

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

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

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ), 650002, г. Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

**Цель исследования** – оценка токсического действия сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов на предварительно поврежденную интиму аорты крыс.

**Методика.** Токсическое действие сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов на поврежденную интиму брюшной аорты крыс линии Wistar ( $n = 10$  на группу) оценивали путем их однократного внутривенного введения после баллонной ангиопластики с эксплантацией поврежденного участка аорты через 5 нед. Биоптаты анализировали: 1) классическими гистологическими методами (окрашивание гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату); 2) иммунофлуоресцентным окрашиванием криосрезов (сочетанное окрашивание на CD31 и CD34, на CD31 и  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -ГМА), на виментин и  $\alpha$ -ГМА, на коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА). Для оценки влияния системного воспаления на КФБ-индуцированную эндотелиотоксичность определяли содержание моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс посредством иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Сферические кальций-фосфатные бионы и игольчатые кальций-фосфатные бионы вызывали выраженную гипертрофию интимы брюшной аорты в 90% (9 из 10 крыс) и 80% случаев (8 из 10 крыс) соответственно, в то время как частота гипертрофии в группе контрольных крыс составила лишь 10% (1 из 10 крыс). Неинтима при экспозиции интимы брюшной аорты обоим типам бионов характеризовалась переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда с контрактильного ( $\alpha$ -ГМА-положительные и виментин-отрицательные гладкомышечные клетки) и неактивного ( $\alpha$ -ГМА-отрицательные и виментин-положительные фибробласты) на активный синтетический ( $\alpha$ -ГМА- и виментин-положительные клетки), что приводило к формированию значительных количеств экстрацеллюлярного матрикса. Внутривенное введение сферических кальций-фосфатных бионов и игольчатых кальций-фосфатных бионов не приводило к изменению уровней MCP-1/CCL2 и церулоплазмينا в сыворотке крови, что свидетельствовало об отсутствии их возможного влияния на развитие системного воспалительного ответа.

**Заключение.** Внутривенное введение кальций-фосфатных бионов после повреждения интимы брюшной аорты крыс путем баллонной ангиопластики вызывает развитие гипертрофии интимы, частота и выраженность которой не зависит от формы кальций-фосфатных бионов и которая характеризуется переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда из контрактильного/неактивного на активный синтетический. При этом эндотелиотоксическое действие кальций-фосфатных бионов обусловлено их непосредственным воздействием на эндотелий, а не развитием системного воспаления.

**Ключевые слова:** атеросклероз; бионы; наночастицы; фосфат кальция; токсичность; эндотелий; гипертрофия интимы; системное воспаление.

**Для цитирования:** 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

**Для корреспонденции:** Кутихин Антон Геннадьевич, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза ФГБНУ НИИ КПССЗ, 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** 09.10.2018

Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L.

## TOXICITY OF SPHERICAL AND NEEDLE-SHAPED CALCIUM PHOSPHATE BIONS TO INJURED INTIMA OF THE RAT ABDOMINAL AORTA

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Sosnovy Blvd 6, Kemerovo 650002, Russia

**Purpose.** To compare toxicity of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB) to injured intima of rat aortas.

**Methods.** Toxicity of SCPB and NCPB to injured abdominal aortas of Wistar rats (n = 10 per group) was evaluated using intravenous administration of the bions after balloon angioplasty. Rats were sacrificed five weeks postoperation, and an injured aortic segment was excised. Tissue preparations were stained with hematoxylin and eosin, alizarin red S, Weigert-van Gieson, and Movat's pentachrome stains. Selected tissue samples were then examined using combined immunofluorescence staining (CD31/CD34, CD31/ $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA),  $\alpha$ -SMA/vimentin, and  $\alpha$ -SMA/collagen IV). Possible influence of systemic inflammation on CPB-induced endothelial toxicity was assessed by measuring monocyte chemoattractant protein-1 and ceruloplasmin in rat serum using the enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results.** Intravenous administration of SCPB or NCPB provoked intimal hyperplasia in 90% (9 of 10) and 80% (8 of 10) of rats vs. 10% (1 of 10) in the control group. The neointima was characterized by a phenotypic switch of mesenchymal cells, i.e. transition of a contractile ( $\alpha$ -SMA-positive, vimentin-negative vascular smooth muscle cells) and quiescent ( $\alpha$ -SMA-negative vimentin-positive fibroblasts) to an active synthetic phenotype (double-positive cells), which resulted in deposition of the extracellular matrix. Neither SCPB nor NCPB changed serum levels of pro-inflammatory molecules, MCP-1/CCL2, and ceruloplasmin.

