

УДК [612.398.145.4–02:616.19–004.6]+616–008.9

DOI 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69

СРАВНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СФЕРИЧЕСКИХ И ИГОЛЬЧАТЫХ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

Д.К. Шишкова¹, Т.В. Глушкова¹, О.С. Ефимова², А.Н. Попова², В.Ю. Малышева², Р.П. Колмыков², З.Р. Исмаилов², А.К. Гутаковский³, Ю.А. Живодков³, А.С. Кожухов³, В.Ф. Долганюк⁴, О.Л. Барбараш¹, А.Г. Кутихин¹ ✉

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ²Институт углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, пр. Советский, 18, Кемерово, Российская Федерация, 650000; ³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, пр. ак. Лаврентьева, 13, Новосибирск, Российская Федерация, 630090; ⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет», Кемерово, ул. Красная, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650000

Основные положения

- При умеренном перенасыщении сыворотки крови кальцием и фосфором образуются сферические кальций-фосфатные наночастицы (бионы), а при тяжелом – игольчатые.
- Сферические и игольчатые кальций-фосфатные бионы сходны по своим физическим и химическим характеристикам, различаясь лишь формой.
- Как сферические, так и игольчатые кальций-фосфатные бионы состоят из гидроксипатита и карбонат-гидроксипатита, а также имеют сходный белковый профиль.

Цель

Сравнить морфологию, минеральный и органический профиль сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ), необходимых для оценки эндотелиотоксического действия КФБ при моделировании умеренной и тяжелой гиперкальциемии/гиперфосфатемии в последующих исследованиях.

Материалы и методы

СКФБ и ИКФБ были искусственно синтезированы посредством умеренного и выраженного перенасыщения имитирующей состав крови среды солями кальция и фосфора. Размерность и форма СКФБ и ИКФБ были изучены при помощи сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Элементный анализ проводился посредством энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии и CHNSO-анализа, функциональные группы идентифицировались при помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и спектроскопии комбинационного рассеяния света, формула входящих в состав бионов химических соединений и степень их кристалличности определялась методом рентгеновской порошковой дифрактометрии. Белковый профиль СКФБ и ИКФБ был исследован путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра.

Результаты

СКФБ визуализировались как кристаллические сферические частицы губчатой структуры диаметром 80–200 нм и средним диаметром около 120 нм, в то время как ИКФБ представляли собой игольчатые кристаллы такого же диаметра. Как СКФБ, так и ИКФБ имели схожий поверхностный заряд и были склонны к агрегации. СКФБ и ИКФБ состояли из углерода, кислорода, водорода, азота, кальция и фосфора, содержали фосфатные (PO_4^{3-}), карбонатные (CO_3^{2-}) и гидроксильные (ОН) группы и состояли из гидроксипатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонат-гидроксипатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$). Кроме того, СКФБ и ИКФБ обладали идентичной степенью кристалличности и схожим белковым профилем с преобладанием альбумина и фетуина-А над остальными белками.

Заключение

СКФБ и ИКФБ отличаются лишь формой, имея схожие размерность, поверхностный заряд, степень кристалличности и химический состав.

Для корреспонденции: Кутихин Антон Геннадьевич, e-mail: antonkutikhin@gmail.com, тел. +79609077067; адрес: 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновский бульвар, д. 6

Corresponding author: Kutikhin Anton G., e-mail: antonkutikhin@gmail.com, phone +79609077067; address: Russian Federation, 650002, Kemerovo, 6, Sosnoviy Blvd.

Ключевые слова Наночастицы • Бионы • Форма • Токсичность • Эндотелий • Атеросклероз
• Элементный анализ • Минеральный состав • Органический состав • Белковый профиль

Поступила в редакцию: 31.10.18; поступила после доработки: 24.11.18; принята к печати: 22.12.18

MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF SPHERICAL AND NEEDLE CALCIUM PHOSPHATE BIONS

D.K. Shishkova¹, T.V. Glushkova¹, O.S. Efimova², A.N. Popova², V.Yu. Malysheva²,
R.P. Kolmykov², Z.R. Ismagilov², A.K. Gutakovskiy³, Yu.A. Zhivodkov³, A.S. Kozhukhov³,
V.F. Dolganyuk⁴, O.L. Barbarash¹, A.G. Kutikhin¹ ✉

¹Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ²Institute of Coal Chemistry and Material Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 18, Sovetsky ave., Kemerovo, Russian Federation, 650000; ³Rzhanov Institute of Semiconductor Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Ac. Lavrentieva ave., Novosibirsk, Russian Federation, 630090; ⁴Kemerovo State University, 6, Krasnaya St., Kemerovo, Russian Federation, 650000

Highlights

- Moderate and severe serum supersaturation with calcium and phosphate results in formation of spherical and needle-shaped calcium phosphate nanoparticles (bions), respectively
- Spherical and needle-shaped calcium phosphate bions are similar in all physical and chemical characteristics excluding the shape.
- Both spherical and needle-shaped calcium phosphate bions consist of hydroxyapatite and carbonate-hydroxyapatite and have similar protein composition

Aim To compare morphological properties, mineral, and organic profile of spherical calcium phosphate bions (SCPБ) and needle calcium phosphate bions (NCPБ) for the assessment of the CPБ-specific endothelial toxicity in models of mild or severe hypercalcemia/hyperphosphatemia in the further studies.

