

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА СПЕЦИФИЧНОЙ ЭНДОТЕЛИОТОКСИЧНОСТИ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

Дарья Кирилловна ШИШКОВА¹, Елена Анатольевна ВЕЛИКАНОВА¹,
Ринат Авхадиевич МУХАМАДИЯРОВ¹, Арсений Евгеньевич ЮЖАЛИН¹,
Юлия Александровна КУДРЯВЦЕВА¹, Анна Николаевна ПОПОВА²,
Дмитрий Михайлович РУССАКОВ³, Антон Геннадьевич КУТИХИН¹

¹ *НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6*

² *Институт углехимии и химического материаловедения ФИЦ угля и углехимии СО РАН
650000, г. Кемерово, просп. Советский, 18*

³ *Кемеровский государственный университет
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6*

Цель работы – идентифицировать механизм специфичной токсичности кальций-фосфатных бионов (КФБ) для эндотелия. **Материал и методы.** Искусственно синтезированные путем перенасыщения культуральной среды соответствующими солями КФБ и магний-фосфатные бионы (МФБ) были добавлены к культурам эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 и эндотелиальных клеток мыши линии 2H-11 с целью изучения пространственно-временных аспектов интернализации бионов эндотелиальными клетками методами просвечивающей электронной и конфокальной микроскопии, анализа влияния блокады вакуолярной H^+ -АТФазы при помощи лизосомального ингибитора бафиломицина А1 на эндотелиотоксичность бионов, а также оценки экспрессии каспазы-3 и ее субстрата поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP-1). **Результаты.** КФБ поглощались эндотелиальными клетками уже через 1 ч после их добавления и были локализованы в лизосомах; спустя 4 ч наблюдалось выделение ионов кальция из лизосом в цитозоль, сопровождавшееся многократным повышением концентрации каспазы-3 и ее субстрата PARP-1. Добавление в культуральную среду бафиломицина А1 позволяло эндотелиальным клеткам избежать индуцируемой малорастворимыми КФБ гибели независимо от его дозы и времени экспозиции, при этом высокорастворимые МФБ не обладали эндотелиотоксичностью независимо от добавления бафиломицина А1. **Заключение.** Поглощаясь эндотелиальными клетками, КФБ инициируют их гибель вследствие своего растворения в лизосомах и последующего выделения в цитозоль ионов кальция, опосредованно активирующих каспазы. В свою очередь, МФБ не обладают эндотелиотоксичностью, поскольку при их растворении в лизосомах не происходит выделения ионов кальция. Таким образом, механизмом специфичной эндотелиотоксичности КФБ является лизосомально-опосредованная клеточная гибель.

Ключевые слова: бионы, фосфат кальция, гидроксипатит, токсичность, эндотелий, лизосомы, клеточная гибель, атеросклероз.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0546-2015-0011 «Патогенетическое 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».

Автор для переписки: Шишкова Д.К., e-mail: shishkovadk@gmail.com

Для цитирования: Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н., Руссаков Д.М., Кутихин А.Г. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 12–21. doi: 10.15372/SSMJ20190402.

LYSOSOME-DEPENDENT CELL DEATH DEFINES SPECIFIC ENDOTHELIAL TOXICITY OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS

Daria Kirillovna SHISHKOVA¹, Elena Anatol'evna VELIKANOVA¹,
Rinat Avkhadiyevich MUKHAMADIYAROV¹, Arseniy Evgen'evich YUZHALIN¹,
Yuliya Aleksandrovna KUDRYAVTSEVA¹, Anna Nikolaevna POPOVA²,
Dmitriy Mikhaylovich RUSSAKOV³, Anton Gennad'evich KUTIKHIN¹

¹ *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases*
650002, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6

² *Institute of Coal Chemistry and Material Science,*
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS
650000, Kemerovo, Sovetsky av., 18

³ *Kemerovo State University*
650000, Kemerovo, Krasnaya str., 6

Aim of the study was to identify the mechanism of specific endothelial toxicity related to calcium phosphate bions (CPB). **Material and methods.** CPB and magnesium phosphate bions (MPB) were artificially synthesised through supersaturation of culture medium with respective salts and then added to human endothelial cells (EA.hy 926) and murine endothelial cells (2H-11) to study: 1) spatiotemporal aspects of bion internalisation by means of transmission electron microscopy and confocal microscopy; 2) whether blocking of H⁺-ATPase by lysosomal inhibitor bafilomycin A1 affects endothelial toxicity of bions; 3) expression of caspase-3 and its substrate poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). **Results.** CPB were internalized by endothelial cells as early as 1 h upon their addition and were localized in lysosomes; after 4 h, we detected release of calcium ions (Ca²⁺) from lysosomes to cytosol accompanied by multifold increase in cleaved caspase 3 and its substrate PARP-1. Bafilomycin A1 rescued endothelial cells from death induced by slightly soluble CPB regardless of exposure time and dose; however, freely soluble MPB did not evince endothelial toxicity regardless of bafilomycin A1 addition. **Conclusion.** Upon internalization by endothelial cells, CPB cause their death due to dissolution in lysosomes and subsequent release of calcium ions into the cytosol, ultimately leading to cleavage of executioner caspases. MPB lack endothelial toxicity because their dissolution does not lead to release of calcium ions. Therefore, specific endothelial toxicity of CPB is defined by lysosome-dependent cell death.

