

## ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИ РЕЛЕВАНТНОГО КАЛЬЦИЕВОГО СТРЕССА

Д.К. Шишкова, Ю.О. Юрьева, М.Ю. Синицкий, А.В. Синицкая, В.Е. Маркова,  
А.И. Лазебная, А.В. Фролов, А.Г. Кутухин

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

### Основные положения

- Патофизиологически релевантный кальциевый стресс (5 мкг кальция на 1 мл) независимо от источника (свободные ионы кальция, кальципротеиновые мономеры или частицы) приводит к повышению выделения эндотелиальными клетками в культуральную среду провоспалительных цитокинов, растворимых форм эндотелиальных рецепторов и проангиогенных факторов.
- Воздействие фетуиновых кальципротеиновых мономеров и частиц на моноциты в вышеуказанной концентрации вызывало повышение экспрессии генов рецепторов связывания с эндотелиальными клетками, увеличение выделения моноцитами провоспалительных и протромботических молекул и адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам в условиях пульсирующего потока.
- Продемонстрировано, что внутривенное введение крысам Wistar фетуиновых кальципротеиновых мономеров и кальципротеиновых частиц в вышеуказанной концентрации вызывает более выраженный провоспалительный сдвиг, чем свободные ионы  $Ca^{2+}$ , и индуцирует повышение выделения растворимых форм эндотелиальных рецепторов, провоспалительных молекул, протромботических молекул, биоактивных матрикинов и маркеров повреждения печени.

### Цель

Определить патологические эффекты воздействия ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ), кальципротеиновых мономеров (КПМ-Ф) и кальципротеиновых частиц (КПЧ-Ф) на эндотелиальные клетки и моноциты.

### Материалы и методы

Первичные эндотелиальные клетки (ЭК) коронарной и внутренней грудной артерий, а также моноциты человека были инкубированы с  $Ca^{2+}$  (с использованием  $CaCl_2$  в качестве донора), КПМ-Ф и КПЧ-Ф для индукции патофизиологически релевантного кальциевого стресса (5 мкг кальция на 1 мл, что соответствует 10%-ному повышению уровня  $Ca^{2+}$ ) с последующим анализом уровня генной экспрессии и содержания провоспалительных молекул в культуральной среде посредством дот-блот-профилирования. Анализ адгезии ЭК к моноцитам проводили после их сокульттивирования в условиях 24-часового воздействия пульсирующего потока. Для оценки системного воспалительного ответа выполняли внутривенные инъекции  $CaCl_2$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф крысам Wistar с дальнейшим измерением содержания провоспалительных молекул в сыворотке методом дот-блоттинга.

### Результаты

Кальциевый стресс независимо от источника ( $Ca^{2+}$ , КПМ-Ф или КПЧ-Ф) приводил к повышению выделения ЭК в культуральную среду: провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, CCL5/RANTES, GM-CSF, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIF); растворимых форм эндотелиальных рецепторов (CD31/PECAM-1, CD105/ENG, CD147/BSG, CD106/VCAM-1), свидетельствующих о клеточной гибели или патологическом слущивании данных рецепторов; проангиогенных факторов (ангиогенин, ангиопоэтин-2, HGF, PDGF, SDF-1 $\alpha$ ). Воздействие КПЧ-Ф на моноциты вызывало повышение экспрессии генов рецепторов связывания ЭК (ITGB1, ITGA4, SELPG), а воздействие КПМ-Ф и КПЧ-Ф – увеличение выделения моноцитами провоспалительных (липокалин-2/NGAL, MMP-9, миелопероксидаза), проангиогенных (ангиогенин, BDNF) и протромботических молекул (uPAR, PAI-1, тромбоспондин-1). Посредством светлопольной микроскопии была показана повышенная адгезия моноцитов к ЭК после их 24-часовой совместной инкубации в системе пульсирующего потока с  $Ca^{2+}$ ,

КПМ-Ф или КПЧ-Ф. Внутривенное введение крысам КПМ-Ф или КПЧ-Ф вызывало повышение выделения растворимых форм эндотелиальных рецепторов (VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54), провоспалительных молекул (CXCL7, CCL11/эотаксин, FLT3LG), протромботических молекул (PAI-1), матрикинов (фибулин-3, остеопонтин, эндостатин, CCN3, MMP-3), гепатокинов (гепассоцин, фетуин-А, RBP4, IGF-1, IGFBP-2/3/5/6) и белков путей метаболизма (реziстин, RAGE, липокалин-2/NGAL).

### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о патофизиологической значимости провоспалительной активации ЭК и моноцитов под воздействием кальциевого стресса в контексте развития дисфункции эндотелия.

### Ключевые слова

Эндотелиальные клетки • Моноциты • Ионы кальция • Кальципротеиновые мономеры • Кальципротеиновые частицы • Провоспалительные цитокины • Дисфункция эндотелия

*Поступила в редакцию: 12.09.2025; поступила после доработки: 30.09.2025; принята к печати: 12.10.2025*

## PRO-INFLAMMATORY ACTIVATION OF ENDOTHELIAL CELLS AND MONOCYTES AT CALCIUM STRESS

**D.K. Shishkova, Yu.O. Yurieva, M.Yu. Sinitsky, A.V. Sinitskaya, V.E. Markova, A.I. Lazebnaya, A.V. Frolov, A.G. Kutikhin**

*Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, blvd. named after academician L.S. Barbarash, Kemerovo, Russian Federation, 650002*

### Highlights

- Pathophysiological calcium stress (5  $\mu$ g calcium per 1 mL) causes the release of pro-inflammatory cytokines, soluble membrane receptor forms, and pro-angiogenic factors into the cell culture medium by endothelial cells regardless of the stress source (free calcium ions, calciprotein monomers, and calciprotein particles).
- Exposure of monocytes to fetuin-centric calciprotein monomers and calciprotein particles (5  $\mu$ g calcium per 1 mL) increased the expression of endothelial cell-ligating receptors, elevated the release of pro-inflammatory and pro-thrombotic molecules, and induced adhesion of monocytes to endothelial cells under the pulsatile flow.
- Intravenous administration of fetuin-centric calciprotein monomers and calciprotein particles (5  $\mu$ g calcium per 1 mL) to Wistar rats induced higher pro-inflammatory response than free calcium ions, and increases the release of soluble endothelial receptor forms, pro-inflammatory molecules, pro-thrombotic molecules, bioactive matrikines, and hepatokines.

### Aim

To define the pathological effects of free calcium ions ( $Ca^{2+}$ ), fetuin-centric calciprotein monomers (CPM-F), and fetuin-centric calciprotein particles (CPP-F) on endothelial cells (ECs) and monocytes.

### Methods

Primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) and human monocytes were incubated with  $Ca^{2+}$  (using  $CaCl_2$  as a donor), calciprotein monomers, and calciprotein particles to induce pathophysiological calcium stress (5  $\mu$ g per 1 mL, equal to  $\approx 10\%$  increase in  $Ca^{2+}$ ) with the following analysis of the gene expression and measurement of the pro-inflammatory molecules in the cell culture medium by dot blot profiling. Adhesion of ECs to monocytes was performed after their co-culture under the 24 hours of pulsatile flow. Systemic inflammatory response was conducted by the intravenous injections of  $CaCl_2$ , CPM-F, and CPP-F to Wistar rats with the subsequent measurement of pro-inflammatory molecules in the serum by dot blotting.

### Results

Regardless of the calcium stress mode ( $Ca^{2+}$ , CPM-F, or CPP-F), it has led to the increased release of: 1) pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, CCL5/RANTES, GM-CSF, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIF); 2) soluble endothelial receptor forms (CD31/PECAM-1, CD105/ENG, CD147/BSG, CD106/VCAM-1)

indicating cell death or pathological shedding of these receptors; 3) pro-angiogenic factors (angiogenin, angiopoietin-2, HGF, PDGF, SDF-1 $\alpha$ ) into the cell culture medium by ECs. Exposure of monocytes to CPP-F elevated the expression of the genes encoding EC-ligating receptors (ITGB1, ITGA4, SELPG), whilst treatment with CPM-F and CPP-F increased the release of pro-inflammatory (lipocalin-2/NGAL, MMP-9, and myeloperoxidase), pro-angiogenic (angiogenic, BDNF), and pro-thrombotic (uPAR, PAI-1, thrombospondin-1) molecules by monocytes. After 24 hours of co-incubation in the pulsatile flow system, monocytes showed an increased adhesion to ECs upon the treatment with  $Ca^{2+}$ , CPM-F, or CPP-F. Intravenous administration of CPM-F or CPP-F to Wistar rats elevated an increased release of soluble endothelial receptor forms (VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54), pro-inflammatory molecules (CXCL7, CCL11/eotaxin, FLT3LG), pro-thrombotic molecules (PAI-1), matrikines (fibulin-3, osteopontin, endostatin, CCN3, MMP-3), hepatokines (hepassocin, fetuin-A, RBP4, IGF-1, IGFBP-2/3/5/6), and proteins of metabolic pathways (resistin, RAGE, lipocalin-2/NGAL).

### Conclusion

Our results indicate the pathophysiological relevance of endothelial and monocyte activation under calcium stress in context of endothelial dysfunction.

### Keywords

Endothelial cells • Monocytes • Calcium ions • Calciprotein monomers • Calciprotein particles • Pro-inflammatory cytokines • Endothelial dysfunction

Received: 12.09.2025; received in revised form: 30.09.2025; accepted: 12.10.2025

### Список сокращений

БСФ	— бычий сывороточный фетуин-А	КПЧ	— кальципротеиновые частицы
ВГА	— внутренняя грудная артерия	ФБС	— это фетальная бычья сыворотка
КА	— коронарная артерия	ФСБД	— фосфатно-солевой буфер по Дульбекко
КПМ	— кальципротеиновые мономеры	ЭК	— эндотелиальные клетки

### Введение

Кальципротеиновые мономеры (КПМ) и кальципротеиновые частицы (КПЧ) являются неотъемлемыми звеньями минерального гомеостаза, представляя собой две различные формы фосфорсвязанного кальция крови. КПМ (диаметром 9–10 мкм) образуются при связывании фетуином-А формируемого в крови фосфата кальция и циркулируют в коллоидном состоянии, постепенно агрегируя в первичные (аморфные) сферические КПЧ (диаметром 30–100 мкм), которые далее при нарушениях минерального гомеостаза трансформируются во вторичные (кристаллические) веретеновидные или игольчатые КПЧ (диаметром 100–300 нм) в результате аморфно-кристаллического перехода [1–3]. В процессе циркуляции в крови КПМ интернализируются синусоидными эндотелиальными клетками (ЭК) печени и ЭК прочих кровеносных сосудов [4, 5], в то время как КПЧ поглощаются всеми вышеуказанными ЭК, циркулирующими моноцитами, а также резидентными макрофагами печени и селезенки [4–9]. Большинство КПМ, однако, остаются в циркуляции и выводятся почками, в силу малого диаметра свободно проходя через клубочковый фильтрационный барьер в отличие от КПЧ [1, 4]. Количественная оценка КПЧ в исследованиях *in vitro*, как правило, проводится посредством расчета массы кальция на 1 мл культуральной среды для объективного отражения кальциевого стресса [5, 7, 9].

В предыдущих исследованиях нашей группой показано, что воздействие КПЧ в супрафизиологических дозах (25 мкг кальция на 1 мл) вызывает эндотелиотоксические эффекты [10, 11] и провоспалительную активацию ЭК, которая сопровождается повышением экспрессии соответствующих молекул клеточной адгезии (VCAM1 и ICAM1) и увеличением выделения провоспалительных цитокинов (интерлейкин-6, интерлейкин-8, фактора привлечения моноцитов MCP-1/CCL2, фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF), а также хемокинов CXCL1, CXCL5 и CCL20) [9, 10, 12, 13]. Воздействие физиологических доз альбуминовых КПЧ (10 мкг кальция на 1 мл, вызывающее повышение молярной концентрации ионизированного кальция ( $Ca^{2+}$ ) в культуральной среде на 10% по аналогии с межквартильным интервалом молярной концентрации  $Ca^{2+}$  в популяции) приводило к аналогичным результатам [5]. Помимо этого, действие КПЧ также индуцирует экспрессию генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1*), что отражает реакцию ЭК на стресс и свидетельствует о развитии их дисфункции [5, 12, 13]. Вместе с тем альбуминовые КПМ и свободные ионы кальция ( $Ca^{2+}$ ) не оказывали подобного влияния на ЭК, что указывает на то, что из всех циркулирующих депо кальция дисфункцию эндотелия вызывают именно КПЧ [5].

Тем не менее дозы кальция, использованные в ранее опубликованных исследованиях по моделированию кальциевого стресса, могут быть завышенными вследствие высокой минеральной емкости альбумина, связывающего значительную долю ионов кальция из-за множества отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности и чрезвычайно высокой концентрации в сыворотке крови (~42 г/л) [14, 15]. Вероятно, наличие альбумина в биохимической системе для синтеза КПЧ требует добавления избыточного количества кальция (в виде  $\text{CaCl}_2$ ) для достижения искомого повышения молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  на 10%, необходимого для моделирования патофизиологически и клинически релевантного кальциевого стресса. Таким образом, даже примененная нами ранее доза кальция в 10 мкг/мл может оказаться избыточной с учетом того, что расчетная масса ионов кальция, необходимая для повышения молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке крови человека на 10% (~0,12 ммоль/л), составляет ~4,8 мкг/мл. С учетом многократно более низкой концентрации фетуина-А в сыворотке крови человека (~1 г/л) масса кальция, необходимая для повышения его молярной концентрации на 10%, в фетуинсодержащем растворе может оказаться существенно ниже, чем в альбуминсодержащем (10 мкг/мл). Принимая во внимание центральную роль фетуина-А в формировании КПМ и КПЧ в организме человека [1, 3], можно предположить, что фетуиновые КПМ и КПЧ (КПМ-Ф и КПЧ-Ф) могут оказаться более физиологически релевантными, чем альбуминовые, для изучения дифференциальных патологических эффектов различных видов кальциевого стресса.

