

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕГО ПУТИ АПОПТОЗА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

МАРКОВА В.Е.* , ШИШКОВА Д.К., КУТИХИН А.Г.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Изучить внутренний путь апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции кальций-фосфатным бионам (КФБ).

Материалы и методы. Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека были экспонированы сферическим и игольчатым КФБ в течение 4 часов с последующим выделением общего белка и фракционированием органелл с разделением митохондриального и цитозольного белка. При помощи иммуноблоттинга определяли уровень митохондриального маркера потенциал-зависимого анионоселективного канала 1, цитозольного маркера глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и белков внутреннего пути апоптоза цитохрома с, HtrA2/Omi в митохондриях и цитозоле, а также уровень общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 в общем белке, собранном с вышеуказанных культур эндотелиальных клеток в трех независимых экспериментах.

Результаты. Воздействие КФБ не всегда сопровождалось транслокацией данных белков из митохондрий в цитозоль. В зависимости от формы КФБ образцы выделенного из первичных артериальных эндотелиальных клеток белка различались как по спектру, так и по содержанию специфических белков. Лишь один эксперимент из трех показал стойкое повышение уровня активной каспазы-9 и каспазы-3 в экспонированных КФБ клетках в сравнении с контрольной группой (ФСБ), в то

время как в остальных каспазы либо детектировались нестабильно, либо уровень активных каспаз не различался между контрольной и опытными группами. Уровни общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 характеризовались конкордантностью, что свидетельствует о прямой корреляции между данными апоптотическими ферментами.

Заключение. Представленные результаты показали неоднозначность механизмов эндотелиотоксического действия КФБ и необходимость дальнейшей расшифровки путей клеточной гибели под воздействием сферических КФБ и игольчатых КФБ, а также необходимость совершенствования методики оценки молекулярных путей клеточной гибели под воздействием КФБ.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы, фосфат кальция, гидроксипатит, эндотелиальные клетки, апоптоз, каспазы.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «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».

Для цитирования:

Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Анализ внутреннего пути апоптоза в эндотелиальных клетках под воздействием кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):50-58. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

*Корреспонденцию адресовать:

Маркова Виктория Евгеньевна, 650002, Россия, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, e-mail: markve@kemcardio.ru

© Маркова В.Е. и др.

ORIGINAL RESEARCH

ANALYSIS OF INTRINSIC APOPTOSIS IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO CALCIUM PHOSPHATE BIONS

VICTORIA E. MARKOVA** , DARIA K. SHISHKOVA, ANTON G. KUTIKHIN

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract

Aim. To study intrinsic apoptosis in primary arterial endothelial cells treated with calcium phosphate bions (CPB).

Materials and Methods. Primary human coronary artery endothelial cells were exposed to spherical or needle-shaped CPB during 4 hours with the subsequent extraction of total protein and subcellular fractionation to separate mitochondrial and cytosolic protein. We then performed Western blotting to measure the relative levels of a mitochondrial marker porin, cytosolic marker glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and intrinsic apoptosis proteins cytochrome c and HtrA2/Omi in mitochondria and cytosol in addition to the levels of total and cleaved caspases-9 and caspases-3 in the total protein collected from three independent experiments.

Results. Translocation of cytochrome c and HtrA2/Omi was not a mandatory consequence of CPB exposure. Relative levels of the measured proteins differed according to the particle shape. Out of three experiments, only one showed a significant increase in cleaved caspase-9 and caspase-3 in CPB-treated as compared with the mock-treated

cells. In other experiments, cleaved caspases did not show a consistent elevation. The levels of total and cleaved caspase-9 and caspases-3 were concordant testifying to the direct correlation between them.

Conclusion. As mechanisms of CPB-induced endothelial toxicity are poorly defined, they require further investigation employing optimised methods.

Keywords: calcium phosphate bions, calcium phosphate, hydroxyapatite, endothelial cells, apoptosis, caspases.

Conflict of Interest

None declared

Funding

This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2019-0002 “Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors”.

◀ English

For citation:

Victoria E. Markova, Daria K. Shishkova, Anton G. Kutikhin. Analysis of intrinsic apoptosis in endothelial cells exposed to calcium phosphate bions. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3):50-58. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

**Corresponding author:

Victoria E. Markova, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation, 650002, e-mail: markve@kemcardio.ru
©Victoria E. Markova et al.