Methods Both SCPБ and NCPБ were artificially synthesized employing blood-mimetic medium either moderately or significantly supersaturated of calcium and phosphorus salts. Size and shape of SCPБ and NCPБ were investigated by scanning and transmission electron microscopy and atomic force microscopy. Elemental analysis was performed utilizing energy-dispersive X-ray spectroscopy, atomic emission spectroscopy, and CHNSO analysis, functional groups were examined using Fourier-transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy while chemical formula was identified by X-ray powder diffraction analysis. Protein profile of SCPБ and NCPБ was screened employing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis following silver staining.

Results SCPБ were visualized as crystalline spherical spongy particles of 80-200 nm diameter and mean diameter of around 120 nm while NCPБ represented needle crystals of a similar diameter. Both SCPБ and NCPБ had similar crystallinity, surface charge and tended to form clusters of several particles. Furthermore, both SCPБ and NCPБ were composed of carbon, oxygen, hydrogen, nitrogen, calcium, and phosphorus, contained phosphate (PO_4^{3-}), carbonate (CO_3^{2-}), and hydroxyl (OH^-) functional groups, and consisted of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and carbonate-hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$). In addition, protein profile of SCPБ and NCPБ was similar and notable for the abundant albumin and fetuin A levels.

Conclusion Having similar size, surface charge, extent of crystallinity, and chemical composition, SCPБ and NCPБ possess a different shape.

Keywords Nanoparticles • Bions • Shape • Toxicity • Endothelium • Atherosclerosis • Elemental analysis • Mineral profile • Organic profile • Protein profile

Received: 31.10.18; received in revised form: 24.11.18; accepted: 22.12.18;

Список сокращений

АСМ – атомно-силовая микроскопия	ОП – оптическая плотность
ИК – инфракрасная спектроскопия	ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
ИКФБ – игольчатый кальций-фосфатный бион	СКФБ – сферический кальций-фосфатный бион
КФБ – кальций-фосфатный бион	СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
МкФ – стандарта МакФарланда	

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) представляют собой наноразмерные минерало-органические частицы, формирующиеся в крови человека при повышении концентрации кальция и фосфора (гиперкальциемии и гиперфосфатемии) и/или снижении концентрации антикальцифицирующих белков, в особенности альбумина и фетуина-А [1, 2]. В недавней работе нашей группой было показано, что КФБ выделяются из 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека [2]. Более того, поскольку гиперкальциемия и гиперфосфатемия являются признанными факторами риска атеросклероза [3–6], было предположено, что КФБ являются одним из триггеров этого патологического процесса. Проведенные нами *in vitro* и *in vivo* эксперименты действительно продемонстрировали токсическое действие КФБ на эндотелий вследствие их интернализации эндотелиальными клетками, что инициировало развитие начальных стадий атеросклероза [2]. Кроме того, было показано, что искусственно синтезированные КФБ морфологически и химически идентичны выделенным из атеросклеротических бляшек [2]. Таким образом, искусственно синтезированные КФБ могут быть использованы для экспериментального моделирования КФБ-индуцированной токсичности.

Поскольку доказано, что повреждение эндотелия является обязательным инициирующим фактором развития атеросклероза [7–10], феномен эндотелиотоксичности КФБ достаточно актуален для дальнейшего изучения. Существуют теоретические предпосылки, что при умеренной гиперкальциемии/гиперфосфатемии могут образовываться сферические КФБ (СКФБ), а при тяжелой гиперкальциемии/гиперфосфатемии – игольчатые КФБ (ИКФБ) [11]. Несмотря на то, что ранее уже была продемонстрирована возможность синтеза и СКФБ, и ИКФБ [11], попыток сравнения химических свойств данных двух групп КФБ проведено не было. Вместе с тем это имеет принципиальное значение, поскольку для адекватного сравнения эндотелиотоксичности СКФБ и ИКФБ в идеале необходимо, чтобы они отличались лишь формой, имея идентичные размеры, характеристики поверхности, степень кристалличности и химический состав.

Целью данного исследования было синтезировать СКФБ и ИКФБ с дальнейшим сравнением их морфологических характеристик и химического состава.

Материалы и методы

Искусственный синтез бионов

СКФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,45М CaCl₂ (Sigma-Aldrich) и 22,5 мкл 0,2М Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) в 1318 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco). ИКФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл 0,45М CaCl₂ (Sigma-Aldrich) и 37,5 мкл 0,2М Na₂HPO₄ в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировались при +37 °С (МСО-18А1С, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и +4 °С в течение 1 ч (Optima МАХ-ХР, Beckman Coulter). С целью получения рабочей суспензии осадок СКФБ ресуспендировался в 300 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл бидистиллированной воды, что позволяло достичь оптической плотности (ОП) в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой и патофизиологически релевантной величиной концентрации бионов в суспензии. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях. Измерение ОП проводилось на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм. В случае необходимости получения сухого порошка для экспериментов суспензия СКФБ или ИКФБ замораживалась при -40 °С (Sanyo) и лиофилизировалась в течение суток (FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System, Labconco).

