

УДК 616-092

Кальций-фосфатные бионы независимо от формы вызывают выделение интерлейкина-6 и интерлейкина-8 в культурах первичных артериальных эндотелиальных клеток

Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Синицкий М.Ю., Великанова Е.А.

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

Актуальность. Кальций-фосфатные бионы (КФБ) формируются при перенасыщении крови ионами кальция и фосфора и, циркулируя в кровотоке, повреждают эндотелиальные клетки (ЭК), при растворении в лизосомах вызывая их лизосомально-опосредованную клеточную гибель, которая может сопровождаться выделением провоспалительных цитокинов в микроокружение.

Цель исследования. Оценить профиль секреции провоспалительных цитокинов первичными артериальными ЭК человека под воздействием сферических КФБ (СКФБ) и игольчатых КФБ (ИКФБ).

Материалы и методы. СКФБ и ИКФБ в равных концентрациях (100 мкл, оптическая плотность суспензии на длине волны 650 нм 0,08–0,10) были добавлены к конфлюэнтным культурам первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека в 6-луночных планшетах. Культуральная жидкость забиралась после 24 часов культивирования с последующим измерением в ней уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкин(ИЛ)-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-23, фактор некроза опухоли- α , γ -интерферон) посредством иммуноферментного анализа. Кроме того, из клеточной массы выделяли РНК посредством соответствующих колонок с последующей обратной транскрипцией для синтеза кДНК и оценкой экспрессии генов, кодирующих вышеуказанные цитокины (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, IL12A, IL12B, IL23, TNF, IFNG) и некоторые рецепторы к ним (IL1R1, IL1R2, TNFRSF1A, TNFRSF1B), методом количественной полимеразной цепной реакции.

Результаты. Воздействие СКФБ и ИКФБ приводило к статистически значимому повышению экспрессии генов IL1B, IL6, CXCL8, IL12A и IL23, при этом ЭК коронарной артерии характеризовались более выраженным ответом на воздействие КФБ на уровне транскриптов в сравнении с ЭК внутренней грудной артерии. Хотя воздействие ИКФБ в большинстве случаев приводило к более выраженному увеличению экспрессии генов цитокинов в сравнении с СКФБ, на уровне белков эта зависимость от формы бионов не наблюдалась. Экспозиция СКФБ и ИКФБ приводила к повышению выделения ИЛ-6 обоими типами артериальных ЭК, в то время как повышенная секреция ИЛ-8 наблюдалась лишь при экспозиции ИКФБ ЭК внутренней грудной артерии.

Заключение. Добавление КФБ к культурам первичных артериальных ЭК способствует выделению этими клетками провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в результате повышения экспрессии генов (IL6 и CXCL8 соответственно) независимо от формы КФБ (сферической или игольчатой).

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы; эндотелиальные клетки; цитокины; интерлейкин-6; интерлейкин-8.

Для цитирования: 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

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 № 0546-2015-0011 «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: 30.12.2019

Calcium phosphate bions cause increased release of interleukin-6 and interleukin-8 in primary arterial endothelial cells regardless of their shape

Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Sinitsky M.Yu., Velikanova E.A.

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

Background. Calcium phosphate bions are formed under blood supersaturation with calcium and phosphate. Circulating bions provoke endothelial injury via lysosome-dependent cell death accompanied by release of proinflammatory cytokines into the microenvironment.

Aim. To evaluate the cytokine secretion profile of human primary arterial endothelial cells (ECs) exposed to either spherical (CPB-S) or needle-shaped (CPB-N) calcium phosphate bions.

Materials and Methods. CPB-S and CPB-N were added at equal concentrations (100 μ L, optical density 0.08–0.10, at 650 nm

wavelength) to confluent cultures of primary coronary artery (HCAEC) and internal thoracic artery (HITAEC) endothelial cells in 6-well plates. At 24 h of culture, the cell culture supernatant was collected, and respective cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, tumor necrosis factor- α , and γ -interferon) were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. Expression of cytokine (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, IL12A, IL12B, IL23, TNF, IFNG) and cytokine receptor genes (IL1R1, IL1R2, TNFRSF1A, TNFRSF1B) was quantified with the reverse transcription-polymerase chain reaction.

