

Форма кальций-фосфатных бионов определяет их токсичность для культур эндотелиальных клеток человека

А.Г. КУТИХИН, Е.А. ВЕЛИКАНОВА, Д.К. ШИШКОВА, В.Г. МАТВЕЕВА, Е.В. ГРИГОРЬЕВ, О.Л. БАРБАРАШ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Резюме

Цель исследования. Сравнение токсичности сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ) для культур эндотелиальных клеток.

Материал и методы. Эндотелиотоксичность бионов была изучена при помощи добавления равных концентраций СКФБ или ИКФБ к: 1) разреженным или конфлюэнтным культурам immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 с последующим культивированием в течение 24 или 4 часов соответственно; 2) конфлюэнтным культурам коммерчески первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии человека с последующим культивированием в течение 24 часов. 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 определяли морфотип и стадии гибели клеток вышеуказанных культур.

Результаты. СКФБ и ИКФБ индуцировали гибель эндотелиальных клеток всех трех линий по апоптотическому морфотипу, при этом ИКФБ продемонстрировали значительно более высокую цитотоксичность, чем СКФБ. Устойчивость культур к токсическому действию кальций-фосфатных бионов (КФБ) определялась степенью их конфлюэнтности (конфлюэнтные культуры были более устойчивы, чем разреженные) и типом клеточной линии (эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии показали большую устойчивость в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии).

Выводы. Токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток зависит от их формы: формирующиеся при тяжелом перенасыщении среды ионами кальция и фосфора ИКФБ обладают более высокой эндотелиотоксичностью, чем образующиеся при умеренном перенасыщении СКФБ. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии менее чувствительны к воздействию СКФБ и ИКФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

Список сокращений: КФБ — кальций-фосфатные бионы, СКФБ — сферические кальций-фосфатные бионы, ИКФБ — игольчатые кальций-фосфатные бионы, НСАЕС — первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека, НТАЕС — первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека, ФСБ — фосфатно-солевой буфер.

Ключевые слова: атеросклероз, бионы, гидроксиапатит, эндотелий, цитотоксичность, апоптоз.

Shape of calcium phosphate bions dictates their toxicity for human venous and arterial endothelial cells

A.G. KUTIKHIN, E.A. VELIKANOVA, D.K. SHISHKOVA, V.G. MATVEEVA, E.V. GRIGORIEV, O.L. BARBARASH

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

Summary

Aim. To compare toxicity of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB) for endothelial cells.

Materials and Methods. To assess endothelial toxicity of the bions, we first added equal concentrations of either SCPB or NCPB 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 morphotype of bion-induced cell death utilizing flow cytometry.

Results. Both SCPB and NCPB provoked death of all three cell lines accompanied by an apoptotic morphotype. Notably, NCPB demonstrated a significantly higher cytotoxicity as compared to SCPB. Resistance of endothelial cells to 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 shape: NCPB formed at severe supersaturation with calcium and phosphate evince considerably higher endothelial toxicity than SCPB formed under moderate supersaturation. Human internal thoracic artery endothelial cells are

more resistant to SCPB and NCPB in comparison with coronary artery endothelial cells.

List of abbreviations: CPB – calcium phosphate bions, CPBS – spherical calcium phosphate bions, CPBN – needle-shaped calcium phosphate bions, HCAEC – human coronary artery endothelial cells, HITAEC – human internal thoracic artery endothelial cells, PBS – phosphate buffered saline.

Key words: atherosclerosis, bions, hydroxyapatite, endothelium, cytotoxicity, apoptosis.

Сведения об авторах:

Кутихин Антон Геннадьевич — к. м. н., зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +79609077067, <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>, antonkutikhin@gmail.com.

Великанова Елена Анатольевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +79505702873, <http://orcid.org/0000-0002-1079-1956>, velikanova_ea@mail.ru.

Шिशкова Дарья Кирилловна — мл. научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +79516121144, <http://orcid.org/0000-0002-1518-3888>, shishkovadk@gmail.com.

Матвеева Вера Геннадьевна — к. м. н., вед. научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +79069276601, <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>, matveeva_vg@mail.ru.

Григорьев Евгений Валерьевич — д. м. н., проф., зам. директора по научной работе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +73842643308, <https://orcid.org/0000-0002-3898-0740>, grigoriev@mail.ru.

Барбараш Ольга Леонидовна — член-кор. РАН, д. м. н., проф., директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, д. 6, г. Кемерово, 650002, Российская Федерация, +73842643308, <http://orcid.org/0000-0002-4642-3610>, barbol@kemcardio.ru.

