



Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К.

ФОРМА КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ ОПРЕДЕЛЯЕТ ВЫРАЖЕННОСТЬ ВЫЗЫВАЕМОГО ИМИ ПРОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО СДВИГА ПРОФИЛЯ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЦИТОКИНОВ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить влияние формы кальций-фосфатных бионов (КФБ) на их эндотелиотоксичность путем оценки профиля секретируемых эндотелиальными клетками проатеросклеротических цитокинов под воздействием КФБ игольчатой формы (ИКФБ) и КФБ сферической формы (СКФБ).

Материал и методы. Для экспериментов была использована культура immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, которые были засеяны в 6-луночные планшеты (3*105 клеток) с последующим: 1) добавлением через 1 ч 100 мкл СКФБ, ИКФБ или чистого фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и дальнейшим культивированием в течение 24 ч (разреженная клеточная модель); 2) культивированием в течение 44 ч и дальнейшим добавлением 100 мкл СКФБ, ИКФБ или ФСБ с продолжением культивирования в течение 4 ч (конфлюэнтная клеточная модель). Далее в надосадке с клеточных культур (n=11 лунок на группу) методом иммуноферментного анализа измерялся уровень секретируемых клетками проатеросклеротических цитокинов (интерлейкина (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, фактора

некроза опухоли (TNF)- α , интерферона (IFN)- γ и растворимой молекулы адгезии сосудистых клеток (sVCAM)-1).

Результаты. На разреженной клеточной модели экспозиция ИКФБ существенно повышала концентрацию ряда проатеросклеротических цитокинов (IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ) в сравнении как с экспозицией СКФБ, так и с контрольными клетками. На конфлюэнтной клеточной модели экспозиция обоим типам КФБ значительно снижала уровень секретируемых IL-1 β , IL-10 и IFN- γ , однако их концентрация при экспозиции ИКФБ была выше, чем при экспозиции СКФБ. Методы многомерного статистического анализа на обеих клеточных моделях подтвердили, что профиль секреции цитокинов под воздействием ИКФБ значимо отличен от такового под воздействием СКФБ и далек от профиля контрольных клеток.

Заключение. ИКФБ вызывают увеличение выделения ряда проатеросклеротических цитокинов эндотелиальными клетками в сравнении с СКФБ, что свидетельствует о большей эндотелиотоксичности ИКФБ.

Ключевые слова: атеросклероз, триггеры, бионы, эндотелиальные клетки, эндотелий, воспаление, цитокины, цитокиновый профиль, интерлейкин-6, интерлейкин-8.

Сведения об авторах:

Великанова Елена Анатольевна	Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Российская Федерация, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6, velikanova_ea@mail.ru
Шишкова Дарья Кирилловна	Младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Российская Федерация, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6, тел.: +7 (3842) 64-45-27, shishkovadk@gmail.com
Автор, ответственный за связь с редакцией: Кутихин Антон Геннадьевич	Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Российская Федерация, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6, тел.: +7 (3842) 64-41-56, antonkutikhin@gmail.com

✉ antonkutikhin@gmail.com

Для цитирования: Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К. Форма кальций-фосфатных бионов определяет выраженность вызываемого ими проатеросклеротического сдвига профиля секретируемых эндотелиальными клетками цитокинов. Евразийский кардиологический журнал. 2017, Ноябрь 25; 4:4-9.

ВВЕДЕНИЕ

Бионы представляют собой семейство минерало-органических наночастиц, синтезирующихся в условиях перенасыщения биологических жидкостей (сыворотки крови, мочи, слюны, желчи, амниотической жидкости и других) различными ионами в результате химического взаимодействия: 1) катионов или содержащих катионы солей; 2) фосфат-аниона или содержащих его солей; 3) определенных белков (альбумин, фетuin-A, остеоонектин и ряд других) [1]. В зависимости от формирующего катиона бионы подразделяют на кальций-фосфатные, магний-фосфатные, марганцево-фосфатные, стронций-фосфатные, барий-фосфатные и другие [1], из которых в организме человека достоверно образуются лишь кальций-фосфатные бионы (КФБ) [2-4]. Было предположено [1] и экспериментально доказано [5], что КФБ представляют собой один из механизмов поддержания минерального гомеостаза, препятствуя прямой кальцификации тканей при перенасыщении сывороточной среды ионами кальция и фосфора. В то же время было выявлено, что КФБ обладают токсическим действием как на культуры immortalized венозных и лимфатических эндотелиальных клеток, запуская их апоптоз и стимулируя выделение ими проатеросклеротических цитокинов интерлейкина (interleukin, IL)-6 и IL-8, так и на интиму брюшной аорты крыс, вызывая ее концентрическую или эксцентрическую гипертрофию [5]. В связи с этим была выдвинута гипотеза, что защищая организм от «большого зла» – массивной эктопической кальцификации, КФБ тем не менее повреждают здоровый эндотелий, потенциально являясь таким образом одним из триггеров развития атеросклероза [5-8]. Ранее в эксперименте было показано, что при умеренном перенасыщении сывороточной среды ионами кальция и фосфора образуются КФБ сферической формы, а при сильном перенасыщении – игольчатой формы [9]. Вместе с тем остается неясным, определяет ли это проатеросклеротическое действие КФБ.

Одним из пусковых механизмов развития атеросклероза является ауто- и паракринная секреция так называемых проатеросклеротических цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 и других) эндотелиальными клетками, которые непосредственно экспонируются формирующимся в крови КФБ, при этом ранее нашей группой была продемонстрирована повышенная секреция эндотелиоцитами IL-6 и IL-8 в результате экспозиции КФБ [5]. Под относительно новым термином «проатеросклеротические цитокины» понимают цитокины, которые своими, как правило, плейотропными эффектами так или иначе способствуют развитию атеросклероза [10-14]. Целью данного исследования было сравнить профиль секретируемых эндотелиальными клетками проатеросклеротических цитокинов под воздействием равных концентраций СКФБ и ИКФБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Искусственный синтез СКФБ и ИКФБ

СКФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2 M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) в 1319 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

0,5 M CaCl₂ и 37,5 мкл 0,2 M Na₂HPO₄ в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза КФБ инкубировались при +37°C (MCO-18AIC, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и +4°C в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочего раствора для добавления к клеткам осадок СКФБ растворялся в 300 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, 1X phosphate buffered saline, Gibco), что позволяло достичь оптической плотности (ОП) в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой и патофизиологически релевантной величиной концентрации КФБ в растворе. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях. Измерение ОП проводилось на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм.

Экспозиция эндотелиальных клеток СКФБ и ИКФБ

Для экспериментов была использована культура immortalized венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, любезно предоставленная Dr. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill, США). Данная клеточная линия является гибридомой, 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 [15]. Клетки культивировались в среде DMEM/F12 (Gibco) с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gibco), 2% раствором гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco), 1% раствором HEPES-буфера (Gibco), 1% раствором L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4% раствором амфотерицина В (Gibco). Все эксперименты с клетками проводились в стерильных условиях при 37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo).