Results. Exposure to both CPB-S and CPB-N led to statistically significant increases in the expression of IL1B, IL6, CXCL8, IL12A, and IL23 genes. HCAEC were characterized by a greater response to CPB at the transcript level compared to HITAEC. Although CPB-N induced a more pronounced cytokine response than CPB-S, such shape-dependent effects were negligible at the protein level. The exposure to CPB-S and CPB-N resulted in elevated release of interleukin-6 by both types of arterial ECs while the interleukin-8 release was augmented exclusively in response to the CPB-N exposure of HITAEC.

Conclusion. Exposure of primary arterial ECs to CPB induced the release of IL-6 and IL-8 due to the expression of respective genes regardless of the CPB shape (spherical or needle-shaped).

Keywords: calcium phosphate bions; endothelial cells; cytokines; interleukin-6; interleukin-8.

For citation: Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Sinitky M.Yu., Velikanova E.A. [Calcium phosphate bions cause increased release of interleukin-6 and interleukin-8 in primary arterial endothelial cells regardless of their shape]. *Patogene. [Pathogenesis]*. 2020; 18(2): 53-60. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.02.53-60

For correspondence: Kutikhin Anton Gennadevich, 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 justification for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using a patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors"

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

Received: 30.12.2019

Введение

Повышение концентрации фосфора и кальция даже до «высоких нормальных» значений и аналогичное понижение концентрации белков-ингибиторов внескелетной минерализации альбумина и фетуина-А ассоциированы с клиническими манифестациями атеросклероза (ишемической болезнью сердца и ишемическим инсультом) [1-3]. Исследования механизмов ингибирования эктопической кальцификации на молекулярном уровне продемонстрировали ключевую роль фетуина-А как минерального шаперона, агрегирующего избыточные ионы кальция и фосфора в постепенно выводимые из организма минерало-органические наночастицы – кальций-фосфатные бионы (КФБ) [4]. Дальнейшие эксперименты по физико-химической характеристике КФБ показали, что они представляют собой наноразмерные (<1 мкм в диаметре) кристаллические частицы сферической или игольчатой формы, состоящие из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита, фетуина-А, альбумина и ряда адсорбируемых белков сыворотки крови [5].

Клиническая значимость формирования КФБ в организме человека заключается в том, что эти частицы выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека и, циркулируя в крови после своего формирования, интернализируются эндотелиоцитами [6], растворяясь в их лизосомах и специфично вызывая лизосомально-опосредованную клеточную гибель вследствие массивного выделения ионов кальция в цитозоль с последующей пермеабиллизацией внешней мембраны митохондрий и активацией каспаз внутреннего пути апоптоза (каспазы-9 и каспазы-3) [7, 8]. Данные результаты позволили выдвинуть

гипотезу о роли КФБ как пускового фактора развития дисфункции эндотелия и атеросклероза [9], поскольку нарушение целостности эндотелия представляет собой начальное звено патогенеза атеросклероза [10].

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 [11]. При этом известно, что форма наночастиц гидроксиапатита является одним из основных факторов, определяющих их токсичность; в частности, наночастицы игольчатой формы значительно токсичнее сферических [12], причем данная зависимость также характерна и для других типов наночастиц, не являясь специфичной для гидроксиапатита или форм фосфата кальция в целом [13]. Интересно, что значение для цитотоксичности КФБ имеют даже на первый взгляд незначительные различия их формы: так, игольчатые КФБ токсичнее палочковидных [14].

Так как одним из важнейших звеньев патогенеза атеросклероза является выраженное выделение эндотелиальными клетками (ЭК) провоспалительных цитокинов [15], в представленной работе была поставлена цель оценить профиль выделяемых первичными артериальными ЭК цитокинов и экспрессию кодирующих их генов под воздействием КФБ сферической (СКФБ) и игольчатой (ИКФБ) формы и сходной размерности.

Материалы и методы исследования

Искусственный синтез бионов. СКФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,45M CaCl₂ (Sigma-Aldrich, США) и 22,5 мкл

0,2М Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, США) в 1318 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США). ИКФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,45М CaCl₂ (Sigma-Aldrich, США) и 37,5 мкл 0,2М Na₂HPO₄ в 936 мкл культуральной среды DMEM, содержащей 10 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота, Thermo Fisher Scientific, США) к 495 мл среды DMEM (финальная концентрация HEPES-буфера в среде – 1%).

