

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

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

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

Цель исследования – оценка токсичности кальций-фосфатных бионов (КФБ) и магний-фосфатных бионов (МФБ) для культур эндотелиальных клеток. **Методика.** Эндотелиотоксичность бионов изучена при помощи добавления равных концентраций МФБ или КФБ к: 1) разреженным или конфлюэнтным культурам immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 с последующим культивированием в течение 24 ч или 4 ч соответственно; 2) конфлюэнтным культурам коммерческих первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека с последующим культивированием в течение 24 ч. Эндотелиотоксические эффекты бионов оценивали при помощи сочетанного окрашивания клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и бромистым этидием, а также посредством колориметрического теста. Кроме того, методом проточной цитометрии оценивали пути и стадии гибели клеток вышеуказанных культур. **Результаты.** В отличие от МФБ, КФБ индуцировали гибель эндотелиальных клеток всех 3 линий путем апоптоза. Устойчивость культур к токсическому действию КФБ определялась степенью их конфлюэнтности (конфлюэнтные культуры более устойчивы чем разреженные) и типом клеточной линии (эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии продемонстрировали большую устойчивость в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии). **Заключение.** Токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток специфична, то есть определяется их специфическим минеральным составом, а не общей для всех типов бионов корпускулярной природой. Добавление КФБ к конфлюэнтным культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток и к immortalized венозным эндотелиальным клеткам вызывало их гибель, при этом экспозиция МФБ не оказывает значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии менее чувствительны к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

Ключевые слова: атеросклероз, триггеры, бионы, гидроксипатит, эндотелиальные клетки, эндотелий, цитотоксичность, апоптоз.

Для цитирования: 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

Для корреспонденции: Шишкова Дарья Кирилловна, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
e-mail: shishkovadk@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 17-04-00570 «Оценка специфичности токсического действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.02.2018

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

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

Aim. To compare toxicity of calcium phosphate bions (CPB) and magnesium phosphate bions (MPB) for endothelial cells. **Methods.** To assess endothelial toxicity of the bions, we first added equal concentrations of either MPB or CPB to: 1) non-confluent or confluent cultures of immortalized human venous endothelial cells EA.hy 926 with the exposure time of 24 h or 4 h, respectively; 2) confluent cultures of commercially available primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells, with the exposure time of 24 h. Endothelial toxicity was then evaluated by combined Hoechst 33342 and ethidium bromide staining following

fluorescence microscopy and by colorimetric cytotoxicity assay. In addition, we attempted to determine the pathway of bion-induced cell death utilizing flow cytometry. **Results.** In contrast to the MPB, CPB induced apoptosis of all studied endothelial cell lines. Resistance of endothelial cells to the CPB was defined by their confluence (confluent cultures demonstrated higher resistance), and cell type (internal thoracic artery endothelial cells were more resistant to the CPB as compared to the coronary artery endothelial cells). **Conclusions.** Endothelial toxicity of the CPB is defined by their specific mineral composition but not by their corpuscular nature, which is common for all nanoparticles. Addition of the CPB to the confluent cultures of primary human arterial cells and to immortalized human venous endothelial cells evoked their death. On the contrary, exposure to the MPB did not cause any toxic effects. Human internal thoracic artery endothelial cells are more resistant to the CPB in comparison with coronary artery endothelial cells.

Keywords: atherosclerosis, triggers, bions, hydroxyapatite, endothelial cells, endothelium, cytotoxicity, apoptosis.

For citation: 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 Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(1): 53-61. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.53-61

For correspondence: *Daria K. Shishkova*, Master of Sciences, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, e-mail: shishkovadk@gmail.com

Acknowledgements. The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research according to the research project № 17-04-00570.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The article was not published or submitted for publication elsewhere.

Information about authors:

Shishkova D.K., <http://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Velikanova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-1079-1956>

Matveeva V.G., <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>

Kudryavtseva Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-6134-7468>

Kutikhin A.G., <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Received 16.02.2018

Введение

Из клинических исследований достаточно давно известно, что как повышенный уровень кальция и фосфора [1-3], так и сниженный уровень антикальцифицирующих белков фетуина-А и альбумина в крови [4, 5] ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца, острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболеваниями периферических артерий). Одним из механизмов объяснения такой связи может быть формирование обладающих эндотелиотоксическим действием кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют собой сферические частицы губчатой структуры диаметром ≤ 500 нм, состоящие из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита и ряда белков, в том числе альбумина и фетуина-А [6, 7]. КФБ образуются в крови при ее перенасыщении ионами кальция и фосфора и препятствуют прямой кальцификации сосудов, тем самым участвуя в регуляции фосфорнокальциевого гомеостаза [6, 7]. Вместе с тем было показано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека и после своего формирования интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя ими секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская апоптоз по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [7]. Также было продемонстрировано, что КФБ могут быть синтезированы искусственно с целью

экспериментального моделирования эндотелиотоксичности и атеросклероза [6, 7].