Введение

Из клинико-эпидемиологических исследований достаточно давно известно, что перенасыщение крови ионами кальция и фосфора, возникающее вследствие повышения абсолютного количества данных элементов (например, при гиперпаратиреозе или гипервитаминозе D) или по причине снижения уровня основных ингибиторов эктопической кальцификации фетуина-А и альбумина (например, при терминальной хронической почечной недостаточности или выраженной хронической печеночной недостаточности), ассоциировано с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемическая болезнь сердца, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболевания периферических артерий) [1, 2].

В ряде экспериментальных исследований было выявлено, что искусственное перенасыщение сыворотки крови ионами кальция и фосфора приводит к опосредованному фетуином-А формированию кристаллических частиц губчатой структуры диаметром 500 нм и менее, состоящих из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита и ряда сывороточных белков помимо собственно фетуина-А [3, 4]. Данные частицы были отнесены к семейству бионов — минералоорганических частиц, формирующихся в биологических жидкостях при их перенасыщении определенными положительно и отрицательно заряженными ионами, и были соответственно названы кальций-фосфатными бионами (КФБ) [3, 4].

Поскольку перенасыщение крови ионами кальция и фосфора одновременно является фактором риска развития атеросклероза и приводит к формированию КФБ, нами была выдвинута гипотеза о триггерной роли КФБ в развитии атеросклероза путем повреждения ими эндотелия [5], так как нарушение целостности эндотелия является обязательным инициирующим фактором патогенеза атеросклероза [6–8]. Обнаружено, что КФБ после своего формирования интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя ими секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская процесс апоптоза по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [5]. Кроме того, КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека [5] и также могут быть синтезированы искусственно для экспериментального моделирования эндотелиотоксичности [4, 5].

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) [9]. При этом известно, что форма наночастиц гидроксиапатита является одним из основных факторов, определяющих их токсичность; в частности, наночастицы игольчатой формы значительно токсичнее сферических [10], причем данная зависимость также характерна и для других

типов наночастиц [11]. Целью данного исследования было сравнить токсическое действие СКФБ и ИКФБ для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека.

Материал и методы

Искусственный синтез СКФБ и ИКФБ

Искусственный синтез СКФБ осуществляли путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М CaCl_2 (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) в 1319 мкл среды DMEM (Gibco), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco). ИКФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,5М CaCl_2 и 37,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (Gibco) к 495 мл среды DMEM (таким образом, конечная концентрация HEPES-буфера в среде составила 1%).

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл с реагентами для синтеза бионов помещали в инкубатор при 37 °C, 5% CO_2 и высокой влажности (МСО-18AIC, Sanyo) на 24 часа с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и 4 °C в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочей суспензии к осадку СКФБ добавляли 300 мкл, а к осадку ИКФБ — 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, 1,06 мМ (0,144 г/л) KH_2PO_4 , 155,17 мМ (9 г/л) NaCl , 2,97 мМ (0,795 г/л) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), эквивалентной оптической плотности на длине волны 650 нм (OP_{650}) в 0,08–0,10 оптических единиц. Данные значения соответствуют минимально измеримой концентрации бионов в растворе (значения OP_{650} ниже 0,08 находятся в пределах погрешности большинства микропланшетных спектрофотометров, учитывая базовую OP_{650} ФСБ в 0,045–0,055, поэтому большее разведение суспензии бионов может привести к снижению воспроизводимости результатов экспериментов). Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях.

Экспозиция эндотелиальных клеток СКФБ и ИКФБ

Для экспериментов была использована культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, предоставленная Dr. C.-J. 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, которая была получена путем слияния эндотелиальных

клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549, и сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека. Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 2% гипоксантина-аминоптерина-тимидина, 1% HEPES-буфера, 1% L-глутамин-пенициллина-стрептомицина и 0,4% амфотерицина В (все — Gibco).

Согласно информации поставщика (Cell Applications), первичные эндотелиальные клетки человека были получены из здоровых артерий доноров (HCAEC — мужчина, 27 лет; HITAEC — мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на втором пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications). Пересев проводили по достижении 80% конфлюэнтности. После четырех-пяти пассажей клетки рассевали в лунки 6-луночного планшета для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37 °C, 5% CO_2 и высокой влажности.