Визуализация бионов

Визуализация бионов проводилась методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для СЭМ несколько капель суспензии СКФБ или ИКФБ помещались на стекло для микроскопии (Thermo Scientific) и высушивались в течение 2 ч при 37°С. Далее образец помещался на углеродный скотч (Ted Pella) и напылялся Au-Pd (SC7640, Emitech), с дальнейшим выполнением непосредственно СЭМ (Hitachi SU8220, Hitachi). Для ПЭМ несколько капель суспензии СКФБ или ИКФБ помещались на медную сеточку,

покрытую углеродной пленкой-подложкой (Structure Probe, Inc.) с последующим проведением непосредственно ПЭМ (JEM-4000 EX, JEOL). Для АСМ несколько капель суспензии СКФБ или ИКФБ помещались на диск из слюды (Ted Pella), и далее осуществлялась непосредственно АСМ (Cypher™ Atomic Force Microscope, Asylum Research).

Определение распределения размерности и поверхностного заряда

Распределение размерности и дзета-потенциал СКФБ и ИКФБ был определен при помощи динамического и электрофоретического рассеяния света соответственно (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Перед измерением суспензия бионов термостатировалась при 25 °С в течение 10 мин. Все измерения проводились трижды (30 последовательных сканирований на измерение) с дальнейшим расчетом среднего распределения.

Элементный анализ

Для определения химических элементов, входящих в состав бионов, помещали несколько капель суспензии СКФБ или ИКФБ на углеродный скотч, высушивали в течение 2 ч при 37 °С и проводили элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (XFlash® 4010, Bruker). Для каждого образца определялись три квадранта с четко визуализируемыми бионами, и затем с поправкой на углерод (во избежание систематической ошибки) рассчитывался средний атомный процент для каждого элемента. Атомно-эмиссионная спектроскопия лиофилизированного порошка СКФБ или ИКФБ проводилась после его растворения в HNO₃ в течение 1 ч при 80 °С. CHNSO-анализ проводился посредством каталитического окисления бионов при 1060 °С.

Определение функциональных групп

Функциональные группы соединений, из которых состоят бионы, определялись методами инфракрасной спектроскопии (ИК) с преобразованием Фурье (Инфралюм ФТ-801, Симэкс, разрешение 4 см⁻¹ на длинах волн от 4,000 см⁻¹ до 500 см⁻¹) и спектроскопии комбинационного рассеяния света (LabRam HR800, Horiba Scientific, разрешение 0,222 см⁻¹ на от 4,000 см⁻¹ до 100 см⁻¹). Каждый представленный спектр рассчитывался как среднее 25 последовательных сканирований лиофилизированного порошка СКФБ или ИКФБ.

Определение химических соединений

Собственно химические соединения, входящие в состав бионов, определялись путем анализа лиофилизированного порошка СКФБ или ИКФБ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии (Bruker D8 ADVANCE, Bruker) с медной рентгеновской

трубкой при 40 кВ. Дифрактометрия проводилась по 2θ углу от 20 до 120 градусов при скорости в 0,02 градуса в секунду. Полученные спектры сравнивались с базой Объединенного комитета порошковых дифракционных стандартов для идентификации химической формулы соединения. Кроме того, при помощи этого же метода посредством сопоставления ширины получаемых пиков проводилось сравнение степени кристалличности СКФБ и ИКФБ.

Определение белкового профиля

Белки, входящие в состав бионов, определялись методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра (AgNO₃). Аликвоты одинакового объема (20 мкл) суспензии СКФБ или ИКФБ с оптической плотностью 0,5 МкФ были смешаны с буфером Лэммли (1,5М Tris-HCl с рН 6,8, глицерол, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, 1% бромфеноловый синий, дитиотреитол) в отношении 4:1 и затем загружены на 1 мм NuPAGE® Novex® 4–12% Bis-Tris гель (Life Technologies). В качестве положительного контроля и маркера молекулярной массы белков использовался белковый стандарт Precision Plus (Bio-Rad). Белки разделялись при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при 100 В в течение 1 ч. Гель окрашивался при помощи набора SilverQuest (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. При появлении полос добавлялся стоп-раствор (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в концентрации 39 мМ). Гели фотографировались с использованием сканера HP Scanjet Enterprise Flow (Hewlett Packard).

Результаты

Для того чтобы исследовать морфологические свойства СКФБ и ИКФБ, были проведены сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия и атомно-силовая микроскопия. Важно отметить, что одинаковая размерность КФБ является обязательным условием для адекватного сравнения их эндотелиотоксичности, так как в одной из предыдущих работ было показано, что СКФБ диаметром <300 нм не обладают цитотоксическим действием, в отличие от СКФБ диаметром >300 нм [12]. Все три вида микроскопии высокого разрешения продемонстрировали, что СКФБ представляли собой сферические частицы губчатой структуры диаметром 80–200 нм и средним диаметром около 120 нм, склонные к кластеризации (Рис. 1, Рис. 2, Рис. 3). ИКФБ визуализировались как игольчатые кристаллы с аналогичными СКФБ разбросом диаметров и средним диаметром (Рис. 1, Рис. 2, Рис. 3). На основании полученных данных можно заключить, что при схожей размерности СКФБ и ИКФБ отличаются геометрической формой.