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) являются минерало-органическими наночастицами, состоящими из гидроксипатита, карбонат-гидроксипатита и кислых белков сыворотки крови, в том числе альбумина и фетуина-А [1]. Снижение уровня альбумина в крови приводит к увеличению концентрации ионизированного кальция (Ca^{2+}), что, в свою очередь, стимулирует формирование КФБ в организме человека.

Биологический смысл образования КФБ в крови заключается в поддержании фосфорно-кальциевого гомеостаза, поскольку данные частицы наряду с кальций-протеиновыми мономерами являются одним из основных депо избыточного кальция и фосфора в системном кровотоке [2]. КФБ собственно абсорбируют ионы кальция (Ca^{2+}) и фосфат-анионы (PO_4^{3-}), предотвращая пассивную внескелетную кальцификацию, и далее выводят из кровотока после интернали-

зации эндотелиальными клетками крупных артерий и микроциркуляторного русла внутренних органов, в особенности печени и селезенки [3, 4]. В то же время, препятствуя развитию эктопической минерализации, КФБ вызывают дисфункцию эндотелия, стимулируя выделение провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул клеточной адгезии на поверхности эндотелиальных клеток [5, 6]. В конечном счете дисфункция эндотелия приводит к миграции моноцитов в интиму и их последующей дифференцировке в макрофаги, а также к нарушению паракринных взаимодействий между эндотелиальными и сосудистыми гладкомышечными клетками [7].

При формировании КФБ претерпевают некоторые физико-химические изменения. Из изначально аморфной структуры происходит переход в кристаллическую, таким образом, из сферических КФБ (СКФБ) образуются игольчатые КФБ (ИКФБ). Есть предположение, что умеренное перенасыщение крови кальцием и фосфатами приводит к образованию СКФБ, в то время как тяжелое перенасыщение сопоставимо с появлением ИКФБ [8]. Форма КФБ, как и наночастиц гидроксипатита, во многом определяет их токсичность – ИКФБ вызывают гибель большей доли клеток в культуре в сравнении с СКФБ [9–11]. На молекулярном уровне сферические и игольчатые КФБ имеют различное патогенное воздействие на эндотелиальные клетки. В частности, СКФБ усиливают выделение клетками эндотелия интерлейкина-1 β , а ИКФБ – фактора некроза опухоли- α , что может указывать на активацию СКФБ инфламматорного пути вследствие первичного повреждения лизосом [4].

Известно множество путей клеточной гибели. Лизосомально-опосредованный путь связан с повышением проницаемости мембран лизосом и высвобождением нарушающих гомеостаз в цитозоле и на внешней мембране митохондрий катепсинов (лизосомальных цистеиновых, аспаргатовых или сериновых протеаз); кроме того, при растворении фосфата кальция это ведет к высвобождению Ca^{2+} , что также приводит к повышению проницаемости внешней мембраны митохондрий вследствие массивного перехода Ca^{2+} из цитозоля в митохондрии [12–15]. Внутренний путь апоптоза, в свою очередь, опосредован повышением проницаемости внешней мембраны митохондрий и запуском каскада реакций, в конечном итоге связанным с

активацией каспаз (цистеин-зависимые аспаргат-специфичные протеазы) [12]. Данный путь клеточной гибели связан с выделением в цитозоль из межмембранного пространства митохондрий про-апоптотических белков цитохрома С, HtrA2/Omi и SMAC/DIABLO [12]. Связываясь с активирующим фактором апоптотических протеаз (APAF-1), цитохром с запускает его гептамеризацию в результате гидролиза и замещения дАТФ [16–18]. Это приводит к формированию апоптосомного комплекса, который связывает и рассекает прокаспазу-9, таким образом активируя ключевую каспазу внутреннего пути апоптоза [18–20]. Связываясь с прокаспазой-3, инициирующая каспаза-9 в конечном итоге, активирует эффекторную каспазу-3 [21–23], что ведет к формированию молекулярной петли положительной обратной связи между каспазой-3 и каспазой-9, усиливающей активацию обеих данных молекул [24]. Одновременно с этим HtrA2/Omi и SMAC/DIABLO связываются с X-связанным ингибитором апоптоза (XIAP), инактивируя его и высвобождая каспазу-9 и каспазу-3 [25–30]. Каспаза-3 далее способствует фрагментации ДНК, инактивируя альфа-субъединицу фактора фрагментации ДНК (DFFA) и таким образом высвобождая бета-субъединицу данного белка (каспаза-активируемую ДНКазу) [31–33]. Фрагментация ДНК, в свою очередь, ведет к р53-опосредованной клеточной гибели [33].

