



УДК 577.11

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-2-60-71

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ ПО БИОХИМИЧЕСКИМ КОМПАРТМЕНТАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИНЕРАЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO* В КОНТЕКСТЕ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Д.К. Шишкова, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, Е.А. Торгунакова, Е.А. Кондратьев,
Ю.А. Дылева, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- В замкнутой альбуминсодержащей биохимической системе при моделировании супрафизиологического минерального стресса кальций распределяется по биохимическим компартментам в следующем соотношении: циркулирующие ионы (Ca^{2+}) – 50%, связанный с альбумином (КПМ) – 20%, связанный с фосфором (КПЧ) – 30%.
- Соотношение несвязанного (свободного, ионизированного) и связанного с белками или фосфором кальция составляет 1 : 1, что соответствует физиологическому соотношению ионизированного и связанного кальция в циркулирующей крови и свидетельствует о физиологической релевантности выполненного моделирования.
- Даже при супрафизиологическом минеральном стрессе естественные минеральные депо (КПМ и КПЧ) поддерживают кальцийсвязывающую способность биохимической системы на физиологическом уровне (50%), а соотношение относительной кальциевой емкости КПМ и КПЧ в условиях супрафизиологического минерального стресса указывает на приоритетную роль КПЧ как буферной системы, ограничивающей неконтролируемое повышение ионизированного кальция в случае нарушения минерального баланса крови.

Цель

Сравнительный анализ содержания кальция в составе различных биохимических компартментов: ионизированного (свободно циркулирующего, несвязанного) кальция, кальций-альбуминовых КПМ (белоксвязанного кальция) и фосфорнокальциевых комплексов (КПЧ).

Материалы и методы

С целью приготовления биохимической системы для параллельного синтеза КПМ и КПЧ моделировали супрафизиологический минеральный стресс путем перенасыщения солевого раствора NaCl, содержащего физиологическую концентрацию альбумина, ионами кальция (CaCl_2) и фосфора (Na_2HPO_4). Разделение кальцийсодержащих биохимических компартментов производили путем ультрацентрифугирования (для выделения КПЧ) и ультрафильтрации (для разделения КПМ и пула свободных ионов). Измерение концентрации кальция проводили колориметрическим методом на основе реакции ортокрезолфталейн-комплексона с ионами кальция в щелочной среде.

Результаты

При моделировании минерального стресса получена замкнутая биохимическая система, в которой ионы кальция были свободно распределены по трем состояниям: циркулируя в свободном виде (Ca^{2+}) либо находясь в составе КПМ (коллоидное первичное депо) или КПЧ (корпускулярное вторичное депо). Распределение кальция в виде свободно циркулирующих ионов (Ca^{2+}) и при связывании с альбумином (КПМ) и с фосфором (КПЧ) составляло 50 : 20 : 30% (5 : 2 : 3) соответственно. Соотношение ионизированного и связанного с белками или фосфором кальция составляло 1 : 1 и соответствовало физиологическому соотношению ионизированного и связанного кальция в циркулирующей крови, свидетельствуя о физиологической релевантности выполненного моделирования. Формирование КПЧ абсорбировало от 10 до 20% всего альбумина.

Заключение

Даже при супрафизиологическом минеральном стрессе естественные минеральные депо (КПМ и КПЧ) поддерживают кальцийсвязывающую способность

Для корреспонденции: Антон Геннадьевич Кутихин, antonkutikhin@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Anton G. Kutikhin, antonkutikhin@gmail.com; address: 6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

биохимической системы на физиологическом уровне (50%), а соотношение относительной кальциевой емкости КПМ и КПЧ в условиях супрафизиологического минерального стресса указывает на приоритетную роль КПЧ как буферной системы, ограничивающей неконтролируемое повышение ионизированного кальция в случае нарушения минерального баланса крови.

Ключевые слова Кальций • Ионизированный кальций • Кальципротеиновые мономеры • Кальципротеиновые частицы • Альбумин • Минеральный стресс • Дисфункция эндотелия

Поступила в редакцию: 08.04.2024; поступила после доработки: 14.05.2024; принята к печати: 09.06.2024

PATTERNS OF CALCIUM DISTRIBUTION BY BIOCHEMICAL SERUM COMPARTMENTS *IN VITRO* MODELING OF MINERAL STRESS IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

D.K. Shishkova, V.E. Markova, Yu.O. Markova, E.A. Torgunakova, E.A. Kondratiev, Yu.A. Dyleva, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

ORIGINAL STUDIES

Highlights

- When modeling mineral stress, a closed biochemical system shows the following calcium distribution ratio among biochemical compartments: freely circulating ions (Ca^{2+}) – 50%, bound to albumin (CPM) – 20%, bound to and phosphorus (CPC) – 30%.
- The ratio of ionized to protein- or phosphorus-bound calcium was 1:1 and corresponded to the physiological ratio of ionized to bound calcium in circulating blood, indicating the physiological relevance of the simulations performed.
- Even under supraphysiological mineral stress, natural mineral depots (CPM and HRC) maintain the calcium-binding capacity of the biochemical system at the physiological level (50%), and the ratio of the relative calcium capacity of the CPM and HRC under conditions of supraphysiological mineral stress indicates the priority role of the HRC as a buffer system limiting the uncontrolled increase in ionized calcium in case of disturbance of the mineral balance of the blood.

Aim	To conduct a comparative analysis of calcium content in various biochemical compartments: 1) ionized (freely circulating, unbound) calcium; 2) calcium-albumin CPM (protein-bound calcium); 3) calcium phosphorus complexes (CPC).
Methods	In order to prepare a biochemical system for the parallel synthesis of CPM and CPC, supraphysiological mineral stress was modeled by supersaturating a NaCl saline solution containing a physiological concentration of albumin with calcium (CaCl_2) and phosphorus (Na_2HPO_4) ions. Separation of calcium-containing biochemical compartments was carried out by ultracentrifugation (to isolate CPM) and ultrafiltration (to separate CPM and the pool of free ions). Calcium concentration was measured using a colorimetric method based on the reaction of orthocresolphthalein complexone with calcium ions in an alkaline medium.
Results	When modeling mineral stress, a closed biochemical system was obtained in which calcium ions were freely distributed in three states: circulating in free form (Ca^{2+}) or being part of the CPM (colloidal primary depot) or PSC (corpuscular secondary depot). The distribution of calcium in the form of freely circulating ions (Ca^{2+}) and when bound to albumin (CPM) and phosphorus (CPC) was 50%: 20%: 30% (5: 2: 3), respectively. The ratio of ionized to protein- or phosphorus-bound calcium was 1:1 and corresponded to the physiological ratio of ionized to bound calcium in circulating blood, indicating the physiological relevance of the simulations performed. The formation of HRC absorbed 10 to 20% of the total albumin.
Conclusion	Even under supraphysiological mineral stress, natural mineral depots (CPM and HRC) maintain the calcium-binding capacity of the biochemical system

at the physiological level (50%), and the ratio of the relative calcium capacity of the CPM and HRC under conditions of supraphysiological mineral stress indicates the priority role of the HRC as a buffer system limiting the uncontrolled increase in ionized calcium in case of disturbance of the mineral balance of the blood.