После кратковременного перемешивания на vortexе пробирки емкостью 1,5 мл с реагентами для синтеза бионов инкубировали при температуре 37°C (МСО-18АІС, Sanyo, Япония) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200 тыс. g и температуре 4°C в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter, США). С целью получения рабочего раствора для добавления к клеткам осадок КФБ растворяли в 300 мкл, а осадок МФБ – в 500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, Thermo Fisher Scientific, США), что позволяло достичь оптической плотности при 650 нм (ОП₆₅₀) в 0,08-0,10 (Униплан (АИФР-01), НПФ «Пикон», Россия), являющейся минимально измеримой величиной концентрации бионов в растворе. Все указанные процедуры проводили в стерильных условиях.

Экспозиция культур ЭК бионами. Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных ЭК коронарной артерии человека и первичных ЭК внутренней грудной артерии человека (Cell Applications, США). Согласно информации поставщика, вышеуказанные линии клеток были получены из здоровых артерий доноров (первичные ЭК коронарной артерии человека – мужчина, 27 лет; первичные ЭК внутренней грудной артерии человека – мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на втором пассаже (500 тыс. клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США). Пересев производили по достижении 80% конfluence. После пяти пассажей клетки рассевали в лунки 6-луночного планшета для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo, Япония).

Токсичность бионов для культур ЭК человека изучали при помощи добавления суспензии СКФБ или ИКФБ (100 мкл на лунку 6-луночного планше-

та, ОП₆₅₀ = 0,08-0,10) к вышеописанным первичным культурам артериальных ЭК (> 90% конfluence) в 6-луночных планшетах, культивирование в течение 24 часов, 11 лунок на группу). В качестве контрольной группы использовали те же линии клеток, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

Измерение уровня секретируемых цитокинов. По завершении инкубации из лунок при помощи автоматического одноканального дозатора (Ленпипет, Россия) забирали культуральную жидкость, которую разделяли на аликвоты объемом 400-500 мкл по 4 пробиркам емкостью 1,5 мл и хранили при температуре –40°C до измерения профиля секретируемых клетками провоспалительных цитокинов (интерлейкин (ИЛ)-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-23, фактор некроза опухоли (ФНО)-α, g-интерферон (g-ИФН)) методом иммуноферментного анализа посредством соответствующих наборов компании Abcam (Соединенное Королевство): ab46052, ab46027, ab46032, ab46034, ab46143, ab64708, ab46087, ab46025 в соответствии с инструкциями производителя. Выбор указанных цитокинов был обусловлен их секрецией ЭК и предполагаемой ролью в развитии атеросклероза [15]. Каждую аликвоту культуральной жидкости размораживали и использовали для анализа не более одного раза. Измерение результата проводили на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (НПФ «Пикон», Россия) на длине волны 450 нм.

Измерение уровня геной экспрессии. Непосредственно после окончания культивирования было проведено выделение тотальной РНК из клеточных культур (три биологических репликаты, каждая из которых содержала РНК из трех-четырёх лунок, на группу). Перед началом эксперимента рабочая зона и все используемое оборудование обрабатывались 0,01% раствором диэтилпирокарбоната (ингибитор рибонуклеаз). Выделение РНК из клеточных суспензий проводилось с помощью набора Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя с предварительной обработкой колонки для очистки из набора ДНКазой I согласно соответствующей опции в протоколе. Концентрация и качество выделенной РНК оценивались с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) путем измерения поглощения света при длинах волн 280 нм, 260 нм и 230 нм и расчета соотношений A260/280 и A260/230. Целостность РНК проверялась электрофорезом образцов в 3% агарозном геле с последующей визуализацией с помощью системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Выделенная РНК хранилась до следующего этапа эксперимента при температуре –70°C.

На основе выделенной РНК посредством обратной транскрипции был проведен синтез одноцепочечной кДНК согласно протоколу коммерческого набора

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на термоциклере Veriti (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация и качество синтезированной кДНК также оценивались с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) по аналогии с РНК. В качестве нормировки спектрофотометра перед измерением концентрации кДНК использовали стерильную бидистиллированную воду. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20°C .

Экспрессия генов, кодирующих изучаемые цитокины (*IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *IL10*, *IL12A*, *IL12B*, *IL23*, *TNF*, *IFNG*) и некоторые рецепторы к ним (*IL1R1*, *IL1R2*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*) оценивалась при помощи количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией результата в режиме реального времени с флюоресцентным красителем SYBR Green на амплификаторе ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Праймеры были разработаны с использованием баз данных для поиска праймеров PrimerBank и RTPrimerDB и мануального скрининга в Google с последующей проверкой их качества в программах PRaTo и PCR Primer Stats. Праймеры были синтезированы ЗАО «Евроген» (Россия).

