



ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ, КАЛЬЦИПРОТЕИНОВЫХ МОНОМЕРОВ И КАЛЬЦИПРОТЕИНОВЫХ ЧАСТИЦ НА ПЕРВИЧНЫЕ АРТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Д.К. Шишкова, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, Е.А. Великанова, А.В. Синицкая,
М.Ю. Синицкий, А.Е. Тюрина, А.Д. Степанов, Ю.А. Дылева, В.Г. Матвеева, А.Г. Кутихин
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Ке-
мерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Для повышения молярной концентрации ионизированного кальция в бессывороточной среде для культивирования эндотелиальных клеток и сыворотке крови крыс Wistar на 10% (в 1,1 раза) с целью моделирования «высокого нормального» уровня ионизированного кальция необходимо добавлять 10 мкг кальция (к примеру, используя хлорид кальция в виде донора Ca^{2+}) на 1 мл среды или сыворотки.
- Добавление ионизированного кальция и кальципротеиновых мономеров в концентрации 10 мкг/мл не вызывает патологических эффектов в культурах первичных артериальных эндотелиальных клеток, при этом кальципротеиновые мономеры интернализируются эндотелиальными клетками по аналогии с кальципротеиновыми частицами.
- Добавление кальципротеиновых частиц к первичным эндотелиальным клеткам коронарной артерии человека в концентрации 10 мкг/мл вызывает их провоспалительную активацию, которая проявляется повышением экспрессии генов молекул адгезии лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1* и *SELE* и генов провоспалительных цитокинов *IL6*, *CXCL8* и *CXCL1*.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель

Сравнительный анализ патологических эффектов различных форм кальция, добавленных к эндотелиальным клеткам в равной концентрации в виде ионов кальция, кальципротеиновых мономеров (КПМ) и кальципротеиновых частиц (КПЧ).

Материалы и методы

Искусственный синтез КПМ и КПЧ проводили путем перенасыщения солевого раствора NaCl, содержащего физиологическую концентрацию альбумина, ионами кальция (используя в качестве донора катиона кальция CaCl_2) и фосфора (используя в качестве донора фосфат-анионов Na_2HPO_4). Разделение КПМ и КПЧ производили последовательно путем ультрацентрифугирования (для выделения КПЧ) и ультрафильтрации (для разделения КПМ и свободных минеральных ионов). Измерение концентрации кальция в КПМ и КПЧ проводили колориметрическим методом на основе реакции ортокрезолфалеинкомплексона с ионами кальция в щелочной среде. Анализ интернализации флуоресцентно меченных КПМ и КПЧ эндотелиальными клетками проводили после их совместной одночасовой инкубации в системе пульсирующего потока при помощи конфокальной микроскопии. Ионизированный кальций (в виде CaCl_2), КПМ и КПЧ добавляли к конфлюэнтным первичным культурам эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий ($n = 6$ лунок на группу) в концентрации 10 мкг/мл (моделируя повышение молярной концентрации ионизированного кальция на 10%). Через 24 ч проводили анализ генной экспрессии методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции.

Результаты

В течение часа циркуляции в пульсирующем потоке КПМ и КПЧ интернализовались эндотелиальными клетками. Добавление ионизированного кальция и кальципротеиновых мономеров в концентрации 10 мкг/мл не вызывало патологических эффектов в культурах артериальных эндотелиальных клеток, в то время как добавление кальципротеиновых частиц в указанной концентрации вызывало повышение экспрессии генов молекул адгезии лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1* и *SELE* и генов провоспалительных цитокинов *IL6*, *CXCL8* и *CXCL1* в первичных эндотелиальных клетках коронарной артерии.

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; 6 Barbarash Boulevard, Kemerovo, Russian Federation, 650002

Заключение	Поскольку дисфункцию эндотелия в физиологической концентрации вызывали исключительно КПЧ, а не КПМ или свободные ионы кальция, можно сделать вывод о том, что патологические эффекты кальция в значительной степени определяются формой его добавления, а не только добавляемой концентрацией.
Ключевые слова	Кальций • Ионизированный кальций • Кальципротеиновые мономеры • Кальципротеиновые частицы • Минеральный стресс • Эндотелиальные клетки • Дисфункция эндотелия

Поступила в редакцию: 07.04.2024; поступила после доработки: 17.05.2024; принята к печати: 26.06.2024

PATHOLOGICAL EFFECTS OF IONIZED CALCIUM, CALCIPROTEIN MONOMERS AND CALCIPROTEIN PARTICLES ON ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS

D.K. Shishkova, V.E. Markova, Y.O. Markova, E.A. Velikanova, A.V. Sinitskaya, M.Yu. Sinitsky, A.E. Tyurina, A.D. Stepanov, Yu.A. Dyleva, V.G. Matveeva, A.G. Kutikhin
Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- To achieve a 10% (i.e., 1.1-fold) increase in ionized calcium level in the serum-free cell culture medium and Wistar rat serum, 10 µg/mL calcium (e.g. with CaCl₂) should be added; this corresponds to the upper quartile of ionized calcium in the human population.
- Incubation with ionized calcium or calciprotein monomers (10 µg/mL calcium) does not induce any pathological effects in primary arterial endothelial cells, although calciprotein monomers are internalised by endothelial cells similar to calciprotein particles.
- Incubation of primary human coronary artery endothelial cells with calciprotein particles (10 µg/mL calcium) triggers an increased expression of *VCAM1*, *ICAM1*, and *SELE* genes (i.e., those encoding cell adhesion molecules) as well as *IL6*, *CXCL8*, and *CXCL1* genes (i.e., those encoding pro-inflammatory cytokines), together indicating endothelial activation.

Aim	To compare the pathological effects of ionized calcium, calciprotein monomers (CPMs), and calciprotein particles (CPPs) after their addition to endothelial cells.
Methods	CPMs and CPPs were synthesized by the supersaturation of albumin-supplemented NaCl solution with calcium (by adding CaCl ₂) and phosphate ions (by adding Na ₂ HPO ₄). CPMs and CPPs were separated by sequential ultracentrifugation (to isolate CPPs) and ultrafiltration (to separate CPMs and free mineral ions). Calcium concentration in CPMs and CPPs was measured by an o-cresolphthalein complexone-based colorimetric assay. Internalization of fluorescent-labeled CPMs and CPPs by endothelial cells was interrogated by confocal microscopy after their 1-hour co-incubation under flow. Primary coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells were incubated with ionized calcium (CaCl ₂), CPMs, or CPPs (10 µg/mL calcium) upon reaching confluence (n = 6 wells per group) to simulate a 10% increase in ionized calcium concentration. After 24 hours, we collected RNA and analyzed the gene expression pattern by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.
Results	CPMs and CPPs were internalized by endothelial cells as soon as after 1 hour of co-incubation under flow. Treatment with ionized calcium or CPMs (10 µg/mL calcium) did not cause any pathological effects in arterial endothelial cells. In contrast, CPPs promoted an expression of <i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , and <i>SELE</i> genes (i.e., those encoding cell adhesion molecules) as well as <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , and <i>CXCL1</i> genes (i.e., those encoding pro-inflammatory cytokines) in primary human coronary artery endothelial cells, together indicating their pro-inflammatory activation.
Conclusion	Pathological effects of calcium stress are defined by the calcium source and not simply by its concentration.
Keywords	Calcium • Ionized calcium • Calciprotein monomers • Calciprotein particles • Mineral stress • Endothelial cells • Endothelial dysfunction

Received: 07.04.2024; received in revised form: 17.05.2024; accepted: 26.06.2024

Список сокращений

КПЧ – кальципротеиновые частицы ЭК – эндотелиальные клетки
КПМ – кальципротеиновые мономеры