**Conclusions.** Intravenous administration of CPB upon balloon-induced vascular injury caused intimal hyperplasia regardless of the CPB shape. Hyperplasia foci were characterized by a switch of mesenchymal cells from a contractile/quiescent to an active synthetic phenotype. Endothelial toxicity of CPBs was defined by their direct cytotoxic action rather than induction of systemic inflammation.

**Keywords:** atherosclerosis; bions; nanoparticles; calcium phosphate; toxicity; endothelium; intimal hyperplasia; systemic inflammation.

**For citation:** Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L. Toxicity of spherical and needle-shaped calcium phosphate bions for injured intima of abdominal aorta. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 80-88. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 80-88

**For correspondence:** Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

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

**Acknowledgements.** This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of 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. The article was not published or submitted for publication elsewhere.

### Information about authors:

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

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

Barbarash O.L., <http://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

**Received** 09.10.2018

## Введение

Из клинико-эпидемиологических исследований достаточно давно известно, что повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями — ишемической болезнью сердца и острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу [1, 2]. Известно также, что сниженный уровень ингибиторов эктопической кальцификации фетуина-А и альбумина в крови также ассоциирован с повышенным риском развития ишемической болезни сердца [3, 4].

В то же время свободные ионы кальция и фосфора могут приводить к прямой кальцификации средней оболочки сосудов без признаков атеросклеротического поражения [5, 6]. Ингибирование кальцификации меди осуществляется за счет функционирования ряда белков с различными механизмами связывания кальция — альбумином, остеоонектином и фетуином-А [7]. Альбумин связывает ионизированный кальций посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, остеоонектин — при помощи EF-руки, специфического белкового домена [7]. Связывание кальция фетуином-А обусловлено от-

рицательными зарядами  $\beta$ -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [7]. Таким образом, альбумин и остеоонектин связывают свободный кальций с низкой и высокой аффинностью соответственно, а фетуин-А отвечает за высокоаффинное связывание фосфата кальция [7].

В свою очередь, связывание фосфата кальция фетуином-А также осуществляется двумя различными механизмами [8]. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция [8]. Несмотря на теоретическую возможность их визуализации методами высококоразрешающей электронной микроскопии и элементного анализа, на данный момент изучение роли таких кластеров в патогенезе различных видов решения задач патологической физиологии технически затруднительно вследствие их чрезвычайно малой размерности. Другим механизмом связывания фетуином-А фосфата кальция является формирование кальций-фосфатных бионов (КФБ) – кристаллических частиц гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита (80–500 нм в диаметре), имеющих губчатую структуру и включающих в себя еще ряд белков сыворотки крови [8–10]. При избытке ионов кальция и фосфора или нарушении их выведения КФБ способны накапливаться в крови человека [9, 10].

Поскольку, являясь фактором риска развития атеросклероза, повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови также приводит к формированию КФБ, нами была *выдвинута гипотеза* о триггерной роли КФБ в развитии атеросклероза вследствие повреждения ими эндотелия [10, 11]. Было обнаружено, что КФБ интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская процесс апоптоза по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [10]. Показано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека [10]. КФБ могут быть также синтезированы искусственно, что может быть использовано при моделировании эндотелиотоксичности [9, 10].

Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови обусловлена предрасположенностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью (ХПН) и больных артериальной гипертензией к формированию КФБ по сравнению с условно здоровыми донорами крови [12]. Кроме того, предрасположенность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хронической болезнью почек

3-й и 4-й стадией [13], а также у больных терминальной ХПН, включая пациентов, перенесших трансплантацию почки. При этом у всех пациентов со склонностью к формированию КФБ повышен риск летального исхода, в том числе и от сердечно-сосудистых причин [14–16]. С научной и клинической точки зрения представляется чрезвычайно важным детальное изучение механизмов патогенного и, в частности, эндотелиотоксического действия КФБ.

Проведенные ранее эксперименты позволили предположить, что при умеренном перенасыщении крови ионами кальция и фосфора могут образовываться КФБ сферической формы (СКФБ), а при тяжелом перенасыщении – КФБ игольчатой формы (ИКФБ) [17]. При этом известно, что форма наночастиц является одним из основных факторов, определяющих их патогенность, в частности, наночастицы игольчатой формы значительно опаснее сферических [18–20]. Цель исследования – сравнение эндотелиотоксического действия СКФБ и ИКФБ на предварительно поврежденную интиму брюшной аорты крыс.