Вместе с тем остается неизвестным, чем именно определяется эндотелиотоксичность КФБ: их специфическим химическим составом или же корпускулярной природой, общей для всех типов бионов. Для ответа на данный вопрос были искусственно синтезированы магний-фосфатные бионы (МФБ), схожие с КФБ физическими (форма и размерность) и химическими (элементный состав, функциональные группы, органический состав) параметрами, однако состоящие не из характерного для КФБ гидроксиапатита, а из магния фосфат гидрата (собственные неопубликованные данные). При этом МФБ не способны образовываться в организме человека, так как для их синтеза необходима несовместимая с жизнью концентрация магния, превышающая норму в 10-20 раз [6]. Таким образом, можно предположить, что МФБ подходят для оценки специфичности токсического действия КФБ в эксперименте.

Цель исследования – сравнение токсичности МФБ и КФБ для культур эндотелиальных клеток.

Методика

Искусственный синтез МФБ и КФБ. МФБ синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 100 мкл 0,2М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) к 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 100 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (fetal calf serum, Gibco). КФБ синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М CaCl₂ (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М Na₂HPO₄ к 1319 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация HEPES-буфера в среде – 1%).

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировали при +37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и 4°C в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). 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, 1X phosphate buffered saline, Gibco), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрацией бионов в растворе.

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

Экспозиция эндотелиальных клеток МФБ и КФБ. 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), а также коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) и первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (human internal thoracic endothelial cells, HITAEC) (Cell Applications).

Клеточная линия EA.hy 926 является гибридомой, полученной путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549. Гибридома сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека [8]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco), содержа-

щей 10% фетальной телячьей сыворотки, 2% гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco), 1% HEPES-буфера (Gibco), 1% L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4% амфотерицина В (Gibco).

Согласно информации поставщика (Cell Applications), первичные эндотелиальные клетки человека получены из здоровых артерий доноров (HCAEC – мужчина, 27 лет; HITAEC – мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на 2-м пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида (dimethyl sulfoxide, DMSO)). Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток Meso-Endo Cell Growth Medium (Cell Applications). Пересев производили по достижении 80% конfluence. После 4-5 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).

Токсичность бионов для культур эндотелиальных клеток человека изучали при помощи добавления суспензии МФБ или КФБ (100 мкл на лунку 6-луночного планшета или 10 мкл на лунку 96-луночного планшета в зависимости от эксперимента; мутность суспензии 0,5 МкФ) к: 1) клеточным культурам линии EA.hy 926 (около 40% конfluence в культуральной посуде и культивирование в течение 24 ч, либо около 90% конfluence в культуральной посуде и культивирование в течение 4 ч); 2) вышеописанным первичным культурам артериальных эндотелиальных клеток (около 85% конfluence в культуральной посуде, культивирование в течение 24 ч). 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 оценивали при помощи колориметрического теста (набор ab112118, 24 лунки 96-луночного планшета на группу) и сочетанного окрашивания клеток флюоресцентными красителями Hoechst 33342 (2 мкл/мл) и бромистым этидием (10 мкл/мл) 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)

оценивали стадию и путь клеточной смерти (ранний апоптоз — аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, поздний апоптоз — аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки и некроз — аннексин V-отрицательные и пропидия иодид-положительные клетки) под воздействием бионов.

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Межгрупповое сравнение проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа, в случае выявления статистически значимых различий между группами осуществляли последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Тьюки. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сочетанном окрашивании Hoechst 33342 (живые клетки) и бромистым этидием (мертвые клетки) показано методом фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, что экспозиция КФБ приводит к

увеличению доли мертвых клеток линии EA.hy 926 в сравнении с экспозицией МФБ как на разреженной, так и на конфлюэнтной модели культивирования (рис. 1 и 2). Аналогичные результаты получены посредством колориметрического теста на цитотоксичность. При этом общее число живых и мертвых клеток EA.hy 926 при экспозиции КФБ в сравнении с контрольными культурами, независимо от модели культивирования, значимо не отличалось. Относительное и абсолютное количество жизнеспособных клеток EA.hy 926 при экспозиции МФБ статически значимо не отличалось от такового в контрольных культурах (рис. 1 и 2).

