



Количественная оценка исходной концентрации кальций-фосфатных бионов как скринингового маркера минерального гомеостаза крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с хронической болезнью почек

Шишкова Д. К., Матвеева В. Г., Маркова В. Е., Хрячкова О. Н., Индукаева Е. В., Шабаев А. Р., Фролов А. В., Кутихин А. Г.

Цель. Оценить исходную концентрацию кальций-фосфатных бионов (КФБ), являющихся сквенджером избыточного кальция и фосфора, в крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с хронической болезнью почек в сравнении с условно здоровыми донорами крови.

Материал и методы. В исследование было включено 308 субъектов: 1) 88 участников эпидемиологического исследования PURE, не имеющих гемодинамически значимого каротидного атеросклероза и симптоматического коронарного атеросклероза; 2) 88 пациентов с цереброваскулярной болезнью (ЦВБ), потребовавшей каротидной эндартерэктомии; 3) 88 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), потребовавшей чрескожного коронарного вмешательства или коронарного шунтирования; 4) 63 пациента с хронической болезнью почек 5 стадии (ХБП5). У пациентов в сыворотке определяли базовые биохимические показатели минерального гомеостаза (уровень общего и ионизированного кальция, фосфора, общего белка, альбумина и фетуина-А) и исходную концентрацию КФБ в сыворотке крови при помощи флуоресцентно меченного бисфосфоната OsteoSense 680EX методом проточной цитометрии.

Результаты. В сравнении со всеми остальными категориями пациентов условно здоровые доноры крови характеризовались наибольшей концентрацией КФБ в сыворотке (249 КФБ/мкл), что свидетельствует о сохранной способности крови к компенсации нарушений минерального гомеостаза путем агрегации избыточного кальция и фосфора с кислыми белками. Сниженная исходная концентрация КФБ у пациентов с ЦВБ (170 КФБ/мкл), ИБС (139 КФБ/мкл) и ХБП5 (193-203 КФБ/мкл) указывала на нарушение способности агрегировать избыточный кальций и фосфор, что также было отражено повышенным уровнем ионизированного кальция в крови.

Заключение. Пациенты с ЦВБ, ИБС и ХБП5 характеризуются сниженной исходной концентрацией КФБ в крови в сравнении с условно здоровыми донорами, что в сочетании с повышенным уровнем ионизированного кальция и сниженным уровнем альбумина позволяет предположить истощение кальций-связывающей способности сыворотки у пациентов с сердечно-сосудистыми и почечными заболеваниями.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, минеральный гомеостаз, кальций, фосфор, кальций-фосфатные бионы, проточная цитометрия.

Отношения и деятельность: нет.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия.

Шишкова Д. К.* — к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0002-1518-3888, Матвеева В. Г. — к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-4146-3373, Маркова В. Е. — м.н.с. лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0002-6652-5745, Хрячкова О. Н. — к.б.н., м.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-6620-5960, Индукаева Е. В. — к.м.н., с.н.с. лаборатории эпидемиологии сердечно-сосудистых заболеваний отдела оптимизации медицинской помощи при сердечно-сосудистых заболеваниях, ORCID: 0000-0002-6911-6568, Шабаев А. Р. — м.н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-9734-8462, Фролов А. В. — к.м.н., м.н.с. лаборатории рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов, ORCID: 0000-0003-2366-6545, Кутихин А. Г. — к.м.н., зав. лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, ORCID: 0000-0001-8679-4857.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): shishkovadk@gmail.com

ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, КФБ — кальций-фосфатные бионы, МКИ — межквартильный интервал, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ХБП — хроническая болезнь почек, ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ХКС — хронический коронарный синдром, ЦВБ — цереброваскулярная болезнь, OsteoSense 680EX — флуоресцентно меченый бисфосфонат, TBS — Tris-буферный раствор.

Рукопись получена 17.05.2022

Рецензия получена 05.07.2022

Принята к публикации 12.07.2022



Для цитирования: Шишкова Д. К., Матвеева В. Г., Маркова В. Е., Хрячкова О. Н., Индукаева Е. В., Шабаев А. Р., Фролов А. В., Кутихин А. Г. Количественная оценка исходной концентрации кальций-фосфатных бионов как скринингового маркера минерального гомеостаза крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с хронической болезнью почек. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(12):5064. doi:10.15829/1560-4071-2022-5064. EDN JBEWAQ

Quantification of the initial levels of calciprotein particles as a screening marker of mineral homeostasis in patients with cardiovascular disease and in patients with chronic kidney disease

Shishkova D. K., Matveeva V. G., Markova V. E., Khryachkova O. N., Indukaeva E. V., Shabaev A. R., Frolov A. V., Kutikhin A. G.

Aim. To evaluate the initial concentration of calciprotein particles (CPPs), which are scavengers of excessive calcium and phosphate, in patients with cardiovascular disease and in patients with chronic kidney disease as compared with the healthy volunteers.

Material and methods. The study included 308 individuals as follows: 1) 88 participants of the PURE study without hemodynamically relevant carotid atherosclerosis and symptomatic coronary atherosclerosis; 2) 88 patients with cerebrovascular disease (CVD) who required carotid endarterectomy; 3) 88 patients with

coronary artery disease (CAD) who required percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass graft surgery; 4) 63 patients with stage 5 chronic kidney disease (CKD). We measured following mineral homeostasis parameters: total and ionized calcium, phosphate, total protein, albumin, and fetuin-A. Then, we determined a baseline serum CPP concentration by flow cytometry using a fluorescent-labeled bisphosphonate OsteoSense 680EX.

Results. In comparison with other patients, healthy volunteers had the highest serum CPP concentration (249 CPPs/ μ L), indicating the retained ability to compensate

mineral homeostasis disturbances by aggregation of excessive calcium and phosphate with acidic proteins (mineral chaperones). Reduced serum CPP concentration in patients with CVD (170 CPPs/ μ L), CAD (139 CPPs/ μ L), and stage 5 CKD (193-203 CPPs/ μ L) showed impaired aggregation of excessive serum calcium and phosphate, which was also reflected by an increased level of blood ionized calcium.

Conclusion. Patients with CVD, CAD, and stage 5 CKD have lower serum CPP concentration than healthy individuals. In combination with elevated ionized calcium and reduced albumin, this suggests the depletion of calcium binding buffers in the serum of patients with cardiovascular and renal diseases.

Keywords: cardiovascular diseases, mineral homeostasis, calcium, phosphate, calciprotein particles, flow cytometry.

Relationships and Activities: none.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia.

Shishkova D. K.* ORCID: 0000-0002-1518-3888, Matveeva V. G. ORCID: 0000-0002-4146-3373, Markova V. E. ORCID: 0000-0002-6652-5745, Khryachkova O. N. ORCID: 0000-0002-6620-5960, Indukaeva E. V. ORCID: 0000-0002-6911-6568, Shabaev A. R. ORCID: 0000-0002-9734-8462, Frolov A. V. ORCID: 0000-0003-2366-6545, Kutikhin A. G. ORCID: 0000-0001-8679-4857.

*Corresponding author:

shishkovadk@gmail.com

Received: 17.05.2022 **Revision Received:** 05.07.2022 **Accepted:** 12.07.2022

For citation: Shishkova D. K., Matveeva V. G., Markova V. E., Khryachkova O. N., Indukaeva E. V., Shabaev A. R., Frolov A. V., Kutikhin A. G. Quantification of the initial levels of calciprotein particles as a screening marker of mineral homeostasis in patients with cardiovascular disease and in patients with chronic kidney disease. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(12):5064. doi:10.15829/1560-4071-2022-5064. EDN JBEWAQ

Ключевые моменты

- Нарушение минерального гомеостаза у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями ассоциировано с повышением молярной концентрации ионизированного кальция и фосфора.
- Измерение концентрации кальций-фосфатных бионов методом проточной цитометрии в сыворотке крови выявило снижение их концентрации у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в сравнении с условно здоровыми донорами крови.