В то время как лизосомально-опосредованный путь клеточной гибели эндотелиальных клеток при воздействии КФБ был изучен нами ранее, реализация внутреннего пути апоптоза в этом патогенетическом сценарии остается неясной. В связи с этим целью данного исследования стало детальное изучение внутреннего пути апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции КФБ.

Цель исследования

Изучить внутренний путь апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции кальций-фосфатным бионам (КФБ).

Материалы и методы

Искусственный синтез бионов

СКФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5M $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, 21115) и 21,5 мкл 0,2M

Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, 94046) в 1320 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Gibco, 41966029), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Игольчатые КФБ (ИКФБ) были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл CaCl_2 (0,5 моль/л, Sigma-Aldrich, 21115) и 37,5 мкл Na_2HPO_4 (0,2 моль/л, Sigma-Aldrich, 94046) в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Для синтеза СКФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 3 ммоль/л, для синтеза ИКФБ – 7,5 ммоль/л. Контроль pH осуществлялся путем предварительного добавления 5 мл N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислоты (Gibco, 15630056) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация в среде – 1%). В целом искусственный синтез бионов соответствовал ранее разработанным оригинальным протоколам [34, 35].

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов были инкубированы при +37°C, 5% CO_2 и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo) в течение 24 часов с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и +4°C в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) для осаждения бионов всего спектра размерности. С целью получения рабочего раствора осадок СКФБ растворялся в 1000 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4, Gibco, 10010023), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой величиной концентрации бионов в растворе.

Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях. Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм (ОП650, мутность суспензии 0,5 МкФ соответствовала значениям ОП650 = 0,08 – 0,10).

Культивирование эндотелиальных клеток

Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (НСАЕС, Cell Applications, 300К-05а). Согласно информации поставщика, первичные эндотелиальные клетки человека были получены из здоровых артерий доноров с криоконсервацией на

2-м пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications, 212К-500), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали в культуральных флаконах T-75 (Techno Plastic Products, 90076) согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). Пересев производили по достижении 80% конфлюэнтности. На 6-м пассаже клетки рассевали в 96-луночные культуральные планшеты (Techno Plastic Products, 92696) для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37°C, 5% CO_2 и высокой влажности.

Фракционирование органелл и выделение белка

Белки, регулирующие клеточную гибель, находятся в различных клеточных органеллах. В связи с этим было решено провести фракционирование органелл с целью выделения обогащенных фракций белков. После культивирования первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии до 85–90% они были собраны с культурального флакона путем обработки трипсином в течение 5 минут и центрифугирования в смеси трипсина с нейтрализующим раствором (Cell Applications, 090К, соотношение 1:4) при 220 x g в течение 5 минут. Следующим этапом было проведение собственно фракционирования клеточных органелл (митохондрии, ядро, цитозоль) и выделение из них белка с помощью специального набора компании Abscam (ab109719) в соответствии с инструкцией производителя.

Параллельно проводился эксперимент по выделению общей белковой фракции. После экспозиции культивированных до 85-90% конфлюэнтности первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии в течение 4 часов, было произведено выделение белка RIPA-буфером (Thermo Scientific, 89901) с ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, 78444) в соответствии с инструкцией производителя (500 мкл RIPA-буфера на флакон, лизис клеток в течение 5 минут на льду, сбор лизата, центрифугирование при 14 000 x g в течение 15 минут при 4°C). Для первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии эксперимент ставился дважды в целях повышения его воспроизводимости.