Введение

Кальципротеиновые частицы (КПЧ) являются универсальным инструментом регуляции минерального гомеостаза, агрегируя избыточные ионы кальция и фосфора и таким образом препятствуя развитию внескелетной кальцификации [1–3]. Несмотря на физиологическую значимость как депо циркулирующих ионов кальция, КПЧ также обладают и патологическими эффектами, вызывая дисфункцию эндотелия после своей интернализации [4–9]. Пациенты с болезнями системы кровообращения характеризуются повышенной молярной концентрацией как общего, так и ионизированного кальция (Ca^{2+}) независимо от остальных биохимических параметров [10–13], а также повышенной склонностью сыворотки крови к преципитации КПЧ в условиях минерального стресса на фоне сниженных концентраций белка-сквенджера альбумина и исходной концентрации самих КПЧ [14, 15], что свидетельствует об истощении циркулирующих кальциевых депо. Ранее показано, что сниженная концентрация белков-сквенджеров кальция альбумина и фетуина-А также ассоциирована с повышенным риском острых сердечно-сосудистых событий [16–18]. В совокупности эти данные свидетельствуют о минеральном стрессе как о самостоятельном факторе сердечно-сосудистого риска.

В последние годы внимание исследователей привлекли так называемые кальципротеиновые мономеры (КПМ), в которых по теоретическим оценкам содержится около половины циркулирующего кальция и более 90% фетуина-А крови [19, 20]. КПМ представляют собой кластеры кислых белков сыворотки крови и фосфата кальция с диаметром 9–10 нм, циркулирующие в коллоидном виде и неспособные к осаждению в отличие от корпускулярных КПЧ, диаметр которых варьирует от 50 до 200 нм [19, 20]. Кроме того, КПМ являются аморфным фосфатом кальция и предположительно могут диссоциировать, в то время как КПЧ состоят из покрытого белками крови нерастворимого карбонат-гидроксиапатита [19, 20]. Таким образом, целесообразно выделить четыре формы циркулирующего в крови кальция: 1) ионизированный (свободный или несвязанный) кальций (Ca^{2+}); 2) ионы кальция, связанные с белками-сквенджерами; 3) кальций в составе КПМ; 4) кальций в составе КПЧ. На долю первой фракции (Ca^{2+}) приходится около половины общего кальция крови, в то время как три остальные фракции включают кальций, связанный с белками и/или фосфором. Следует отметить, что за исключением фетуина-А роль

остальных кислых белков сыворотки (в частности альбумина) в формировании КПМ не была показана, однако они принимают активное участие в образовании КПЧ [6] и, следовательно, могут взаимодействовать с фосфатом кальция, а не только с его ионами.

За исключением КПЧ влияние всех остальных указанных форм циркулирующего кальция на развитие дисфункции эндотелия остается неясным. Молярная концентрация Ca^{2+} является одной из наиболее жестко регулируемых в организме человека констант (доказательством чему является такое количество соответствующих буферных систем крови в дополнение к костному депо), поэтому при исследованиях патологических эффектов кальция *in vitro* и *in vivo* целесообразно моделировать именно «высокий нормальный» уровень кальция, примерно соответствующее верхнему квартилю в популяции (то есть повышение от уже имеющегося не более чем на 10%). В настоящее время расчет дозы добавляемых КПЧ основывается именно на концентрации добавляемого *in vitro* или *in vivo* кальция, однако остается неясным, определяются ли патогенные эффекты кальциевого стресса исключительно массой поступающего в клетку кальция или также его формой (Ca^{2+} , КПМ или КПЧ). Кроме того, остается не вполне понятным, могут ли в принципе эндотелиальные клетки (ЭК) поглощать циркулирующие в кровотоке КПМ по аналогии с КПЧ, поскольку связывание КПЧ с мембраной ЭК и их последующая интернализация в значительной степени обусловлены связыванием КПЧ со специфическими сквенджер-рецепторами [20–22].

В данном исследовании была поставлена цель оценить интернализацию КПМ и КПЧ ЭК в условиях пульсирующего потока, а также исследовать патогенные эффекты добавления равных концентраций кальция в виде Ca^{2+} и в составе КПМ и КПЧ к культурам первичных артериальных ЭК в контексте развития дисфункции эндотелия.

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, США) 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 – 3200 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», «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 выполнения 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: 1) либо в 100 мкл воды для инъекций («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; 2) либо в 100 мкл HCl (здесь и далее 0,5 моль/л, 3.04.0390, «Экротекс», Россия) и далее сливали в одну стеклянную пробирку (таким образом, общий объем суспензии КПЧ в пробирке составлял 400 мкл) для последующего анализа 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 отсечения молекулярной массы (molecular weight cut-off, MWCO) 30 кДа (FTT130150, Китай). 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 ретентат, содержащий КПМ), а 3,5 мл – в центрифужной пробирке (фильтрат, содержащий свободные ионы кальция, фосфора, натрия и хлора). Количество повторностей в эксперименте составляло 16.

Измерение концентрации кальция и альбумина в КПМ и КПЧ

Для измерения концентрации кальция в КПЧ ($n = 15$) и КПМ (ретентат после ультрафильтрации) 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 (5 мкл раствора КПЧ в HCl + 595 мкл HCl) раз, аликвоту КПМ – в 10 раз (5 мкл ретентата с КПМ + 45 мкл HCl). Колориметрическое определение концентрации кальция в КПЧ, КПМ и контрольном растворе CaCl_2 (0,2 ммоль/л) проводили при помощи оригинального набора CalciScore (Molecular Wings), основанного на реакции ортокрезолфталейнкомплексона с ионами кальция в щелочной среде ($\text{pH} = 10.6 - 10.8$). Измерение проводили на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) на длине волны 575 нм.

Для измерения концентрации альбумина в КПМ (ретентат после ультрафильтрации, $n = 15$) аликвоту КПМ разводили в 200 раз (10 мкл ретентата с КПМ + 1 990 мкл воды для инъекций) и использовали 25 мкл из данного разведения в качестве образца при измерении концентрации альбумина колориметрическим методом 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.

Культивирование эндотелиальных клеток

Для экспериментов использовали коммерческие культуры первичных ЭК коронарной артерии (300K-05a, Cell Applications, США) и первичных ЭК внутренней грудной артерии (308K-05a, Cell Applications, США) человека. Все эксперименты по воздействию КФБ на ЭК проводили строго параллельно на обеих клеточных линиях для повышения воспроизводимости и достоверности полученных результатов. Согласно информации поставщика, первичные ЭК человека были получены из здоровых артерий доноров (первичные ЭК коронарной артерии человека – мужчина, 27 лет; первичные ЭК внутренней грудной артерии человека – мужчина, 50 лет) с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (212K-500, Cell Applications, США)), содер-

жашей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения экспериментов ЭК размораживали и культивировали во флаконах T-75 (N-708003, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd, США) согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток EndoBoost (Molecular Wings). Пересев производили по достижении 80% конфлюэнтности. После двух пассажей и достижения 100% конфлюэнтности во флаконе T-75 ЭК рассевали в проточные культуральные камеры (80126, Ibidi, Германия) из расчета один флакон T-75 на 6 камер либо в 6-луночные плоскодонные культуральные планшеты (N-703001, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd, США) из расчета один флакон T-75 на 2 планшета и культивировали до достижения 100% конфлюэнтности. Все эксперименты с ЭК проводили в стерильных условиях при 37 °C, поддержании атмосферы 95% воздуха: 5% CO₂ и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo, Япония).

