

# БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК [612.398.145.4-02:616.13-004.6]-092.4

## РОЛЬ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ БИОНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА: ТОКСИЧНОСТЬ ДЛЯ ЭНДОТЕЛИЯ

**А. Г. Кутихин<sup>1\*</sup>, Е. А. Великанова<sup>1</sup>, Д. Е. Филиппов<sup>1</sup>, Р. А. Мухамадияров<sup>1</sup>,  
В. Г. Матвеева<sup>1</sup>, Л. В. Антонова<sup>1</sup>, А. С. Головкин<sup>1</sup>, Д. М. Руссаков<sup>2</sup>,  
Е. В. Григорьев<sup>1,3</sup>, Е. Б. Брусина<sup>1,3</sup>, О. Л. Барбараш<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово,

<sup>2</sup>Кемеровский государственный университет, г. Кемерово,

<sup>3</sup>Кемеровская государственная медицинская академия, г. Кемерово, Россия

## ROLE OF CALCIUM-PHOSPHATE BIONS IN PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS: TOXICITY FOR ENDOTHELIUM

**A. G. Kutikhin<sup>1\*</sup>, E. A. Velikanova<sup>1</sup>, D. E. Filipiev<sup>1</sup>, R. A. Mukhamadiyarov<sup>1</sup>,  
V. G. Matveeva<sup>1</sup>, L. V. Antonova<sup>1</sup>, A. S. Golovkin<sup>1</sup>, D. M. Russakov<sup>2</sup>,  
E. V. Grigoriev<sup>1,3</sup>, E. B. Brusina<sup>1,3</sup>, O. L. Barbarash<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo,

<sup>2</sup>Kemerovo State University, Kemerovo,

<sup>3</sup>Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

---

© Кутихин А. Г., Великанова Е. А., Филиппов Д. Е., Мухамадияров Р. А., Матвеева В. Г., Антонова Л. В., Головкин А. С., Руссаков Д. М., Григорьев Е. В., Брусина Е. Б., Барбараш О. Л., 2015

e-mail: antonkutikhin@gmail.com

тел. 8 960 907 70 67

[Кутихин А. Г. (\*контактное лицо) – младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии; Великанова Е. А. – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии; Филиппов Д. Е. – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории реконструктивной хирургии отдела мультифокального атеросклероза; Мухамадияров Р. А. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии; Матвеева В. Г. – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии; Антонова Л. В. – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии; Головкин А. С. – доктор медицинских наук, заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии; Руссаков Д. М. – заведующий лабораторией электронной микроскопии кафедры экспериментальной физики физического факультета; Григорьев Е. В. – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе; Брусина Е. Б. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии; Барбараш О. Л. – доктор медицинских наук, профессор, директор].

**Цель.** Оценить токсичность кальцийфосфатных бионов (КФБ) для эндотелия *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Искусственный синтез КФБ, стандартные методы культивирования клеток, фазово-контрастная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, аннексин V/7-аминоактиномицин D-тест, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ)-тест, иммуноферментный анализ, оригинальная экспериментальная модель ангиопластики аорты крысы с применением баллона для коронарной ангиопластики, окраска гематоксилин-эозином и по ван Гизону, гистологический анализ, статистический анализ.

**Результаты.** КФБ интернализировались эндотелиальными клетками линии EA.hy 926. Доля клеток, подвергшихся позднему апоптозу/некрозу, была статистически значимо выше, в то время как доля живых клеток была статистически значимо ниже в культурах клеток, экспонированных КФБ, в сравнении с контрольными культурами; дозозависимости выявлено не было. Уровень интерлейкина-6 и интерлейкина-8 был статистически значимо выше в надосадке с клеток, экспонированных КФБ, в сравнении с контрольными культурами. Также была выявлена значительная гиперплазия интимы у трех крыс, экспонированных КФБ, но не у контрольных крыс. Отношение интимы к меди в стенке брюшной аорты также было статистически значимо выше у крыс, экспонированных КФБ, в сравнении с контрольными крысами.