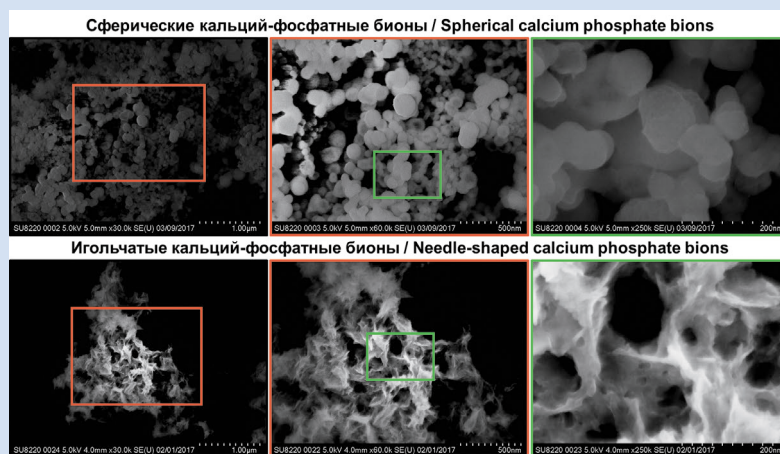


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ)
Figure 1. Scanning electron microscopy of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB)

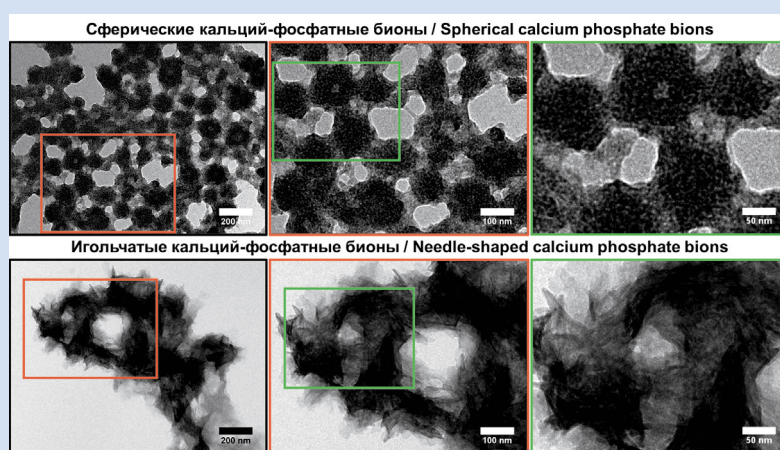


Рисунок 2. Просвечивающая электронная микроскопия сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ)
Figure 2. Transmission electron microscopy of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB)

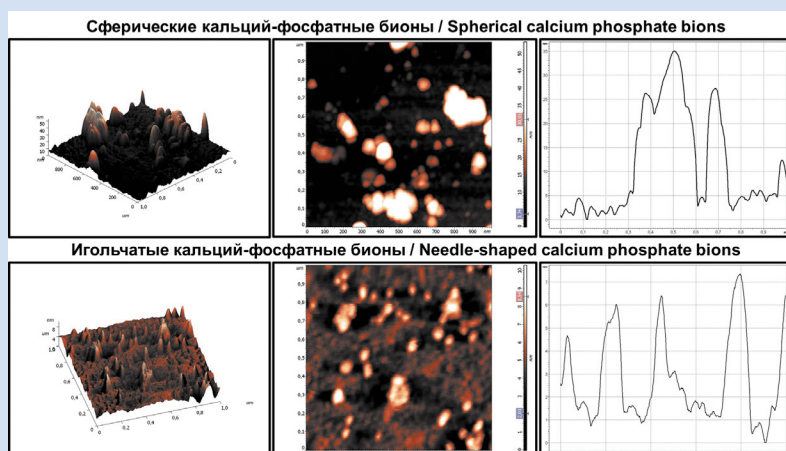


Рисунок 3. Атомно-силовая микроскопия сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов на высоком разрешении (ИКФБ)
Figure 3. Atomic force microscopy of spherical calcium phosphate bions (SCPB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB)

Стоит отметить, что, хотя электронная и атомно-силовая микроскопия позволяют детально оценить размерность и форму наночастиц, оценка распределения их размерности при помощи количественного

анализа изображений может приводить к артефактам вследствие их неравномерного распределения по поверхности подложки, что в том числе может вести к избыточному рассеянию или агрегации частиц.

Поэтому нами был дополнительно применен метод динамического рассеяния света, позволяющий оценить распределение размерности бионов в растворе (включая оценку их кластеризации), а также метод электрофоретического рассеяния света для измерения поверхностного заряда (дзета-потенциала) частиц, определяющего их склонность к агрегации. Динамическое рассеяние света подтвердило данные, полученные при визуализации СКФБ и ИКФБ, причем как в отношении диаметра отдельных частиц, так и в отношении формирования кластеров до 1000 нм в диаметре (Рис. 4А). Дзета-потенциал СКФБ и ИКФБ варьировал от -19 до -24 мВ, что подтвердило склонность бионов к агрегации (Рис. 4Б).

Следующей задачей для выполнения цели адекватного сравнения СКФБ и ИКФБ стал анализ их химического состава, то есть минерального и органического профиля. В идеале для оценки влияния формы КФБ на их эндотелиотоксичность СКФБ и ИКФБ должны иметь идентичный элементный состав, функциональные группы, формулу составляющих их химических соединений и органический профиль. Для анализа элементного состава СКФБ и ИКФБ применяли энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию, атомно-эмиссионную спектроскопию и CHNSO-анализ. Было выявлено, что как СКФБ, так и ИКФБ состоят из углерода, кислорода, водорода, азота, кальция и фосфора

(Рис. 5А). Используя инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье и спектроскопию комбинационного рассеяния света, было найдено, что как СКФБ, так и ИКФБ содержат фосфатные (PO_4^{3-}), карбонатные (CO_3^{2-}) и гидроксильные (OH^-) группы (Рис. 5Б). Наконец, посредством рентгеновской порошковой дифрактометрии было выявлено, что как СКФБ, так и ИКФБ состоят из гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонат-гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$) (Рис. 5В). Таким образом, СКФБ и ИКФБ имели схожий минеральный профиль, с преобладанием гидроксиапатита. Совпадение ширины пиков соединений указало на сходную степень кристалличности СКФБ и ИКФБ, при этом узкие и высокие пики указывали на малую долю аморфного компонента (Рис. 5В).