Key messages

- Impairment of mineral homeostasis in cardiovascular patients is associated with an increase in the molar concentration of ionized calcium and phosphate.
- Measurement of the serum concentration of calciprotein particles' by flow cytometry revealed a decrease in their concentration in cardiovascular patients compared with healthy volunteers.

Нарушения минерального гомеостаза в зависимости от своей тяжести могут привести к повышению уровней ионизированного кальция и фосфора до "высоких нормальных" значений или даже к превышению их физиологической нормы. Эпидемиологические исследования показали, что "высокие нормальные" уровни ионизированного кальция и фосфора ассоциированы с повышенным риском развития инфаркта миокарда (ИМ) и ишемического инсульта (ИИ) [1], а также микрососудистой дисфункции [2], которая коррелирует с относительно высокой вероятностью острых сердечно-сосудистых событий, хронической сердечной недостаточности и смерти от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [3].

Помимо системы кальциетропных и фосфотропных гормонов и их рецепторов, а также ионов магния, уровень ионизированного кальция в крови контролируется циркулирующими кислыми белками — так называемыми минеральными шаперонами [4], которые связывают положительно заряженные ионы кальция за счет отрицательно заряженных аминокислот в своей структуре. Основными минеральными шаперонами сыворотки крови человека являются

ся альбумин (до 60% всех белков крови) и фетуин-А, который обладает чрезвычайно высокой емкостью связывания как ионов кальция, так и зарождающихся фосфорнокальциевых кластеров [5]. По аналогии с "высоким нормальным" уровнем кальция и фосфора, "низкий нормальный" уровень альбумина и фетуина-А также ассоциирован с повышенным риском развития ИМ, ИИ и сердечно-сосудистой смерти [6]. В результате связывания фетуина-А с фосфатом кальция происходит формирование кальципротеиновых мономеров и наноразмерных частиц — кальций-фосфатных бионов (КФБ), также называемых кальципротеиновыми частицами, агрегирующих избыточный ионизированный кальций и фосфат-анионы и выводящих их из кровотока [7]. Эксперименты по моделированию влияния КФБ на сосудистую стенку показали, что данные частицы интернализируются эндотелиальными клетками, вызывая их гибель посредством пермеабиллизации лизосомальной мембраны [7] и способствуя формированию провоспалительного микроокружения, приводящего к развитию дисфункции эндотелия [8] и формированию неинтимы [7, 8]. Таким образом, КФБ, с одной стороны, выполняют жизненно важную функцию системных сквенджеров избыточного кальция и фосфора, а с другой — способствуют развитию

дисфункции эндотелия, являющейся обязательным триггером развития атеросклероза.

В последние годы был разработан метод прямой детекции (определения исходной концентрации) КФБ в сыворотке или плазме крови при помощи связывания КФБ флуоресцентно меченым бисфосфонатом (OsteoSense 680EX) в сочетании с дифференциальным окрашиванием имеющих сходную размерность внеклеточных везикул липофильным мембранным красителем РКН67 [9]. Несмотря на активное использование этого метода у пациентов с требующей гемодиализа хронической болезнью почек (ХБП) [10, 11], количественного измерения КФБ в сыворотке крови пациентов с ССЗ, тем более в контексте иных нарушений минерального гомеостаза, до настоящего времени проведено не было.

Материал и методы

В исследование было включено 308 субъектов: 1) 88 участников эпидемиологического исследования PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology Study), обследованных на базе НИИ КПССЗ и не имеющих гемодинамически значимого каротидного атеросклероза (стеноз >50% просвета сосуда) по данным ультразвуковой доплерографии и симптоматического коронарного атеросклероза в анамнезе; 2) 88 пациентов с цереброваскулярной болезнью (ЦВБ), поступивших в нейрохирургическое отделение ГБУЗ КО "КОККД им. акад. Л. С. Барбараша" с потребовавшим проведения каротидной эндартерэктомии атеросклерозом сонных артерий (44 пациента с ИИ и 44 пациента с хронической ишемией головного мозга (ХИГМ)); 3) 88 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), потребовавшей чрескожного коронарного вмешательства (44 пациента с ИМ, поступивших в кардиологическое отделение ГБУЗ КО "КОККД им. акад. Л. С. Барбараша") или коронарного шунтирования (44 пациента с хроническим коронарным синдромом (ХКС), поступивших в кардиохирургическое отделение НИИ КПССЗ); 4) 63 пациента с ХБП 5 стадии (ХБП5) (определяемой как скорость клубочковой фильтрации <15 мл/мин/1,73 м² по формуле СКД-ЕРІ), поступивших в Центр нефрологии и гемодиализа ГАУЗ "КОКБ им. С. В. Беляева". Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (дата заседания 10.09.2018, протокол № 80/2018). До включения в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие. Гендерно-возрастные характеристики, коморбидные патологии и фармакологический анамнез включенных в исследование субъектов приведены в более ранней статье нашей группы [12].

У включенных в исследование пациентов при помощи автоматизированного биохимического анализатора (Konelab 60i, Thermo Scientific) были определены параметры, определяющие системный минеральный гомеостаз: уровень общего и ионизированного кальция, фосфора, а также концентрации общего белка и альбумина. Концентрацию фетуина-А в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (RD191037100, BioVendor) согласно протоколу производителя на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Scientific).

С целью прямой детекции КФБ в сыворотке крови использовали флуоресцентно меченный бисфосфонат OsteoSense 680EX (NEV10020EX, Perkin-Elmer), тропный к фосфату кальция, и липофильный флуоресцентный краситель РКН67 (MIDI67-1KT, Sigma-Aldrich), связывающийся с липидами, согласно авторской методике [9]. Такое сочетание красителей позволило надежно дифференцировать КФБ от внеклеточных мембранных везикул. Для проведения анализа сыворотку включенных в исследование пациентов после разморозки центрифугировали при 3500 × g в течение 5 мин (Microfuge 20R, Beckman Coulter) для осаждения криопреципитата. Затем в новую пробирку с номером исследуемого пациента было аликвотировано 50 мкл чистого надосадка, который был разведен в соотношении 1:5 в дважды отфильтрованном через поры диаметром 220 нм Tris-буферном растворе (TBS, pH 7,4, 252859, Sigma-Aldrich). Далее образцы были вновь центрифугированы для осаждения нецелевого крупного дебриса при 10000 × g в течение 15 мин при 4° С. Для дальнейшего окрашивания 200 мкл надосадка были смешаны с 250 мкл флуоресцентного меченного бисфосфоната OsteoSense 680EX (предварительно разведенного в соотношении 1:75 в вышеуказанном TBS) и инкубированы в течение 50 мин в темноте при 4° С. По истечении времени инкубации в пробирку было добавлено 25 мкл флуоресцентного красителя РКН67 (растворенного в специальном растворителе Diluent C в соотношении 1:100 согласно инструкции к набору), с дальнейшим ресуспендированием и инкубацией в темноте в течение 10 мин при 4° С.