Подбор дозы добавляемого к эндотелиальным клеткам кальция

Подбор дозы осуществляли путем добавления 5, 10, 15, 20, 25 или 37,5 мкг кальция (в составе CaCl₂), растворенного в водном растворе альбумина с концентрацией 300 мг/мл (средняя концентрация альбумина в ретентате), на 1 мл бессывороточной культуральной среды для ЭК EndoLife (Molecular Wings) или добавления 8, 10, 12,5, 15, 20, 40, 60, 80, 100 или 150 мкг кальция, растворенного в водном растворе альбумина с концентрацией 300 мг/мл (средняя концентрация альбумина в ретентате), на 1 мл сыворотки крысы Wistar (Molecular Wings) с последующим тщательным ресуспендированием, инкубацией смеси в течение часа и последующим измерением молярной концентрации Ca²⁺ (Konelab 70i) в сравнении с контрольной средой EndoLife или сывороткой крысы без добавления CaCl₂. Для последующих экспериментов использовалась доза кальция, повышающая молярную концентрацию Ca²⁺ в бессывороточной культуральной среде для ЭК (EndoLife) или в сыворотке крысы на 10% (в 1,1 раза), поскольку именно такое повышение (на 0,10–0,14 ммоль/л, в среднем 0,12 ммоль/л) составляет межквартильный интервал (разницу между верхним и нижним квартилями) по Ca²⁺ у здоровых людей, пациентов с инфарктом миокарда и ишемическим инсультом [4, 15]. Как указано выше, субъекты с верхним квартилем по молярной концентрации Ca²⁺ имеют повышенный риск развития острых сердечно-сосудистых событий в сравнении с таковыми с нижним квартилем [4, 13, 15].

Анализ интернализации КПМ и КПЧ эндотелиальными клетками

С целью анализа интернализации КПЧ и КПМ ЭК проводили мечение КПЧ и КПМ флюоресце-

ин-5-изотиоцианат (ФИТЦ)-меченным альбумином: в процессе синтеза (добавляя к смеси 750 мкг ФИТЦ-меченного альбумина в концентрации 5 мкг/мкл, A23015, Thermo Fisher Scientific, США) либо после синтеза путем инкубации осажденных КПЧ со 125 мкг (25 мкл) ФИТЦ-меченного альбумина и последующей инкубации 500 мкл ретентата (КПМ) с 250 мкг (50 мкл) ФИТЦ-меченного альбумина после их перемешивания.

При использовании первого подхода (с инкорпорацией ФИТЦ-меченного альбумина в КПМ и КПЧ в процессе их синтеза) искусственный синтез проводился не ранее чем за 24 ч до эксперимента и при отсутствии прямого воздействия света для минимизации снижения интенсивности ФИТЦ со временем. Осадок КПЧ дополнительно ресуспендировали в 1,5 мл физиологического раствора NaCl и центрифугировали при 13 000 × g (Microfuge 20R, Beckman Coulter, США) в течение 10 мин для отмывки КПЧ от несвязавшегося ФИТЦ-меченного альбумина. Осадок КПЧ повторно ресуспендировали в 400 мкл стерильного физиологического раствора NaCl. Ретентат от несвязавшегося ФИТЦ-меченного альбумина не отмывали ввиду технической невозможности осуществления этого процесса.

При использовании второго подхода (с инкубацией уже синтезированных КПЧ и КПМ с ФИТЦ-меченным альбумином) инкубация КПЧ или КПМ с ФИТЦ-меченным альбумином длилась в течение часа при 4 °C без доступа света. После инкубации КПЧ осаждали посредством центрифугирования при 13 000 × g (Microfuge 20R, Beckman Coulter, США) в течение 10 мин при 4 °C, ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора NaCl и повторно центрифугировали при 13 000 × g (Microfuge 20R, Beckman Coulter, США) в течение 10 мин для отмывки КПЧ от несвязавшегося ФИТЦ-меченного альбумина. Осадок КПЧ повторно ресуспендировали в 400 мкл стерильного физиологического раствора NaCl. Измерение концентрации кальция и белка в полученных образцах ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ проводили в день их синтеза по указанным выше протоколам.

Для моделирования пульсирующего ламинарного потока (15 дин/см²) применяли систему Ibidi Pump System Quad (Ibidi, Германия) и набор коннекторов для перфузии (Perfusion Set Yellow/Green, 10964, Ibidi, Германия). Первичные ЭК коронарной артерии и внутренней грудной артерии человека, предварительно культивированные до 100% конфлюэнтности в проточные камеры (350 000 клеток на проточную камеру, 80126, Ibidi, Германия), прекоинкубировали ламинарным потоком (15 дин/см²) в бессывороточной обогащенной факторами роста культуральной среде EndoLife (Molecular Wings) в течение 24 ч. Далее в систему добавляли ФИТЦ-КПЧ и ФИТЦ-КПМ (10 мкг

кальция на 1 мл среды, всего 150 мкг кальция на один модуль системы пульсирующего потока, то есть на одну проточную камеру). Первый запуск системы проводился с КПМ и КПЧ, в которые ФИТЦ-меченный альбумин был инкорпорирован в процессе их синтеза, второй запуск – с КПМ и КПЧ, которые были инкубированы с ФИТЦ-меченным альбумином после синтеза, третий запуск – с контрольными клетками, к которым добавляли КПМ и КПЧ без мечения ФИТЦ. Продолжительность инкубацииЭК с КПМ и КПЧ в системе пульсирующего потока составляла один час. Контрастирование ядер проводили с использованием красителя Hoechst 33342 (2 мкг/мл, H3570, Thermo Fisher Scientific, США), разбавленного в бессывороточной культуральной среде EndoLife, в течение 5 мин. Визуализацию КПМ и КПЧ в живыхЭК выполняли после тщательной отмывки в свободной от красителя бессывороточной культуральной среде EndoLife с использованием конфокальной микроскопии (LSM 700, Carl Zeiss, Германия).

Анализ ответа эндотелиальных клеток на добавление Ca^{2+} , КПМ и КПЧ

Для изучения реакцииЭК на инкубацию с равными концентрациями Ca^{2+} , КПМ и КПЧ к предварительно высаженным в 6-луночные плоскостные культуральные планшеты (N-703001, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd, США) первичнымЭК коронарной и внутренней грудной артерий добавляли Ca^{2+} (в виде смеси CaCl_2), КПМ или КПЧ в дозировке 10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды EndoLife (20 мкг кальция на лунку 6-луночного планшета, $n = 6$ лунок на группу) и проводили инкубацию в течение 24 ч. Во все лунки также добавлялось соответствующее средней концентрации альбумина в ретентате количество альбумина (12 мг) во избежание нивелирования возможных протективных эффектов данного белка. В качестве контрольной группы использовали клетки, к которым добавляли аналогичный объем фосфатно-солевого буфера по Дульбекко (DPBS) без кальция и магния (1.2.4.7., «БиолоТ», Россия). Замену сывороточной культуральной среды на бессывороточную (EndoLife) для наращивания клеточной массы (EndoBoost) осуществляли непосредственно перед проведением эксперимента. После 24-часовой инкубации с избыточной дозой кальция проводили микрофотосъемку клеток при помощи фазово-контрастной микроскопии, культуральную среду отбирали, центрифугировали при $2000 \times g$ для осаждения клеточного дебриса и замораживали при -80°C , клетки промывали ледяным (4°C) раствором DPBS без кальция и магния (1.2.4.7., «БиолоТ», Россия) и лизировали монофазным водным раствором фенола и гуанидин-изотиоцианата для выделения РНК ExtractRNA (BC032,

«Евроген», Россия).

