения суспензии бионов на предварительно напыленную углеродом медную сеточку (Structure Probe, Inc., 3520C-FA) и контрастирования 2% уранилацетатом (22400-2, Electron Microscopy Sciences) в течение 20 мин;

3) атомно-силовой микроскопии (Cypher, Asylum Research) после нанесения суспензии бионов на диск из слюды (50-12, Ted Pella).

Репрезентативные микрофотографии, полученные методами атомно-силовой микроскопии, а также сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, представлены на **рис. 1**.

Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях. Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм (OP_{650} , мутность суспензии 0,5 МкФ соответствовала значениям $OP_{650} = 0,08-0,10$, мутность суспензии 2 МкФ – $OP_{650} = 0,42-0,45$).

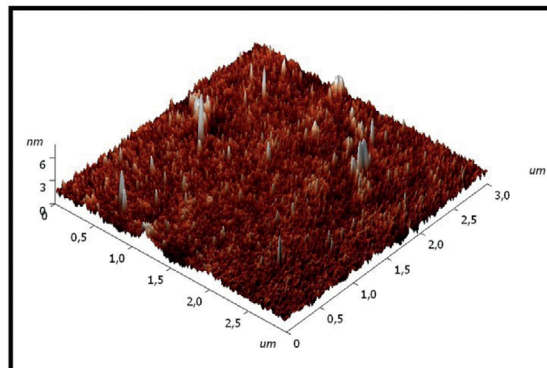
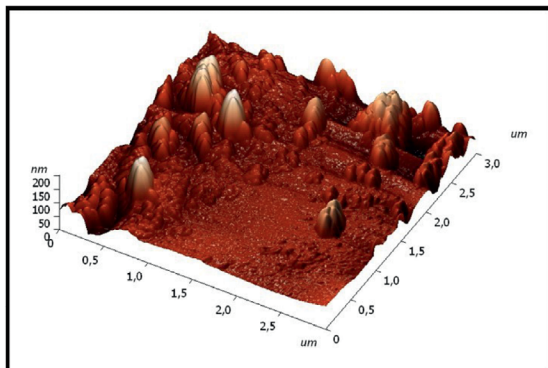
Культивирование эндотелиальных клеток. Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных ЭК коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC, Cell Applications, 300K-05a) и первичных ЭК внутренней грудной артерии человека (human internal thoracic endothelial cells, HITAEC, 308K-05a). Согласно информации поставщика, первичные ЭК человека были получены из здоровых артерий доноров 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 ЭК размораживали и культивировали в культуральных флаконах T-75 (Techno Plastic Products, 90076) согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). Пересев производили по достижении 80% конфлюэнтности. На 6-м пассаже клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты (Techno Plastic Products, 92696) для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при $37^\circ C$, 5% CO_2 и высокой влажности.

Оценка цитотоксичности КФБ под воздействием ингибиторов каспаз. К культивированным до 90% конфлюэнтности в 96-луночных планшетах первичным ЭК коронарной и внутренней грудной артерии после забора сывороточной среды и промывания од-

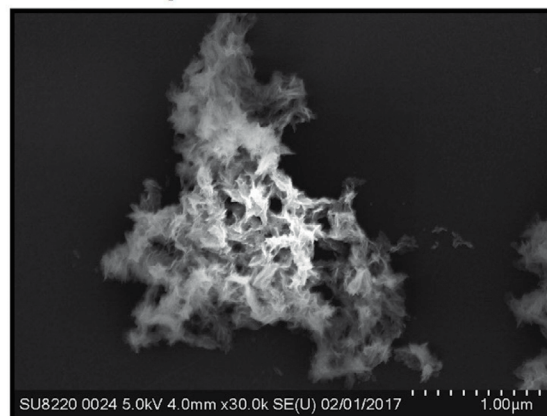
нократным ФСБ добавляли бессывороточную среду DMEM/F-12 (Gibco, 31330038), содержащую 1% диметилсульфоксид (VWR, 97061) в качестве контроля растворителя (vehicle control), ингибитор каспазы-3 Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK (Abcam, ab120488) в концентрации 100 мкмоль/л или пан-каспазный ингибитор Z-VAD(OMe)-FMK (Abcam, ab120487) также в концентрации 100 мкмоль/л. Далее в каждую лунку ка-

ждой из трех указанных экспериментальных групп добавляли по 10 мкл однократного ФСБ (контроль растворителя), СКФБ или ИКФБ с $OP_{650} = 0,08-0,10$ или $0,42-0,45$ (таким образом, общее число экспериментальных подгрупп составило 9). После этого в каждую лунку планшета добавляли по 20 мкл реактива для колориметрической оценки пролиферации и жизнеспособности клеток (Abcam, ab112118), перемешивали со-

Атомно-силовая микроскопия



Сканирующая электронная микроскопия



Просвечивающая электронная микроскопия

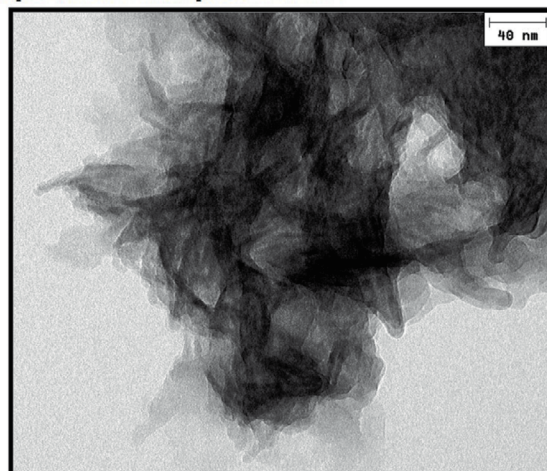
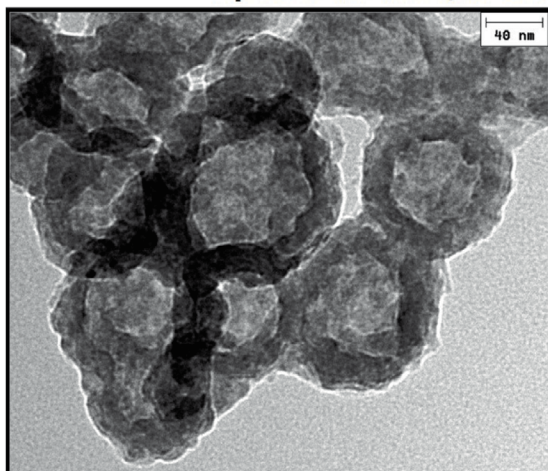