Keywords

Calcium • Ionized calcium • Calcioprotein monomers • Calcioprotein particles • Albumin • Mineral stress • Endothelial dysfunction

Received: 08.04.2024; received in revised form: 14.05.2024; accepted: 09.06.2024

Список сокращений

БСК – болезни системы кровообращения КПЧ – кальципротеиновые частицы
КПМ – кальципротеиновые мономеры

Введение

Минеральный стресс, проявляющийся высоким нормальным уровнем ионизированного кальция и фосфора (верхний квартиль значений) и низким нормальным уровнем кислых белков сыворотки (так называемых минеральных шаперонов, в первую очередь альбумина и фетуина-А, нижний квартиль значений), является независимым фактором сердечно-сосудистого риска [1, 2] и, по данным последних систематических обзоров и метаанализов, ассоциирован с риском развития инфаркта миокарда и ишемического инсульта [3–7]. Система поддержания минерального гомеостаза включает в себя целый ряд во многом независимых друг от друга механизмов: 1) кальцитропные факторы (паратиреоидный гормон, кальцитонин, 1,25-дигидроксивитамин D, ионизированный кальций), фосфотропные факторы (паратиреоидный гормон, 1,25-дигидроксивитамин D, FGF-23) и их рецепторы (PTHrP – рецептор к паратиреоидному гормону, CALCR – рецептор к кальцитонину, VDR – рецептор к 1,25-дигидроксивитамину D, CaSR – рецептор ионизированного кальция, Klotho – рецептор к FGF-23); 2) ионы магния, являющегося антагонистом кальция; 3) белки-регуляторы костной резорбции (RANK-лиганд, остеопротегерин); 4) ингибиторы кристаллизации фосфата кальция (остеопонтин, неорганический пирофосфат); 5) белки-скевенджеры ионизированного кальция (альбумин, остеоонектин и прочие кислые белки крови); 6) фетуин-А, который целесообразно вынести в отдельную группу, поскольку он, хотя и является ингибитором кристаллизации фосфата кальция по аналогии с остеопонтином и неорганическим пирофосфатом, представляет собой уникальный минеральный шаперон с двойным механизмом действия: формированием кальципротеиновых мономеров (КПМ) и кальципротеиновых частиц (КПЧ) [8, 9]. В КПЧ содержится около 50% циркулирующего кальция и фосфора крови, а также около 5–10% фетуина-А; КПМ содержат оставшиеся 50% циркулирующего кальция и фосфора крови и 90–95% фетуина-А [10, 11].

Из перечисленных механизмов поддержания

минерального гомеостаза регуляцию ионизированного кальция осуществляют кислые белки крови, называемые белками-скевенджерами или минеральными шаперонами, поскольку они обеспечивают физиологичное выведение кальция и фосфора из кровотока [12, 13], КПМ и КПЧ (также называемые в русскоязычной литературе кальций-фосфатными бионами). Целесообразным является выделение первичного кальциевого депо (белки-скевенджеры и КПМ), связывающего ионы кальция в коллоидном состоянии, и вторичного кальциевого депо (КПЧ), которые являются нерастворимыми и выпадают в осадок под действием силы тяжести. Для проведения экспериментов КПМ и КПЧ могут быть синтезированы искусственно путем перенасыщения белоксодержащего солевого раствора (как правило, хлорида натрия) или белоксодержащей культуральной среды ионами кальция и фосфора (в качестве донора ионов кальция используется кальций хлорид, в качестве донора фосфат-анионов – одно- или двухзамещенный гидрофосфат натрия либо их смесь). В качестве источника белка могут быть применены сыворотка крови (гетерогенная смесь различных белков), белки, которые могут быть в большом количестве выделены из сыворотки крови животных (к примеру, альбумин и фетуин-А), или рекомбинантные белки (в ограниченном количестве).

Ранее нашей группой показано, что именно низкая нормальная концентрация альбумина (нижний квартиль значений) является основной причиной повышения молярной концентрации ионизированного кальция (верхний квартиль значений) у пациентов с болезнями системы кровообращения (БСК) на фоне исходно сниженного содержания КПЧ в крови [2, 14]. Таким образом, причиной повышения молярной концентрации ионизированного кальция в крови пациентов с БСК является истощение как первичного депо ионов кальция (альбумин как один из двух наиболее важных белков-скевенджеров ионизированного кальция наряду с фетуином-А), так и вторичного их депо (способности крови к формированию кальципротеиновых частиц). Данная гипотеза подтверждается повышением преципитации КПЧ

из сыворотки крови пациентов с БСК в условиях ее перенасыщения ионами кальция и фосфора [2, 15]. В то же время количественная оценка второго компонента первичного депо ионов кальция (КПМ) у лиц с БСК и условно здоровых субъектов до настоящего времени не была проведена.

Выполненные ранее теоретические расчеты относительного содержания кальция в КПМ и КПЧ [10, 11], однако, так и не были подтверждены экспериментально. В данном исследовании была поставлена цель провести сравнительный анализ содержания кальция в составе различных биохимических компартментов: ионизированного (свободно циркулирующего, несвязанного) кальция, кальций-альбуминовых КПМ (белоксвязанного кальция) и фосфорнокальциевых комплексов (КПЧ). Для выполнения этой цели был смоделирован супрафизиологический минеральный стресс – искусственное перенасыщение кальцием и фосфором солевого раствора, содержащего физиологическую концентрацию альбумина.

Материалы и методы

Искусственный синтез КПМ и КПЧ

С целью приготовления биохимической системы для параллельного синтеза КПМ и КПЧ навеску в 0,34 г бычьего сывороточного альбумина (A3059, Sigma-Aldrich, США) аккуратно ресуспендировали в 4 мл стерильного физиологического раствора NaCl (154 ммоль/л, H-1401, Akzo Nobel Salts, Дания) и далее последовательно добавляли 2 мл раствора Na_2HPO_4 (24 ммоль/л, 94046, Sigma-Aldrich, США) и 2 мл раствора CaCl_2 (40 ммоль/л, 21115, Sigma-Aldrich, США) с аккуратным ресуспендированием после добавления каждого реактива. Итоговая концентрация альбумина в смеси составляла 42 мг/мл, CaCl_2 – 10 ммоль/л, Na_2HPO_4 – 6 ммоль/л, итоговая масса кальция – 3 200 мг. После этого смесь аликвотировали по 8 пробиркам типа эппендорф (по 1 мл смеси в каждом из эппендорфов), которые помещали в предварительно нагретый до 37 °С твердотельный термостат («Термит», ООО «ДНК-Технология», Россия) и инкубировали в течение 10 мин. В результате проведенной процедуры в рабочей смеси образовывались КПМ и КПЧ, а также оставались свободные ионы кальция, фосфора, натрия и хлора. Все указанные процедуры осуществляли в стерильных условиях (ламинарный шкаф для работы с клеточными культурами).

