

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.15372/ATER20190202

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ И МАГНИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ И КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ**Д.К. Шишкова, Р.А. Мухамадияров, Е.А. Великанова, Ю.А. Кудрявцева, А.Г. Кутихин***НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6*

Цель исследования – оценить, происходит ли интернализация кальций-фосфатных и магний-фосфатных бионов эндотелиальными клетками. **Материал и методы.** Искусственно синтезированные путем перенасыщения культуральной среды соответствующими солями магний-фосфатные бионы (МФБ), а также сферические и игольчатые кальций-фосфатные бионы (СКФБ и ИКФБ) были добавлены к конфлюэнтным культурам первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека на 4 ч. Для визуализации интернализации бионов эндотелиальные клетки изучали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в обратнорассеянных электронах и конфокальной микроскопии. Для СЭМ изучаемые клетки были фиксированы в 10%-м забуференном формалине, постфиксированы/окрашены 2%-м тетраоксидом осмия, дегидратированы воздействием спиртов возрастающей концентрации, окрашены 2%-м уранилацетатом, пропитаны смесью ацетона и эпоксидной смолы, заключены в чистую эпоксидную смолу для создания полимеризованных эпоксидных блоков с их последующей шлифовкой и полировкой. Эпоксидные блоки контрастировали цитратом свинца путем нанесения на поверхность шлифованного образца с последующим напылением блоков углеродом и собственно СЭМ. Для анализа интернализации бионов клетками методом конфокальной микроскопии к синтезированным бионам был добавлен меченный флуоресцеинизотиоцианатом альбумин (МФБ) или кальцеин (КФБ) с последующим добавлением к клеточным культурам лизосомального красителя LysoTracker Red и ядерного красителя Hoechst 33342. **Результаты.** Все изученные виды бионов интернализировались эндотелиальными клетками в течение 4 ч. При СЭМ отчетливо визуализировались множественные черные электронноплотные минеральные включения в цитоплазме клеток, отсутствующие как внутри контрольных клеток, так и в межклеточном пространстве. Конфокальная микроскопия позволила детектировать интернализированные клетками МФБ и КФБ, которые находились в цитоплазме клеток или были ко-локализованы с лизосомами. **Заключение.** При помощи СЭМ в обратнорассеянных электронах удалось визуализировать МФБ и КФБ, интернализированные эндотелиальными клетками после четырехчасовой экспозиции. Посредством конфокальной микроскопии выявлено, что состоящие из малорастворимого гидроксиапатита КФБ после интернализации оказыва-

Шишкова Дарья Кирилловна – м.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: shishkovadv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Мухамадияров Ринат Авхадиевич – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: gem57@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1263-1158>

Великанова Елена Анатольевна – канд. биол. наук, н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: tellella@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1079-1956>

Кудрявцева Юлия Александровна – д-р биол. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: kudrua@kems cardio.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6134-7468>

Кутихин Антон Геннадьевич – канд. мед. наук, зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: antonkutikhin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

ются в лизосомах. МФБ также оказываются в лизосомах, однако детектируются хуже вследствие большей растворимости магний фосфат гидрата. Следовательно, МФБ являются подходящей группой сравнения для оценки специфичности токсического действия КФБ на эндотелий, поскольку данные типы бионов обладают не только близкими физико-химическими свойствами, но и идентично интернализируются эндотелиальными клетками.

Ключевые слова: бионы, фосфат кальция, гидроксиапатит, эндотелий, атеросклероз, интернализация, лизосомы.

Наряду с артериальной гипертензией, нарушением липидного и углеводного профиля, избыточным весом, сниженной физической активностью, курением и хроническим системным воспалением [1] признанным фактором риска развития атеросклероза является перенасыщение крови ионами кальция и фосфора [2, 3]. В то же время показано, что повышение уровня данных ионов в крови может приводить к минерализации средней оболочки сосудов (медии), но не к характерной для атеросклероза кальцификации неоинтимы [4]. Нейтрализация свободных ионов кальция и фосфора в крови человека осуществляется за счет ряда белков, среди которых можно выделить протеины с низкой (альбумин) и высокой (остеонектин) аффинностью к ионам кальция, а также белок, обладающий высоким сродством к фосфату кальция – фетуин-А [5, 6]. Взаимодействие молекул фосфата кальция с фетуином-А приводит к формированию кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют собой кристаллические частицы губчатой структуры диаметром ≤ 500 нм, состоящие из гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита. КФБ выделяются из трех четвертей атеросклеротических бляшек артерий человека и оказывают токсическое действие на эндотелий [5, 7, 8]. Форма КФБ определяется концентрацией ионов кальция и фосфора в среде: при умеренном перенасыщении ими сывороточной среды образуются КФБ сферической формы (СКФБ), при сильном – КФБ игольчатой формы (ИКФБ) [9]. Как СКФБ, так и ИКФБ имеют одинаковые физико-химические свойства, единственное отличие заключается в форме частиц [10].

