

КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЕ БИОНЫ СПЕЦИФИЧНО ИНДУЦИРУЮТ ГИПЕРТРОФИЮ ПОВРЕЖДЕННОЙ ИНТИМЫ У КРЫС

Шишкова Д. К., Великанова Е. А., Кривкина Е. О., Миронов А. В., Кудрявцева Ю. А., Кутихин А. Г.

Цель. Изучить специфичность эндотелиотоксического действия кальций-фосфатных бионов (КФБ) *in vivo*.

Материал и методы. Токсичность кальций-фосфатных бионов и магний-фосфатных бионов (МФБ) по отношению к интиме брюшной аорты крыс линии Wistar оценивали путем их однократного внутривенного введения после баллонной ангиопластики с последующей эксплантацией аорт через пять недель. Биоптаты анализировали: 1) классическими гистологическими методами (окраской гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату) при помощи световой микроскопии; 2) иммунофлюоресцентным окрашиванием криосрезов (сочетанные окраски на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34, на CD31 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток α -гладкомышечный актин (α -ГМА), на маркер фибробластов виментин и α -ГМА, на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа и α -ГМА, после всех окрасок проводили докрасивание ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом) с дальнейшей конфокальной микроскопией. У всех животных забиралась кровь с последующим выделением сыворотки для определения молекул системного воспаления моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا посредством иммуноферментного анализа.

Результаты. В отличие от КФБ, МФБ не вызывали гипертрофию интимы брюшной аорты крыс. Формирование неоинтимы в аорте связано с индуцированным КФБ повреждением эндотелия, что запускает сдвиг фенотипа клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и фибробластов) с контрактного (для гладкомышечных клеток) и неактивного (для фибробластов) на синтетический.

Заключение. Внутривенное введение МФБ не вызывало гипертрофии интимы, что доказывает специфичность эндотелиотоксического действия КФБ, которое характеризуется фенотипическим сдвигом клеток мезенхимального ряда в неоинтиму.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(9):33–38
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-9-33-38>

Ключевые слова: атеросклероз, бионы, наночастицы, токсичность, эндотелий, гипертрофия интимы.

Конфликт интересов: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 17-04-00570 "Оценка специфичности токсического действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий".

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

Шишкова Д. К.* — м.н.с. лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-1518-3888, Великанова Е. А. — к.б.н., н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-1079-1956, Кривкина Е. О. — м.н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-2500-2147, Миронов А. В. — м.н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-8846-5077, Кудрявцева Ю. А. — д.б.н., зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-6134-7468, Кутихин А. Г. — к.м.н., с.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0001-8679-4857.

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

КФБ — кальций-фосфатные бионы, МФБ — магний-фосфатные бионы, α -ГМА — α -гладкомышечный актин, MCP-1/CCL2 — моноцитарный хемоаттрактантный белок.

Рукопись получена 06.03.2018
 Рецензия получена 23.03.2018
 Принята к публикации 04.04.2018

CALCIUM-PHOSPHATE BIONS DO SPECIFICALLY INDUCE HYPERTROPHY OF DAMAGED INTIMA IN RATS

Shishkova D. K., Velikanova E. A., Krivkina E. O., Mironov A. V., Kudryavtseva Yu. A., Kutikhin A. G.

Aim. To evaluate specificity of endothelial toxicity of calcium-phosphate bions (CPB) *in vivo*.

Material and methods. Toxicity of calcium-phosphate bions and magnesium-phosphate bions (MPB) in relation to intima of abdominal aorta of the Wistar rats, was assessed by single intravenous injection after balloon angioplastics with further explanting of aortas in five weeks. Bioplates were analyzed: 1) with classical histological methods (hematoxylin-eosine, alizarin red, van Gison, Russell-Movat) with light microscopy; 2) immune fluorescence coloring of cryoslices (combinational coloring for marker of mature endothelial cells CD31 and marker of progenitory CD34, for CD31 and marker of vascular smooth muscle cells α -smoothmuscle actin (α -SMA), for vimentin and α -SMA, for extracellular matrix marker collagen type IV and α -SMA, after all colorings there was additional nuclear 4',6-diamidine-2-phenylindol color) with further confocal microscopy. In all animals the blood was collected with serum extraction for systemic inflammation molecules analysis, as chemoattractant protein (MCP-1/CCL2) and ceruloplasmin via the immune enzyme analysis.