Key words: bions, calcium phosphate, hydroxyapatite, toxicity, endothelium, lysosomes, cell death, atherosclerosis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of funding. This study was supported by the complex program of SB RAS within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0546-2015-0011 «Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors».

Citation: Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Yuzhalin A.E., Kudryavtseva Yu.A., Popova A.N., Russakov D.M., Kutikhin A.G. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 12–21. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190402.

Перенасыщение крови ионами кальция и фосфатами ассоциировано с атеросклерозом и его клиническими проявлениями, основными из которых являются ишемическая болезнь сердца, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболевания периферических артерий [6, 11, 12]. Одним из физиологических механизмов поддержания минерального гомеостаза крови является образование кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют

собой кристаллические частицы губчатой структуры диаметром ≤ 500 нм, состоящие из гидроксипатита, карбонат-гидроксипатита и ряда белков, включая ключевые ингибиторы эктопической кальцификации альбумин и фетуин-А [18]. Ранее нашей группой показано, что, защищая организм от массивной кальцификации средней оболочки артерий, КФБ, тем не менее, вызывают гибель эндотелиальных клеток в культуре и выделение ими провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6

и интерлейкина-8) [1, 10], а также индуцируют гипертрофию интимы [2, 10] и воспаление адвентиции [3] в аорте нормолипидемических крыс Wistar. В то же время, несмотря на неоднократно показанную в различных экспериментах специфичность эндотелиотоксического действия КФБ (в сравнении с магниевыми фосфатными бионами, (МФБ)) [1–3, 10], механизм этого эффекта остается неизвестным. Целью исследования было изучение механизма специфичной токсичности КФБ для эндотелиальных клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Искусственный синтез бионов. Все эксперименты по искусственному синтезу бионов проводились в стерильных условиях. КФБ были синтезированы искусственно путем последовательного добавления равных концентраций солевых растворов CaCl_2 («Sigma-Aldrich», США, 21115) и Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», 94046) к питательной среде DMEM («Gibco», США, 41966029), содержащей фетальную бычью сыворотку («Gibco», 10500056). Для синтеза КФБ концентрация солей в среде после их добавления составляла 3 мМ, а доля фетальной бычьей сыворотки – 10 %. МФБ были также синтезированы искусственно при помощи последовательного добавления равных концентраций солевых растворов MgCl_2 («Sigma-Aldrich», 63069) и Na_2HPO_4 к питательной среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку. Концентрация солей в среде после их добавления составляла 20 мМ, а доля фетальной бычьей сыворотки – 10 %. Культивирование бионов проводили в течение суток при физиологических условиях (37 °С, 5 % CO_2 , высокая влажность), после чего среду центрифугировали при 200 000 g («Optima MAX-XP», «Beckman Coulter», США) в течение часа, что позволило обеспечить осаждение бионов всего спектра размерности. После ультрацентрифугирования бионы ресуспендировали в бидистиллированной воде (для рентгеновской дифрактометрии) либо однократном фосфатно-солевом буфере (для экспериментов с клеточными культурами) до оптической плотности на длине волны 650 нм (OP_{650}) в 0,08–0,10 («Multiskan GO», «Thermo Fisher Scientific», США), являющейся минимально измеримой концентрацией бионов в растворе. С целью получения сухого порошка для рентгеновской дифрактометрии суспензию бионов замораживали при –40 °С и подвергали лиофилизации в течение суток («FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System», «Labconco», США).

Рентгеновская дифрактометрия. Химические соединения, входящие в состав бионов,

определяли путем анализа их лиофилизированного порошка методом рентгеновской порошковой дифрактометрии («Bruker D8 ADVANCE», «Bruker», США) с медной рентгеновской трубкой при 40 кВ. Дифрактометрию проводили по 2 θ углу от 20 до 120° при скорости в 0,02° в секунду. Полученные спектры сравнивали с базой Объединенного комитета порошковых дифракционных стандартов для идентификации химической формулы соединения.

Культивирование клеток. Для экспериментов была использована культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 (передана коллегами) и культура иммортализованных лимфатических эндотелиальных клеток мыши линии 2H-11 (American Tissue Culture Collection, CRL-2163). Пересев клеток проводили по достижении 80 % конfluence. Манипуляции с клетками проводились в стерильных условиях при 37 °С, 5 % CO_2 и высокой влажности.