Нашей группой обнаружено, что КФБ, с одной стороны, предотвращают массивную эктопическую кальцификацию, а с другой – поглощаются первичными артериальными эндотелиальными клетками [11], индуцируют секрецию ими провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [8, 12, 13], запускают процесс лизосомально-опосредованной клеточной гибели [8], а также стимулируют развитие гипертрофии интимы [14] и воспаления адвентиции [15], как предварительно поврежденной, так и интактной брюшной аорты крыс линии Wistar.

Феномен эндотелиотоксичности был специфичен для КФБ, так как искусственно синтезированные в качестве группы сравнения магний-фосфатные бионы (МФБ), сходные с КФБ по всем характеристикам, кроме формулы основного составляющего химического соединения (магний фосфат гидрат вместо гидроксиапатита), не влияли на жизнеспособность эндотелия. В то же время несмотря на неоднократно показанную в различных экспериментах специфичность эндотелиотоксического действия КФБ [8, 11, 12, 14, 15], до настоящего времени отсутствовали убедительные доказательства того, что МФБ действительно интернализируются клетками и находятся в цитоплазме или лизосомах. Поэтому целью данной работы было визуализировать КФБ и МФБ, интернализированные первичными артериальными эндотелиальными клетками, а также обозначить связанные с их интернализацией эффекты на молекулярном уровне.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Искусственный синтез бионов. Все эксперименты по искусственному синтезу бионов проводились в стерильных условиях. МФБ искусственно синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М $MgCl_2$ («Sigma-Aldrich», США, 63069) и 100 мкл 0,2М Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», 94046) к 700 мкл питательной среды DMEM («Gibco», США, 41966029), содержащей 100 мкл (10 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки («Gibco», 10500056). Содержание солей в среде после их добавления составляло 20 мМ. СКФБ были синтезированы искусственно путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М $CaCl_2$ («Sigma-Aldrich», 21115) и 21,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», 94046) к 1319 мкл питательной среды DMEM («Gibco», 41966029), содержащей 150 мкл (10 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки («Gibco», 10500056). Для синтеза СКФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 3 мМ. ИКФБ синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,45М $CaCl_2$ («Sigma-Aldrich», 21115) и 37,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», 94046) к 936 мкл среды DMEM («Gibco», 41966029),

содержащей 10 мкл (1 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки («Gibco», 10500056). Для синтеза ИКФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 7,5 мМ. Контроль pH осуществляли путем предварительного добавления 1 % буфера HEPES («Gibco», 15630056) к культуральной среде. Бионы культивировали в течение суток при физиологических условиях (37 °С, 5 % CO₂, высокая влажность) в CO₂-инкубаторе («МСО-18АІС», «Sanyo», Япония), после чего среду центрифугировали при 200 000 g («Optima MAX-XP», «Beckman Coulter», США) в течение часа, что позволило обеспечить осаждение бионов всего спектра размерности. После ультрацентрифугирования бионы ресуспендировали в однократном фосфатно-солевом буфере до оптической плотности на длине волны 650 нм (ОП₆₅₀) в 0,08–0,10 («Multiskan GO», «Thermo Fisher Scientific», США). Данная оптическая плотность соответствует мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой концентрацией бионов в растворе [7].

Культивирование клеток. Для экспериментов были использованы коммерческие линии первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека («Cell Applications», США, каталожный номер 300K-05a) и иммортализованных вирусом SV40 лимфатических эндотелиальных клеток мыши (2H-11, ATCC, CRL-2163). Согласно информации поставщика, первичные эндотелиальные клетки человека получены из здоровой артерии донора (мужчина, 27 лет) с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium («Cell Applications», 212K-500), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки и 10 % диметилсульфоксида. Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека MesoEndo Cell Growth Medium («Cell Applications», 212-500) либо в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки (клетки линии 2H-11). Пересев производили по достижении 80 % конfluence. Эксперименты с первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии человека проводились на 5-м пассаже. Все эксперименты с клетками выполняли в стерильных условиях при 37 °С, 5 % CO₂ и высокой влажности («МСО-18АІС», Sanyo).

Анализ интернализации бионов эндотелиальными клетками. Для оценки интернализации бионов к первичным эндотелиальным клеткам коронарной артерии человека, культивированным во флаконах T-75 (8,4 × 10⁶ клеток на флакон,

один флакон на группу), добавляли суспензию МФБ, СКФБ, ИКФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера на 4 ч, после чего проводили трипсинизацию в течение 10 мин. После центрифугирования клетки фиксировали в 2,5%-м глутаровом альдегиде («Sigma-Aldrich», G6257) в течение одного часа, периодически ресуспендируя для лучшей фиксации, затем трижды промывали в 0,1M фосфатном буфере (12 г/л NaH₂PO₄ («Sigma-Aldrich», S5011) и 36 г/л Na₂HPO₄ × 12H₂O («Sigma-Aldrich», 71650), pH 7,4) и при последней отмывке суспензию клеток каждой группы делили на четыре равные объемные части (для дальнейшего получения четырех эпоксидных блоков на группу).