Вследствие того, что устойчивость и ответ эндотелиальных клеток на внешние воздействия существенно зависит от целостности их монослоя [6-8], секретируемый клетками цитокиновый профиль оценивался на двух клеточных моделях: разреженной (<50% конфлюэнтности клеток в культуральной посуде) и конфлюэнтной (>90% конфлюэнтности клеток в культуральной посуде). В разреженной модели клетки высаживались в 6-луночные планшеты (3*10⁵ клеток на лунку, 1900 мкл среды в лунке) с добавлением к ним через 1 ч 100 мкл СКФБ (0,5 МкФ), ИКФБ (0,5 МкФ) или ФСБ с дальнейшей инкубацией в течение 24 ч. В конфлюэнтной модели клетки точно так же высаживались в 6-луночные планшеты (3*10⁵ клеток на лунку, 1900 мкл среды в лунке) и культивировались в течение 44 ч, после чего к ним добавлялись 100 мкл СКФБ (0,5 МкФ), ИКФБ (0,5 МкФ) или ФСБ с дальнейшей инкубацией в течение 4 ч. По завершении инкубации из лунок (n=11 лунок на каждую группу) при помощи автоматического одноканального дозатора (Ленпипет) забирались надосадок, который разделялся на аликваты объемом 400-500 мкл по четырем пробиркам объемом 1,5 мл и хранился при -40°C (Sanyo) до измерения профиля секретируемых клетками проатеросклеротических цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF)- α , интерферон (interferon, IFN)- γ , растворимая молекула адгезии сосудистых клеток-1 (soluble vascular cell adhesion molecule, sVCAM-1)) методом иммуноферментного анализа посредством

соответствующих наборов компании Abcam (ab46052, ab46027, ab46032, ab46034, ab46143, ab64708, ab46087, ab46025, ab46118) в соответствии с инструкциями производителя. Выбор вышеуказанных цитокинов был обусловлен их секрецией эндотелиальными клетками и центральной ролью в развитии атеросклероза [10-14]. Каждая аликвота надосадки размораживалась и использовалась для анализа не более одного раза. Измерение результата проводилось на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» на длине волны 450 нм.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистический анализ результатов был выполнен при помощи программ GraphPad Prism 6 (GraphPad Software), Microsoft Excel 2013 (Microsoft) и Statistica 13 (Dell). Межгрупповое сравнение измеренных уровней каждого из девяти цитокинов проводилось посредством однофакторного дисперсионного анализа. В случае выявления статистически значимых различий (вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу $P \leq 0,05$) между группами осуществлялось последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Тьюки. Статистически значимыми признавались полученные по критерию Тьюки Р-значения $\leq 0,05$. Для оценки того, насколько профиль секретируемых цитокинов в целом различен по трем группам, были построены тепловые карты выделения цитокинов, а также использованы дискриминантный анализ и метод главных компонент. Как и в случае с однофакторным дисперсионным анализом, при дискриминантном анализе и методе главных компонент статистические различия между группами признавались значимыми при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты, проведенные на разреженной клеточной модели, показали, что, в отличие от СКФБ, ИКФБ индуцировали

секрецию целого ряда цитокинов (IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ) в сравнении с контрольными клетками (рис. 1). Кроме того, ИКФБ повышали уровень секретируемой sVCAM-1 и снижали концентрацию секретируемого TNF- α в сравнении с СКФБ (рис. 1). Как СКФБ, так и ИКФБ в схожей степени повышали секрецию IL-8 по сравнению с контрольными клетками (рис. 1).

В то же время на конфлюэнтной клеточной модели экспозиция как СКФБ, так и ИКФБ вызвала значительное снижение секреции IL-1 β , IL-10 и IFN- γ , однако их уровень при экспозиции ИКФБ был выше, чем при экспозиции СКФБ (рис. 2). Напротив, концентрация секретируемого IL-6 при экспозиции как СКФБ, так и ИКФБ в сравнении с контрольными клеточными культурами увеличивалась, но не отличалась между самими типами КФБ (рис. 2). Уровень TNF- α и IL-8 при экспозиции ИКФБ был схож с таковыми у контрольных клеток, но ниже, чем при экспозиции СКФБ (рис. 2). Концентрация IL-12, IL-23 и sVCAM-1 при экспозиции обоим типам КФБ была существенно ниже, чем в отсутствие экспозиции, без значимых различий между СКФБ и ИКФБ (рис. 2).

С целью сочетанной визуализации эффектов воздействия СКФБ и ИКФБ были составлены тепловые карты выделения цитокинов эндотелиальными клетками на обеих клеточных моделях (рис. 3), которые позволили предположить, что профиль секретируемых цитокинов в целом значительно изменяется под воздействием СКФБ и особенно ИКФБ.

Для проверки этой гипотезы были применены методы многомерного статистического анализа: дискриминантный анализ и метод главных компонент. Оба данных метода подтвердили, что профиль секретируемых клетками цитокинов существенно отличался во всех трех группах и под воздействием ИКФБ был значительно дальше от такового контрольных клеток в сравнении с СКФБ (рис. 4а, б), причем основной вклад в это различие вносили IL-8, IL-10 и TNF- α (рис. 4в).

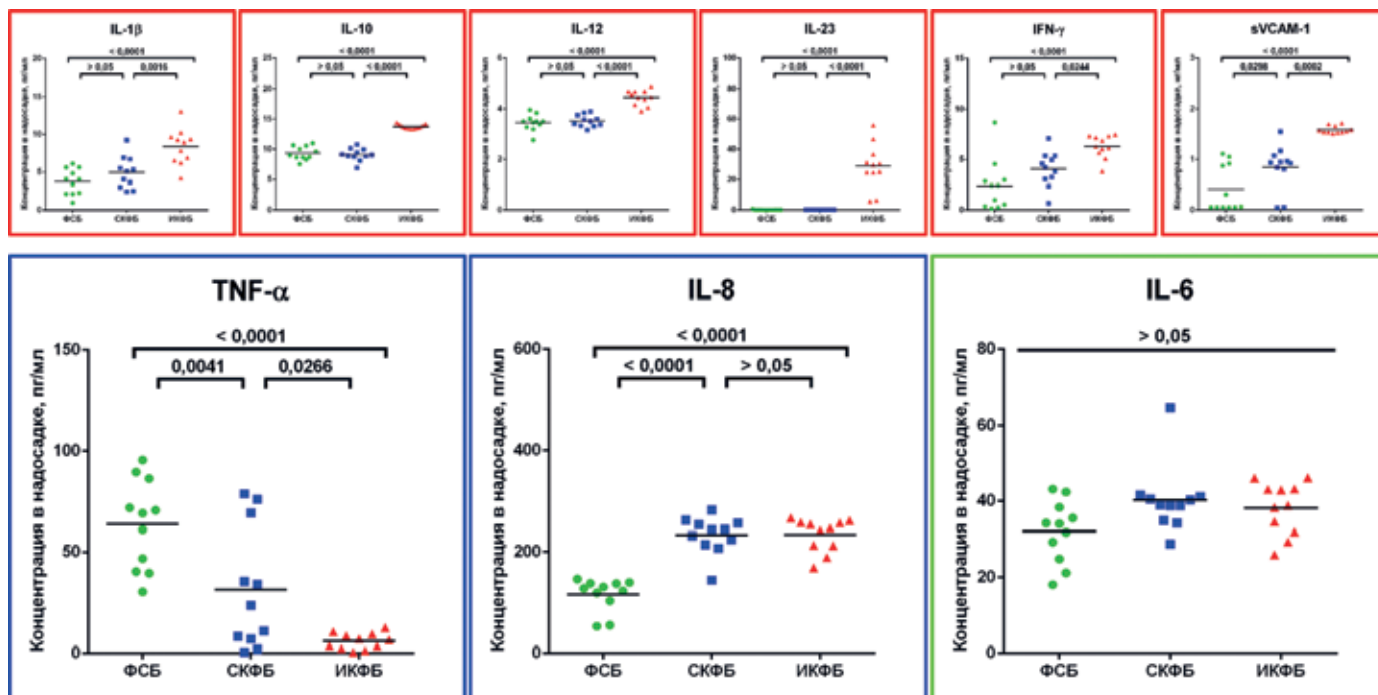


Рисунок 1. Выделение цитокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на разреженной клеточной модели под воздействием СКФБ и ИКФБ

Примечание: ФСБ – фосфатно-солевой буфер, СКФБ – кальций-фосфатные бионы сферической формы, ИКФБ – кальций-фосфатные бионы игольчатой формы, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, IFN – интерферон, sVCAM-1 – растворимая молекула адгезии сосудов клеток-1.