Далее рабочую смесь аликвотировали по четырем стерильным ультрацентрифужным пробиркам (по 2 мл на одну пробирку, 8 мл на цикл) и производили ультрацентрифугирование при $200\,000 \times g$ в течение часа при 4 °С. В результате данной процедуры осадок представлял собой сформированные КПЧ, а надосадок – КПМ и свободные ионы кальция, фосфора, натрия и хлора. Надосадок в объеме

8 мл переносили в новые пробирки типа эппендорф, а осадок (КПЧ) в каждой из четырех ультрацентрифужных пробирок ресуспендировали: в 100 мкл воды для инъекций (ООО «Гротекс», Россия) и далее сливали в одну пробирку типа эппендорф (таким образом, общий объем суспензии КПЧ в пробирке составлял 400 мкл) для последующей визуализации при помощи сканирующей электронной микроскопии либо в 100 мкл HCl (здесь и далее – 0,5 моль/л, 3.04.0390, ООО «Экротекс», Россия) и далее сливали в одну стеклянную пробирку (таким образом, общий объем суспензии КПЧ в пробирке составлял 400 мкл) для последующего определения концентрации кальция при помощи колориметрического анализа и расчета общей массы кальция в КПЧ. Измерение концентрации кальция проводили в тот же день во избежание испарения соляной кислоты и изменения объема исходного раствора для исключения погрешности при пересчете концентрации кальция в его общую массу в растворе.

Надосадок после ультрацентрифугирования в стерильных условиях (ламинарный шкаф для работы с клеточными культурами) тщательно ресуспендировали и аликвотировали из расчета 4 мл на один центрифужный концентратор с порогом отсеивания молекулярной массы (molecular weight cut-off, MWCO) 30 кДа (FTT130150, Jet Biofil, КНР), после чего забирали аликвоту объемом 100 мкл для последующего измерения концентрации альбумина и кальция. Концентраторы предварительно активировали 2 мл воды для инъекций при $1800 \times g$ в течение 15 мин на низкоскоростной настольной центрифуге (5804R, Eppendorf, Германия). Центрифугирование надосадка осуществляли при $1\,800 \times g$ в течение 25 мин (5804R, Eppendorf, Германия) при комнатной температуре. После этого 0,5 мл оставалось внутри концентратора (обессоленный ретенат, содержащий КПМ), а 3,5 мл – в центрифужной пробирке (фильтрат, содержащий свободные ионы кальция, фосфора, натрия и хлора). Количество повторностей в эксперименте составляло 16.

Сканирующая электронная микроскопия

Для визуализации синтезированных КПЧ при помощи сканирующей электронной микроскопии суспензию КПЧ из каждого синтеза разводили в воде для инъекций в 200 раз (5 мкл суспензии КПЧ + 995 мкл воды для инъекций) и визуализировали на сканирующем электронном микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме вторичных электронов с ускоряющим напряжением 10 кВ с увеличением в 30 000 крат.

Измерение концентрации кальция и альбумина в КПЧ, КПМ и пуле свободных ионов

Для измерения концентрации кальция в КПЧ ($n = 15$), надосадке (рабочая смесь КПМ и свободных

ионов после ультрацентрифугирования, $n = 15$), КПМ (ретентат после ультрафильтрации) и пуле свободных ионов (фильтрат после ультрафильтрации, $n = 15$) использовали различные разведения исходно получаемых растворов. Аликвоту КПЧ разводили в 30 (5 мкл раствора КПЧ в HCl + 145 мкл HCl), 60 (5 мкл раствора КПЧ в HCl + 295 мкл HCl) и 120 раз (5 мкл раствора КПЧ в HCl + 595 мкл HCl, аликвоту надосадка – в 5 раз (10 мкл надосадка + 40 мкл HCl), аликвоту КПМ – в 10 раз (5 мкл ретентата с КПМ + 45 мкл HCl), аликвоту пула свободных ионов – в 10 раз (10 мкл фильтрата с ионами + 90 мкл воды для инъекций). Колориметрическое определение концентрации кальция в КПЧ, надосадке, КПМ и пуле свободных ионов проводили при помощи оригинального набора CalciScore (Molecular Wings), основанного на реакции ортокрезолфталеинкомплексона с ионами кальция в щелочной среде ($\text{pH} = 10,6\text{--}10,8$). Измерение проводили на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) на длине волны 575 нм.

Для измерения концентрации альбумина в надосадке (рабочая смесь КПМ и свободных ионов после ультрацентрифугирования, $n = 15$), КПМ (ретентат после ультрафильтрации, $n = 15$) и пуле свободных ионов (фильтрат после ультрафильтрации, $n = 15$ в каждой группе) также использовали различные разведения исходно получаемых растворов. Аликвоту надосадка разводили в 40 раз (10 мкл надосадка + 390 мкл воды для инъекций), аликвоту КПМ – в 200 раз (10 мкл ретентата с КПМ + 1 990 мкл воды для инъекций), аликвоту пула свободных ионов дополнительно не разводили. После тщательного ресуспендирования 25 мкл из каждого разведения использовали в качестве образца при измерении концентрации альбумина колориметрическим ме-

тодом при помощи набора BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя. Измерение проводили на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) на длине волны 562 нм.

Результаты

При моделировании минерального стресса получена система, в которой ионы кальция были свободно распределены по трем состояниям: циркулируя в свободном виде (Ca^{2+}) либо находясь в составе КПМ (коллоидное первичное депо) или КПЧ (корпускулярное вторичное депо). После осаждения КПЧ путем ультрацентрифугирования при $200\,000 \times g$ в надосадке оставались КПМ, а также пул свободных ионов кальция, фосфора, натрия и хлора. Сканирующая электронная микроскопия КПЧ, сформированных при наличии в биохимической системе исключительно альбумина, продемонстрировала их губчатую структуру и неправильную форму (рис. 1), отличающуюся от сферической формы первичных КПЧ или веретеновидной формы вторичных КПЧ, формирующихся при циркуляции в крови. Эти данные совпадают с полученными нашей группой ранее [24] и, вероятно, обусловлены аддитивным или синергичным влиянием других кислых белков сыворотки на процесс формирования КПЧ. Следует отметить, что аналогичная картина наблюдалась при наличии в биохимической системе исключительно фетуина-А [24].