Ранее нашей группой и зарубежными учеными был разработан метод одновременного синтеза КПМ и КПЧ в результате перенасыщения солями кальция и фосфора белоксодержащего физиологического раствора [4, 5, 16]. В нашем варианте указанный метод подразумевает ультрацентрифугирование для отделения КПЧ от КПМ и  $\text{Ca}^{2+}$  и последующую ультрафильтрацию для отделения КПМ (которые остаются в ретентате) от  $\text{Ca}^{2+}$ , которые оказываются в фильтрате [5, 16]. Таким образом, становится возможным получение КПМ и КПЧ из одного источника, при этом высокая концентрация белка в ретентате (за счет отсутствия его попадания в фильтрат) и отсутствие в нем свободных ионов кальция и фосфора препятствуют агрегации КПМ и формированию КПЧ [5, 16]. Распределение кальция между фракцией свободных ионов и альбуминовыми КПМ/КПЧ составило 1:1, что соответствует таковому в крови человека и свидетельствует о физиологической релевантности данного метода синтеза и фракционирования потенциальных источников кальциевого стресса [16]. Успешное получение и проведение экспериментов

на альбуминовых КПМ и КПЧ позволило предположить, что данный метод может быть применен и для синтеза КПМ-Ф и КПЧ-Ф с целью анализа влияния различных видов кальциевого стресса на ЭК и моноциты, интерназированные КПЧ в организме человека.

**Цель данного исследования** – сравнительный анализ эффектов физиологически релевантного кальциевого стресса (5 мкг/мл) при его достижении путем добавления  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф к культурам ЭК и моноцитов, а также при их внутривенном введении крысам Wistar.

## Материалы и методы

### Искусственный синтез КПМ-Ф и КПЧ-Ф

С целью приготовления биохимической системы для параллельного синтеза КПМ-Ф и КПЧ-Ф навеску в 8 мг бычьего сывороточного фетуина-А (БСФ, CAS 9014-81-7, F3385, Sigma-Aldrich, США) ресуспендировали в 4 мл стерильного физиологического раствора  $\text{NaCl}$  (154 ммоль/л, 7647-14-5, «Гротекс», ООО «ФармЛайн», Россия) и далее последовательно добавляли 2 мл раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (24 ммоль/л, CAS 7558-79-4, 94046, Sigma-Aldrich, США) и 2 мл раствора  $\text{CaCl}_2$  (40 ммоль/л, CAS 10043-52-4, 21115, Sigma-Aldrich, США) с ресуспендированием после добавления каждого реагента. Итоговая концентрация БСФ в смеси составляла 1 мг/мл (что соответствует медианной концентрации фетуина-А в популяции),  $\text{CaCl}_2$  – 10 ммоль/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6 ммоль/л, итоговая масса кальция – 3 200 мкг. После этого смесь аликовотировали по 8 пробиркам (по 1 мл смеси в каждой, Ac-ACT-017-L-B-S, Accutax Lab Devices, Индия), 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-Ф и КПЧ-Ф, а также оставались  $\text{Ca}^{2+}$ .

Далее рабочую смесь аликовотировали по 4 стерильным ультрацентрифужным пробиркам (по 2 мл на одну пробирку, 8 мл на цикл, 347357, Beckman Coulter, США) и производили ультрацентрифугирование при 200 000 × g (OPTIMA MAX-XR, Beckman Coulter, США) в течение часа. После выполнения данной процедуры осадок представлял собой сформированные КПЧ-Ф, а надосадок – КПМ-Ф и  $\text{Ca}^{2+}$ . Надосадок переносили в новые пробирки, а осадок (КПЧ-Ф) в каждой из 4 ультрацентрифужных пробирок ресуспендировали в 100 мкл воды для инъекций (7732-18-5, «Гротекс», ООО «ФармЛайн», Россия) и далее сливали в одну пробирку для последующей визуализации (при помощи сканирующей электронной микроскопии) и дальнейших экспериментов.

Разделение КПМ-Ф и  $\text{Ca}^{2+}$  осуществлялось при

помощи ультрафильтрации. Надосадок после ультрацентрифугирования в стерильных условиях ре-суспендировали и аликовтировали из расчета 4 мл на один центрифужный концентратор с порогом отсечения молекулярной массы (MWCO) 30 кДа (FTT130150, Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd, Китай). Центрифугирование надосадка осуществляли при  $1\,800 \times g$  в течение 25 мин при комнатной температуре. После этого 0,5 мл оставалось внутри концентратора (обессоленный ретентат, содержащий КПМ-Ф), а 3,5 мл – в центрифужной пробирке (фильтрат, содержащий  $\text{Ca}^{2+}$ ).

#### Измерение концентрации кальция и фетуина-А в КПМ-Ф, КПЧ-Ф и $\text{Ca}^{2+}$

Для измерения концентрации кальция в КПЧ-Ф, надосадке (рабочая смесь КПМ-Ф и  $\text{Ca}^{2+}$  после ультрацентрифугирования), КПМ-Ф (ретентат после ультрафильтрации) и  $\text{Ca}^{2+}$  (фильтрат после ультрафильтрации) аликовту КПЧ-Ф разводили в 15 раз, аликовту надосадка – в 5 раз, аликовту КПМ-Ф – в 25 раз, аликовту  $\text{Ca}^{2+}$  – в 10 раз. Колориметрическое определение концентрации кальция в КПЧ-Ф, надосадке, КПМ-Ф и  $\text{Ca}^{2+}$  проводили при помощи набора CalciScore (C001, AppScience Products, Россия), основанного на реакции ортоизолфталеинкомплексона с ионами кальция в щелочной среде, согласно инструкциям производителя. Для измерения концентрации БСФ в надосадке, КПМ-Ф и  $\text{Ca}^{2+}$  аликовту КПМ-Ф разводили в 25 раз, аликовты надосадка и  $\text{Ca}^{2+}$  дополнительно не разводили. После ресуспендиования 25 мкл из каждого разведения использовали в качестве образца при измерении концентрации фетуина-А колориметрическим методом при помощи набора BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя. Измерения проводили на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) на длине волны 575 нм (кальций) и 562 нм (фетуин-А).

#### Сканирующая электронная микроскопия КПЧ-Ф

Для визуализации синтезированных КПЧ-Ф при помощи сканирующей электронной микроскопии супензию КПЧ-Ф из каждого синтеза разводили в воде для инъекций в 200 раз и визуализировали на сканирующем электронном микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме вторичных электронов с ускоряющим напряжением 10 или 30 кВ.

#### Культивирование ЭК

Для экспериментов с ЭК использовали коммерческие культуры первичных ЭК атерочувствительной коронарной артерии человека (HCAEC,

или ЭК-КА, 300K-05a, Cell Applications, США) и первичных ЭК атерорезистентной внутренней грудной артерии человека (HITAEC, или ЭК-ВГА, 308K-05a, Cell Applications, США). Все эксперименты проводили параллельно на обеих линиях ЭК. Согласно информации поставщика, первичные ЭК человека были получены из здоровых артерий доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток на виалу). Для проведения экспериментов ЭК размораживали и культивировали во флаконах T-75 (708003, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd., Китай) в среде для устойчивой пролиферации ЭК EndoBoost (EB1, AppScience Products, Россия). После двух пассажей ЭК рассеивали в проточные камеры (80126, Ibiidi, Германия) либо в 6-луночные планшеты (N-703001, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd, Китай) и культивировали до достижения конфлюэнтности. Пассажирование (пересев) ЭК осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина и этилендиаминетиуркусной кислоты (трипсин-ЭДТА, P043p, ООО НПП «ПанЭко», Россия) и 10% ФБС (FBS-HI-11A, Capricorn Scientific) для ингибиования трипсина. Непосредственно перед проведением экспериментов сывороточную среду EndoBoost заменяли на бессывороточную для поддержания физиологического состояния ЭК EndoLife (EL1, AppScience Products, Россия) с промежуточным двукратным промыванием ЭК фосфатно-солевым буфером по Дульбекко (DPBS, или ФСБД, здесь и далее – без кальция и магния, 1.2.4.7, ООО «БиолоГ») для отмычки от остаточных компонентов ФБС во избежание неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами при дот-блоттинге.

#### Выделение моноцитов

Для экспериментов с моноцитами была использована свежая периферическая кровь 8 условно здоровых доноров (сотрудников научного коллектива), из которой предварительно производилось выделение мононуклеарных клеток периферической крови при помощи стандартного разделения в градиенте фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>, P053E, ООО НПП «ПанЭко», Россия). Далее из мононуклеарных клеток периферической крови проводилось выделение собственно моноцитов путем негативной магнитной сепарации с использованием магнита EasySep Magnet (18000, STEMCELL Technologies, Канада) и набора для выделения моноцитов EasySep Human Monocyte Isolation Kit (19359, STEMCELL Technologies, Канада) в соответствии с инструкциями производителя. Подсчет моноцитов осуществляли с использованием автоматического счетчика клеток Countess II (Thermo Fisher Scientific, США) и соответствующих одноразовых стекол для подсчета клеток (C10312, Thermo Fisher Scientific, США).

### Подбор физиологической дозы кальция для добавления к клеточным культурам и введения лабораторным животным

Подбор дозы добавляемого к ЭК и моноцитам кальция осуществляли путем добавления 1,25, 2,5, 5, 10 или 12,5 мкг кальция (в составе CaCl2), растворенного в водном растворе БСФ с концентрацией 28 мг/мл (средняя концентрация фетуина-А в ретентате), на 1 мл бессывороточной среды EndoLife, или добавления 2,0, 2,5, 3,125, 3,75 или 5 мкг кальция, растворенного в водном растворе БСФ с концентрацией 28 мг/мл, на 1 мл сыворотки крысы Wistar с последующим ресуспендионом, инкубацией смеси в течение часа и измерением молярной концентрации Ca<sup>2+</sup> (KoneLab 70i, Thermo Fisher Scientific, США) в сравнении с контрольной средой EndoLife или сывороткой крысы без добавления CaCl2. Для последующих экспериментов использовалась доза в 5 мкг кальция на 1 мл, повышающая молярную концентрацию Ca<sup>2+</sup> в бессывороточной среде EndoLife или в сыворотке крысы на 10% (в 1,1 раза), поскольку именно такое повышение (на 0,10–0,14 ммол/л, либо 4,0–5,6 мкг/мл, в среднем 0,12 ммол/л, либо 4,8 мкг/мл) составляет межквартильный интервал (разницу между рисковым верхним и протективным нижним квартилями) по Ca<sup>2+</sup> у здоровых людей, пациентов с инфарктом миокарда и с ишемическим инсультом.

### Анализ молекулярного ответа ЭК на добавление Ca<sup>2+</sup>, КПМ-Ф и КПЧ-Ф

Для изучения реакции ЭК на инкубацию с равными концентрациями Ca<sup>2+</sup>, КПМ-Ф и КПЧ-Ф к предварительно высаженным в 6-луночные планшеты конфлюэнтным культурам первичных ЭК-КА и ЭК-ВГА человека добавляли Ca<sup>2+</sup> (использованием CaCl2 в качестве донора), КПМ-Ф или КПЧ-Ф в дозировке 5 мкг кальция на 1 мл бессывороточной среды EndoLife (10 мкг кальция на лунку 6-луночного планшета, n = 18 лунок на группу) и проводили инкубацию в течение 24 ч. В качестве контрольной группы использовали клетки, к которым добавляли аналогичный объем ФСБД. В каждую из лунок также добавлялось соответствующее средней концентрации фетуина-А в ретентате количество БСФ (0,33 мг) во избежание нивелирования возможных протективных эффектов данного белка. Замену сывороточной среды EndoBoost на бессывороточную среду EndoLife осуществляли непосредственно перед проведением эксперимента. После 24-часовой инкубации с избыточной дозой кальция проводили микрофотосъемку клеток при помощи фазово-контрастной микроскопии. Далее культуральную среду отбирали, центрифугировали при 2 000 × g для осаждения клеточного дебриса, переносили в новые микропробирки с низким связыванием белка (Ac-ACT-017-L-B-S,

Accumax Lab Devices, Индия) и замораживали при –80 °C для последующей оценки содержания цитокинов при помощи дот-блоттинга.

### Анализ молекулярного и функционального ответа моноцитов на добавление Ca<sup>2+</sup>, КПМ-Ф и КПЧ-Ф

Инкубацию моноцитов человека с равными концентрациями Ca<sup>2+</sup>, КПМ-Ф и КПЧ-Ф проводили в закрытой системе пульсирующего потока (Ibidi Pump System Quad, Ibidi, Германия) и набора коннекторов для перфузии (Perfusion Set Yellow/Green, 10964, Ibidi, Германия) в течение 24 ч. Четыре экспериментальные группы были распределены по четырем модулям системы пульсирующего потока. В каждом из модулей к циркулирующим в бессывороточной культуральной среде EndoLife моноцитам (350 000 моноцитов на модуль системы пульсирующего потока) добавляли Ca<sup>2+</sup> (использованием CaCl2 в качестве донора), КПМ-Ф или КПЧ-Ф в дозировке 5 мкг кальция на 1 мл среды EndoLife (75 мкг кальция на модуль) с последующей инкубацией в течение 24 ча. В качестве контрольной группы использовали клетки, к которым добавляли аналогичный объем ФСБД. В каждый из модулей системы пульсирующего потока также добавлялось соответствующее средней концентрации фетуина-А в ретентате количество БСФ (2,47 мг) во избежание нивелирования возможных протективных эффектов данного белка. После 24-часовой инкубации с избыточной дозой кальция культуральную среду отбирали, центрифугировали при 220 × g (5804R, Eppendorf, Германия) для осаждения моноцитов и далее при 2 000 × g для осаждения клеточного дебриса с последующим замораживанием при –80 °C для последующей оценки содержания цитокинов при помощи дот-блоттинга и иммуноферментного анализа. Осадок моноцитов промывали холодным раствором ФСБД (4 °C) и лизировали тризолом (15596018, Thermo Fisher Scientific, США) для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя. С учетом донор-зависимого характера моноцитарного провоспалительного ответа эксперимент повторяли 4 раза с использованием периферической крови от разных доноров (сотрудников научного коллектива).