Рис. 1. Визуализация СКФБ (слева) и ИКФБ (справа) методами атомно-силовой микроскопии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

держимое лунок легким покачиванием планшета и инкубировали в стерильных условиях при 37°C, 5% CO₂ и высокой влажности с последовательной спектрофотометрией на длинах волн 570 и 605 нм (Multiskan Sky, Thermo Scientific) после 4, 24 и 48 часов инкубации. Интегральным показателем жизнеспособности клеток служило соотношение оптической плотности на длинах волн 570 и 605 нм (чем выше был данный показатель, тем выше была жизнеспособность). Также рассчитывалась жизнеспособность клеток относительно контрольной группы (чистый однократный фосфатно-солевой буфер). Во всех экспериментах данного типа для вычета фонового (не связанного с клеточным метаболизмом колориметрического реактива) окрашивания в обязательном порядке из полученного соотношения оптической плотности на длинах волн 570 и 605 нм производился вычет такого соотношения

в лунках, содержащих идентичный объем культуральной среды, фосфатно-солевого буфера и реактива для колориметрического теста, но не содержащих клеток.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Сравнение измеренных или рассчитанных количественных показателей проводили по U-критерию Манна–Уитни (для двух групп) или критерию Краскала–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения посредством двухэтапного расчета средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR) по Беньямини, Кригеру и Йекутиели. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу p (или q – скорректированного при помощи FDR значения p) $\leq 0,05$.

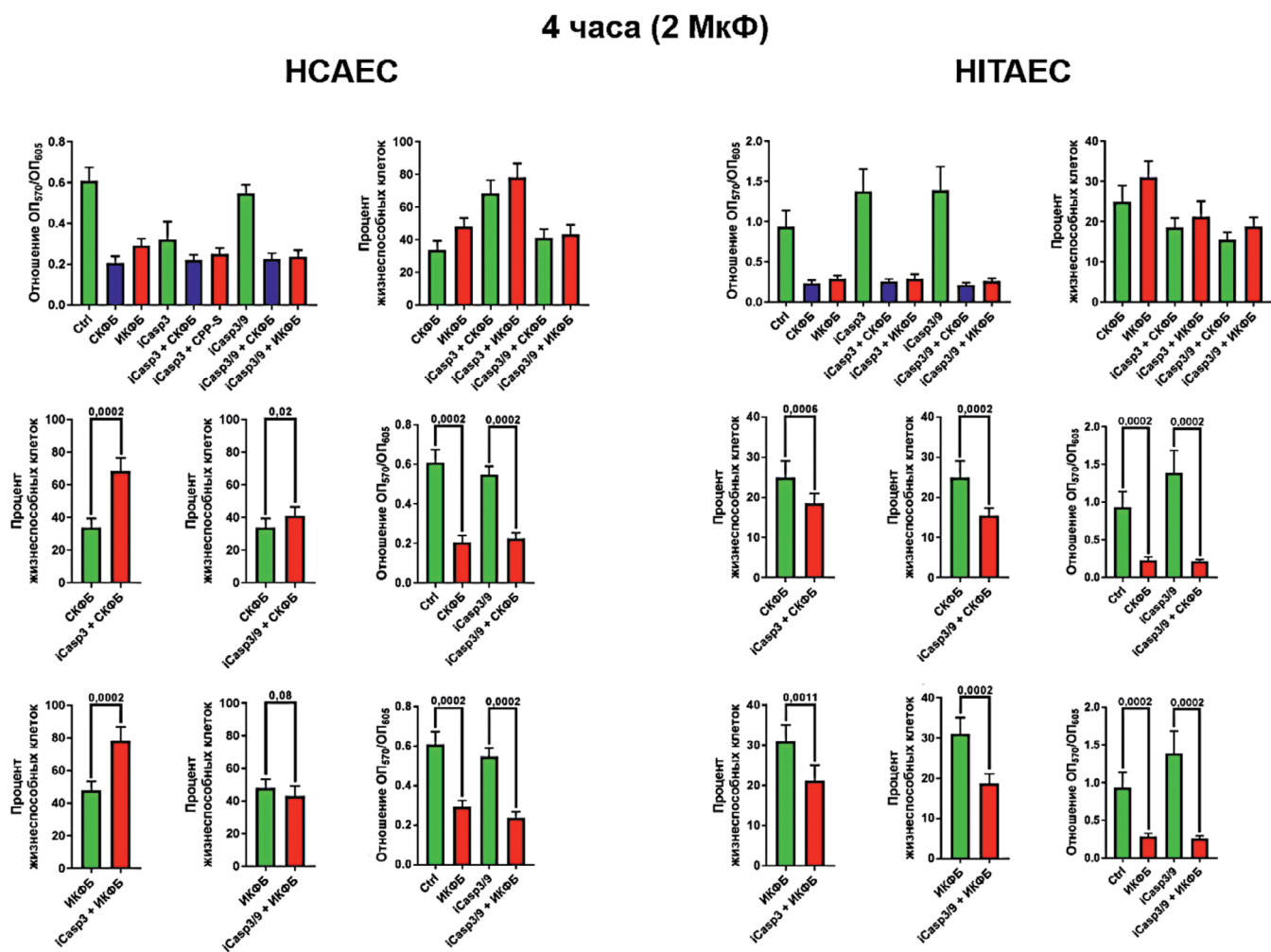


Рис. 2. Оценка метаболической активности первичных ЭК коронарной артерии (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HITAEC) человека спустя 4 часа экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мкл суспензии с оптической плотностью 2 стандарта МакФарланда (МкФ, ОП = 0,42-0,45) на лунку) по соотношению оптической плотности на длинах волн 570 и 605 нм (ОП₅₇₀ и ОП₆₀₅, чем выше соотношение, тем выше клеточная жизнеспособность) и проценту жизнеспособных клеток относительно контрольной группы. N = 8 лунок 96-луночного культурального планшета в каждой группе, U-критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования

Для того, чтобы оценить принцип клеточной гибели (моментальная или регулируемая) под воздействием СКФБ и ИКФБ, было проведено две серии экспериментов по оценке их цитотоксичности, подразумевающих последовательное колориметрическое измерение метаболической активности экспонированных культур на трех временных точках (4, 24 и 48 часов). В первой серии экспериментов использована супрафизиологическая концентрация КФБ в 2 МкФ ($ОП_{650} = 0,42-0,45$), во второй была применена физиологическая концентрация в 0,5 МкФ ($ОП_{650} = 0,08-0,10$).