Поскольку ранее было обнаружено, что КФБ не содержат липидов, углеводов и нуклеиновых кислот (неопубликованные данные), из всех классов биологических макромолекул сравнительный анализ был проведен лишь по отношению к белкам, целый ряд которых характерен для КФБ [1, 2, 13, 14]. Известно, что сывороточные белки КФБ играют протективную роль, делая данные наночастицы менее токсичными в сравнении с кристаллами чистого гидроксиапатита [15]. Электрофорез в агарозном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра показал,

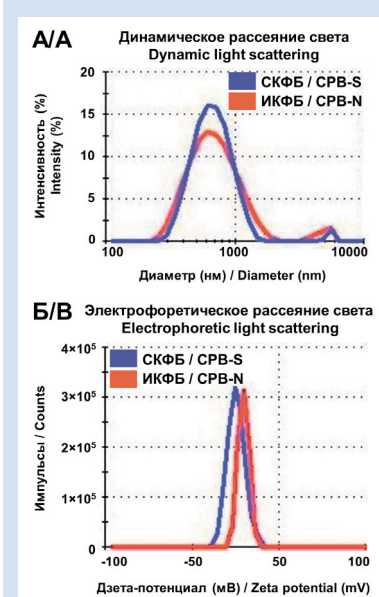


Рисунок 4. Анализ распределения размерности и поверхностного заряда СКФБ и КФБ на анализаторе наночастиц Zetasizer Nano ZS

Примечание: СКФБ – сферический кальций-фосфатный бийон; ИКФБ – игольчатый кальций-фосфатный бийон.

Figure 4. Particle-size distribution and surface charge of spherical calcium phosphate bions (SCPVB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPVB)
Note: spherical calcium phosphate bions (SCPVB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPVB).

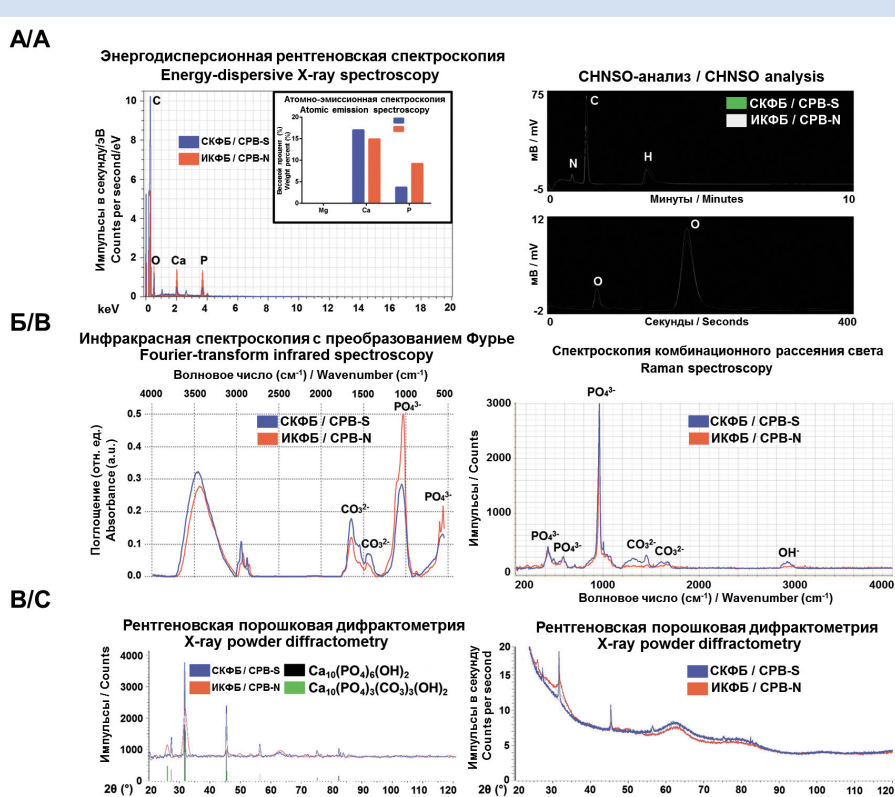


Рисунок 5. Анализ минерального профиля сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ)

Примечание: СКФБ – сферический кальций-фосфатный бийон; ИКФБ – игольчатый кальций-фосфатный бийон.

Figure 5. Mineral profiling of spherical calcium phosphate bions (SCPVB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPVB)

Note: spherical calcium phosphate bions (SCPVB) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPVB).

что белковый профиль СКФБ и ИКФБ был схож и характеризовался присутствием белков с одинаковыми молекулярными массами, при этом среди всех белков как в СКФБ, так и в ИКФБ значительно преобладали фетуин-А (48,4 кДа) и альбумин (66,5 кДа) (Рис. 6), что согласуется с результатами более ранних работ, которые продемонстрировали, что эти два белка являются наиболее характерными для КФБ [1, 13, 14]. Таким образом, можно сделать вывод, что СКФБ и ИКФБ обладают сходным белковым профилем.