Для анализа адгезии лейкоцитов к эндотелию выделенные моноциты аккуратно ресуспенсировали в 2 мл среды EndoLife с последующим добавлением к этой суспензии 10 мкл красителя ядер CellTracker Green (25 мкмоль/л, C7025, Thermo Fisher Scientific, США) и инкубацией в течение 30 мин с трехкратным ресуспендионом (один раз в 10 мин). После центрифугирования и однократной отмычки от несвязавшегося красителя при 220 × g (5804R, Eppendorf, Германия) в течение 5 мин осадок меченых CellTracker Green моноцитов рав-

номерно распределяли по модулям системы пульсирующего потока (350,000 моноцитов на модуль), каждый из которых был подключен к проточной камере (80126, Ibidi, Германия) с конфлюэнтными культурами ЭК-ВГА, пассаж которых осуществляли не позднее чем за 24 ч до начала эксперимента для прочной адгезии ЭК к культуральному пластику. Далее в каждый из модулей пульсирующего потока к циркулирующим в среде EndoLife моноцитам добавляли  $\text{Ca}^{2+}$  (с использованием  $\text{CaCl}_2$  в качестве донора), КПМ-Ф или КПЧ-Ф в дозировке 5 мкг кальция на 1 мл среды EndoLife (75 мкг кальция на модуль) с последующей инкубацией в течение 24 ч. В качестве контрольной группы использовали клетки, к которым добавляли аналогичный объем ФСБД. В каждый из модулей системы пульсирующего потока также добавлялось соответствующее средней концентрации фетуина-А в ретентате количество БСФ (2,47 мг) во избежание нивелирования возможных протективных эффектов данного белка. После 24 ч сокульттивирования меченых CellTracker Green моноцитов с ЭК-ВГА проточные камеры пятикратно промывали в среде EndoLife для отмычки от несвязавшихся моноцитов и окрашивали в среде EndoLife с красителем ядер Hoechst 33342 (5 мкг/мл, H3570, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 20 мин. Таким образом,

Hoechst 33342 (краситель ядер с синим свечением) окрашивал и ЭК, и моноциты, а CellTracker Green (краситель ядер с зеленым свечением) только моноциты. Далее проточные камеры трижды промывали в среде EndoLife для повторной отмычки от несвязавшихся моноцитов и несвязавшегося красителя с последующей визуализацией при помощи эпифлюоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1. При микрофотосъемке снимали по 15 полей зрения на проточную камеру (60 полей зрения на все экспериментальные группы за каждый запуск системы пульсирующего потока).

### Анализ генной экспрессии

Обратную транскрипцию выделенной РНК выполняли с использованием набора для синтеза кДНК M-MuLV-RH First Strand cDNA Synthesis Kit (R01-250, ЗАО «ЕвроГен», Россия) и обратной транскриптазы M-MuLV-RH (R03-50, ЗАО «ЕвроГен», Россия). Измерение генной экспрессии проводили при помощи количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции с использованием самостоятельно разработанных праймеров (500 нмоль/л каждый, ЗАО «ЕвроГен», Россия; табл. 1), кДНК (20 нг) и мастер-микса BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR (MHR031-

**Таблица 1.** Последовательности праймеров для количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции  
**Table 1.** Primer sequences for the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Ген / Gene	Прямой праймер / Direct primer	Обратный праймер / Reverse primer
<b>Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines</b>		
<i>IL1B</i>	5'-TGGCTTATTACAGTGGCAATG-3'	5'-GTGGTGGTCGGAGATTG-3'
<i>CXCL8</i>	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCTTAGCACTCCTTGGC-3'
<i>IL18</i>	5'-TCGGGAAGAGGAAAGGAACCTC-3'	5'-CTACTGGTTCAGCAGCCATCT-3'
<i>CCL2</i>	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3'
<i>CXCL1</i>	5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
<i>MIF</i>	5'-GGTGTCCGAGAACGTCAAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTACG-3'
<i>TNF</i>	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCC-3'	5'-GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC-3'
<b>Рецепторы к провоспалительным цитокинам / Receptors to pro-inflammatory cytokines</b>		
<i>IL1R1</i>	5'-GGCTGAAAAGCATAGAGGGAAAC-3'	5'-CTGGGCTCACAAATCACAGG-3'
<i>IL1R2</i>	5'-TGGCACCTACGTCTGCACTACT-3'	5'-TTGCGGGTATGAGATGAACG-3'
<i>IL6R</i>	5'-GCACGCCCTGGACAGAAATCC-3'	5'-ACTGGGAGGCTGTCGCATT-3'
<i>TNFRSF1B</i>	5'-GTCCACACGATCCAACAC-3'	5'-CACACCCACAATCAGTCAA-3'
<i>CD40</i>	5'-TGTCCATCAGCAGGAGACTG-3'	5'-ACCCTTCCAGAACCCCTTGTT-3'
<i>CD40LG</i>	5'-CCAGGTGCTTCGGTGTGTTGT-3'	5'-ATGGCTCACTTGGCTTGGAT-3'
<b>Молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов) / Cell adhesion molecules (leukocyte receptors for endothelial cells)</b>		
<i>ITGA4</i>	5'-TCGGAAAGAATCCCGGCCAGA-3'	5'-CCTGGCTGTCTGGAAAGTGTG-3'
<i>ITGB1</i>	5'-GTGAATGCCAAAGCGAAGGC-3'	5'-ACCAACACGCCCTTCATTGC-3'
<i>ITGB2</i>	5'-GACAGCAAGTGGACTCCGA-3'	5'-GCTGCTGACCTTGAACCTCG-3'
<i>ITGAM</i>	5'-TTCTGGCTCCTCCAGCCAT-3'	5'-CCCCTTGCCTCTCTTGGAA-3'
<i>SELPG</i>	5'-ACAGGCTGAGTCCTTGTGCTA-3'	5'-AGGAGTTGCAGAACATGGCA-3'
<b>Гены «домашнего хозяйства» / Housekeeping genes</b>		
<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'

2040, ООО «Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой биологической повторности ( $n = 18$ , по числу лунок в эксперименте) при измерении уровня генной экспрессии выполняли три технических повторности. Количественный анализ уровней мРНК генов интереса в лизате моноцитов человека (измерение относительных уровней транскриптов генов *IL1B*, *CXCL8*, *IL18*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *TNF*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL6R*, *TNFRSF1B*, *CD40*, *CD40LG*, *ITGA*, *ITGB1*, *ITGB2*, *ITGAM*, *SELPG*) проводили посредством пересчета их экспрессии относительно экспрессии референсных генов (*ACTB*, *GAPDH* и *B2M*) по методу  $2^{-\Delta Ct}$ . Для расчета кратности изменения экспрессии (fold change) относительно группы сравнения (инкубированные с ФСБД клетки) проводили расчет показателя  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . 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.

#### Дот-блот-профилирование

Для повышения концентрации цитокинов при дот-блот-профилировании производили обогащение бессывороточной среды EndoLife до равных объемов (для среды от ЭК – в 3 раза, с 3 до 1 мл; для среды от моноцитов – в 7 раз, от 14 до 2 мл) в каждой из экспериментальных групп при помощи ее вакуумного центрифужного концентрирования (HyperVAC-LITE, Gyrozen Co. Ltd, Южная Корея). Скрининговый полуколичественный анализ содержания цитокинов, выделяемых ЭК и моноцитами в культуральную среду, выполняли с использованием наборов для дот-блот-профилирования Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя (1 мл обогащенной культуральной среды на образец). Хемилюминесцентную детекцию результатов дот-блоттинга проводили при помощи системы визуализации Odyssey XF (LI-COR Biosciences, США). Денситометрический анализ хемилюминесцентной съемки результатов дот-блоттинга выполняли в программе ImageJ (National Institutes of Health, США) после бинаризации изображения с использованием следующей последовательности команд: инвертирование цвета изображения (edit – invert) – выделение области фонового свечения (rectangular selection) – изменение интенсивности фонового свечения – вычитание интенсивности фонового свечения (process – math – subtract) – обратное инвертирование цвета изображения до исходного (edit – invert) – собственно денситометрия областей интереса (analyze

– gels – select first lane – analyze – gels – plot lanes – wand – выделение площади пика). Использование бессывороточной среды позволяло отмыть остаточные компоненты ФБС и избежать неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами как при дот-блоттинге, так и при иммуноферментном анализе.

#### Анализ системного воспалительного ответа крыс Wistar на добавление $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф

В хвостовую вену самцов крыс Wistar (масса 500 г, объем циркулирующей крови  $\sim 32,5$  мл из расчета 6,5% от массы тела крысы) добавляли  $\text{Ca}^{2+}$  (с использованием  $\text{CaCl}_2$  в качестве донора), КПМ-Ф или КПЧ-Ф в дозировке 5 мкг кальция на 1 мл циркулирующей крови крысы (162,5 мкг кальция на крысу) и проводили инкубацию в течение часа. В качестве контрольной группы использовали крыс, в хвостовую вену которых вводили аналогичный объем ФСБД. В состав каждой из инъекций также добавлялось соответствующее средней концентрации фетуина-А в ретентате количество БСФ (7,08 мг) во избежание нивелирования возможных протективных эффектов данного белка. После одночасового наблюдения крыс выводили из эксперимента под изофлурановым наркозом и забирали кровь из почечной вены с ее последующим центрифугированием при  $1\ 700 \times g$  в течение 15 мин для выделения сыворотки (MiniSpin Plus, Eppendorf, Германия). С учетом индивидуальных различий в интенсивности системного воспалительного ответа эксперимент повторяли 5 раз (по 5 крыс на экспериментальную группу, всего 20 крыс). Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови крыс выполняли с использованием наборов для дот-блот-профилирования Proteome Profiler Rat XL Cytokine Array (ARY030, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя (1 мл необогащенной культуральной среды на образец). Хемилюминесцентную детекцию результатов дот-блоттинга проводили при помощи системы визуализации Odyssey XF (LI-COR Biosciences, США). Денситометрический анализ хемилюминесцентной съемки результатов дот-блоттинга выполняли в программе ImageJ (National Institutes of Health, США) по вышеуказанному алгоритму.

#### Результаты

Аналогично ранее проведенным экспериментам с альбуминовыми КПМ и КПЧ при моделировании минерального стресса была получена система, в которой ионы кальция были свободно распределены по трем состояниям: циркулируя в свободном виде ( $\text{Ca}^{2+}$ ) либо находясь в составе КПМ-Ф (коллоидное первичное депо) или КПЧ-Ф (корпускулярное вторичное депо). Сканирующая электронная микроскопия продемонстрировала сферическую форму

КПЧ-Ф и их визуальное сходство с КПЧ, выделенными ранее из атеросклеротических бляшек и сыворотки крови, подтверждая ведущую роль фетуина-А в синтезе КПЧ (рис. 1).

В результате последовательного ультрацентрифугирования и ультрафильтрации были получены корпуксуллярные КПЧ-Ф (осадок после ультрацентрифугирования), коллоидные КПМ-Ф (ретентат) и  $\text{Ca}^{2+}$  (фильтрат). По аналогии с экспериментами прошлого года для всех последующих экспериментов с КПМ-Ф и КПЧ-Ф была использована доза добавляемого кальция, вызывающая повышение молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (относительно контрольной среды без добавления кальция) на 10% (что соответствует относительной разнице между рисковым верхним и протективным нижним квартилем по этому показателю в популяции). *In vitro* моделирование с  $\text{CaCl}_2$  в качестве донора  $\text{Ca}^{2+}$  показало, что искомое повышение молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  на 10% в бессывороточной культуральной среде для ЭК и моноцитов EndoLife и в сыворотке крови крысы при добавлении средней концентрации фетуина-А в ретентате (28 мг/мл) достигалось посредством добавления кальция в концентрации 5 мкг/мл (рис. 2). Именно концентрация в 5 мкг кальция на 1 мл культуральной среды или сыворотки крови и была далее выбрана для проведения экспериментов по оценке интернализации КПМ-Ф и КПЧ-Ф ЭК, а также по анализу патогенных эффектов добавляемого в различных формах ( $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф) кальция для ЭК, моноцитов и крыс. Следует отметить, что физиологическое повышение молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке крови человека на 10% (~0,12 ммоль/л) также соответствует выбранной экспериментальной концентрации кальция (4,8, то есть ~5 мкг/мл). Для объективного исследования воздействия различных видов кальциевого стресса все эксперименты включали четыре экспериментальные группы: 1) контрольный раствор ФСБД; 2) свободные ионы

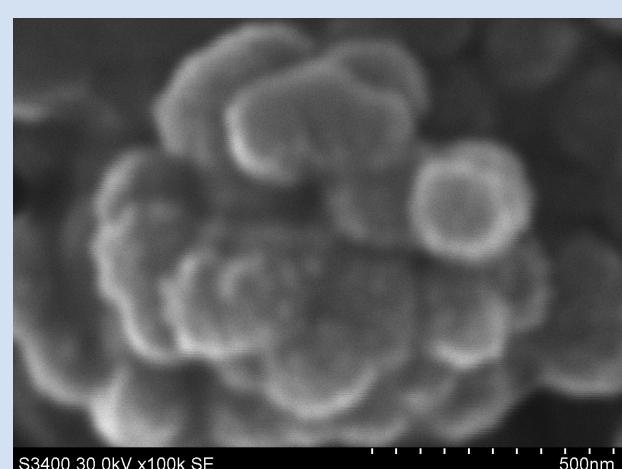


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия КПЧ-Ф  
Figure 1. Scanning electron microscopy of CPP-F

кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ , с использованием  $\text{CaCl}_2$  в качестве донора); 3) КПМ-Ф; 4) КПЧ-Ф.