Токсичность бионов для культур эндотелиальных клеток человека изучали при помощи добавления суспензии СКФБ или ИКФБ (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% конфлюэнтности в культуральной посуде и культивирование в течение 24 часов либо около 90% конфлюэнтности в культуральной посуде и культивирование в течение 4 часов); 2) вышеописанным первичным культурам артериальных эндотелиальных клеток (около 85% конфлюэнтности в культуральной посуде, культивирование в течение 24 часов). В качестве контрольной группы использовали те же линии клеток, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования. Эксперименты с иммортализованными венозными эндотелиальными клетками (неконфлюэнтный и конфлюэнтный тип культуры) вследствие большого объема репликат проводили в разное время и однократно. Эксперименты с первичными эндотелиальными клетками коронарной и внутренней грудной артерий осуществляли одновременно с обеими линиями и также однократно (в связи с высокой стоимостью данных клеточных линий).

Цитотоксичность бионов оценивали при помощи колориметрического теста (набор ab112118, 24 лунки 96-луночного планшета на группу) и сочетанного окрашивания клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (2 мкл/мл) и бромистым этидием (10 мкл/мл) с дальнейшей фазово-контрастной и

флуоресцентной 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 (подсчитывали клетки в трех полях зрения на лунку). Посредством проточной цитометрии (набор ab14085, 8 лунок 6-луночного планшета на группу) оценивали стадию и морфотип клеточной смерти (морфотип раннего апоптоза — аннексин V-положительные и пропидия иодид-отрицательные клетки, морфотип позднего апоптоза — аннексин V- и пропидия иодид-положительные клетки и некротический морфотип — 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 критерия Краскела — Уоллиса, в случае выявления статистически значимых различий между группами осуществляли последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Данна. Данные представляли в виде медианы и межквартильного размаха с обозначением минимального и максимального значений. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p \leq 0,05$.

Результаты

При проведении фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии после сочетанного окрашивания Hoechst 33342 (живые клетки) и бромистым этидием (мертвые клетки) было обнаружено, что экспозиция как СКФБ, так и ИКФБ приводит к гибели венозных эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 как на разреженной (рис. 1, А, Б), так и на конфлюэнтной (рис. 2, А, Б) моделях культивирования, причем ИКФБ обладали существенно большей эндотелиотоксичностью. Общее число живых и мертвых клеток EA.hy 926 при экспозиции бионам в сравнении с контрольными культурами отличалось лишь в случае воздействия ИКФБ на конфлюэнтной модели культивирования (рис. 1, В и 2, В). Схожие результаты были получены посредством колориметрического теста на цитотоксичность (рис. 1, Г и 2, Г).

Обсуждение

Проведенные ранее исследования ряда авторов показали цитотоксическое [5, 9], в частности эндотелиотоксическое [5], действие КФБ. При этом степень перенасыщения крови ионами кальция и фосфора определяет форму КФБ [9], которая, в свою очередь, может быть фактором их цитотоксичности [10, 11]. В данном исследовании нам удалось синтезировать КФБ сфериче-

Рисунок 1. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для разреженных культур иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. ФСБ — фосфатно-солевой буфер. А — флуоресцентная микроскопия. Синяя окраска — Hoechst 33342 (живые клетки), красная — бромистый этидий (мертвые клетки), $\times 200$; Б — количественный анализ результатов флуоресцентной микроскопии. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 21, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку; В — подсчет общего количества клеток (живых и мертвых) на флуоресцентной микроскопии; Г — колориметрический тест. ОП₅₃₀ отражает нормальную жизнеспособность клеток, ОП₆₅₀ — сниженную. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 24. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки» с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперименты проведены однократно