Результаты экспериментов с массивной передозировкой КФБ показали, что уже через 4 часа (визуально под микроскопическим контролем через 10–20 мин) большинство (60–85% в зависимости от клеточной линии) ЭК погибло безотносительно типа добавленных КФБ и воздействия специфического ингибитора каспазы-3 и пан-каспазного ингибитора (рис. 2).

Последствия гибели абсолютного большинства клеток были очевидны через 24 часа (рис. 3) и

48 часов (рис. 4), когда оценка метаболической активности указывала лишь на 5–10% живых клеток относительно контрольной группы. В то же время спустя 24 часа специфичный ингибитор каспазы-3 и пан-каспазный ингибитор спасали определенное количество ЭК коронарной артерии (видимо, выживших при изначальной гиперэкспозиции вследствие малого количества поглощенного фосфата кальция) от КФБ-опосредованной гибели (рис. 3), а через 48 часов данный эффект наблюдался среди обеих клеточных линий (рис. 4).

Таким образом, целесообразно говорить о моментальной клеточной гибели при добавлении супрафизиологических доз КФБ, по-видимому, вследствие разрыва клеточной мембраны (некротический морфотип клеточной смерти). В то же время на временных точках 24 и 48 часов, на которых метаболизируется достаточное для достижения порога чувствительности количество колориметрического субстрата, ингибиторы каспаз имели некоторую эффективность в отношении выживаемости клеток под воздействием КФБ без однозначных различий между препаратами и

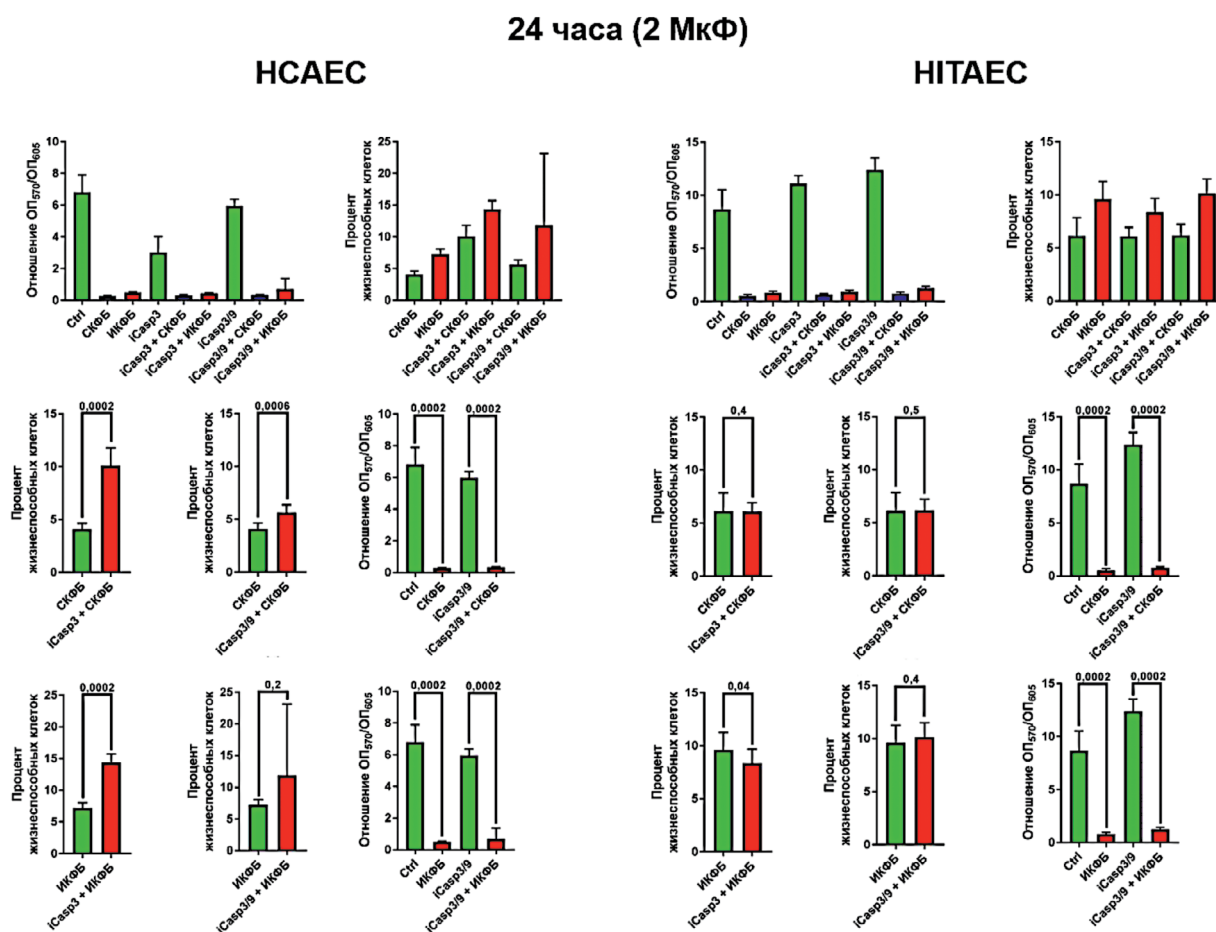


Рис. 3. Оценка метаболической активности НСАЕС и НИТАЕС спустя 24 часа экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мл суспензии с оптической плотностью 2 МкФ на лунку).

их воздействия на использованные клеточные линии (рис. 3, 4). Исходя из этого, можно предположить, что то незначительное количество клеток, которое переживает изначальное воздействие КФБ вследствие гетерогенного распределения фосфата кальция в лунках и поэтому сохраняет метаболическую активность, далее подвергается регулируемой клеточной гибели вследствие интернализации определенного количества КФБ.