Results. With the difference from CPB, MPB did not lead to intimal hypertrophy in abdominal aorta in rats. Shaping of neointima in aorta is related with CPB-induced endothelium damage that induces a phenotype shift in mesenchymal cells (smooth muscle cells and fibroblasts) from contractile (for smooth muscle) and non-active (for fibroblasts) towards synthesizing.

Conclusion. Intravenous load of MPB did not lead to intimal hypertrophy that witness on specificity of endothelial toxicity of CPB, with phenotypical shift of the mesenchymal cells in neointima.

Russ J Cardiol. 2018;23(9):33–38
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-9-33-38>

Key words: atherosclerosis, bions, nanoparticles, toxicity, endothelium, intimal hypertrophy.

Conflicts of Interest: funded by Russian Foundation for Fundamental Research, grant № 17-04-00570.

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

Shishkova D. K. ORCID: 0000-0002-1518-3888, Velikanova E. A. ORCID: 0000-0002-1079-1956, Krivkina E. O. ORCID: 0000-0002-2500-2147, Mironov A. V. ORCID: 0000-0002-8846-5077, Kudryavtseva Yu. A. ORCID: 0000-0002-6134-7468, Kutikhin A. G. ORCID: 0000-0001-8679-4857.

Из клинических исследований известно, что перенасыщение крови ионами кальция и фосфора [1-5] ассоциировано с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца и острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу). Одним из физиологических механизмов поддержания минерального гомеостаза крови является образование кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют собой сферические частицы губчатой структуры диаметром ≤ 500 нм, состоящие из гидроксипатита, карбонат-гидроксипатита и ряда белков, включая ключевые ингибиторы кальцификации — альбумин и фетуин-А [6, 7]. В то же время, было обнаружено, что КФБ после своего формирования интернализируются эндотелиальными клетками, индуцируя секрецию провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6 и интерлейкина-8), запуская процесс апоптоза по внутреннему пути и вызывая развитие гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [6]. Кроме того, КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека [6] и также могут быть синтезированы искусственно для экспериментального моделирования эндотелиотоксичности [6, 7].

В то же время остается не известным, специфично ли эндотелиотоксическое действие только для КФБ или же это связано с общей для всех типов наночастиц корпускулярной природой. Для ответа на данный вопрос были искусственно синтезированы магний-фосфатные бионы (МФБ), идентичные КФБ по размерности, форме и органическому составу, однако имеющие другой минеральный состав. Важно отметить, что МФБ не образуются в организме человека, так как для их формирования в организме необходимо увеличить концентрацию магния в 10-20 раз, что несовместимо с жизнью [7]. Таким образом, можно предположить, что МФБ подходят для оценки специфичности токсического действия КФБ в эксперименте.

Целью данного исследования было изучить специфичность эндотелиотоксического действия КФБ *in vivo*.

Материал и методы

КФБ синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5М CaCl_2 (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 в 1319 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. МФБ синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М MgCl_2 (Sigma-Aldrich) и 100 мкл 0,2М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) в 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 100 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (fetal calf serum, Gibco). Контроль pH осуществляли

путем предварительного добавления 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация HEPES-буфера в среде — 1%).

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировали при $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 и 90% влажности (MCO-18AIC, Sanyo) в течение 24 часов с дальнейшим центрифугированием при $200,000 \times g$ и 4°C в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочей суспензии для инъекции в хвостовую вену крыс осадок КФБ растворяли в 300 мкл, а осадок МФБ — в 500 мкл 0,9% раствора NaCl, что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), эквивалентной оптической плотности на длине волны 650 нм 0,08-0,10. Данные значения соответствуют минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрации бионов в растворе. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях.