## Методика

**Приготовление СКФБ и ИКФБ.** Искусственный синтез СКФБ осуществляли путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich) в 1319 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. ИКФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,5М  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich) и 37,5 мкл 0,2М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich) к 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (конечная 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 °С, 5%  $\text{CO}_2$  и 90% влажности (МСО-18А1С, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 г и 4 °С в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочей суспензии для инъекции осадок СКФБ растворяли в 300 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл 0,9% раствора NaCl, что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта Мак-

Фарланда (МкФ), эквивалентной оптической плотности на длине волны 650 нм 0,08-0,10. Данные значения соответствуют минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрации бионов в растворе. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях.

*Эксперименты на животных.* Все работы с лабораторными животными проводили в соответствии с «правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министра здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Wistar ( $n = 30$ ) массой 200–300 г, на модели повреждения интимы брюшной аорты баллоном для коронарной ангиопластики. Все животные получали ингаляционную анестезию в течение всей операции. Животное фиксировали в положении на спине, обрабатывали операционное поле 70% этанолом. Затем выполняли полную срединную лапаротомию. После изолирования полости брюшины салфетками, петли кишечника отводили вправо и заворачивали в предварительно увлажненную и согретую салфетку. Вдоль корня брыжейки вскрывали задний листок брюшины и выделяли аорту от уровня почечных артерий до бифуркации. На аорту дистальнее почечных артерий и на уровне бифуркации накладывали 2 сосудистых зажима типа «бульдог». При этом одновременно пережимали аорту и нижнюю полую вену. На 3 мм проксимальнее бифуркации аорты аорту пунктировали в проксимальном направлении иглой 21G и в просвет сосуда заводили баллон для коронарной баллонной ангиопластики. Затем проводили ангиопластику давлением 6 атм в течении 30 с. После этого баллон извлекали, просвет аорты промывали 0,9% NaCl, накладывали П-образный шов (Prolene 8-0). Место повреждения эндотелия после проведения ангиопластики находилось на 4 мм проксимальнее П-образного шва. Петли кишечника возвращали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку послойно ушивали непрерывным обвивным швом (Лавсан 4-0). Непосредственно перед ушиванием брюшную полость заполняли подогретым до 37 °C 0,9% NaCl. Для изучения токсического действия бионов на интиму аорты крыс суспензию СКФБ или ИКФБ (900 мкл, 0,5 МкФ) или такой же объем стерильного 0,9% NaCl (контроль) однократно вводили в хвостовую вену (по 10 животных на группу). Все процедуры проводились в стерильных условиях. После операции животных помещали в клетку на теплую подстилку. Осмотр крыс проводился ежедневно.

Через 5 нед под наркозом забирали поврежденный участок брюшной аорты, который разрезали на два равных сегмента – один фиксировали в 10% нейтральном

забуференном формалине в течение 24 ч при 4 °C с последующей заливкой в парафин, а второй замораживали при -140 °C. Для изучения аорт готовили циркулярные срезы толщиной 8 мкм (12 серийных срезов, равномерно распределенных по всей длине соответствующего сегмента аорты, на стекло). Для анализа использовали: 1) классические гистологические методы (окрашивание гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату); 2) иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов (использованы сочетанные окраски а) на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34, б) на CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -ГМА), в) на маркер фибробластов виментин и  $\alpha$ -ГМА, г) на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА, после всех окрасок докрашивали ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss). Оценивали наличие или отсутствие гипертрофии интимы, а также отношение утолщенного участка интимы к наиболее тонкому (для количественной оценки гипертрофии интимы) в программе ImageJ. У всех животных брали кровь для определения в сыворотке концентрации провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا посредством иммуноферментного анализа (наборы ab100777 и ab108820, Abcam).

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

Через 5 нед после введения бионов в хвостовую вену крыс в предварительно поврежденных баллоном участках брюшных аорт при окрашивании гематоксилин-эозином выявлена гипертрофия интимы в группах крыс с введением СКФБ (9 из 10 крыс) и ИКФБ (8 из 10 крыс) (рис. 1, а). В то же время в контроле частота гипертрофии интимы была кратно ниже (1 из 10 крыс) (рис. 1, а). При оценке выраженности гипертрофии интимы отсутствовали статистически значимые

различия между группами животных, которым вводили СКФБ и ИКФБ (рис. 1, б).

Репрезентативные микрофотографии окрашенных гематоксилин-эозином срезов брюшных аорт представлены на рис. 2, а. Окрашивание ализариновым красным показало полное отсутствие признаков кальцификации сосудистой ткани во всех образцах (рис. 2, б).