**Выводы.** КФБ обладают токсическим действием на эндотелиальные клетки.

**Ключевые слова.** Бионы, атеросклероз, патогенез, эндотелий, токсичность, воспаление, апоптоз.

**Aim.** To assess the toxicity of calcium-phosphate bions (CPB) for epithelium *in vitro* and *in vivo*.

**Materials and methods.** Artificial CPB synthesis, standard methods for cell culturing, phase-contrast microscopy, transmission electronic microscopy, annexin-V/7-aminoactinomycin D-test, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT-test), immune-enzyme assay, original experimental model of rat aortal angioplasty using balloons for coronary angioplasty, hematoxylin-eosin stain and Van Gieson's stain, histological analysis, statistical analysis were used.

**Results.** CPB were internalized by endothelial cells of the EA.hy 926 line. The share of cells exposed to late apoptosis/necrosis was significantly higher, whereas, the share of bioplasts was significantly lower in the cultures of CPB-exposed cells as compared to the control cultures; no dose-dependence was revealed. The levels of interleukin-6 and interleukin-8 were significantly higher in the supernatant from CPB-exposed cells versus the control cultures. There was also observed a significant hyperplasia of intima in 3 CPB-exposed rats, but not in the controls. The intima to media ratio in the abdominal aorta wall was also significantly higher in CPB-exposed rates in comparison with the control rats.

**Conclusions.** Calcium-phosphate bions have a toxic effect on endothelial cells.

**Key words.** Bions, atherosclerosis, pathogenesis, endothelium, toxicity, inflammation, apoptosis.

## ВВЕДЕНИЕ

В 2013 г. научной группе из Тайваня удалось успешно синтезировать семейство минералоорганических наночастиц из различных солей и фосфатов [9]. Было предположено, что данные неживые биомиметические частицы, называемые «бионами», являются частью физиологического механизма, регулирующего функцию, транспорт и выведение элементов и минералов в организме человека [9]. Кальцийфосфатные бионы (КФБ) формируются при избытке преципитирующих ионов или безуспешной работе механизма их

выведения в биологических жидкостях [9]. Эти образования представляют собой само-реплицирующиеся кальцийфосфатные частицы  $\leq 500$  нм в диаметре [9] и могут быть визуализированы при помощи электронной или атомно-силовой микроскопии как сферические наночастицы, формирующие агрегаты и состоящие из углерода, азота, кислорода, водорода, кальция и фосфора [9]. Также было продемонстрировано, что они содержат некоторые белки [9].

В работе было показано, что КФБ схожи между собой при выделении из различных биологических жидкостей [9]. В нашей не-

давшей работе также было продемонстрировано, что КФБ, выделенные из кальцифицированных атеросклеротических бляшек, и искусственно синтезированные КФБ имеют практически одинаковую морфологию и химический состав [1]. Кроме того, было выявлено, что факторы риска развития атеросклероза и кальцификации клапанов сердца аналогичны тем, что способствуют формированию КФБ в крови [1]. Это указывает на их возможную патогенность и роль в появлении сердечно-сосудистой кальцификации. В то же время остается неясным, являются ли КФБ патогенными частицами и истинной причиной сердечно-сосудистой кальцификации или это всего лишь безвредный продукт фосфорно-кальциевого гомеостаза. Было предположено, что КФБ способны оказывать токсические эффекты на эндотелиальные клетки.

*Цель исследования* – оценить токсичность КФБ для эндотелия *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Искусственный синтез КФБ*

Готовились базовые растворы  $\text{CaCl}_2$  (0,45М, Sigma-Aldrich) и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,2М, Sigma-Aldrich), которые далее разбавлялись до равных концентраций в 1 мМ во флаконе с 10 мл культуральной среды (среда DMEM, 10%-ная фетальная бычья сыворотка, 1%-ный раствор L-глутамин-пенициллина-стрептомицина и 0,4%-ный раствор амфотерицина В, Gibco) и инкубировались при 37 °С, 5%-ном  $\text{CO}_2$  и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo). Все процедуры осуществлялись в стерильных условиях. Длительность культивирования составила 6 недель, после чего растворы инкубировались в течение 3 дней при 4 °С, центрифугировались при 200 000 xg (Optima MAX-XR Ultracentrifuge, Beckman Coulter) в течение 1 ч при 4 °С, и осадок растворялся в фосфатно-

солевом буфере (ФСБ, 1x, pH 7,4, Gibco). Количество КФБ в растворе определялось измерением оптической плотности (ОП) на длине волны 650 нм в соответствии со стандартами МакФарланда (0,5; 1 и 2 МкФ с соответствующими значениями ОП 0,08–0,10; 0,14–0,17 и 0,27–0,31). Во всех экспериментах для измерения ОП использовался микропланшетный ридер «Униплан» (Пикон, Россия).