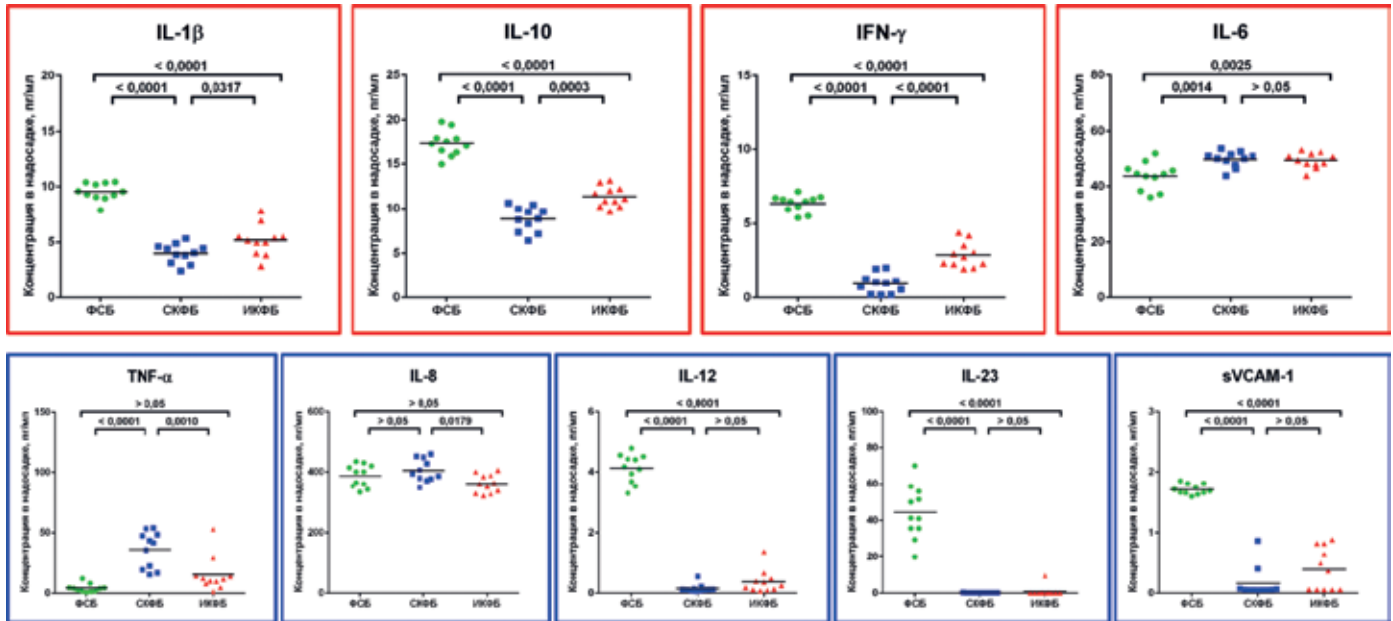


Рисунок 2. Выделение цитокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на конфлюэнтной клеточной модели под воздействием СКФБ и ИКФБ

Примечание: ФСБ – фосфатно-солевой буфер, СКФБ – кальций-фосфатные бионы сферической формы, ИКФБ – кальций-фосфатные бионы игольчатой формы, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, IFN – интерферон, sVCAM-1 – растворимая молекула адгезии сосудистых клеток-1.

На конфлюэнтной клеточной модели профиль секретируемых клетками цитокинов под воздействием ИКФБ был существенно ближе к таковому под воздействием СКФБ, однако они, тем не менее, были далеки от профиля контрольных клеток (рис. 5а, б). Основной вклад в эти различия вносили IL-10, IL-12 и IFN-γ (рис. 5в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было выявлено, что при умеренном перенасыщении сывороточной среды ионами кальция и фосфора образуются КФБ сферической формы, а при сильном перенасыщении – игольчатой формы [9], что может свидетельствовать о возможности образования в крови человека КФБ сферической формы при умеренной гиперкальциемии/гиперфосфатемии и КФБ игольчатой формы при сильной гиперкальциемии/гиперфосфатемии. Однако, несмотря на ряд опубликованных работ, продемонстрировавших цитотоксическое и, в частности, эндотелиотоксическое действие КФБ [5, 16–18], не было проведено исследований влияния формы КФБ на их токсичность для клеток. Поскольку КФБ рассматриваются в качестве потенциального триггера развития атеросклероза [5–8], а сдвиг профиля выделяемых эндотелиальными клетками цитокинов на проатеросклеротический под воздействием КФБ является одним из эффектов, определяющим их эндотелиотоксичность, в данной работе была изучена зависимость секреции проатеросклеротических цитокинов эндотелиоцитами от формы искусственно синтезированных КФБ.

Выполненные эксперименты продемонстрировали, что на разреженной клеточной модели экспозиция ИКФБ значительно увеличивала уровень выделения ряда проатеросклеротических цитокинов (IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ) в сравнении как с экспозицией СКФБ, так и с контрольными клетками. На конфлюэнтной клеточной модели экспозиция обоим типам КФБ вызывала выраженное уменьшение выделения IL-1β, IL-10 и IFN-γ, однако их концентрация при экспозиции ИКФБ была тем не менее выше, чем при экспозиции СКФБ. Приме-

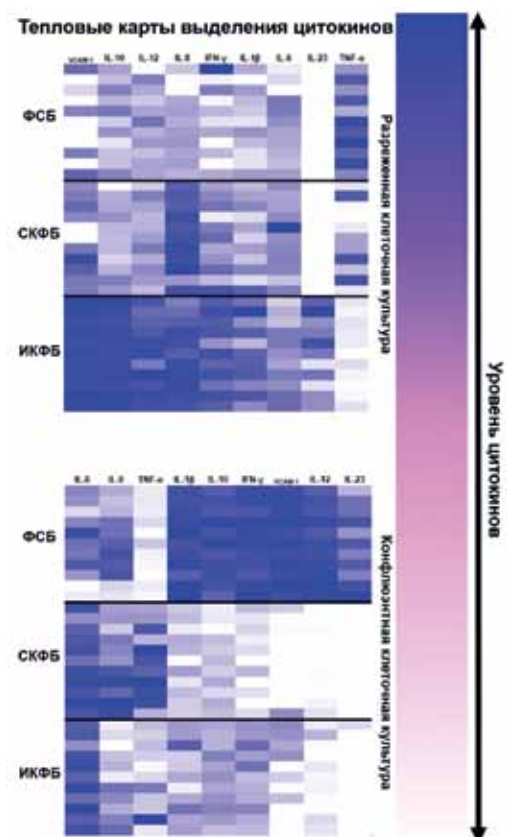


Рисунок 3. Тепловые карты выделения цитокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 под воздействием СКФБ и ИКФБ

Примечание: ФСБ – фосфатно-солевой буфер, СКФБ – кальций-фосфатные бионы сферической формы, ИКФБ – кальций-фосфатные бионы игольчатой формы, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, IFN – интерферон, sVCAM-1 – растворимая молекула адгезии сосудистых клеток-1.

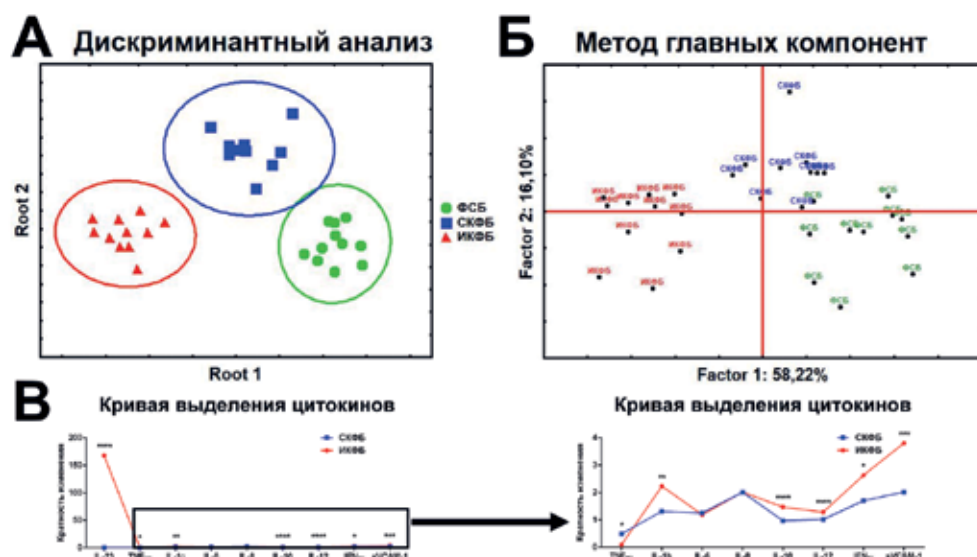


Рисунок 4. Многомерный статистический анализ выделения цитокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на разреженной клеточной модели под воздействием СКФБ и ИКФБ

Примечание: ФСБ – фосфатно-солевой буфер, СКФБ – кальций-фосфатные бионы сферической формы, ИКФБ – кальций-фосфатные бионы игольчатой формы, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, IFN – интерферон, sVCAM-1 – растворимая молекула адгезии сосудистых клеток-1.