Для подтверждения выдвинутой гипотезы была проведена серия экспериментов с физиологическими концентрациями КФБ. Было выявлено, что ИКФБ также обладали высокой цитотоксичностью для обеих исследованных клеточных линий на всех временных точках, приводя к гибели $\approx 55\text{--}65\%$ клеток через 4 часа (рис. 5) и $\approx 90\%$ клеток через 24 (рис. 6) и 48 (рис. 7) часов. На первой временной точке ингибиторы каспаз не демонстрировали однозначного цитопротективного действия (рис. 5), однако через 24 часа уже был заметен тренд на повышение метаболической активности в обработанных данными препаратами (особенно пан-каспазным ингибитором)

культурах (рис. 6), а через 48 часов эти различия достигли статистической значимости (рис. 7).

В то же время СКФБ демонстрировали несколько другой профиль цитотоксичности, вызывая гибель $\approx 10\%$ клеток через 4 часа (рис. 5), $\approx 30\%$ клеток через 24 часа (рис. 6) и $\approx 40\%$ клеток через 48 часов (рис. 7), без существенных различий между использованными клеточными линиями. На временной точке в 4 часа ингибиторы каспаз не оказывали существенного эффекта (рис. 5), видимо, вследствие отсутствия значимого цитотоксического действия СКФБ, но через 24 часа метаболическая активность клеток была существенно выше при применении пан-каспазного ингибитора (рис. 6), а через 48 часов – при добавлении как пан-каспазного ингибитора, так и специфичного ингибитора каспазы-3 (рис. 7). Важным является то, что данные различия были детектированы при отсутствии явного тренда к повышению выживаемости в контрольных культурах (рис. 5–7). Таким образом, целесообразно говорить о регулируемой каспазами клеточной гибели, которой подвергаются ЭК под воздействием физиологических концентраций КФБ вне зависимости от их типа.

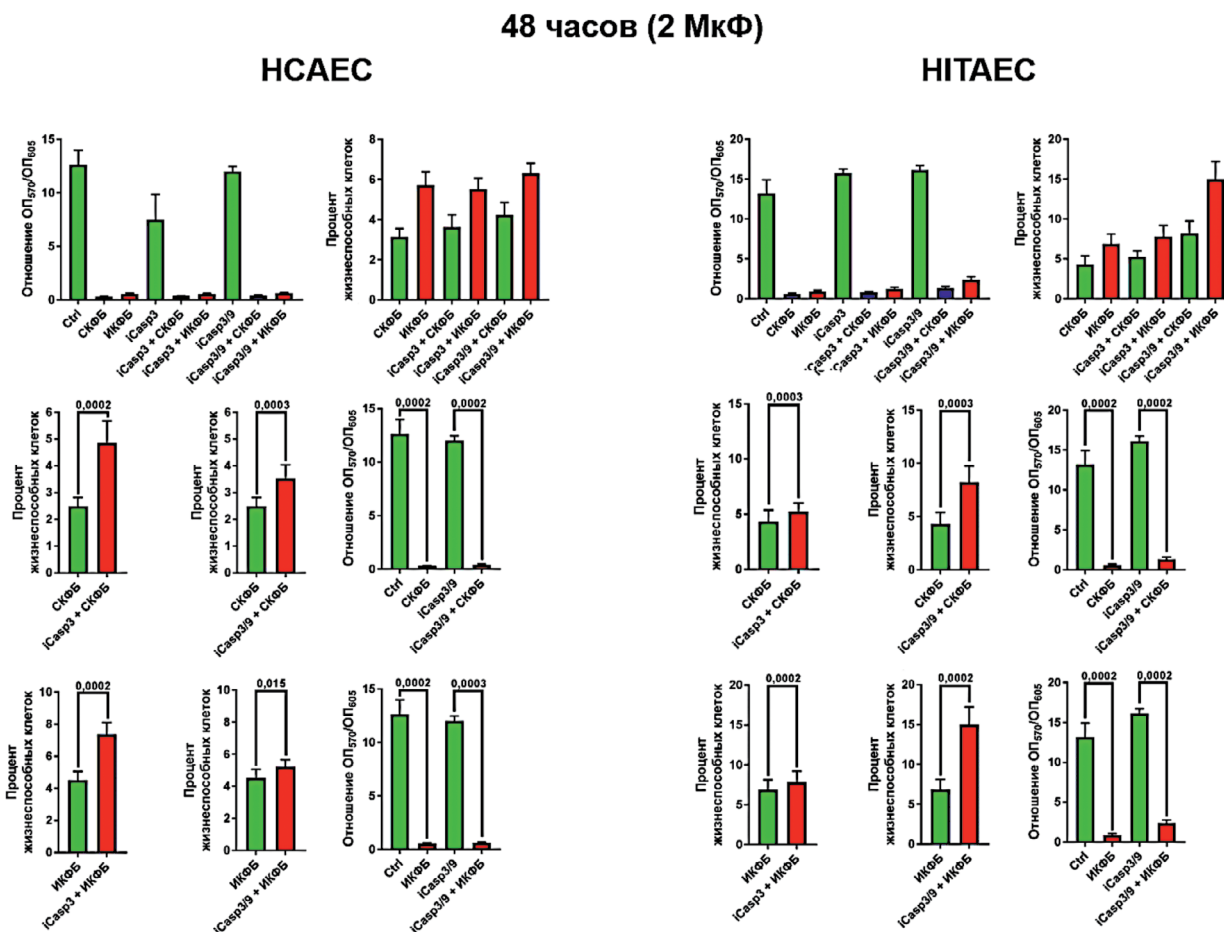


Рис. 4. Оценка метаболической активности НСАЕС и НИТАЕС спустя 48 часов экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мл суспензии с оптической плотностью 2 МкФ на лунку).