Обратную транскрипцию выделенной РНК выполняли с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, США). Измерение генной экспрессии проводили при помощи количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) с использованием самостоятельно разработанных праймеров (500 нмоль/л каждый, «Евроген», Россия; табл. 1), кДНК (20 нг) и мастер-микса PowerUp SYBR Green (A25778, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя для $T_m \geq 60^\circ\text{C}$ (стандартные настройки амплификатора). Для каждой биологической повторности ($n = 6$, по числу лунок в каждой планшете) при измерении уровня генной экспрессии выполняли три технических повторности. Реакцию считали успешно проведенной при эффективности 90–105% и $R_2 \geq 0,98$. Количественный анализ уровней мРНК в лизатеЭК человека (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *NOS3*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *KLF2*, *KLF4*, *NFE2L2*) выполняли с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Такой набор генов позволил оценить провоспалительную активацию эндотелия (гены рецепторовЭК для лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP*), синтез провоспалительных цитокиновЭК (гены провоспалительных цитокинов *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF*), синтез эндотелиальной NO-синтазы (ген *NOS3*), развитие эндотелиально-мезенхимального перехода (гены транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1*) и развитие нарушений эндотелиальной механотрансдукции (гены механочувствительных транскрипционных факторов *KLF2*, *KLF4* и *NFE2L2*). Уровни транскриптов пересчитывали относительно экспрессии референсных генов (*ACTB*, *GAPDH* и *B2M*) и относительно группы сравнения (контрольные клетки, к которым добавляли DPBS без кальция и магния) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Данные представляли в виде среднего арифметического и стандартного отклонения от среднего. Статистическую значимость различий между группами оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением различий между экспериментальными группами и контрольной группой по критерию Даннета.

Результаты

Для расчета физиологически релевантной дозы добавляемого в культуральную среду кальция проведен эксперимент и построена кривая зависимости процента повышения молярной концентрации Ca^{2+} (относительно контрольной среды без добавления кальция) от концентрации кальция, добавляемого в среду в составе CaCl_2 . Расчеты показали, что иско-

мое повышение молярной концентрации Ca^{2+} на 10% в бессывороточной культуральной среде для ЭК достигалось посредством добавления кальция в концентрации 10 мкг/мл (рис. 1). Аналогичный результат продемонстрирован и в результате оценки концентрации кальция, необходимой для достижения искомого повышения (на 10%) молярной концентрации Ca^{2+} в сыворотке крысы (10 мкг/мл, рис. 2). Таким образом, для проведения экспериментов по оценке интернализации КПМ и КПЧ ЭК, а также по анализу патогенных эффектов добавляемого в различных формах (Ca^{2+} , КПМ и КПЧ) кальция на ЭК была выбрана концентрация в 10 мкг/мл.

Далее проанализирована возможность интернализации КПМ ЭК в условиях потока. Для иден-

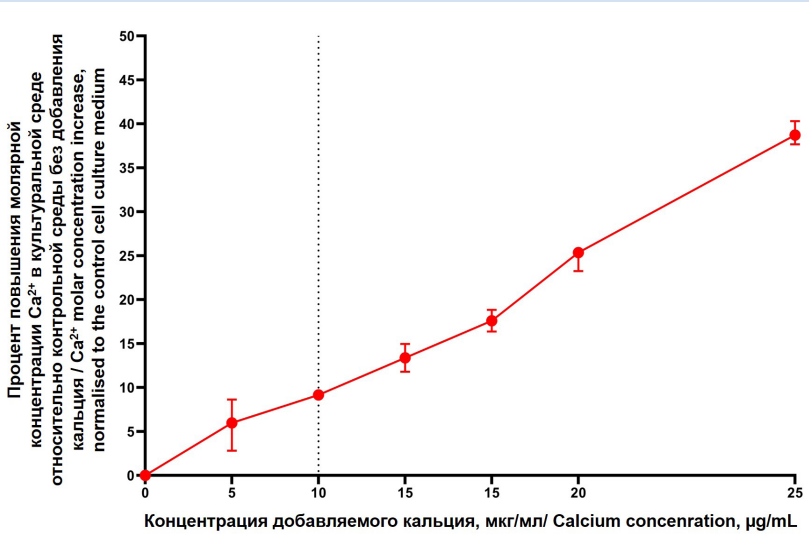


Рисунок 1. Подбор дозы кальция, добавляемого в культуральную среду для ЭК. Повышение молярной концентрации Ca^{2+} на 10% достигалось посредством добавления 10 мкг кальция на 1 мл культуральной среды
Figure 1. Measurement of ionized calcium (Ca^{2+}) increment in endothelial cell culture medium upon the calcium supersaturation provided by calcium chloride addition. 10% Ca^{2+} increment is achieved by the addition of 10 µg calcium per 1 mL cell culture medium

Таблица 1. Последовательности праймеров для ОТ-кПЦР
Table 1. Primer sequences for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Ген / Gene	Форвард-праймер / Forward primer	Реверс-праймер / Reverse primer
Провоспалительная активация эндотелия / Pro-inflammatory endothelial activation		
<i>VCAM1</i>	5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3'	5'-ACATTCATATACTCCCGCATCCTTC-3'
<i>ICAM1</i>	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
<i>SELE</i>	5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3'	5'-ACCTCACCAAACCCTTCG-3'
<i>SELP</i>	5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3'	5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3'
<i>IL6</i>	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>CXCL8</i>	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCTTTAGCACTCCTTGGC-3'
<i>CCL2</i>	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3'
<i>CXCL1</i>	5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
<i>MIF</i>	5'-GGTGTCGAGAAGTCAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3'
Синтез монооксида азота (NO) / Nitric oxide biosynthesis		
<i>NOS3</i>	5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3'	5'-CCGAGCCCCGAACACACAGAAC-3'
Развитие эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial-to-mesenchymal transition		
<i>SNAIL</i>	5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3'	5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'
<i>SNAIL2</i>	5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3'	5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'
<i>TWIST1</i>	5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3'	5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'
<i>ZEB1</i>	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'	5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT-3'
Нарушения эндотелиальной механотрансдукции / Impaired endothelial mechanotransduction		
<i>KLF2</i>	5'-CAGCACTGGTCTGGTTGCTTG-3'	5'-ACCCACTGCACACGATGCTT-3'
<i>KLF4</i>	5'-GAAAAGGACCGCCACCCACA-3'	5'-AGCGGGCGAATTTCCATCCA-3'
<i>NFE2L2</i>	5'-GCACATCCAGTCAGAAACCACT-3'	5'-ACTGAAACGTAGCCGAAGAAAC-3'
Гены «домашнего хозяйства» / Housekeeping genes		
<i>ACTB</i>	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'	5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>B2M</i>	5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3'	5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'

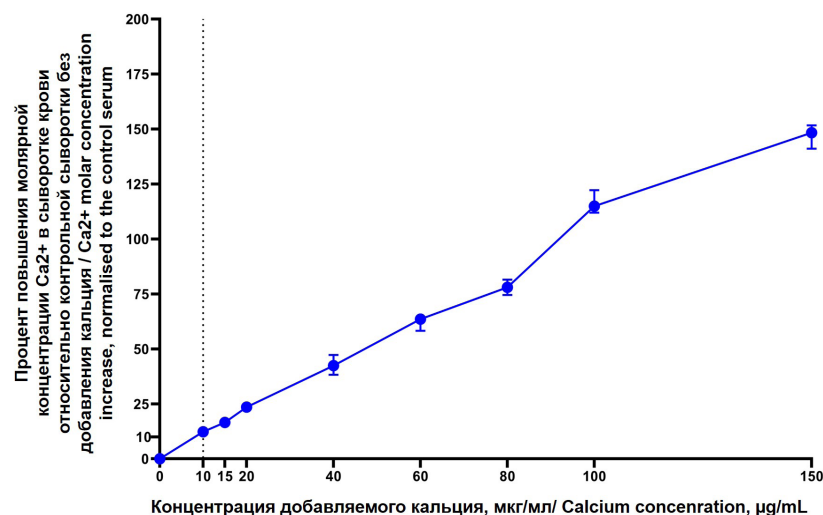


Рисунок 2. Подбор дозы кальция, добавляемого к сыворотке крысы. Повышение молярной концентрации Ca^{2+} на 10% достигалось посредством добавления 10 мкг кальция на 1 мл сыворотки крысы