Измерение белка во всех полученных образцах проводилось при помощи набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225) в соответствии с инструкцией производителя на спектрофотометре (Multiskan Sky, Thermo Scientific) и длине волны 562 нм. Принцип действия указанного набора основан на восстановлении Cu^{2+} до Cu^+ белками в щелочной среде с последующей колориметрической детекцией Cu^+ бицинохониновой кислотой (BCA). Белок замораживали и хранили при -60°C . Далее белок замораживали и хранили при -60°C .

Иммуноблоттинг

Одинаковые количества белка (10 мкг для митохондриальной и цитозольной фракций и 21 мкг для общей белковой фракции) смешивали с буфером для денатурации белка NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007) в отношении 4:1 и восстановителем NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen, NP0009) в отношении 10:1 и загружали на 10-луночный гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris толщиной 1,5 мм (Invitrogen, NP0335). В качестве маркеров молекулярных масс загружали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, LC5800) и MagicMark XP Western Protein Standard (Invitrogen, LC5602) в соотношении 1:1 (5:5 мкл). Разделение белков проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в буфере NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen, NP000202) при 150 В в течение 1 часа. Перенос белка осуществляли при помощи наборов для сухого переноса, содержащих мембрану из поливинилиденфторида (Invitrogen, IB24001), и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Invitrogen) в соответствии со стандартным протоколом производителя (P0, 7 минут). Блокировку неспецифического связывания осуществляли при помощи набора iBind Flex Solution Kit (Invitrogen, SLF2020) в течение 1 часа.

Иммуноблоттинг проводили с первичными антителами к цитохрому с (Abcam, ab133504, разведение 1:500), потенциал-зависимому анионоselectивному каналу 1 (VDAC1, Abcam, ab235143, разведение 1:500), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, Abcam, ab139416, разведение 1:250), HtrA2/Omi (Abcam, ab75982, разведение 1:200), каспазе-9 (Abcam, ab202068, разведение 1:500), каспазе-3 (Abcam, ab208161, разведение 1:500) и вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителами (Cell Signaling Technology, 7074,

разведение 1:200; Sigma-Aldrich, AP130P, разведение 1:1000).

Инкубацию с антителами проводили с использованием набора iBind Flex Solution Kit, карточек для инкубации мембран с антителами iBind Flex Cards (Invitrogen, SLF2010) и прибора для инкубации мембран с антителами iBind Flex Western Device (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Хемилюминесцентную детекцию осуществляли посредством инкубации мембраны в течение 30 секунд в хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, 34580) с последующим 12-минутным сканированием на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Денситометрию результатов иммуноблоттинга проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного фракционирования органелл были успешно выделены митохондриальная (образцы ФСБ-МХ, СКФБ-МХ, ИКФБ-МХ) и цитозольная (образцы ФСБ-ЦТ, СКФБ-ЦТ, ИКФБ-ЦТ) фракции белка, что было подтверждено положительными результатами иммуноблоттинга разделенных фракций на специфичный белок внешней мембраны митохондрий потенциал-зависимый анионоselectивный канал 1 (VDAC1, также называемый порин) и специфичный фермент гликолиза (анаэробного окисления в цитозоли) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH, **рисунок 1**). В общей белковой фракции логично наблюдали наличие обоих этих белков (**рисунок 1**).

Результаты, полученные в эксперименте (**рисунок 1**), продемонстрировали различное содержание изученных маркеров внутреннего пути апоптоза в исследованных образцах. В зависимости от формы КФБ образцы выделенного из первичных артериальных эндотелиальных клеток белка различались как по спектру, так и по содержанию специфических белков. Независимо от экспериментальной группы во всех образцах наблюдали присутствие цитохрома с и HtrA2/Omi в митохондриях, что соответствует физиологической норме (**рисунок 1**). При этом воздействие СКФБ и ИКФБ не всегда сопровождалось транслокацией данных белков из митохондрий в цитозоль (**рисунок 1**), что требует дальнейшего изучения данного вопроса.