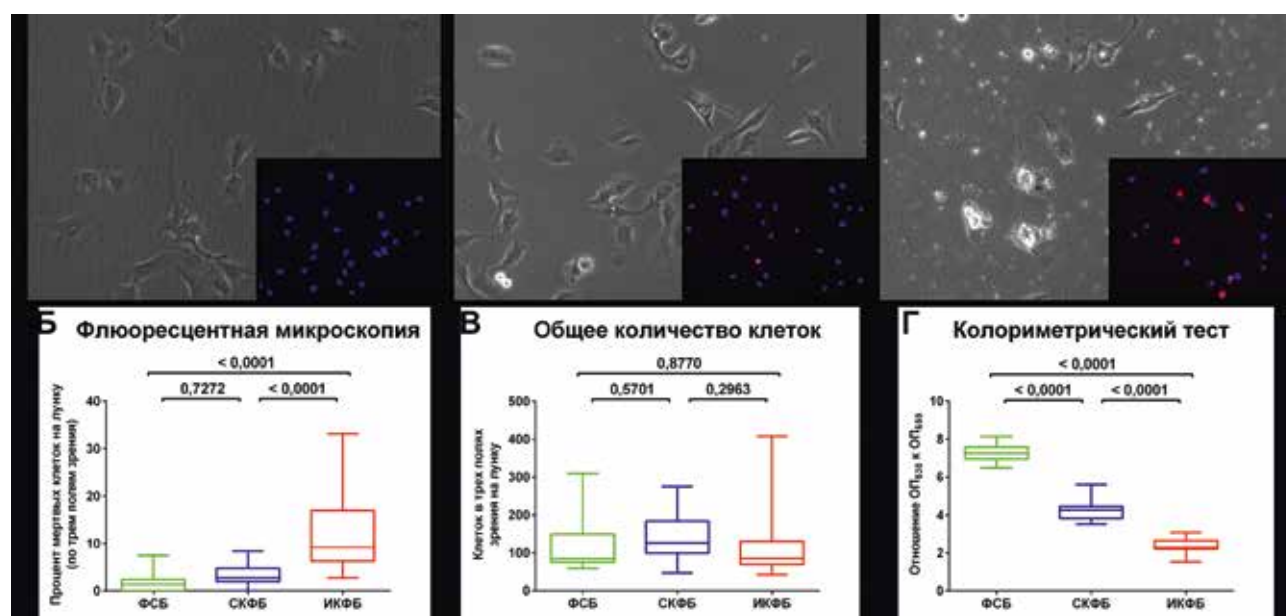
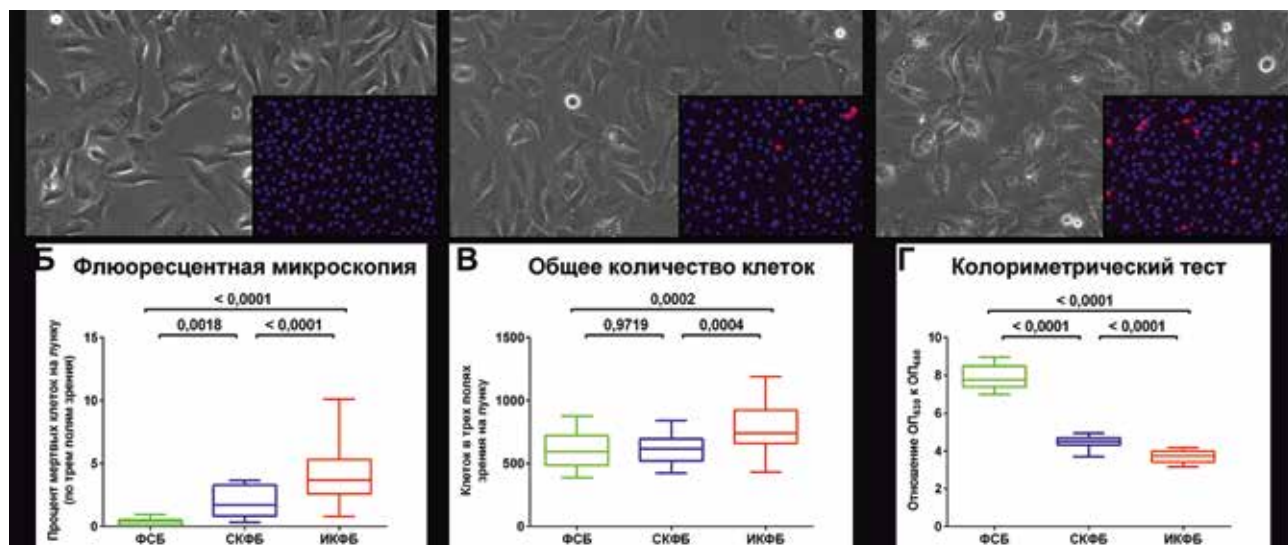


Рисунок 2. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для конфлюэнтных культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926. ФСБ — фосфатно-солевой буфер. А — флюоресцентная микроскопия. Синяя окраска — Hoechst 33342 (живые клетки), красная — бромистый этидий (мертвые клетки), $\times 200$; Б — количественный анализ результатов флюоресцентной микроскопии. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 21, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку; В — подсчет общего количества клеток (живых и мертвых) на флюоресцентной микроскопии; Г — колориметрический тест. ОП₅₃₀ отражает нормальную жизнеспособность клеток, ОП₆₅₀ — сниженную. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 24. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки») с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперименты проведены однократно



ской и игольчатой формы с идентичным минеральным (гидроксиапатит и карбонат-гидроксиапатит) и органическим (одинаковый набор сывороточных белков) профилем, а также сходной размерностью (статья в печати). Таким образом, СКФБ и ИКФБ представляли собой максимально пригодные группы для оценки влияния формы бионов на их токсичность для культур эндотелиальных клеток.

