

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18

Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А.

## Детекция окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках человека при воздействии кальций-фосфатных бионов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

**Введение.** Кальций-фосфатные бионы (КФБ) формируются в организме человека при перенасыщении сыворотки ионами кальция и фосфора и вызывают дисфункцию эндотелия, однако молекулярные механизмы нарушения функционирования эндотелия при воздействии КФБ не ясны. Цель исследования – выяснение роли кальций-фосфатных бионов различной формы в развитии окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках (ЭК) человека.

**Методика.** Для детекции окислительного стресса к конфлюэнтным культурам первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека добавляли равные концентрации КФБ сферической или игольчатой формы (СКФБ и ИКФБ соответственно) с последующим культивированием в течение 1 и 4 ч, добавлением флуоресцентных индикаторов окислительного стресса MitoSOX Red и CellROX Green и конфокальной микроскопией. Измеряли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в культуральной жидкости через 24 ч экспозиции эндотелиальных клеток КФБ. Анализ нейтрализации цитотоксических эффектов перекисного окисления липидов проводили путем добавления к ЭК супероксиддисмутазы и каталазы на 4 или 24 ч (одновременно с КФБ). Для сравнения механизмов клеточной гибели при воздействии СКФБ и ИКФБ анализировали цитотоксичность обоих типов бионов при одновременном воздействии лизосомального ингибитора бафиломицина А1.

**Результаты.** Значимого увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) в результате экспозиции СКФБ (независимо от линии ЭК и продолжительности экспозиции) не было выявлено. В то же время наблюдалось повышение генерации супероксида через 4 ч, а иных свободных радикалов через 1 ч после добавления ИКФБ к ЭК. Предварительная нейтрализация АФК супероксиддисмутазой и каталазой частично защищала ЭК от индуцируемой ИКФБ гибели. При этом добавление бафиломицина А1 к ЭК частично защищало их от гибели только при воздействии СКФБ, но не ИКФБ.

**Заключение.** Гибель ЭК при воздействии СКФБ происходит в результате первичного повреждения лизосом, а при воздействии ИКФБ – в первую очередь вследствие окислительного стресса.

**Ключевые слова:** атеросклероз; бионы; гидроксипатит; эндотелиальные клетки; активные формы кислорода; супероксид; свободные радикалы; супероксиддисмутазы

**Для цитирования:** Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А. Детекция окислительного стресса в артериальных эндотелиальных клетках человека при воздействии кальций-фосфатных бионов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 70-78.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.70-78

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

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кутихин А.Г., Шишкова Д.К.; сбор и обработка материала – Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Мухамадияров Р.А., Великанова Е.А.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование – Кутихин А.Г.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.02.2020

Принята в печать 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A.

## Detection of oxidative stress induced by calcium phosphate bions in human arterial endothelial cells

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

**Background.** Calcium phosphate bions (CPB) form in the human blood upon its supersaturation with calcium and phosphate and provoke endothelial dysfunction; however, the molecular mechanisms of these pathological processes remain unclear.

**Aim.** To elucidate the role of differently shaped CPBs in induction of oxidative stress in human arterial endothelial cells (ECs).

**Methods.** For detection of oxidative stress, equal concentrations of spherical CPB (CPB-S) or needle-shaped CPB (CPB-N) were added to confluent cultures of primary human coronary artery and internal thoracic artery ECs for 1 and 4 h; this was followed by MitoSOX Red and CellROX Green staining and subsequent confocal microscopy. Concentration of thiobarbituric acid-reactive substances was measured in the EC culture supernatant at 24 h of the CPB exposure. The lipid peroxidation cytotoxicity was neutralized by adding superoxide dismutase and catalase to ECs for 4 or 24 h. To compare cell death subroutines induced by CPB-S and CPB-N, the effect of bafilomycin A1, a lysosomal inhibitor, on CRB cytotoxicity was studied.

**Results.** No increase in reactive oxygen species generation was observed in the CPB-S exposure, regardless of the EC line and exposure duration. However, addition of CPB-N to ECs increased the production of superoxide and other free radicals after four- and one-hour exposure, respectively. Prior neutralization of reactive oxygen species with superoxide dismutase and catalase partially protected ECs from CPB-N- but not CPB-S-induced death while bafilomycin A1, *vice versa*, protected ECs from CPB-S- but not CPB-N-induced death.