### *Культивирование клеток*

Для экспериментов с клетками использовалась эндотелиальная клеточная линия EA.hy 926, предоставленная Dr. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill, США) и первичная культура фибробластов кожи человека (пассаж 5/6), выделенная из кожи нижней конечности здорового взрослого человека. Клеточная линия EA.hy 926 является гибридомой, которая была получена путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека с клетками аденокарциномы легкого линии A549 и сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека [3]. Клетки культивировались в среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) с 10%-ной фетальной телячьей сывороткой (Gibco), 2%-ным раствором гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Sigma-Aldrich), 1%-ным раствором HEPES-буфера (Gibco), 1%-ным раствором L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4%-ным раствором амфотерицина В (Gibco). Все эксперименты с клетками проводились в стерильных условиях при 37 °С, 5%-ном  $\text{CO}_2$  и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo).

### *Животные*

Четырнадцать крыс-самцов породы Wistar (вес 250–300 г, возраст 12–14 недель) использовались для экспериментов на животных. Животные содержались в полипропиленовых клетках (пять крыс на клетку), высланных деревом, и имели доступ к воде и пище *ad libitum*. В течение всего времени

эксперимента поддерживались стандартные условия температуры ( $24 \pm 1$  °C), относительной влажности ( $55 \pm 10$  %) и 12-часовые циклы света и темноты. Осмотр крыс проводился ежедневно. Все процедуры осуществлялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных и были одобрены этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

#### *Анализ интернализации КФБ*

Клетки EA.hy 926 в 6-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку) экспонировались 100  $\mu$ л КФБ (2 МкФ) или ФСБ в течение 48 ч. Осадок клеток фиксировался в течение 1 ч 2,5%-ным глутаровым альдегидом (Sigma-Aldrich), постфиксировался в течение 1 ч 1%-ным тетраоксидом осмия (Serva Electrophoresis), заключался в 2%-ную агарозу (Amresco) и обезвоживался в батарее спиртов возрастающей концентрации. Срезы агарозного геля заключались в смесь эпоксидной смолы и ацетона (соотношение 1:1, Sigma-Aldrich) при комнатной температуре на 2 ч, затем снова заключались в эпоксидную смолу при комнатной температуре на сутки и наконец заключались в свежую эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы производились на ультрамикротоме (LKB Bromma Nova Ultra Microtome, LKB), помещались на медную сеточку с углеродным напылением (Structure Probe, Inc.), окрашивались 2%-ным уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences) и контрастировались цитратом свинца (Electron Microscopy Sciences). Далее срезы оценивались при помощи просвечивающего электронного микроскопа (JEOL JEM-2100, JEOL).

#### *Аннексин V/7-аминоактиномицин D-тест*

Клетки EA.hy 926 и первичные фибробласты кожи человека в 6-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку) экспонировались 100 мкл КФБ (0,5 или 2 МкФ) или ФСБ в течение 24 ч. Аннексин V/7-аминоактиномицин D-тест для определения апоптоза/некроза

проводился с использованием набора компании BioLegend в соответствии с инструкциями производителя, оценка результатов проводилась проточной цитометрией (BD FACSCalibur Flow Cytometry System, BD Biosciences). Для анализа данных проточной цитометрии использовалась программа FSCAP Array (Soft Flow). Все измерения осуществлялись в дублях, и средние значения использовались для последующего анализа.

#### *3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ)-тест*

Клетки EA.hy 926 и первичные фибробласты кожи человека в 96-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^4$  клеток на лунку) экспонировались 10 мкл КФБ (0,5 или 2 МкФ) или ФСБ в течение 24 ч. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид)-тест для оценки клеточной жизнеспособности и пролиферации проводился при помощи соответствующего набора компании Life Technologies в соответствии с инструкциями производителя, измерение результата осуществлялось на длине волны 570 нм.