В процессе сравнения токсичности бионов для культур клеток EA.hy 926 различной конфлюэнтности выявлено, что конфлюэнтная культура более устойчива к экспозиции бионами по сравнению с разреженной (рис. 3). Поэтому, для увеличения надежности результатов, последующие эксперименты по оценке токсичности бионов для первичных артериальных эндотелиальных клеток человека проводили именно на их конфлюэнтных культурах.

Так же, как и в случае с культурами клеток линии EA.hy 926, посредством фазово-контрастной и флюо-

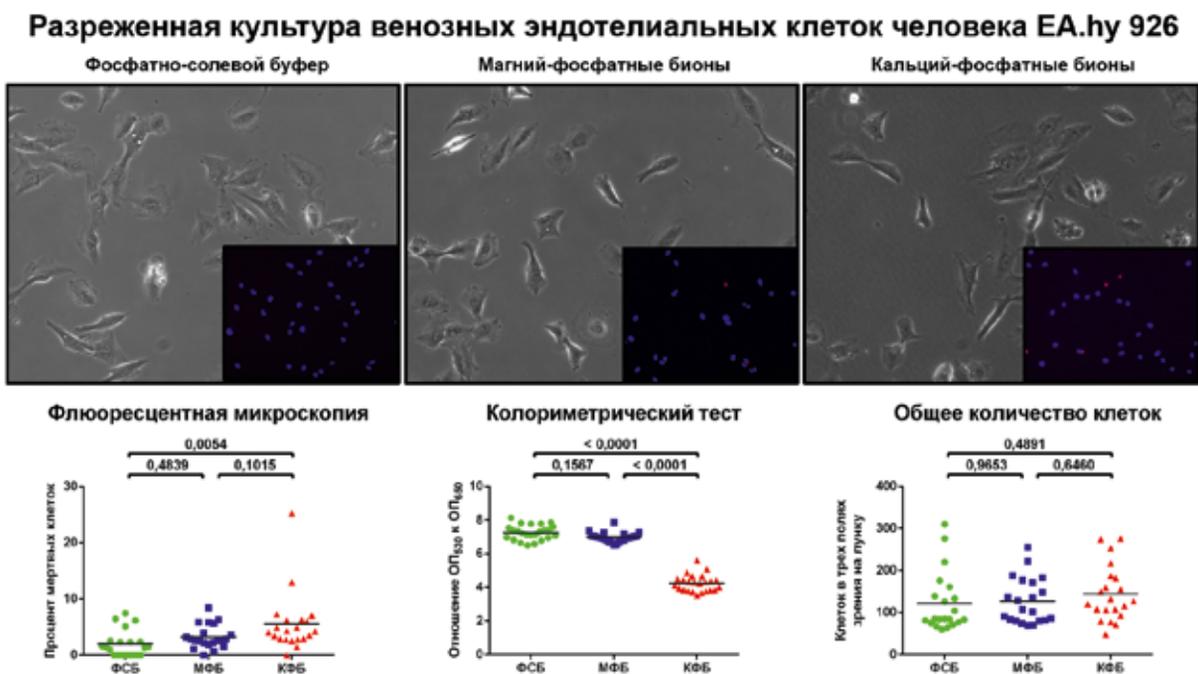


Рис. 1. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для разреженных культур immortalized венных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение x200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм (OP_{530}) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм (OP_{650}) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флуоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

ресцентной микроскопии, а также при помощи колориметрического теста показано, что КФБ вызывают гибель первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека (рис. 4 и 5). В то же время экспозиция МФБ не оказывает значимого токсического эффекта на эндотелиальные клетки коронарной артерии (рис. 4) и внутренней грудной артерии (рис. 5).

При сравнении токсичности КФБ для эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии выявлено, что КФБ существенно более токсичны для клеток коронарной артерии в сравнении с клетками внутренней грудной артерии (рис. 6).