Окрашивание на коллаген и эластин (по Вейгерту-ван Гизону) позволило визуализировать внутреннюю эластическую мембрану, отделяющую интиму от меди. У крыс, которым внутривенно вводились СКФБ и ИКФБ, отчетливо визуализировалась гипертрофия интимы брюшной аорты (рис. 3, а). Пентахромное окрашивание на фибрин и все компоненты сосудистой

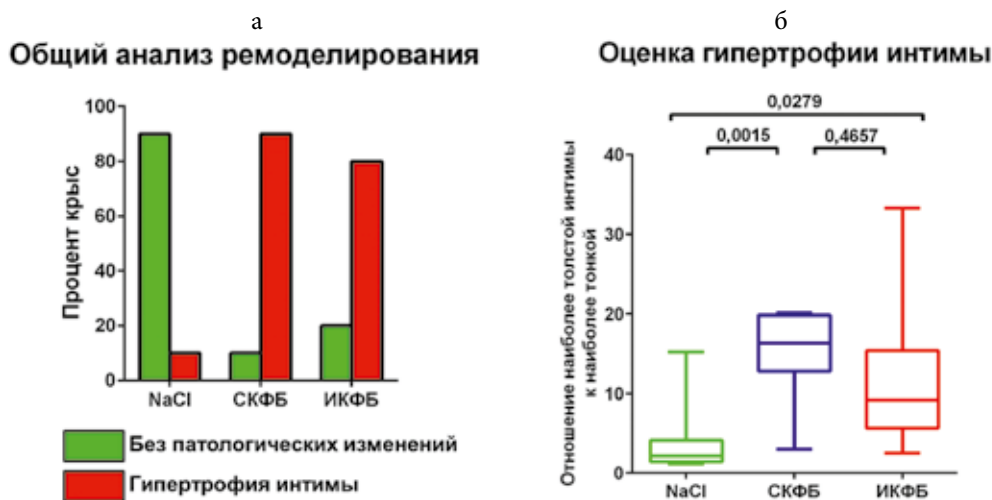


Рис. 1. Анализ а) частоты и б) выраженности гипертрофии интимы брюшной аорты крыс после проведения баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ).

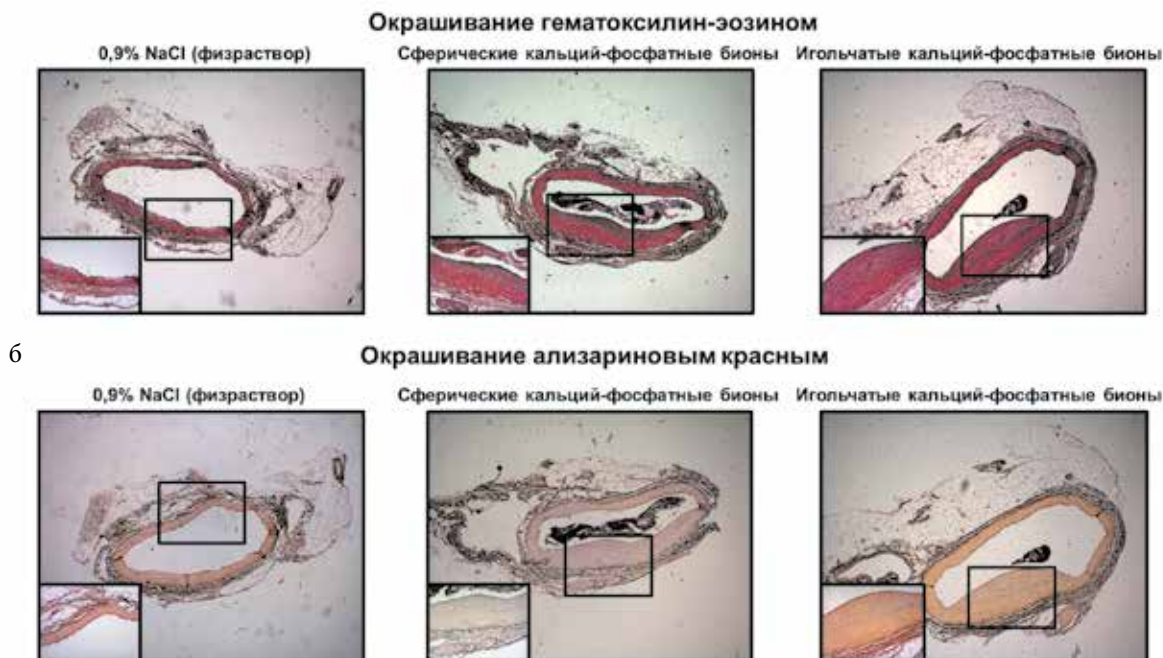


Рис. 2. Брюшная аорта крыс после проведения баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов или игольчатых кальций-фосфатных бионов. а) окрашивание гематоксилин-эозином и б) окрашивание ализариновым красным (увеличение  $\times 50$ , вставки в левом нижнем углу –  $\times 200$ ).