После ультрафильтрации в центрифужном концентраторе визуализировали концентрированную фракцию КПМ (ретентат светло-желтого цвета) и прозрачную фракцию свободных ионов кальция, фосфора, натрия и хлора (прозрачный фильтрат) (рис. 2). Таким образом, последовательные ультрацентрифугирование и ультрафильтрация позволили разделить все содержащие ионы кальция биохимические компартменты крови (свободно циркулирующие ионы, коллоидные КПМ и корпускулярные КПЧ).

Для измерения концентрации кальция в различных биохимических компартментах применен коло-

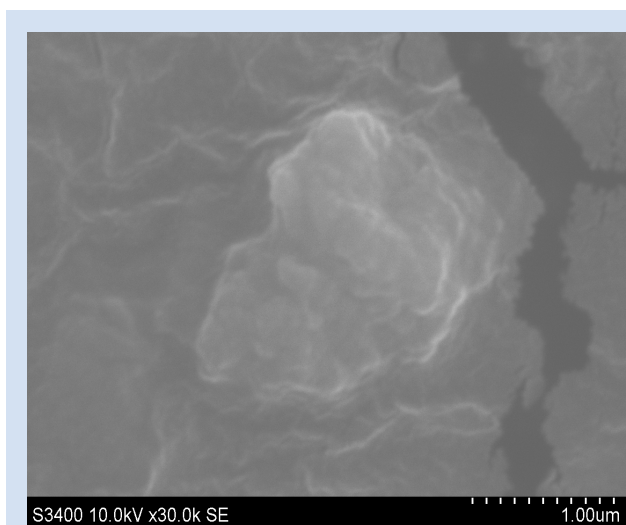


Рисунок 1. Визуализация КПЧ методом сканирующей электронной микроскопии. Режим вторичных электронов, ускоряющее напряжение – 10 кВ, увеличение – 30 000 крат, шкала масштаба – 1 мкм (цена деления – 100 нм)

Figure 1. Visualisation of calciprotein particles by scanning electron microscopy. Secondary electron mode, acceleration voltage: 10 kV, magnification: $\times 30\,000$, scale bar: 1 μm

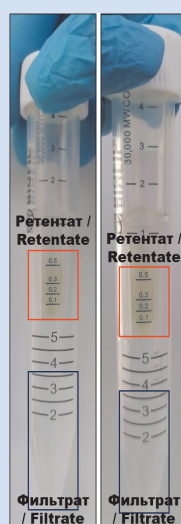


Рисунок 2. Визуализация КПМ (ретентат после ультрафильтрации, желтый цвет, обведен красным контуром) и пула свободных ионов (фильтрат после ультрафильтрации, прозрачный, обведен синим контуром). Центрифужные концентраторы с порогом отсеивания молекулярной массы (molecular weight cutoff, MWCO) в 30 000 Да (30 кДа)

Figure 2. Visualisation of calciprotein monomers (retentate after the ultrafiltration, demarcated by red contour) and free ion pool (filtrate after the ultrafiltration, transparent, demarcated by blue contour). Centrifugal concentrators have molecular weight cutoff (MWCO) of 30,000 Da (30 kDa)

риметрический метод на основе индикатора орто-крезолфталеинкомплексона, поскольку перевод содержащегося в КПЧ и КПМ кальция в ионизированную форму требует растворения КПЧ и КПМ (включая денатурацию альбумина в составе КПМ) при помощи сильной кислоты (к примеру, соляной), pH которой несовместим со стандартным измерением ионизированного кальция методом прямой потенциометрии. Колориметрический анализ содержания кальция в осажденных при помощи ультрацентрифугирования КПЧ и надосадке показал, что сформированные с участием альбумина КПЧ абсорбируют около 30% всех ионов кальция, в то время как в надосадке остается около 70% (табл. 1). Аналогичное измерение содержания кальция в разделенных при помощи ультрафильтрации КПМ (ретентате) и пуле свободных ионов (фильтрате) продемонстрировало, что в КПМ (то есть в связанном с альбумином виде) содержится около 20% от всего находившегося в биохимической системе кальция, тогда как в свободном виде – около 50% (табл. 1). Независимость полученных результатов от калибровочной кривой (при колориметрическом измерении использовалось два способа составления калибровочной кривой – долевым разбавлением и простым перекатом) подтвердила техническую валидность проведенных колориметрических измерений.

Таким образом, распределение кальция в замкнутой альбуминсодержащей биохимической системе в условиях моделирования супрафизиоло-

гического минерального стресса в виде свободно циркулирующих ионов (Ca^{2+}) и при связывании с альбумином (КПМ) и с фосфором (КПЧ) составляет 50 : 20 : 30% (5 : 2 : 3) соответственно (см. табл. 1). Иными словами, среди циркулирующих кровяных депо ионов кальция относительная емкость первичного депо (КПМ) составляет 40%, а вторичного депо (КПЧ) – 60%. Следует отметить, что данное распределение ионов кальция по биохимическим компартментам, выявленное экспериментальным путем, согласуется с физиологическим соотношением ионизированного и общего кальция, где отношение ионизированного кальция к связанному с белками и с фосфором также составляет приблизительно 1 : 1. Подобная сопоставимость результатов подтверждает физиологическую релевантность разработанной биохимической системы для моделирования минерального стресса.

Для того чтобы выявить долю агрегируемого в составе КПЧ альбумина, был проведен аналогичный сравнительный анализ содержания этого белка в биохимических компартментах после его измерения стандартным колориметрическим методом. Обнаружено, что в КПЧ содержится от 11 до 17% всего альбумина (при этом следует отметить, что количество формируемых КПЧ в условиях минерального стресса существенно выше, чем в физиологических условиях), в то время как от 83 до 89% альбумина остается в свободной циркуляции (табл. 2). Кроме того, измерение уровня альбумина в ретен-

Таблица 1. Сравнительный анализ содержания кальция в КПЧ, надосадке (рабочая смесь КПМ и свободных ионов после ультрацентрифугирования), КПМ (ретентат после ультрафильтрации) и пуле свободных ионов (фильтрат после ультрафильтрации)

Table 1. Analysis of calcium concentration in calcioprotein particles (CPPs), supernatant including calcioprotein monomers (CPM) and free ions, CPM (retentate after the ultrafiltration), and free ions (filtrate after the ultrafiltration)

Биохимический компартмент / Biochemical compartment	Сравнение КПЧ и надосадка / CPP and supernatant		Сравнение КПЧ, ретентата и фильтрата / CPPs, retentate, and filtrate		
	КПМ + свободные ионы / CPM + free ions	КПЧ / CPP	Свободные ионы / Free ions	КПМ / CPM	КПЧ / CPP
Содержание кальция (калибровочная кривая 1) / Calcium concentration (calibration curve 1), %	69	31	51	19	30
Содержание кальция (калибровочная кривая 2) / Calcium concentration (calibration curve 2), %	69	31	50	19	31

Примечание. Здесь и далее в табл. 2: КПМ – кальципротеиновые мономеры; КПЧ – кальципротеиновые частицы.
Note. Here and further in Table 2: CPM – calcioprotein monomers; CPP – calcioprotein particles.