**Conclusion.** CPB-S cause cell death due to primary damage of lysosomes whereas CPB-N induce apoptosis due to oxidative stress.

**Keywords:** atherosclerosis; bions; hydroxyapatite; endothelial cells; reactive oxygen species; superoxide; free radicals; superoxide dismutase

**For citation:** Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A. Detection of oxidative stress induced by calcium phosphate bions in human arterial endothelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 70-78. (in Russian).  
DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.70-78

**For correspondence:** Anton G. Kutikhin, Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovyy Bulevar, Kemerovo 650025, Russian Federation, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

**Contribution:** research concept and design – Kutikhin A.G., Shishkova D.K.; material collecting and processing – Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Mukhamadiyarov R.A., Velikanova E.A.; statistical processing, writing text, text editing – Kutikhin A.G. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**Acknowledgment.** This study was supported by the Integrated 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 # 0546-2019-0002 «Pathogenetic justification for 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.

### Information about the authors:

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

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

Mukhamadiyarov R.A., <https://orcid.org/0000-0002-5558-3229>

Received 23.02.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

## Введение

Известно, что выраженные нарушения минерального гомеостаза, характерные для хронической болезни почек, и «высокий нормальный» уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемическим инсультом, ишемической болезнью сердца и заболеваниями периферических артерий) [1, 2]. Одним из механизмов поддержания минерального гомеостаза является формирование кальций-фосфат-

ных бионов (КФБ) – кристаллических наночастиц губчатой структуры, состоящих из гидроксипатита, карбонат-гидроксипатита и адсорбирующих различные белки сыворотки [3, 4].

Ранее было показано, что КФБ интернализируются эндотелиальными клетками (ЭК) [4] и оказываются в лизосомах, растворяясь в их кислой среде с последующим выделением в цитозоль опосредованно активирующей каспазы ионов кальция [5]. Последнее

способствует выделению ЭК провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6 и интерлейкина-8) [4] и лизосомально-опосредованной гибели ЭК [5, 6], индуцируя формирование неointимы [4] и воспаление адвентиции аорты крыс Wistar.

В то же время, несмотря на продемонстрированные в экспериментах патогенные и специфичные эффекты КФБ для ЭК [4-6], остается неясным, способствует ли экспозиция КФБ (наряду с запуском эффекторных каспаз) параллельному процессу окислительного стресса в ЭК, являющегося неспецифичным молекулярным последствием воздействия цитотоксических факторов. Цель исследования – оценить роль КФБ в развитии окислительного стресса в артериальных ЭК человека.

### Методика

Искусственный синтез магний-фосфатных бионов (МФБ), сферических КФБ (СКФБ) и игольчатых КФБ (ИКФБ) соответствовал ранее разработанным оригинальным протоколам [7, 8].

**Культивирование эндотелиальных клеток.** Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных ЭК коронарной артерии (human coronary artery endothelial cells, HCAEC, Cell Applications, 300K-05a) и внутренней грудной артерии человека (human internal thoracic endothelial cells, HITAEC, 308K-05a), которые размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). После 4-5 пассажей ЭК рассеивали в 8-луночные культуральные камеры (Ibidi, 80841) для проведения экспериментов.

**Детекция КФБ в эндотелиальных клетках.** С целью последующей визуализации КФБ в ЭК проводили конъюгирование осадка КФБ с раствором бычьего сыровоточного альбумина, меченного флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-БСА, 5 мг/мл, Invitrogen, A23015). КФБ с ФИТЦ-БСА инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, после чего проводили повторное ультрацентрифугирование при 200,000 g в течение 1 ч с дальнейшей однократной отмывкой в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). К конфлюэнтным культурам HCAEC и HITAEC, культивируемым в 8-луночных культуральных камерах (Ibidi, 80841), добавляли 25 мкл суспензии ФИТЦ-КФБ (мутность суспензии 0,5 стандарта МакФарланда, что эквивалентно  $OP_{650} = 0,08-0,10$ ) либо аналогичный объем ФИТЦ-БСА (2 ммоль/л, в качестве контроля) на 1 или 4 ч после чего добавляли лизосомальный краситель LysoTracker Red (Invitrogen, L7528, 500 нмоль/л) на 30 мин, ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин

с последующей конфокальной микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss).