Далее проведено полуколичественное профилирование широкого спектра провоспалительных молекул в аналогичных условиях. После дополнительного обогащения культуральной среды методом дот-блот-профилирования удалось выявить еще несколько молекул, выделение которых ЭК-КА и ЭК-ВГА также повышалось при воздействии КПМ-Ф и КПЧ-Ф (рис. 3, 4; табл. 2). В числе данных молекул были растворимые формы мембранных рецепторов ЭК CD105 (эндоглин) и CD147 (басигин), а также фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF). В сравнении с ЭК-КА ЭК-ВГА продемонстрировали существенно более выраженный ответ на воздействие КПМ-Ф и КПЧ-Ф (см. рис. 4; табл. 2). В частности, ЭК-ВГА характеризовались повышением выделения в культуральную среду провоспалительных цитокинов

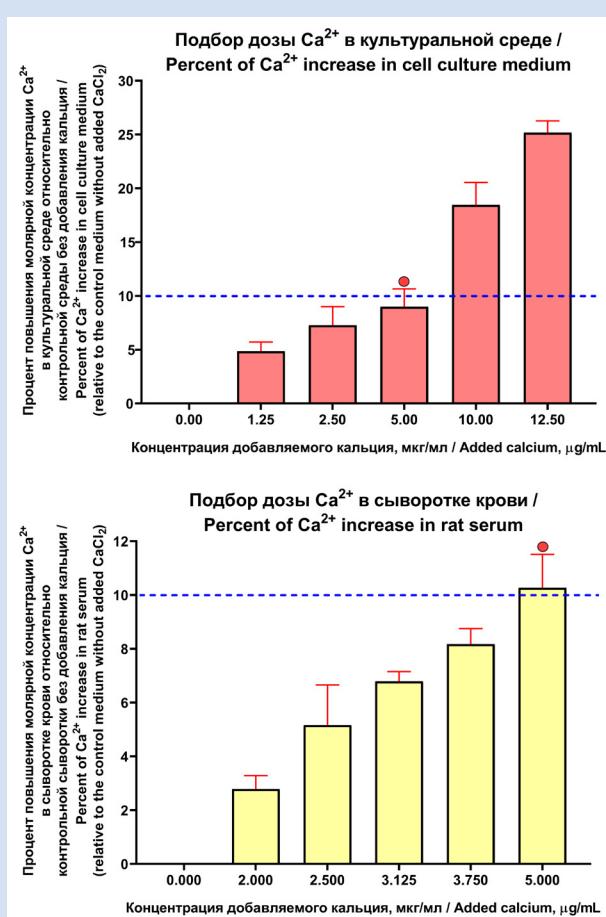
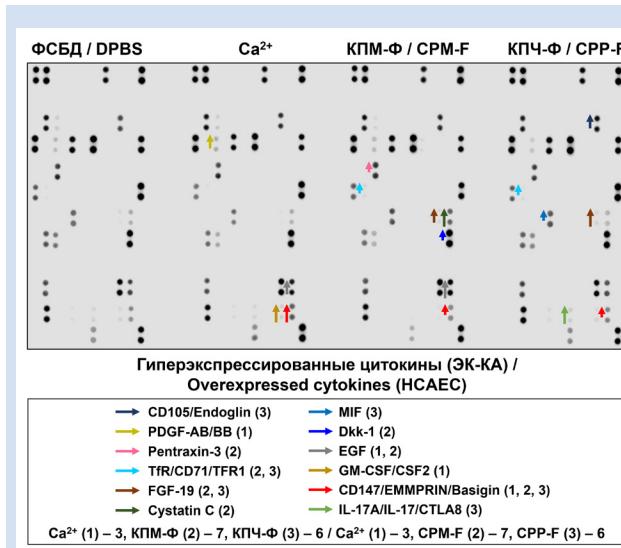


Рисунок 2. Подбор физиологически релевантной экспериментальной концентрации кальция, добавляемого в бессывороточную культуральную среду (сверху) и сыворотку крови крысы (снизу). Повышение молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  на 10% (отражаемое синей пунктирной линией) достигалось посредством добавления 5 мкг кальция на 1 мл (концентрация отмечена красным кругом) культуральной среды или сыворотки крови крысы

Figure 2. Selection of pathophysiological concentration of calcium added to the serum-free cell culture medium (top) and rat serum (bottom). 10% increase in molar concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (blue dotted line) is achieved by the addition of 5  $\mu\text{g}$  calcium (marked by red circle) per 1 mL cell culture medium or rat serum

гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), протромботической растворимой формы рецептора урокиназы (uPAR), растворимых форм конститутивного эндотелиального маркера CD31 (PECAM-1) и индуцибельного эндотелиального маркера VCAM-1 (CD106), а также проангиогенных факторов ангиогенина, ангиопоэтина-2, фактора роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF-AB/BB) и стромально-клеточного фактора роста (SDF-1 $\alpha$ ), антиангиогенных факторов цистатина С и дипептидилпептидазы IV при воздействии КПМ-Ф и КПЧ-Ф (см. рис. 4; табл. 2). В совокупности данные иммуноферментного анализа и дот-блоттинга свидетельствуют о



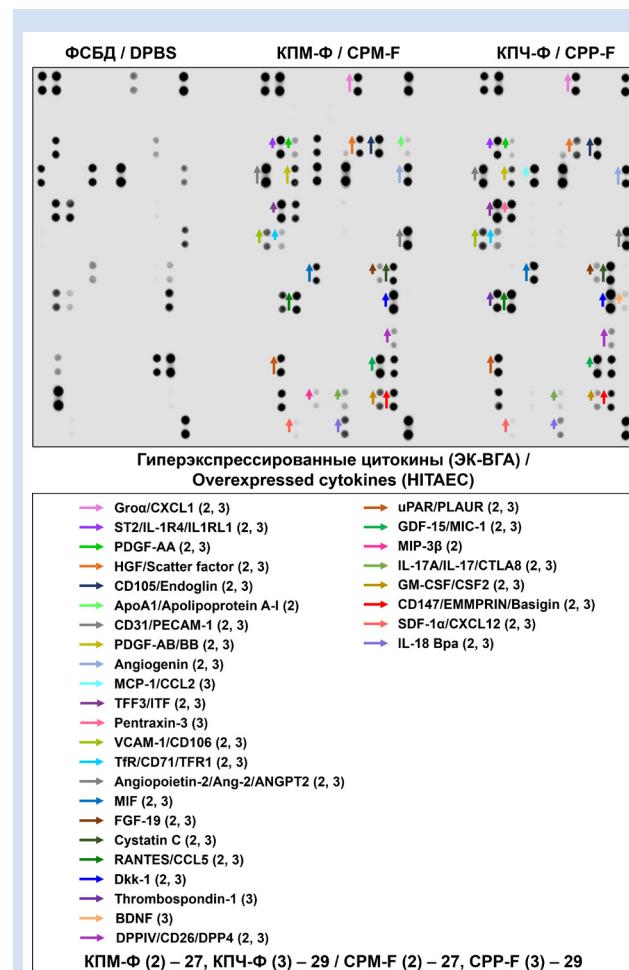
**Рисунок 3.** Полуколичественное измерение уровня провос-  
палительных цитокинов методом дот-блоттинга в обога-  
щенной (в 3 раза) бессывороточной культуральной среде от  
ЭК-КА, инкубированных с контрольным ФСБД без кальция  
и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция  
на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержа-  
нием кальция (5 мкг/мл) в течение 24 ч

**Примечание:** здесь далее на рис. 4, 5, 8 – список гиперэкспрессированных в культуральной среде цитокинов расположены под рисунком; длина стрелок отражает результаты денситометрического анализа хемилюминесцентной съемки в программе ImageJ. Короткие, средние и длинные стрелки эквивалентны бледно-розовому, пурпурно-розовому и красному цвету в табл. 2, обозначают кратность изменения 1,20–1,34, 1,35–1,49 и  $\geq 1,50$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе и наличии его экспрессии в экспериментальных группах значения денситометрии до 9 000 условных единиц обозначены короткими стрелками.

**Figure 3.** Semi-quantitative measurement of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the 3-fold enriched serum-free cell culture supernatant from primary HCAEC incubated with control DPBS without calcium and magnesium (or excessive calcium (5  $\mu$ g calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F for 24 hours

**Note:** here and further on Figure 4, 5, 8 – overexpressed cytokines are noted by the colored arrows and are specified at the bottom. Arrow length indicates the results of densitometry analysis in the ImageJ software. Short, medium, and long arrows correspond to pink, coral, and red colors in the Table 2 and to the fold change from 1.20 to 1.34, 1.35 to 1.49, and  $\geq 1.50$ , respectively, as compared to densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary units, it was denoted by a short arrow.

выраженном провоспалительном ответе ЭК-КА и ЭК-ВГА на кальциевый стресс и об его паракринных последствиях: 1) повышенном выделении индуцильных провоспалительных цитокинов (интерлейкин-6, интерлейкин-8, MCP-1/CCL2, CCL5/



**Рисунок 4.** Полуколичественное измерение уровня провоспалительных цитокинов методом дот-блоттинга в обогащенной (в 3 раза) бессывороточной культуральной среде от первичных ЭК-ВГА, инкубированных с контрольным ФСБД без кальция и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл) в течение 24 ч

**Примечание:** короткие, средние и длинные стрелки эквивалентны бледно-розовому, пурпурно-розовому и красному цвету в табл. 3, обозначают кратность изменения 1,20–1,49, 1,50–1,99 и  $\geq 2,00$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе и наличии его экспрессии в экспериментальных группах значения денситометрии до 9 000 условных единиц обозначены короткими стрелками, 9 001–19 499 условных единиц – средними стрелками, 19 500 условных единиц и более – длинными стрелками.

**Figure 4.** Semi-quantitative measurement of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the 3-fold enriched serum-free cell culture supernatant from primary HITAEC incubated with control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu$ g calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F for 24 hours

**Note:** Short, medium, and long arrows correspond to pink, coral, and red colors in the Table 2 and to the fold change from 1.20 to 1.49, 1.50 to 1.99, and  $\geq 2.00$ , respectively, as compared to densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary units, from 9001 to 14999 arbitrary units, and  $\geq 19500$  arbitrary units, it was denoted by short, medium, and long arrows, respectively.

**Таблица 2.** Дентопиогетический полупищечный анализ результатов измерения уровня провоспалительных цитокинов (метод дол-блот-профилирования, хемилуминесцентная съемка) в обогащенной (в 3 раза) бессывороточной культуральной среде от первичных ЭК-КА (слева) и ЭК-ВГА (справа), инкубированных с контролем ФСБД без кальция и с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг/мл) в течение 24 ч

ОРИГИНАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ

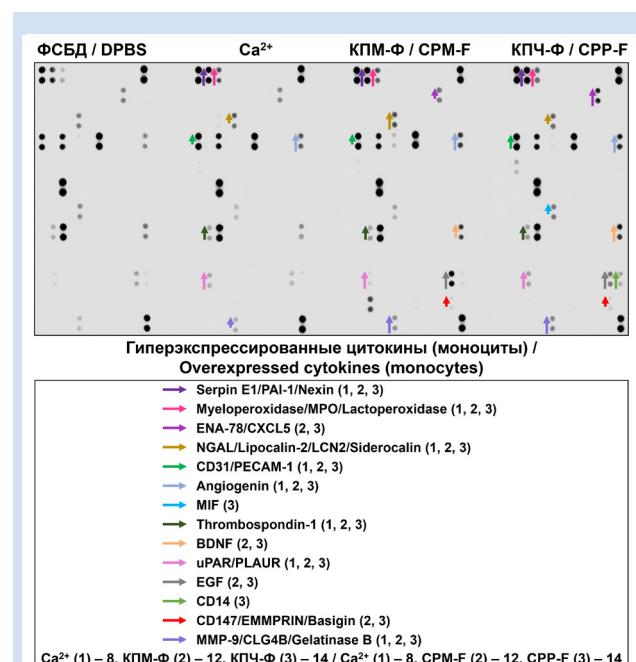
RANTES, GM-CSF) и optionalном повышении выделения конститутивных провоспалительных цитокинов (CXCL1/GRO $\alpha$ , MIF); 2) повышенном выделении растворимых форм эндотелиальных рецепторов CD105 (эндоглин), CD147 (басигин), CD31 (PECAM-1) и VCAM-1 (CD106), свидетельствующих о клеточной гибели или патологическом слущивании данных рецепторов с клеточной мембраны в культуральную среду; 3) проангиогенных факторов (ангиогенин, ангиопоэтин-2, фактор роста гепатоцитов, тромбоцитарный фактор роста, стромально-клеточный фактор роста).

Изучение патофизиологической значимости вышеуказанных паракринных последствий, а также циркуляции КПМ и КПЧ в системном кровотоке потребовало параллельной оценки эффектов воздействия кальциевого стресса на моноциты. Анализ генной экспрессии после инкубации моноцитов с избыточным количеством  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф или КПЧ-Ф (5 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) в системе пульсирующего потока (15 дин/см $^2$ ) показал повышение экспрессии генов трансмембранных молекул, косвенно (*CD40*) или напрямую (*ITG44*, *ITGB1*, *SELP*) вовлеченных в связывание с соответствующими рецепторами на поверхности ЭК (VCAM-1, ICAM-1, E-селектин/SELE, P-селектин/SELP), после воздействия КПЧ-Ф, но не  $\text{Ca}^{2+}$  или КПМ-Ф. Данные гиперэкспрессированные гены кодируют субъединицу CD49d (*ITG44*) и субъединицу CD29 (*ITGB1*) моноцитарного рецептора VLA-4, связывающегося с VCAM-1, а также моноцитарный рецептор PSGL-1/CD162, связывающийся с P- и E-селектином (*SELP*) (табл. 3).

Полученные результаты позволили предположить провоспалительную активацию моноцитов при их инкубации с КПЧ-Ф и обосновали необходимость полуколичественного измерения уровня моноцитарных провоспалительных молекул в бессывороточной культуральной среде из этого эксперимента. По аналогии с ЭК воздействие кальциевого стресса (в большей степени КПМ-Ф и КПЧ-Ф) приводило к повышению выделения моноцитами провоспалительных (липокалин-2/NGAL, матриксная металлопротеиназа-9, миелопероксидаза), проангиогенных (ангиогенина, нейротрофический фактор мозга) и протромботических молекул ( растворимая форма рецептора урокиназы uPAR, ингибитор активатора плазминогена PAI-1, тромбоспондин-1) (рис. 5; табл. 4). В совокупности результаты анализа генной экспрессии и дот-блоттинга указывали на потенциальную синергию функциональных последствий провоспалительной активации ЭК и моноцитов в контексте повышенного выделения провоспалительных, проангиогенных и протромботических молекул в культуральную среду, а также повышенной экспрессии генов рецепторов ЭК для моноцитов (*VCAM1*, *SELE*, *SELP*) и ге-

нов рецепторов моноцитов для ЭК (*ITGB1*, *ITGA4*, *SELP*).

Для проверки гипотезы о патофизиологической значимости параллельной провоспалительной активации ЭК и моноцитов под воздействием кальциевого стресса проведен анализ адгезии моноцитов к ЭК после их 24-часовой совместной инкубации в системе пульсирующего потока (15 дин/см $^2$ ) с  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф или КПЧ-Ф (5 мкг кальция на 1 мл культуральной среды). Светлопольная микроскопия показала повышенное соотношение адгезированных моноцитов к ЭК в результате воздействия всех видов кальциевого стресса, подтверждая релевантность соответствующей провоспалительной активации ЭК и моноцитов для развития дисфункции



**Рисунок 5.** Полуколичественное измерение уровня провоспалительных цитокинов методом дот-блоттинга в обогащенной (в 7 раз) бессывороточной культуральной среде от первичных моноцитов человека, инкубированных с контрольным ФСБД без кальция и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл) в течение 24 ч в системе пульсирующего потока (15 дин/см $^2$ )

**Примечание:** горючие, средние и длинные стрелки эквивалентны бледно-розовому, пурпурно-розовому и красному цвету в табл. 4, обозначают кратность изменения 1,20–1,34, 1,35–1,49 и  $\geq 1,50$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе и наличии его экспрессии в экспериментальных группах значения денситометрии до 9000 условных единиц обозначены короткими стрелками.