После отмывки проводили постфиксацию в 2 % фосфатно-солевом растворе тетраоксида осмия (Sigma-Aldrich, 75633) в течение 12 ч и далее окрашивание в 2%-м водном растворе тетраоксида осмия в течение 24 ч. Затем клетки обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации: 50-, 60-, 70-, 80%-й этанол – все по две смены, каждая смена по 15 мин, 95%-й этанол – 15 мин, 95%-й этанол + 2 % уранилацетат – 5 ч, 99,7%-й изопропанол, ацетон. После дегидратации образцы помещали в смесь рабочего раствора эпоксидной смолы (собственно эпоксидная смола Araldite M – «Sigma-Aldrich», 10951, катализатор для эпоксидной среды – 45348, отвердитель эпоксидной среды – 45346) и ацетона в соотношении 1:1 на 6 ч, затем инкубировали в чистом рабочем растворе эпоксидной смолы в течение ночи и заключали в свежий рабочий раствор эпоксидной смолы с последующей шлифовкой и полировкой полимеризованных при 60 °С эпоксидных блоков до собственного образца. Контрастирование цитратом свинца по Рейнольдсу (водный раствор, приготовленный на основе 3%-го Pb(NO₃)₂ («Sigma-Aldrich», 228621) и Na₃C₆H₅O₇ («Sigma-Aldrich», W302600)) выполняли в течение 7 мин путем нанесения на поверхность шлифованного образца с последующей отмывкой эпоксидного блока бидистиллированной водой. Далее эпоксидные блоки напыляли углеродом (толщина напыления 10–15 нм, «EM ACE200», «Leica Microsystems», Германия) и собственно визуализация образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в обратнорассеянных электронах с напряжением 10 кВ («Hitachi-S-3400N», «Hitachi», Япония).

С целью подтверждения результатов СЭМ осадок МФБ после ультрацентрифугирования ресуспендировали в меченном флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) альбумине («Invitrogen», США, A23015), а осадок СКФБ и ИКФБ – в кальцеине («Sigma-Aldrich», C0875) в течение часа, по-

сле чего проводили ультрацентрифугирование при 200 000 g («Optima MAX-XP», «Beckman Coulter», США) в течение часа с последующей трехкратной отмывкой в однократном фосфатно-солевом буфере. Далее добавляли 25 мкл суспензии МФБ, СКФБ, ИКФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера к первичным эндотелиальным клеткам коронарной артерии человека, культивированным на стеклах для конфокальной микроскопии компании «Ibidi» (Германия, каталожный номер 80841) на 4 ч с последующим добавлением лизосомального красителя LysoTracker Red («Invitrogen», L7528, 500 нМ) на 30 мин, ядерного красителя Hoechst 33342 («Invitrogen», H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин и конфокальной микроскопией («LSM 700», «Carl Zeiss», Германия).

Выделение белка и иммуноблоттинг. Для анализа молекулярного ответа на воздействие КФБ к иммортализованным лимфатическим эндотелиальным клеткам мыши линии 2Н-11, культивированным во флаконах Т-75 (8,4 × 10⁶ клеток на флакон, один флакон на группу), добавляли суспензию КФБ (ОП₆₅₀ = 0,08–0,10 или ОП₆₅₀ = 0,18–0,24, что аналогично 0,5 и 2 стандартам МкФ соответственно) либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера на 18 ч. После однократной отмывки от остаточной культуральной среды однократным фосфатно-солевым буфером выделяли белок посредством добавления к клеткам 1 мл RIPA-буфера (89901, «Thermo Fisher Scientific»), в который дополнительно вносили коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78444, «Thermo Fisher Scientific»). Для определения экспрессии белков и детекции посттрансляционных модификаций методом иммуноблоттинга 10 мкл белка (на каждую группу) смешивали с буфером Лэммли (S3401, «Sigma-Aldrich») в отношении 1:1, нагревали в кипящей воде в течение 5 мин и далее загружали на 12-луночный гель NuPAGE® толщиной 1 мм, содержащий 4–12 % Bis-Tris (NP0321BOX, «Invitrogen»). В качестве маркера молекулярных масс применяли белковый стандарт Precision Plus (1610374, «BioRad», США).

Белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при 100 В в течение 1 ч, переносили на мембрану при 30 В в течение 90 мин при 4 °С. Блоттинг проводили с антителами к расщепленной каспазе-9 (GTX86912, «GenTex», США), X-связанному ингибитору апоптоза (XIAP, sc-11426, «Santa Cruz Biotechnology»), митохондриальной сериновой протеазе Htra2/Omi (sc-15467, Santa Cruz Biotechnology), лиганду сигнального пути Hedgehog Shh (sc-9024, Santa Cruz

Biotechnology), его рецептору Ptch1 (sc-9016, «Santa Cruz Biotechnology», США) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, sc-20357, «Santa Cruz Biotechnology»). Для хемилюминесцентной детекции результата (цифровой сканер хемилюминесцентных блотов «C-DiGit», «LI-COR Bioscience», США) использовали конъюгированные с пероксидазой хрена противокроличьи вторичные антитела козла («Abcam», Великобритания, ab205718) и детектирующий реагент Amersham ECL Prime (GERPN2232, «Sigma-Aldrich»). Количественный анализ снимков хемилюминесцентных гелей проводили при помощи стандартного алгоритма в программе ImageJ (National Institutes of Health).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Посредством СЭМ проанализированы эпоксидные блоки (четыре блока на группу) с заключенными в них первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии, которые были экспонированы МФБ, СКФБ, ИКФБ и чистым однократным фосфатно-солевым буфером (группа контроля) в течение 4 ч. В цитоплазме клеток, подвергшихся воздействию всех видов бионов, визуализировались множественные черные электронно-плотные включения, которых не наблюдалось ни в клетках контрольной группы, ни в межклеточном пространстве, при этом плазматическая мембрана всех клеток была интактна (рис. 1).

При конфокальной микроскопии спустя 4 ч после добавления связанных с меченным ФИТЦ альбумином МФБ было детектировано преимущественно отображающее лизосомы красное свечение (Lyso Tracker Red) и слабое желтое свечение, свидетельствующее о присутствии ФИТЦ-меченных МФБ внутри лизосом (рис. 2). Слабую флуоресценцию можно объяснить тем, что в состав МФБ входит легко растворимый в кислой среде лизосом магний фосфат гидрат, детекция которого затруднена вследствие быстрой химической диссоциации.

Для анализа интернализации КФБ эндотелиальными клетками был использован кальцеин (специфичный флуоресцентный краситель соединений кальция), который дает зеленый спектр свечения. Через 4 ч после добавления КФБ к клеткам методом конфокальной микроскопии обнаружено, что КФБ, состоящие из малорастворимого гидроксиапатита, после интернализации также оказываются в лизосомах (желтая флуоресценция) (рис. 3). В отличие от визуализации интернализации МФБ, внутри клеток после экспозиции клеток КФБ одновременно наблюдалась зеленая и красная флуоресценция,

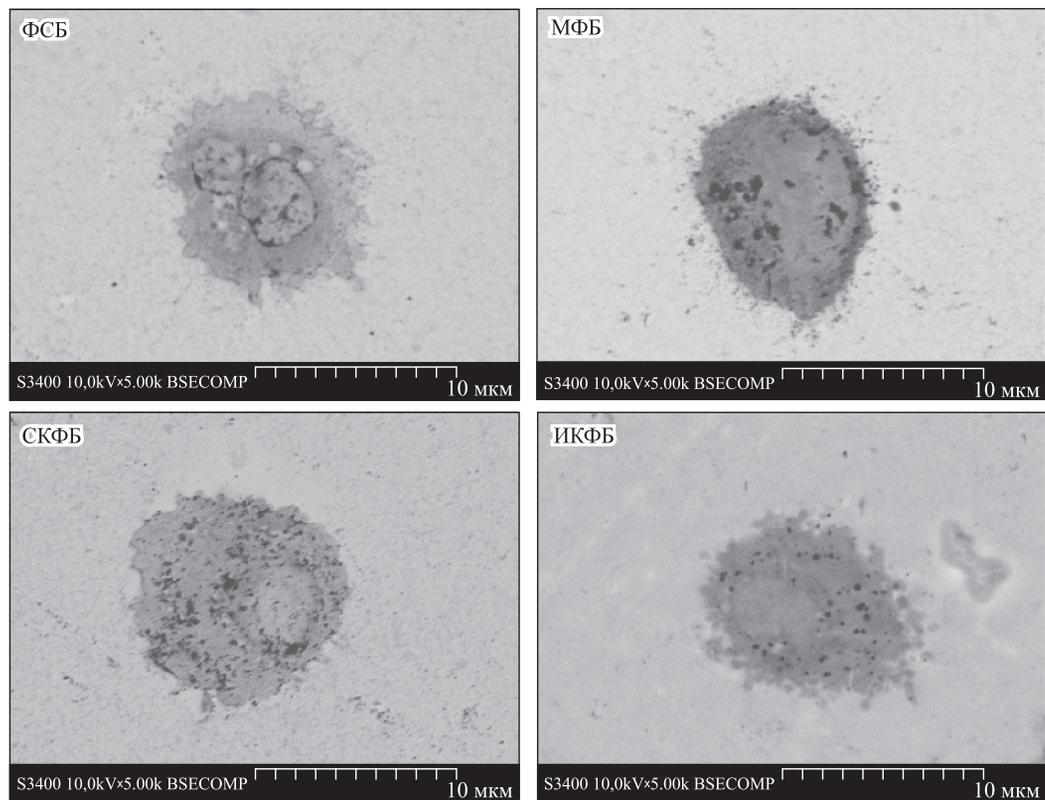


Рис. 1. СЭМ первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, подвергшихся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, контроль), МФБ, СКФБ и ИКФБ в течение 4 ч, ув. $\times 5000$