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar (n=30) весом 200-300 г, используя модель ангиопластики брюшной аорты баллоном для коронарной ангиопластики [8]. После введения в анестезию 3% изофлураном, все животные получали ингаляционную анестезию 2% изофлураном в течение всего времени операции. Животное фиксировали в положении лежа на спине, состригали с поверхности брюшной стенки шерсть и обрабатывали операционное поле 70% этанолом. Затем выполняли полную срединную лапаротомию. После изолирования полости брюшины салфетками, петли кишечника отводили вправо и заворачивали в предварительно увлажненную и согретую салфетку. Вдоль корня брыжейки вскрывали задний листок брюшины и выделяли аорту от уровня почечных артерий до бифуркации. На аорту дистальнее почечных артерий и на уровне бифуркации аорты накладывали два сосудистых зажима типа “бульдог”. При этом одновременно пережимали аорту и нижнюю полую вену. На 3 мм проксимальнее бифуркации аорты аорту пунктировали в проксимальном направлении иглой 21G и в просвет сосуда заводили баллон для коронарной баллонной ангиопластики. Затем проводили ангиопластику давлением инфляции 6 атм в течение 30 с. После этого баллон извлекали, просвет аорты промывали 0,9% NaCl, накладывали П-образный шов (Prolene 8-0). Место повреждения эндотелия после проведения ангиопластики находилось на 4 мм проксимальнее П-образного шва. Петли кишечника укладывали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку послойно ушивали непрерывным обвивным швом (Лавсан 4-0). Непосредственно перед ушиванием

брюшную полость заполняли подогретым до 37° С 0,9% NaCl. Для изучения токсического действия бионов на интиму аорты крыс суспензию КФБ или МФБ (900 мкл, 0,5 МкФ) или такой же объем стерильного 0,9% NaCl однократно вводили в хвостовую вену (по 10 животных на группу). Все процедуры проводились в стерильных условиях. После операции животных помещали в клетку на теплую подстилку. Осмотр крыс проводился ежедневно. Все процедуры осуществлялись в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных [9].

Вывод животных из эксперимента после оперативного вмешательства проходил через пять недель с последующей эксплантацией поврежденного участка брюшной аорты, который разрезался на два равных сегмента — один фиксировался в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч при 4° С с последующей заливкой в парафин, а второй замораживался при -140° С. Для изучения эксплантированных аорт делали циркулярные срезы толщиной 8 мкм (12 серийных срезов, равномерно распределенных по всей длине соответствующего сегмента аорты, на стекло) и анализировали: 1) классическими гистологическими методами (окраской гематоксилин-эозином, ализариновым красным, по Вейгерту-ван Гизону и по Расселлу-Мовату) при помощи световой микроскопии (AxioImager.A1, Carl Zeiss); 2) иммунофлуоресцентным окрашиванием криосрезов (сочетанные окраски на маркер зрелых эндотелиальных клеток CD31 и маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34, на CD31 и маркер гладкомышечных клеток α -гладкомышечный актин (α -ГМА), на маркер фибробластов виментин и α -ГМА, на маркер экстрацеллюлярного матрикса коллаген IV типа и α -ГМА, после всех окрасок проводили докрасивание ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (LSM 700, Carl Zeiss). Оценивали наличие или отсутствие воспалительной инфильтрации и гипертрофии интимы, а также отношение наиболее толстого участка интимы к наиболее тонкому (для количественной оценки гипертрофии интимы) в программе ImageJ. Также у всех животных забирали кровь с последующим выделением сыворотки для определения концентрации провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا посредством иммуноферментного анализа (наборы ab100777 и ab108820).

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Межгрупповое сравнение проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа, в случае выявления статистически значимых различий между группами осуществляли последующее попарное сравнение групп с использо-

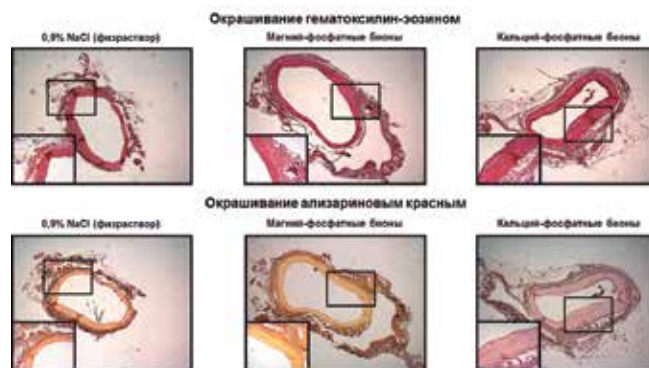


Рис. 1. Гистологическое окрашивание брюшных аорт крыс гематоксилин-эозином и ализариновым красным (увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу — $\times 200$).