#### *Иммуноферментный анализ*

Клетки EA.hy 926 и первичные фибробласты кожи человека в 6-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку) экспонировались 100 мкл КФБ (0,5 или 2 МкФ) или ФСБ в течение 24 ч. Уровень цитокинов и молекул клеточной адгезии (интерлейкин-1 $\alpha$ , -4, -6, -8, растворимый CD40-лиганд, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, растворимый E-селектин, растворимый P-селектин, растворимая межклеточная молекула клеточной адгезии-1, интерферон- $\gamma$  и фактор некроза опухоли- $\alpha$ ) в надосадке с клеточных культур измерялся методом иммуноферментного анализа посредством наборов компании eBioscience в соответствии с инструкциями производителя. Все измерения проводились в дублях, и средние значения использовались для последующего анализа. Измерение результата выполнялось на длине волны 450 нм.

*Животная модель*

После анестезии 3%-ным изофлураном все животные получали ингаляционную анестезию 1,5%-ным изофлураном в течение всего времени операции. Использовалась оригинальная экспериментальная модель ангиопластики аорты крысы с применением баллона для коронарной ангиопластики [6]. Аорта пунктировалась в проксимальном направлении иглой 21G, баллонный катетер DIOR 2,0×15 мм вставлялся в просвет аорты при помощи 0,014-дюймового проводника, и проводилась ангиопластика с давлением 10 атмосфер в течение 10 секунд. Катетер выводился, и процедура повторялась трижды для повреждения эндотелия. Все процедуры выполняли в асептических условиях. Раствор КФБ (700 мкл, 0,5 МкФ) или такой же объем 0,9%-ного NaCl (Gibco) вводился в кровеносное русло опытных и контрольных крыс соответственно (по 7 животных) путем инъекции в хвостовую вену.

*Забор тканей, окраска и гистологический анализ*

Спустя пять недель после операции все животные умерщвлялись передозировкой углекислого газа. Сегменты брюшной аорты крыс ( $\geq 2,5$  см) иссекались, фиксировались в 10%-ном забуференном формалине (Electron Microscopy Sciences), заключались в парафин (Electron Microscopy Sciences), и производились срезы (3 мкм). После окраски гематоксилин-эозином и по ван Гизону в соответствии с общепринятой методикой срезы с каждой аорты оценивались световой микроскопией (Axioscop 40 Lab Microscope, Carl Zeiss) для определения гиперплазии интимы и отношения интимы к меди. Ширина интимы и меди оценивалась с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health). Оценивалось по три среза каждой окраски с каждой крысы, и вычислялось среднее значение для статистического анализа.

*Статистический анализ*

Статистический анализ проводился при помощи программы MedCalc (MedCalc Software). Оценка нормальности распределения оценивалась по критерию д'Агостино-Пирсона. Данные представлялись с помощью медианы, межквартильного расстояния (25-й и 75-й процентиля), среднего и доверительных интервалов (ДИ) для медианы и среднего. В зависимости от типа распределения две независимые группы сравнивались по *U*-критерию Манна-Уитни или *t*-критерию Стьюдента, три и более независимые группы сравнивались по критерию Краскелла-Уоллиса или однофакторным дисперсионным анализом (ОДА) с последующим попарным сравнением по *U*-критерию Манна-Уитни или *t*-критерию Стьюдента в том случае, если статистически значимые различия были выявлены критерием Краскелла-Уоллиса или ОДА соответственно. Поправка на множественные сравнения проводилась вычислением средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate). *P*-значения или *q*-значения в случае вычисления средней доли ложных отклонений гипотез (*q*-значения – это *p*-значения после поправки с использованием этого метода)  $\leq 0,05$  признавались статистически значимыми.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Поскольку КФБ могли быть замечены в клеточных культурах методом фазово-контрастной микроскопии (рис. 1, *a*), была исследована возможность интернализации КФБ клетками линии EA.hy 926. Данное явление было успешно выявлено при помощи просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1, *б*).

Затем была исследована способность КФБ вызывать цитотоксические эффекты, т.е. индуцировать апоптоз и снижать жизнеспособность. Аннексин V/7-аминоактиномицин D-тест показал, что доля клеток, подвергшихся

позднему апоптозу/некрозу, статистически значимо выше, в то время как доля живых клеток статистически значимо ниже в культурах клеток EA.hy 926, экспонированных КФБ в течение 24 часов, в сравнении с контрольными культурами (рис. 2, а); последнее также было подтверждено посредством МТТ-теста (рис. 2, б). Стоит отметить, что не было обнаружено никакой дозозависимой связи при добавлении к клеткам растворов с КФБ одинакового объема, но разной оптической плотности (0,5 или 2 МкФ) (рис. 2, а, б).