**Детекция супероксида в эндотелиальных клетках.** Чтобы определить, вызывают ли бионы окислительный стресс в ЭК, к конфлюэнтным культурам HCAEC добавляли 25 мкл суспензии МФБ, СКФБ или ИКФБ (мутность суспензии 0,5 МкФ) на лунку 8-луночной культуральной камеры для конфокальной микроскопии (Ibidi, 80841). Далее проводили культивирование в течение 1 и 4 ч, добавляли на 15 мин флюоресцентный индикатор супероксида MitoSOX Red (Invitrogen, M36008, 5 мкмоль/л) и ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) с последующей конфокальной микроскопией. Либо после 1 и 4 ч культивирования добавляли флюоресцентный индикатор свободных радикалов CellROX Green (Invitrogen, C10444, 5 мкмоль/л) на 30 мин и ядерный краситель Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин с дальнейшей конфокальной микроскопией. Здесь и далее в качестве контрольной группы использовали те же линии ЭК, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

**Измерение концентрации продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой.** Для определения уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) к конфлюэнтным культурам HCAEC и HITAEC (культивирование в течение 24 ч, 11 лунок на экспериментальную группу) добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ (100 мкл на лунку, мутность суспензии 0,5 МкФ). После инкубации из лунок забирали культуральную жидкость.

Концентрацию продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ПР-ТБК) в культуральной жидкости измеряли путем добавления 1 мл ТБК (Sigma-Aldrich) и 3 мл  $H_3PO_4$  (Sigma-Aldrich) к 250 мкл образца. После 1 ч инкубации при 100 °С и охлаждения при 8 °С в течение 5 мин для обогащения фракции ПР-ТБК добавляли 1 мл н-бутанола. После 10 мин центрифугирования при 3000 об/мин надосадок помещали в 96-луночные планшеты (100 мкл на лунку, каждый образец в 3 повторах) с последующим измерением при длине волны 450 нм ( $OP_{450}$ ). Концентрацию ПР-ТБК в каждом образце далее рассчитывали путем деления показателя  $OP_{450}$  на коэффициент молярной экстинкции малонового диальдегида (0,156) и последующего умножения на фактор разведения образца (16).

**Оценка эффективности нейтрализации активных форм кислорода.** С целью анализа эффективности предотвращения цитотоксических эффектов ПОЛ к конфлюэнтным культурам HCAEC (культивирование в те-

чение 4 или 24 ч с добавлением или без добавления антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (250 ЕД/мл) или 500 ЕД/мл каталазы (12 лунок на экспериментальную группу)) добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ (10 мкл на лунку, мутность суспензии 0,5 МкФ). Супероксиддисмутазу и каталазу добавляли за 3 ч до экспозиции для обеспечения проникновения ферментов через плазматическую мембрану. Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически, добавляя реактив ab112118 (Abcam) на 4 ч, с последующими измерениями и расчетами по протоколу производителя.

**Анализ проницаемости лизосом.** Для анализа влияния ацидификации лизосом на цитотоксичность бионов к конфлюэнтным культурам НСАЕС в 96-луночных планшетах добавляли суспензию МФБ, СКФБ или ИКФБ либо аналогичный объем ФСБ (10 мкл, мутность суспензии 0,5 МкФ) на 4 или 24 ч с добавлением или без добавления бафиломицина А1 специфического ингибитора вакуолярной  $H^+$ -АТФазы (Abcam, ab120497, 0,1 или 1 микромоляр). Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически путем добавления реактива ab112118 (Abcam) на 4 ч с последующими измерениями и расчетами по протоколу производителя.