ткани (коллаген, эластин, гладкую мышечную ткань и основное вещество) по Расселлу-Мовату позволило оценить эластическую мембрану и состояние всех компонентов сосудистой стенки в отдельности (рис. 3, б).

При сочетанном окрашивании на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34 был обнаружен монослой CD31<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> клеток (рис. 4), свидетельствующий о процессе реэндотелизации брюшной аорты крыс после ангиопластики и последующего введения бионов. Реэндотелизация осуществляется по механизму миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток из неповрежденного эндотелия, а не по механизму адгезии и дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока. Сочетанное окрашивание на CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток  $\alpha$ -ГМА выявило значительное количество CD31<sup>-</sup> $\alpha$ -ГМА<sup>+</sup> клеток в неоинтимае (рис. 4), что указывает на участие механизма миграции и пролиферации гладкомышечных клеток из мидии в формировании неоинтимы. В свою очередь, сочетанное окрашивание на маркер фибробластов виментин и  $\alpha$ -ГМА также показало присутствие в неоинтимае виментин<sup>+</sup> $\alpha$ -ГМА<sup>+</sup> клеток (рис. 4), предположительно образовавшихся в результате активации местных фибробластов и фибро-

бластов мигрировавших из адвентиции. При сочетанном окрашивании на маркер экстрацеллюлярного матрикса (коллаген IV типа и  $\alpha$ -ГМА) обнаружено в неоинтимае большое количество коллагена IV типа, локализованного в экстрацеллюлярном матриксе вокруг клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов), что свидетельствует об их синтетической активности (рис. 4).

Измерение уровня провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактанта/хемотаксического белка-1 (monocyte chemoattractant protein 1, monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс методом иммуноферментного анализа выявило отсутствие повышения их концентрации при внутривенном введении СКФБ и ИКФБ, что показывает отсутствие индукции КФБ системного воспалительного ответа (рис. 5).

Целостность и функциональная активность эндотелия играют ключевую роль в его устойчивости к атерогенезу [11]. Повреждение эндотелия инициируется при сочетании турбулентного кровотока и различных факторов сердечно-сосудистого риска (артериальной гипертензии, дислипидемии, гипергликемии и системного воспаления); происходит инфильтрация интимы моноцитами, впоследствии дифференцирующимися в