Для проведения кПЦР готовили реакционную смесь общим объемом 10 мкл, содержащую 5 мкл мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США), по 500 нмоль/л прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. ПЦР проводили в стандартном 96-луночном оптическом планшете, содержащем, помимо анализируемых образцов, 5 стандартов с последовательным двукратным разведением для построения стандартной кривой и отрицательный контроль (реакционная смесь, не содержащая кДНК). На каждый тестируемый образец, стандарт и отрицательный контроль готовилось по три технических повтора. 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 ПЦР проводилась с помощью трех референтных генов (генов «домашнего хозяйства») *ACTB*, *GAPDH* и *B2M* в соответствии с общепринятыми на настоящий момент рекомендациями [16]. Для оценки эффективности ПЦР анализировали графики амплификации и стандартные кривые в программе QuantStudio Real-Time PCR Software v. 1.3 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Межгрупповое сравнение измеренных уровней цитокинов проводили по критерию Краскела-Уоллиса. В случае выявления статистически значимых различий между группами осуществляли последующее попарное сравнение групп с использованием

метода FDR (false discovery rate, средняя доля ложных отклонений гипотез). Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу Pfaffl [17] и выражали на логарифмической (lg) шкале в виде кратного изменения относительно контрольных культур ЭК. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Добавление как СКФБ, так и ИКФБ к конфлюэнтным культурам первичных ЭК на 24 часа индуцировало статистически значимое повышение секреции ИЛ-6 в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека, при этом ИКФБ вызывали более существенное увеличение выделения ИЛ-6 в сравнении с СКФБ лишь в ЭК внутренней грудной артерии (рис. 1, А). В отношении ИЛ-8 статистически значимое повышение при экспозиции ИКФБ было выявлено лишь для ЭК внутренней грудной артерии, а воздействие СКФБ не приводило к повышению выделения этого цитокина в обеих линиях ЭК (рис. 1, Б). Как и в случае с ИЛ-6 (рис. 1, А), ЭК внутренней грудной артерии характеризовались более высоким выделением ИЛ-8 при воздействии ИКФБ по сравнению с СКФБ (рис. 1, Б). Измерение уровня других выбранных для анализа провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-23, ФНО- α , г-ИФН) не выявило детектируемых концентраций данных цитокинов, что может свидетельствовать об отсутствии их выделения ЭК без дополнительной стимуляции иницирующими провоспалительными цитокинами (к примеру, рекомбинантными ФНО- α или ИЛ-1 β).

Анализ профиля экспрессии генов цитокинов (*IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *IL10*, *IL12A*, *IL12B*, *IL23*, *TNF*, *IFNG*) и некоторых из их рецепторов (*IL1R1*, *IL1R2*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*) выявил существенное повышение экспрессии генов:

– *IL1B* (в 3,6 и 2,8 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при экспозиции СКФБ и в 22,4 и 2,9 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при воздействии ИКФБ);

– *IL6* (в 1,9 и 1,8 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при экспозиции СКФБ и в 3,6 и 2,9 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при воздействии ИКФБ);

– *CXCL8* (в 10,2 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при экспозиции СКФБ и в 19,4 и 5,7 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при воздействии ИКФБ);

– *IL23* (в 5,9 раза и 4,7 раза в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии соответственно при экспозиции СКФБ и в 19,2 и 12,2 в ЭК коронарной и внутрен-

ней грудной артерии соответственно при воздействии ИКФБ);

IL12A (в 3,0 раза и 2,9 раза в ЭК коронарной артерии при экспозиции СКФБ и ИКФБ соответственно) (рис. 2).

Другие гены не продемонстрировали двукратного повышения или снижения экспрессии, необходимого для предположения их роли в патогенезе воспалительного ответа на КФБ (рис. 2).