Клеточная линия EA.hy 926 является гибридной, которая была получена путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549 и сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека. Клеточная линия 2H-11, полученная путем иммортализации первичной культуры лимфатических эндотелиальных клеток мыши вирусом SV40, также сохраняет основные морфологические и функциональные особенности лимфатических эндотелиальных клеток. Данные линии клеток культивировали в среде DMEM/F12 («Gibco», 11320074), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки, 2 % гипоксантина-аминоптерина-тимидина («Gibco», 21060017), 1 % NERES-буфера («Sigma-Aldrich», H3537) и антибиотик-антимикотик («Gibco», 15240062: 10 000 ЕД/мл пенициллина, 10 000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В).

Анализ интернализации бионов эндотелиальными клетками. Для оценки интернализации бионов эндотелиоцитами к клеткам линии EA.hy 926 в 6-луночных планшетах (2 × 10⁵ клеток на лунку) добавляли суспензию КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера (100 мкл, OP_{650} = 0,08–0,10) на 48 ч, после чего проводили трипсинизацию в течение 10 мин. После центрифугирования клетки фиксировали в 2,5%-м глutarовом альдегиде (1 ч) и постфиксировали в 1%-м тетраоксиде осмия (1 ч). Клетки заключали в 2%-ю агарозу, обезвоживали в этаноле возрастающей концен-

трации (70 %, 80 % и трижды 95 % по 15 мин), помещали в смесь эпоксидной смолы и ацетона (1 : 1, 2 ч), затем пропитывали эпоксидной смолой (10 ч) и заключали в свежую эпоксидную смолу (60 °С, 24 ч). Срезы, полученные с помощью ультратома («LKB Bromma Nova Ultra», «LKB», США), помещали на медные сеточки с углеродным напылением, окрашивали 2%-м уранилацетатом, контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали при помощи просвечивающей электронной микроскопии («JEM-2100», «Jeol», Япония).

С целью подтверждения результатов просвечивающей электронной микроскопии осадок КФБ после ультрацентрифугирования ресуспендировали в растворе альбумина, меченного флуоресцеинизотиоцианатом («Invitrogen», США, A23015) в течение часа, после чего снова ультрацентрифугировали при 200 000 g (1 ч). Вносили 25 мкл суспензии КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера к клеткам линии EA.hy 926, культивированным на стеклах для конфокальной микроскопии, на 1, 2 или 4 ч с последующим добавлением лизосомального красителя LysoTracker Red («Invitrogen», L7528, 500 нМ) на 30 мин, ядерного красителя Hoechst 33342 («Invitrogen», H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин и конфокальной микроскопией («LSM 700», «Carl Zeiss», Германия).

Анализ проницаемости лизосом. Для анализа влияния ацидификации лизосом на цитотоксичность бионов к клеткам линии EA.hy 926 в 96-луночных планшетах (80–85 % конфлюэнтности) добавляли суспензию МФБ или КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера (10 мкл, ОП₆₅₀ = 0,08–0,10, 12 лунок на группу) на 4 или 24 ч с добавлением или без добавления специфичного ингибитора вакуолярной H⁺-АТФазы бафиломицина А1 («Abcam», Великобритания, ab120497, 0,1 или 1 мкМ), растворенного в диметилсульфоксиде (конечная концентрация в среде 0,6 %). Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически с помощью набора для анализа цитотоксичности клеток («Abcam», ab112118) согласно протоколу производителя.

Для оценки перехода ионов кальция из лизосом в цитозоль к клеткам линии EA.hy 926, культивированным на стеклах для конфокальной микроскопии, вносили 25 мкл суспензии КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера на 1, 2 или 4 ч с добавлением флуоресцентного детектора ионов кальция Fluo-3 AM («Invitrogen», F1242, 5 мкМ) на 1 ч, лизосомального красителя «LysoTracker Red» (500 нМ) на 30 мин и ядерного красителя

«Hoechst 33342» (2 мкл/мл) на 15 мин с последующей конфокальной микроскопией.