Figure 2. Measurement of ionized calcium (Ca^{2+}) increment in the rat serum upon the calcium supersaturation provided by calcium chloride addition. 10% Ca^{2+} increment is achieved by the addition of 10 µg calcium per 1 mL rat serum

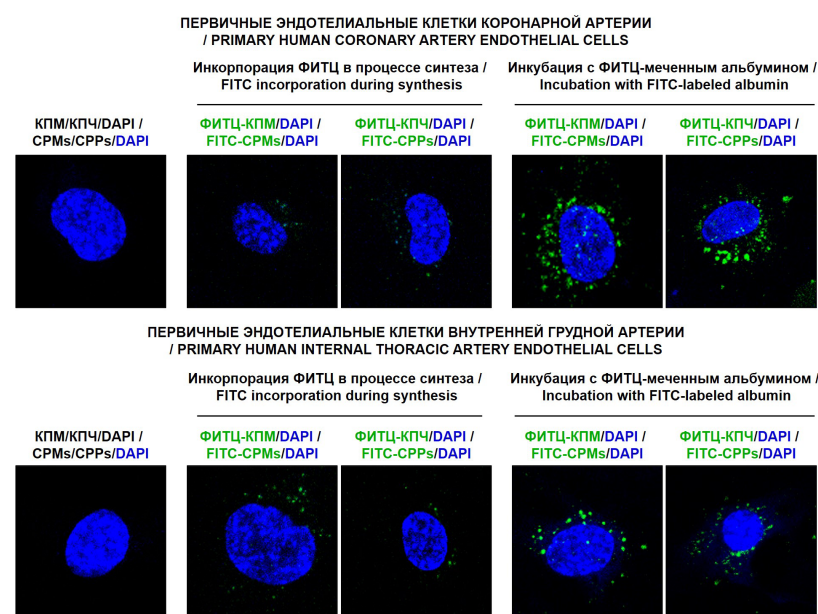


Рисунок 3. Визуализация интернализации меченных флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ)-меченным альбумином кальципротеиновых мономеров (ФИТЦ-КПМ) и кальципротеиновых частиц (ФИТЦ-КПЧ) первичными ЭК коронарной артерии (сверху) и внутренней грудной артерии (снизу). Слева: контрольные клетки с добавлением КПМ и КПЧ в отсутствие мечения ФИТЦ-меченным альбумином. В центре: интернализация ЭК ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ, в которые ФИТЦ-меченный альбумин был инкорпорирован в процессе их синтеза. Справа: интернализация ЭК ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ, инкубированных с ФИТЦ-меченным альбумином после их синтеза. Ядра контрастированы 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Конфокальная микроскопия, увеличение $\times 400$

Figure 3. Internalization of fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin-labeled calcein protein monomers (FITC-CPMs) and calcein protein particles (FITC-CPPs) by primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC, top) and primary human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC, bottom). Left: cells treated with unlabeled CPMs and CPPs; center: cells treated with CPMs and CPPs which incorporated FITC-labeled albumin during their synthesis; right: cells treated with CPMs and CPPs which were co-incubated with FITC-labeled albumin after their synthesis. Nuclei are counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Confocal microscopy, $\times 400$ magnification

тификации этого феномена использован ФИТЦ-меченный альбумин, инкорпорированный в ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ при их синтезе или адгезированный к ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ после их синтеза. ФИТЦ-КПЧ использованы как группа положительного контроля, поскольку возможность интернализации КПЧ ЭК в условиях потока была показана ранее [5, 8]. В качестве отрицательного контроля использованы КПЧ и КПМ, не меченные ФИТЦ. Конфокально-микроскопический анализ, проведенный через час после совместной инкубации ЭК с ФИТЦ-меченными КПМ и ФИТЦ-меченными КПЧ в условиях потока, продемонстрировал флуоресцентное свечение внутри инкубированных с ФИТЦ-КПМ и ФИТЦ-КПЧ ЭК и отсутствие такового свечения в ЭК, инкубированных с КПМ и КПЧ без мечения ФИТЦ (рис. 3). При адгезии ФИТЦ-меченного альбумина к КПМ и КПЧ после их синтеза в цитозоле клеток наблюдалось значительно более яркое свечение в сравнении с инкорпорацией ФИТЦ-меченного альбумина в КПМ и КПЧ в процессе их синтеза. Интенсивность и объем свечения между КПМ и КПЧ не различались, что свидетельствовало о близкой аффинности и avidности ФИТЦ-меченного альбумина к КПМ и КПЧ (см. рис. 3).

При добавлении к первичным ЭК коронарной и внутренней грудной артерий равной концентрации кальция (10 мкг/мл) в форме Ca^{2+} , КПМ и КПЧ при помощи фазово-контрастной микроскопии выявлено патологическое изменение морфологии ЭК (рис. 4).

Соответствующие дисфункции эндотелия молекулярные изменения наблюдались исключительно в ЭК, к которым добавляли КПЧ (табл. 2). В частности, в первичных ЭК коронарной артерии человека наблюдалось

повышение экспрессии генов провоспалительных молекул, отвечающих за адгезию лейкоцитов (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) и генов провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8* и *CXCL1*, см. табл. 2). Несмотря на то что в ЭК внутренней грудной артерии определена тенденция аналогичного повышения уровня генной экспрессии, статистической значимости они не достигли. Следует также отметить компенсаторное повышение гена атеропротективного транскрипционного фактора эндотелиальной механотрансдукции *KLF4* (см. табл. 2). Изменения в ЭК при воздействии Ca^{2+} и КПМ носили стохастический характер, не достигали статистической значимости и не указывали на развитие дисфункции эндотелия.

Обсуждение

В настоящее время активно исследуется двоякая роль КПЧ как «обоюдоострого меча»: с одной стороны, они являются неотъемлемой частью системы поддержания минерального гомеостаза и буфером избыточного ионизированного кальция, с другой – интернализуются артериальными ЭК [4–6, 8], ЭК синусоидных капилляров печени [20, 22], моноцитами [8], а также резидентными макрофагами печени [20–22] и селезенки [21], вызывая дисфункцию эндотелия [4–9], которая также может быть более выраженной при наличии у пациента коморбидных патологий. Тем не менее циркулирующие депо ионов кальция не ограничиваются КПЧ и также включают в себя КПМ и кислые белки-скеванджеры ионов кальция [19, 20]. При этом роль самих белков-скеванджеров, за исключением фетуина-А, в формировании КПМ остается не вполне ясной, однако формирование КПЧ с их участием позволяет предположить, что по меньшей мере некоторые из них (к примеру, альбумин) также способны формировать КПМ.