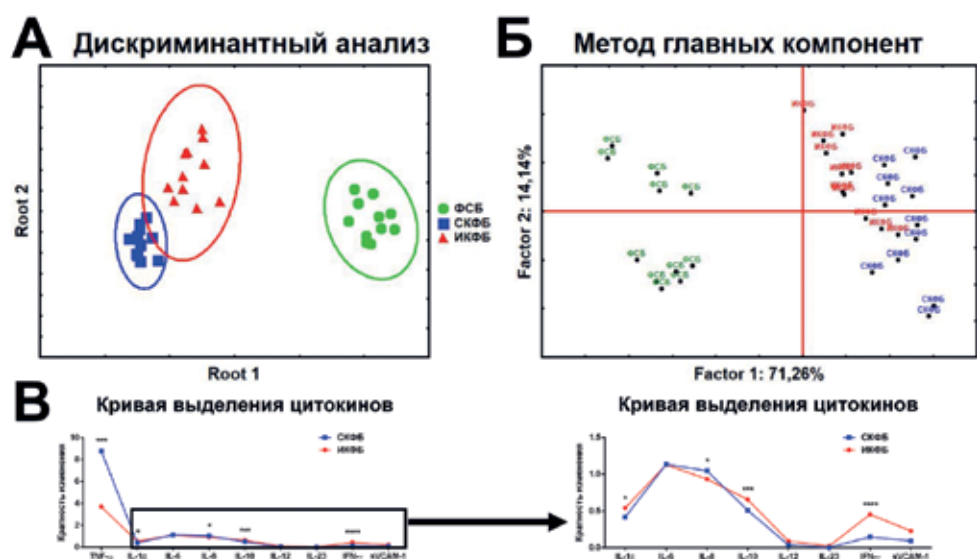


Рисунок 5. Многомерный статистический анализ выделения цитокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 на конфлюэнтной клеточной модели под воздействием СКФБ и ИКФБ

Примечание: ФСБ – фосфатно-солевой буфер, СКФБ – кальций-фосфатные бионы сферической формы, ИКФБ – кальций-фосфатные бионы игольчатой формы, IL – интерлейкин, TNF – фактор некроза опухоли, IFN – интерферон, sVCAM-1 – растворимая молекула адгезии сосудистых клеток-1.

ненные методы многомерного статистического анализа (дискриминантный анализ и метод главных компонент) на обеих клеточных моделях подтвердили, что профиль секреции цитокинов эндотелиальными клетками под воздействием ИКФБ значительно отличается от такового под воздействием СКФБ и далек от профиля контрольных клеток. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более выраженном сдвиге профиля выделения проатеросклеротических цитокинов эндотелиальными клетками под воздействием ИКФБ в сравнении с СКФБ и, следовательно, о большей эндотелиотоксичности ИКФБ.

Сравнение результатов, полученных на разреженной и конфлюэнтной клеточных моделях, показало их существенное

различие, особенно заметное при применении многомерных методов статистического анализа. На разреженной модели выделение IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ и sVCAM-1 клетками под воздействием ИКФБ в сравнении с контрольными клетками увеличивалось, а на конфлюэнтной модели – уменьшалось. На разреженной модели клетки, экспонированные ИКФБ, в сравнении с контрольными клетками, характеризовались повышенной секрецией IL-8, а на конфлюэнтной модели – IL-6. Наконец, на разреженной модели секреция клетками TNF-α под воздействием ИКФБ в сравнении с контрольными клетками уменьшалась, а на конфлюэнтной модели – нет. Общий профиль секреции проатеросклеротических цитокинов эндотелиальными клетками под воздействием ИКФБ на раз-

реженной модели был дальше от такового контрольных клеток в сравнении с профилем клеток, экспонированных СКФБ, в то время как на конфлюэнтной модели наблюдалось прямо противоположное. Такие различия между моделями могут быть обусловлены различной длительностью экспозиции клеток КФБ (24 ч при разреженной и 4 ч при конфлюэнтной клеточной модели), однако в случае с иммортализованной по гибридной технологии эндотелиальной клеточной линией бессмысленно экспонировать ее КФБ при >90% конфлюэнтности в течение 24 ч, поскольку при этом 7-8% клеток подвергаются апоптозу даже в контрольной культуре (собственные неопубликованные наблюдения авторов), что не позволяет качественно провести эксперимент. Для преодоления этого недостатка моделирования конфлюэнтного монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* в перспективе предполагается использовать первичные артериальные эндотелиальные клетки, которые вследствие медленного роста теоретически могут быть экспонированы КФБ в течение достаточно долгого времени даже при высокой конфлюэнтности. Однако такие клеточные линии характеризуются сложностью в культивировании после выделения и высокой стоимостью при заказе коммерчески доступных стандартизированных культур, что существенно затрудняет проведение таких экспериментов и требует предварительных экспериментов на классических и широко распространенных иммортализованных эндотелиальных клеточных линиях, таких как использованная в данной работе линия EA.hy 926.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что ИКФБ индуцируют повышенную секрецию ряда проатеросклеротических цитокинов (в особенности IL-1 β , IL-10 и IFN- γ) эндотелиальными клетками в сравнении с СКФБ, что свидетельствует о большей эндотелиотоксичности ИКФБ. Для подтверждения данной гипотезы требуется проведение аналогичных экспериментов на первичных культурах артериальных эндотелиальных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu C.Y., Young L., Young D. et al. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013. Vol. 8. No. 9. P. e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
2. Price P.A., Thomas G.R., Pardini A.W. et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. No. 6. P. 3926-3934. doi: 10.1074/jbc.M106366200.
3. Jahnke-Dechent W., Heiss A., Schäfer C., Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 2011. Vol. 108. No. 12. P. 1494-1509. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234260.
4. Wong T.Y., Wu C.Y., Martel J. et al. Detection and characterization of mineralo-organic nanoparticles in human kidneys. *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15272. doi: 10.1038/srep15272.
5. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A. et al. 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. Vol. 6. P. 27255. doi: 10.1038/srep27255.
6. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016. Vol. 118. No. 4. P. 620-636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
7. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016. Vol. 248. P. 97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
8. Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2016. Vol. 14. No. 9. P. 1021-1033. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527.
9. Young J.D., Martel J., Young D. et al. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One*. 2009. Vol. 4. No. 5. P. e5421. doi: 10.1371/journal.pone.0005421.
10. Tedgui A., Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. No. 2. P. 515-581. doi: 10.1152/physrev.00024.2005.
11. Kleemann R., Zedelaar S., Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc. Res.* 2008. Vol. 79. No. 3. P. 360-376. doi: 10.1093/cvr/cvn120.
12. Ait-Oufella H., Taleb S., Mallat Z., Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. Vol. 31. No. 5. P. 969-979. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207415.
13. Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. Vol. 26. No. 6. P. 673-685. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.
14. Moss J.W., Ramji D.P. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med. Chem.* 2016. Vol. 8. No. 11. P. 1317-1330. doi: 10.4155/fmc-2016-0072.
15. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983. Vol. 80. No. 12. P. 3734-3737.
16. Aghagholzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R. et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016. Vol. 251. P. 404-414. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044.
17. 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. Vol. 8. No. 4. P. e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904.
18. Peng H.H., Wu C.Y., Young D. et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013. Vol. 9. No. 13. P. 2297-2307. doi: 10.1002/smll.201202270.



Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Shishkova D.K.

SHAPE OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS DEFINES A PROATHEROSCLEROTIC SHIFT IN CYTOKINE SECRETION PROFILE OF ENDOTHELIAL CELLS

Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

ABSTRACT

Study aim. To investigate whether the shape of calcium phosphate bions (CPB) affects their endothelial toxicity via evaluating the cytokine secretion profile of endothelial cells upon the exposure to either spherical or spindle-shaped CPB.