Иммуноблоттинг. После добавления равных концентраций МФБ, КФБ или чистого однократного фосфатно-солевого буфера (100 мкл, ОП₆₅₀ = 0,08–0,10) к культурам клеток линии 2H-11 (80–85 % конфлюэнтности) на 24 ч и отмывки от остаточной культуральной среды охлажденным однократным фосфатно-солевым буфером проводили выделение белка посредством добавления 1 мл RIPA-буфера (0,15M NaCl, 1%-й NP-40, 1%-й дезоксихолат натрия, 0,1%-й додецилсульфат натрия и 0,025M Tris-HCl pH 7,6), дополненного коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз («Thermo Fisher Scientific», 78446). Для определения экспрессии белков и детекции посттрансляционных модификаций методом иммуноблоттинга 10 мкл белка (на каждую группу) смешивали с буфером Лэммли (4%-й додецилсульфат натрия, 20%-й глицерол, 10%-й 2-меркаптоэтанол, 0,004%-й бромфеноловый синий и 0,125M Tris-HCl pH 6,8) в отношении 1 : 1, нагревали в кипящей воде в течение 5 мин и далее загружали на 12-луночный гель NuPAGE® толщиной 1 мм, содержащий 4–12 % Bis-Tris («Invitrogen», NP0321BOX). В качестве маркера молекулярных масс применяли белковый стандарт «Precision Plus» («Bio-Rad», США, 1610374). Белки разделяли электрофорезом (100 В) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в течение 1 ч. Белки на мембрану переносили при 30 В в течение 90 мин при 4 °С. Блоттинг проводили с антителами к расщепленной каспазе-3 (cleaved caspase-3, cCasp-3; «Abcam», ab49822) и расщепленной поли(АДФ-рибоза)-полимеразе (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cPARP-1; «Abcam», ab194586). В качестве контроля загрузки был использован гистон H3 (histone H3; «Abcam», ab12079). Для хемилюминесцентной детекции результата использовали конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела козла («Abcam», ab205718). Белки визуализировали с использованием реагента для детекции «Amersham ECL Prime» («Sigma-Aldrich», GERPN2232) и цифрового сканера хемилюминесцентных блотов «C-DiGit» («LI-COR Bioscience», США s). Количественный анализ снимков хемилюминесцентных гелей проводился при помощи стандартного алгоритма в программе «ImageJ» (National Institutes of Health).

Статистический анализ. В силу относительно небольшого количества репликат нормальность распределения не оценивалась и использовались методы непараметрической статистики. Данные представлены в виде медианы и межквартильного расстояния. Различия между груп-

пами устанавливались при помощи критерия Манна – Уитни, статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электронная и конфокальная микроскопия выявили интернализацию КФБ (рис. 1), которая начиналась уже через 1 ч после их добавления к культурам эндотелиальных клеток, и их колокализацию КФБ с лизосомами (рис. 2). Отсутствие повреждений плазматической мембраны позволило выдвинуть гипотезу о том, что КФБ могут вызывать один из вариантов программированной гибели клеток, а не приводить к цитолиту (см. рис. 1). Было предположено, что внутрилизосомальное растворение КФБ после их интернализации сопровождается освобождением в цитозоль ионов кальция, что в конечном итоге приведет к активации каспаз и инициации клеточной гибели.

Воздействие бафиломицином А1 (соединением, ингибирующим вакуолярную H^+ -АТФазу [4]

и, следовательно, предотвращающим ацидификацию лизосомального содержимого [19]) частично спасало эндотелиальные клетки от вызванной КФБ гибели независимо от времени воздействия (4 или 24 ч) и дозы (0,1 или 1 мкМ) (рис. 3). Напротив, МФБ, состоящие из магния фосфата гидрата, который обладает более высокой растворимостью, чем характерный для КФБ гидроксипатит (рис. 4), не проявляли эндотелиотоксичность независимо от присутствия бафиломицина А1 (см. рис. 3).

Через 1 ч после добавления КФБ к эндотелиальным клеткам наблюдалось смещение флуоресцентно детектируемых ионов кальция из лизосом в цитозоль (рис. 5). Следовательно, гибель эндотелиальных клеток связана с растворением КФБ и сопутствующим высвобождением ионов кальция из лизосом в цитозоль, а не с возможным осмотическим шоком, который возникал бы независимо от типа растворенных бионов из-за градиента ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} между лизосомами и цитозолем. Через 4 ч после добавления сфериче-

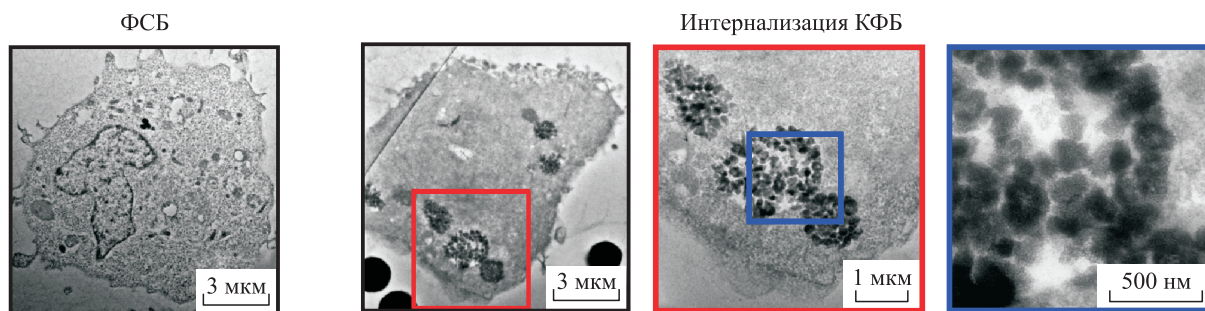


Рис. 1. Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера или КФБ в течение 48 ч. Вставки показывают интернализированные КФБ. Просвечивающая электронная микроскопия