Обсуждение

Токсичность наночастиц является многофакторным феноменом и определяется их размерностью, формой, степенью кристалличности, зарядом и площадью поверхности, а также минеральным и органическим составом [16–18]. Надлежащая оценка указанных свойств требует применения широкого спектра методов визуализации и химического материаловедения, включая электронную и атомно-силовую микроскопию, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, методы анализа химических элементов и образуемых ими функциональных групп и соединений, аналитический электрофорез и хромато-масс-спектрометрию [16–18]. К особенностям анализа эндогенных минерало-органических наночастиц (бионов) можно отнести необходимость использования электронной и атомно-силовой микроскопии высокого разрешения, а также важность оценки органического профиля, поскольку бионы адсорбируют биополимеры из той биологической жидкости, в которой находятся [1, 14, 19, 20].

Возможность формирования сферических и игольчатых КФБ была показана ранее в экспериментах Тайваньской группы, в которых снижение концентрации сыворотки крови до <3% в сочетании с перенасыщением раствора ионами кальция и фосфора приводило к формированию игольчатых КФБ вместо сферических, что, по-видимому, связано с недостаточным количеством белков-ингибиторов

эктопической кальцификации (фетуина-А, альбумина и остеоонектина) для адекватной стабилизации молекул фосфата кальция [11]. Таким образом, можно предположить, что форма КФБ зависит от выраженности перенасыщения биологических жидкостей (в частности, крови) ионами кальция и фосфора, что потенциально может влиять на их токсичность. При этом не отмечается предпосылок к изменению иных свойств КФБ (кроме площади их поверхности, определяемой формой наночастиц) при изменении соотношения белков-ингибиторов кальцификации и ионов кальция и фосфора, что позволяет использовать их как близкие к идеальным группы сравнения для оценки токсичности сферических и игольчатых наночастиц фосфата кальция. Однако данная гипотеза нуждается в экспериментальной проверке.

Проведенный в данной работе анализ позволил установить, что СКФБ и ИКФБ представляют собой частицы с разбросом диаметров 80–200 нм и средним диаметром около 120 нм, склонные к кластеризации (дзета-потенциал от -19 до -24 мВ), что было подтверждено методом динамического рассеяния света (кластеры диаметром до 1000 нм). Степень кристалличности СКФБ и ИКФБ также была схожей, при этом оба типа бионов характеризовались малой долей аморфного компонента. По минеральному составу СКФБ и ИКФБ представляли собой смесь гидроксипатита и карбонат-гидроксипатита, что было напрямую продемонстрировано при помощи рентгеновской порошковой дифрактометрии и косвенно подтверждено наличием соответствующих функциональных групп и химических элементов. Из органических макромолекул СКФБ и ИКФБ содержали лишь белки и обладали сходным белковым профилем.

Говоря о полноте проведенного анализа, стоит отметить, что степень кристалличности может определяться как во всем образце одновременно (как в случае с рентгеновской порошковой дифрактометрией), так и для каждой отдельной наночастицы или их кластера (оценка дифракционной решетки при просвечивающей электронной микроскопии). Однако оценка дифракционной решетки на репрезентативной выборке частиц в образце достаточно трудоемка, и, кроме того, характер решетки в разных наночастицах в пределах одного и того же образца может существенно различаться, что еще более затрудняет количественный анализ. Поэтому в этом исследовании для сравнительного анализа кристалличности бионов нами была выбрана именно рентгеновская порошковая дифрактометрия. По аналогичному принципу динамическое рассеяние света была предпочтено анализу изображений электронной или атомно-силовой микроскопии для количественной оценки размерности КФБ. В свою очередь, надежность результатов анализа минерального состава подтверждается комплексным подходом к его оценке (три метода элементного анализа, два метода

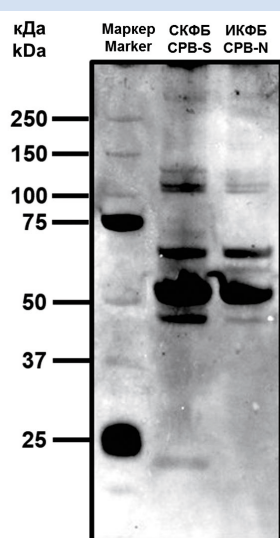


Рисунок 6. Анализ органического (белкового) профиля сферических кальций-фосфатных бионов (СКФБ) и игольчатых кальций-фосфатных бионов (ИКФБ)

Примечание: СКФБ – сферический кальций-фосфатный бион; ИКФБ – игольчатый кальций-фосфатный бион.

Figure 6. Organic (protein) profiling of spherical calcium phosphate bions (SCPБ) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPБ)

Note: spherical calcium phosphate bions (SCPБ) and needle-shaped calcium phosphate bions (NCPБ).

определения функциональных групп и рентгеновская порошковая дифрактометрия как золотой стандарт), а адекватность анализа органического состава – сочетанием простого, но в то же время достаточно мощного метода для анализа белков (электрофорез в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра) и высокопроизводительного метода для анализа липидов, убедительно показывающего их отсутствие в составе бионов (газовая хромато-масс-спектрометрия).