Material and methods. For the experiments, we used an immortalized human vein endothelial cell line EA.hy 926. Cells were seeded into 6-well plates (3*10⁵ cells) with the further: 1) addition of 100 µL either spherical CPB, spindle-shaped CPB, or 1x phosphate buffered saline (PBS) upon 1 h following culture for 24 h (non-confluent cell culture); 2) culture for 44 h and subsequent addition of 100 µL either spherical CPB, spindle-shaped CPB, or PBS following culture for 4 h (confluent cell culture). Upon the collection of cell culture supernatant (n=11 wells per group), the levels of proatherosclerotic cytokines (interleukin (IL)-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, tumor necrosis factor (TNF)-α, interferon (IFN)-γ, and soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM)-1) were measured utilizing an enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. In a non-confluent cell culture, exposure to spindle-shaped CPB increased the secretion of several proatherosclerotic cytokines (IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ) compared to either spherical CPB-treated or control cells. In a confluent cell culture, exposure to either of CPB types decreased the release of IL-1β, IL-10, and IFN-γ; however, their concentration was still higher upon the exposure to spindle-shaped CPB in comparison with exposure to spherical CPB. Discriminant analysis and principal component analysis demonstrated that the cytokine secretion profile of spindle-shaped CPB-treated endothelial cells significantly differed from those of either spherical CPB-treated or control cells.

Conclusion. Spindle-shaped CPB induce the secretion of proatherosclerotic cytokines by endothelial cells compared to spherical CPB; this suggests higher endothelial toxicity of spindle-shaped CPB.

Keywords: *atherosclerosis, triggers, bions, endothelial cells, endothelium, inflammation, cytokines, cytokine secretion profile, interleukin-6, interleukin-8.*

Information about authors:

Elena A. Velikanova	PhD, Researcher, Laboratory for Cell Technologies, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy boulevard, 6, velikanova_ea@mail.ru
Darya K. Shishkova	Junior Researcher, Laboratory for Novel Biomaterials, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy boulevard, 6, tel.: +7 (3842) 64-45-27, shishkovadk@gmail.com
Corresponding author: Anton G. Kutikhin	MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy Bulvar, 6, tel.: +7 (3842) 64-41-56, antonkutikhin@gmail.com

✉ antonkutikhin@gmail.com

For citation: Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Shishkova D.K. Shape of calcium phosphate bions defines a proatherosclerotic shift in cytokine secretion profile of endothelial cells. Eurasian heart journal. 2017, November 25; 4: 10-15 [in Russian].

INTRODUCTION

Bions are a family of mineral-organic nanoparticles, synthesized under conditions of supersaturation of biological fluids (blood serum, urine, saliva, bile, amniotic fluid and others) by various ions as a result of chemical interactions: 1) cations, or salts, containing cations; 2) phosphate anion or salts, containing it; 3) certain proteins (albumin, fetuin-A, osteonectin and several others) [1]. Depending on forming cation, bions are divided into calcium phosphate, magnesium phosphate, manganese phosphate, strontium phosphate, barium phosphate and the others [1], of which only a calcium phosphate bion (CPB) is accurately formed in the human body [2-4]. It was suggested [1] and experimentally proved [5], that the CPB are one of the mechanisms for maintaining mineral homeostasis, preventing direct tissue calcification, when serum environment is saturated with ions of calcium and phosphorus. At the same time it was revealed that CPB have a toxic effect on the culture of immortalized venous and lymphatic endothelial cells, triggering their apoptosis and stimulating the secretion by them of proatherosclerotic cytokines of interleukin (interleukin, IL-6) and IL-8 and on the intima of the abdominal aorta of rats, causing its concentric or eccentric hypertrophy [5]. In this regard, the hypothesis was proposed, that protecting the body from the "greater evil" – massive ectopic calcification, CPB nevertheless damage healthy endothelium, potentially becoming one of the triggers for the development of atherosclerosis [5-8]. Earlier in the experiment it was shown, that with moderate oversaturation of serum medium with ions of calcium and phosphorus, spherical CPB are formed, and with a strong oversaturation – needle-shaped CPB [9]. However, it remains unclear whether this determine proatherosclerotic action of CPB.

One of the triggers for the development of atherosclerosis is auto- and paracrine secretion of the so-called proatherosclerotic cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and others) by endothelial cells, which are directly exhibited by CPB, emerging in the blood, while previously our group demonstrated increased secretion by endothelial cells, IL-6 and IL-8 due to exposure of CPB [5]. A relatively new term «proatherosclerotic cytokines» means cytokines where it's generally pleiotropic effects somehow contribute to the development of atherosclerosis [10-14]. The aim of this study was to compare the profile of proatherosclerotic cytokines secreted by endothelial cells under the influence of equal concentrations of spherical CPB and needle-shaped CPB.

MATERIAL AND METHODS

Artificial synthesis of spherical CPB and needle-shaped CPB

Spherical CPB were synthesized by sequential addition of 9.9 μ l 0.5 M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) and 21.5 μ l 0.2 M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) in 1319 μ l of the medium Needle, modified by Dulbecco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) containing 150 μ l (10% of the total volume) of fetal calf serum (Gibco). Needle-shaped CPB were synthesized with successive addition of 16.5 μ l 0.5 M CaCl₂ and 37.5 μ l 0.2 M Na₂HPO₄ 936 μ l of DMEM medium, containing 10 μ l (1% of the total volume) of fetal calf serum. After a short mixing by vortex, the tubes 1.5 ml (Eppendorf) with reagents for the synthesis of CPB were incubated at +37°C (MCO-18AIC, Sanyo) for 24 h with further centrifugation at 200,000 $\times$ g and +4°C for 1 h (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). In order to obtain a working solution for addition to cells, spherical CPB precipitate was dissolved in 300 μ l and needle-shaped CPB precipitate – in 1500 μ l of a single phosphate-saline buffer (FSB, 1X phosphate buffered saline, Gibco). That allowed to reach an optical density (OD) of 0.5 McFarland standard (MF), which

is a minimally measurable and pathophysiologically relevant value of concentration of CPB in the solution. All the above procedures were performed under sterile conditions. Measurement of OP was carried out on a microplate spectrophotometer "Uniplan" (AIFR-01, Picon) at the wavelength of 650 nm.

Exposure of endothelial cells of needle-shaped CPB and spherical CPB

For experiments it was used to culture of immortalized venous endothelial cell of the human line EA.hy 926, kindly provided by Dr. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina at Chapel Hill.). This cell line is hybridoma, which was obtained by merging the endothelial cells of the human umbilical vein (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) with cells of adenocarcinoma of human lungs of line A549 and retains the basic morphological and functional features of the venous endothelial human cells [15]. Cells were cultured in the DMEM/F12 (Gibco) medium with 10% of fetal calf serum (Gibco), 2% solution of hypoxanthine- aminopterin-thymidine (Gibco), 1% solution of HEPES-buffer (Gibco), 1% solution of L-glutamine-penicillin-streptomycin (Gibco) and 0.4% solution of amphotericin B (Gibco). All experiments with cells were performed under sterile conditions at 37°C, 5% CO₂ and high humidity (MCO-18AIC, Sanyo).