Поскольку immortalized венозные эндотелиальные клетки широкодоступны и относительно просты в культивировании, начальные эксперименты по изучению эндотелиотоксичности СКФБ и ИКФБ проводили на линии EA.hy 926. Так как целостность и функциональная активность эндотелия играют ключевую роль в его устойчивости к атерогенезу [6–8], а высокая конфлюэнтность культуры эндотелиальных клеток определяет ее устойчивость к повреждающим агентам [12–14], эндотелиотоксичность бионов исследована на двух *in vitro* моделях: разреженной, где клетки культивировались до 40% конфлюэнтности и далее экспонировались бионам в течение 24 часов, и конфлюэнтной, где клетки культивировались до 90% конфлюэнтности и затем экспонировались бионам в течение 4 часов.

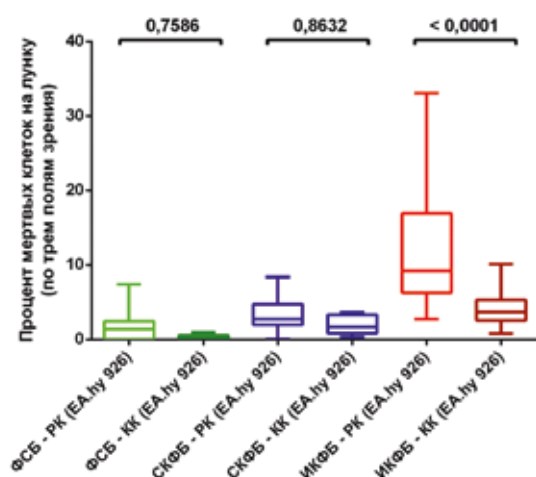
Как и ожидалось, конфлюэнтные культуры эндотелиальных клеток показали большую устойчивость к экспозиции СКФБ и ИКФБ в сравнении с разреженными, однако ИКФБ продемонстрировали более высокую эндотелиотоксичность, чем СКФБ, на обеих моделях культивирования. Стоит отметить, что на

выявленные различия в выраженности токсических эффектов двух типов КФБ между двумя моделями теоретически могло также повлиять разное время экспозиции (24 часа в случае с разреженной моделью и 4 часа в случае с конфлюэнтной). Такой экспериментальный протокол был обусловлен тем, что immortalized по гибридной технологии клетки линии EA.hy 926 характеризуются быстрой пролиферацией и при культивировании с 90%-ной конфлюэнтностью в течение 24 часов 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 [15]. Поскольку атеросклероз представляет собой патологию именно артериального русла, для надежного подтверждения эндотелиотоксического действия бионов необходимо проведение экспериментов на первичных артериальных эндотелиальных клетках, конфлюэнтные культуры которых к тому же могут быть экспонированы СКФБ и ИКФБ в течение относительно длительного времени в связи с их относительно медленным ростом. Так как различные артерии в силу своих анатомических и физиологических особенностей характеризуются разной склонностью к развитию атеросклероза [16], для анализа токсичности бионов для артериальных эндотелиальных клеток были выбраны две

Рисунок 3. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для разреженных (РК) и конфлюэнтных (КК) культур immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 (по данным флуоресцентной микроскопии). ФСБ — фосфатно-солевой буфер. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 21, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки») с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперимент проведен однократно

Сравнительная цитотоксичность



клеточных линии: эндотелиальные клетки коронарной артерии человека, которая поражается атеросклерозом достаточно часто [17], и эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека, устойчивой к развитию атеросклероза [16].

Как и в случае с клетками линии EA.hy 926, добавление СКФБ к ИКФБ конфлюэнтным культурам первичных артериальных эндотелиальных клеток вызывало их гибель, при этом цитотоксичность ИКФБ была значительно выше, чем СКФБ. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии продемонстрировали меньшую чувствительность к воздействию как СКФБ, так и ИКФБ в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии, что может быть вызвано повышенной экспрессией эндотелиальной синтазы оксида азота [18, 19] и, соответственно, повышенным выделением ими монооксида азота (NO) [18, 20], который обладает выраженным сосудорасширяющим и атеропротективным действием, а также препятствует развитию тромбоза [21]. Кроме того, эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии также характеризуются увеличенным уровнем ответственного за реализацию сосудорасширяющего эффекта NO циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) по сравнению с эндотелиальными клетками большой подкожной вены человека [22].