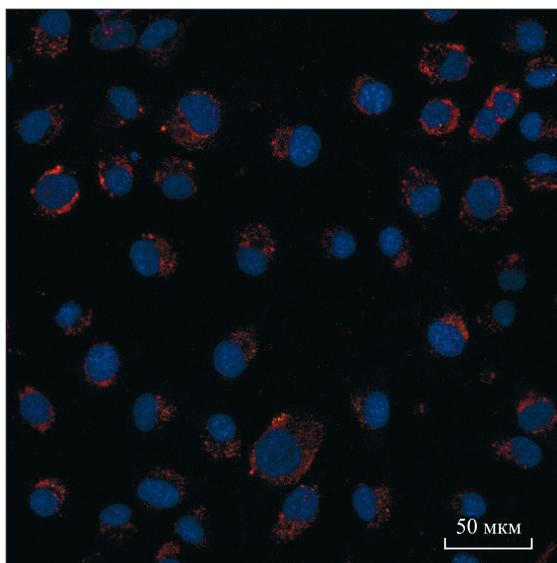


Рис. 2. Конфокальная микроскопия первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, подвергшихся воздействию меченных ФИТЦ МФБ в течение 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342, ув. $\times 200$

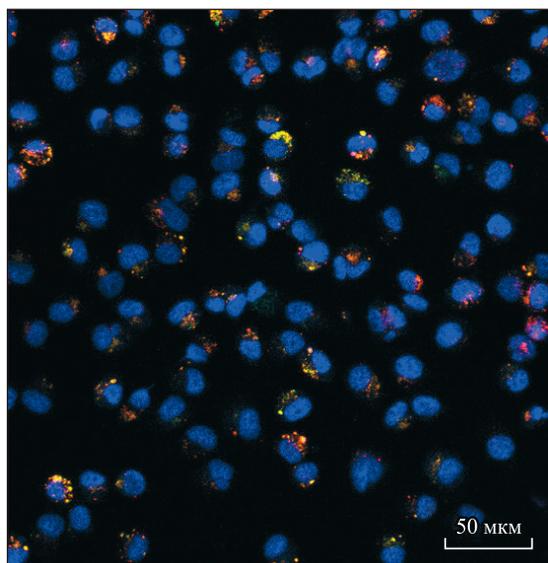


Рис. 3. Конфокальная микроскопия первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, подвергшихся воздействию меченных кальцием КФБ в течение 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red и ядерным красителем Hoechst 33342, ув. $\times 200$

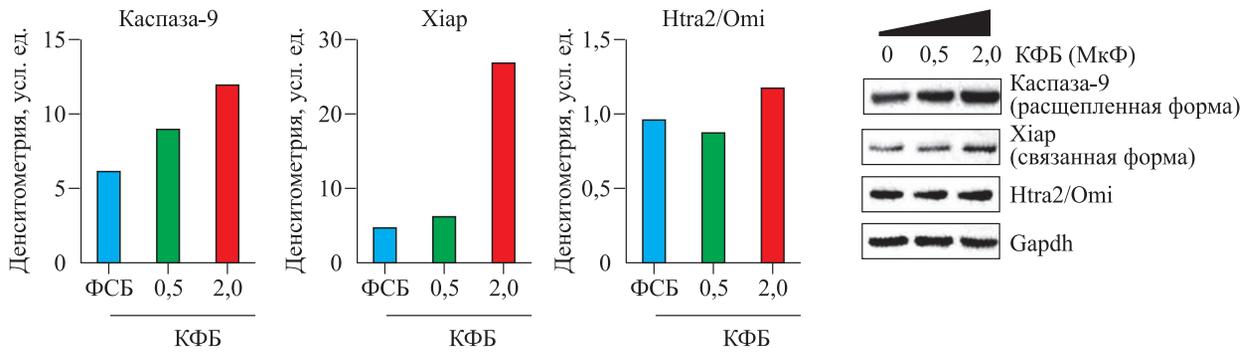


Рис. 4. Оценка содержания белков внутреннего пути апоптоза расщепленной каспазы-9, XIAP и протеазы Htra2/Omi в immortalized вирусом SV40 лимфатических эндотелиальных клетках мыши линии 2H-11, подвергшихся воздействию различных концентраций КФБ (0,5 и 2 стандартных МкФ) в течение 18 ч. В качестве контроля загрузки белка на гель был оценен уровень GAPDH