Далее был применен иммуноферментный анализ для оценки уровня проатеросклеротических цитокинов и молекул клеточной адгезии в надосадке с клеточных культур. Уровень интерлейкина-6 и интерлейкина-8 был статистически значимо выше в надосадке с культур линии EA.hy 926, экспонированных КФБ в течение 24 часов,

в сравнении с контрольными культурами (рис. 2, в). Кроме того, не удалось обнаружить значимых цитотоксических эффектов или изменений секреторного профиля в экспериментах на первичных культурах фибробластов кожи человека.

Наконец была оценена способность КФБ вызывать гиперплазию интимы *in vivo*. Она была обнаружена у шести из семи крыс, экспонированных КФБ, и лишь у трех из семи контрольных крыс. Более того, была выявлена значительная концентрическая или эксцентрическая гиперплазия интимы брюшной аорты у трех крыс, экспонированных КФБ, но не у контрольных крыс (рис. 3, а, б). Отношение интимы к меди в стенке брюшной аорты также было статистически значимо выше у крыс, экспонированных КФБ, в сравнении с контрольными крысами (рис. 3, в).

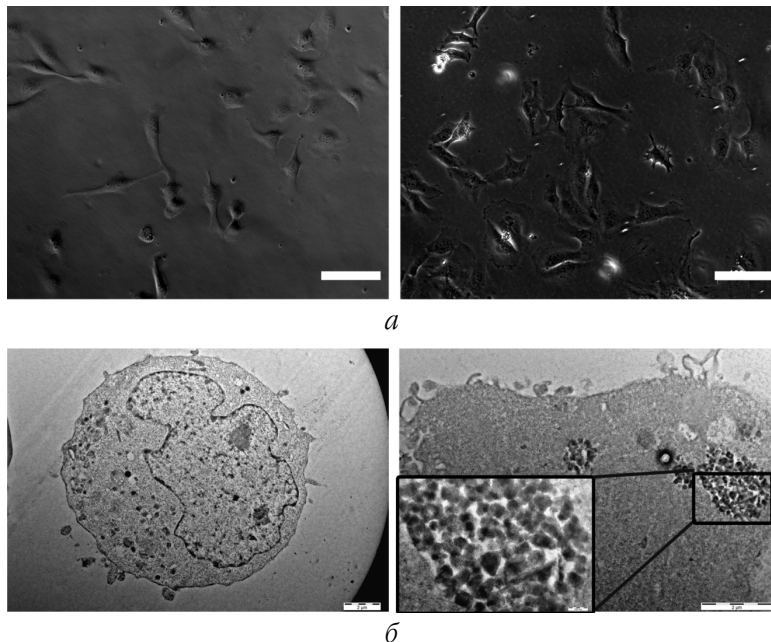


Рис. 1. Интернализация кальцийфосфатных бионов эндотелиальными клетками: а – КФБ присутствуют среди клеток EA.hy 926, экспонированных им (справа), но не в контрольной культуре (слева); б – КФБ интернализируются клетками EA.hy 926, экспонированными им (справа); контрольная культура свободна от КФБ (слева)