С этой целью было проведено три независимых эксперимента для анализа уровня ини-

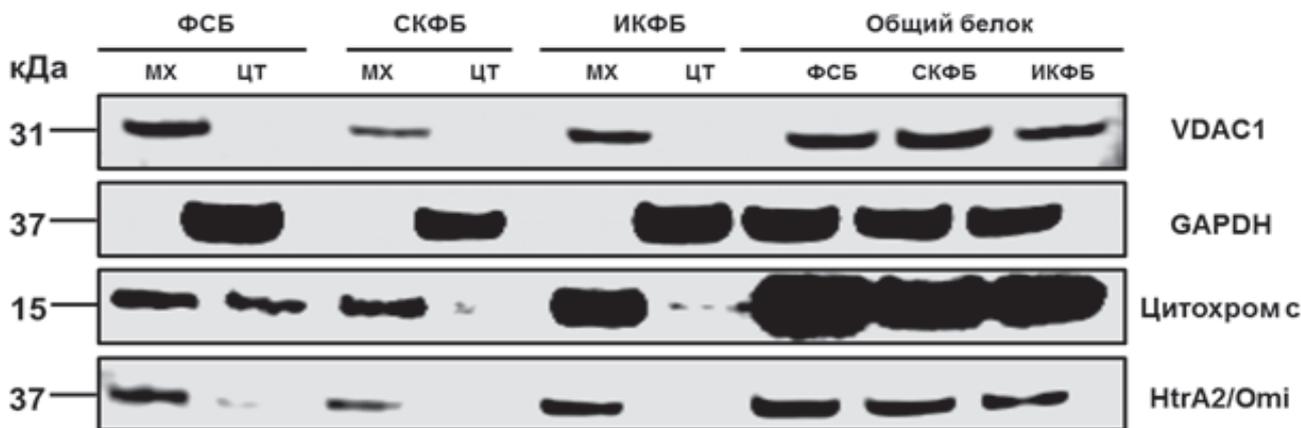


Рисунок 1.

Определение уровня специфических белков в митохондриальной, цитозольной и общей фракциях белка, выделенного из первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии после воздействия СКФБ и ИКФБ, при помощи иммуноблоттинга. ФСБ – фосфатно-солевой буфер (контрольная группа); СКФБ – сферические кальций-фосфатные бионы; ИКФБ – игольчатые кальций-фосфатные бионы, МХ – митохондрии, ЦТ – цитозоль, VDAC1 – потенциал-зависимый анионселективный канал 1, GAPDH – глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Слева указана молекулярная масса исследованных белков (в кДа).

Figure 1.

Western blotting measurements of the mitochondrial and cytosolic markers and intrinsic apoptosis proteins after the subcellular fractionation of mock- and CPB-treated cells. PBS – phosphate-buffered saline (control group), CPB-S – spherical calcium phosphate bions, CPB-N – needle-shaped calcium phosphate bions, МХ – mitochondria, ЦТ – cytosol, VDAC1 – voltage-dependent anion-selective channel 1, GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Molecular weight of the mentioned proteins is indicated to the left.

цирующей каспазы внутреннего пути апоптоза (каспазы-9) и эффекторной апоптотической каспазы (каспазы-3) в общей и активной формах. Лишь один эксперимент из трех (с первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии) показал стойкое повышение уровня активной каспазы-9 и каспазы-3 в экспонированных СКФБ клетках в сравнении с контрольной группой (ФСБ), в то вре-

мя как в остальных каспазы либо детектировались нестабильно, либо уровень активных каспаз не различался между контрольной и опытными группами (рисунок 2). Стоит отметить, что уровни общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 характеризовались конкордантностью, что свидетельствует о прямой корреляции между данными апоптотическими ферментами.