Fig. 1. EA.hy 926 cells, exposed to single phosphate-buffered saline or CPB for 48 hours. Inserts show internalized CPB. Transmission electron microscopy

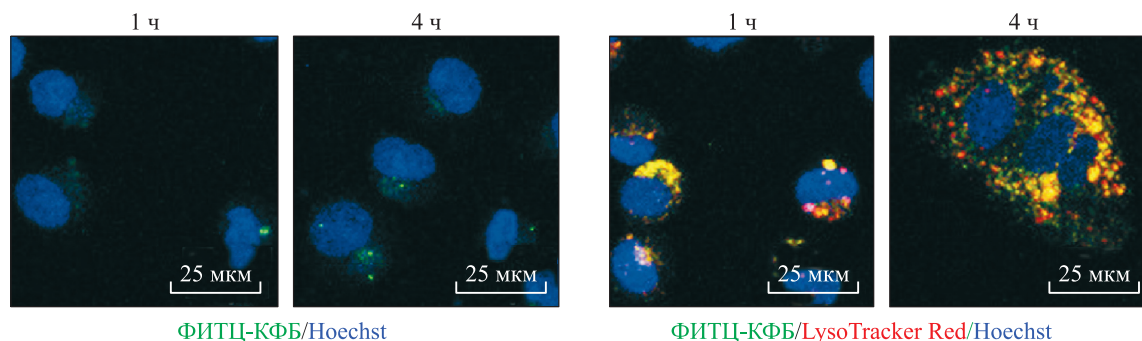


Рис. 2. Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) КФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red (справа) и ядерным красителем Hoechst 33342. Конфокальная микроскопия

Fig. 2. EA.hy 926 cells, exposed to fluorescein isothiocyanate (FITC) CPB for 1 or 4 hours and stained with lysosomal dye LysoTracker Red (right) and nuclear dye Hoechst 33342. Confocal microscopy

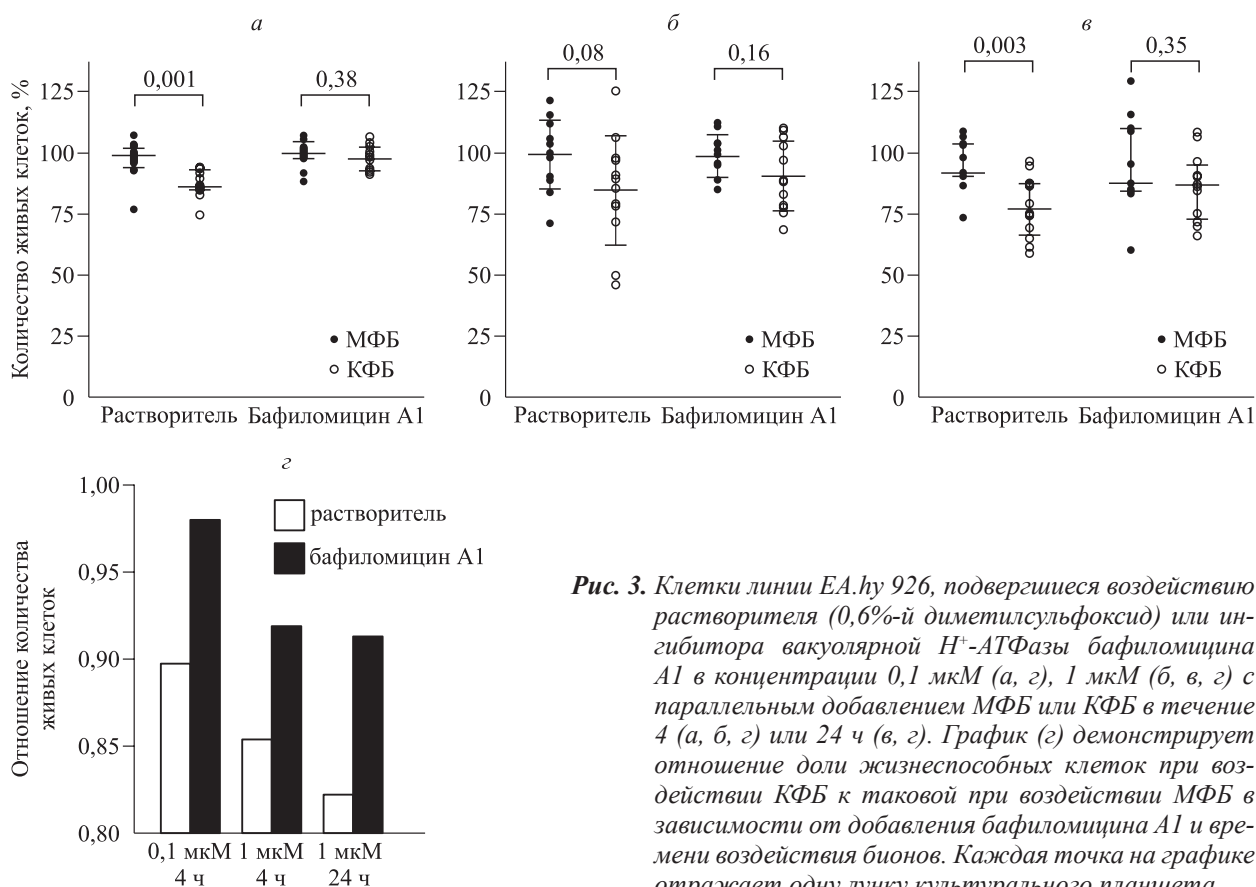
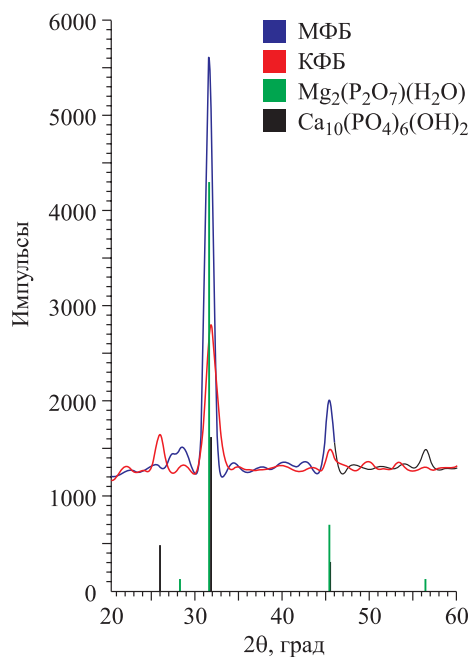