Due to the fact, that the stability and response of endothelial cells to external influences greatly depends on the integrity of their monolayer [6-8], cytokine profile secreted by the cells was assessed in two cell models: sparse model (<50% of cell confluency in the culture dishes) and confluent model (> 90% of cell confluency in the culture dishes). In sparse models the cells were planted in 6-hole tablets (3*10⁵ cells per hole, 1900 μ l of the medium in the hole) with the addition to them after 1 hour of 100 μ l of spherical CPB (0.5 UF), needle-shaped CPB (0.5 UF) or PBS (phosphate buffered saline) with further incubation for 24 h. In a confluent model, cells similarly were planted in 6-hole tablets (3*10⁵ cells per hole, 1900 μ l of medium in the hole) and cultivated for 44 h, after which 100 μ l of spherical CPB (0.5 McF), needle-shaped CPB (0.5 McF) or PBS were added with further incubation for 4 h. At the end of the incubation, the supernatant was taken from holes (n=11 holes for each group) using an automatic single-channel dispenser (Lenpipet), which was divided into aliquots with a volume of 400-500 μ l in four test tubes with a volume of 1.5 ml and stored at -40°C (Sanyo) until it was time to measure the profile of proatherosclerotic cytokines, secreted by cells (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, tumor necrosis factor (tumor necrosis factor, TNF)- α , interferon (interferon, IFN)- γ , soluble vascular cell adhesion molecule-1 (soluble vascular cell adhesion molecule, sVCAM-1)) by method of enzyme immunoassay by means of appropriate kits of Abcam company (ab46052, ab46027, ab46032, ab46034, ab46143, ab46708, ab46087, ab46025, ab46118) in accordance with the manufacturer's instructions. The selection of the above cytokines was due to their secretion by endothelial cells and central role in the development of atherosclerosis [10-14]. Each aliquot of supernatant was thawed and used for analysis no more than once. The measurement of outcomes was conducted on a microplate spectrophotometer "Uniplan" at a wavelength of 450 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed using the programs GraphPad Prism 6 (GraphPad Software), Excel 2013 (Microsoft) and Statistica 13 (Dell). Intergroup comparison of the measured levels of each of the nine cytokines were performed by one-way variance analysis. In case of detection of statistically significant differences (the probability of rejecting the true null

hypothesis $P \leq 0,05$) between the groups, a subsequent pairwise comparison of the groups was carried out, using the Tukey criterion. P -values $\leq 0,05$, obtained by the criterion of Tjuki, were considered to be statistically significant. To assess whether the profile of secreted cytokines as a whole is different in three groups, heat maps of cytokines secretion were constructed, and discriminant analysis and the main component method were used. As in the case of single-factor variance analysis, for discriminant analysis and the method of principal components, statistical differences between groups were recognized as significant at $P \leq 0,05$.

THE RESULTS OF THE STUDY

Experiments performed on sparse cell model, showed that, in contrast to spherical CPB, needle-shaped CPB induced secretion of a number of cytokines (IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ) compared to control cells (Fig. 1). In addition, needle-shaped CPB increased the level of secreted sVCAM-1 and reduced concentrations of secreted TNF- α in comparison with spherical CPB (Fig. 1). Spherical CPB as well as needle-shaped CPB in a similar extent increased the secretion of IL-8 compared to control cells (Fig. 1).

At the same time, on the confluent cell model, the exposure of both spherical CPB and needle-shaped CPB caused a significant decrease in the secretion of IL-1 β , IL-10 and IFN- γ , but their level was higher when exposed to needle-shaped CPB than when exposed to spherical CPB (Fig. 2). Conversely, the concentration of secreted IL-6 in the exposure of both spherical CPB and needle-shaped CPB in comparison with control cell cultures increased, but did not differ between the types of CPB itself (Fig. 2). The level of TNF- α and IL-8 was similar to that of control cells in exposure to needle-shaped CPB, but lower than that of spherical CPB exposure (Fig. 2). The concentration of IL-12, IL-23 and sVCAM-1 in exposure to both types of CPB was significantly lower than in the absence of exposure, without significant differences between needle-shaped CPB and spherical CPB (Fig. 2).

To collectively visualize the result of the impact effects of spherical CPB and needle-shaped CPB, heat maps of cytokine release by endothelial cells on both cellular models (Fig. 3) have been compiled, which suggested that the profile of secreted cytokines as a whole varies significantly under the influence of spherical CPB and especially needle-shaped CPB.

To test this hypothesis, multidimensional statistical analysis methods were used: discriminant analysis and the method of principal components. Both of these methods confirmed that the profile of the cytokine secreted by the cells was significantly different in all three groups and under the influence of the needle-shaped CPB was significantly further from that of the control cells compared to the spherical CPB (Fig. 4a, b), with the main contribution to this difference being made by IL-8, IL-10 and TNF- α (Fig. 4c).

DISCUSSION

Previously, it was found that with a moderate supersaturation of the serum environment with calcium and phosphorus ions, a spherical CPB forms, and with a strong supersaturation – a needle-shaped CPB form [9], which may indicate the possibility of the formation of a spherical form in the blood of a person with moderate hypercalcemia / hyperphosphataemia and needle-shaped CPB with severe hypercalcemia / hyperphosphataemia. However, despite a number of published studies, demonstrating the cytotoxic and, in particular, endotheliotoxic effect of the CPB [5, 16-18], no studies have been conducted of the effect of the form of CPB on their toxicity for cells. Since the CPB is considered as a potential trigger for the development of atherosclerosis [5-8], and the shift in the profile of cytokines released by endothelial cells released to the proatherosclerotic under the influence of CPB is one of the effects that determines their endotheliotoxicity, in this study, the dependence of the secretion of proatherosclerotic cytokines of endotheliocytic forms of artificially synthesized CPB.

The performed experiments demonstrated, that on the sparse

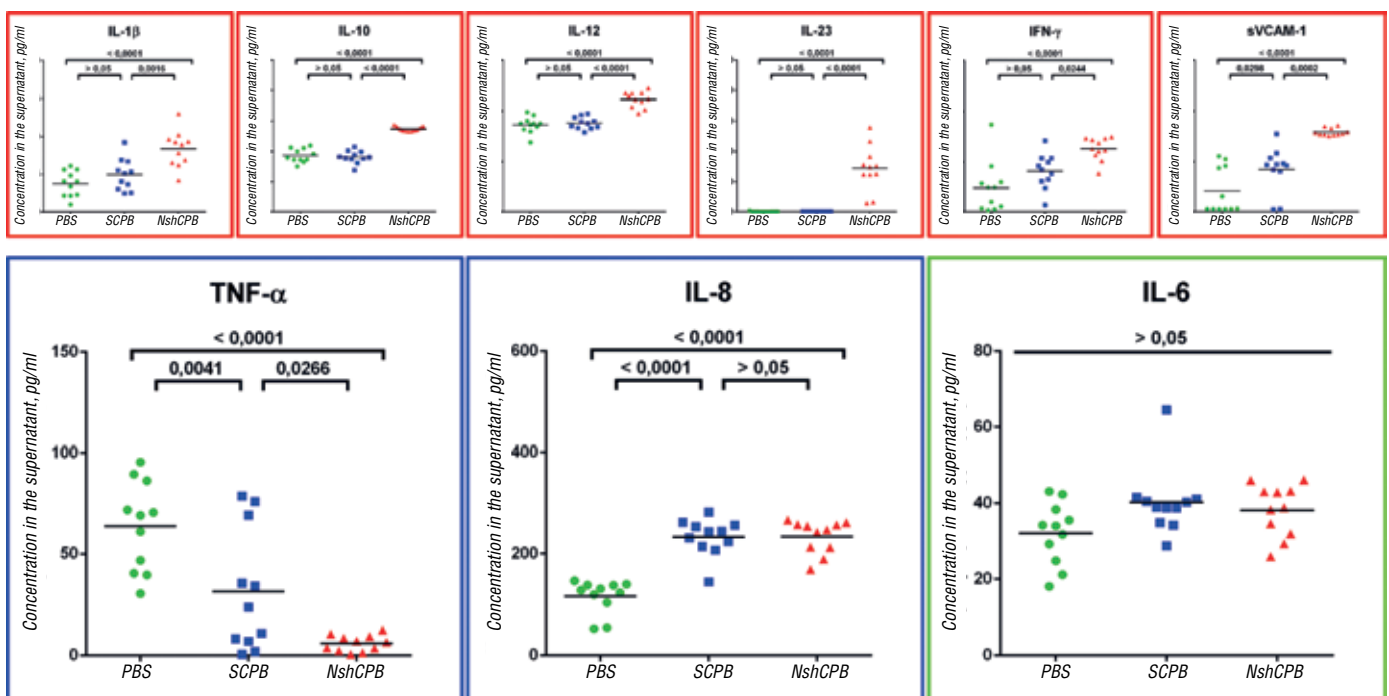


Figure 1. Isolation of cytokines by endothelial cells of the line EA.hy 926 on a sparse cell model under the influence of spherical CPB and needle-shaped CPB

Note: PBS is a phosphate-buffered saline, SCPB – spherical-shaped calcium phosphate bions, NshCPB – needle-shaped calcium phosphate bions, IL – interleukin, TNF – tumor necrosis factor, IFN – interferon, sVCAM-1 – soluble molecule of adhesion of vascular cells-1.