Рис. 2. Гистологическое окрашивание брюшных аорт крыс по Вейгерту-ван-Гизону и по Расселлу-Мовату (увеличение $\times 50$, вставки в левом нижнем углу — $\times 200$).

ванием критерия Тьюки. Различия между группами признавали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p \leq 0,05$.

Результаты

Спустя 5 недель после введения бионов в хвостовую вену крыс в предварительно поврежденных баллоном участках брюшных аорт при окрашивании гематоксилин-эозином визуализировалась гипертрофия интимы в сочетании с воспалительной инфильтрацией в группе крыс, которым вводили КФБ. Экспозиция МФБ не оказывала значимого токсического действия, поскольку выраженное ремоделирование брюшной аорты у крыс отсутствовало (рис. 1). Окрашивание ализариновым красным показало полное отсутствие признаков кальцификации сосудистой ткани во всех образцах (рис. 1).

Окрашивание на коллаген и эластин (по Вейгерту-ван Гизону) позволило визуализировать внутреннюю эластическую мембрану, которая отделяет интиму от средней оболочки (медии). У крыс, которым внутривенно вводились КФБ, отчетливо детектировалась гипертрофия интимы брюшной аорты (рис. 2),

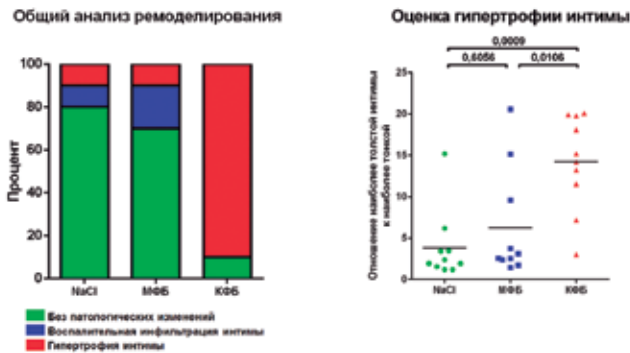


Рис. 3. Анализ степени ремоделирования сосудистой стенки брюшной аорты крыс.

Сокращения: NaCl — 0,9% раствор NaCl, МФБ — магний-фосфатные бионы, КФБ — кальций-фосфатные бионы.

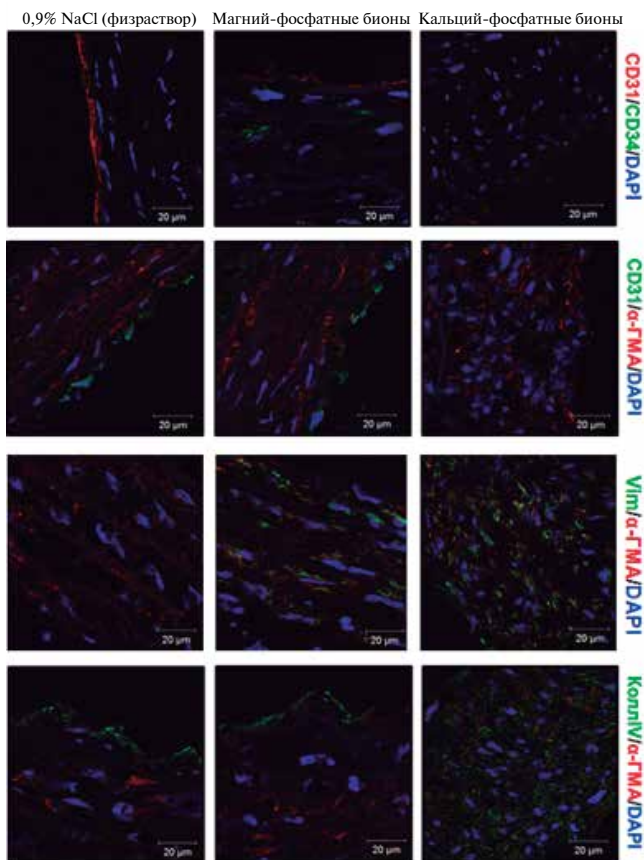


Рис. 4. Иммунофлюоресцентное окрашивание криосрезов брюшных аорт крыс.