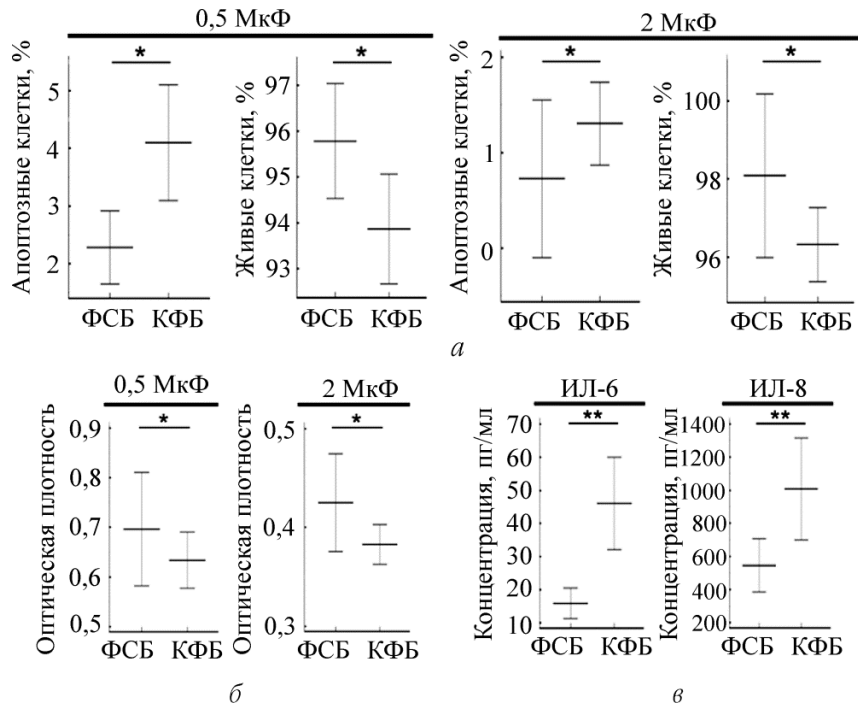


Рис. 2. Токсичность кальцийфосфатных бионов для эндотелиальных клеток *in vitro*: а – КФБ способны индуцировать апоптоз и снижать жизнеспособность клеток EA.hy 926 независимо от дозы; б – клетки EA.hy 926, экспонированные КФБ, менее жизнеспособны; в – экспозиция КФБ увеличивает синтез интерлейкина-6 и интерлейкина-8 клетками EA.hy 926; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

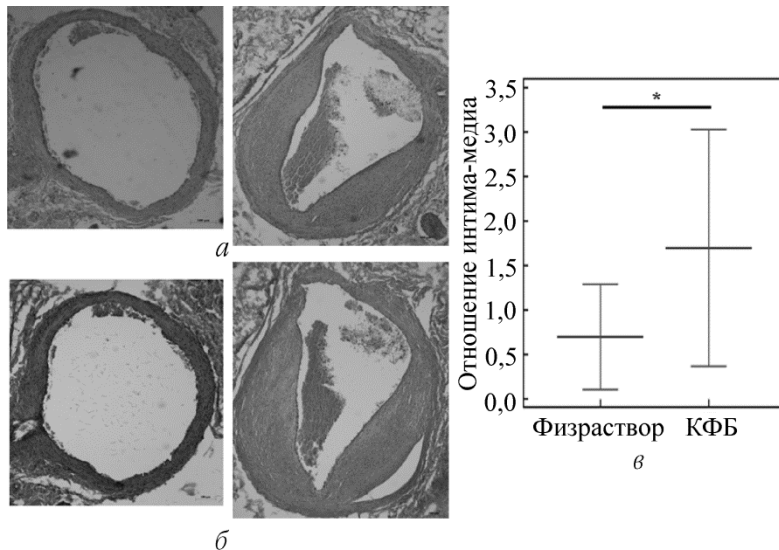


Рис. 3. Токсичность кальцийфосфатных бионов для эндотелиальных клеток *in vivo*: а – окраска гематоксилин-эозином показывает значительную гиперплазию интимы брюшной аорты крыс, экспонированных КФБ (справа), но не контрольных крыс (слева); б – окраска по ван Гизону также показывает значительную гиперплазию интимы брюшной аорты крыс, экспонированных КФБ (справа), но не контрольных крыс (слева); в – отношение интимы к медиэ выше в брюшной аорте крыс, экспонированных КФБ, в сравнении с контрольными крысами; \* $p < 0,05$

Таким образом, в данной работе показано, что КФБ обладают эндотелиотоксичностью. Они способствуют апоптозу и снижают жизнеспособность эндотелиальных клеток, индуцируют синтез интерлейкина-6 и интерлейкина-8, являющихся проатеросклеротическими цитокинами [2, 4], а также вызывают гиперплазию интимы *in vivo*. Эти эффекты могут быть обусловлены интернализацией данных частиц эндотелиальными клетками.

В то же время представленные эксперименты имеют ряд ограничений. Во-первых, клеточная линия EA.hy 926 является гибридной, которая была получена путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека с клетками аденокарциномы легкого линии A549 [3]. Хотя она сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека [3], это все же: 1) венозные, а не артериальные эндотелиальные клетки; 2) они потеряли способность синтезировать некоторые молекулы клеточной адгезии, что затрудняет оценку их секреторного профиля. В то же время у гибридомы есть как минимум одно преимущество: она значительно более резистентна к цитотоксическим агентам. Поэтому можно сделать вывод, что КФБ на самом деле обладают цитотоксическим действием. Во-вторых, возможно, что эндотелиотоксичность КФБ обусловлена обычным физическим повреждением клеточных мембран или органелл, которое может быть вызвано также и другими бионами. Хотя в теории это и возможно, не существует доказательств того, что атеросклероз может быть ассоциирован с перенасыщением элементами, отличными от кальция и фосфора. Поэтому включать другие бионы в дизайн данного исследования было нерелевантно.