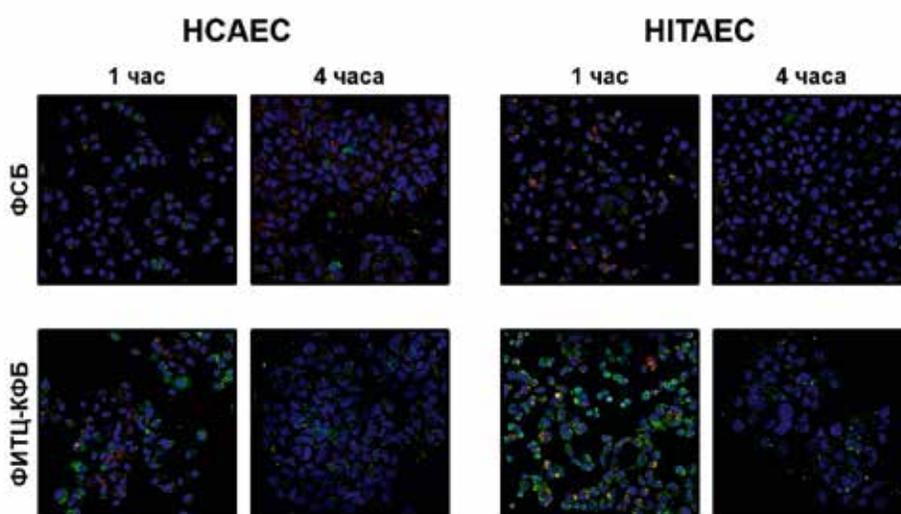
**Статистический анализ.** Статистическую обработку данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Межгрупповое сравнение проводили по критерию Краскела-Уоллиса или критерию Манна-Уитни в зависимости от числа групп. В случае выявления статистически значимых

межгрупповых различий осуществляли попарное сравнение групп посредством метода средней доли ложных отклонений гипотез. Различия между группами признавали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

При конфокальной микроскопии через 1 ч после добавления конъюгированных с ФИТЦ-БСА КФБ в значительной доле артериальных ЭК было обнаружено желтое свечение, отображающее начало процесса интернализации ФИТЦ-КФБ (зеленое свечение) в лизосомы (LysoTracker Red, красное свечение). Однако также было выражено и чисто зеленое свечение, свидетельствующее либо о локализации ФИТЦ-КФБ в цитозоле ЭК после их поглощения, либо о высвобождении ФИТЦ из лизосом после дезинтеграции КФБ в кислой лизосомальной среде (рис. 1). Через 4 ч после добавления ФИТЦ-КФБ к ЭК детектировалось исключительно зеленое свечение ФИТЦ-БСА, что указывает в пользу интернализации и растворения за 4 ч основной массы КФБ в лизосомах (рис. 1). Данная картина наблюдалась в обеих линиях ЭК, что свидетельствует о типовом клеточном ответе на воздействие КФБ и об отсутствии выраженных различий в интернализации КФБ различными типами ЭК.

Далее для анализа патогенного действия бионов на артериальные ЭК были взяты только культуры НСАЕС. В результате окрашивания митохондриальным красителем и детектором супероксида MitoSOX Red было визуализировано интенсивное красное свечение в ЭК, подвергшихся 4-часовому воздействию СКФБ и



**Рис. 1.** Конфокальная микроскопия НСАЕС и НИТАЕС, подвергшихся воздействию ФИТЦ-КФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342.  $\times 200$ . (Описание в тексте).

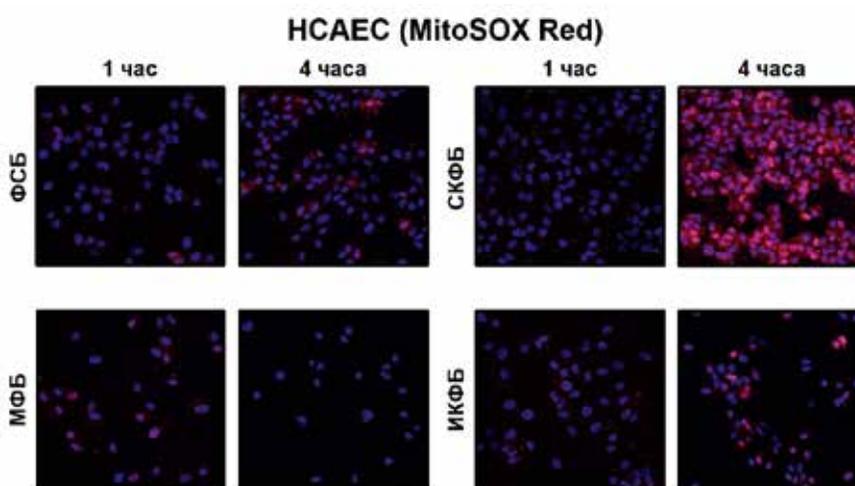
ИКФБ, что отражает повышенную генерацию супероксида в митохондриях при экспозиции бионами в сравнении с контрольными и инкубированными с безвредными МФБ ЭК (рис. 2).