Общепринятым принципом расчета дозы КПЧ для *in vitro* или *in vivo* экспериментов является оценка содержащегося в них кальция, поскольку биохимической основой патогенных эффектов корпускулярных КПЧ является именно кальциевый стресс [4, 7, 20–22]. С этой точки зрения представляет интерес анализ вероятных патогенных эффектов находящихся в коллоидном состоянии КПМ и свободных ионов Ca^{2+} в сравнении с КПЧ при добавлении равной концентрации кальция. Следует отметить, что в данных экспериментальных условиях к раствору CaCl_2 (донору ионов Ca^{2+}) и суспензии КПЧ также должен добавляться белок, при помощи которого синтезированы КПМ (так как белок является неотъемлемой частью этих коллоидных кальций-белковых комплексов); в данном исследовании таким белком стал альбумин. Выбор альбумина как белка для модельного синтеза КПМ был сделан вследствие связи «низкой нормальной» концентрации этого белка в сыворотке крови с развитием острых сердечно-сосудистых событий [15, 17, 18], а также отрицательной корреляционной связи между концентрацией альбумина и интенсивностью преципитации КПЧ из сыворотки крови в условиях минерального стресса [15]. Кроме того, концентрация альбумина положительно коррелирует с исходной концентрацией КПЧ и молярной концентрацией общего кальция в сыворотке крови, что также подтверждает важность этого белка для формирования КПЧ и поддержания минерального гомеостаза [14].

Принципиальным аспектом проведения исследования по сравнительному анализу патогенных эффектов равной концентрации различных форм кальция (Ca^{2+} , КПМ и КПЧ) также является достижение именно «высокой нормальной», а не патологически повышенной молярной концентрации Ca^{2+} , поскольку данный параметр является одним

из наиболее жестко регулируемых в организме человека во избежание развития несовместимых с жизнью нарушений ритма, а также внескелетной кальцификации [9]. По ранее полученным нашей группой данным, различие между протективным нижним квартилем и рисковым верхним квартилем молярной концентрации Ca^{2+} составляет от 0,10 до 0,14 ммоль/л, или около 10% от его референсной концентрации в крови (1,16–1,32 ммоль/л). Поэтому именно повышение исходной концентрации Ca^{2+} в бессывороточной среде для культивирования эндотели-

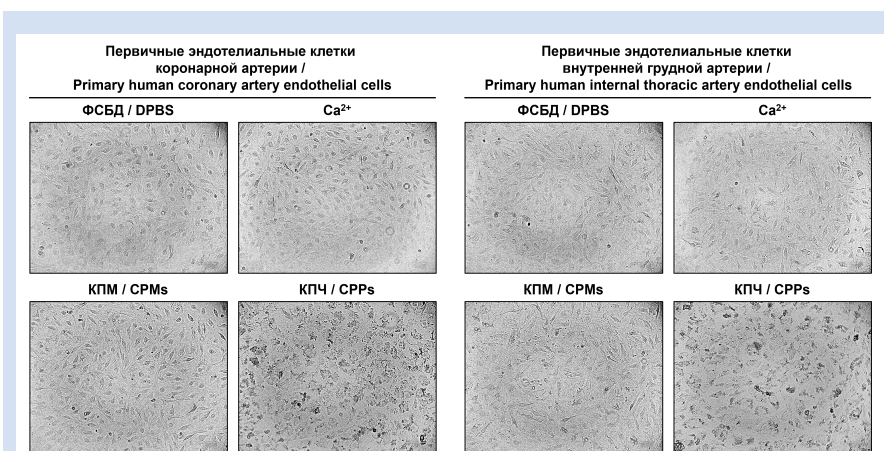


Рисунок 4. Фазово-контрастная микроскопия первичных ЭК коронарной артерии (слева) и внутренней грудной артерии (справа), инкубированных с контрольным фосфатно-солевым буфером, Ca^{2+} , КПМ или КПЧ

Figure 4. Phase contrast microscopy of primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC, left) and primary human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC, right) which were incubated with control phosphate-buffered saline, ionized calcium (Ca^{2+}), calcein protein monomers (CPMs), or calcein protein particles (CPPs)

Таблица 2. Относительный уровень экспрессии генов (Δ Ct, верхняя строка ячейки каждого гена), кратности изменения экспрессии (средняя строка ячейки каждого гена) и статистическая значимость различий (значение p, нижняя строка ячейки каждого гена) генов, кодирующих провоспалительные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*), эндотелиальную синтазу монооксида азота (*NOS3*), транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) и транскрипционные факторы эндотелиальной механотрансдукции (*KLF2*, *KLF4*, *NFE2L2*). Значимые кратности изменения выделены жирным шрифтом

Table 2. Relative level of gene expression (Δ Ct, top string within each line), fold change (middle string within each line), and p value (bottom string within each line) in genes encoding pro-inflammatory cell adhesion molecules (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*), endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*), endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*), and endothelial mechanotransduction transcription factors (*KLF2*, *KLF4*, *NFE2L2*). Significant fold change values are marked bold