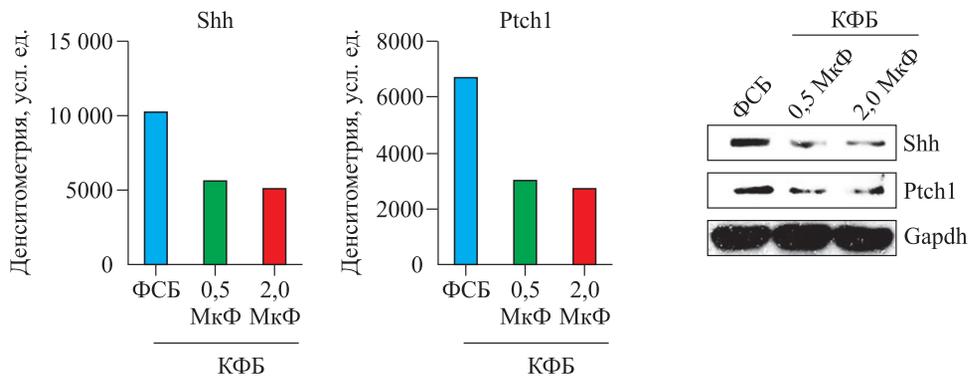


Рис. 5. Анализ уровня основного лиганда сигнального пути Hedgehog Shh и его рецептора Ptch1 в immortalized вирусом SV40 лимфатических эндотелиальных клетках мыши линии 2H-11, подвергшихся воздействию различных концентраций КФБ (0,5 и 2 стандартных МкФ) в течение 18 ч. В качестве контроля загрузки белка на гель был оценен уровень GAPDH.

что можно объяснить смещением флуоресцентно детектируемых ионов кальция из лизосом в цитозоль (см. рис. 3).

С целью оценки молекулярного ответа на интернализацию КФБ через 18 ч после их добавления к эндотелиальным клеткам был проведен иммуноблоттинг к белкам внутреннего пути апоптоза расщепленной каспазе-9, XIAP и митохондриальной сериновой протеазе Htra2/Omi. Уровень основного эффекторного белка внутреннего пути апоптоза расщепленной каспазы-9 былкратно и дозозависимо повышен (что свидетельствует об ее активации) при экспозиции КФБ, в то время как повышение уровня X-связанного ингибитора апоптоза и блокирующей его митохондриальной протеазы XIAP наблюдалось лишь при чрезвычайно высокой концентрации КФБ (рис. 4). Это может быть объяснено активацией обратной связи по остановке механизма запуска внутреннего пути апоптоза при супрафизиологической концентрации КФБ.

Недавно опубликованные данные указывают на сниженную активность вовлеченного в развитие эктопической кальцификации сигнального пути Hedgehog в атеросклеротических бляшках сонной артерии человека в сравнении с интактными сосудами [16]. Воздействие КФБ в течение 18 ч также вызывало двукратное снижение уровня основного рецептора данного сигнального пути Ptch1 и его лиганда Shh (Sonic Hedgehog) независимо от добавляемой дозы (рис. 5). Таким образом, молекулярные эффекты влияния КФБ на эндотелий могут включать в себя уменьшение активности пути Hedgehog.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее установлено, что при умеренном перенасыщении сывороточной среды ионами кальция и фосфора образуются СКФБ, а при сильном перенасыщении – ИКФБ [9, 10], что теоретически можно связать с их вероятным

образованием в крови человека при умеренной и сильной гиперкальциемии/гиперфосфатемии соответственно. Исследования ряда авторов показали цитотоксическое действие КФБ [6, 17, 18]. Для оценки специфичности токсического действия КФБ на эндотелий была искусственно синтезирована идеальная группа сравнения – МФБ, которые схожи с КФБ по физическим (форма, размерность, степень кристалличности) и химическим (элементный состав, функциональные группы, органический состав) параметрам, однако состоящие не из характерного для КФБ гидроксипатита, а из более растворимого магний фосфат гидрата [19].

Нашей группой проведен ряд исследований [8, 11–15, 20], которые экспериментально продемонстрировали, что именно КФБ токсичны для эндотелиальных клеток, в связи с чем были выдвинуты три гипотезы о запуске клеточной гибели. Суть первой гипотезы заключается в том, что, в отличие от высокорастворимых МФБ, малорастворимые КФБ при попадании в лизосомы вызывают механическое повреждение их мембраны с последующим разрывом лизосом и выходом кислого лизосомального содержимого в цитозоль. В соответствии со второй гипотезой КФБ растворяются в кислой лизосомальной среде и вызывают пермеабиллизацию лизосомальной мембраны вследствие нарушения осмотического баланса между лизосомами и цитозолем, что в конечном итоге также приведет к разрыву лизосом [21, 22]. Согласно третьей гипотезе, при растворении КФБ в лизосомах существенно повышается концентрация ионов кальция в цитозоле, вследствие чего увеличивается проницаемость внешней мембраны митохондрий и по каскаду внутреннего пути апоптоза через каспазу-9 активируется запускающая клеточную гибель каспаза-3 [8, 23, 24].