Рис. 3. Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию растворителя (0,6%-й диметилсульфоксид) или ингибитора вакуолярной H⁺-АТФазы бафиломицина А1 в концентрации 0,1 мкМ (а, з), 1 мкМ (б, в, з) с параллельным добавлением МФБ или КФБ в течение 4 (а, б, з) или 24 ч (в, з). График (з) демонстрирует отношение доли жизнеспособных клеток при воздействии КФБ к таковой при воздействии МФБ в зависимости от добавления бафиломицина А1 и времени воздействия бионов. Каждая точка на графике отражает одну лунку культурального планшета

Fig. 3. EA.hy 926 cells, exposed to a solvent (0.6% dimethyl sulfoxide) or vacuolar H⁺-ATPase inhibitor baflomycin A1 at a concentration of 0.1 μM (a, d), 1 μM (b, c, d) with parallel addition of MPB or CPB for 4 (a, b, d) or 24 hours (c, d). Graph (d) shows the ratio of the proportion of viable cells when exposed to CPB to that when exposed to MPB, depending on the addition of baflomycin A1 and the time of exposure to bions. Each dot in the graph represents one well of the culture plate

Рис. 4. МФБ и КФБ состоят из высокорастворимого магния фосфата гидрата (Mg₂(P₂O₇)(H₂O)) и малорастворимого гидроксиапатита (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) соответственно. Рентгеновская порошковая дифрактометрия

Fig. 4. MPB and CPB consist of highly soluble magnesium phosphate hydrate (Mg₂(P₂O₇)(H₂O)) and poorly soluble hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), respectively. X-ray powder diffractometry



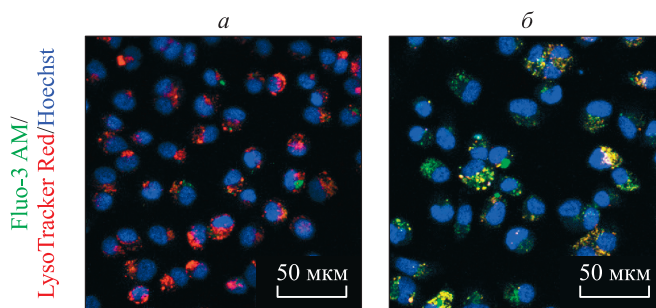


Рис. 5. Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера (а) или КФБ (б) в течение 1 ч и окрашенные красителями Fluo 3-AM, LysoTracker Red и Hoechst 33342. В контрольных клетках лизосомы не содержат ионов кальция (красное окрашивание), которые в относительно небольшом количестве локализованы в цитозоле (зеленое окрашивание); в клетках, подвергшихся воздействию КФБ, ионы кальция расположены как в цитозоле (в большом количестве), так и в лизосомах (соответствующий наложению зеленого и красного желтый цвет, отражающий колокализацию ионов кальция и лизосом)