Обсуждение

В настоящее время считается доказанным, что КФБ обладают двойной ролью в физиологии сосудов. С одной стороны, агрегация возникающих в кровотоке при нарушениях минерального гомеостаза избыточных ионов кальция и фосфора в КФБ защищает сосуды от «большого зла» – необратимого нарушения механических свойств, приводящего к дезадаптации ответа на изменения гемодинамики [1, 3, 4]. С другой стороны, формирование комплексов фосфата кальция в системном кровотоке не проходит для организма бесследно, поскольку они поглощаются ЭК и приводят вследствие этого к различным патологическим последствиям, вызывая гибель ЭК, повышая выделение ими провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6, интерлейкина-8, фактора ингибирования миграции макрофагов, CXCL1) и увеличивая экспрессию ими молекул клеточной адгезии VCAM1 и ICAM1, отвечающих за прикрепление моноцитов и лимфоцитов к эндотелию [1, 4]. Неясность временной динамики циркуляции КФБ в крови в сочетании с показанным *in vitro* феноменом перехода относительно аморфных СКФБ в кристаллические ИКФБ дополнительно усложняет

описанный сценарий, поскольку и физико-химические предпосылки [2, 11, 12], и экспериментальные данные [10, 13, 14] свидетельствуют о том, что СКФБ и ИКФБ обладают различной токсичностью для ЭК из-за различных механизмов их интернализации [10]. При этом эти два типа КФБ обладают и сходной выраженностью некоторых эффектов, к примеру, выделения провоспалительных цитокинов [15] или способности индуцировать формирование неоинтимы *in vivo* [16].

Несмотря на некоторые исследования в этом направлении, позволяющие предположить первичное вовлечение лизосом в механизм индуцируемой КФБ клеточной гибели [5, 6], события, разворачивающиеся в ЭК после поступления КФБ в лизосомы, все ещё остаются в значительной степени нерасшифрованными. Учитывая клиническую релевантность формирования КФБ в кровотоке (у пациентов с инфарктом миокарда, хронической ишемией головного мозга и ишемическим инсультом повышена склонность крови к формированию КФБ вследствие истощения кальций-связывающего депо в системном кровотоке [17]), принципиальные типы и молекулярные механизмы клеточной гибели под воздействием обоих видов КФБ нуждаются в детальном изучении.

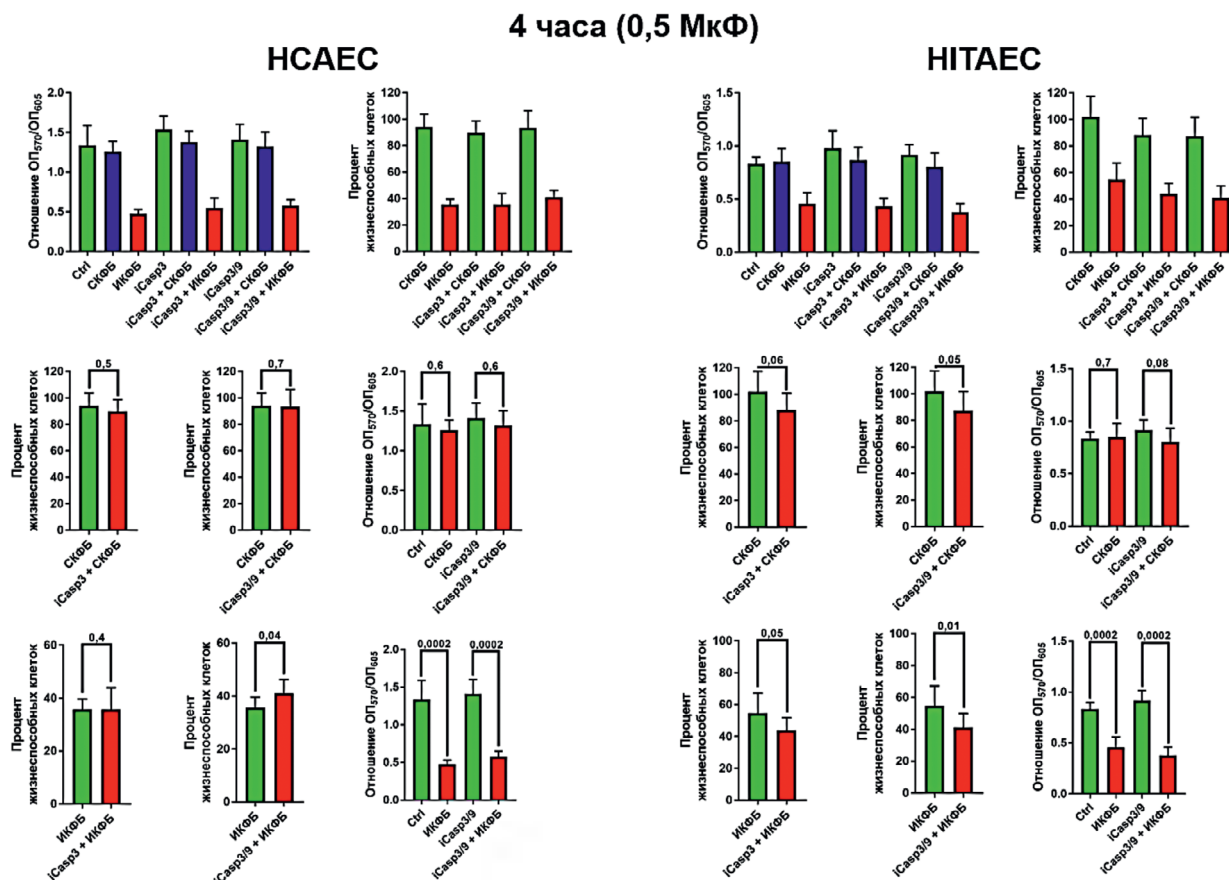


Рис. 5. Оценка метаболической активности НСАЕС и НИТАЕС спустя 4 часа экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мкл суспензии с оптической плотностью 0,5 МкФ на лунку).

В данном исследовании было показано, что при добавлении супрафизиологических концентраций КФБ абсолютное большинство эндотелиальных клеток погибает вне зависимости от типа частиц и воздействия ингибиторов каспаз, что указывает на моментальную (не регулируемую какими-либо специфическими молекулами, к примеру, каспазами) клеточную гибель, ранее относимую к некрозу [7]. Стоит отметить, что распределение КФБ между клетками в лунках даже теоретически не может являться равномерным (поскольку содержащая КФБ жидкость вследствие нерастворимости гидроксиапатита в любом случае представляет собой суспензию, а не раствор), и поэтому некоторые клетки не подвергаются воздействию супрафизиологических количеств КФБ даже при в целом супрафизиологической их дозе. В соответствии с этой предпосылкой ингибиторы каспаз оказывали некоторое цитопротективное действие (видимо, именно на данные клетки) даже при супрафизиологической концентрации КФБ.