**Figure 5.** Semi-quantitative densitometry analysis of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the 7-fold enriched serum-free cell culture supernatant from human monocytes, incubated with control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F at pulsatile flow (15 dyn/cm $^2$ ) for 24 hours

**Note:** Short, medium, and long arrows correspond to pink, coral, and red colors in the Table 4 and to the fold change from 1.20 to 1.34, 1.35 to 1.49, and  $\geq 1.50$ , respectively, as compared to densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary units, it was denoted by a short arrow.

**Таблица 3.** Результаты анализа генной экспрессии при воздействии различных видов кальциевого стресса – повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф (5 мкг/мл), КПЧ-Ф (5 мкг/мл) – на первичные моноциты человека в системе пульсирующего потока (напряжение сдвига 15 дин/см<sup>2</sup>) в течение 24 ч

**Table 3.** Analysis of gene expression in the human monocytes incubated with control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F at pulsatile flow (15 dyn/cm<sup>2</sup>) for 24 hours

Ген / Gene	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	ФСБД / DPBS	$\text{Ca}^{2+}$	КПМ-Ф / CPM-F	КПЧ-Ф / CPP-F
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation				
	Кратность изменения / Fold change				
	p				
<b>Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines</b>					
<i>IL1B</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0531	0,0853	0,0814	0,1427
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0402	0,0841	0,1129	0,0863
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,61	1,53	2,69
	p	1,00	0,747	0,945	0,338
<i>CXCL8</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	3,6160	2,5740	3,6020	5,4640
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	1,7420	1,5760	1,4480	4,5210
	Кратность изменения / Fold change	1,00	0,71	1,00	1,51
	p	1,00	0,523	0,948	0,638
<i>IL18</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0325	0,0326	0,0217	0,0678
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0270	0,0054	0,0141	0,0859
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,00	0,67	2,09
	p	1,00	0,562	0,493	0,172
<i>CCL2</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,9865	1,0440	0,7982	2,2880
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,9930	0,8284	0,4228	3,1310
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,06	0,81	2,32
	p	1,00	0,626	0,847	0,149
<i>CXCL1</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0303	0,0298	0,0332	0,0614
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0208	0,0053	0,0105	0,0398
	Кратность изменения / Fold change	1,00	0,98	1,09	2,03
	p	1,00	0,665	0,676	0,148
<i>MIF</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,1759	0,3139	0,2678	4,5210
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,1020	0,1239	0,3349	7,6040
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,78	1,52	25,70
	p	1,00	0,089	0,833	0,146
<i>TNF</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0109	0,0174	0,0096	0,0113
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0084	0,0110	0,0025	0,0111
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,61	0,88	1,04
	p	1,00	0,425	0,914	0,639
<b>Рецепторы к провоспалительным цитокинам / Receptors for pro-inflammatory cytokines</b>					
<i>IL1R1</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0153	0,0220	0,0079	0,0278
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0129	0,0350	0,0022	0,0296
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,43	0,51	1,81
	p	1,00	0,747	0,494	0,657
<i>IL1R2</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,7500	0,7705	0,6182	1,6410
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,7621	0,3804	0,3281	1,8570
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,03	0,82	2,19
	p	1,00	0,435	0,621	0,283

<i>IL6R</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0709	0,1213	0,1917	0,1573
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0703	0,0864	0,1854	0,1687
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,71	2,70	2,22
<i>TNFRSF1B</i>	p	1,00	0,421	0,131	0,334
	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,6051	1,1850	0,6858	1,1930
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,3780	0,4578	0,3385	0,6602
<i>CD40</i>	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,96	1,13	1,97
	p	1,00	0,113	0,675	0,109
	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0566	0,1726	0,3735	0,3790
<i>CD40LG</i>	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0459	0,1881	0,4215	0,4094
	Кратность изменения / Fold change	1,00	3,05	6,60	6,69
	p	1,00	0,177	0,118	0,002
<i>ITG44</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0080	0,0066	0,0181	0,0705
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0078	0,0051	0,0173	0,1161
	Кратность изменения / Fold change	1,00	0,83	2,26	8,84
<i>ITGB1</i>	p	1,00	0,713	0,834	0,217
	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,6257	0,9419	0,5883	0,9306
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,2852	0,304	0,3203	0,4799
<i>ITGB2</i>	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,51	0,94	1,49
	p	1,00	0,084	0,928	0,271
	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0278	0,1635	0,1326	0,0846
<i>ITGAM</i>	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0214	0,2633	0,1813	0,1012
	Кратность изменения / Fold change	1,00	5,88	4,77	3,04
	p	1,00	0,301	0,176	0,037
<i>SELPG</i>	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0206	0,0261	0,0264	0,0314
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0071	0,0072	0,0196	0,0283
	Кратность изменения / Fold change	1,00	1,27	1,29	1,53
	p	1,00	0,456	0,914	0,817
	$\Delta\text{Ct}$ , среднее арифметическое / $\Delta\text{Ct}$ , arithmetic mean	0,0009	0,0059	0,0052	0,0017
	$\Delta\text{Ct}$ , стандартное отклонение / $\Delta\text{Ct}$ , standard deviation	0,0008	0,0107	0,0077	0,0012
	Кратность изменения / Fold change	1,00	6,85	5,99	1,93
	p	1,00	0,454	0,229	0,024

**Примечание:** в качестве контрольной группы использованы моноциты, к которым добавляли контрольный ФСБД без кальция и магния. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции, нормализация на гены «домашнего хозяйства» (GAPDH, ACTB, B2M). Представлены относительный уровень экспрессии генов, кратность изменения экспрессии и статистическая значимость генов, кодирующих провоспалительные молекулы клеточной адгезии (VCAM1, ICAM1, SEL1, SELP), провоспалительные цитокины (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF), endothelial-to-mesenchymal перехода (SNAII, SNA12, TWIST1, ZEB1), протромботические молекулы (VWF, SERPINE1) и антипротромботические молекулы (PLAU, PLAT). Однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением всех экспериментальных групп ( $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф, КПЧ-Ф) с контрольной группой (ФСБД) по критерию Дненета. Статистически значимые различия (значения  $\Delta\text{Ct}$ , кратности изменения и значения p) отмечены розовым цветом и выделены жирным шрифтом.

**Note:** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), normalization for housekeeping genes (GAPDH, ACTB, B2M). Relative level of gene expression ( $\Delta\text{Ct}$ ), fold change, and P value are provided for each gene encoding pro-inflammatory cell adhesion molecules (VCAM1, ICAM1, SEL1, SELP), pro-inflammatory cytokines (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF), endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors (SNAII, SNA12, TWIST1, ZEB1), proteolytic molecules (VWF, SERPINE1), and anti-thrombotic molecules (PLAU, PLAT). One-way analysis of variance with the further pairwise comparison of  $\text{Ca}^{2+}$ , CPM-F, and CPP-F groups with DPBS group with Dunnett's multiple comparisons test. Statistically significant differences ( $\Delta\text{Ct}$  values, fold change, and P values) are marked pink and bold.

эндотелия (рис. 6, 7). Следует отметить выраженное провоспалительное действие КПМ-Ф и КПЧ-Ф (7 гиперэкспрессированных провоспалительных молекул при воздействии КПМ-Ф и 6 таких молекул при воздействии КПЧ-Ф на модели ЭК-КА, 27 и 29 на модели ЭК-ВГА и 12 и 14 соответственно на модели моноцитов). Таким образом, в отношении моделей *in vitro* (клеточным культурам) правомерно указать на наличие провоспалительных эффектов и у КПМ-Ф, и у КПЧ-Ф. При этом паракринные провоспалительные эффекты (повышение выделения провоспалительных, протромботических и проангиогенных молекул и растворимых форм эндотелиальных рецепторов) сопровождались повышением экспрессии генов рецепторов адгезии моноцитов к

ЭК и собственно повышением адгезии моноцитов к ЭК в условиях пульсирующего потока.

В соответствии с полученными на клеточных моделях результатами через час после внутривенного введения крысам Wistar КПМ-Ф или КПЧ-Ф (в концентрации 5 мкг на 1 мл циркулирующей крови) вызывали более выраженный провоспалительный сдвиг, чем свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (8 гиперэкспрессированных провоспалительных молекул при воздействии  $\text{Ca}^{2+}$ , 13 таких молекул при воздействии КПМ-Ф и 15 таких молекул при воздействии КПЧ-Ф; рис. 8; табл. 5). В число этих провоспалительных факторов входили растворимые формы эндотелиальных рецепторов (VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54), провоспалительные молекулы (CXCL7, CCL11/

**Таблица 4.** Денситометрический полуколичественный анализ результатов измерения уровня провоспалительных цитокинов (метод дот-блот-профилирования, хемилюминесцентная съемка) в обогащенной (в 7 раза) бессывороточной культуральной среде от первичных моноцитов человека, инкубированных в системе пульсирующего потока (напряжение сдвига 15 дин/см<sup>2</sup>) с контрольным ФСБД без кальция и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл) в течение 24 ч

**Table 4.** Semi-quantitative densitometry analysis of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the 7-fold enriched serum-free cell culture supernatant from primary human monocytes incubated with control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F for 24 hours

Место на мемbrane / Position on the membrane	Анализируемая молекула / Analyte	ID гена / Gene ID	Альтернативное название молекулы / Alternative molecule name	ФСБД / DPBS	$\text{Ca}^{2+}$	Кратность изменения / Fold change	КПМ-Ф / CPM-F	Кратность изменения / Fold change	КПЧ-Ф / CPP-F	Кратность изменения / Fold change
A7,8	Angiogenin	283	—	7956,723	12896,52	1,62	17437,84	2,19	20350,03	2,56
A15,16	BDNF	627	—	10066,21	6979,601	0,69	14112,94	1,40	19090,61	1,90
A19,20	CD14	929	—	832,455		0,00	780,627	0,94	5412,188	6,50
B19,20	EGF	1950	—	6701,652	4607,853	0,69	33211,1	4,96	12731,28	1,90
B21,22	EMMPRIN	682	CD147, Basigin				1927,933	1927,93	2595,104	2595,104
C3,4	ENA-78	6374	CXCL5	14814,99	13552,38	0,91	17694,64	1,19	29478,96	1,99
E7,8	IL-8	3576	CXCL8	42132,68	40758,51	0,97	46654,35	1,11	37863,97	0,90
G5,6	Lipocalin-2	3934	NGAL, LCN2, Siderocalin	20406,96	24785,25	1,21	31437,91	1,54	25530,66	1,25
G13,14	MIF	4282	—	23244,2	10778,57	0,46	14693,52	0,63	30292,44	1,30
G23,24	MMP-9	4318	CLG4B, Gelatinase B	10921,45	15120,94	1,38	24383,37	2,23	29401,2	2,69
H1,2	Myeloperoxidase	4353	MPO, Lactoperoxidase	4033,318	13651,52	3,38	13966,89	3,46	13908,59	3,45
H7,8	PDGF-AB/BB	5154/5155	—	25714,15	26627,63	1,04	26711,58	1,04	25602,81	1,00
H11,12	PF4	5196	CXCL4	46854,63	47119,89	1,01	49134,7	1,05	50471,13	1,08
H15,16	RANTES	6352	CCL5	38865,21	41353,09	1,06	40254,56	1,04	40568,16	1,04
I1,2	Serpin E1	5054	PAI-1, PAI-1, Nelin	20863,66	33171,24	1,59	37595,43	1,80	40503,56	1,94
I15,16	Thrombospondin-1	7057	THBS1, TSP-1	4114,803	5811,53	1,41	5697,581	1,38	5823,601	1,42
I19,20	uPAR	5329	PLAUR	829,628	5920,945	7,14	1563,598	1,88	7388,602	8,91
I21,22	VEGF	7422	BEGFA				31736,56			
J7,8	CD31	5175	PECAM-1	28318,69	37524,02	1,33	36664,61	1,29	39782,75	1,40
J9,10	TIM-3	84868	HAVCR2		2368,125		3440,146		66992,67	

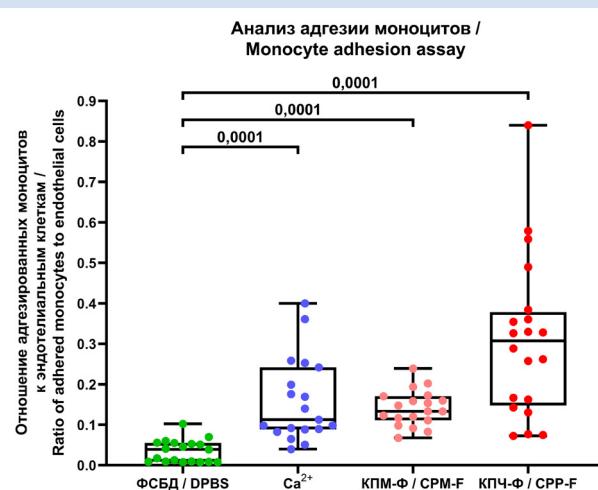
**Примечание:** Бледно-розовый, пурпурно-розовый и красный цвет эквивалентен коротким, средним и длинным стрелкам на рис. 5, обозначает кратность изменения 1,20–1,34, 1,35–1,49 и  $\geq 1,50$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе (условно обозначаемой в таблице как 1 условная единица) и наличии его экспрессии в экспериментальных группах значения денситометрии до 9 000 условных единиц в таблице выделяли бледно-розовым цветом и обозначали короткими стрелками на рис. 5.

**Note:** Pink color (equal to short arrows in the Figure 3) indicates fold change from 1,20 to 1,34, coral color (equal to medium arrows in the Figure 3) indicates fold change from 1,35 to 1,49, red color (equal to long arrows in the Figure 3) indicates fold change  $\geq 1,50$  as compared with densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group (1 arbitrary unit) and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary units, it was marked by a pink color in Table 3 and was denoted by a short arrow in the Figure 5.