Далее был проведен анализ образцов на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). В качестве отмывочной жидкости была использована отфильтрованная через поры диаметром 220 нм би-дистиллированная вода. Для детекции флуоресцентного красителя OsteoSense 680EX был применен лазер с длиной волны 638 нм (фильтр 712/25 BP), для детекции РКН67 — лазер с длиной волны 488 нм (фильтр 525/40 BP). В качестве положительного контроля для установки напряжения каналов флуоресценции были использованы искусственно синтезированные КФБ [8]. В качестве отрицательного

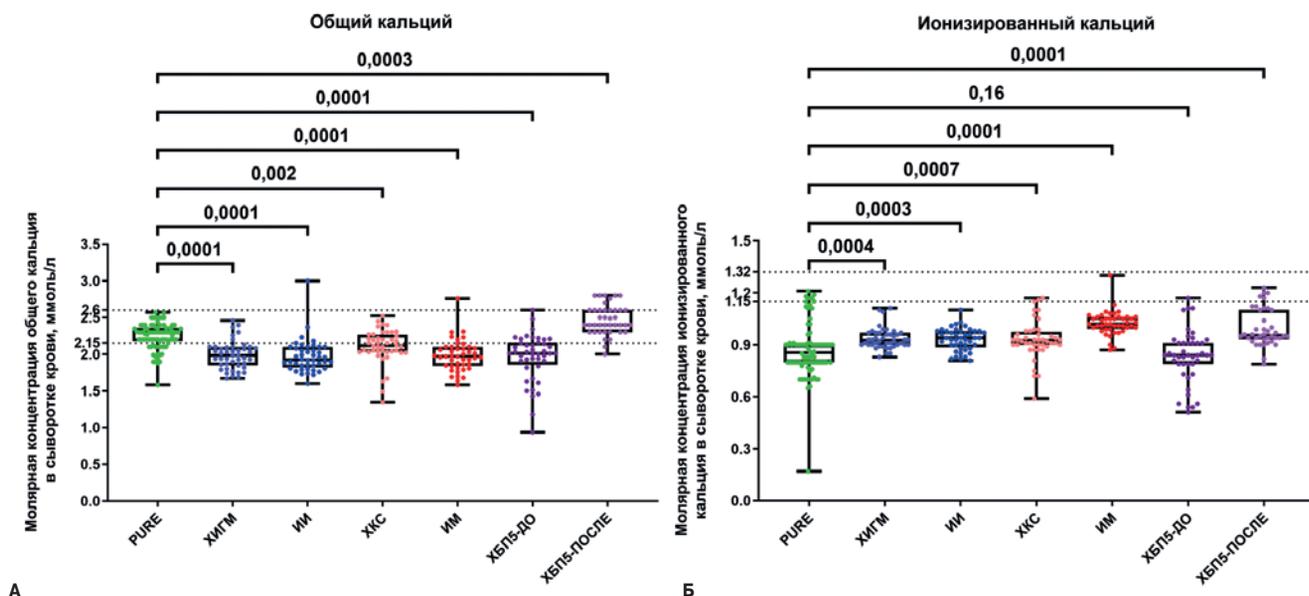


Рис. 1. Молярная концентрация общего и ионизированного кальция в сыворотке крови исследованных субъектов. Значения Р указаны над графиками, пунктирные линии отражают нижнюю и верхнюю границы нормы. Каждая точка на графике отражает анализ по одному пациенту.

Сокращения: ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ХКС — хронический коронарный синдром.

контроля (холостые пробы) для установки напряжения каналов флюоресценции и ежедневной проверки сходимости показаний прибора были использованы рабочие растворы обоих указанных флюоресцентных красителей, смешанные с чистым TBS без внесения сыворотки пациентов, а также сыворотка пациентов без внесения флюоресцентных красителей. КФБ детектировались как OsteoSense 680EX-положительные РКН67-отрицательные события.

Для сбора событий была установлена минимально возможная скорость 10 мкл/мин, что позволяло минимизировать детекцию ложноположительных "засвеченных частиц". Для максимальной стабилизации сигнала начало записи событий осуществлялось через 30 сек после загрузки образца в проточный цитометр. Длительность регистрации событий в каждом образце составила 2 мин, для повышения точности анализа все измерения были проведены дважды. Для исключения кросс-контаминации между различными образцами после анализа каждого образца дважды выполнялась короткая промывка прибора.

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Сравнения между группами были проведены при помощи критерия Краскела-Уоллиса, при этом поправка на множественные сравнения была осуществлена посредством расчета средней доли ложных отклонений гипотез (FDR). Значения $p < 0,05$ признавались статистически значимыми.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследова-

ний СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 "Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов".

Результаты

При измерении молярной концентрации общего кальция в сыворотке крови было выявлено, что пациенты с ЦВБ (ХИГМ, ИИ), ИБС (ХКС, ИМ) и ХБП5 до гемодиализа характеризуются его сниженным уровнем в сравнении с условно здоровыми донорами крови, в то время как после гемодиализа, наоборот, регистрируется повышение уровня общего кальция вследствие использования кальций-содержащих фосфат-биндеров и временному перераспределению кальция из костной ткани в кровотоки (рис. 1 А). Напротив, при измерении молярной концентрации ионизированного (физиологически активного, не связанного с белками или фосфором) кальция в сыворотке крови было обнаружено его повышение у пациентов с ЦВБ (ХИГМ, ИИ) и ИБС (ХКС, ИМ), а также у пациентов с ХБП5 после гемодиализа в сравнении с условно здоровыми донорами крови по описанным выше причинам (рис. 1 Б).

Наиболее вероятным объяснением повышенного уровня ионизированного кальция у пациентов с ЦВБ

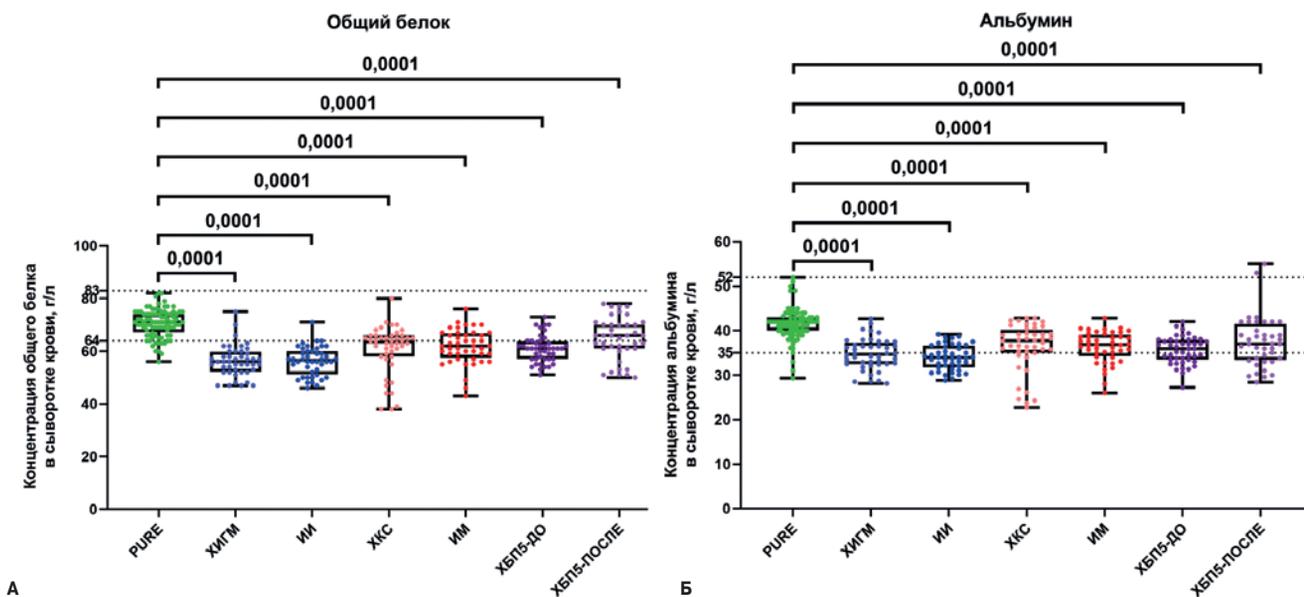


Рис. 2. Концентрация общего белка и альбумина в сыворотке крови исследованных субъектов. Значения Р указаны над графиками, пунктирные линии отражают нижнюю и верхнюю границы нормы. Каждая точка на графике отражает анализ по одному пациенту.
Сокращения: ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ХКС — хронический коронарный синдром.