Fig. 5. EA.hy 926 cells, exposed to single phosphate-buffered saline (a) or CPB (b) for 1 hour and stained with Fluo 3-AM, LysoTracker Red and Hoechst 33342 dyes. In the control cells lysosomes do not contain calcium ions (red staining), which are located in a relatively small amount in the cytosol (green staining); in cells, exposed to CPB, calcium ions are located both in the cytosol (in large quantities) and in lysosomes (the yellow color corresponding to the superimposition of green and red, reflecting the co-localization of calcium ions and lysosomes)

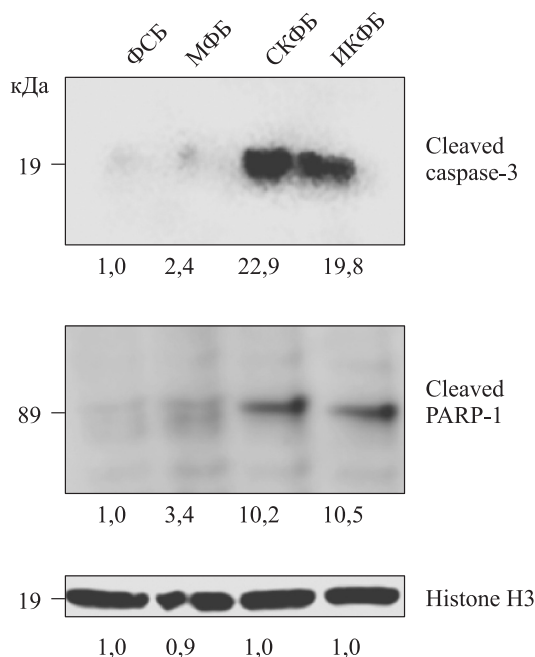


Рис. 6. Эндотелиальные клетки линии 2H-11, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ), МФБ, сферических КФБ (СКФБ) или игольчатых КФБ (ИКФБ) в течение 24 ч. Числовые значения показывают плотность полос относительно контрольной группы (ФСБ).

Fig. 6. Endothelial cells of the 2H-11 line, exposed to single phosphate-buffered saline (PBS), MPB, spherical CPB, or needle CPB for 24 hours. The numerical values indicate the density of the bands relative to the control group (PBS)

ских или игольчатых КФБ, но не МФБ или фосфатно-солевого буфера методом иммуноблоттинга было детектировано увеличение концентрации расщепленных форм каспазы-3 и ее субстрата PARP-1 (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одним из триггеров увеличения проницаемости внешней мембраны митохондрий, в конечном итоге приводящего к активации запускающей клеточную гибель каспазы-3 [9]. Концентрация расщепленных форм каспазы-3 (отражает ее активацию) [8, 14], так и ее субстрата, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы [17] (отражает инактивацию этого белка, ответственного за репарацию ДНК) [8, 14], увеличивалась в несколько раз через 4 ч после добавления сферических или игольчатых КФБ, но не МФБ или фосфатно-солевого буфера (см. рис. 6). Кроме того, в работах нашей группы [10] и коллег [20] ранее было продемонстрировано повышение концентрации расщепляющей каспазу-3 активной каспазы-9 (свидетельствующей об ее активации) [8, 14] при воздействии КФБ. В целом эти результаты указывают на лизосомально-опосредованную гибель клеток (тип клеточной гибели, отличающийся от остальных по первичному повышению проницаемости лизосом и активации каспазы-3 и -9) как вероятный механизм вызываемой КФБ клеточной гибели [7].

Данные результаты согласуются с полученными ранее на сосудистых гладкомышечных клетках [5, 21], однако противоречат другим работам, в которых было предположено, что КФБ вызывают разрыв мембраны лизосом вследствие создания осмотического градиента между лизосомальным матриксом и цитозолем [13, 15, 16]. Стоит отметить, что нарушение целостности мембраны лизосом в этих исследованиях определялось либо окрашиванием акридиновым оранжевым [13], либо просвечивающей электронной микроскопией [15, 16]. Оба данных метода не являются оптимальными для надежной детекции повреждения лизосомальной мембраны – акридиновый оранжевый недостаточно специфичен в качестве индикатора рН и не всегда демонстрирует стабильные результаты применительно к окрашиванию лизосом (репрезентативное изображение в работе [13] показывает полное отсутствие лизосом в клетке через 4 ч после добавления КФБ, что напрямую противоречит окрашиванию LysoTracker Red в наших экспериментах (см. рис. 4)), а визуализация разрушения лизосом методом просвечивающей электронной микроскопии весьма условна (что подтверждается полученными в этих исследованиях репрезентативными изображениями [15, 16]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При растворении в лизосомах КФБ инициируют гибель эндотелиальных клеток вследствие массивного выделения в цитоплазму ионов кальция, опосредованно активирующих каспазы, что соответствует механизму лизосомально-зависимой клеточной гибели. В то же время аналогичные КФБ по всем физико-химическим характеристикам (кроме более высокой растворимости) МФБ не вызывают токсических эффектов вследствие отсутствия выделения в цитоплазму ионов кальция при растворении в лизосомах, что доказывает специфичность эндотелиотоксического действия КФБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. *Комплекс. проблемы серд.-сосуд. заболеваний*. 2017; (1): 92–101.
2. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кути-

хин А.Г. Кальций-фосфатные бионы специфично индуцируют гипертрофию поврежденной интимы у крыс. *Рос. кардиол. журн*. 2018; 23 (9): 33–38.