этаксин, FLT3LG), протромботические молекулы (ингибитор активатора плазминогена PAI-1), матрикины (фибулин-3, остеопонтин, эндостатин, CCN3, матриксная металлопротеиназа-3), гепатокины (гепассоцин, фетуин-А, RBP4, инсулиноподобный фактор роста IGF-1 и связывающие его белки IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 и IGFBP-6), а также белки путей метаболизма (резистин, рецептор конечных продуктов гликирования, липокалин-2) (см. рис. 8; табл. 5). Сводный анализ результатов анализа цитокинов, гиперэкспрессированных в культуральной среде от ЭК и моноцитов и в сыворотке крови крыс при воздействии избыточного количества (5 мкг/мл)  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф, представлен в табл. 6.

## Обсуждение

Полученные в данном исследовании результаты подтвердили применимость ранее разработанного метода, подразумевающего одновременный синтез КПМ и КПЧ при перенасыщении белоксодержащего солевого раствора солями кальция ( $\text{CaCl}_2$ )

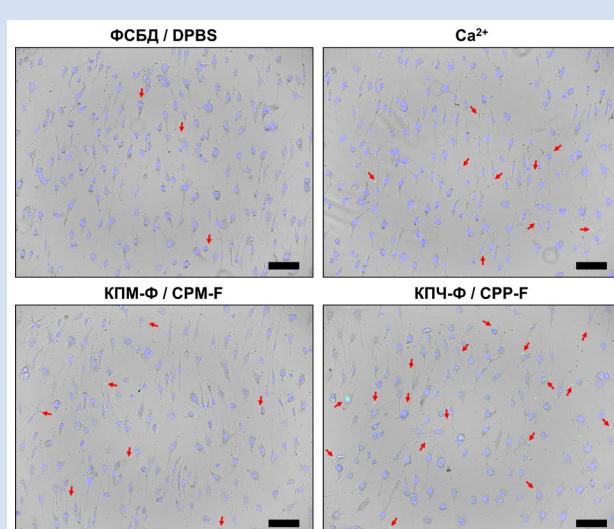


**Рисунок 6.** Анализ адгезии моноцитов к ЭК-ВГА человека после их совместной 24-часовой инкубации в системе пульсирующего потока (15 дин/см<sup>2</sup>) с параллельным добавлением контрольного ФСБД без кальция и магния, повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл). **Примечание:** каждая точка на графиках отражает анализ одного поля зрения ( $n = 19-20$  на группу). На графиках типа «ящик с усами» «усы» – минимальное и максимальное значения, границы «ящика» – межквартильный интервал (25-й и 75-й процентили), центральная линия – медиану. Критерий Краскела – Уолиса с последующим попарным сравнением всех экспериментальных групп ( $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф, КПЧ-Ф) с контрольной группой (ФСБД) по критерию Данна, значения  $p$  приведены над графиками.

**Figure 6.** Adhesion of monocytes to primary HITAEC after their co-incubation with control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^2$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F at pulsatile flow (15 dyn/cm<sup>2</sup>) for 24 hours

**Note:** Each dot on the plot represents one field of view ( $n = 19-20$  fields of view per group). Box-and-whisker plots, whiskers indicate minimum and maximum values, boxes bounds indicate the interquartile range (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles), and central line indicates the median. Kruskal-Wallis test with the further pairwise comparison of  $\text{Ca}^{2+}$ , CPM-F, and CPP-F groups with DPBS group with Dunn's multiple comparisons test.  $P$  values are provided above the plot.

и фосфора ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) и дальнейшее разделение кальциевых фракций путем последовательного отделения КПЧ от КПМ и  $\text{Ca}^{2+}$  при помощи ультраконцентрифугирования и отделения КПМ от  $\text{Ca}^{2+}$  посредством ультрафильтрации [5, 16] для получения фетуинсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$  со сниженной минеральной емкостью относительно альбуминсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$ , а также для получения КПМ-Ф и КПЧ-Ф. Применение указанного фетуинсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$  позволило использовать для моделирования кальциевого стресса дозу кальция (5 мкг/мл), соответствующую физиологически необходимой для повышения молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в циркулирующей крови человека на 10% (~0,12 ммоль/л, что соответствует межквартильному интервалу  $\text{Ca}^{2+}$  в популяции). Именно такая доза (5 мкг/мл) при использовании фетуинсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$  также повышала на 10% молярную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в культуральной среде для ЭК и моноцитов и сыворотке крови крыс Wistar. Таким образом, сравнение патологических эффектов фетуинсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$ , а также КПМ-Ф и



**Рисунок 7.** Светлопольная микроскопия первичных ЭК-ВГА человека после их совместной 24-часовой инкубации в системе пульсирующего потока (15 дин/см<sup>2</sup>) с моноцитами человека с параллельным добавлением контрольного ФСБД без кальция и магния, повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл).

**Примечание:** красные стрелки указывают на адгезированные к ЭК (очерченная геометрия клетки и синее ядро) моноциты (зеленый цвет). Моноциты мечены красителем CellTracker Green, ядра ЭК контрастированы Hoechst 33342. Увеличение  $\times 200$ . Шкала масштаба: 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 7.** Brightfield microscopy of primary internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) after their co-incubation with control Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (DPBS) or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as free calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ , added with  $\text{CaCl}_2$ ), fetuin-centric calciprotein monomers (CPM-F), or fetuin-centric calciprotein particles (CPP-F) at pulsatile flow (15 dyn/cm<sup>2</sup>) for 24 hours.

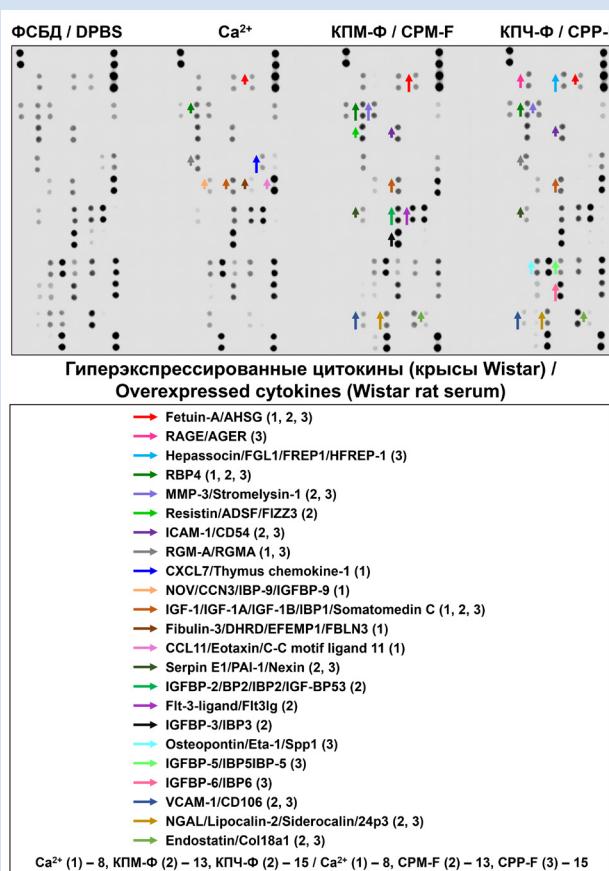
**Note:** Red arrows indicate monocytes (green color) adhered to endothelial cells (elongated geometry and blue color). Monocytes are labeled by CellTracker Green dye, endothelial cell nuclei are counterstained with Hoechst 33342.  $\times 200$  magnification. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

КПЧ-Ф действительно было патофизиологически и клинически релевантным.

При оценке результатов действия различных видов кальциевого стресса с альбуминовыми КПМ и КПЧ [5] в сравнении с КПМ-Ф и КПЧ-Ф на клеточных культурах следует отметить слабые провоспалительные эффекты патофизиологически релевантной избыточной молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в экспериментах *in vitro*. При анализе воздействия альбуминсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$  на ЭК и моноциты

выявлено повышенное выделение 4 и 3 провоспалительных цитокинов соответственно [5]. Воздействие фетуинсодержащего раствора  $\text{Ca}^{2+}$  на ЭК и моноциты приводило к увеличенному выделению 3 и 8 провоспалительных цитокинов соответственно. Значительно больший контраст наблюдался при сравнении эффектов альбуминовых КПМ (КПМ-А) и КПМ-Ф. В частности, воздействие КПМ-А на ЭК и моноциты вызывало повышение выделения 6 и 3 провоспалительных цитокинов соответственно [5], в то время как воздействие КПМ-Ф на ЭК и моноциты сопровождалось увеличением выделения 27 и 12 провоспалительных цитокинов соответственно. Патологическое воздействие КПЧ-А существенно превосходило таковое у КПМ-А, приводя к увеличению выделения 11 провоспалительных цитокинов при воздействии на ЭК и моноциты [5]. В то же время патологическое воздействие КПЧ-Ф и КПМ-Ф было близким и сопровождалось выделением 7 и 6 провоспалительных цитокинов соответственно при воздействии на ЭК-КА, 27 и 29 – на ЭК-ВГА, 12 и 14 – при воздействии на моноциты. Таким образом, при моделировании кальциевого стресса на клеточных культурах правомерно говорить о зависимости провоспалительных эффектов КПМ от их основного белка (невысокая выраженность таких эффектов у КПМ-А и высокая выраженность у КПМ-Ф) и о безусловных провоспалительных эффектах КПЧ вне зависимости от белков, входящих в их состав. При этом паракринные провоспалительные эффекты (повышение выделения провоспалительных, протромботических и проангиогенных молекул и растворимых форм эндотелиальных рецепторов) сопровождались: 1) повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов; 2) reciprocalным повышением экспрессии генов рецепторов адгезии ЭК к моноцитам (то есть соответствующих эндотелиальных молекул) [5] и генов рецепторов адгезии моноцитов к ЭК (то есть соответствующих моноцитарных молекул); 3) повышением экспрессии генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода, отражающего общий эндотелиальный стресс [5]; 4) повышением адгезии моноцитов к ЭК при соответствующем функциональном анализе в условиях пульсирующего потока.

Анализируя повышение выделения ЭК и моноцитами провоспалительных цитокинов и проангиогенных молекул под воздействием кальциевого стресса, следует отметить роль данных молекул в стимуляции пролиферации и миграции ЭК [17, 18], что может способствовать развитию патологического ангиогенеза [19–23]. Это частично пересекается с закономерностями пролиферации колониесформирующих ЭК, деление которых в первые дни после выделения из периферической крови в значительной степени зависит от моноцитов и лим-



**Рисунок 8.** Полуколичественное измерение уровня провоспалительных цитокинов методом дот-блоттинга в необогащенной сыворотке крови крыс Wistar через час после внутривенного введения контрольного ФСБД без кальция и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг/мл), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл)

**Примечание:** короткие, средние и длинные стрелки эквивалентны бледно-розовому, пурпурно-розовому и красному цвету в табл. 5, обозначают кратность изменения 1,20–1,34, 1,35–1,49, и  $\geq 1,50$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе и наличии его экспрессии в экспериментальных группах значения денситометрии до 9 000 условных единиц обозначены короткими стрелками.

**Figure 8.** Semi-quantitative densitometry analysis of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the serum of Wistar rats 1 hour after the intravenous injection of control DPBS without calcium and magnesium or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F

**Note:** Short, medium, and long arrows correspond to pink, coral, and red colors in the Table 5 and to the fold change from 1.20 to 1.34, 1.35 to 1.49, and  $\geq 1.50$ , respectively, as compared to densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary units, it was denoted by a short arrow.

**Таблица 5.** Денситометрический полуколичественный анализ результатов измерения уровня провоспалительных цитокинов (метод лот-блот-профильтрования, хемилуминесцентная съемка) в необогащенной сыворотке крови крысы через час после внутривенного введения контрольного ФСБД без кальция и магния, с повышенной концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл сыворотки крови), КПМ-Ф или КПЧ-Ф или с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл)

**Table 5.** Semi-quantitative densitometry analysis of pro-inflammatory cytokines by dot blotting in the rat serum 1 hour after the intravenous injection of control Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (DPBS) or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as free calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ , added with  $\text{CaCl}_2$ ), fetuin-centric calciprotein monomers (CPM-F), or fetuin-centric calciprotein particles (CPP-F)