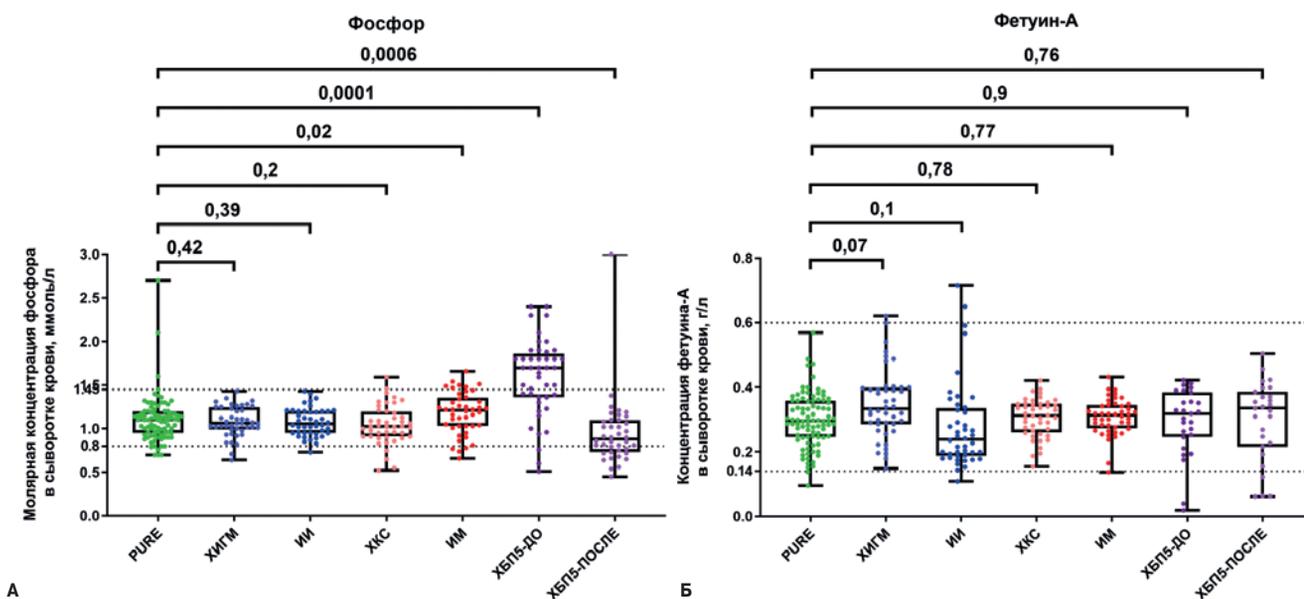
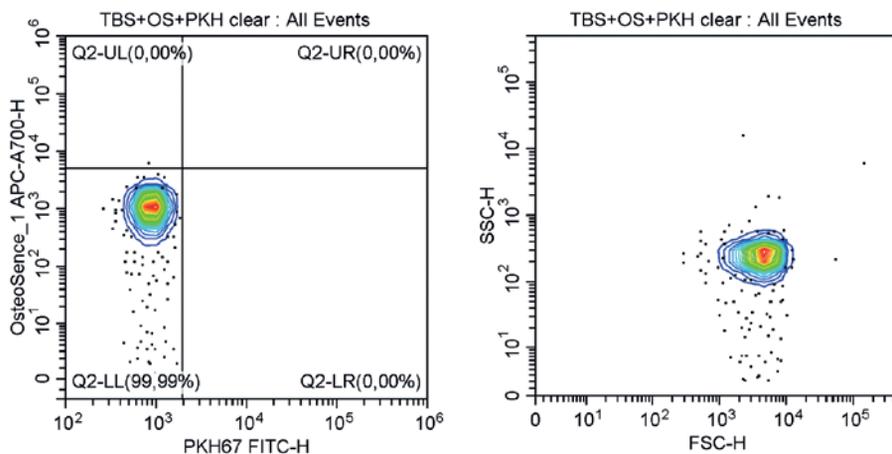


Рис. 3. Концентрация фосфора и фетуина-А в сыворотке крови исследованных субъектов. Значения Р указаны над графиками, пунктирные линии отражают нижнюю и верхнюю границы нормы. Каждая точка на графике отражает анализ по одному пациенту.
Сокращения: ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ХКС — хронический коронарный синдром.

и ИБС может быть сниженная концентрация общего белка (рис. 2 А) и кальций-связывающего белка альбумина (рис. 2 Б). Стоит отметить гипопроteinемию и гипоальбуминемию у пациентов с ХБП5 до и ее частичную коррекцию после гемодиализа (рис. 2 Б), что указывает на техническую валидность выполненных измерений.

Молярная концентрация фосфора в сыворотке крови пациентов с ЦВБ и ИБС практически не отличалась от таковой у условно здоровых доноров крови (рис. 3 А). Выявленная гиперфосфатемия у пациентов с ХБП5 до гемодиализа и резкое снижение уровня фосфора в крови после проведения данной процедуры подтвердило техническую

**Контрольный образец
без внесения сыворотки крови**



**Сыворотка крови
без внесения флуоресцентных красителей**

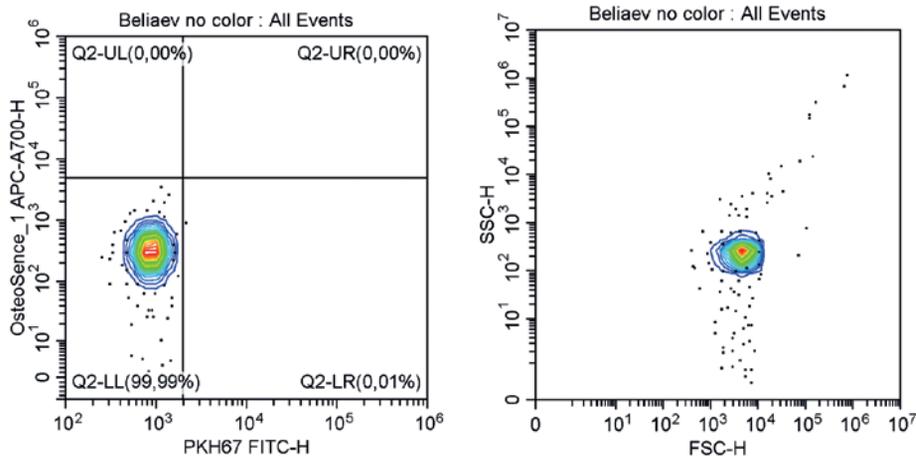


Рис. 4. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных РКН67-отрицательных событий, слева) и распределение размерности данных событий (справа). Холодная проба (TBS и флуоресцентные красители) без внесения сыворотки крови и сыворотка крови без внесения флуоресцентных красителей (отрицательный контроль).

Искусственно синтезированные КФБ

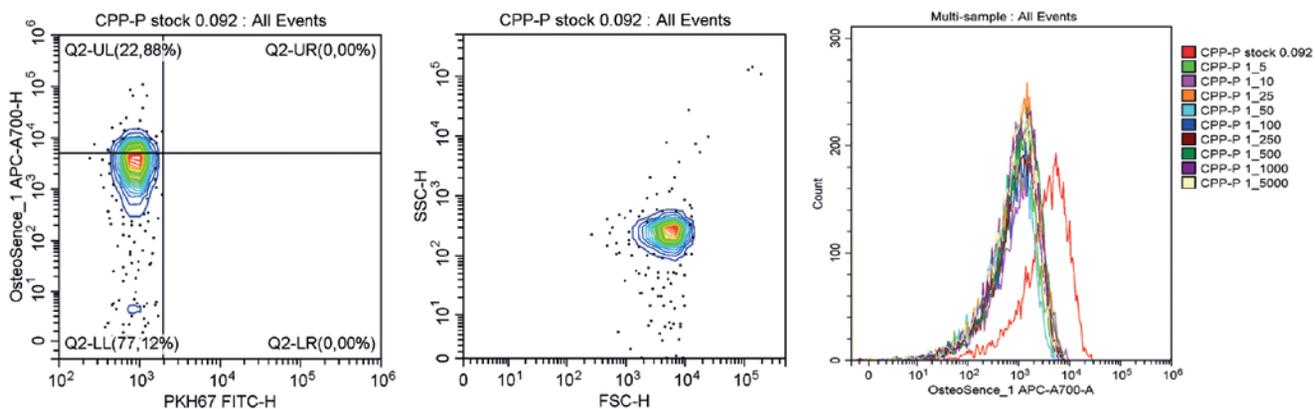


Рис. 5. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных РКН67-отрицательных событий, слева), распределение размерности данных событий (в центре) и стабильность детекции КФБ между образцами (справа). Искусственно синтезированные КФБ (положительный контроль).

Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращение: КФБ — кальций-фосфатные бионы.

валидность выполняемых измерений (рис. 3 А). Измерение концентрации фетуина-А не выявило статистически значимых отличий между группами,

практически у всех пациентов его концентрация находилась в пределах физиологической нормы (рис. 3 Б).

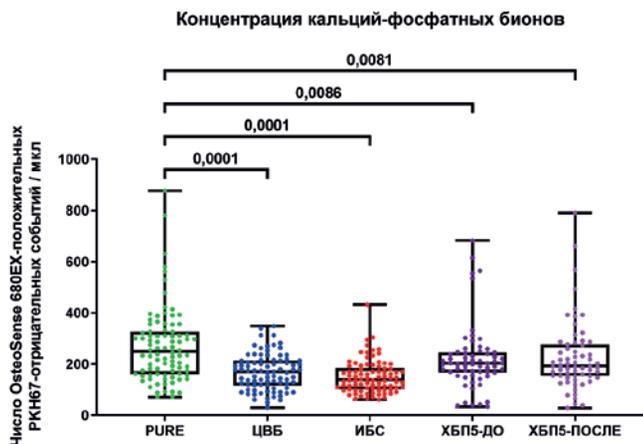


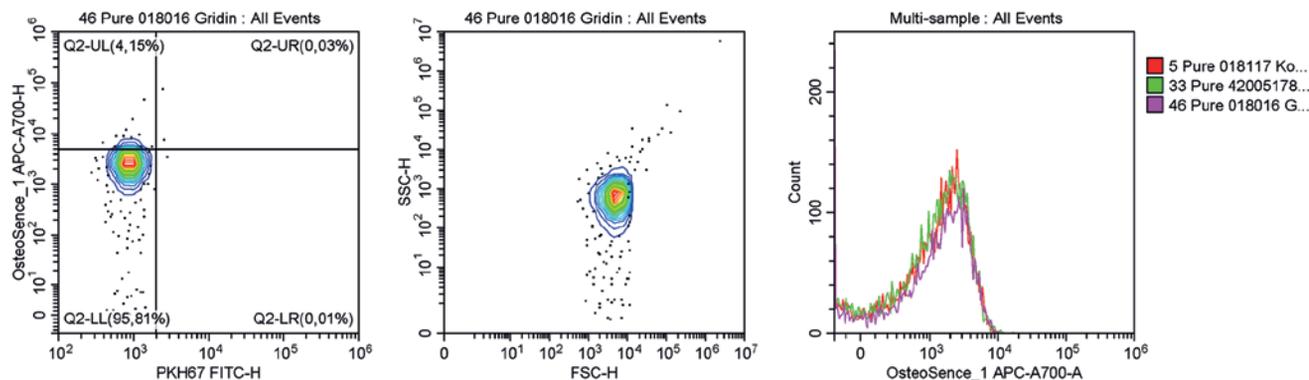
Рис. 6. Концентрация КФБ (OsteoSense 680EX-положительные RKN67-отрицательные события) в сыворотке крови исследованных субъектов. Значения P указаны над графиками. Каждая точка на графике отражает анализ по одному пациенту.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии, ЦВБ — цереброваскулярная болезнь.

Далее была проведена оценка исходной концентрации КФБ в сыворотке крови методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентных красителей OsteoSense 680EX и RKN67. Сперва было проведено измерение холостых проб и отрицательного контроля, что позволило оценить фоновую флуоресценцию контрольных образцов и показать отсутствие в них OsteoSense 680EX-положительных RKN67-отрицательных событий до специфического флуоресцентного окрашивания (гейт Q2-UL, рис. 4).

С целью установки напряжения фотоэлектронного умножителя для лазера с длиной волны 638 нм (фильтр 712/25 BP), детектирующего флуоресцентный краситель OsteoSense 680EX, в качестве положительного контроля были использованы искусственно синтезированные КФБ в серии разведений, успешная флуоресцентная детекция которых подтвердила техническую валидность примененного подхода к измерению концентрации КФБ (рис. 5).

Условно здоровые доноры крови



Цереброваскулярная болезнь

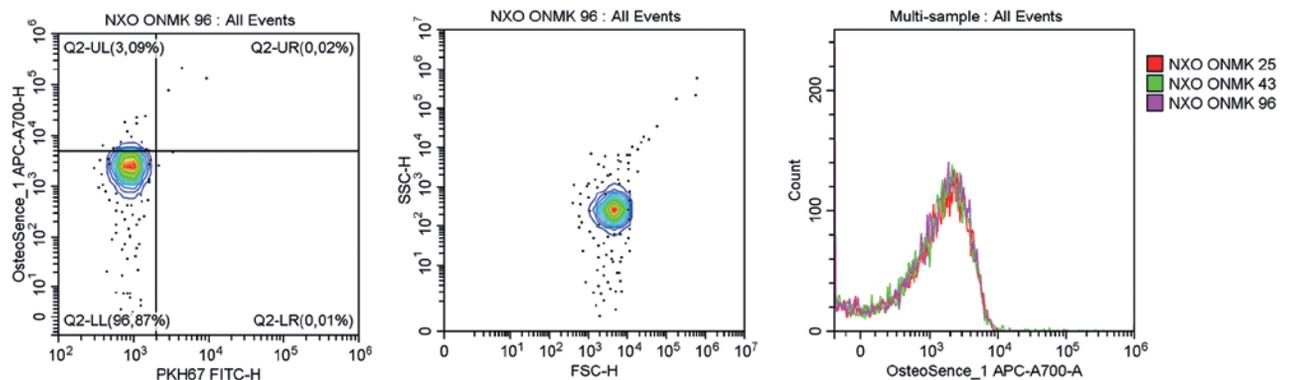
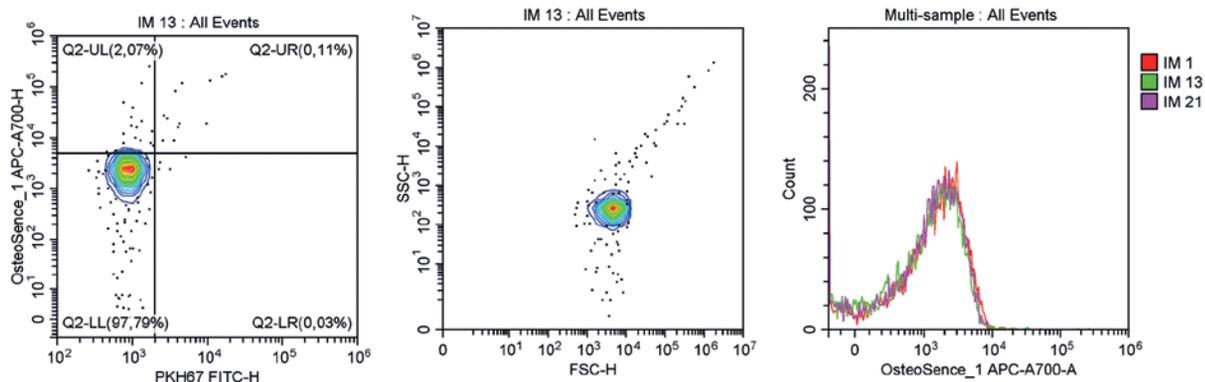


Рис. 7. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных RKN67-отрицательных событий, слева), распределение размерности данных событий (в центре) и стабильность детекции КФБ между образцами одной и той же группы (справа). Сыворотка крови исследованных пациентов.