При окрашивании ЭК флуоресцентным детектором свободных радикалов CellROX Green характерное яркое зеленое свечение было отмечено в ЭК, инкубированных с ИКФБ спустя 1 ч, но через 4 ч данный эффект не обнаруживался, как и в остальных группах (рис. 3).

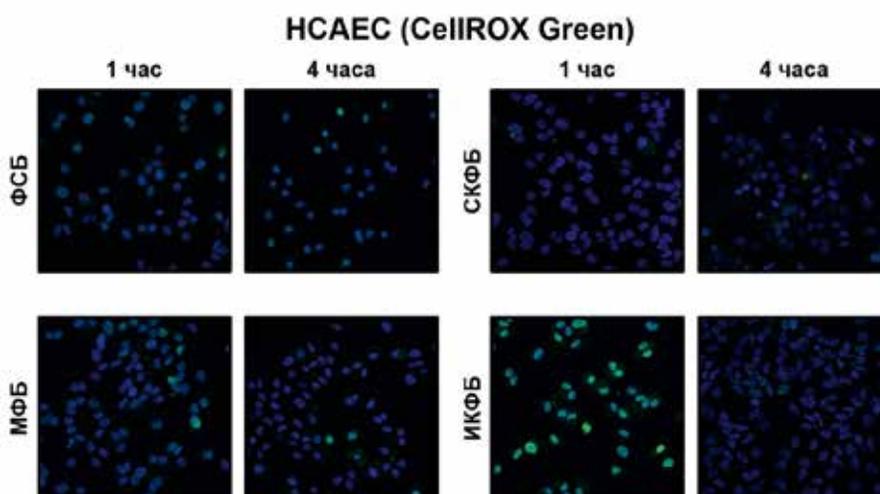
Определение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПР-ТБК), образующихся в результате окислительного стресса в культуральной жидкости, не выявило статистически значимых различий между

контрольными ЭК и ЭК, подвергшимися воздействию бионов, что указывало на отсутствие выраженных признаков окислительного стресса при воздействии КФБ (рис. 4).

Добавление антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы не препятствовало индуцируемой СКФБ клеточной гибели независимо от используемой дозы и продолжительности экспозиции бионами, хотя в отношении ИКФБ на временной точке 4 ч данное фармакологическое воздействие повышало количество жизнеспособных ЭК (рис. 5). В целом это согласуется с данными, полученными в результате выявления флуоресцентными метками суперокси-



**Рис. 2.** Конфокальная микроскопия HCAEC, подвергшихся воздействию ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных митохондриальным красителем и индикатором супероксида MitoSOX Red и ядерным красителем Hoechst 33342.  $\times 200$ . (Описание в тексте).



**Рис. 3.** Конфокальная микроскопия культур HCAEC, подвергшихся ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных флуоресцентным детектором свободных радикалов в клетке CellROX Green и ядерным красителем Hoechst 33342.  $\times 200$ . (Описание в тексте).

да и иных свободных радикалов (повышение генерации супероксида и уровня свободных радикалов при воздействии ИКФБ в течение 4 ч и 1 ч соответственно). Таким образом, можно заключить, что ИКФБ, в отличие от СКФБ, провоцируют развитие окислительного стресса в ЭК.

Поскольку СКФБ и ИКФБ различаются по способности вызывать окислительный стресс в ЭК, было выдвинуто предположение о различных механизмах их цитотоксического действия. В частности, ранее

нашей группой было показано, что при растворении СКФБ в лизосомах происходит выделение ионов кальция в цитозоль, приводящее к повышению проницаемости внешней мембраны митохондрий и опосредованной активации каспазы-9 и каспазы-3 [5]. Воздействие специфического блокатора вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы бафиломицина А1, нейтрализующего кислую среду лизосом, частично спасало клетки от лизосомально-опосредованной клеточной гибели вследствие снижения растворимости СКФБ и,