Иная картина наблюдалась при добавлении физиологических концентраций КФБ, где в соответствии с ранее проведенным исследованием [14] ИКФБ демон-

стрировали существенно более высокую токсичность для ЭК в сравнении с СКФБ. В отличие от предыдущей экспериментальной модели, ингибиторы каспаз оказывали выраженное цитопротективное действие через 24 и 48 часов экспозиции. Вне зависимости от временной точки пан-каспазный ингибитор оказывал значительно более выраженное цитопротективное действие по сравнению с селективным ингибитором каспазы-3, что свидетельствует о кумулятивном эффекте ингибирования каспаз, возникающем, вероятно, вследствие запуска внутреннего пути апоптоза.

Ранее проведенные работы косвенно подтверждают полученные в данном исследовании результаты, поскольку при добавлении КФБ к ЭК была отмечена активация каспаз внутреннего пути апоптоза (каспазы-9 и каспазы-3) и специфического субстрата каспазы-3 поли [АДФ-рибоза] полимеразы 1 [1, 4]. Кроме того, предварительное добавление к макрофагам примененного в проведенном исследовании пан-каспазного ингибитора z-VAD-fmk [18], а также инкубация ЭК [5] и первичных гладкомышечных клеток аорты человека [19] со специфичным ингибитором вакуолярной H^+ -АТФазы бафи-

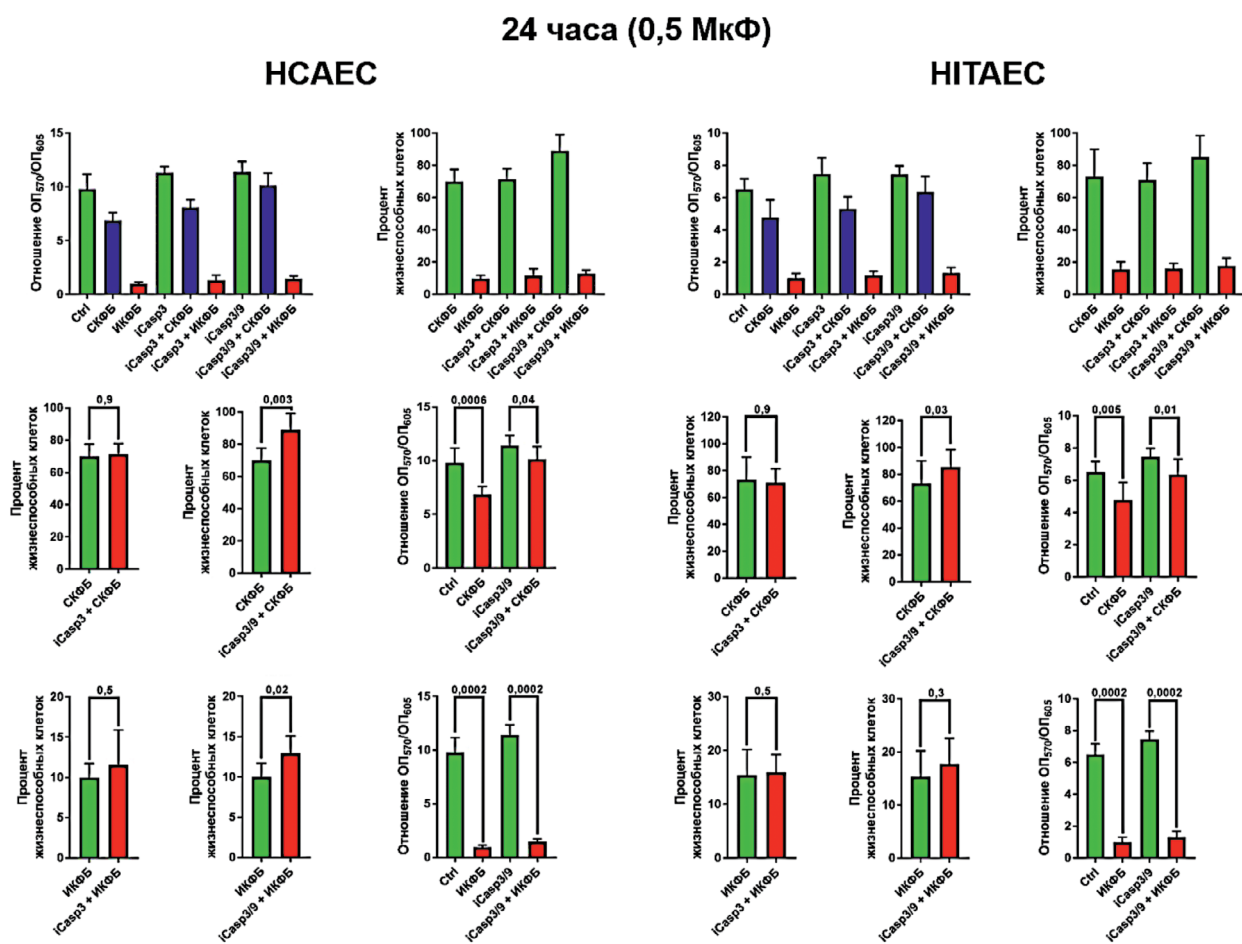


Рис. 6. Оценка метаболической активности НСАЕС и НИТАЕС спустя 24 часа экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мкл суспензии с оптической плотностью 0,5 МкФ на лунку).

48 часов (0,5 МкФ)