Таблица 2. Сравнительный анализ содержания альбумина в КПЧ, надосадке (рабочая смесь КПМ и свободных ионов после ультрацентрифугирования), КПМ (ретентат после ультрафильтрации) и пуле свободных ионов (фильтрат после ультрафильтрации)

Table 2. Analysis of albumin concentration in calcioprotein particles (CPPs), supernatant including calcioprotein monomers (CPM) and free ions, CPM (retentate after the ultrafiltration), and free ions (filtrate after the ultrafiltration).

Биохимический компартмент / Biochemical compartment	Сравнение надосадка и КПЧ / CPP and supernatant		Сравнение КПЧ, ретентата и фильтрата / CPPs, retentate, and filtrate		
	КПМ + свободные ионы / CPM + free ions	КПЧ / CPP	Свободные ионы / Free ions	КПМ / CPM	КПЧ / CPP
Содержание альбумина / Albumin concentration, %	89	11	0	83	17

тате и фильтрате позволило подтвердить эффективность ультрафильтрации (прошедший через 30 кДа-размерные поры фильтрат не содержал альбумина, который полностью оставался в ретентате). Таким образом, даже в условиях супрафизиологического минерального стресса доля агрегируемого в КПЧ альбумина была сравнительно невелика и не противоречила выполнению этим белком своих физиологических функций, что также свидетельствовало о физиологической релевантности разработанной биохимической системы.

Обсуждение

Нарушения минерального гомеостаза являются распространенным фактором риска БСК, при этом выступая как в качестве независимого фактора риска [2, 14, 15], так и в качестве следствия хронической болезни почек, которая сама по себе вызывает дисфункцию эндотелия в результате патогенных эффектов повышения креатинина и мочевины в крови [16, 17]. Помимо воздействия ионизированного кальция, креатинина и мочевины в качестве фактора повреждения эндотелия следует выделить циркулирующие в крови КПЧ, которые способствуют провоспалительной дисфункции эндотелия в результате своей интернализации [2, 18, 19] и вызывают хроническое системное воспаление низкой интенсивности [20, 21], схожее с инфламэйджингом [22]. К патологическим последствиям интернализации циркулирующих КПЧ эндотелиальными клетками, моноцитами и макрофагами печени и селезенки следует отнести повышение концентрации провоспалительных цитокинов в крови, нарушение баланса между вазоконстрикцией и вазодилатацией вследствие снижения выделения вазодилаторов (в частности, монооксида азота NO), эндотелиально-мезенхимальный переход (потерю эндотелиальными клетками своего изначального фенотипа и трансдифференцировку в мезенхимальные клетки) и нарушения эндотелиальной механотрансдукции (трансформации механических сигналов потока в биохимические) [2, 18–21]. Из повышаемых при воздействии КПЧ цитокинов можно отметить эндотелиальные цитокины (интерлейкин-6, интерлейкин-8, хемоаттрактант моноцитов MCP-1/CCL2 и растворимую молекулу межклеточной адгезии sICAM-1) и моноцитарные цитокины (макрофагальные воспалительные белки MIP-1α и MIP-3α, цитокин-индуцированные хемоаттрактанты нейтрофилов CINC-1 и CINC-3, а также провоспалительный белок CXCL10) [21]. При этом хроническое системное воспаление низкой интенсивности само по себе является триггером дисфункции эндотелия [23], а дисфункция эндотелия, в свою очередь, вносит вклад в развитие системного воспалительного ответа [24], поэтому выделить относительный вклад эндотелиальных клеток и моно-

цитов (равно как и выделяемых ими специфических цитокинов) в развитие КПЧ-индуцированного воспаления представляется затруднительным.

Несмотря на изученность воздействия минерального стресса на развитие системного воспаления и доказательство дисфункции регуляции ионизированного кальция и формирования КПЧ у пациентов с БСК, вклад дисфункции различных кальцийсодержащих биохимических компартментов (циркулирующего ионизированного кальция, КПМ и КПЧ) в развитие минерального стресса и связанной с ним дисфункции эндотелия и системного воспалительного ответа остается неясным. В данной работе была поставлена задача изучить распределение кальция в вышеуказанных биохимических компартментах при моделировании минерального стресса *in vitro*.

При планировании работы были рассмотрены два подхода к проведению задуманного эксперимента: целостный (holistic approach) и фрагментарный (reductionist approach). Целостный подход заключался в добавлении сыворотки крови при искусственном синтезе для формирования КПМ и КПЧ, фрагментарный – в добавлении отдельных минеральных шаперонов (к примеру, альбумина или фетуина-А). Преимуществом целостного подхода является полное соответствие происходящему в сыворотке крови человека; преимуществом фрагментарного – возможность проанализировать минеральную емкость каждого из основных минеральных шаперонов в отдельности. Кроме того, целостный подход при добавлении к клеткам не позволяет дифференцировать минеральные шапероны от остальных белков с возможным патогенным эффектом (к примеру, глобулинов или цитокинов), в то время как фрагментарный подход такой проблемы лишен. Поэтому с учетом предполагаемого дальнейшего применения разрабатываемой системы одновременного синтеза КПМ и КПЧ *in vitro* для моделирования патологических процессов было решено использовать фрагментарный подход с альбумином (и планируемым дальнейшим применением фетуина-А) в качестве белка-скеванджера ионизированного кальция. Изначальный выбор был сделан в пользу альбумина вследствие: низкого нормального уровня этого кислого белка у пациентов с БСК, важности как одного из двух основных белков-скеванджеров ионизированного кальция (наряду с фетуином-А) и технического удобства использования в системе и отработки методики (поскольку альбумин в физиологической концентрации окрашивает смесь для синтеза в желтый цвет). Следует отметить, что выбор альбумина позволил устранить изначальный недостаток системы (синтезируемые КПЧ даже при низкоскоростном (до 2 000 × g) центрифугировании оседают на фильтры центрифужных концентраторов и блокируют даль-

нейшую фильтрацию, что выявляется отсутствием альбумина в ретентате) и модифицировать процесс разделения кальциевых депо посредством изначального ультрацентрифугирования смеси с осаждением всех КПЧ с последующим фракционированием КПМ и ионизированного кальция.