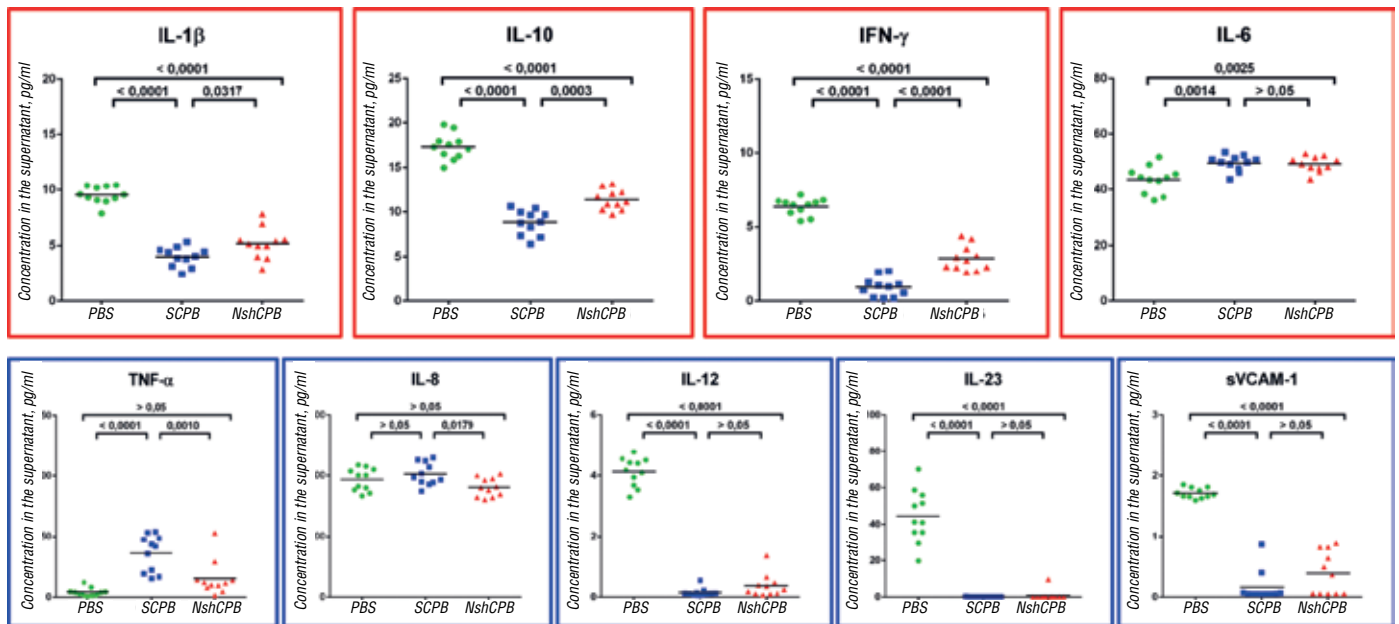


Figure 2. Isolation of cytokines by endothelial cells of the line EA.hy 926 on a confluent cell model under the influence of spherical CPB and needle-shaped CPB

Note: PBS is a phosphate-buffered saline, SCPB – spherical-shaped calcium phosphate bions, NshCPB – needle-shaped calcium phosphate bions, IL – interleukin, TNF – tumor necrosis factor, IFN – interferon, sVCAM-1 – soluble molecule of adhesion of vascular cells-1.

cell model, the exposure of the needle-shaped CPB significantly increased the level of release of a number of pro-atherosclerotic cytokines (IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ) compared to spherical CPB exposure, as well as control cells. On the confluent cell model, the exposure of both types of CPB caused a marked decrease in the release of IL-1β, IL-10 and IFN-γ, but their concentration was still higher when exposed to needle-shaped CPB, than when exposed to spherical CPB. The applied methods of multidimensional statistical analysis (discriminant analysis and main components method) on both cellular models have confirmed that the profile of cytokine secretion by endothelial cells under the influence of needle-shaped CPB is significantly different from that under the influence of spherical CPB and is far from the profile of control cells. Thus, the obtained data indicate a more pronounced shift in the profile of the release of proatherosclerotic cytokines by endothelial cells under the influence of needle-shaped CPB in comparison with spherical CPB and, consequently, the greater endotheliotoxicity of the needle-shaped CPB.

Comparison of the results obtained on the sparse and confluent cellular models showed their significant difference, especially noticeable in the application of multidimensional methods of statistical analysis. In a sparse model, the isolation of IL-1β, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ and sVCAM-1 by cells under the influence of needle-shaped CPB increased in comparison with control cells, and decreased on the confluent model. On a sparse model, the cells exposed to needle-shaped CPB, in comparison with the control cells, were characterized by increased secretion of IL-8, and on the confluent model – IL-6. Finally, on a sparse model, the secretion of TNF-α cells under the influence of needle-shaped CPB decreased in comparison with control cells, and on the confluent model – no. The overall profile of secretion of pro-atherosclerotic cytokines by endothelial cells under the influence of needle-shaped CPB on a sparse model was further from that of control cells in comparison with the profile of cells exposed to spherical CPB, while the opposite was observed in the confluent model. Such differences between the models may be due to different exposure times of the cells of the CPB (24 hours at sparse cell model and 4 hours in the confluent

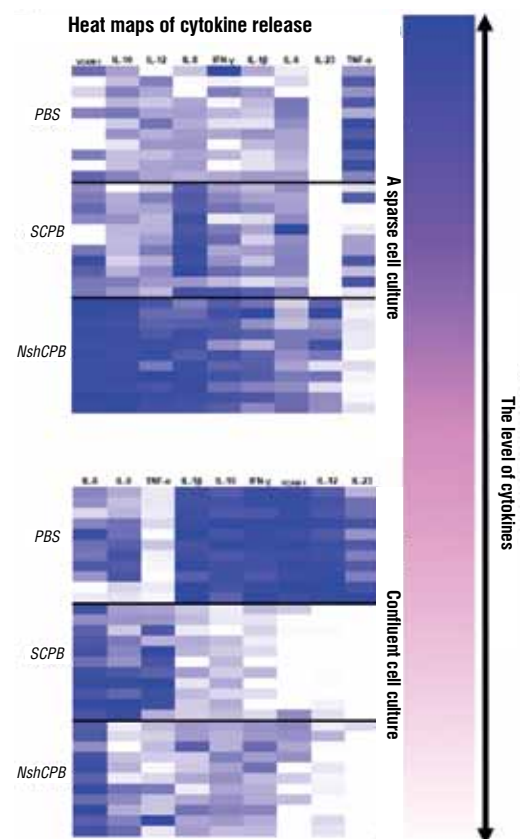


Figure 3. Heat maps of cytokine release by endothelial cells of the line EA.hy 926 under the influence of spherical CPB and needle-shaped CPB

Note: PBS is a phosphate-buffered saline, SCPB – spherical-shaped calcium phosphate bions, NshCPB – needle-shaped calcium phosphate bions, IL – interleukin, TNF – tumor necrosis factor, IFN – interferon, sVCAM-1 – soluble molecule of adhesion of vascular cells-1.