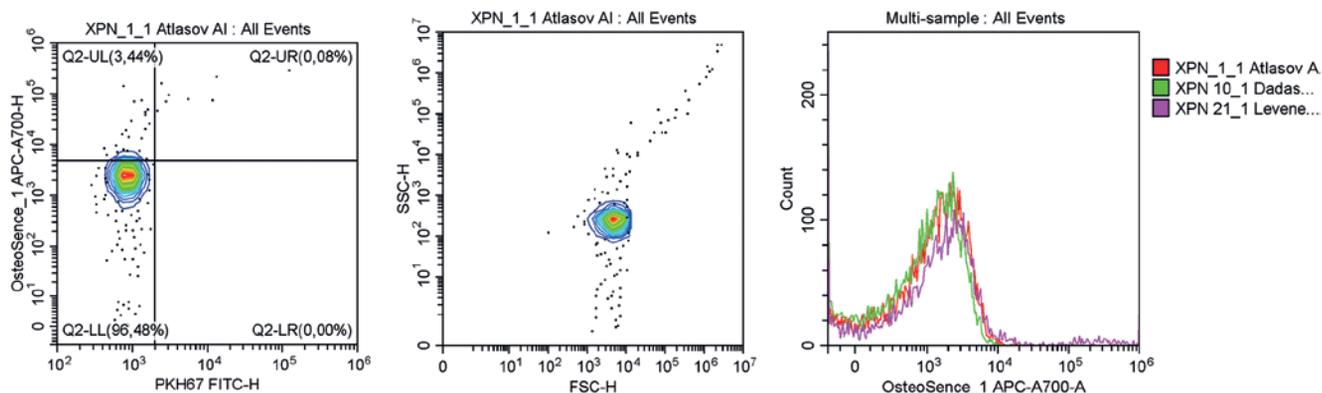
Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращение: ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии.

Ишемическая болезнь сердца



ХБП5 (до гемодиализа)



ХБП5 (после гемодиализа)

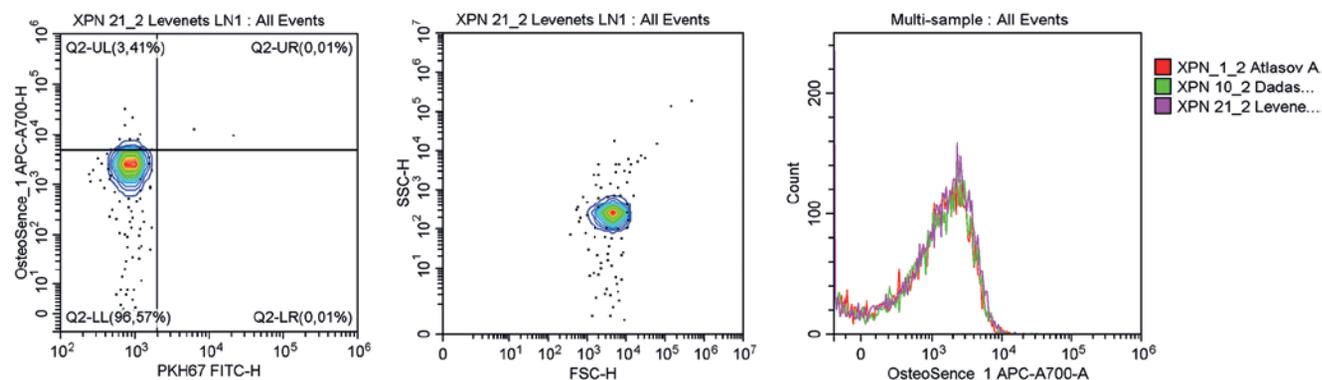


Рис. 7. Продолжение. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных РКН67-отрицательных событий, слева), распределение размерности данных событий (в центре) и стабильность детекции КФБ между образцами одной и той же группы (справа). Сыворотка крови исследованных пациентов.

Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращение: ХБП5 — хроническая болезнь почек 5 стадии.

Измерение концентрации КФБ в сыворотке крови пациентов методом проточной цитометрии выявило снижение концентрации КФБ (OsteoSense 680EX-положительных РКН67-отрицательных событий) в крови пациентов с ЦВБ, ИБС и ХБП5 в сравнении с условно здоровыми донорами крови.

Медианная концентрация КФБ в сыворотке крови условно здоровых доноров составила 249 КФБ/мкл (межквартильный интервал (МКИ): 162-326), у пациентов с ЦВБ — 170 КФБ/мкл (МКИ: 117-213), у пациентов с ИБС — 139 КФБ/мкл (МКИ: 103-185), у пациентов с ХБП5 до гемодиализа — 203 КФБ/мкл

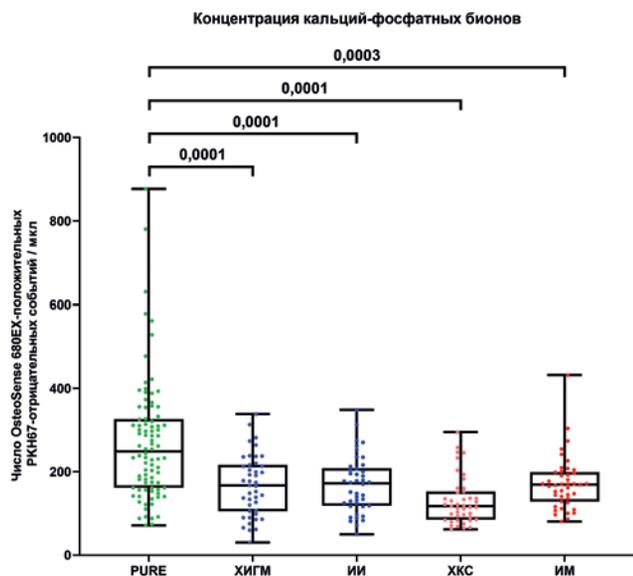


Рис. 8. Концентрация КФБ (OsteoSense 680EX-положительные PKH67-отрицательные события) в сыворотке крови исследованных субъектов. Значения P указаны над графиком. Каждая точка на графике отражает анализ по одному пациенту.
Сокращения: ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, ХИГМ — хроническая ишемия головного мозга, ХКС — хронический коронарный синдром.

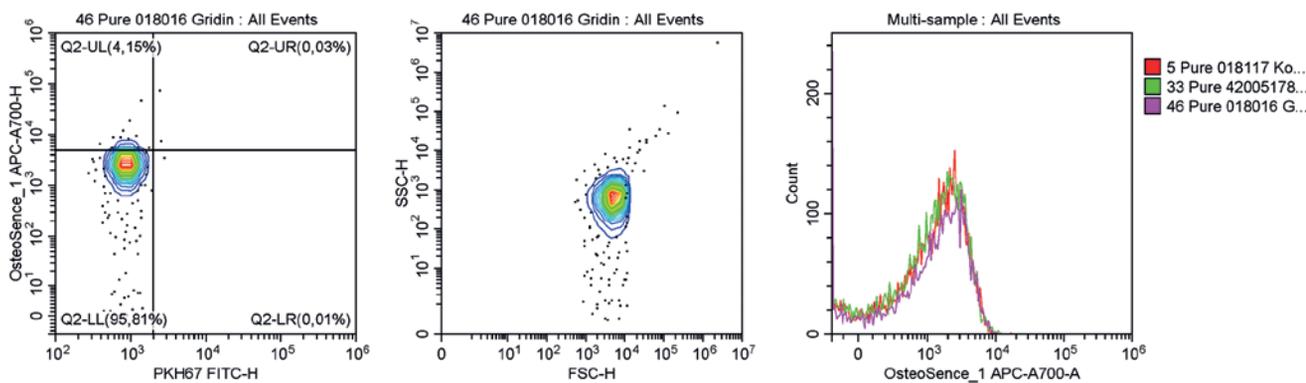
(МКИ: 167-245), у пациентов с ХБП5 после гемодиализа — 193 КФБ/мкл (МКИ: 154-276) (рис. 6). Примеры репрезентативных гейтов (проточно-цитометрических карт) приведены на рисунке 7.