В проведенном исследовании продемонстрировано, что в замкнутой альбуминсодержащей биохимической системе распределение кальция в виде циркулирующих ионов (Ca^{2+}) в связанном с альбумином (КПМ) и фосфором (КПЧ) состоянии при моделировании супрафизиологического минерального стресса составляет 50 : 20 : 30% (5 : 2 : 3) соответственно. Таким образом, относительная кальциевая емкость альбумина как белка-сквенджера кальция и КПМ как первичного циркулирующего кровяного депо составила 40%, а относительная кальциевая емкость КПЧ как вторичного циркулирующего кровяного депо – 60%. Соотношение свободного (ионизированного, несвязанного) и связанного с белками или фосфором кальция в созданной биохимической системе составило 50 : 50% (1 : 1), что соответствует наблюдаемому в крови человека физиологическому соотношению и свидетельствует о физиологической релевантности проведенного эксперимента. Кроме того, данное наблюдение также сигнализировало о том, что даже при супрафизиологическом минеральном стрессе естественные минеральные депо (КПМ и КПЧ) поддерживают кальцийсвязывающую способность биохимической системы на физиологическом уровне (50%). Соотношение относительной кальциевой емкости КПМ и КПЧ в условиях супрафизиологического минерального стресса свидетельствовало о перенасыщении первичного депо ионов кальция (КПМ) с активным вовлечением вторичного депо ионов кальция (КПЧ), что указывает на приоритетную роль КПЧ как буферной системы, ограничивающей неконтролируемое повышение ионизированного кальция в случае нарушения минерального баланса крови. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о том, что соотношение кальция в КПЧ и КПМ в физиологических условиях составляет 1:1 [10, 11], что также указывает на то, что при минеральном стрессе и истощении возможности КПМ связывать свободный кальций избыточный кальций агрегируется именно в формирующихся КПЧ для предотвращения повышения молярной концентрации ионизированного кальция в крови до несовместимой с жизнью. Доля входящего в состав КПЧ альбумина составляла от 11 до 17%, что с учетом перенасыщения системы ионами кальция свидетельствовало о том, что формирование КПЧ является естественным процессом и даже при супрафизиологическом минеральном стрессе не ограничивает выполнение альбумином своих физиологических функций.

Следует отметить, что синтезированные КПЧ, по данным сканирующей электронной микроскопии, соответствовали полученным ранее кальций-альбуминовым частицам [24], что отражает адекватность проведенного моделирования физиологическим процессам. Перспективным направлением дальнейших исследований является повторение выполненного моделирования с заменой альбумина на фетуин-А – минеральный шаперон, позволяющий осуществлять более физиологичное моделирование КПМ и также обладающий высокой минеральной емкостью, несмотря на многократно меньшую концентрацию в крови в сравнении с альбумином (1 против 34 г/л альбумина). В качестве группы сравнения целесообразно использовать белок-сквенджер ионизированного кальция остеоонектин, обладающий более высокой аффинностью к ионизированному кальцию в сравнении с альбумином [1, 25]. Поскольку до настоящего времени экспериментального сравнения минеральной емкости альбумина, фетуина-А и остеоонектина проведено не было, сопоставление распределения кальция по биохимическим компартментам позволило бы выполнить адекватный анализ относительного вклада каждого из этих минеральных шаперонов в поддержание минерального гомеостаза. Кроме того, разработанную систему одновременного синтеза КПМ и КПЧ *in vitro* целесообразно применять и при сравнительном анализе минеральной емкости других белков-сквенджеров ионизированного кальция (к примеру, остеоонектина), что позволит улучшить понимание системы поддержания минерального гомеостаза в сыворотке крови человека.

Соотношение физиологической и патофизиологической значимости КПМ на данный момент остается неясным и требует последующих экспериментов. В частности, требуют изучения интернализация КПМ и их возможное воздействие на физиологию эндотелия с позиции основных критериев его дисфункции. Остается принципиальным вопрос, имеет ли значение для развития дисфункции эндотелия сам факт избыточного количества кальция или все же форма, в которой он поступает в клетку (в виде ионов, коллоидных КПМ или корпускулярных КПЧ), поскольку расчет дозы КПЧ в современных исследованиях патогенных эффектов КПЧ на эндотелий основан исключительно на измерении концентрации добавляемого кальция, а не на количественных, полуколичественных или качественных характеристиках добавляемых КПЧ. Разработанная система одновременного синтеза КПМ и КПЧ *in vitro* предоставляет платформу для подготовки подобных исследований, поскольку в данном случае КПМ и КПЧ синтезируются из одного источника и одновременно, а далее разделяются при помощи различных методов (ультрацентрифугирование и ультрафильтрация) с параллельным

обессоливанием в процессе ультрафильтрации (при таком фракционировании КПМ оказываются в ретентате, а ионизированный кальций – в фильтрате). Отдельной важной задачей является дифференциальное определение КПМ и КПЧ в образцах сыворотки крови, для чего целесообразно использовать флуоресцентно меченный бисфосфонат (IVISense Osteo 680) и проточную цитометрию с предварительной калибровкой по искусственно синтезированному при помощи такой системы (с использованием фетуина-А) КПМ и КПЧ и последующей кластеризации КПМ и КПЧ в сыворотке крови по предустановленным гейтам. Остается открытым вопрос о возможности селективного связывания КПМ и КПЧ различными флуоресцентными зондами. Если на стадии предварительной калибровки возможно осуществить мечение контрольных образцов КПМ и КПЧ различными зондами (поскольку коллоидный раствор КПМ и суспензия КПЧ будут находиться в различных аликвотах) для их разделения не только по светорассеянию, но и по длине волны флуоресцентного зонда, то осуществить их дифференциальное мечение в сыворотке крови и осуществлять таким образом их разделение за пределами возможностей оценки светорассеяния объективно представляется затруднительным.

Заключение

В замкнутой альбуминсодержащей биохимической системе при моделировании супрафизиологического минерального стресса кальций распределяется по биохимическим компартментам в следующем соотношении: циркулирующие ионы (Ca^{2+}) – 50%, связанный с альбумином (КПМ) – 20%, связанный с фосфором (КПЧ) – 30%. Соотношение несвязанного (свободного, ионизированного) и связанного с белками или фосфором кальция при этом составляет 1 : 1, что соответствует физиологи-

ческому соотношению ионизированного и связанного кальция в циркулирующей крови. Таким образом, даже при супрафизиологическом минеральном стрессе естественные минеральные депо (КПМ и КПЧ) поддерживают кальцийсвязывающую способность биохимической системы на физиологическом уровне (50%). Соотношение относительной кальциевой емкости КПМ и КПЧ в условиях супрафизиологического минерального стресса свидетельствовало о перенасыщении первичного депо ионов кальция (КПМ) с активным вовлечением вторичного депо ионов кальция (КПЧ), что указывает на приоритетную роль КПЧ как буферной системы, ограничивающей неконтролируемое повышение ионизированного кальция в случае нарушения минерального баланса крови. Формирование КПЧ даже в условиях супрафизиологического минерального стресса секвестрирует лишь незначительную долю альбумина (около 15%), что едва ли может ограничивать выполнение своих физиологических функций этим белком.

Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Торгунакова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Кондратьев заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.А. Дылева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00107, <https://rscf.ru/project/22-15-00107/>.

Информация об авторах

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Маркова Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5959-1699

Маркова Юлия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Author Information Form

Shishkova Daria K., PhD, Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Markova Victoria E., Junior Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5959-1699

Markova Yulia O., Junior Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Торгунакова Евгения Александровна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0005-0683-991X

Кондратьев Егор Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4326-7640

Дылева Юлия Александровна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6890-3287

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Torgunakova Evgeniya A., Junior Researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0005-0683-991X

Kondratiev Egor A., Junior Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4326-7640

Dyleva Yulia A., PhD, Researcher at the Laboratory of Homeostasis Research, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6890-3287

Kutikhin Anton G., PhD, Head of the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

ШДК – вклад в концепцию и дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МВЕ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МЮО – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ТЕА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КЕА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ДЮА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

ShDK – contribution to the concept and design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

MBE – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MYuO – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

TEA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KEA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

DYuA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kutikhin A.G., Feenstra L., Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Hillebrands J.L., Krenning G. Calciprotein Particles: Balancing Mineral Homeostasis and Vascular Pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(5):1607-1624. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315697.

2. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Bogdanov L.A., Sinitsky M.Y., Kostyunin A.E., Tsepokina A.V., Gruzdeva O.V., Mironov A.V., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Krivkina E.O., Matveeva V.G., Hryachkova O.N., Markova V.E., Dyleva Y.A., Belik E.V., Frolov A.V., Shabaev A.R., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Kolmykov R.P., Sevostyanov O.G.,

Russakov D.M., Dolganyuk V.F., Gutakovsky A.K., Zhivodkov Y.A., Kozhukhov A.S., Brusina E.B., Ismagilov Z.R., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G.. 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.

3. Ronit A., Kirkegaard-Klitbo D.M., Dohlmann T.L., Lundgren J., Sabin C.A., Phillips A.N., Nordestgaard B.G., Afzal S. Plasma Albumin and Incident Cardiovascular Disease: Results From the CGPS and an Updated Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(2):473-482. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313681.

4. Xie W.M., Ran L.S., Jiang J., Chen Y.S., Ji H.Y., Quan X.Q. 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.
5. Reid I.R., Gamble G.D., Bolland M.J. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. *J Intern Med.* 2016;279(6):524-40. doi: 10.1111/joim.12464.
6. Kobylecki C.J., Nordestgaard B.G., Afzal S. Plasma Ionized Calcium and Risk of Cardiovascular Disease: 106 774 Individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem.* 2021;67(1):265-275. doi: 10.1093/clinchem/hvaa245.
7. Campos-Obando N., Lahousse L., Brusselle G., Stricker B.H., Hofman A., Franco O.H., Uitterlinden A.G., Zillikens M.C. Serum phosphate levels are related to all-cause, cardiovascular and COPD mortality in men. *Eur J Epidemiol.* 2018;33(9):859-871. doi: 10.1007/s10654-018-0407-7.
8. Кутихин А.Г. Патофизиологическая и клиническая значимость нарушений минерального гомеостаза в контексте развития сердечно-сосудистых заболеваний. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2021. Т. 6. № 2. С. 82-102. doi: 10.23946/2500-0764-2021-6-1-82-102. [Kutikhin A.G. Pathophysiological and clinical significance of mineral homeostasis disorders in the development of cardiovascular disease. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2021;6(2):82-102. doi: 10.23946/2500-0764-2021-6-1-82-102. (In Russian)]
9. Bäck M., Aranyi T., Cancela M.L., Carracedo M., Conceição N., Leftheriotis G., Macrae V., Martin L., Nitschke Y., Pasch A., Quaglini D., Rutsch F., Shanahan C., Sorribas V., Szeri F., Valdivielso P., Vanakker O., Kempf H. 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.
10. Heiss A., Pipich V., Jahn-Dechent W., Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J.* 2010;99(12):3986-95. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.030.
11. Koepfert S., Ghallab A., Peglow S., Winkler C.F., Graeber S., Büscher A., Hengstler J.G., Jahn-Dechent W. Live Imaging of Calciprotein Particle Clearance and Receptor Mediated Uptake: Role of Calciprotein Monomers. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:633925. doi: 10.3389/fcell.2021.633925.
12. Heiss A., Eckert T., Aretz A., Richtering W., van Dorp W., Schäfer C., Jahn-Dechent W. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14815-25. doi: 10.1074/jbc.M709938200.
13. Jahn-Dechent W., Schäfer C., Ketteler M., McKee M.D. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(4):379-89. doi: 10.1007/s00109-007-0294-y.
14. Шишкова Д.К., Матвеева В.Г., Маркова В.Е., Хрячкова О.Н., Индукаева Е.В., Шабаетв 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. Т. 27. № 12. С. 20-31. doi: 10.15829/1560-4071-2022-5064.
15. Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Хрячкова О.Н., Фролов А.В., Шабаетв А.Р., Загородников Н.И., Маркова В.Е., Богданов Л.А., Осяев Н.Ю., Индукаева Е.В., Груздева О.В. Закономерности формирования кальций-фосфатных бионов у пациентов с каротидным и коронарным атеросклерозом. *Российский кардиологический журнал.* 2020. Т. 25. № 12. С. 39-48. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3881.
16. Harlacher E., Wollenhaupt J., Baaten C.C.F.M.J., Noels H. Impact of Uremic Toxins on Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):531. doi: 10.3390/ijms23010531.
17. Roumeliotis S., Mallamaci F., Zoccali C. Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update. *J Clin Med.* 2020;9(8):2359. doi: 10.3390/jcm9082359.
18. Shishkova D., Markova V., Sinitsky M., Tsepokina A., Velikanova E., Bogdanov L., Glushkova T., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8802. doi: 10.3390/ijms21228802.
19. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pysnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep.* 2016;6:27255. doi: 10.1038/srep27255.
20. Feenstra L., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Buikema H., Zeper L.W., Bourgonje A.R., Krenning G., Hillebrands J.L. Calciprotein Particles Induce Endothelial Dysfunction by Impairing Endothelial Nitric Oxide Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(3):443-455. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318420.
21. Shishkova D., Lobov A., Zainullina B., Matveeva V., Markova V., Sinitskaya A., Velikanova E., Sinitsky M., Kanonykina A., Dyleva Y., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.
22. Ferrucci L., Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2.
23. Liberale L., Montecucco F., Tardif J.C., Libby P., Camici G.G. Inflamm-ageing: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.
24. Gu S.X., Tyagi T., Jain K., Gu V.W., Lee S.H., Hwa J.M., Kwan J.M., Krause D.S., Lee A.I., Halene S., Martin K.A., Chun H.J., Hwa J. Thrombocytopathy and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(3):194-209. doi: 10.1038/s41569-020-00469-1.
25. Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T., Jahn-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13333-41. doi: 10.1074/jbc.M210868200.