Ген / Gene	Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека / Primary human coronary artery endothelial cells				Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека / Primary human internal thoracic artery endothelial cells			
	DPBS	Ca2+	КПМ / CPMs	КПЧ / CPPs	DPBS	Ca2+	КПМ / CPMs	КПЧ / CPPs
VCAM1	0,00034 ± 0,00069	0,00012 ± 0,00007	0,00018 ± 0,00007	0,0014 ± 0,0009	0,0003 ± 0,0002	0,0010 ± 0,0011	0,0006 ± 0,0004	0,0009 ± 0,0007
	1	0,353	0,529	4,118	1	3,333	2,000	3,000
	1,00	0,850	0,931	0,012	1,00	0,187	0,797	0,298
ICAM1	0,0152 ± 0,0078	0,0371 ± 0,0220	0,0113 ± 0,0035	0,1167 ± 0,0887	0,0333 ± 0,0220	0,0495 ± 0,0342	0,0401 ± 0,0251	0,0430 ± 0,0208
	1	2,441	0,743	7,678	1	1,486	1,204	1,291
	1,00	0,748	0,998	0,003	1,00	0,581	0,942	0,856
SELE	0,0048 ± 0,0012	0,0088 ± 0,0037	0,0018 ± 0,0005	0,0131 ± 0,0064	0,0591 ± 0,0367	0,1035 ± 0,1418	0,0909 ± 0,1282	0,0939 ± 0,0919
	1	1,833	0,375	2,729	1	1,751	1,538	1,589
	1,00	0,179	0,402	0,003	1,00	0,817	0,920	0,899
SELP	0,0070 ± 0,0057	0,0026 ± 0,0007	0,0013 ± 0,0005	0,0021 ± 0,0012	0,0008 ± 0,0005	0,0053 ± 0,0061	0,0055 ± 0,0054	0,0024 ± 0,0031
	1	0,371	0,186	0,300	1	6,625	6,875	3,000
	1,00	0,049	0,009	0,026	1,00	0,210	0,188	0,869
IL6	0,0165 ± 0,0123	0,0057 ± 0,0020	0,0067 ± 0,0044	0,1194 ± 0,0881	0,0084 ± 0,0044	0,0131 ± 0,0165	0,0191 ± 0,0210	0,0245 ± 0,0283
	1	0,345	0,406	7,236	1	1,560	2,274	2,917
	1,00	0,953	0,964	0,002	1,00	0,953	0,666	0,366
CXCL8	0,0352 ± 0,0242	0,0440 ± 0,0158	0,0240 ± 0,0107	2,0352 ± 1,6428	0,1388 ± 0,0560	0,1800 ± 0,2123	0,1826 ± 0,1994	0,3264 ± 0,3855
	1	1,250	0,682	57,818	1	1,297	1,316	2,352
	1,00	0,999	0,999	0,001	1,00	0,982	0,979	0,419
CCL2	0,6479 ± 0,4577	0,4320 ± 0,4485	0,6591 ± 0,6445	1,3611 ± 1,1318	0,8872 ± 0,4282	1,2822 ± 1,6046	1,4833 ± 1,7250	1,6066 ± 2,0785
	1	0,667	1,017	2,101	1	1,445	1,672	1,811
	1,00	0,918	0,999	0,240	1,00	0,949	0,853	0,773
CXCL1	0,1176 ± 0,0489	0,0435 ± 0,0433	0,0437 ± 0,0368	0,3480 ± 0,1635	0,0643 ± 0,0284	0,1520 ± 0,1957	0,0941 ± 0,0936	0,0981 ± 0,1116
	1	0,370	0,372	2,959	1	2,364	1,463	1,526
	1,00	0,367	0,368	0,001	1,00	0,478	0,952	0,933
MIF	0,3595 ± 0,1704	0,2292 ± 0,1011	0,2608 ± 0,0750	0,4163 ± 0,3009	0,3007 ± 0,1543	0,7886 ± 0,9699	0,5127 ± 0,4061	0,4603 ± 0,4413
	1	0,638	0,725	1,158	1	2,623	1,705	1,531
	1,00	0,485	0,680	0,910	1,00	0,346	0,859	0,932
NOS3	0,0087 ± 0,0062	0,0068 ± 0,0037	0,0065 ± 0,0027	0,0082 ± 0,0085	0,0030 ± 0,0015	0,0092 ± 0,0092	0,0118 ± 0,0132	0,0059 ± 0,0036
	1	0,782	0,747	0,943	1	3,067	3,933	1,967
	1,00	0,899	0,846	0,997	1,00	0,407	0,194	0,857
SNAI1	0,0153 ± 0,0075	0,0099 ± 0,0041	0,0117 ± 0,0060	0,0340 ± 0,0306	0,0048 ± 0,0020	0,0128 ± 0,0112	0,0139 ± 0,0130	0,0093 ± 0,0100
	1	0,647	0,765	2,222	1	2,667	2,896	1,938
	1,00	0,902	0,967	0,178	1,00	0,390	0,296	0,784
SNAI2	0,0121 ± 0,0099	0,0038 ± 0,0008	0,0061 ± 0,0038	0,0045 ± 0,0030	0,0008 ± 0,0004	0,0032 ± 0,0023	0,0096 ± 0,0169	0,0028 ± 0,0049
	1	0,314	0,504	0,372	1	4,000	12,000	3,500
	1,00	0,044	0,176	0,069	1,00	0,942	0,276	0,966
TWIST1	0,0013 ± 0,0010	0,0003 ± 0,0002	0,0002 ± 0,0001	0,0007 ± 0,0004	0,0004 ± 0,0003	0,0016 ± 0,0025	0,0028 ± 0,0046	0,0013 ± 0,0016
	1	0,231	0,154	0,538	1	4,000	7,000	3,250
	1,00	0,015	0,006	0,149	1,00	0,770	0,332	0,883
ZEB1	0,2133 ± 0,0853	0,0757 ± 0,0583	0,1547 ± 0,0612	0,3244 ± 0,2382	0,1422 ± 0,0695	0,3690 ± 0,4640	0,4539 ± 0,4903	0,3511 ± 0,4072
	1	0,355	0,725	1,521	1	2,595	3,192	2,469
	1,00	0,208	0,789	0,360	1,00	0,638	0,402	0,690
KLF2	0,0026 ± 0,0016	0,0013 ± 0,0008	0,0010 ± 0,0006	0,0031 ± 0,0029	0,0010 ± 0,0008	0,0017 ± 0,0012	0,0041 ± 0,0058	0,0043 ± 0,0068
	1	0,500	0,385	1,192	1	1,700	4,100	4,300
	1,00	0,484	0,295	0,917	1,00	0,988	0,496	0,462
KLF4	0,0047 ± 0,0026	0,0026 ± 0,0007	0,0023 ± 0,0013	0,0472 ± 0,0390	0,0117 ± 0,0061	0,0154 ± 0,0206	0,0134 ± 0,0113	0,0305 ± 0,0344
	1	0,553	0,489	10,043	1	1,316	1,145	2,607
	1,00	0,995	0,993	0,003	1,00	0,981	0,998	0,308
NFE2L2	0,2095 ± 0,1512	0,0889 ± 0,0260	0,1093 ± 0,0414	0,3476 ± 0,2403	0,1489 ± 0,0718	0,2252 ± 0,2664	0,4401 ± 0,4784	0,3014 ± 0,3919
	1	0,424	0,522	1,659	1	1,512	2,956	2,024
	1,00	0,356	0,498	0,257	1,00	0,961	0,335	0,777

Примечание: КПМ – кальципротеиновые мономеры; КПЧ – кальципротеиновые частицы.

Note: CPMs – calciprotein monomers; CPPs – calciprotein particles.

альных клеток на 10% было выбрано в качестве целевого. Проведенные в представленной работе эксперименты показали, что такое повышение достигается путем увеличения концентрации кальция на 10 мкг/мл.

Необходимой предпосылкой реализации патогенных эффектов КПЧ является их интернализация ЭК [4–6, 8], которая происходит даже в условиях потока [5, 8]. Возможность интернализации КПМ ЭК оставалась неясной, однако также была показана в условиях потока в данном исследовании. Несмотря на это, добавление Ca^{2+} и КПМ в выбранной для исследования концентрации (10 мкг/мл) не вызывало системных патогенных эффектов в первичных артериальных ЭК человека (хотя отдельные стохастические эффекты все же достигали статистической значимости). Напротив, добавление КПЧ к первичным ЭК коронарной артерии человека в концентрации 10 мкг/мл вызывало повышение экспрессии генов провоспалительных молекул клеточной адгезии, обеспечивающих связывание лейкоцитов с ЭК (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) и генов основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8* и *CXCL1*). Тем не менее ЭК внутренней грудной артерии были более устойчивыми к воздействию КПЧ в вышеуказанной концентрации и не характеризовались статистически значимыми изменениями генной экспрессии. Наблюдавшаяся в ЭК коронарной артерии их провоспалительная активация является типовой для дисфункциональных ЭК [23, 24], в особенности при воздействии кальциевого стресса [4]. Интересным наблюдением было компенсаторное повышение гена атеропротективного транскрипционного фактора эндотелиальной механотрансдукции *KLF4* в ЭК коронарной артерии, однако системный характер данного феномена находится под вопросом, учитывая отсутствие подобной реакции генов *KLF2* и *NFE2L2*.

Выявленные изменения генной экспрессии в ЭК коронарной артерии под воздействием КПЧ соответствуют картине хронического системного воспаления низкой интенсивности, которое само по себе является триггером дисфункции эндотелия [25] и наблюдается у пожилых пациентов (так называемый феномен инфламэйджинга). Это свидетельствует о физиологической релевантности проведенного исследования. Различие в патогенном действии Ca^{2+} , КПМ и КПЧ на ЭК (отсутствие такового у Ca^{2+} и КПМ и наличие такового у КПЧ) свидетельствует о том, что патологические эффекты кальция определяются также формой его доставки внутрь клетки и его присутствия вне клетки, а не только его концентрацией. Данные результаты могут указывать на необходимость переоценки подходов к дозировке

КПЧ в экспериментальных исследованиях; тем не менее следует отметить, что все остальные подходы (мечение флюоресцентно меченым бисфосфонатом, сканирующая электронная микроскопия и измерение оптической плотности в сочетании с оценкой распределения диаметра частиц в растворе при помощи динамического рассеяния света или без него) ограничены их применимостью исключительно для КПЧ. Кроме того, ни один из указанных альтернативных подходов не свободен от критики, поскольку проточно-цитометрический анализ отличается слишком высокой вариативностью, прямой подсчет количества частиц при помощи электронной микроскопии слишком длителен, а результаты измерения оптической плотности в значительной степени зависят от распределения размерности частиц в растворе.