Гибель эндотелиальных клеток под воздействием различных повреждающих факторов может происходить по различным морфотипам, включая апоптотический и некротический. Характерными признаками апоптотического морфотипа являются сжатие цитоплазмы, конденсация хроматина (пикноз), фрагментация ядра (кариорексис) и

Рисунок 4. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека. ФСБ — фосфатно-солевой буфер. А — флуоресцентная микроскопия. Синяя окраска — Hoechst 33342 (живые клетки), красная — бромистый этилий (мертвые клетки), x200; Б — количественный анализ результатов флуоресцентной микроскопии. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 11, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку; В — подсчет общего количества клеток (живых и мертвых) на флуоресцентной микроскопии; Г — колориметрический тест. ОП₅₃₀ отражает нормальную жизнеспособность клеток, ОП₆₅₀ — сниженную. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 24. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки») с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперименты проведены однократно

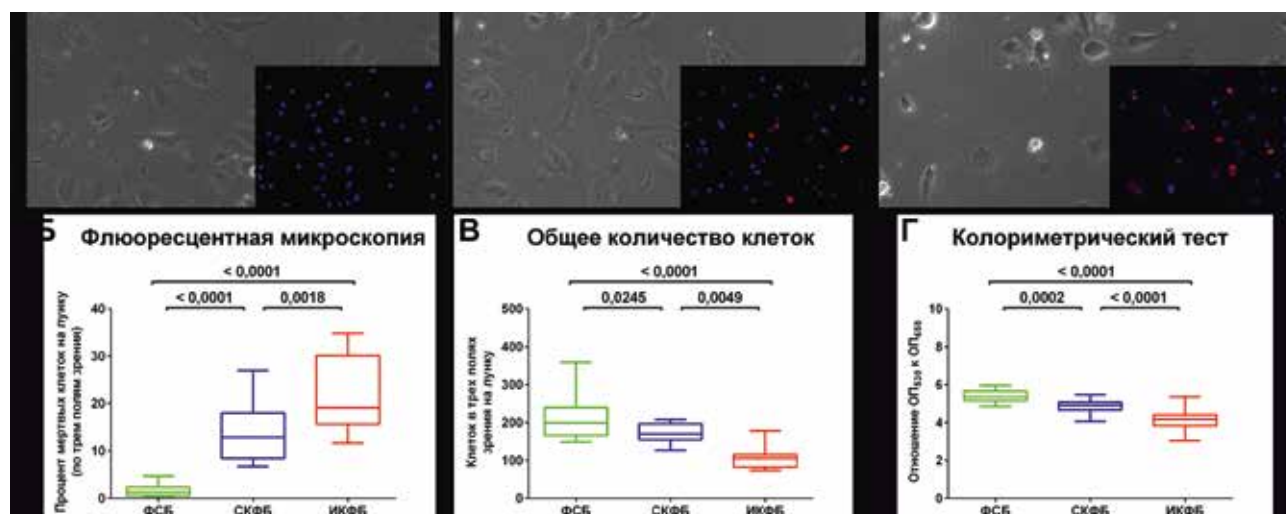


Рисунок 5. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека. ФСБ — фосфатно солевой буфер. А — флюоресцентная микроскопия. Синяя окраска — Hoechst 33342 (живые клетки), красная — бромистый этилий (мертвые клетки), $\times 200$; Б — количественный анализ результатов флюоресцентной микроскопии. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 11, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку; В — подсчет общего количества клеток (живых и мертвых) на флюоресцентной микроскопии; Г — колориметрический тест. ОП₅₃₀ отражает нормальную жизнеспособность клеток, ОП₆₅₀ — сниженную. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 24. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки») с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперименты проведены однократно