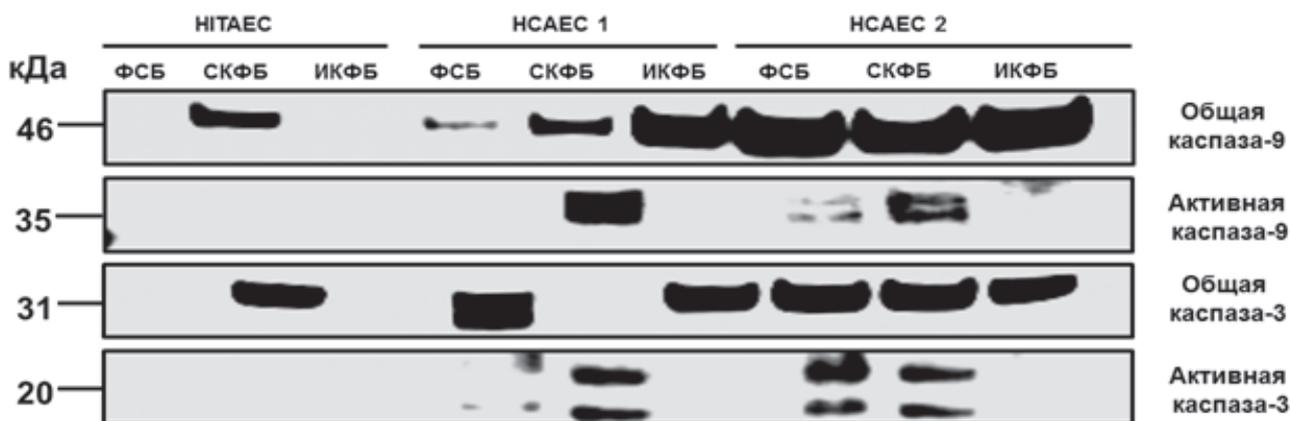


Рисунок 2.

Определение уровня иницирующей каспазы внутреннего пути апоптоза (каспазы-9) и регулируемой ей эффекторной каспазы (каспазы-3) в общей фракции белка, выделенного из первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной или коронарной артерии после воздействия СКФБ и ИКФБ, при помощи иммуноблоттинга. ФСБ – фосфатно-солевой буфер (контрольная группа); СКФБ – сферические кальций-фосфатные бионы; ИКФБ – игольчатые кальций-фосфатные бионы. Слева указана молекулярная масса исследованных белков (в кДа).

Figure 2.

Western blotting measurements of the initiator caspase of intrinsic apoptosis (caspase-9) and its downstream effector caspase (caspase-3) in the total protein extracted from primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells optionally treated with CPB. PBS – phosphate-buffered saline (control group), CPB-S – spherical calcium phosphate bions, CPB-N – needle-shaped calcium phosphate bions. Molecular weight of the mentioned proteins is indicated to the left.

Представленные результаты показали неоднозначность механизмов эндотелиотоксического действия КФБ и необходимость дальнейшей расшифровки путей клеточной гибели под воздействием СКФБ и ИКФБ. В частности, экспозиция первичных артериальных эндотелиальных клеток КФБ, хотя и стабильно сопровождается гибелью значительной их части [1, 9, 15] и выделением провоспалительных цитокинов [6], не всегда сопровождается транслокацией цитохрома с и HtrA2/Omi из митохондрий в цитозоль, при этом также не происходит повышения уровня активной каспазы-9 и каспазы-3.

В то же время повышение количества активной каспазы-9 в обязательном порядке сопровождалось увеличением уровня активной каспазы-3, что согласуется с данными литературы [21-23]. В целом эксперименты в этом отношении демонстрируют довольно разнонаправленные результаты, что может свидетельствовать о необходимости совершенствования методики оценки молекулярных путей клеточной гибели под воздействием КФБ, к примеру, введения в протокол обязательного центрифугирования культуральной жидкости для сбора открепившихся от пластика в результате гибели клеток.

Литература / References:

1. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov 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. <https://doi.org/10.1038/srep27255>
2. Smith ER, Hewitson TD, Jahnen-Dechent W. Calciprotein particles: mineral behaving badly? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2020;29(4):378-386. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000609>
3. 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-Dechent W. Clearance of fetuin-A--containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res*. 2012;111(5):575-584. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261479>
4. Köppert S, Büscher A, Babler A, Ghallab A, Buhl EM, Latz E, Hengstler JG, Smith ER, Jahnen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol*. 2018;9:1991. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01991>
5. Peng HH, Wu CY, Young D, Martel J, Young A, Ojcius DM, Lee YH, Young JD. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013;9(13):2297-2307. <https://doi.org/10.1002/sml.201202270>
6. Шишкова Д.К., Синицкий М.Ю., Великанова Е.А., Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы индуцируют секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 артериальными эндотелиальными клетками in vitro. *Цитокины и воспаление*. 2018;17(1-4):80 [Shishkova DK, Sinitsky MYu, Velikanova EA, Kutikhin AG. Calcium phosphate bions induce secretion of pro-inflammatory cytokines interleukin-6 and interleukin-8 by arterial endothelial cells in vitro. *Cytokines and Inflammation*. 2018;17(1-4):80. (In Russ.)]
7. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium- Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
8. Young JD, Martel J, Young D, Young A, Hung CM, Young L, Chao YJ, Young J, Wu CY. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005421>
9. Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Матвеева В.Г., Григорьев Е.В., Барбараш О.Л. Форма кальций-фосфатных бионов определяет их токсичность для культур эндотелиальных клеток человека. *Кардиологический вестник*. 2019;XIV(4):34-41 [Kutikhin AG, Velikanova EA, Shishkova DK, Matveeva VG, Grigoriev EV, Barbarash OL. Shape of calcium phosphate bions dictates their toxicity for human venous and arterial endothelial cells. *Cardiology Bulletin*. 2019;XIV(4):34-41. (In Russ.)] <https://doi.org/10.36396/MS.2019.15.4.004>
10. Lebre F, Sridharan R, Sawkins MJ, Kelly DJ, O'Brien F, Lavelle EC. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2922. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03086-0>
11. Sukhanova A, Bozrova SV, Sokolov PY, Berestovoy MA, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>
12. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Mar-