Заключение

СКФБ и ИКФБ имеют идентичные размерность, поверхностный заряд, степень кристалличности, минеральный и органический профиль и различаются лишь формой (сферической для СКФБ и игольчатой для ИКФБ), что позволяет адекватно сравнивать эндотелиотоксичность двух данных групп бионов в экспериментах на клеточных линиях и лабораторных животных.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Па-

тогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.С. Ефимова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Н. Попова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Ю. Малышева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Р.П. Колмыков заявляет об отсутствии конфликта интересов. З.Р. Исмагилов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.К. Гутаковский заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.А. Живодков заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.С. Кожухов заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Ф. Долганюк заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.Л. Барбараш заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Шишкова Дарья Кирилловна, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация;

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация;

Ефимова Ольга Сергеевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории высокотемпературных углеродных материалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Российская Федерация;

Попова Анна Николаевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории неорганических наноматериалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Российская Федерация;

Малышева Валентина Юрьевна, ведущий технолог лаборатории высокотемпературных углеродных материалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Российская Федерация;

Колмыков Роман Павлович, кандидат химических наук, научный сотрудник Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра

Author Information Form

Shishkova Daria K., junior researcher, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation;

Glushkova Tatiana V., PhD, researcher, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation;

Efimova Olga S., PhD, researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation;

Popova Anna N., PhD, senior researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation;

Malysheva Valentina Yu., engineer-technologist, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation;

Kolmykov Roman P., PhD, senior researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation;

угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Российская Федерация;

Исмагилов Зинфер Ришатович, доктор химических наук, проф., чл.-корр. РАН, директор Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Российская Федерация;

Севостьянов Олег Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры экспериментальной физики Института фундаментальных наук Кемеровского государственного университета, Кемерово, Российская Федерация;

Долганюк Вячеслав Федорович, кандидат технических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Кемеровский государственный университет», Кемерово, Российская Федерация;

Гутаковский Антон Константинович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация;

Живодков Юрий Алексеевич, ведущий инженер-технолог лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация;

Кожухов Антон Сергеевич, аспирант лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация;

Барбараш Ольга Леонидовна, доктор медицинских наук, проф., чл.-корр. РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация;

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Ismagilov Zinfer R., PhD, Professor, Chief Executive Officer, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation;

Sevostyanov Oleg G., PhD, Associate Professor, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation;

Dolganyuk Viatcheslav F., PhD, senior researcher, Research Institute of Biotechnology, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation;

Gutakovsky Anton K., PhD, leading researcher, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation;

Zhivodkov Yuriy A., leading engineer-technologist, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation;

Kozhukhov Anton S., graduate student, Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation;

Barbarash Olga L., PhD, Professor, Chief Executive Officer, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation;

Kutikhin Anton G., PhD, Head of the Laboratory, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Вклад авторов в статью

ШДК – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ГТВ – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ЕОС – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ПАН – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

МВЮ – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии

Author Contribution Statement

ShDK – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

GTV – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

EOS – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

PAN – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

MVYu – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

для публикации, полная ответственность за содержание;

KPII – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

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

СОГ – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ДВФ – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ГАК – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ЖЮА – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

КАС – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

БОЛ – вклад в концепцию исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

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

KRP – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

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

SOG – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

DVF – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

GAK – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ZhYuA – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

KAS – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

BOL – contribution to the concept of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013; 8 (9): e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
2. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep*. 2016; 6: 27255. doi: 10.1038/srep27255.
3. Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J Clin Epidemiol*. 1997; 50 (8): 967-973. doi: 10.1016/S0895-4356(97)00104-2.
4. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*. 2008; 156 (3): 556-563. doi: 10.1016/j.ahj.2008.05.016.
5. Palmer S.C., Hayen A., Macaskill P., Pellegrini F., Craig J.C., Elder G.J., Strippoli G.F. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011; 305 (11): 1119-1127. doi: 10.1001/jama.2011.308.
6. Reid I.R., Gamble G.D., Bolland M.J. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. *J Intern Med*. 2016; 279 (6): 524-540. doi: 10.1111/joim.12464.
7. Yurdagul A. Jr., Finney A.C., Woolard M.D., Orr A.W. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J*. 2016; 473 (10): 1281-1295. doi: 10.1042/BJ20150844.
8. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118 (4): 620-636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
9. Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016; 14 (9): 1021-1033. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527.
10. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016; 248: 97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
11. Young J.D., Martel J., Young D., Young A., Hung C.M., Young L., Chao Y.J., Young J., Wu C.Y. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One*. 2009; 4 (5): e5421. doi: 10.1371/journal.pone.0005421.
12. Peng H.H., Wu C.Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D.M., Lee Y.H., Young J.D. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013; 9 (13): 2297-2307. doi: 10.1002/sml.201202270.
13. Young J.D., Martel J., Young L., Wu C.Y., Young A., Young D. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis. *PLoS One*. 2009; 4 (2): e4417. doi: 10.1371/journal.pone.0004417.
14. Martel J., Young D., Young A., Wu C.Y., Chen C.D., Yu J.S., Young J.D. Comprehensive proteomic analysis of mineralnanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2011; 418 (1): 111-125. doi: 10.1016/j.ab.2011.06.018.
15. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904.
16. Love S.A., Maurer-Jones M.A., Thompson J.W., Lin Y.S., Haynes C.L. Assessing nanoparticle toxicity. *Annu Rev*

Anal Chem (Palo Alto Calif). 2012; 5: 181-205. doi: 10.1146/annurev-anchem-062011-143134.