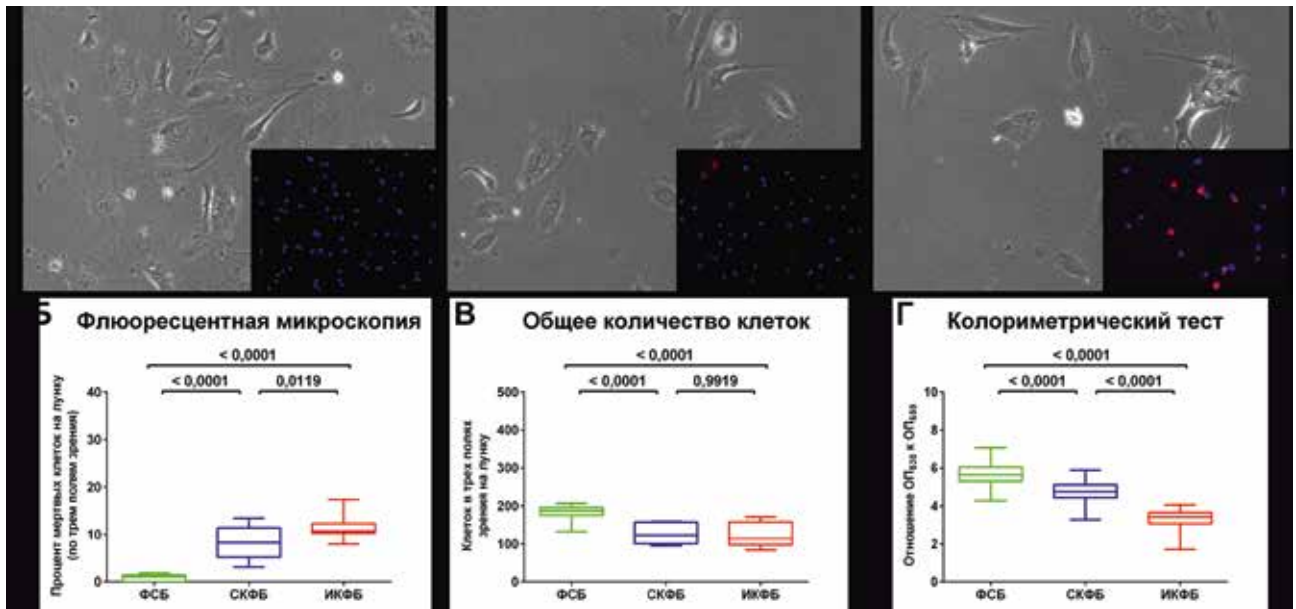
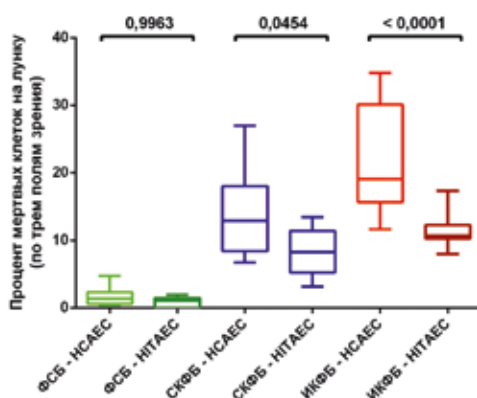


Рисунок 6. Сравнительная токсичность СКФБ и ИКФБ для конфлюэнтных культур первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной артерии (НТАЕС) человека (по данным флюоресцентной микроскопии). ФСБ — фосфатно-солевой буфер. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 11, подсчет клеток проводили в трех полях зрения на лунку. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха (границы «коробки») с обозначением минимального и максимального значений («усы»). Эксперимент проведен однократно