Место на мемbrane / Position on the membrane	Анализируемая молекула / Analyte	ID гена / Gene ID	Альтернативное название молекулы / Alternative molecule name	Фосфат / DPBS	$\text{Ca}^{2+}$	Кратность изменения / Fold change	КПЧ-Ф / CPP-F	Кратность изменения / Fold change
A3.4	Adiponectin/Acrsp30	246253	AdipoQ	48054747	46049,061	0,96	49860,233	1,04
A5.6	CCL2/IE/MCP-1	24770	MCAF	7380,531	7710,117	1,04	2710,589	0,37
A9,10	CCL5/RANTES	81780	SI5d	8568,894	1146,941	0,13	5523,802	0,64
A11,12	CCL11/Eotaxin	29397	C-C motif ligand 11	30461,857	38480,434	1,26	27144,099	0,89
A17,18	CCL21/6Ckine	29806	C-C motif ligand 21	25993,543	30082,321	1,16	16059,158	0,62
A19,20	CCL22/MDC	117551	ABCD-1, STCP-1	29735,543	28660,200	0,96	8506,016	0,29
B9,10	CXCL7/Thymus chemoattractant-1	246358	—	1761,104	5549,752	3,15	0,00	847,284
B13,14	Cystatin C	25307	ARMID11, CST3	31134,836	27163,300	0,87	30565,492	0,98
B21,22	Endostatin	85251	Col18a1	1,0	0,00	1,928,397	1928,40	1189,184
C3,4	Fetuin-A/AHSG	25373	—	3989,146	4861,631	1,22	6491,238	1,63
C11,12	Fibulin-3	305604	DHRD, EFEMP1, FBLN3	1,0	1183,012	1183,01	0,00	5146,338
C13,14	Fit3 Ligand	100363556	Flt3 Ig	16023,451	16387,865	1,02	25758,300	1,61
C15,16	Galectin-1	56646	GAL1, GBP, HBL, LGALS1	1669,155	0,00	0,00	6323,631	0,39
C17,18	Galectin-3	83781	AGE-R3, L-31, GAL3	16062,866	9721,844	0,61	10772,915	0,45
C21,22	GDF-15	29455	MIC-1	23915,250	1670,619	0,07	4616,773	0,84
D3,4	Hepassocin	246186	FGL1, FREP1, HFREP-1	5471,288	5957,924	1,09	9212,380	1,68
D7,8	ICAM-1/CD54	25464	—	15931,694	14851,450	0,93	21150,350	1,33
D11,12	IGF-1	24482	IBP1, IGF-1A, IGF-1B, Sematomedin C	8645,773	10424,501	1,21	12808,794	1,48
D13,14	IGFBP2	25662	BP2, IBP2, IGF-BP53	14449,743	14284,501	0,99	23477,300	1,62
D15,16	IGFBP3	24484	IBP3	27082,200	30382,392	1,12	36826,534	1,36
D17,18	IGFBP5	25285	IBP5/IBP5-	6143,238	38333,731	0,62	3881,539	0,63
D19,20	IGFBP6	25641	IBP6	18408,522	15395,866	0,84	20170,401	1,10
E17,18	Jagged 1	29146	AGS, CD339	30848,664	29202,371	0,95	29244,613	0,95
E21,22	Lipocalin-2/NGAL	170496	Siderocalin, 24p3	6849,117	0,00	10603,208	1,55	10562,209
E23,24	LIX	60565	CXCL5, GCP-2, FNA-78	31750,685	27383,422	0,86	37689,898	1,19
F5,6	MMP-3	171045	Stromelysin-1	8684,258	8993,359	1,04	14389,330	1,66
F11,12	NOV/CCN3	81526	IBP-9, IGFBP-9	2727,003	3290,489	1,21	2703,589	0,99
F17,18	Osteopontin	25353	Eta-1, Spp1	10664,551	8388,773	0,79	7516,409	0,70
F19,20	Osteoprotegerin/TNFSF11B	25341	OPG, Ocif	5717,824	536,385	0,09	1832,741	0,32
F21,22	PDGF-BB	24628	PDGFBB	8619,258	5215,045	0,61	14389,330	1,66
G3,4	RAGE	81722	AGER	6570,823	5620,338	0,86	7461,602	1,14
G5,6	RBp4	25703	—	11267,036	14959,329	1,33	19711,885	1,75
G7,8	Resistin	246250	ADSF, FIZZ3	22828,836	22102,057	0,97	28761,492	1,26
G9,10	RGM-A	308739	RGMA	7726,823	10203,966	1,32	8189,045	1,06
G13,14	Serpin E1/PAI-1	24617	Nexin, PLANH1	4215,803	1645,205	0,39	5524,459	1,31
G19,20	TWEAK/TNFSF12	360548	APO3-ligand	2805,589	0,00	478,971	0,17	0,00
G21,22	VCAM-1/CD106	25361	L1CAM, INCAM-100	729,870	0,00	4389,803	6,01	2131,397
H5,6	WISP-1/CCN4	65154	WISPc, WISPii	8917,309	2678,660	0,30	9538,066	1,07

**Примечание:** бирюзово-розовый, пурпурно-розовый и красный цвет эквивалентен коротким, средним и длинным стрелкам на рис. 8, обозначает кратность изменения 1,20–1,34, 1,35–1,49 и  $\geq 1,50$  соответственно в сравнении со значениями денситометрии в контрольной группе (ФСБД). В случае отсутствия экспрессии белка в контрольной группе (условно обозначено в таблице, как «условная единица») и панель его экспрессии в экспериментальной группе (значения денситометрии до 9000 условных единиц в таблице выделены цветом и обозначены короткими стрелками на рис. 8). Равное (равноцветное) значение fold change, from 1,35 to 1,49, red color (equal to long arrows in the Figure 8) indicates fold change from 1,20 to 1,34, coral color (equal to medium arrows in the Figure 8) indicates fold change from 1,35 to 1,49, green color (equal to short arrows in the Figure 8) indicates fold change from 1,20 to 9000 arbitrary units, it was marked by a pink color in Table 4 and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary unit and was not expressed in the control group (1 arbitrary unit) and had a densitometry value  $\geq 9000$  arbitrary unit and was denoted by a short arrow in the Figure 8 as compared with densitometry values in DPBS group. If the protein was not expressed in the control group (1 arbitrary unit) and had a densitometry value  $\leq 9000$  arbitrary unit, it was marked by a pink color in Table 4 and was denoted by a short arrow in the Figure 8

**Таблица 6.** Провоспалительные молекулы, дифференциальны экспрессированные при дот-блот-профилировании бессывороточной культуральной среды от ЭК и моноцитов либо сыворотки крови крыс Wistar после воздействия повышенной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (+5 мкг кальция на 1 мл среды), КПМ-Ф или КПЧ-Ф с аналогичным содержанием кальция (5 мкг/мл) в течение 24 ч (ЭК и моноциты) или 1 ч (крысы Wistar). Контрольная группа: ФСБД без кальция и магния. Результаты денситометрического анализа в программе ImageJ

**Table 6.** Pro-inflammatory molecules which are differentially expressed at dot blot profiling of serum-free cell culture supernatant from ECs and monocytes or serum of Wistar rats after the exposure to DPBS without calcium and magnesium (or excessive calcium (5  $\mu\text{g}$  calcium per 1 mL medium) delivered as  $\text{Ca}^{2+}$  (added with  $\text{CaCl}_2$ ), CPM-F, or CPP-F for 24 hours (ECs and monocytes) or 1 hour (Wistar rats)

<i>In vitro</i> (бессывороточная культуральная среда от моноцитов / serum-free cell culture supernatant from monocytes)	<i>In vivo</i> (сыворотка крыс Wistar / serum of Wistar rats)
CD31/PECAM-1, серпин E1/PAI-1, uPAR, тромбоспондин-1, NGAL/липокалин-2, MMP-9, ангиогенин, MPO / CD31/PECAM-1, serpin E1/PAI-1, uPAR, thrombospondin-1, NGAL/lipocalin-2, MMP-9, angiogenin, MPO	CCL11/эотаксин, CCN3/IGFBP-9, CXCL7, IGF-1, фетуин-А, фибулин-3, RBP4, RGM-A / CCL11/eotaxin, CCN3/IGFBP-9, CXCL7, IGF-1, fetuin-A, fibulin-3, RBP4, RGM-A
CD31/PECAM-1, CD147/басигин, CXCL5, серпин E1/PAI-1, uPAR, тромбоспондин-1, EGF, BDNF, NGAL/липокалин-2, MMP-9, ангиогенин, MPO / CD31/PECAM-1, CD147/basigin, CXCL5, serpine E1/PAI-1, uPAR, thrombospondin-1, EGF, BDNF, NGAL / lipocalin-2, MMP-9, angiogenin, MPO	VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, серпин E1/PAI-1, IGF-1, IGFBP-2, IGFBP-3, NGAL/липокалин-2, MMP-3, эндостатин, фетуин-А, резистин, RBP4, Flt3lg / VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, serpine E1/PAI-1, IGF-1, IGFBP-2, IGFBP-3, NGAL/lipocalin-2, MMP-3, endostatin, fetuin-A, resistin, RBP4, Flt3lg
CD31/PECAM-1, CD147/басигин, MIF, CXCL5, серпин E1/PAI-1, uPAR, тромбоспондин-1, BDNF, EGF, NGAL/липокалин-2, MMP-9, ангиогенин, MPO, CD14 / CD31/PECAM-1, CD147/basigin, MIF, CXCL5, serpin E1/PAI-1, uPAR, thrombospondin-1, BDNF, EGF, NGAL / lipocalin-2, MMP-9, angiogenin, MPO, CD14	VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, серпин E1/PAI-1, IGF-1, IGFBP-5, IGFBP-6, NGAL/липокалин-2, фетуин-А, гепассоцин/FGL1, MMP-3, RAGE/AGER, эндостатин, остеопонтин, RBP4, RGM-A / VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, serpin E1/PAI-1, IGF-1, IGFBP-5, IGFBP-6, NGAL/lipocalin-2, fetuin-A, hepassocin/FGL1, MMP-3, RAGE/AGER, endostatin, osteopontin, RBP4, RGM-A
<b>Сравнения по экспериментальным моделям / Comparison between the experimental models</b>	
$\text{Ca}^{2+}$ : гиперэкспрессия в ЭК и моноцитах / $\text{Ca}^{2+}$ : overexpression in ECs and monocytes	—
$\text{Ca}^{2+}$ : гиперэкспрессия в ЭК и крысах / $\text{Ca}^{2+}$ : overexpression in ECs and rats	—
$\text{Ca}^{2+}$ : гиперэкспрессия в моноцитах и крысах / $\text{Ca}^{2+}$ : overexpression in monocytes and rats	—
$\text{Ca}^{2+}$ : гиперэкспрессия в ЭК, моноцитах и крысах / $\text{Ca}^{2+}$ : overexpression in ECs, monocytes, and rats	—
КПМ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК и моноцитах / CPM-F: overexpression in ECs and monocytes	CD31/PECAM-1, CD147/басигин, ангиогенин, uPAR, EGF / CD31/PECAM-1, CD147/basigin, angiogenin, uPAR, EGF
КПМ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК и крысах / CPM-F: overexpression in ECs and rats	VCAM-1/CD106
КПМ-Ф: гиперэкспрессия в моноцитах и крысах / CPM-F: overexpression in monocytes and rats	Серпин E1/PAI-1, NGAL/липокалин-2 / Serpin E1/PAI-1, NGAL/lipocalin-2
КПМ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК, моноцитах и крысах / CPM-F: overexpression in ECs, monocytes, and rats	—
КПЧ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК и моноцитах / CPP-F: overexpression in ECs and monocytes	CD31/PECAM-1, CD147/басигин, MIF, ангиогенин, uPAR, BDNF / CD31/PECAM-1, CD147/basigin, MIF, angiogenin, uPAR, BDNF
КПЧ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК и крысах / CPP-F: overexpression in ECs and rats	VCAM-1/CD106
КПЧ-Ф: гиперэкспрессия в моноцитах и крысах / CPP-F: overexpression in monocytes and rats	Серпин E1/PAI-1, NGAL/липокалин-2 / Serpin E1/PAI-1, NGAL/lipocalin-2
КПЧ-Ф: гиперэкспрессия в ЭК, моноцитах и крысах / CPP-F: overexpression in ECs, monocytes, and rats	—
<b>Сравнения по экспериментальным группам / Comparisons by experimental groups</b>	
Гиперэкспрессия при воздействии $\text{Ca}^{2+}$ и КПМ-Ф / Overexpression after the exposure to $\text{Ca}^{2+}$ and CPM-F	CD31/PECAM-1, GM-CSF, серпин E1/PAI-1, uPAR, PDGF-AB/BB, EGF, IGF-1, NGAL/липокалин-2, ангиогенин, MMP-9, MPO, фетуин-А, RBP4 / CD31/PECAM-1, GM-CSF, serpin E1/PAI-1, uPAR, PDGF-AB/BB, EGF, IGF-1, NGAL/lipocalin-2, angiogenin, MMP-9, MPO, fetuin-A, RBP4
Гиперэкспрессия при воздействии $\text{Ca}^{2+}$ и КПЧ-Ф / Overexpression after the exposure to $\text{Ca}^{2+}$ and CPP-F	CD31/PECAM-1, GM-CSF, серпин E1/PAI-1, uPAR, тромбоспондин-1, PDGF-AB/BB, IGF-1, NGAL/липокалин-2, МРО, ангиогенин, MMP-9, фетуин-А, RBP4, RGM-A / CD31/PECAM-1, GM-CSF, serpin E1/PAI-1, uPAR, thrombospondin-1, PDGF-AB/BB, IGF-1, NGAL/lipocalin-2, MPO, angiogenin, MMP-9, fetuin-A, RBP4, RGM-A
Гиперэкспрессия при воздействии КПМ-Ф и КПЧ-Ф / Overexpression after the exposure to CPM-F and CPP-F	CD31/PECAM-1, CD105/эндолгин, CD147/басигин, VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, MIF, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL5/RANTES, GM-CSF, CXCL5, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, IL-17A, IL-18 BPa, пентраксин-3, серпин E1/PAI-1, uPAR, тромбоспондин-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, FGF-19, IGF-1, HGF/SF, GDF-15, BDNF, NGAL/липокалин-2, MMP-3, MMP-9, MPO, цистатин С, ангиогенин, angiopoietin-2, эндостатин, ST2, TFF3/ITF, TFR/CD71, Dkk-1, DPP4/CD26, фетуин-А, RBP4 / CD31/PECAM-1, CD105/endoglin, CD147/basigin, VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54, MIF, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL5/RANTES, GM-CSF, CXCL5, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, IL-17A, IL-18 BPa, pentraxin-3, серпин E1/PAI-1, uPAR, thrombospondin-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, FGF-19, IGF-1, HGF/SF, GDF-15, BDNF, NGAL/lipocalin-2, MMP-3, MMP-9, MPO, cystatin C, angiogenin, angiopoietin-2, endostatin, ST2, TFF3/ITF, TFR/CD71, Dkk-1, DPP4/CD26, fetuin-A, RBP4
Гиперэкспрессия при воздействии $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф и КПЧ-Ф / Overexpression after the exposure to $\text{Ca}^{2+}$ , CPM-F, and CPP-F	CD31/PECAM-1, GM-CSF, серпин E1/PAI-1, uPAR, PDGF-AB/BB, IGF-1, NGAL/липокалин-2, ангиогенин, МгтМР-9, MPO, фетуин-А, RBP4 / CD31/PECAM-1, GM-CSF, serpin E1/PAI-1, uPAR, PDGF-AB/BB, IGF-1, NGAL/lipocalin-2, angiogenin, MMP-9, MPO, fetuin-A, RBP4

фоцитов, выделяемых в градиенте фильтра вместе с единичными предшественниками ЭК и секретирующими в микроокружение большое количество провоспалительных цитокинов [24, 25]. В проведенных в данном исследовании и в предыдущей работе экспериментах [5] выявлено, что при культивировании в условиях пульсирующего потока моноциты выделяют: 1) провоспалительные молекулы: фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), хемокины IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, PF4/CXCL4, ENA-78/CXCL5, миелопероксидазу (МПО); 2) проангиогенные молекулы: ангиогенин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF-AB/BB), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), матриксную металлопротеиназу-9 (MMP-9), рецептор к урокиназе (uPAR); 3) молекулы с контекст-зависимой проангиогенной и антиангиогенной активностью: ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) и липокалин-2 (NGAL); 4) антиангиогенную молекулу тромбоспондин-1 (TSP-1); 4) растворимые формы тромбоцитарно-эндотелиального рецептораPECAM1/CD31 и моноцитарного рецептора CD14. Поскольку спектр провоспалительных цитокинов и проангиогенных молекул ЭК и моноцитов в значительной степени совпадает (проводоспалительные цитокины MIF, IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, ENA-78/CXCL5; проангиогенные молекулы ангиогенин и PDGF-AB/BB), можно предположить синергичное воздействие эндотелиальных и моноцитарных провоспалительных цитокинов и проангиогенных молекул, выделяемых при кальциевом стрессе, в контексте патологического ангиогенеза.