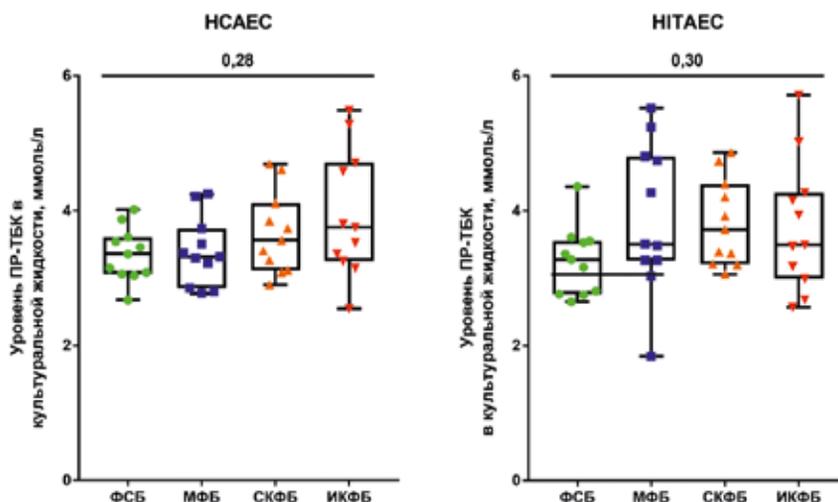


Рис. 4. Измерение уровня продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой, отражающих активность ПОЛ в культурах НСАЕС и НІТАЕС, подвергшихся воздействию ФСБ, МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 24 ч.

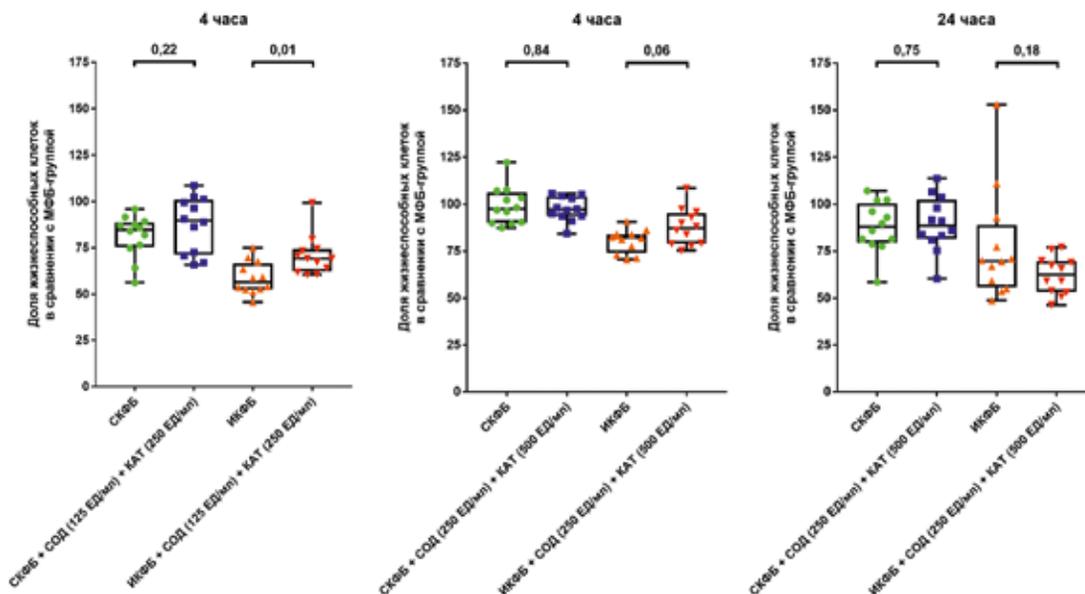


Рис 5. Оценка цитотоксичности СКФБ и ИКФБ для культур НСАЕС, в том числе при добавлении супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) в различных дозах и в различных временных точках.



зосомальную мембрану, а также открывать лизосомальные кальциевые каналы [9]; таким образом, справедливо говорить и о частичной пересекаемости данных путей нарушения внутриклеточного гомеостаза.