Далее, с использованием проточной цитометрии, были изучены пути и стадии клеточной смерти под воздействием КФБ. Обнаружено, что все 3 линии эндотелиальных клеток в результате токсических эффектов КФБ погибали путем апоптоза, при этом после 24 ч экспозиции детектирован как ранний апоптоз (отражаемый аннексин V-положительными клетками и пропидия иодид-отрицательными клетками), так и поздний апоптоз (отражаемый аннексин V- и пропидия иодид-положительными клетками). При этом процент гибнущих

некрозом клеток был на порядок меньше, чем процент клеток, подвергающихся апоптозу, и не превышал одного процента при всех измерениях (рис. 7).

Проведенные ранее исследования ряда авторов показали цитотоксическое [7, 9-11], в частности, эндотелиотоксическое [7] действие КФБ. Однако природа токсического действия КФБ на эндотелиальные клетки неизвестна и может быть связана как с их специфическим минеральным составом (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит), так и с корпускулярной структурой, общей для всех бионов. Определение механизмов эндотелиотоксичности КФБ имеет значение как для разработки новых средств антикальцифицирующей терапии, которая может быть применена в профилактике и лечении атеросклероза [12, 13], так и для нанотоксикологии в связи с активно разрабатываемыми наноразмерными средствами направленной доставки лекарственных препаратов [14].

В качестве группы сравнения для оценки специфичности эндотелиотоксического действия КФБ были искусственно синтезированы МФБ, имеющие аналогичные форму, диаметр, элементный состав (за исключением наличия магния икратно более низкого

Конфлюэнтная культура венозных эндотелиальных клеток человека EA.hy 926

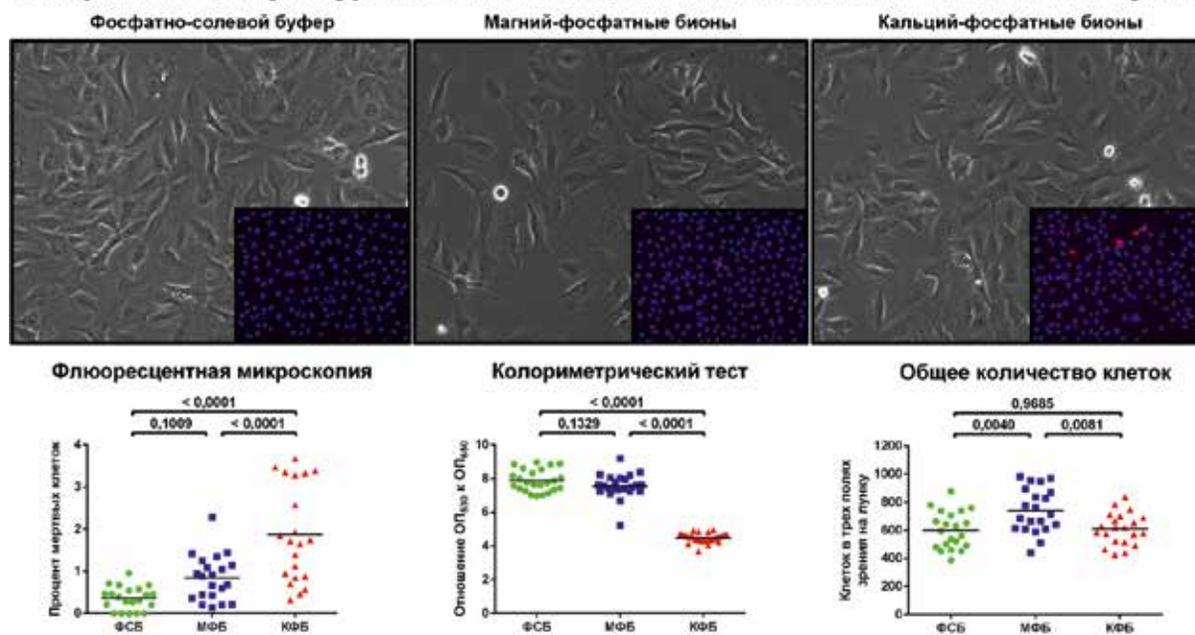


Рис. 2. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение $\times 200$. Оптическая плотность на длине волны 530 нм ($ОП_{530}$) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм ($ОП_{650}$) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флуоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

содержания кальция), функциональные группы и органический состав, однако характеризующиеся другим основным химическим соединением (магния фосфат гидрат вместо гидроксиапатита) (собственные неопубликованные данные).