- tin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenberghe P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vossen KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, 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;25:486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
13. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem.* 2008;283(27):19140-19150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802513200>
 14. Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31401-31411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301911200>
 15. 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 [Shishkova DK, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Yuzhalin AE, Kudryavtseva YuA, Popova AN, Russakov DM, Kutikhin AG. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2019;39(4):12-21. (In Russ.)] <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190402>
 16. Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17545-17550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507900102>
 17. Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal.* 2012;24(7):1420-1425. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.03.007>
 18. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure.* 2013;21(4):501-515. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
 19. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549-11556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>
 20. Li Y, Zhou M, Hu Q, Bai XC, Huang W, Scheres SH, Shi Y. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(7):1542-1547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620626114>
 21. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004;13(8):1979-1987. <https://doi.org/10.1110/ps.04789804>
 22. Lavrik IN, Golks A, Kramer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2665-2672. <https://doi.org/10.1172/JCI26252>
 23. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-489. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1)
 24. Fujita E, Egashira J, Urase K, Kuida K, Momoi T. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ.* 2001;8(4):335-344. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400824>
 25. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 2001;20(5):998-1009. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.998>
 26. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003;11(2):519-527. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00054-6)
 27. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;408(6815):1008-1012. <https://doi.org/10.1038/35050012>
 28. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30718-30727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705258200>
 29. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.* 2002;277(1):439-444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109784200>
 30. Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenberghe P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):453-460. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402291>
 31. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
 32. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391(6662):96-99. <https://doi.org/10.1038/34214>
 33. Larsen BD, Sørensen CS. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J.* 2017;284(8):1160-1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
 34. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Севостьянов О.Г., Долганюк В.Ф., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2019;4(2):6-16 [Shishkova DK, Glushkova TV, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VYu, Kolmykov RP, Ismagilov ZR, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YuA, Kozhukhov AS, Sevostyanov OG, Dolganuyk VF, Kudryavtseva YuA, Kutikhin AG. Morphological and chemical characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2019;4(2):6-16. (In Russ.)] <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16>
 35. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гу-

таковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Долганюк В.Ф., Барбараш О.Л., Кутихин А.Г. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2019;8(1):59-69 [Shishkova DK, Glushkova TV, Efimova OS, Popova AN, Malysheva

VYu, Kolmykov RP, Ismagilov ZR, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YuA, Kozhukhov AS, Dolganyuk VF, Barbarash OL, Kutikhin AG. Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2019;8(1):59-69 2019. (In Russ.)] <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69>

Сведения об авторах

Маркова Виктория Евгеньевна, лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: проведение экспериментов, написание статьи.
ORCID: 0000-0002-6652-5745

Шишкова Дарья Кирилловна, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: проведение экспериментов.
ORCID: 0000-0002-1518-3888

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: разработка идеи и дизайна исследования, проведение экспериментов, написание статьи.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Статья поступила: 06.08.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Ms. Victoria E. Markova, Research Technician, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: performed the experiments; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0002-6652-5745

Ms. Daria K. Shishkova, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: performed the experiments.
ORCID: 0000-0002-1518-3888

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Received: 06.08.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.