Обсуждение результатов

Полученные результаты объясняют безуспешность детекции ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО- α и γ -ИФН артериальными ЭК независимо от воздействия КФБ. В то же время аналогичная ситуация наблюдалась и для ИЛ-1 β и ИЛ-23, для которых было отмечено повышение генной экспрессии при добавлении КФБ к культурам ЭК, следовательно, экспрессия генов цитокинов в арте-

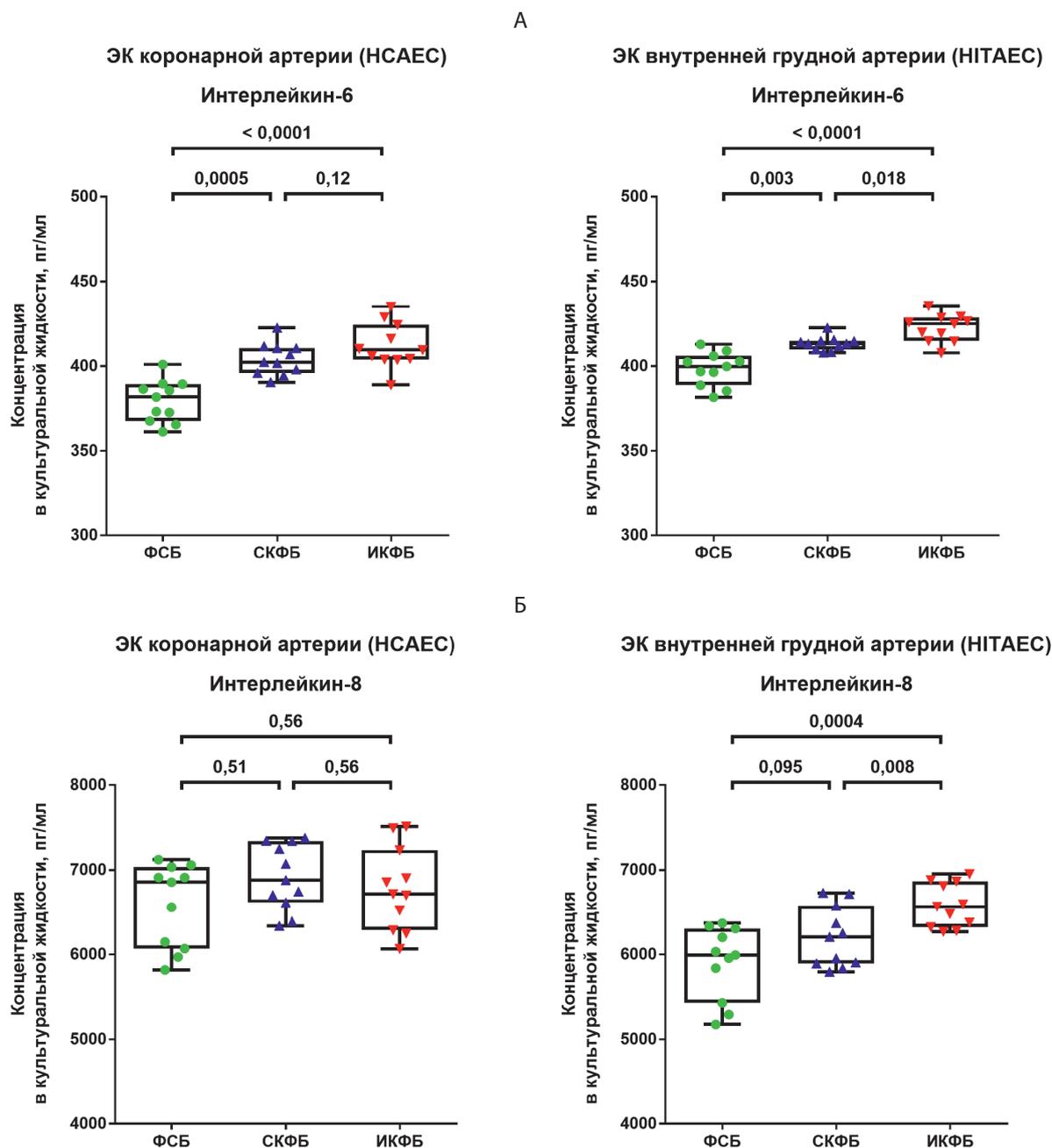


Рис. 1. Выделение цитокинов конфлюэнтными культурами первичных эндотелиальных клеток (ЭК) коронарной артерии человека и внутренней грудной артерии человека после воздействия контрольного чистого фосфатно-солевого буфера (ФСБ), сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ) в течение 24 часов. Каждая точка на графике отражает анализ культуральной жидкости с одной лунки 6-луночного планшета. Статистическая значимость межгрупповых различий приведена численно вверху графика.