Для проверки указанных гипотез в первую очередь необходимо подтвердить интернализацию МФБ, СКФБ и ИКФБ эндотелиальными клетками. Оригинальный метод СЭМ в обратнорассеянных электронах [25] позволил детектировать эндотелиальные клетки с визуально интактной клеточной мембраной, внутри которых после экспозиции всем видам бионов отчетливо наблюдались множественные черные электронно-плотные включения. В то же время такого явления не было отмечено ни в группе клеток, к которым добавлялся чистый фосфатно-солевой буфер, ни вокруг клеток. Таким образом, полученные данные подтвердили процесс интернализации всех типов бионов первичными артериальными эндотелиальными клетками с их дальнейшей постепенной гибелью вследствие запуска внутреннего пути апоптоза и сниженной активностью сигнального пути Hedgehog, что ха-

рактерно для атеросклеротических бляшек сонной артерии [16]. Также проведенные эксперименты доказывают правомерность использования МФБ в качестве группы сравнения для оценки специфичности эндотелиотоксического действия КФБ, поскольку оба близких по физико-химическим свойствам типа бионов успешно интернализируются эндотелиальными клетками после их добавления в культуральную среду и оказываются в лизосомах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При помощи СЭМ в обратнорассеянных электронах после добавления к первичным артериальным эндотелиальным клеткам человека при сохранении целостности клеточной мембраны удалось визуализировать в них многочисленные черные электронно-плотные включения, отражающие интернализацию МФБ, СКФБ и ИКФБ. Конфокальная микроскопия при связывании бионов с флуорофорами позволила детектировать как интенсивно флуоресцирующие и в большинстве своем колокализированные с лизосомами КФБ, так и слабо флуоресцирующие МФБ, детекция которых была затруднена вследствие более высокой растворимости входящего в их состав магний фосфат гидрата. Следовательно, МФБ могут быть применены в качестве группы сравнения для анализа специфичности токсического действия КФБ на эндотелий, так как они не только химически схожи с КФБ за исключением формулы основного компонента минеральной составляющей, но и идентично интернализируются эндотелиальными клетками. Интернализация КФБ эндотелиальными клетками приводит к запуску внутреннего пути апоптоза и инактивации сигнального пути Hedgehog.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 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».

ЛИТЕРАТУРА

1. Gooding H., Johnson H.M. The uncharted frontier: preventive cardiology between the ages of 15 and 35 years // *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* 2016. Vol. 10, N 9. pii 29.
2. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlov J., Lind L., Sundstrom J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. Vol. 30, N 2. P. 333–339.
3. 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. Vol. 2014. P. 691540.
4. Sonou T., Ohya M., Yashiro M., Masumoto A., Nakashima Y., Ito T., Mima T., Negi S., Kimura-Suda H., Shigematsu T. Mineral composition of phosphate-induced calcification in a rat aortic tissue culture model // *J. Atheroscler. Thromb.* 2015. Vol. 22, N 11. P. 1197–206.
5. Heiss A., Pipich V., Jahnen-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. Vol. 99, N 12. P. 3986–3995.
6. Köppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E., Hengstler J.G., Smith E.R., Jahnen-Dechent W. Cellular clearance and biological activity of calciprotein particles depend on their maturation state and crystallinity // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. ID 1991.
7. 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. Vol. 8, N 9. ID e75501.
8. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Yu., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Yu.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. ID 27255.
9. Young J.D., Martel J., Young D., Young A., Hung C.M., Young L., Chao Y.J., Young J., Wu C.Y. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria // *PLoS One.* 2009. Vol. 4, N 5. ID e5421.
10. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Мальшева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Долганюк В.Ф., Барбараш О.Л., Кутихин А.Г. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов // *Комплекс. пробл. серд.-сосуд. заболеваний.* 2019. Т. 8, № 1. С. 59–69.
11. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Специфичная токсичность кальций-фосфатных бионов для культур венозных и артериальных эндотелиальных клеток человека // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 2019. Т. 63, № 1. С. 53–61.
12. Шишкова Д.К., Синицкий М.Ю., Великанова Е.А., Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы индуцируют секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 артериальными эндотелиальными клетками *in vitro* // *Цитокины и воспаление.* 2018. Т. 17, № 1–4. С. 80–85.
13. Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К. Форма кальций-фосфатных бионов определяет выраженность вызываемого ими проатеросклеротического сдвига профиля секретируемых эндотелиальными клетками цитокинов // *Евраз. кардиол. журн.* 2017. № 4. С. 4–9.
14. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы специфично индуцируют гипертрофию поврежденной интимы у крыс // *Рос. кардиол. журн.* 2018. Т. 23, № 9. С. 33–38.
15. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Токсическое действие кальций-фосфатных бионов на адвентицию брюшной аорты крыс // *Атеросклероз и дислипидемии.* 2018. Т. 3, № 32. С. 37–43.
16. Queiroz K.C., Bijlsma M.F., Tio R.A., Zeebregts C.J., Dunaeva M., Ferreira C.V., Fuhler G.M., Kuipers E.J., Alves M.M., Rezaee F., Spek C.A., Peppelenbosch M.P. Dichotomy in Hedgehog signaling between human healthy vessel and atherosclerotic plaques // *Mol. Med.* 2012. Vol. 18. P. 1122–1127.
17. Aghagolzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R., Jackson C., Smith E.R., Odermatt A., Radpour R., Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α // *Atherosclerosis.* 2016. Vol. 251. P. 404–414.
18. 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. Vol. 8, N 4. ID e60904.
19. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Мальшева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Севостьянов О.Г., Долганюк В.Ф., Кутихин А.Г. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов // *Фундамент. и клин. медицина.* 2019. Т. 4, № 2. С. 6–16.
20. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кутихин А.Г. Специфичная индукция кальций-фосфатными бионами провоспалительного сдвига профиля цитокинов, секретируемых эндотелиальными клетками // *Кардиол. вестн.* 2018. Т. 13, № 1. С. 51–58.
21. Liu Z., Xiao Y., Chen W., Wang B., Wang G., Xub X., Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity // *J. Mater. Chem. B.* 2014. Vol. 2. P. 3480–3489.
22. Shyong Y.J., Wang M.H., Kuo L.W., Su C.F., Kuo W.T., Chang K.C., Lin F.H. Mesoporous hydroxyapatite as a carrier of olanzapine for long-acting antidepressant