Shishkova D.K., Velikanova E.A., Krivkina E.O., Mironov A.V., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Calcium-phosphate bions do specifically induce hypertrophy of damaged intima in rats. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2018; 23 (9): 33–38. [In Russian].

3. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Токсическое действие кальций-фосфатных бионов на адвентицию брюшной аорты крыс. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2018; (3): 37–43.

Shishkova D.K., Velikanova E.A., Krivkina E.O., Mironov A.V., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Toxicity of calcium phosphate bions for aortic adventitia in rats. *Ateroskleroz i dislipidemii = The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2018; 3: 37–43. [In Russian].

4. Bowman E.J., Siebers A., Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988; 85 (21): 7972–7976.

5. Ewence A.E., Bootman M., Roderick H.L., Skepper J.N., McCarthy G., Epple M., Neumann M., Shanahan C.M., Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ. Res*. 2008; 103 (5): e28–e34.

6. 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.

7. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., de Laurenzi V., de Maria R., Debatin K.M., de Bernardinis R.J., Deshmukh M., di Daniele N., di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., Garcia-Saez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M.,

- Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molkentin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandennebeele P., Vander Heiden M.G., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25 (3): 486–541.
8. Julien O., Wells J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017; 24 (8): 1380–1389.
9. Kumar S., Kasseckert S., Kostin S., Abdallah Y., Schafer C., Kaminski A., Reusch H.P., Piper H.M., Steinhoff G., Ladilov Y. Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12. *Cardiovasc. Res.* 2007; 73 (1): 172–180.
10. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamdiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filipev 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.
11. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L., Sundström J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 (2): 333–339.
12. 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.
13. Liu Z., Xiao Y., Chen W., Wang Y., Wang B., Wang G., Xu X., Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity. *J. Mater. Chem. B.* 2014; 2: 3480–3489.
14. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015; 22 (4): 526–539.
15. Shyong Y.J., Wang M.H., Kuo L.W., Su C.F., Kuo W.T., Chang K.C., Lin F.H. Mesoporous hydroxyapatite as a carrier of olanzapine for long-acting antidepressant treatment in rats with induced depression. *J. Control Release.* 2017; 255: 62–72.
16. Shyong Y.J., Wang M.H., Tseng H.C., Cheng C., Chang K.C., Lin F.H. Mesoporous hydroxyapatite as olanzapine carrier provides a long-acting effect in antidepressant treatment. *J. Med. Chem.* 2015; 58 (21): 8463–8474.
17. Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V.M. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995; 81 (5): 801–809.
18. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineral-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e75501.
19. Yoshimori T., Yamamoto A., Moriyama Y., Futai M., Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (26): 17707–17712.
20. Yuan Y., Liu C., Qian J., Wang J., Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials.* 2010; 31 (4): 730–740.
21. Zhang C.Y., Sun X.Y., Ouyang J.M., Gui B.S. Diethyl citrate and sodium citrate reduce the cytotoxic effects of nanosized hydroxyapatite crystals on mouse vascular smooth muscle cells. *Int. J. Nanomedicine.* 2017; 12: 8511–8525.

Сведения об авторах:

Шишкова Д.К., e-mail: shishkovadk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>
Великанова Е.А., к.б.н., terella@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1079-1956>
Мухамадияров Р.А., к.б.н., e-mail: rem57@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1263-1158>
Южалин А.Е., к.м.н., e-mail: yuzhalin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7454-6653>
Кудрявцева Ю.А., д.б.н., e-mail: jackie1970@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6134-7468>
Попова А.Н., к.х.н., e-mail: h991@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6970-9542>
Руссаков Д.М., e-mail: dm.russakov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5170-7530>
Кутихин А.Г., к.м.н., e-mail: antonkutikhin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Information about authors:

Shishkova D.K., e-mail: shishkovadk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>
Velikanova E.A., candidate of biological sciences, e-mail: terella@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1079-1956>
Mukhamadiyarov R.A., candidate of biological sciences, e-mail: rem57@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1263-1158>
Yuzhalin A.E., candidate of medical sciences, e-mail: yuzhalin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7454-6653>
Kudryavtseva Yu.A., doctor of biological sciences, e-mail: jackie1970@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6134-7468>
Popova A.N., candidate of chemical sciences, e-mail: h991@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6970-9542>
Russakov D.M., e-mail: dm.russakov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5170-7530>
Kutikhin A.G., candidate of medical sciences, e-mail: antonkutikhin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8679-4857>