Сокращения: CD31 — маркер зрелых эндотелиальных клеток, CD34 — маркер эндотелиальных прогениторных клеток, α-гладкомышечный актин (α-GMA) — маркер гладкомышечных клеток, виментин (Vim) — маркер фибробластов, коллаген IV типа (КоллIV) — маркер экстрацеллюлярного матрикса, DAPI — ядерный краситель 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

в то время как введение МФБ не оказывало эндотелиотоксического действия. Пентахромное окрашивание на фибрин и все компоненты сосудистой ткани (коллаген, эластин, гладкую мышечную ткань и основное

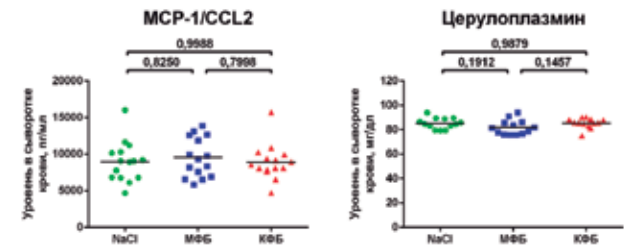


Рис. 5. Уровни провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактанта/хемотаксического белка-1 (MCP-1/CCL2) и церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при внутривенном введении МФБ и КФБ.

вещество) по Расселлу-Мовату позволило подтвердить локализацию внутренней эластической мембраны и оценить состояние всех компонентов сосудистой стенки в отдельности (рис. 2).

Качественная и количественная оценка гипертрофии интимы показала, что при внутривенном введении КФБ частота и выраженность патологического ремоделирования сосудистой стенки (в частности, гипертрофии интимы) брюшной аорты у животных, которым вводили КФБ, многократно и статистически значимо отличалась как от контрольной группы крыс, которым вводили физиологический раствор, так и от животных, которым вводили МФБ (рис. 3).

При сочетанной окраске на CD31 и CD34 был выявлен монослой CD31+CD34- клеток, указывающий на то, что реэндотелизация брюшной аорты после повреждения баллоном в ходе ангиопластики и последующей внутривенной инъекции бионов осуществляется по механизму миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток с неповрежденного эндотелия, а не по механизму адгезии и дифференцировки эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока. Сочетанное окрашивание на CD31 и α-GMA выявило значительное количество CD31-α-GMA+ клеток, свидетельствующих о том, что гипертрофия интимы обусловлена миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток из меди, в то время как сочетанное окрашивание на виментин и α-GMA также показало присутствие миофибробластов (виментин+α-GMA+ клеток), предположительно образовавшихся в результате активации фибробластов базальной мембраны и мигрировавших фибробластов адвентиции. При сочетанном окрашивании на α-гладкомышечный актин и коллаген IV типа обнаружено, что неоинтима содержит большое количество коллагена IV типа, локализованного в экстрацеллюлярном матриксе вокруг клеток мезенхимального ряда (гладкомышечных клеток и миофибробластов), детектируя их синтетическую активность (рис. 4).

Измерение уровня провоспалительных молекул моноцитарного хемоаттрактанта/хемотаксического белка-1 (monocyte chemoattractant protein 1, monocyte chemotactic protein 1, MCP-1/CCL2) и церу-

лоплазмина в сыворотке крови прооперированных крыс методом иммуноферментного анализа выявило отсутствие повышения их концентрации при внутривенном введении бионов (рис. 5).

Обсуждение

Несмотря на то, что существует ряд исследований, показывающих как цитотоксическое [6, 10-12], так и эндотелиотоксическое [6] действие КФБ, природа их токсического действия остается неизвестной: неясно, специфично оно только для данного типа бионов или же для всех типов наночастиц корпускулярной природы. Ответ на данный вопрос позволит улучшить понимание механизмов триггерной роли КФБ в развитии атеросклероза, что может способствовать разработке новых средств антикальцифицирующей терапии, которая может быть применена в профилактике и лечении этой патологии [13, 14]. Для оценки специфичности эндотелиотоксического действия КФБ в качестве группы сравнения были искусственно синтезированы МФБ, имеющие аналогичные форму, диаметр, элементный состав (за исключением наличия магния и кратно более низкого содержания кальция), функциональные группы и органический состав, однако характеризующиеся другой химической формулой соединения (магния фосфат гидрат вместо гидроксиапатита) (собственные неопубликованные данные). В данном исследовании выявлено, что частота и выраженность гипертрофии интимы при внутривенном введении КФБ была многократно выше по сравнению с МФБ. Таким образом, внутривенное введение МФБ не вызывало существенных патологических изменений в аорте, что доказывает специфичность эндотелиотоксического действия КФБ *in vivo*.