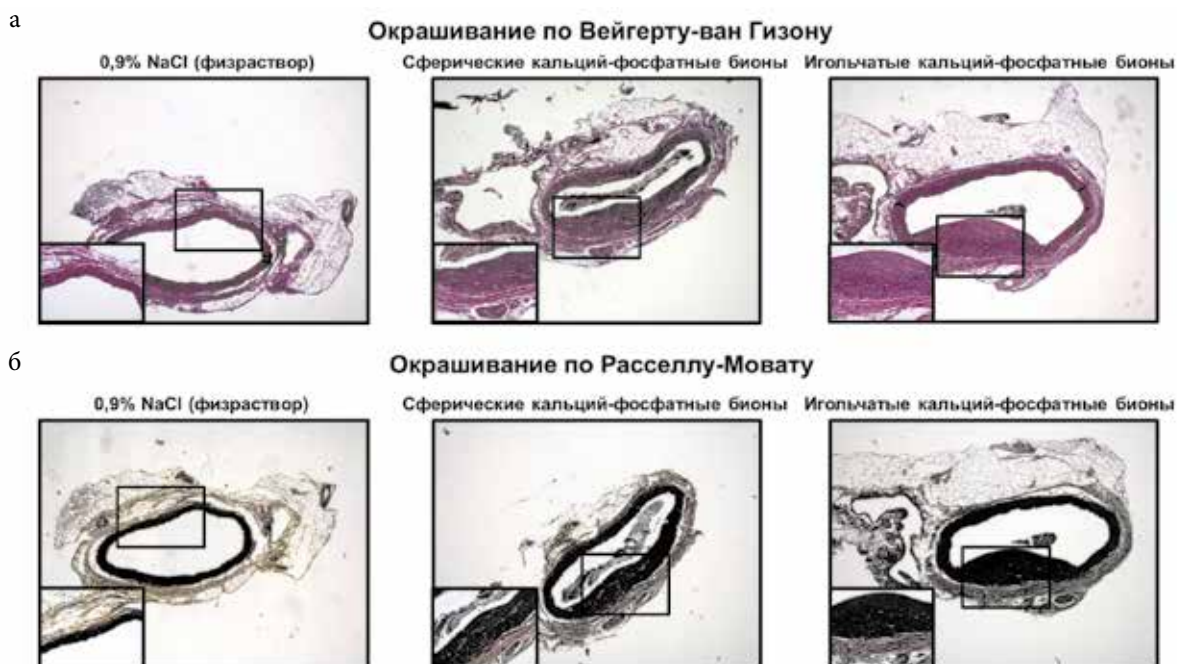
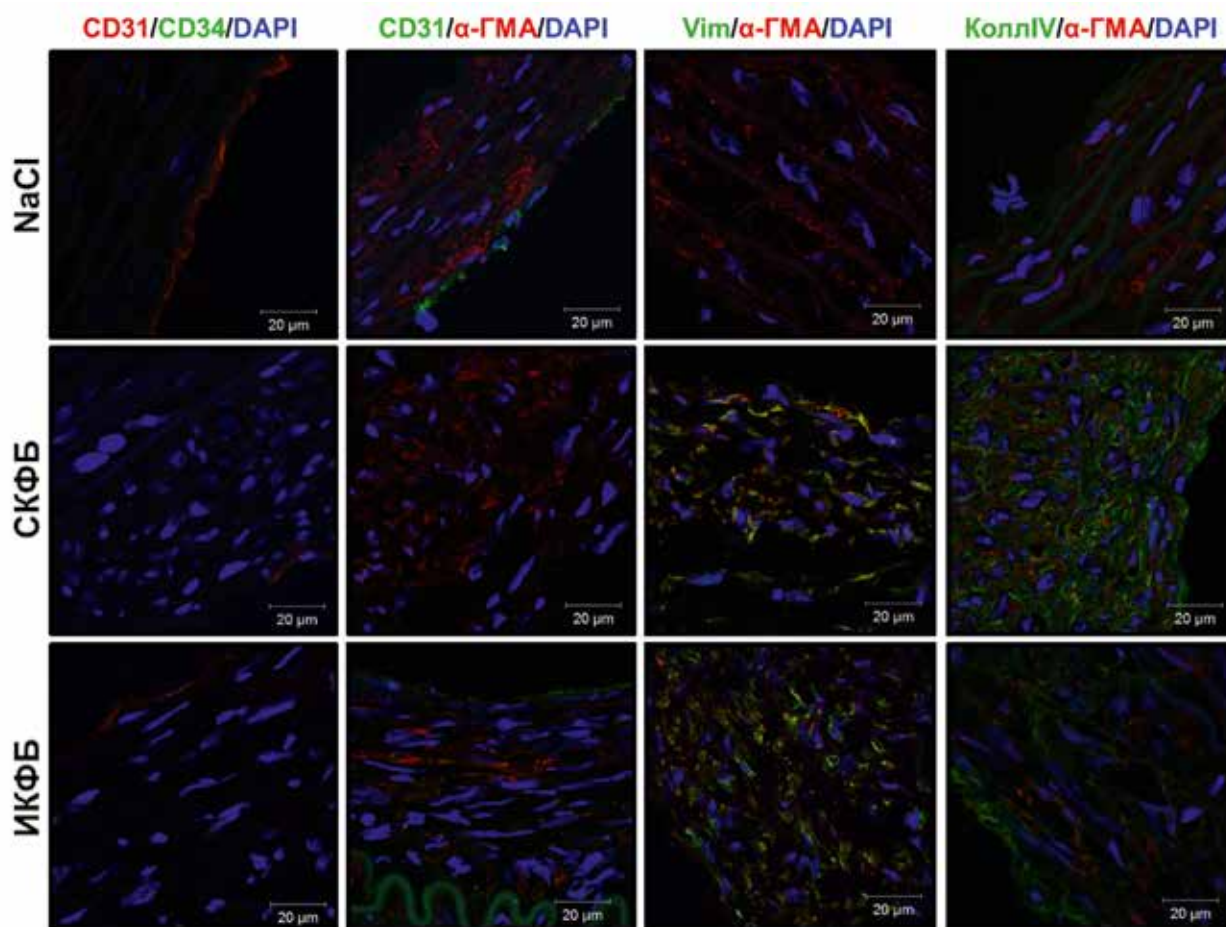
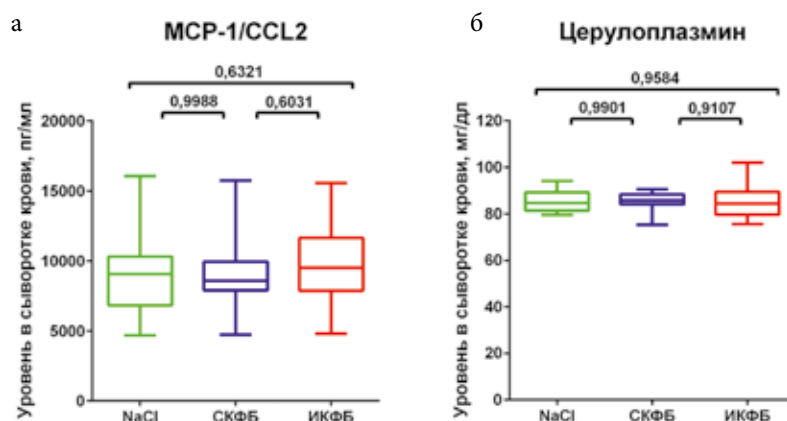