НСАЕС

НИТАЕС

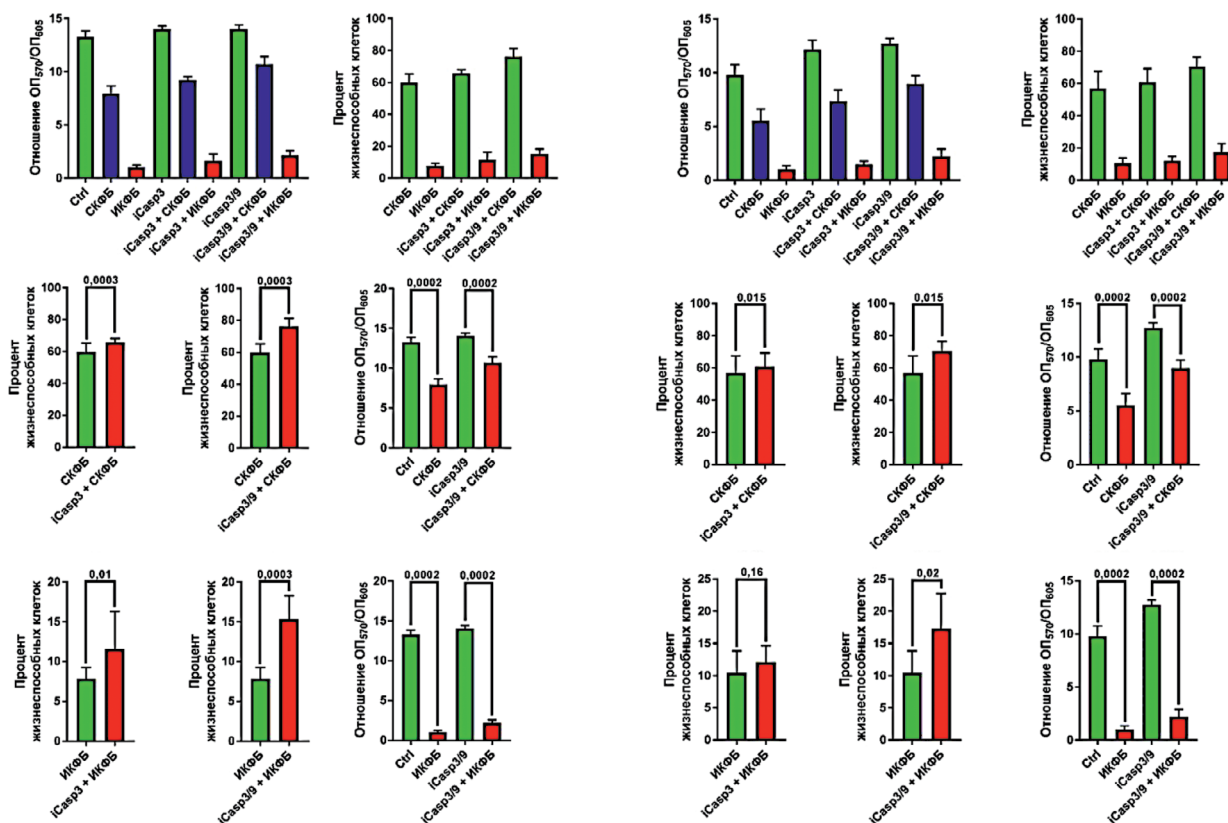


Рис. 7. Оценка метаболической активности НСАЕС и НИТАЕС спустя 48 часов экспозиции СКФБ и ИКФБ (10 мкл суспензии с оптической плотностью 0,5 МкФ на лунку).

ломицином А1 предотвращали КФБ-индуцированную клеточную гибель. Некротический морфотип клеточной гибели при воздействии КФБ также был отмечен ранее, хотя и безотносительно моментальной клеточной гибели, поскольку сроки экспозиции и культивирования больше соответствовали регулируемой клеточной гибели и лизосомально-опосредованной клеточной смерти [20].

Перспективным направлением дальнейших исследований в области механизмов КФБ-индуцированной клеточной гибели является оценка транслокации про-апоптотических белков (цитохрома С, SMAC/DIABLO, НtrA2/Omi) из митохондрий в цитозоль, а также транслокации каспазы-3 из цитозоля в ядро, для чего необходимо проведение фракционирования указанных органелл и полуколичественный сравнительный анализ содержания данных белков в этих субклеточных компартментах при помощи иммуноблоттинга.

Заключение

В супрафизиологических концентрациях КФБ вызывают моментальную гибель абсолютного большин-

ства ЭК, однако в физиологических концентрациях ингибиторы каспаз существенно повышают выживаемость ЭК, что свидетельствует о регулируемом направлении их клеточной гибели. Дальнейшие исследования в этом направлении должны расшифровать молекулярные пути регулируемой клеточной гибели ЭК под воздействием физиологических концентраций КФБ.

Список литературы

1. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pshyniy D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate biions. *Sci. Rep.* 2016; 6: 27255. DOI: 10.1038/srep27255
2. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013; 8(9): e75501. DOI: 10.1371/journal.pone.0075501

3. Smith E.R., Hewitson T.D., Jahnen-Dechent W. Calciprotein particles: mineral behaving badly? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2020; 29(4): 378-386. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000609
4. Shishkova D., Velikanova E., Sinitisky M., Tsepokina A., Gruzdeva O., Bogdanov L., Kutikhin A. Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(22): 5728. DOI: 10.3390/ijms20225728
5. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н., Руссаков Д.М., Кутихин А.Г. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39(4): 12-21. DOI: 10.15372/SSMJ20190402
6. Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Визуальная оценка интернализации кальций-фосфатных и магний-фосфатных бионов эндотелиальными клетками методами сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. *Атеросклероз.* 2019; 15(2): 8-16. DOI: 10.15372/ATER20190202
7. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molkenstein J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M.G., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 486-541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
8. Martel J., Wu C.Y., Peng H.N., Young J.D. Mineralo-organic nanoparticles in health and disease: an overview of recent findings. *Nanomedicine (Lond).* 2018; 13(14): 1787-1793. DOI: 10.2217/nmm-2018-0108
9. Smith E.R., Hewitson T.D., Hanssen E., Holt S.G. Biochemical transformation of calciprotein particles in uraemia. *Bone.* 2018; 110: 355-367. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.023
10. Köppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E., Hengstler J.G., Smith E.R., Jahnen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1991. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01991
11. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Севостьянов О.Г., Долганюк В.Ф., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2019; 4(2): 6-16. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16
12. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Долганюк В.Ф., Барбараш О.Л., Кутихин А.Г. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2019; 8(1): 59-69. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69
13. Aghagolzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R., Jackson S.C., Smith E.R., Odermatt A., Radpour R., Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis.* 2016; 251: 404-414. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044
14. Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Матвеева В.Г., Григорьев Е.В., Барбараш О.Л. Форма кальций-фосфатных бионов определяет их токсичность для культур эндотелиальных клеток человека. *Кардиологический вестник.* 2019; 14(4): 34-41. DOI: 10.36396/MS.2019.15.4.004
15. Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Синицкий М.Ю., Великанова Е.А. Кальций-фосфатные бионы независимо от формы вызывают выделение интерлейкина-6 и интерлейкина-8 в культурах первичных артериальных эндотелиальных клеток. *Патогенез.* 2020; 18(2): 53-60. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.02.53-60
16. Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Миронов А.В., Кривкина Е.О., Барбараш О.Л. Сравнение токсического действия сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 80-88. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.80-88
17. Eelderink C., Te Velde-Keyzer C.A., Freney A.S., Vermeulen E.A., Bachtler M., Aghagolzadeh P., van Dijk P.R., Gansevoort R.T., Vervloet M.G., Hillebrands J.L., Bakker S.J.L., van Goor H., Pasch A., de Borst M.H.; NIGRAM2+ consortium. Serum Calcification Propensity and the Risk of Cardiovascular and All-Cause Mortality in the General Population: The PREVEND Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020; 40(8): 1942-1951. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314187
18. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One.* 2013; 8(4): e60904. DOI: 10.1371/journal.pone.0060904
19. Ewence A.E., Bootman M., Roderick H.L., Skepper J.N., McCarthy G., Epple M., Neumann M., Shanahan C.M., Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ. Res.* 2008; 103(5): e28-34. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181305
20. Liu Z., Xiao Y., Chen W., Wang Y., Wang B., Wang G., Xu X., Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity. *J. Mater. Chem. B.* 2014; 2(22): 3480-3489. DOI: 10.1039/c4tb00056k