Целостность и функциональная активность эндотелия играют ключевую роль в его устойчивости к атерогенезу [15-18]. Факторы сердечно-сосудистого риска инициируют повреждение эндотелия и каскад провоспалительных событий [15-18], что приводит к инфильтрации интимы липидами и моноцитами с их последующей дифференцировкой в макрофаги, формированию пенистых клеток в результате поглощения липидов макрофагами и деградации базальной мембраны вследствие действия матриксдеградирующих ферментов. В результате этого происходит миграция гладкомышечных клеток из медиа и фибробластов из адвентиции в интиму с их дальнейшей пролиферацией и постепенным переходом на синтетический фенотип, сопровождающийся активным синтезом ими белков экстрацеллюлярного матрикса, что в конечном счете приводит к образованию неointимы [16-19]. Наибольший объем неointимы составляют именно белки экстрацеллюлярного матрикса [17-20]. Поскольку внутривенное введение КФБ после ангиопластики брюшной аорты вызывало

гипертрофию интимы, характеризующуюся большим количеством гладкомышечных клеток, миофибробластов и белка экстрацеллюлярного матрикса коллагена IV типа в неointиме, можно предположить, что воздействие КФБ запускает по меньшей мере некоторые характерные для атерогенеза процессы. Присутствие коллагена IV типа, локализованного вокруг множественных гладкомышечных клеток и миофибробластов в неointиме, указывало на их синтетический фенотип, характерный для ранних стадий развития атеросклероза.

В ряде исследований говорилось о прогениторных (CD34+) клетках, циркулирующих в крови и обладающих способностью адгезироваться к поврежденным участкам эндотелия, где они дифференцируются в зрелые эндотелиальные клетки, тем самым играя ведущую роль в регенерации функционально активного эндотелия после повреждения [21-24]. В то же время встречаются работы, показывающие, что процесс восстановления поврежденного эндотелия опосредован исключительно миграцией и пролиферацией зрелых (CD31+CD34-) эндотелиальных клеток с соседних участков здорового эндотелия [25, 26]. Выявленный нами монослой зрелых CD31+CD34- клеток свидетельствует в пользу того, что реэндотелизация брюшной аорты крыс после ангиопластики и экспозиции поврежденного сегмента КФБ проходит именно по такому механизму репарации. При этом неointима также подвергалась реэндотелизации зрелыми CD31+CD34- клетками.

Известно, что циркулирующие в периферической крови молекулы системного воспаления также способствуют нарушению эндотелиального гомеостаза и развитию дисфункции эндотелия [19, 27, 28]. При внутривенном введении КФБ и МФБ не было выявлено повышения концентраций молекул системного воспаления MCP-1/CCL2 и церулоплазмина в сыворотке крови прооперированных крыс. Данные наблюдения указывают на то, что токсические эффекты КФБ для эндотелия обусловлены их прямым воздействием на эндотелиальные клетки, а не опосредованы развитием системного воспалительного ответа и воздействием молекул воспаления из системного кровотока.

Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови обусловлена повышенной склонностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью и больных артериальной гипертензией к формированию КФБ в сравнении с условно здоровыми донорами крови [29]. Кроме того, повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хронической болезнью почек 3 и 4 стадий [30], а также у больных терминальной хронической почечной недостаточностью [31], включая перенесших трансплантацию

почки [32, 33]. При этом пациенты с увеличенной склонностью сыворотки крови к формированию КФБ характеризуются повышенным риском смерти как от всех, так и отдельно от сердечно-сосудистых причин [32, 33], а также повышенным риском развития инфаркта миокарда и заболеваний периферических артерий [31]. Поэтому как с позиции фундаментальной кардиологии, так и с клинической точки зрения представляется важным подробное изучение механизмов патогенного и, в частности, эндотелиотоксического действия КФБ.