Поскольку иммортализованные венозные эндотелиальные клетки широкодоступны и относительно просты в культивировании, начальные эксперименты по изучению специфичности эндотелиотоксичности КФБ проводили на линии EA.hy 926. Так как высокая конфлюэнтность культуры эндотелиальных клеток определяет ее устойчивость к повреждающим агентам [15–17], исследована токсичность бионов на 2 моделях *in vitro*: разреженной, где клетки культивировались до 40% конфлюэнтности и далее экспонировались бионами в течение 24 ч, и конфлюэнтной, где клетки культивировались до 90% конфлюэнтности и затем экспонировались бионами в течение 4 ч. Как и ожидалось, конфлюэнтные культуры эндотелиальных клеток показали большую устойчивость к экспозиции бионами по сравнению с разреженными, тем не менее на обеих моделях культивирования зафиксирована повышенная гибель клеток под воздействием КФБ в сравнении с МФБ. На выявленные различия в выраженности ток-

Сравнительная цитотоксичность

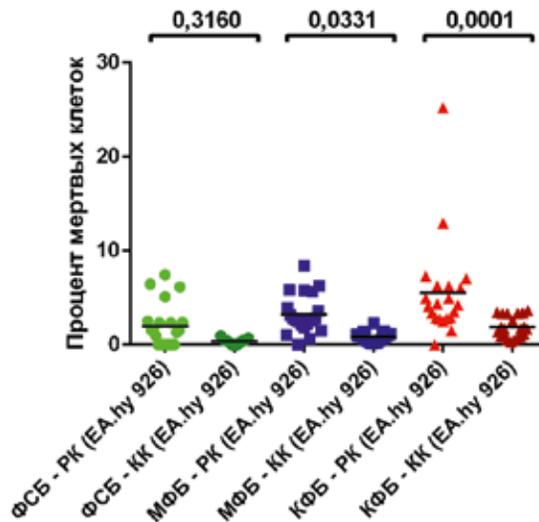


Рис. 3. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для разреженных (РК) и конфлюэнтных (КК) культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. ФСБ – фосфатно-солевой буфер. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета.

Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека

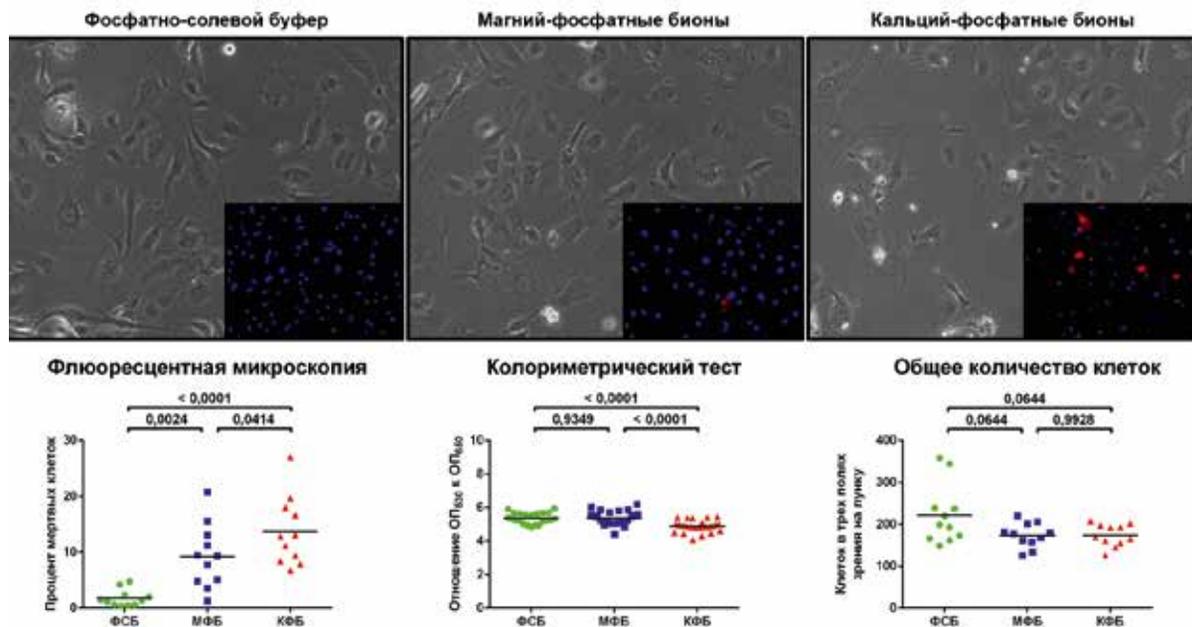


Рис. 4. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение х200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм (OP_{530}) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм (OP_{650}) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флюоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека

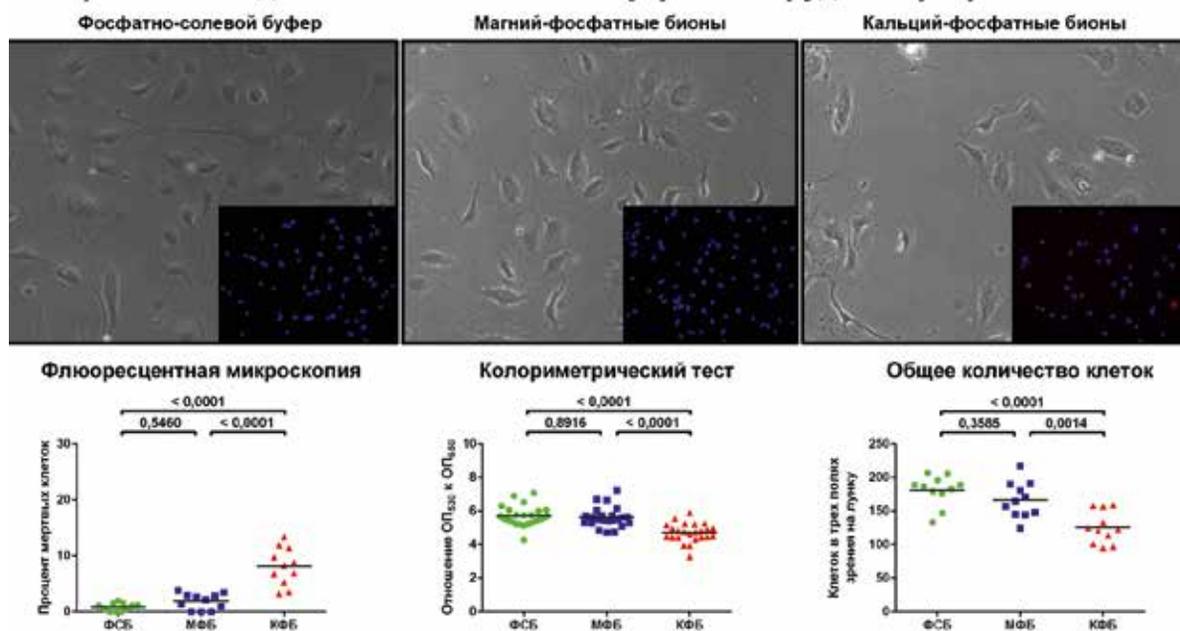


Рис. 5. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека. Синяя окраска – Hoechst 33342 (живые клетки), красная – бромистый этидий (мертвые клетки), увеличение x200. Оптическая плотность на длине волны 530 нм (OP_{530}) отражает нормальную жизнеспособность клеток, оптическая плотность на длине волны 650 нм (OP_{650}) – сниженную. Каждая точка на графиках соответствует одной лунке 6-луночного планшета (флюоресцентная микроскопия, подсчет общего количества клеток) или 96-луночного планшета (колориметрический тест).

Сравнительная цитотоксичность

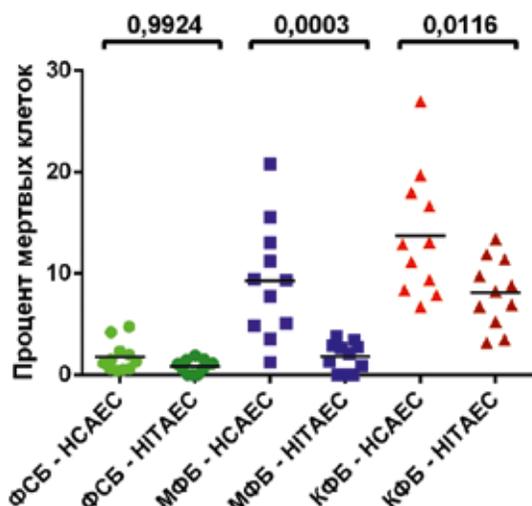


Рис. 6. Сравнительная токсичность магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HTAEC) человека, ФСБ – фосфатно-солевой буфер. Каждая точка на графике соответствует одной лунке 6-луночного планшета.