Сравнительная цитотоксичность

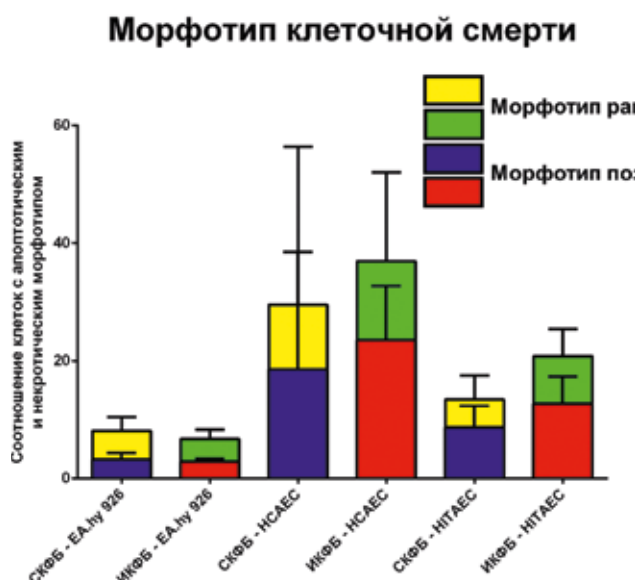


образование пузырей в плазматической мембране (блеббинг), что в итоге завершается формированием апоптотических тел, которые далее поглощаются клетками с фагоцитарной активностью и расщепляются в лизосомах (эффероцитоз) [23]. Некротический морфотип характеризуется отсутствием данных признаков, равно как и признаков аутофагии (вакуолизация цитоплазмы с последующим эффероцитозом), и не сопровождается поглощением останков клеток фагоцитами [23]. Исследование морфотипов и стадий смерти иммортализованных венозных и первичных артериальных эндотелиальных клеток под воздействием СКФБ и ИКФБ методом проточной цитометрии выявило клетки, гибнущие по апоптотическому морфотипу как на ранней, так и на поздней стадии (с сопоставимым соотношением клеток на данных стадиях), однако практически не обнаружило клеток, гибнущих по некротическому морфотипу, что согласуется с полученными нами ранее результатами [5]. Таким образом, можно предположить регулируемый, а не мгновенный характер гибели эндотелиальных клеток при воздействии бионов.

Выводы

Токсичность КФБ для культур эндотелиальных клеток определяется их формой (КФБ игольчатой формы значительно более цитотоксичны, чем сферические), однако как СКФБ, так и ИКФБ обладают выраженной эндотелиоток-

Рисунок 7. Оценка морфотипа и стадий клеточной смерти под воздействием СКФБ и ИКФБ на конфлюэнтные культуры иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерии (HITAEC) человека. Морфотип раннего апоптоза — аннексин V-положительные и пропидия иодида-отрицательные клетки, морфотип позднего апоптоза — аннексин V и пропидия иодида-положительные клетки. Количество репликат (лунок культурального планшета) в каждой группе составило 8. Данные представлены в виде медианы (средняя линия) и межквартильного размаха («усы»). Эксперимент проведен однократно



сичностью. Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии были менее чувствительны к воздействию обоих типов бионов в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

Источник финансирования

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».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.08.2018

Принята в печать 18.02.2019

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Larsson T.E., Olsson H., Hagström E. 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.
- Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L. et al. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:691540. doi: 10.1155/2014/691540.
- Heiss A., DuChesne A., Denecke B. 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.
- Wu C.Y., Young L., Young D. et al. Bions: a family of biomimetic mineral-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013;8(9):e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
- Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A. 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.
- Gimbrone M.A., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2016;14(9):1021-33. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527.
- Yurdagul A., Finney A.C., Woolard M.D. et al. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J.* 2016;473(10):1281-95. doi: 10.1042/BJ20150844.
- Peng H.H., Wu C.Y., Young D. 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.
- Lebre F., Sridharan R., Sawkins M.J. et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci Rep.* 2017;7(1):2922. doi: 10.1038/s41598-017-03086-0.
- Zhang B., Sai Lung P., Zhao S. et al. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):7315. doi: 10.1038/s41598-017-07588-9.
- Nguyen L.K., Yee R.W., Sigler S.C. et al. 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.
- Rauen U., Noll T., Piper H.M. et al. Endothelial cell toxicity of preservation solutions: comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. *Cryobiology.* 1994;31(2):144-53.
- van Setten P.A., van Hinsbergh V.W., van der Velden T.J. et al. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997;51(4):1245-56.
- Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 2017;35(3):265-277. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
- Perrotta I., Sciangula A., Concistrè G. et al. Internal mammary artery atherosclerosis: an ultrastructural study of two cases. *Ultrastruct Pathol.* 2014;38(3):199-203. doi: 10.3109/01913123.2013.868568.
- Brown R.A., Shantsila E., Varma C. et al. Current Understanding of Atherogenesis. *Am J Med.* 2017;130(3):268-282. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.10.022.
- He G.W., Fan L., Grove K.L. et al. 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.
- Gaudino M., Toesca A., Maggiano N. et al. 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.
- Broeders M.A., Doevendans P.A., Maessen J.G. et al. The human internal thoracic artery releases more nitric oxide in response to vascular endothelial growth factor than the human saphenous vein. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122(2):305-9. doi: 10.1067/j.mtc.2001.113602.
- Vanhoutte P.M., Zhao Y., Xu A. et al. 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.
- Tadjkarimi S., O'Neil G.S., Luu T.N., Allen S.P., Schyns C.J., Chester A.H., Yacoub M.H. Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: implications for coronary artery bypass graft patency. *Cardiovasc Res.* 1992;26(3):297-300.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.