Заключение

Внутривенное введение КФБ при индуцированном повреждении брюшной аорты вызывает

развитие гипертрофии интимы, свидетельствующей об их выраженной токсичности для эндотелия и являющейся характерным признаком атеросклероза. В то же время аналогичное внутривенное введение МФБ не вызывало подобных патологических изменений в аорте, что доказывает специфичность эндотелиотоксического действия КФБ *in vivo*.

Конфликт интересов. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 17-04-00570 “Оценка специфичности токсического действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий”.

Литература

- Lind L, Skarforss E, Berglund L, et al. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J Clin Epidemiol*. 1997;50(8):967-73. doi:10.1016/S0895-4356(97)00104-2.
- Foley RN, Collins AJ, Ishani A, et al. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*. 2008;156(3):556-63. doi:10.1016/j.ahj.2008.05.016.
- Larsson TE, Olausson 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.
- Danesh J, Collins R, Appleby P, et al. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279(18):1477-82. doi:10.1001/jama.279.18.1477.
- Sun XL, Zie QY, Guo GL, 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.
- Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, 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.
- Wu CY, Young L, Young D, et al. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013;8(9):e75501. doi:10.1371/journal.pone.0075501.
- Sin'kov MA, Filip'ev DE, Sevost'yanova VV, et al. Experimental model of rat aorta angioplasty with a paclitaxel releasing balloon catheter. *Bull Exp Biol Med*. 2013;156(9):392-5.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. doi:10.17226/12910.
- Aghagholzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016;251:404-14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044.
- Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, et al. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013;8(4):e60904. doi:10.1371/journal.pone.0060904.
- Peng HH, Wu CY, 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/smll.201202270.
- Escobar E, Lamas GA, Mark DB, et al. The effect of an EDTA-based chelation regimen on patients with diabetes mellitus and prior myocardial infarction in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2014;7(1):15-24. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663.
- Peguero JG, Arenas I, Lamas GA. Chelation therapy and cardiovascular disease: connecting scientific silos to benefit cardiac patients. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;24(6):232-40. doi:10.1016/j.tcm.2014.06.002.
- Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium — Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
- Jensen HA, Mehta JL. 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.
- Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Yurdagül A, Finney AC, Woolard MD, et al. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J*. 2016;473(10):1281-95. doi:10.1042/BJ20150844.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508-19. doi:10.1038/nri1882.
- Xu J, Shi GP. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(11):2106-19. doi:10.1016/j.bbdis.2014.07.008.
- Hristov M, Erl W, Linder S, et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004;104(9):2761-6. doi:10.1182/blood-2003-10-3614.
- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111(22):2981-7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340.
- Banerjee S, Brilakis E, Zhang S, et al. Endothelial progenitor cell mobilization after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):70-5. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.026.
- Zhao J, Mitrofan CG, Appleby SL, et al. Disrupted endothelial cell layer and exposed extracellular matrix proteins promote capture of late outgrowth endothelial progenitor cells. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:1406304. doi:10.1155/2016/1406304.
- Hagensen MK, Shim J, Falk E, et al. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:808-13. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221184.
- Hagensen MK, Raarup MK, Mortensen MB, et al. Circulating endothelial progenitor cells do not contribute to regeneration of endothelium after murine arterial injury. *Cardiovasc Res*. 2012;93(2):211-2. doi:10.1093/cvr/cvr342.
- Moss JW, Ramji DP. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem*. 2016;8(11):1317-30. doi:10.4155/fmc-2016-0072.
- Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(6):673-85. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.
- Prujm M, Lu Y, Megdiche F, et al. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease. *J Hypertens*. 2017;35(10):2044-52. doi:10.1097/HJH.0000000000001406.
- Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, et al. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):339-48. doi:10.1681/ASN.2013060635.
- Pasch A, Block GA, Bachtler M, et al. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(2):315-22. doi:10.2215/CJN.04720416.
- Keyzer CA, de Borst MH, van den Berg E, et al. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):239-48. doi:10.1681/ASN.2014070670.
- Dahle DO, Åsberg A, Hartmann A, et al. Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(1):204-12. doi:10.1111/ajt.13443.