сических эффектов КФБ между двумя моделями теоретически могло также повлиять разное время экспозиции (24 ч в случае с разреженной моделью и 4 ч в случае с конфлюэнтной). Такой экспериментальный протокол был обусловлен тем, что иммортализованные по гибридной технологии клетки линии EA.hy 926 характеризуются быстрой пролиферацией и при культивировании с 90% конфлюэнтностью в течение 24 ч начинают погибать от гиперконфлюэнтности (7-8% мертвых клеток в контрольной культуре по данным проточной цитометрии, собственные наблюдения авторов), а не только от воздействия повреждающего фактора.

Известно, что физиология эндотелия различных сосудов (в частности, вен и артерий) существенно отличается [18-20]. Поскольку атеросклероз представляет собой патологию именно артериального русла, для надлежащего подтверждения эндотелиотоксического действия бионов 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 характери-

зуются разной предрасположенностью к развитию атеросклероза [21-23], для анализа токсичности бионов для артериальных эндотелиальных клеток были выбраны 2 клеточных линии: эндотелиальные клетки коронарной артерии человека, которая поражается атеросклерозом достаточно часто [21], и эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека, устойчивой к развитию атеросклероза [22, 23].

Как и в случае с клетками линии EA.hy 926, добавление КФБ к конфлюэнтным культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток вызывало их гибель, при этом МФБ не оказывали значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии имели меньшую чувствительность к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии, что может быть вызвано повышенной экспрессией эндотелиальной синтазы оксида азота и, соответственно, повышенным выделением ими монооксида азота (NO) [24-26], который обладает выраженным сосудорасширяющим и атеропротективным действием, а также препятствует развитию тромбоза [27, 28].

Гибель эндотелиальных клеток под воздействием различных повреждающих факторов может происходить по различным механизмам, включая апоптоз [29] и некроз [30]. Исследование путей и стадий смерти immortalized венозных и первичных артериальных эндотелиальных клеток под воздействием КФБ методом проточной цитометрии выявило клетки, находящиеся в состоянии как раннего, так и позднего апоптоза, однако практически не было обнаружено клеток, погибающих путем некроза, что согласуется с полученными нами ранее результатами [7].

Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на расшифровку механизмов эндотелиотоксичности КФБ на субклеточном уровне. Основываясь на имеющихся данных об интернализации КФБ эндотелиальными клетками [7], можно предположить 2 возможных механизма: 1) прямой механический разрыв лизосом под воздействием нерастворенных кристаллов гидроксиапатита; 2) нарушение осмотического баланса между лизосомами и цитоплазмой 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.

Таким образом, токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток специфична, то есть определяется их специфическим минеральным составом (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит), а не общей для всех типов бионов корпускулярной природой. Добавление КФБ к конфлюэнтным культурам первичных артериальных и к immortalized венозным эндоте-

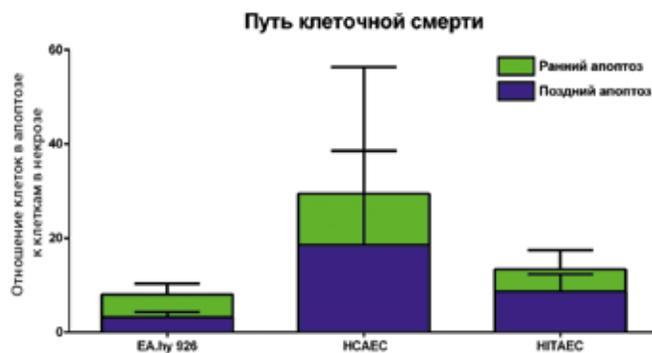


Рис. 7. Оценка путей и стадий клеточной смерти под воздействием кальций-фосфатных бионов (КФБ) на культуры immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HITAEC) человека. Ранний апоптоз – аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, поздний апоптоз – аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки.