Рис. 3. Брюшная аорта крыс после проведения баллонной ангиопластики в контроле и при введении сферических кальций-фосфатных бионов или игольчатых кальций-фосфатных бионов. а) окрашивание по Вейгерту-ван-Гизону и б) окрашивание по Расселлу-Мовату (увеличение  $\times 50$ , вставки в левом нижнем углу –  $\times 200$ ).



**Рис. 4.** Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов брюшной аорты крыс после баллонной ангиопластики и однократного внутривенного введения 0,9% раствора NaCl, сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ). CD31 – маркер зрелых эндотелиальных клеток, CD34 – маркер эндотелиальных прогениторных клеток, α-гладкомышечный актин (α-ГМА) – маркер гладкомышечных клеток, Vim (виментин) – маркер фибробластов, коллаген IV типа – маркер экстрацеллюлярного матрикса, DAPI – ядерный краситель 4,6-диамидино-2-фенилиндол.



**Рис. 5.** Уровни провоспалительных цитокинов А) моноцитарного хемоаттрактантного/хемотаксического белка-1 (MCP-1/CCL2) и Б) церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при внутривенном введении сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) или игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ).

макрофаги, которые поглощают окисленные липопротеины низкой плотности, образуя пенистые клетки [11]. В дальнейшем происходит деградация базальной мембраны вследствие действия матриксдеградирующих ферментов; поврежденные эндотелий и макрофаги синтезируют множество хемокинов и факторов роста, которые индуцируют миграцию гладкомышечных клеток из меди и фибробластов из адвентиции в интиму с их дальнейшей пролиферацией и постепенным переходом на синтетический фенотип, сопровождающийся активным синтезом белков экстрацеллюлярного матрикса, что в конечном счете приводит к образованию неоинтимы [11]. Наибольший объем неоинтимы составляют белки экстрацеллюлярного матрикса [11].

Поскольку КФБ рассматриваются в качестве потенциального триггера развития атеросклероза [11], в данной работе было изучено влияние формы искусственно синтезированных КФБ на токсичность для эндотелия после предварительного повреждения брюшной аорты баллоном во время ангиопластики. Такое повреждение аорты в сочетании с внутривенным введением СКФБ и ИКФБ приводило к высокой частоте и выраженности формирования неоинтимы, в которой было выявлено большое количество гладкомышечных клеток, фибробластов и локализованного вокруг них коллагена IV типа, указывающего на активный синтетический фенотип этих клеток. Это свидетельствует о характерных для атерогенеза процессах, которые были вызваны экспозицией КФБ, при этом существенных различий в частоте и выраженности формирования неоинтимы, а также в ее гистоморфологических характеристиках при воздействии СКФБ и ИКФБ выявлено не было.

В ряде работ была показана роль эндотелиальных прогениторных клеток в регенерации функционально активного эндотелия после повреждения [21, 22]. Данная популяция клеток циркулирует в крови и способна прикрепляться к поврежденным участкам эндотелия и дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [21, 22]. В то же время, по наблюдениям других авторов, процесс восстановления поврежденного эндотелия осуществляется посредством миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток с соседних участков здорового эндотелия [23, 24]. В нашем исследовании было показано, что процесс реэндотелизации брюшной аорты происходит именно по этому механизму, поскольку методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при эндотелизации неоинтимы был выявлен монослой зрелых (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) эндотелиальных клеток при полном отсутствии эндотелиальных прогениторных (CD31<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>) клеток или эндотелиальных клеток с переходным фенотипом (CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>).