риальных ЭК при воздействии различных стрессовых стимулов не всегда отражает активность их выделения этими клеточными культурами. Несмотря на то, что воздействие ИКФБ в большинстве случаев приводило к более выраженному увеличению экспрессии генов цитокинов в сравнении с СКФБ (*IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *IL23* в первичных ЭК коронарной артерии; *IL6* и *IL23* в первичных ЭК внутренней грудной артерии), на уровне белков это различие нивелировалось и было значимо лишь для ЭК внутренней грудной артерии (в отношении как ИЛ-6, так и ИЛ-8), не обладая, однако, при этом даже близкой к различиям генной экспрессии кратностью. Стоит также отметить, что независимо от формы КФБ первичные ЭК коронарной артерии характеризовались более выраженным повышением экспрессии генов цитокинов (*IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *IL23*, *IL12A*) в ответ на их воздействие, чем первичные ЭК внутренней грудной артерии.

Ранее было продемонстрировано, что обработка первичных ЭК пупочной вены человека наноразмерным гидроксиапатитом не вызывает усиленного выделения ИЛ-6, однако сокультивирование с моноцитами или добавление среды от обработанных частицами гидроксиапатита моноцитов приводит к повышению концентрации ИЛ-6 в данной культуре ЭК [18]. В то же

время в проведенном нами исследовании повышение концентрации ИЛ-6 при воздействии КФБ на артериальные ЭК достигало статистической значимости и подтверждалось соответствующими изменениями генной экспрессии. Полученные нами на артериальных ЭК результаты относительно повышенного выделения ИЛ-6 при добавлении КФБ также косвенно подтверждаются данными исследователей, изучавших цитокиновый ответ на воздействие КФБ на сосудистые гладкомышечные клетки [19, 20].

Причиной подобных различий может быть несоответствие используемых линий клеток линиями (первичные ЭК пупочной вены человека в исследовании Liu и Sun [18] и первичные ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека в проведенной нами работе). В то же время ранее нашей группой были получены аналогичные результаты на иммортализованных ЭК человека линии *EA.hy 926*, которая является гибридной первичных ЭК пупочной вены и клеток аденокарциномы легкого, в отношении как ИЛ-6, так и ИЛ-8 [9]. Кроме того, конфлюэнтность культур ЭК в сравниваемых работах была схожей и приближалась к 85-90%, как и число биореplikат и методы статистической обработки. Вероятно, причиной в несоответствии результатов может быть дозировка добавляемого