лиальным клеткам вызывало их гибель, при этом экспозиция МФБ не оказывала значимого токсического действия. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии были менее чувствительны к воздействию КФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J. Clin. Epidemiol.* 1997; 50(8): 967-73. doi: 10.1016/S0895-4356(97)00104-2.
- 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): 556-63. doi: 10.1016/j.ahj.2008.05.016.
- Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L. et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(2): 333-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.196675.
- Danesh J., Collins R., Appleby P., Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA.* 1998; 279(18): 1477-82. doi: 10.1001/jama.279.18.1477.
- 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.
- 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.
- Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamdiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G. et al. 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.
8. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80(12): 3734-7.
 9. Aghagholzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R., Jackson C., Smith E.R., Odermatt A. et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis.* 2016; 251: 404-14. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044.
 10. 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.
 11. Peng H.H., Wu C.Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D.M. et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small.* 2013; 9(13): 2297-307. doi: 10.1002/smll.201202270.
 12. Escolar E., Lamas G.A., Mark D.B., Boineau R., Goertz C., Rosenberg Y. et al. 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). *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes.* 2014; 7(1): 15-24. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663.
 13. Peguero J.G., Arenas I., Lamas GA. Chelation therapy and cardiovascular disease: connecting scientific silos to benefit cardiac patients. *Trends Cardiovasc. Med.* 2014; 24(6): 232-40. doi: 10.1016/j.tcm.2014.06.002.
 14. Blau R., Krivitsky A., Epshtein Y., Satchi-Fainaro R. Are nanotheranostics and nanodiagnosics-guided drug delivery stepping stones towards precision medicine? *Drug Resist. Updat.* 2016; 27: 39-58. doi: 10.1016/j.drug.2016.06.003.
 15. Nguyen L.K., Yee R.W., Sigler S.C., Ye H.S. Use of in vitro models of bovine corneal endothelial cells to determine the relative toxicity of viscoelastic agents. *J. Cataract Refract. Surg.* 1992; 18(1): 7-13.
 16. Rauen U., Noll T., Piper H.M., Lauchart W., Becker H.D., De Groot H. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology.* 1994; 31(2): 144-53.
 17. van Setten P.A., van Hinsbergh V.W., van der Velden T.J., van de Kar N.C., Vermeer M., Mahan J.D. et al. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997; 51(4): 1245-56.
 18. Aitsebaomo J., Portbury A.L., Schisler J.C., Patterson C. Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circ. Res.* 2008; 103(9): 929-39. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184937.
 19. Atkins G.B., Jain M.K., Hamik A. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31(7): 1476-84. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.228999.
 20. Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 2017; 35(3): 265-77. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
 21. Brown R.A., Shantsila E., Varma C., Lip G.Y. Current Understanding of Atherogenesis. *Am. J. Med.* 2017; 130(3): 268-82. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.10.022.
 22. Otsuka F., Yahagi K., Sakakura K., Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann. Cardiothorac. Surg.* 2013; 2(4): 519-26. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.
 23. Perrotta I., Sciangula A., Concistrè G., Mazzulla S., Aquila S., Agnino A. Internal mammary artery atherosclerosis: an ultrastructural study of two cases. *Ultrastruct. Pathol.* 2014; 38(3): 199-203. doi: 10.3109/01913123.2013.868568.
 24. He G.W., Liu Z.G. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation.* 2001; 104(12 Suppl 1): I344-9. doi: 10.1161/hc37t1.094930.
 25. Gaudino M., Toesca A., Maggiano N., Pragliola C., Possati G. Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; 125(6): 1510-5. doi: 10.1016/S0022-5223(03)00029-1.
 26. He G.W., Fan L., Grove K.L., Furnary A., Yang Q. Expression and function of endothelial nitric oxide synthase messenger RNA and protein are higher in internal mammary than in radial arteries. *Ann. Thorac. Surg.* 2011; 92(3): 845-50. doi: 10.1016/j.athoracsurg.2011.04.063.
 27. Walford G., Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1(10): 2112-8. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00345.x.
 28. Vanhoutte P.M., Zhao Y., Xu A., Leung S.W. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ. Res.* 2016; 119(2): 375-96. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.
 29. Chen J., Mehta J.L., Haider N., Zhang X., Narula J., Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ. Res.* 2004; 94(3): 370-6. doi: 10.1161/01.RES.0000113782.07824.BE.
 30. Vissers M.C., Carr A.C., Winterbour C.C. Fatty acid chlorohydrins and bromohydrins are cytotoxic to human endothelial cells. *Redox Rep.* 2001; 6(1): 49-55. doi: 10.1179/135100001101536030.

Сведения об авторах:

Шшишкова Дарья Кирилловна, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

Великанова Елена Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: velikanova_ea@mail.ru;

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: matveeva_vg@mail.ru;

Кудрявцева Юлия Александровна, доктор биол. наук, зав. отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: kudrua@kemcardio.ru;

Кутихин Антон Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com