- treatment in rats with induced depression // *J. Control Release*. 2017. Vol. 255. P. 62–72.
23. Zhang C.Y., Sun X.Y., Ouyang J.M., Gui B.S. Diethyl citrate and sodium citrate reduce the cytotoxic effects of nanosized hydroxyapatite crystals on mouse vascular smooth muscle cells // *Int. J. Nanomedicine*. 2017. Vol. 12. P. 8511–8525.
24. Yuan Y., Liu C., Qian J., Wang J., Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, N 4. P. 730–740.
25. Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах // *Фундамент. и клин. медицина*. 2019. Т. 4, № 1. С. 6–15.

INTERNALISATION OF CALCIUM PHOSPHATE AND MAGNESIUM PHOSPHATE BIONS BY ENDOTHELIAL CELLS UTILISING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND CONFOCAL MICROSCOPY

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

*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6*

Aim of the study was to investigate whether endothelial cells internalise magnesium phosphate and calcium phosphate bions. **Material and methods.** Magnesium phosphate and calcium phosphate bions synthesised through supersaturation of the culture medium with the respective salts were further added to the confluent cultures of primary human coronary artery endothelial cells for 4 h. Internalisation was evaluated by backscattered scanning electron microscopy (BSEM) and confocal microscopy. For BSEM, cells were fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin, postfixed/stained by 2 % osmium tetroxide, dehydrated in a graded ethanol series, stained by 2% uranyl acetate, impregnated into acetone:epoxy resin (1:1) and into the fresh epoxy resin with its subsequent polymerisation, grinding, and polishing. Samples were then counterstained by lead citrate, sputter coated with carbon, and visualised utilising BSEM. Confocal microscopy was conducted after exposure of endothelial cells to FITC-labeled magnesium phosphate bions or calcein-labeled calcium phosphate bions with the following staining by a pH sensor LysoTracker Red and nuclear stain Hoechst 33342. **Results.** All types of bions were internalised by endothelial cells within 4 h. BSEM after long-term postfixation/staining by osmium tetroxide and uranyl acetate, embedding into epoxy resin and counterstaining by lead citrate visualised multiple black electron-dense mineral inclusions which were not detected both within the control cells and in the intercellular space. Confocal microscopy also detected internalised MPB and CPB in cytosol and lysosomes. **Conclusion.** BSEM visualised MPB and CPB internalised by endothelial cells after 4 h exposure while confocal microscopy detected their colocalisation with lysosomes. MPB is an appropriate comparison group to study the specificity of CPB-related pathogenic effects as both of these bion types have close physico-chemical properties and are similarly internalised.

Keywords: bions, calcium phosphate, hydroxyapatite, endothelium, atherosclerosis, internalisation, lysosomes.

*Статья поступила 28 мая 2019 г.,
принята в печать 16 июня 2019 г.*