17. Lai D.Y. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2012; 4 (1): 1-15. doi: 10.1002/wnan.162.

18. Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. Nanoscale Res Lett. 2018; 13 (1): 44. doi: 10.1186/s11671-018-2457-x.

19. Martel J., Wu C.Y., Hung C.Y., Wong T.Y., Cheng A.J., Cheng M.L., Shiao M.S., Young J.D. Fatty acids and small organic

compounds bind to mineralo-organic nanoparticles derived from human body fluids as revealed by metabolomic analysis. Nanoscale. 2016; 8 (10): 5537-5545. doi: 10.1039/c5nr08116e.

20. Wu C.Y., Martel J., Young J.D. Comprehensive organic profiling of biological particles derived from blood. Sci Rep. 2018; 8 (1): 11310. doi: 10.1038/s41598-018-29573-6.

21. Барбараш Л.С., Роголина Н.В., Рутковская Н.В., Овчаренко Е.А. Механизмы развития дисфункций биологических протезов клапанов сердца. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018; 7 (2): 10-24

REFERENCES

1. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. PLoS One. 2013; 8 (9): e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.

2. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovskiy A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. Sci Rep. 2016; 6: 27255. doi: 10.1038/srep27255.

3. Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. J Clin Epidemiol. 1997; 50 (8): 967-973. doi: 10.1016/S0895-4356(97)00104-2.

4. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am Heart J. 2008; 156 (3): 556-563. doi: 10.1016/j.ahj.2008.05.016.

5. Palmer S.C., Hayen A., Macaskill P., Pellegrini F., Craig J.C., Elder G.J., Strippoli G.F. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2011; 305 (11): 1119-1127. doi: 10.1001/jama.2011.308.

6. Reid I.R., Gamble G.D., Bolland M.J. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. J Intern Med. 2016; 279 (6): 524-540. doi: 10.1111/joim.12464.

7. Yurdagul A. Jr., Finney A.C., Woolard M.D., Orr A.W. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. Biochem J. 2016; 473 (10): 1281-1295. doi: 10.1042/BJ20150844.

8. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res. 2016; 118(4): 620-636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

9. Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2016; 14 (9): 1021-1033. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527.

10. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis. 2016; 248: 97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

11. Young J.D., Martel J., Young D., Young A., Hung C.M., Young

L, Chao Y.J., Young J., Wu C.Y. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. PLoS One. 2009; 4 (5): e5421. doi: 10.1371/journal.pone.0005421.

12. Peng H.H., Wu C.Y., Young D., Martel J., Young A., Ojcius D.M., Lee Y.H., Young J.D. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. Small. 2013; 9 (13): 2297-2307. doi: 10.1002/sml.201202270.

13. Young J.D., Martel J., Young L., Wu C.Y., Young A., Young D. Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis. PLoS One. 2009; 4 (2): e4417. doi: 10.1371/journal.pone.0004417.

14. Martel J., Young D., Young A., Wu C.Y., Chen C.D., Yu J.S., Young J.D. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 2011; 418 (1): 111-125. doi: 10.1016/j.ab.2011.06.018.

15. Smith E.R., Hanssen E., McMahon L.P., Holt S.G. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. PLoS One. 2013; 8 (4): e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904.

16. Love S.A., Maurer-Jones M.A., Thompson J.W., Lin Y.S., Haynes C.L. Assessing nanoparticle toxicity. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 2012; 5: 181-205. doi: 10.1146/annurev-anchem-062011-143134.

17. Lai D.Y. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2012; 4 (1): 1-15. doi: 10.1002/wnan.162.

18. Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. Nanoscale Res Lett. 2018; 13 (1): 44. doi: 10.1186/s11671-018-2457-x.

19. Martel J., Wu C.Y., Hung C.Y., Wong T.Y., Cheng A.J., Cheng M.L., Shiao M.S., Young J.D. Fatty acids and small organic compounds bind to mineralo-organic nanoparticles derived from human body fluids as revealed by metabolomic analysis. Nanoscale. 2016; 8 (10): 5537-5545. doi: 10.1039/c5nr08116e.

20. Wu C.Y., Martel J., Young J.D. Comprehensive organic profiling of biological particles derived from blood. Sci Rep. 2018; 8 (1): 11310. doi: 10.1038/s41598-018-29573-6.

21. Barbarash L.S., Rogulina N.V., Rutkovskaya N.V., Ovcharenko E.A. Mechanisms underlying bioprosthetic heart valve dysfunctions. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2018; 7 (2): 10-24. (In Russian)

Для цитирования: Д.К. Шишкова, Т.В. Глушкова, О.С. Ефимова, А.Н. Попова, В.Ю. Малышева, Р.П. Колмыков, З.Р. Исмагилов, А.К. Гутаковский, Ю.А. Живодков, А.С. Кожухов, В.Ф. Долганюк, О.Л. Барбараш, А.Г. Кутихин. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2019; 8 (1): 59-69. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69

To cite: D.K. Shishkova, T.V. Glushkova, O.S. Efimova, A.N. Popova, V.Yu. Malysheva, R.P. Kolmykov, Z.R. Ismagilov, A.K. Gutakovskiy, Yu.A. Zhivodkov, A.S. Kozhukhov, V.F. Dolganyuk, O.L. Barbarash, A.G. Kutikhin. Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2019; 8 (1): 59-69. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69