Таким образом, все эксперименты подтверждают гипотезу о том, что КФБ оказывают токсические эффекты на эндотелиальные клетки, что, в свою очередь, определяет их патогенность, поскольку это одно из главных

звеньев в развитии атеросклероза [8]. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований [5, 7, 10, 11], которые обнаружили выраженную цитотоксичность КФБ для других клеточных линий. Кроме того, помимо прямой цитотоксичности, КФБ также способствуют выработке интерлейкина-6 и интерлейкина-8, которые известны как проатеросклеротические цитокины [2, 4]. Поэтому КФБ могут быть начальным триггером атеросклероза и способствовать развитию местного воспаления путем индукции синтеза проатеросклеротических цитокинов.

Будущие исследования по патогенности КФБ должны быть сфокусированы на их цитотоксических эффектах. В отношении эндотелиотоксичности было бы полезно исследовать этот механизм на артериальных эндотелиальных клетках для лучшего понимания: 1) влияния КФБ на секреторный профиль данных клеток; 2) путей апоптоза после экспозиции КФБ. Это может помочь в понимании развития атеросклероза, особенно его начального триггера. В то же время следует также сфокусироваться на других возможных механизмах патогенности КФБ, которыми могут быть прямая кальцификация и изменение конформации антикальцифицирующих белков.

## Выводы

1. КФБ интернализируются эндотелиальными клетками.
2. КФБ способствуют апоптозу и снижают жизнеспособность эндотелиальных клеток.
3. КФБ индуцируют синтез интерлейкина-6 и интерлейкина-8, являющихся проатеросклеротическими цитокинами.
4. КФБ вызывают гиперплазию интимы *in vivo*.
5. Таким образом, КФБ обладают токсическим действием на эндотелиальные клетки.



**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. *Кутихин А. Г., Великанова Е. А., Глушкова Т. В., Ефимова О. С., Попова А. Н., Мальшиева В. Ю., Владимиров А. А., Созинов С. А., Руссаков Д. М., Гутаковский А. К., Живодков Ю. А., Демидов Е. А., Пельтек С. Е., Долганюк В. Ф., Бабич О. О., Фралов А. В., Мухамадияров Р. А., Долгов В. Ю., Григорьев Е. В., Брусина Е. Б., Барбараиш О. Л.* Сходство минералоорганических наночастиц, выделенных из атеросклеротических бляшек, и искусственно синтезированных минерало-органических наночастиц. *Медицина в Кузбассе* 2015; 4: 57–63.

2. *Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D. A.* Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84: 353–360.

3. *Edgell C. J., McDonald C. C., Grabam J. B.* Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 3734–3737.

4. *Hartman J., Frishman W. H.* Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol. Rev.* 2014; 22: 147–151.

5. *Peng H. H., Wu C. Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D. M., Lee Y. H., Young J. D.*

Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small* 2013; 9: 2297–2307.

6. *Sin'kov M. A., Filip'ev D. E., Sevost'yanova V. V., Velikanova E. A., Burago A. S., Ganyukov V. I.* Experimental model of rat aorta angioplasty with a Paclitaxel releasing balloon catheter. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 156: 413–415.

7. *Smith E. R., Hanssen E., McMabon L. P., Holt S. G.* Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One* 2013; 8: e60904.

8. *Tabas I, García-Cardena G, Owens G. K.* Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell. Biol.* 2015; 209: 13–22.

9. *Wu C. Y., Young L., Young D., Martel J., Young J. D.* Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One* 2013; 8: e75501.

10. *Zhang M. J., Liu S. N., Xu G., Guo Y. N., Fu J. N., Zhang D. C.* Cytotoxicity and apoptosis induced by nanobacteria in human breast cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 2014; 9: 265–271.

11. *Zhang M., Yang J., Shu J., Fu C., Liu S., Xu G., Zhang D.* Cytotoxicity induced by nanobacteria and nanohydroxyapatites in human choriocarcinoma cells. *Nanoscale Res. Lett.* 2014; 9: 616.

Материал поступил в редакцию 28.09.2015