References

1. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci. Rep.* 2016; 6: 27255. DOI: 10.1038/srep27255
2. Wu C.Y., Young L., Young J.D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013; 8(9): e75501. DOI: 10.1371/journal.pone.0075501
3. Smith E.R., Hewitson T.D., Jahnen-Dechent W. Calciprotein particles: mineral behaving badly? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2020; 29(4): 378-386. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000609
4. Shishkova D., Velikanova E., Sinitisky M., Tsepokina A., Gruzdeva O., Bogdanov L., Kutikhin A. Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(22): 5728. DOI: 10.3390/ijms20225728
5. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Yuzhalin A.E., Kudryavtseva Yu.A., Popova A.N., Russakov D.M., Kutikhin A.G. [Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions]. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal [Siberian Scientific Medical Journal]*. 2019; 39(4): 12-21. DOI: 10.15372/SSMJ20190402 (in Russian)

6. Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. [Internalisation of calcium phosphate and magnesium phosphate bions by endothelial cells utilising scanning electron microscopy and confocal microscopy]. *Ateroskleroz. [Atherosclerosis]*. 2019; 15(2): 8-16. DOI: 10.15372/ATER20190202 (in Russian)
7. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angioloella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., Garcia-Saz A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Green D.R., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otin F., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molkentin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M.G., Vulliamy A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 486-541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
8. Martel J., Wu C.Y., Peng H.H., Young J.D. Mineralo-organic nanoparticles in health and disease: an overview of recent findings. *Nanomedicine (Lond)*. 2018; 13(14): 1787-1793. DOI: 10.2217/nmm-2018-0108
9. Smith E.R., Hewitson T.D., Hanssen E., Holt S.G. Biochemical transformation of calciprotein particles in uraemia. *Bone*. 2018; 110: 355-367. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.023
10. Köppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E., Hengstler J.G., Smith E.R., Jahnhen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1991. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01991
11. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Yu., Kolmykov R.P., Ismagilov Z.R., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Yu.A., Kozhukhov A.S., Sevostyanov O.G., Dolganyuk V.F., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. [Morphological and chemical excretion of magnesium phosphate and calcium phosphate bions]. *Fundamental'naya i klinicheskaya medicina [Fundamental and clinical medicine]*. 2019; 4(2): 6-16. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16. (in Russian)
12. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Yu., Kolmykov R.P., Ismagilov Z.R., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Yu.A., Kozhukhov A.S., Dolganyuk V.F., Barbarash O.L., Kutikhin A.G. [Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions]. *Kompleksnye problemy serdecno-sosudistyyh zabolevaniy [Complex Issues of Cardiovascular Diseases]*. 2019; 8(1): 59-69. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69. (in Russian)
13. Aghagolzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R., Jackson C., Smith E.R., Odermatt A., Radpour R., Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016; 251: 404-414. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044
14. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Shishkova D.K., Matveeva V.G., Grigoryev E.V., Barbarash O.L. [The form of calcium phosphate bions determines their toxicity to human endothelial cell cultures]. *Kardiologicheskii vestnik [Russian Cardiology Bulletin]*. 2019; 14(4): 34-41. DOI: 10.36396/MS.2019.15.4.004 (in Russian)
15. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Sinititsky M.Yu., Velikanova E.A. [Calcium-phosphate bions, regardless of shape, cause the release of interleukin-6 and interleukin-6 in cultures of primary arterial endothelial cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(2): 53-60. DOI: 10.25557/2310-0435.2020.02.53-60 (in Russian)
16. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L. [Comparison of the toxic effects of spherical and needle-shaped calcium phosphate bions on damaged intima of the rat abdominal aorta]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2019; 63(2): 80-88. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.80-88 (in Russian)
17. Eelderink C., Te Velde-Keyzer C.A., Frenay A.S., Vermeulen E.A., Bachtler M., Aghagolzadeh P., van Dijk P.R., Gansevoort R.T., Vervloet M.G., Hillebrands J.L., Bakker S.J.L., van Goor H., Pasch A., de Borst M.H.; NIGRAM2 consortium. Serum Calcification Propensity and the Risk of Cardiovascular and All-Cause Mortality in the General Population: The PREVEND Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020; 40(8): 1942-1951. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314187
18. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60904. DOI: 10.1371/journal.pone.0060904
19. Ewence A.E., Bootman M., Roderick H.L., Skepper J.N., McCarthy G., Eppe M., Neumann M., Shanahan C.M., Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ. Res.* 2008; 103(5): e28-34. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181305
20. Liu Z., Xiao Y., Chen W., Wang Y., Wang B., Wang G., Xu X., Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity. *J. Mater. Chem. B*. 2014; 2(22): 3480-3489. DOI: 10.1039/c4tb00056k

Сведения об авторах:

Маркова Виктория Евгеньевна — лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; <https://orcid.org/0000-0002-5959-1699>

Шишкова Дарья Кирилловна — младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; <http://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Кутихин Антон Геннадьевич — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>