Экспрессия генов цитокинов и их рецепторов

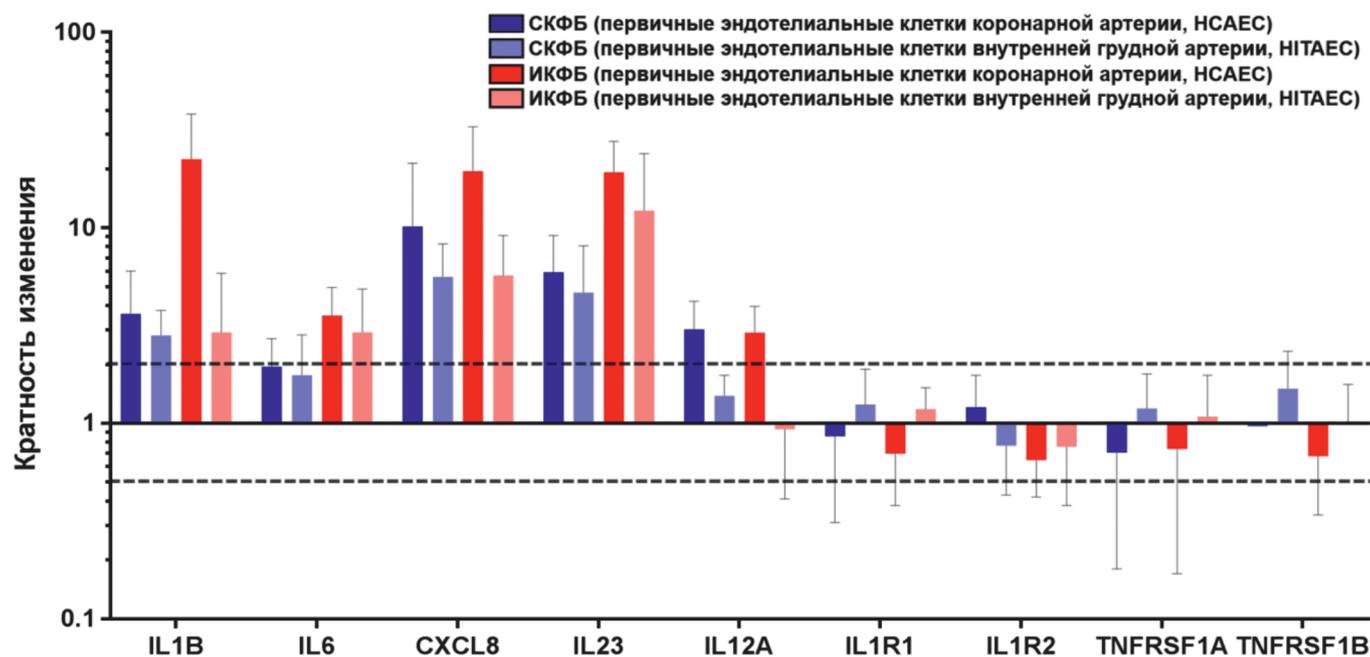


Рис. 2. Уровень экспрессии генов цитокинов в конфлюэнтных культурах первичных эндотелиальных клеток (ЭК) коронарной артерии человека и внутренней грудной артерии человека после воздействия контрольного чистого фосфатно-солевого буфера, сферических кальций-фосфатных биоонов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных биоонов (ИКФБ) в течение 24 ч. Серая пунктирная линия обозначает кратность изменения, равную 2 (формальный порог значимости повышения экспрессии – кратность изменения ≥ 2 или снижения экспрессии – кратность изменения $\leq 0,5$).

стресс-стимула (100 мкг/мл искусственно синтезированного гидроксиапатита в работе Liu и Sun [18] и $OP_{650} = 0,08-0,10$ в выполненном нами исследовании). Ограничением проведенной работы является невозможность количественного анализа КФБ в единицах отношения массы к объему, так как при их искусственном синтезе необходимо использовать сывороточную среду, а лиофильное высушивание может привести к необратимым изменениям структуры ассоциированными с КФБ белков, отсутствующих в чистом гидроксиапатите.

Заключение

Полученные в результате проведенных экспериментов результаты свидетельствуют о том, что добавление КФБ к культурам первичных артериальных ЭК способствует выделению этими клетками провоспалительных цитокинов (в частности, ИЛ-6 и ИЛ-8) в результате повышения экспрессии соответствующих генов (*IL6* и *CXCL8* соответственно) независимо от их формы (сферической или игольчатой). С целью повышения надежности результатов при анализе генной и белковой экспрессии цитокинов можно рекомендовать сочетание количественной полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа.

Список литературы

- Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. Heart J.* 2008; 156(3): 556-563. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.05.016
- Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L., Ma K., Huang Y.Y. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 691540. DOI: 10.1155/2014/691540
- Chien S.C., Chen C.Y., Lin C.F., Yeh H.I. Critical appraisal of the role of serum albumin in cardiovascular disease. *Biomark. Res.* 2017; 5: 31. DOI: 10.1186/s40364-017-0111-x
- Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T., Jahn-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(15): 13333-13341. DOI: 10.1074/jbc.M210868200
- 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
- Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Визуальная оценка интернализации кальций-фосфатных и магниевых фосфатных бионов эндотелиальными клетками методами сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. *Атеросклероз.* 2019; 15(2): 8-16. DOI: 10.15372/ATER20190202
- 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
- Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Специфичная токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 53-61. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.53-61