Сравнивая результаты выполненного *in vivo* эксперимента (8 гиперэкспрессированных провоспалительных молекул при воздействии  $\text{Ca}^{2+}$ , 13 таких молекул при воздействии КПМ-Ф и 15 таких молекул при воздействии КПЧ-Ф) с данными, полученными ранее при внутривенном введении КПМ-А и КПЧ-А крысам Wistar (11 гиперэкспрессированных провоспалительных молекулы при воздействии  $\text{Ca}^{2+}$ , 20 таких молекул при воздействии КПМ-А и 17 таких молекул при воздействии КПЧ-А) [5], следует отметить устойчивую гиперэкспрессию тех же самых провоспалительных молекул (CXCL7, CCL11/эотаксин), протромботических молекул (ингибитор активатора плазминогена PAI-1), матрикинов (фибулин-3, матриксная металлопротеиназа-3), гепатокинов (гепассоцин, фетуин-А) и рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE/AGER). Данные результаты свидетельствуют об общих системных последствиях кальциевого стресса: повышенном выделении провоспалительных хемокинов, биоактивных матрикинов и маркеров повреждения печени независимо от состава КПМ и КПЧ. Последующие исследования воздействия кальциевого стресса на ЭК могут включать использование физиологической дозы КПЧ (5 мкг/мл) в качестве

модельного пускового фактора дисфункции эндотелия, а также применение специфических панелей антител к растворимым формам эндотелиальных рецепторов, провоспалительных и проангиогенных молекул при анализе молекулярного влияния кальциевого стресса на ЭК для определения высокочувствительных маркеров дисфункции эндотелия.

## Заключение

Использование фетуинсодержащего раствора  $\text{CaCl}_2$  для моделирования кальциевого стресса позволило достичь патофизиологически релевантного повышения молярной концентрации кальция (на 10%, ~0,12 ммоль/л) при добавлении 5 мкг кальция на 1 мл культуральной среды или сыворотки крови (что практически соответствует соответствующему значению в организме человека, составляющему ~4,8 мкг/мл). Воздействие КПЧ-Ф (но не  $\text{Ca}^{2+}$  или КПМ-Ф) на моноциты в указанной концентрации вызывало повышение экспрессии генов рецепторов связывания ЭК (*ITGB1*, *ITGA4*, *SELP*), кодирующих субъединицы CD49d (*ITGA4*) и CD29 (*ITGB1*) моноцитарного рецептора VLA-4, связывающегося с VCAM-1, а также моноцитарный receptor PSGL-1/CD162 (*SELP*), связывающийся с Р- и Е-селектином ЭК. Кроме того, действие КПМ-Ф и КПЧ-Ф в указанной концентрации приводило к повышению выделения провоспалительных, проангиогенных и протромботических молекул моноцитами. В совокупности с повышением адгезии моноцитов к ЭК после их совместной инкубации в системе пульсирующего потока с  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-Ф или КПЧ-Ф полученные результаты позволили сделать вывод о патофизиологической значимости и функциональной синергии провоспалительной активации ЭК и моноцитов в контексте развития дисфункции эндотелия. Внутривенное введение крысам Wistar КПМ-Ф или КПЧ-Ф в указанной концентрации вызывало более выраженный провоспалительный сдвиг, чем свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , и индуцировало повышение выделения растворимых форм эндотелиальных рецепторов, провоспалительных молекул, протромботических молекул, биоактивных матрикинов, гепатокинов (маркеров повреждения печени) и белков путей метаболизма. На основании этих результатов сделан вывод о системных последствиях кальциевого стресса.

## Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Юрьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсут-

ствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

## Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гран-

та Российского научного фонда № 22-15-00107-П «Патологические последствия и молекулярные механизмы воздействия кальций-фосфатных бионов (кальципротеиновых частиц) на форменные элементы крови», <https://rscf.ru/project/22-15-00107/>

### Информация об авторах

*Шишкива 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

*Юрьева 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

*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

*Синицкая Анна Викторовна*, кандидат биологических наук старший 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

*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

*Лазебная Анастасия Ивановна*, 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** 0000-0002-1867-6354

*Фролов Алексей Витальевич*, доктор медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

*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

### 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

*Yurieva 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

*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”, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

*Sinitskaya Anna V.*, PhD, Senior Researcher, 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

*Markova Victoria E.*, MSc, 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

*Lazebnaya Anastasia I.*, 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** 0000-0002-1867-6354

*Frolov Alexey V.*, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory for Endovascular and Reconstructive Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

*Kutikhin Anton G.*, MD, DSc, 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, получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ЮЮО* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*СМО* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*CAB* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*МВЕ* – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ЛАИ* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ФАВ* – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

## Author Contribution Statement

*SDK* – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, approval of the final version, fully responsible for the content

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

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

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

*MVE* – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

*FAV* – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith ER, Holt SG. The formation and function of calciprotein particles. *Pflugers Arch.* 2025;477(6):753-772. doi: 10.1007/s00424-025-03083-7
- Kutikhin AG, Feenstra L, Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Hillebrands JL, 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.
- Jahnen-Decent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res.* 2011;108(12):1494-509. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234260.
- Koeppert S, Ghallab A, Peglow S, Winkler CF, Graeber S, Büscher A, Hengstler JG, Jahnen-Decent 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.
- Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calciprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc).* 2025;90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.
- Zeper LW, Bos C, Leermakers PA, Franssen GM, Raavé R, Hoenderop JGJ, de Baaij JHF. Liver and spleen predominantly mediate calciprotein particle clearance in a rat model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2024;326(4):F622-F634. doi: 10.1152/ajprenal.00239.2023.
- Köppert S, Büscher A, Babler A, Ghallab A, Buhl EM, Latz E, Hengstler JG, Smith ER, Jahnen-Decent 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.
- Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, Gräber S, Kinkeldey A, Büscher A, Schmitt MM, Bornemann J, Nimmerjahn F, Herrmann M, Helming L, Gordon S, Jahnen-Decent 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.
- 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.
- Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filippov DE, Golovkin AS, Shishkova DK, Burago AY, Frolov AV, Dolgov VY, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Vladimirov AA, Sozinov SA, Ismagilov ZR, Russakov DM, Lomzov AA, Pyshnyi DV, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Demidov EA, Peltek SE, Dolganyuk VF, Babich OO, Grigoriev EV, Brusina EB, Barbarash OL, Yuzhalin AE. 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.
- Shishkova D, Velikanova E, Sinitsky M, Tsepokina A, Gruzdeva O, Bogdanov L, Kutikhin A. Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of

- Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5728. doi: 10.3390/ijms20225728.
12. 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.
  13. Shishkova DK, Velikanova EA, Bogdanov LA, Sinitsky MY, Kostyulin AE, Tsepokina AV, Gruzdeva OV, Mironov AV, Mukhamadiarov RA, Glushkova TV, Krivkina EO, Matveeva VG, Hryachkova ON, Markova VE, Dyleva YA, Belik EV, Frolov AV, Shabaev AR, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Kolmykov RP, Sevostyanov OG, Russakov DM, Dolganyuk VF, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Kozhukhov AS, Brusina EB, Ismagilov ZR, Barbarash OL, Yuzhalin AE, Kutikhin AG. 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.
  14. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzingen J, Yamamoto K, Renné T, Jähnen-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.
  15. Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schäfer C, Jähnen-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.
  16. 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. Т. 13. № 2. С. 60-71. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-2-60-71.
  17. Jerka D, Bonowicz K, Piekarska K, Gokyer S, Derici US, Hindy OA, Altunay BB, Yazgan I, Steinbrink K, Kleszczyński K, Yilgor P, Gagat M. Unraveling Endothelial Cell Migration: Insights into Fundamental Forces, Inflammation, Biomaterial Applications, and Tissue Regeneration Strategies. *ACS Appl BioMater.* 2024;7(4):2054-2069. doi: 10.1021/acsabm.3c01227.
  18. Lee HW, Shin JH, Simons M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. *Exp Mol Med.* 2022;54(6):711-719. doi: 10.1038/s12276-022-00785-1.
  19. Lin A, Miano JM, Fisher EA, Misra A. Chronic inflammation and vascular cell plasticity in atherosclerosis. *Nat Cardiovasc Res.* 2024;3(12):1408-1423. doi: 10.1038/s44161-024-00569-y.
  20. Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(8):599-616. doi: 10.1038/s41580-024-00715-1.
  21. Hilgendorf I, Frantz S, Frangogiannis NG. Repair of the Infarcted Heart: Cellular Effectors, Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Circ Res.* 2024;134(12):1718-1751. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.323658.
  22. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2022;22(9):576-588. doi: 10.1038/s41577-022-00694-4.
  23. Wu X, Reboll MR, Korf-Klingebiel M, Wollert KC. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2021;117(5):1257-1273. doi: 10.1093/cvr/cvaa287.
  24. Yan F, Liu X, Ding H, Zhang W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem.* 2022;124(1):151833. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151833.
  25. Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(4):530-8. doi: 10.5966/sctm.2015-0227.

## REFERENCES

1. Smith ER, Holt SG. The formation and function of calciprotein particles. *Pflugers Arch.* 2025;477(6):753-772. doi: 10.1007/s00424-025-03083-7.
2. Kutikhin AG, Feenstra L, Kostyulin AE, Yuzhalin AE, Hillebrands JL, 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.
3. Jähnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res.* 2011;108(12):1494-509. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234260.
4. Koeppert S, Ghallab A, Peglow S, Winkler CF, Graeber S, Büscher A, Hengstler JG, Jähnen-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.
5. Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calciprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc).* 2025;90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.
6. Zeper LW, Bos C, Leermakers PA, Franssen GM, Raavé R, Hoenderop JGJ, de Baaij JHF. Liver and spleen predominantly mediate calciprotein particle clearance in a rat model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2024;326(4):F622-F634. doi: 10.1152/ajprenal.00239.2023.
7. Köppert S, Büscher A, Babler A, Ghallab A, Buhl EM, Latz E, Hengstler JG, Smith ER, Jähnen-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.
8. Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, Gräber S, Kinkeldey A, Büscher A, Schmitt MM, Bornemann J, Nimmerjahn F, Herrmann M, Helming L, Gordon S, Jähnen-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.
9. 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.
10. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filip'ev DE, Golovkin AS, Shishkova DK, Burago AY, Frolov AV, Dolgov VY, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Vladimirov AA, Sozinov SA, Ismagilov ZR, Russakov DM, Lomzov AA, Pyshnyi DV, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Demidov EA, Peltek SE, Dolganyuk VF, Babich OO, Grigoriev EV, Brusina EB, Barbarash OL, Yuzhalin AE. 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.
11. Shishkova D, Velikanova E, Sinitsky M, Tsepokina A, Gruzdeva O, Bogdanov L, Kutikhin A. Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5728. doi: 10.3390/ijms20225728.
12. 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.
13. Shishkova DK, Velikanova EA, Bogdanov LA, Sinitsky MY, Kostyunin AE, Tsepokina AV, Gruzdeva OV, Mironov AV, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Krivkina EO, Matveeva VG, Hryachkova ON, Markova VE, Dyleva YA, Belik EV, Frolov AV, Shabaev AR, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Kolmykov RP, Sevostyanov OG, Russakov DM, Dolganyuk VF, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Kozhukhov AS, Brusina EB, Ismagilov ZR, Barbarash OL, Yuzhalin AE, Kutikhin AG. 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.
14. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzingen J, Yamamoto K, Renné T, Jähnen-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.
15. Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schäfer C, Jähnen-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.
16. 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 = Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Vol. 13. № 2. P. 60-71. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-2-60-71.
17. Jerka D, Bonowicz K, Piekarska K, Gokyer S, Derici US, Hindy OA, Altunay BB, Yazgan I, Steinbrink K, Kleszczyński K, Yilgor P, Gagat M. Unraveling Endothelial Cell Migration: Insights into Fundamental Forces, Inflammation, Biomaterial Applications, and Tissue Regeneration Strategies. *ACS Appl Bio Mater.* 2024;7(4):2054-2069. doi: 10.1021/acsabm.3c01227.
18. Lee HW, Shin JH, Simons M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. *Exp Mol Med.* 2022;54(6):711-719. doi: 10.1038/s12276-022-00785-1.
19. Lin A, Miano JM, Fisher EA, Misra A. Chronic inflammation and vascular cell plasticity in atherosclerosis. *Nat Cardiovasc Res.* 2024;3(12):1408-1423. doi: 10.1038/s44161-024-00569-y.
20. Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(8):599-616. doi: 10.1038/s41580-024-00715-1.
21. Hilgendorf I, Frantz S, Frangogiannis NG. Repair of the Infarcted Heart: Cellular Effectors, Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Circ Res.* 2024;134(12):1718-1751. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.323658.
22. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2022;22(9):576-588. doi: 10.1038/s41577-022-00694-4.
23. Wu X, Reboll MR, Korf-Klingebiel M, Wollert KC. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2021;117(5):1257-1273. doi: 10.1093/cvr/cvaa287.
24. Yan F, Liu X, Ding H, Zhang W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem.* 2022;124(1):151833. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151833.
25. Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(4):530-8. doi: 10.5966/sctm.2015-0227.

**Для цитирования:** Шишкова Д.К., Юрьева Ю.О., Синицкий М.Ю., Синицкая А.В., Маркова В.Е., Лазебная А.И., Фролов А.В., Кутихин А.Г. Провоспалительная активация эндотелиальных клеток и макрофагов при различных видах патофизиологически релевантного кальциевого стресса. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2025;14(6): 213-235. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-6-213-235

**To cite:** Shishkova D.K., Yurieva Yu.O., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Markova V.E., Lazebnaya A.I., Frolov A.V., Kutikhin A.G. Pro-inflammatory activation of endothelial cells and monocytes at calcium stress. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2025;14(6): 213-235. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-6-213-235