Известно, что циркулирующие в периферической крови молекулы системного воспаления также способствуют нарушению эндотелиального гомеостаза и развитию дисфункции эндотелия [25]. При внутривенном введении как СКФБ, так и ИКФБ не было выявлено повышения концентраций молекул системного воспаления MCP-1/CCL2 и церулоплазмينا в сыворотке крови прооперированных крыс, что свидетельствует о прямом эндотелиотоксическом действии исследованных типов бионосов.

Таким образом, внутривенное введение КФБ после повреждения интимы брюшной аорты крыс вызывает развитие гипертрофии интимы, частота и выраженность которой не зависит от формы КФБ и которая характеризуется переходом фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактильного/неактивного на активный синтетический фенотип. При этом эндотелиотоксическое действие КФБ обусловлено их непосредственным воздействием на эндотелий, а не развитием системного воспаления.

#### Литература/References

1. 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.
2. 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.
3. Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P. et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000; 321(7255): 199-204. doi: 10.1136/bmj.321.7255.199.
4. 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.
5. El-Abbadi M.M., Pai A.S., Leaf E.M., Yang H.Y., Bartley B.A., Quan K.K. et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney. Int.* 2009; 75(12): 1297-307. doi: 10.1038/ki.2009.83.
6. Sonou T., Ohya M., Yashiro M., Masumoto A., Nakashima Y., Ito T. et al. Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model. *J. Atheroscler. Thromb.* 2015; 22(11): 1197-206. doi: 10.5551/jat.28647.
7. Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T. et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(15): 13333-41. doi: 10.1074/jbc.M210868200.
8. Heiss A., Pipich V., Jahnhen-Dechent W., Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new



- insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys. J.* 2010; 99(12): 3986-95. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.030.
9. 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.
  10. 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.
  11. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118(4): 620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
  12. Pruijm M., Lu Y., Megdiche F., Piskunowicz M., Milani B., Stuber M. et al. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease. *J. Hypertens.* 2017; 35(10): 2044-52. doi: 10.1097/HJH.0000000000001406.
  13. Smith E.R., Ford M.L., Tomlinson L.A., Bodenham E., McMahon L.P., Farese S. et al. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25(2): 339-48. doi: 10.1681/ASN.2013060635.
  14. Pasch A., Block G.A., Bachtler M., Smith E.R., Jahn-Dechent W., Arampatzis S. et al. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE Trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2017; 12(2): 315-22. doi: 10.2215/CJN.04720416.
  15. Keyzer C.A., de Borst M.H., van den Berg E., Jahn-Dechent W., Arampatzis S., Farese S. et al. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 27(1): 239-48. doi: 10.1681/ASN.2014070670.
  16. Dahle D.O., Åsberg A., Hartmann A., Holdaas H., Bachtler M., Jenssen T.G. et al. Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* 2016; 16(1): 204-12. doi: 10.1111/ajt.13443.
  17. 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/sml.201202270.
  18. Zhao X., Ng S., Heng B.C., Guo J., Ma L., Tan T.T. et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch. Toxicol.* 2013; 87(6): 1037-52. doi: 10.1007/s00204-012-0827-1.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Hristov M., Erl W., Linder S., Weber P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2004; 104(9): 2761-6. doi: 10.1182/blood-2003-10-3614.
  22. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005; 111(22): 2981-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340.
  23. Hagensen M.K., Shim J., Falk E., Bentzon J.F. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 808-13. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221184.
  24. Hagensen M.K., Raarup M.K., Mortensen M.B., Thim T., Nve-gaard J.R., Falk E. et al. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc. Res.* 2012; 93(2): 211-2. doi: 10.1093/cvr/cvr342.
  25. 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): 673-85. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.

#### Сведения об авторах:

**Кутихин Антон Геннадьевич**, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза НИИ КПССЗ, e-mail: antonkutikhin@gmail.com;

**Шишкова Дарья Кирилловна**, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза 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;

**Мионов Андрей Владимирович**, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: a.mir.80@mail.ru;

**Кривкина Евгения Олеговна**, мл. науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ, e-mail: leonora92@mail.ru;

**Барбараш Ольга Леопольдовна**, доктор мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, директор НИИ КПССЗ, e-mail: barbol@kemcardio.ru