REFERENCES

1. Kutikhin A.G., Feenstra L., Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Hillebrands J.L., Krenning G. Calciprotein Particles: Balancing Mineral Homeostasis and Vascular Pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(5):1607-1624. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315697.
2. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Bogdanov L.A., Sinitsky M.Y., Kostyunin A.E., Tsepokina A.V., Gruzdeva O.V., Mironov A.V., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Krivkina E.O., Matveeva V.G., Hryachkova O.N., Markova V.E., Dyleva Y.A., Belik E.V., Frolov A.V., Shabaev A.R., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Kolmykov R.P., Sevostyanov O.G., Russakov D.M., Dolganyuk V.F., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Kozhukhov A.S., Brusina E.B., Ismagilov Z.R., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. 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.
3. Ronit A., Kirkegaard-Klitbo D.M., Dohmann T.L.,

- Lundgren J., Sabin C.A., Phillips A.N., Nordestgaard B.G., Afzal S. Plasma Albumin and Incident Cardiovascular Disease: Results From the CGPS and an Updated Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(2):473-482. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313681.
4. Xie W.M., Ran L.S., Jiang J., Chen Y.S., Ji H.Y., Quan X.Q. 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.
5. Reid I.R., Gamble G.D., Bolland M.J. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. *J Intern Med.* 2016;279(6):524-40. doi: 10.1111/joim.12464.
6. Kobylecki C.J., Nordestgaard B.G., Afzal S. Plasma Ionized Calcium and Risk of Cardiovascular Disease: 106 774 Individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem.* 2021;67(1):265-275. doi: 10.1093/clinchem/hvaa245.
7. Campos-Obando N., Lahousse L., Brusselle G., Stricker B.H., Hofman A., Franco O.H., Uitterlinden A.G., Zillikens M.C. Serum phosphate levels are related to all-cause, cardiovascular and COPD mortality in men. *Eur J Epidemiol.* 2018;33(9):859-871. doi: 10.1007/s10654-018-0407-7.
8. Kutikhin A.G. Pathophysiological and clinical significance of mineral homeostasis disorders in the development of cardiovascular disease. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2021;6(2):82-102. doi: 10.23946/2500-0764-2021-6-1-82-102. (In Russian)
9. Bäck M., Aranyi T., Cancela M.L., Carracedo M., Conceição N., Leftheriotis G., Macrae V., Martin L., Nitschke Y., Pasch A., Quaglini D., Rutsch F., Shanahan C., Sorribas V., Szeri F., Valdivielso P., Vanakker O., Kempf H. 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.
10. Heiss A., Pipich V., Jahn-Dechent W., Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J.* 2010;99(12):3986-95. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.030.
11. Koepfert S., Ghallab A., Peglow S., Winkler C.F., Graeber S., Büscher A., Hengstler J.G., Jahn-Dechent W. Live Imaging of Calciprotein Particle Clearance and Receptor Mediated Uptake: Role of Calciprotein Monomers. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:633925. doi: 10.3389/fcell.2021.633925.
12. Heiss A., Eckert T., Aretz A., Richtering W., van Dorp W., Schäfer C., Jahn-Dechent W. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14815-25. doi: 10.1074/jbc.M709938200.
13. Jahn-Dechent W., Schäfer C., Ketteler M., McKee M.D. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(4):379-89. doi: 10.1007/s00109-007-0294-y.
14. 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. (In Russian)
15. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Khryachkova O.N., Frolov A.V., Osyaev N.Yu., Indukaeva E.V., Gruzdeva O.V., Shabaev A.R., Zagorodnikov N.I., Markova V.E., Bogdanov L.A. Formation of calcium phosphate bions in patients with carotid and coronary atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology.* 2020;25(12):3881. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3881 (In Russian)
16. Harlacher E., Wollenhaupt J., Baaten C.C.F.M.J., Noels H. Impact of Uremic Toxins on Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):531. doi: 10.3390/ijms23010531.
17. Roumeliotis S., Mallamaci F., Zoccali C. Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update. *J Clin Med.* 2020;9(8):2359. doi: 10.3390/jcm9082359.
18. Shishkova D., Markova V., Sinitsky M., Tsepokina A., Velikanova E., Bogdanov L., Glushkova T., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Endothelial Dysfunction under Flow. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8802. doi: 10.3390/ijms21228802.
19. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep.* 2016;6:27255. doi: 10.1038/srep27255.
20. Feenstra L., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Buikema H., Zeper L.W., Bourgonje A.R., Krenning G., Hillebrands J.L. Calciprotein Particles Induce Endothelial Dysfunction by Impairing Endothelial Nitric Oxide Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023;43(3):443-455. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318420.
21. Shishkova D., Lobov A., Zainullina B., Matveeva V., Markova V., Sinitskaya A., Velikanova E., Sinitsky M., Kanonykina A., Dyleva Y., Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.
22. Ferrucci L., Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2.
23. Liberale L., Montecucco F., Tardif J.C., Libby P., Camici G.G. Inflamm-ageing: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.
24. Gu S.X., Tyagi T., Jain K., Gu V.W., Lee S.H., Hwa J.M., Kwan J.M., Krause D.S., Lee A.I., Halene S., Martin K.A., Chun H.J., Hwa J. Thrombocytopathy and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(3):194-209. doi: 10.1038/s41569-020-00469-1.
25. Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T., Jahn-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13333-41. doi: 10.1074/jbc.M210868200.

Для цитирования: Шишкова Д.К., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Торгунакова Е.А., Кондратьев Е.А., Дылева Ю.А., Кутихин А.Г. Закономерности распределения кальция по биохимическим компартментам сыворотки крови при моделировании минерального стресса *in vitro* в контексте дисфункции эндотелия. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(2): 60-71. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-2-60-71

To cite: Shishkova D.K., Markova V.E., Markova Yu.O., Torgunakova E.A., Kondratiev E.A., Dyleva Yu.A., Kutikhin A.G. Patterns of calcium distribution by biochemical serum compartments *in vitro* modeling of mineral stress in endothelial dysfunction. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(2): 60-71. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-2-60-71