Независимо от течения ишемии, все категории пациентов (пациенты с ЦВБ (ХИГМ и ИИ) и ИБС (ХКС и ИМ)) характеризовались статистически значимо сниженной концентрацией КФБ в сыворотке в сравнении с условно здоровыми донорами крови. Медианная концентрация КФБ в сыворотке крови условно здоровых доноров составила 249 КФБ/мкл (МКИ: 162-326), у пациентов с ХИГМ — 167 КФБ/мкл (МКИ: 105-216), у пациентов с ИИ — 172 КФБ/мкл (МКИ: 118-208), у пациентов с ХКС — 118 КФБ/мкл (МКИ: 85-152), у пациентов с ИМ — 169 КФБ/мкл (МКИ: 128-299) (рис. 8). Примеры репрезентативных гейтов (проточно-цитометрических карт) приведены на рисунке 9.

Обсуждение

Патофизиологическая значимость частиц-скевенджеров избыточного кальция и фосфора (КФБ) достаточно активно привлекает внимание физиологов,

Условно здоровые доноры крови



Хроническая ишемия головного мозга

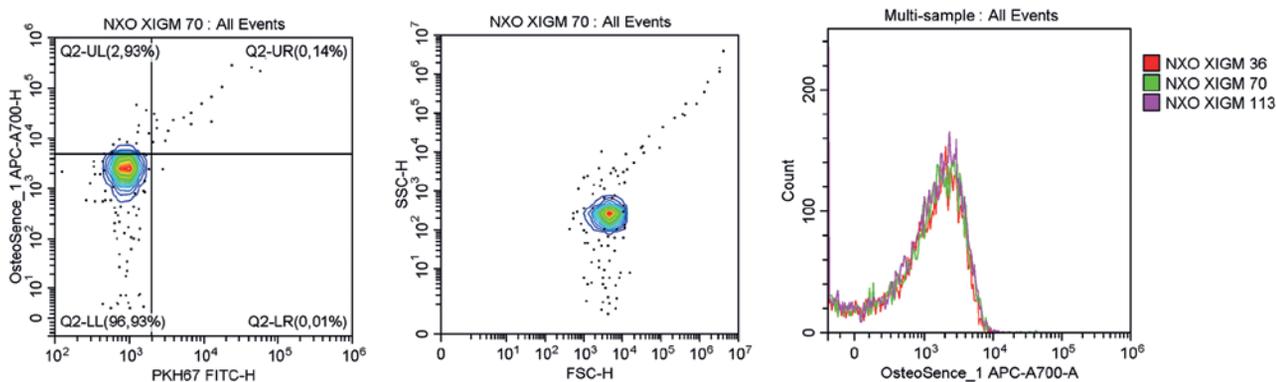
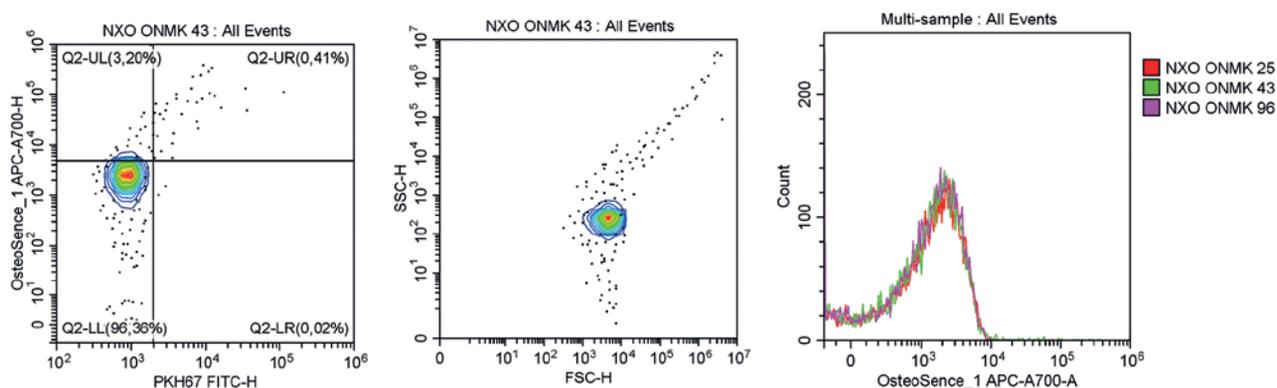
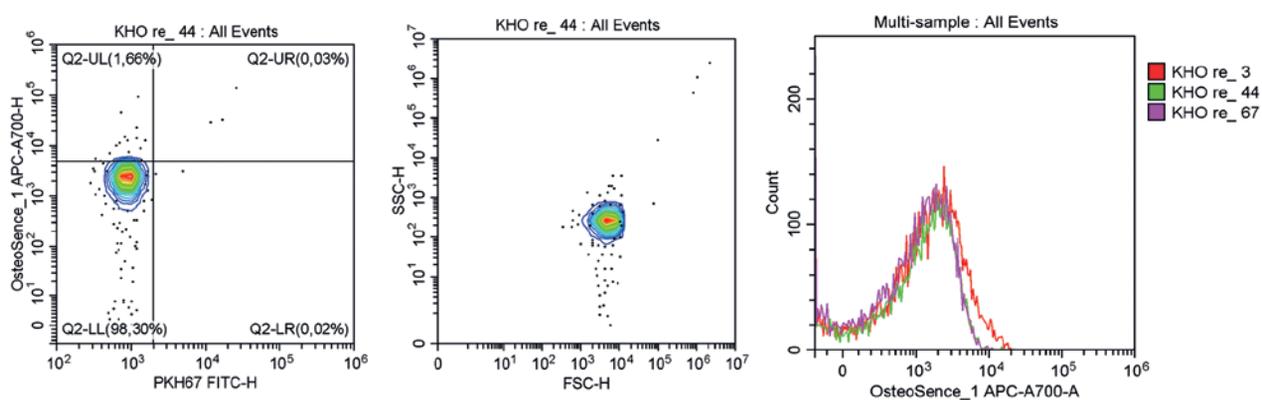


Рис. 9. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных PKH67-отрицательных событий, слева), распределение размерности событий (в центре) и стабильность детекции КФБ между образцами одной и той же группы (справа). Сыворотка крови исследованных пациентов.
Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Ишемический инсульт



Хронический коронарный синдром



Инфаркт миокарда

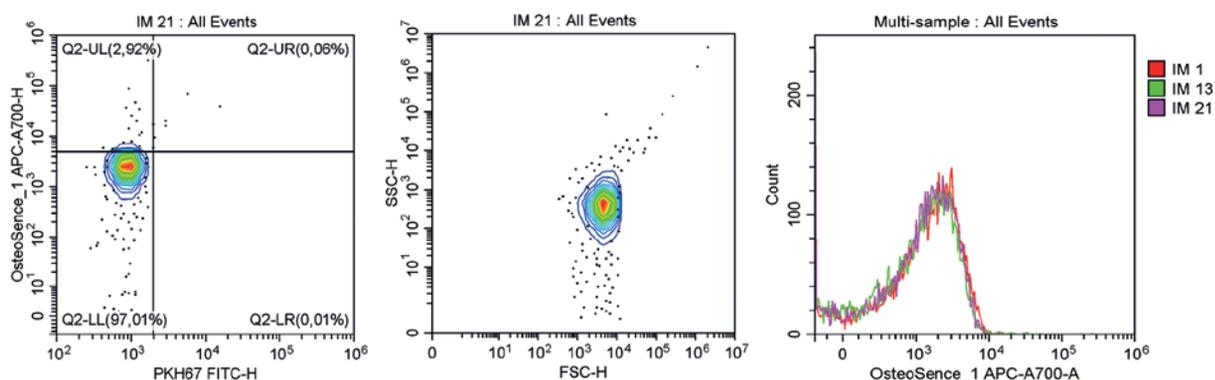


Рис. 9. Продолжение. Репрезентативные гейты, отражающие процент КФБ (OsteoSense 680EX-положительных PKH67-отрицательных событий, слева), распределение размерности событий (в центре) и стабильность детекции КФБ между образцами одной и той же группы (справа). Сыворотка крови исследованных пациентов.

Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

кардиологов и нефрологов, поскольку ускоренное формирование данных минерало-органических частиц в крови ассоциировано с развитием артериальной гипертензии, ИМ, ХИГМ, ИИ [7] и сердечно-сосудистой смертью [13] у субъектов без ХБП, а также с развитием заболеваний периферических артерий, ИМ и сердечно-сосудистой смертью у па-

циентов с ХБП5 (в т.ч. после трансплантации почки) [14]. Кроме того, было продемонстрировано, что ускоренное формирование КФБ в крови коррелирует с тяжестью и прогрессированием кальцификации коронарных артерий, а также развитием острых сердечно-сосудистых событий у пациентов с 2-4 стадиями ХБП [14].

Ранее нашей группой было показано, что сыворотка крови пациентов с ЦВБ и ИБС обладает повышенной склонностью к преципитации КФБ при создании сценария искусственного минерального стресса путем ее перенасыщения солевыми растворами кальция (CaCl_2) и фосфора (Na_2HPO_4) в концентрации 2 ммоль/л на фоне сниженной концентрации общего белка и альбумина [12]. Было предположено, что у таких больных истощаются как наиболее мощное первичное депо ионов кальция — альбумин, так и вторичное депо — способность организма формировать КФБ, что в совокупности приводит к избыточности ионизированного кальция, являющегося химическим субстратом для преципитации КФБ при искусственном перенасыщении сыворотки фосфат-анионами.

Прямая проточно-цитометрическая детекция КФБ в сыворотке крови при помощи сочетания флуоресцентных красителей OsteoSense 680EX и PKN67 действительно выявила снижение исходной концентрации КФБ в крови пациентов с ЦВБ (ХИГМ и ИИ), ИБС (ХКС и ИМ) и ХБП5 в сравнении с условно здоровыми донорами крови. На основании этих экспериментов был сделан вывод о том, что сыворотка условно здоровых доноров крови обладает сохранной способностью к компенсации нарушений минерального гомеостаза путем агрегации избыточного кальция и фосфора с белками. Соответственно, сниженное формирование КФБ у пациентов с ССЗ и ХБП5 свидетельствует о нарушенной способности крови агрегировать избыточный кальций и фосфор (вероятно, вследствие сниженного уровня общего белка и альбумина), что также отражается повышенным уровнем ионизированного кальция в крови. Помимо нашей группы, другому научному коллективу также удалось успешно детектировать КФБ в сыворотке крови пациентов с ХБП5 [9]. В этом исследовании было выявлено, что количество КФБ в группе условно здоровых доноров крови составило от 350 до 1400 (медианное значение 1050) КФБ/мкл, а у пациентов, находящихся на гемодиализе — от 300 до 9000 (медианное значение 1020) КФБ/мкл, а у пациентов, находящихся на перитонеальном диализе — от 400 до 30000 (медианное значение 1090) КФБ/мкл, соответственно [9]. Иные результаты также были получены в другом исследовании этой научной группы, где исходная концентрация КФБ у пациентов с ХБП5 в зависимости от приема кальцимиметика цинакальцета и трансплантации почки

варьировала от 16200 КФБ/мкл (после трансплантации) до 32600 (в случае прекращения приема цинакальцета) [10]. Еще одно исследование с подобной методологией у пациентов с ХБП5 выявило исходную концентрацию КФБ в 720-900 частиц/мкл [11]. Существенные различия в показателях можно объяснить тем, что скорость потока для сбора событий (flow rate) в приведенных исследованиях [9-11] была в 5 раз выше (50 мкл/мин), чем в нашем исследовании (10 мкл/мин), что приводит к увеличению количества ложноположительных событий ("засвеченных частиц").

С клинической точки зрения представляет интерес возможность фармакологического воздействия на КФБ с целью их дезинтеграции до момента поглощения эндотелиальными клетками с параллельным выведением избыточных ионов кальция и фосфора из кровотока. Исследование EVOLVE показало, что назначение пациентам с ХБП кальцимиметика цинакальцета приводило к снижению вероятности сердечно-сосудистой смерти и острой сердечной недостаточности [15]. Перспективными подходами для проведения доклинических испытаний способов коррекции нарушений минерального гомеостаза представляются: 1) коррекция концентрации альбумина с "низкой нормальной" до "высокой нормальной"; 2) саплементация донорами ионов магния, конкурирующими с ионами кальция за связывание с фосфат-анионом; 3) использование соединений с хелатирующим действием, которые позволяют дезинтегрировать уже сформированные КФБ и одновременно вывести высвобождающийся из них кальций и фосфор из кровотока.

Заключение

Проведенное исследование выявило высокую распространенность нарушений кальциевого гомеостаза у пациентов с ССЗ в сравнении с условно здоровым населением. Характерными особенностями таких нарушений у пациентов с ЦВБ и ИБС являются повышение молярной концентрации ионизированного кальция на фоне истощения кальций-связывающих депо (первичного — альбумина и вторичного — КФБ) и нормальном состоянии фосфорного звена минерального гомеостаза.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Kobylecki CJ, Nordestgaard BG, Afzal S. Plasma Ionized Calcium and Risk of Cardiovascular Disease: 106 774 Individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem*. 2021;67(1):265-75. doi:10.1093/clinchem/hvaa245.
2. Ginsberg C, Houben AJHM, Malhotra R, et al. Serum Phosphate and Microvascular Function in a Population-Based Cohort. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(11):1626-33. doi:10.2215/CJN.02610319.
3. Campos-Obando N, Lahousse L, Brusselle G, et al. Serum phosphate levels are related to all-cause, cardiovascular and COPD mortality in men. *Eur J Epidemiol*. 2018;33(9):859-71. doi:10.1007/s10654-018-0407-7.
4. Back M, Aranyi T, Cancela ML, et al. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front Cardiovasc Med*. 2019;5:196. doi:10.3389/fcvm.2018.00196.
5. Uedono H, Mori K, Ochi A, et al. Effects of fetuin-A-containing calciprotein particles on posttranslational modifications of fetuin-A in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):7486. doi:10.1038/s41598-021-86881-0.
6. Xie WM, Ran LS, Jiang J, et al. Association between fetuin-A and prognosis of CAD: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2019;49(5):e13091. doi:10.1111/eci.13091.
7. Shishkova DK, Velikanova EA, Bogdanov LA, et al. Calciprotein Particles Link Disturbed Mineral Homeostasis with Cardiovascular Disease by Causing Endothelial Dysfunction and Vascular Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12458. doi:10.3390/ijms222212458.
8. Shishkova D, Markova V, Sinitzky M, et al. Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8802. doi:10.3390/ijms21228802.
9. Smith ER, Hewitson TD, Cai MMX, et al. A novel fluorescent probe-based flow cytometric assay for mineral-containing nanoparticles in serum. *Sci Rep*. 2017;7(1):5686. doi:10.1038/s41598-017-05474-y.
10. Ruderman I, Smith ER, Toussaint ND, et al. Longitudinal changes in bone and mineral metabolism after cessation of cinacalcet in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *BMC Nephrol*. 2018;19(1):113. doi:10.1186/s12882-018-0910-9.
11. Bressendorff I, Hansen D, Pasch A, et al. The effect of increasing dialysate magnesium on calciprotein particles, inflammation and bone markers: post hoc analysis from a randomized controlled clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2021;36(4):713-21. doi:10.1093/ndt/gfz234.
12. Kuthin AG, Shishkova DK, Hryachkova ON, et al. Formation of calcium phosphate bions in patients with carotid and coronary atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(12):3881. (In Russ.) Кутихин А. Г., Шишкова Д. К., Хрячкова О. Н. и др. Закономерности формирования кальций-фосфатных бионов у пациентов с каротидным и коронарным атеросклерозом. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(12):3881. doi:10.15829/1560-4071-2020-3881.
13. Bojic M, Koller L, Cejka D, et al. Propensity for Calcification in Serum Associates With 2-Year Cardiovascular Mortality in Ischemic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:672348. doi:10.3389/fmed.2021.672348.
14. Bundy JD, Cai X, Scialla JJ, et al. Serum Calcification Propensity and Coronary Artery Calcification Among Patients With CKD: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(6):806-14. doi:10.1053/j.ajkd.2019.01.024.
15. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, et al. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Circulation*. 2015;132(1):27-39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013876.