- 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 biions. *Sci. Rep.* 2016; 6: 27255. DOI: 10.1038/srep27255
- Gimbrone M.A. Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- Young J.D., Martel J., Young D., Young A., Hung C.M., Young L., Chao Y.J., Young J., Wu C.Y. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One.* 2009; 4(5): e5421. DOI: 10.1371/journal.pone.0005421
- Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J., Kelly D.J., O'Brien F.J., Lavelle E.C. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2922. DOI: 10.1038/s41598-017-03086-0
- Zhang B., Sai Lung P., Zhao S., Chu Z., Chrzanowski W., Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 7315. DOI: 10.1038/s41598-017-07588-9
- Santos C., Turiel S., Sousa Gomes P., Costa E., Santos-Silva A., Quadros P., Duarte J., Battistuzzo S., Fernandes M.H. Vascular biosafety of commercial hydroxyapatite particles: discrepancy between blood compatibility assays and endothelial cell behavior. *J. Nanobiotechnology.* 2018; 16(1): 27. DOI: 10.1186/s12951-018-0357-y
- Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(6): 673-685. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
- Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol. Detect. Quantif.* 2017; 14: 19-28. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Liu X., Sun J. Potential proinflammatory effects of hydroxyapatite nanoparticles on endothelial cells in a monocyte-endothelial cell coculture model. *Int. J. Nanomedicine.* 2014; 9: 1261-1273. DOI: 10.2147/IJN.S56298
- Callegari A., Coons M.L., Ricks J.L., Rosenfeld M.E., Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6. *J. Vasc. Res.* 2014; 51(2): 118-131. DOI: 10.1159/000358920
- Zickler D., Luecht C., Willy K., Chen L., Witowski J., Girndt M., Fiedler R., Storr M., Kamhieh-Milz J., Schoon J., Geissler S., Ringden O., Schindler R., Moll G., Dragun D., Catar R. 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. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2018; 33(4): 574-585. DOI: 10.1093/ndt/gfx316

References

- Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. Heart J.* 2008; 156(3): 556-563. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.05.016
- Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L., Ma K., Huang Y.Y. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 691540. DOI: 10.1155/2014/691540
- Chien S.C., Chen C.Y., Lin C.F., Yeh H.I. Critical appraisal of the role of serum albumin in cardiovascular disease. *Biomark. Res.* 2017; 5: 31. DOI: 10.1186/s40364-017-0111-x
- Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T., Jahn-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(15): 13333-13341. DOI: 10.1074/jbc.M210868200
- 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 serdечно-sosudistykh zabolevaniy* [Complex Issues of Cardiovascular Diseases]. 2019; 8(1): 59-69. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69 (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. 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)
 8. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. [Specific toxicity of calcium phosphate bions for human venous and arterial endothelial cells]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya* [Pathophysiology and Experimental Therapy]. 2019; 63(1): 53-61. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.53-61 (in Russian)
 9. 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
 10. Gimbrone M.A. Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
 11. Young J.D., Martel J., Young D., Young A., Hung C.M., Young L., Chao Y.J., Young J., Wu C.Y. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One.* 2009; 4(5): e5421. DOI: 10.1371/journal.pone.0005421
 12. Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J., Kelly D.J., O'Brien F.J., Lavelle E.C. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2922. DOI: 10.1038/s41598-017-03086-0
 13. Zhang B., Sai Lung P., Zhao S., Chu Z., Chrzanowski W., Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 7315. DOI: 10.1038/s41598-017-07588-9
 14. Santos C., Turiel S., Sousa Gomes P., Costa E., Santos-Silva A., Quadros P., Duarte J., Battistuzzo S., Fernandes M.H. Vascular biosafety of commercial hydroxyapatite particles: discrepancy between blood compatibility assays and endothelial cell behavior. *J. Nanobiotechnology.* 2018; 16(1): 27. DOI: 10.1186/s12951-018-0357-y
 15. Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(6): 673-685. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
 16. Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol. Detect. Quantif.* 2017; 14: 19-28. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001
 17. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
 18. Liu X., Sun J. Potential proinflammatory effects of hydroxyapatite nanoparticles on endothelial cells in a monocyte-endothelial cell coculture model. *Int. J. Nanomedicine.* 2014; 9: 1261-1273. DOI: 10.2147/IJN.S56298
 19. Callegari A., Coons M.L., Ricks J.L., Rosenfeld M.E., Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6. *J. Vasc. Res.* 2014; 51(2): 118-131. DOI: 10.1159/000358920
 20. Zickler D., Luecht C., Willy K., Chen L., Witowski J., Girndt M., Fiedler R., Storr M., Kamhieh-Milz J., Schoon J., Geissler S., Ringden O., Schindler R., Moll G., Dragun D., Catar R. Tumour necrosis factor- α 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. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2018; 33(4): 574-585. DOI: 10.1093/ndt/gfx316

Сведения об авторах:

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>

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>

Синицкий Максим Юрьевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; <http://orcid.org/0000-0002-4824-2418>

Великанова Елена Анатольевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; <http://orcid.org/0000-0002-1079-1956>