В одном из выполненных исследований с использованием аналогичного метода (окрашивание флуоресцентным индикатором супероксида MitoSOX) было выявлено, что экспозиция КФБ повышала выделение АФК иммортализованными макрофагами человека [12]. В другой работе данные результаты были воспроизведены на иммортализованных макрофагах мышцы посредством измерения внутриклеточного 8-изопростагландина F<sub>2α</sub> [13] – суррогатного маркера свободнорадикального окисления. В нашем исследовании были получены противоречивые результаты. С одной стороны, воздействие СКФБ определенно не сопровождалось развитием выраженного окислительного стресса независимо от метода его детекции. В то же время добавление ИКФБ к культурам ЭК стимулировало генерацию супероксида и свободных радикалов, хотя и с разной временной динамикой; кроме того, предварительная инкубация с супероксиддисмутазой и каталазой независимо от дозы частично спасала ЭК от индуцируемой ИКФБ клеточной гибели.

Это позволяет предположить, что генерация АФК не играет критически важной роли в клеточной гибели после интернализации СКФБ (в отличие от первичного повреждения лизосом), однако может вносить вклад в патогенные эффекты ИКФБ, по крайней мере для ЭК. Приоритет первичного повреждения лизосом над окислительным стрессом для опосредованной СКФБ клеточной гибели и обратная ситуация для ИКФБ свидетельствуют о различных механизмах клеточной гибели при воздействии КФБ различной формы на клетку, что частично подтверждается данными литературы, в которых ИКФБ преимущественно способствовали выделению фактора некроза опухоли альфа, а СКФБ – интерлейкина-1β, что может быть связано с более высокой растворимостью СКФБ в лизосомах и более выраженной активацией инфламмосом, зависимой от уровня кальция в цитозоле [14].

Стоит отметить, что образование АФК активно вовлечено в процесс клеточной гибели, вызываемой воздействием стандартной неорганической наноразмерной фракции фосфата кальция [15], что в любом случае не позволяет однозначно исключить окислительный стресс из механизмов цитотоксичности КФБ. Тем не менее, бионы принципиально отличаются от чистых неорганических кристаллов фосфата кальция наличием белковой составляющей, снижающей их цитоток-

сичность, так как они изначально формируются исключительно в биологических жидкостях (к примеру, сыворотке крови) [3, 4]. Вследствие этого их эффекты, в частности, для ЭК, могут отличаться.

### Заключение

Предполагается, что патогенность СКФБ для ЭК определяется в первую очередь лизосомально-опосредованной гибелью, а ИКФБ – окислительным стрессом.

### Литература

(п.п. 1-4; 9-15 см. References)

1. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н. и др. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39(4): 12-21.
2. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., 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.
3. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П. и др. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 4(2): 6-16.
4. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П. и др. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2019; 8(1): 59-69.

### 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.
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.
3. 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.
4. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov 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.
5. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Yuzhalin A.E., Kudryavtseva Yu.A., Popova A.N., et al. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 39(4): 12-21. (in Russian)
6. 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*. 2019; 1(63): 53-6. (in Russian)

7. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malyshova V.Y., Kolmykov R.P., et al. Morphological and chemical characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. *Fundamentalnaya i klinicheskaya meditsina*. 2019; 2(4): 6-16. (in Russian)
8. Shishkova D.K., Glushkova T.V., Efimova O.S., Popova A.N., Malyshova V.Yu., Kolmykov R.P., et al. Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2019; 1(8): 59-69. (in Russian)
9. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3): 486-541.
10. Dupre-Crochet S., Erard M., Nüsse O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013; 94(4): 657-70.
11. Brown G.C., Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*. 2012; 12(1): 1-4.
12. 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.
13. 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.
14. Koppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E. et al. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol*. 2018; 9: 1991.
15. Pujari-Palmer S., Chen S., Rubino S., Weng H., Xia W., Engqvist H., et al. In vivo and in vitro evaluation of hydroxyapatite nanoparticle morphology on the acute inflammatory response. *Biomaterials*. 2016; 90: 1-11.

#### Сведения об авторах:

**Кутихин Антон Геннадьевич**, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: antonkutikhin@gmail.com;

**Шिशкова Дарья Кирилловна**, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: shishkovadk@gmail.com;

**Мухамадияров Ринат Авхадиевич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отд. экспериментальной медицины, e-mail: rem57@rambler.ru;

**Великанова Елена Анатольевна**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий отд. экспериментальной медицины, e-mail: velikanova\_ea@mail.ru