Заключение

Повышение молярной концентрации ионизированного кальция в бессывороточной среде для культивирования ЭК и сыворотке крови крыс Wistar на 10% (в 1,1 раза) (то есть достижение «высокого нормального» уровня Ca^{2+}) обеспечивается путем добавления 10 мкг кальция на 1 мл среды или сыворотки. Добавление Ca^{2+} и КПМ в концентрации 10 мкг/мл не вызывает патологических эффектов в культурах первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерий (несмотря на факт интернализации КПМ). Добавление КПЧ к первичным ЭК коронарной артерии человека в концентрации 10 мкг/мл вызывает провоспалительную активацию эндотелия, которая проявляется повышением экспрессии генов молекул адгезии лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1* и *SELE* и генов провоспалительных цитокинов *IL6*, *CXCL8* и *CXCL1*, при этом первичные ЭК внутренней грудной артерии остаются относительно устойчивыми к развитию дисфункции эндотелия при воздействии такой дозы КПЧ. Поскольку дисфункцию эндотелия в физиологической концентрации вызывали исключительно КПЧ, а не КПМ или Ca^{2+} , можно сделать вывод о том, что патологические эффекты кальция в значительной степени определяются формой его добавления, а не только добавляемой концентрацией.

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. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Тюрина заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Д. Степанов заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Ю.А. Дылева заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционный совет журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00107 «Патологические последствия и молекулярные механизмы воздействия кальций-фосфатных бионов (каль-

ципротеиновых частиц) на форменные элементы крови», <https://rscf.ru/project/22-15-00107/>.

Funding

This research and the article processing charge were funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-15-00107 “Circulation of calciprotein particles in human blood: pathogenic consequences and molecular mechanisms” (Anton Kutikhin), <https://rscf.ru/en/project/22-15-00107/>.

Информация об авторах

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук заведующая лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной 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 отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

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

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук 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** 0000-0002-1079-1956

Синицкая Анна Викторовна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Синицкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук заведующий лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Тюрина Арина Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0002-6293-6974

Author Information Form

Shishkova Daria K., PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental 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, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

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

Velikanova Elena A., PhD, Research Fellow, Laboratory for Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Sinitskaya Anna V., PhD, Research Fellow, Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Sinitsky Maxim Yu., PhD, Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Tyurina Arina E., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0002-6293-6974

Степанов Александр Денисович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Дылева Юлия Александровна, кандидат медицинских наук старший 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

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук старший 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** 0000-0002-4146-3373

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

Stepanov Alexander D., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Dyleva Yulia A., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for 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

Matveeva Vera G., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Department of Experimental 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 и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ВЕА – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

СМЮ – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

САД – 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

МВГ – 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

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

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

VEA – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

SMYu – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

SAD – 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

MVG – 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lutsey P.L., Alonso A., Michos E.D., Loehr L.R., Astor B.C., Coresh J., Folsom A.R. Serum magnesium, phosphorus, and calcium are associated with risk of incident heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(3):756-64. doi: 10.3945/ajcn.114.085167.
11. Rohrmann S., Garmo H., Malmstrom H., Hammar N., Jungner I., Walldius G., Van Hemelrijck M. Association between serum calcium concentration and risk of incident and fatal cardiovascular disease in the prospective AMORIS study. *Atherosclerosis.* 2016;251:85-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.004.
12. 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.
13. 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.
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. 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.
17. 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.
18. Seidu S., Kunutsor S.K., Khunti K. Serum albumin, cardiometabolic and other adverse outcomes: systematic review and meta-analyses of 48 published observational cohort studies involving 1,492,237 participants. *Scand Cardiovasc J.* 2020;54(5):280-293. doi: 10.1080/14017431.2020.1762918.
19. 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.
20. Koeppert 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.
21. Herrmann M., Schäfer C., Heiss A., Gräber S., Kinkeldey A., Büscher A., Schmitt M.M., Bornemann J., Nimmerjahn F., Herrmann M., Helming L., Gordon S., Jahn-Dechent W. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res.* 2012;111(5):575-84. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261479.
22. Köppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E., Hengstler J.G., Smith E.R., Jahn-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol.* 2018;9:1991. doi: 10.3389/fimmu.2018.01991.
23. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
24. Шишкова Д.К., Синицкая А.В., Синицкий М.Ю., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Маркова В.Е., Кутихин А.Г. Случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(3):97-114. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114>
25. Liberale L., Montecucco F., Tardif J.C., Libby P., Camici G.G. Inflamm-aging: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.

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. Heiss A., Eckert T., Aretz A., Richtering W., van Dorp W., Schäfer

- C., Jahnhen-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.
3. Heiss A., DuChesne A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T., Jahnhen-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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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)
10. Lutsey P.L., Alonso A., Michos E.D., Loehr L.R., Astor B.C., Coresh J., Folsom A.R. Serum magnesium, phosphorus, and calcium are associated with risk of incident heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(3):756-64. doi: 10.3945/ajcn.114.085167.
11. Rohrmann S., Garmo H., Malmstrom H., Hammar N., Jungner I., Walldius G., Van Hemelrijck M. Association between serum calcium concentration and risk of incident and fatal cardiovascular disease in the prospective AMORIS study. *Atherosclerosis.* 2016;251:85-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.004.
12. 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.
13. 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.
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., Osysaev 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. 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.
17. 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.
18. Seidu S., Kunutsor S.K., Khunti K. Serum albumin, cardiometabolic and other adverse outcomes: systematic review and meta-analyses of 48 published observational cohort studies involving 1,492,237 participants. *Scand Cardiovasc J.* 2020;54(5):280-293. doi: 10.1080/14017431.2020.1762918.
19. Heiss A., Pipich V., Jahnhen-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.
20. Koepfert S., Ghallab A., Peglow S., Winkler C.F., Graeber S., Büscher A., Hengstler J.G., Jahnhen-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.
21. Herrmann M., Schäfer C., Heiss A., Gräber S., Kinkeldey A., Büscher A., Schmitt M.M., Bornemann J., Nimmerjahn F., Herrmann M., Helming L., Gordon S., Jahnhen-Dechent W. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res.* 2012;111(5):575-84. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261479.
22. Köppert S., Büscher A., Babler A., Ghallab A., Buhl E.M., Latz E., Hengstler J.G., Smith E.R., Jahnhen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol.* 2018;9:1991. doi: 10.3389/fimmu.2018.01991.
23. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
24. Shishkova D.K., Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Markova V.E., Kutikhin A.G. Spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in human primary umbilical vein endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(3):97-114. doi:10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114 (In Russian)
25. Liberale L., Montecucco F., Tardif J.C., Libby P., Camici G.G. Inflamm-aging: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.

Для цитирования: Шишкова Д.К., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Великанова Е.А., Сеницкая А.В., Сеницкий М.Ю., Тюрин А.Е., Степанов А.Д., Дылева Ю.А., Матвеева В.Г., Кутихин А.Г. Исследование патологического воздействия ионизированного кальция, кальципротейиновых мономеров и кальципротейиновых частиц на первичные артериальные эндотелиальные клетки. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2024;13(3): 167-181. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-167-181

To cite: Shishkova D.K., Markova V.E., Markova Y.O., Velikanova E.A., Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Tyurina A.E., Stepanov A.D., Dyleva Yu.A., Matveeva V.G., Kutikhin A.G. Pathological effects of ionized calcium, calciprotein monomers and calciprotein particles on arterial endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(3): 167-181. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-167-181