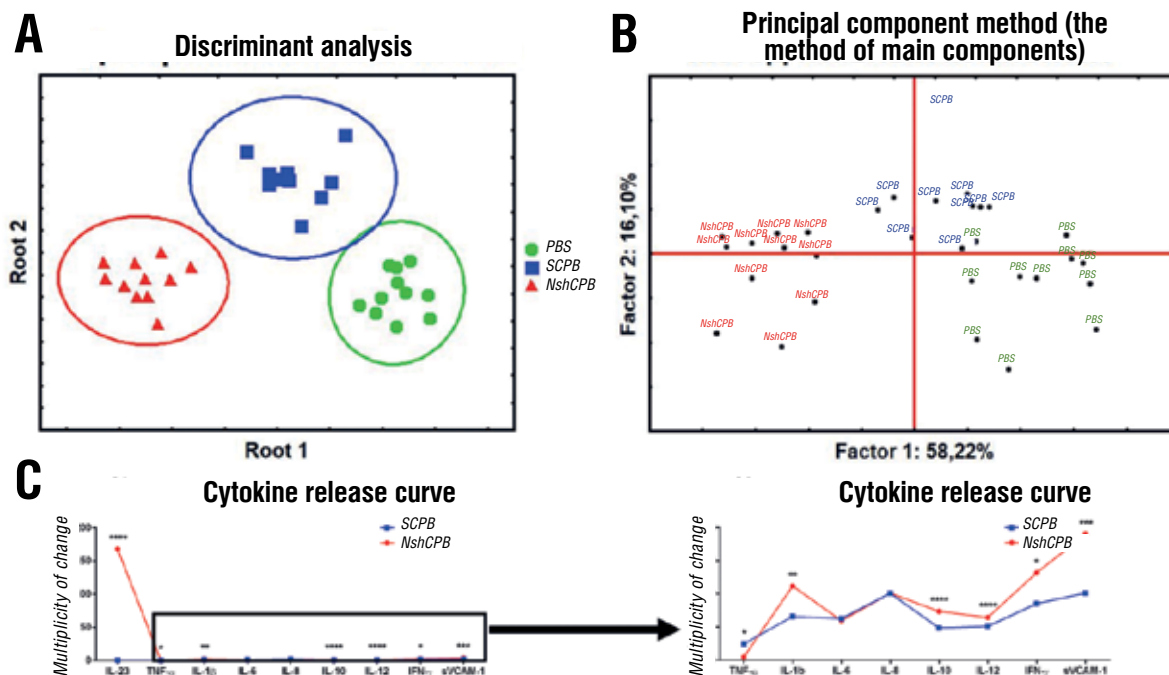


Figure 4. Multi-dimensional statistical analysis of cytokine release by endothelial cells of the line EA.hy 926 on a sparse cell model under the influence of spherical CPB and needle-shaped CPB

Note: PBS is a phosphate-buffered saline, SCPB – spherical-shaped calcium phosphate bions, NshCPB – needle-shaped calcium phosphate bions, IL – interleukin, TNF – tumor necrosis factor, IFN – interferon, sVCAM-1 – soluble molecule of adhesion of vascular cells-1.

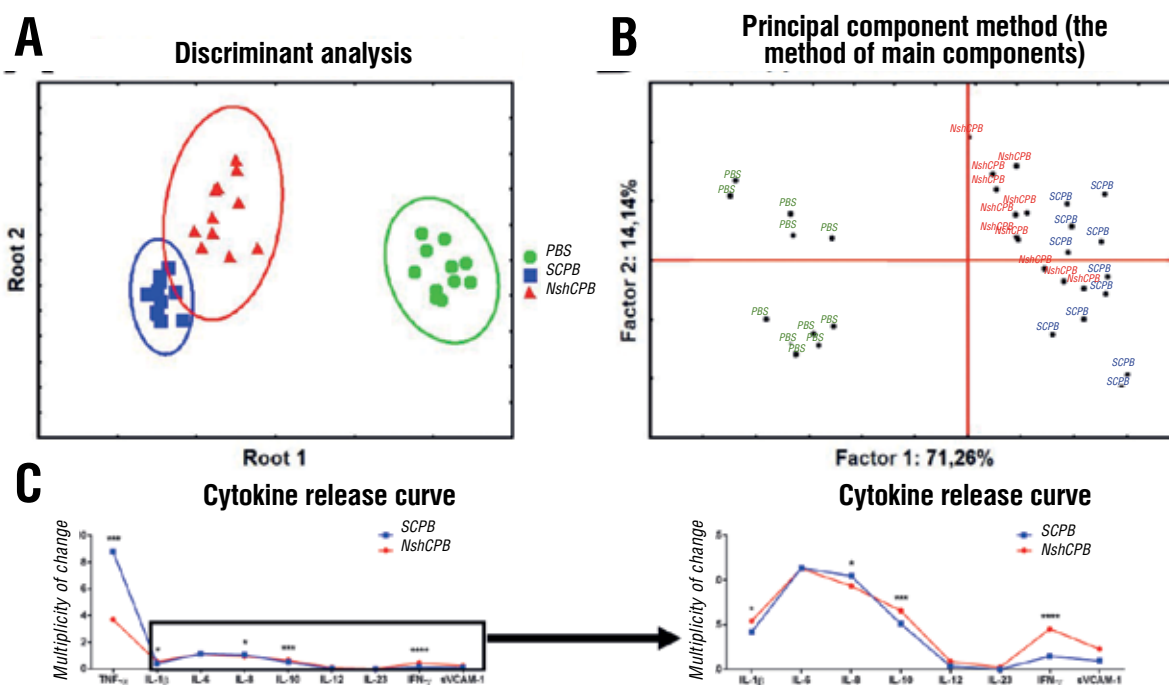


Figure 5. Multivariate statistical analysis of cytokine release by endothelial cells of the line EA.hy 926 on the confluent cell model under the influence of spherical CPB and needle-shaped CPB

Note: PBS is a phosphate-buffered saline, SCPB – spherical-shaped calcium phosphate bions, NshCPB – needle-shaped calcium phosphate bions, IL – interleukin, TNF – tumor necrosis factor, IFN – interferon, sVCAM-1 – soluble molecule of adhesion of vascular cells-1.

cell model), however, with the endothelial cell line immortalized by hybridoma technology, it is pointless to expose its CPB at >90% confluence within 24 hours, because in this case 7-8% of the cells undergo apoptosis even in the control culture (own unpublished observations of the authors), which does not allow to conduct a qualitative experiment. To overcome this lack of modeling of a confluent monolayer of endothelial cells in vitro, it is proposed to use primary arterial endothelial cells, which, due to slow growth, can theoretically be exposed to the CFB for a sufficiently long time, even with high confluence. However, such cell lines are characterized by the complexity of cultivation after isolation and high cost when ordering commercially available standardized cultures, which makes it difficult to conduct such experiments and requires preliminary experiments on classic and widespread immortalized endothelial cell lines such as the EA.hy 926 line used in this study.

Based on the results obtained, it can be concluded that needle-shaped CPB induces an increased secretion of a number of pro-atherosclerotic cytokines (in particular, IL-1 β , IL-10 and IFN- γ) by endothelial cells in comparison with spherical CPB, which indicates greater endotheliotoxicity of needle-shaped CPB. To confirm this hypothesis, similar experiments are required to conduct on primary cultures of arterial endothelial cells.

BIBLIOGRAPHY

1. Wu C.Y., Young L., Young D. et al. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013. Vol. 8. No. 9. P. e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
2. Price P.A., Thomas G.R., Pardini A.W. et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. No. 6. P. 3926-3934. doi: 10.1074/jbc.M106366200.
3. Jahnen-Dechent W., Heiss A., Schäfer C., Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 2011. Vol. 108. No. 12. P. 1494-1509. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234260.
4. Wong T.Y., Wu C.Y., Martel J. et al. Detection and characterization of mineralo-organic nanoparticles in human kidneys. *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15272. doi: 10.1038/srep15272.
5. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A. et al. 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. Vol. 6. P. 27255. doi: 10.1038/srep27255.
6. Gimbrone M.A. Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016. Vol. 118. No. 4. P. 620-636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
7. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016. Vol. 248. P. 97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
8. Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2016. Vol. 14. No. 9. P. 1021-1033. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527.
9. Young J.D., Martel J., Young D. et al. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One*. 2009. Vol. 4. No. 5. P. e5421. doi: 10.1371/journal.pone.0005421.
10. Tedgui A., Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. No. 2. P. 515-581. doi: 10.1152/physrev.00024.2005.
11. Kleemann R., Zadelaar S., Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc. Res.* 2008. Vol. 79. No. 3. P. 360-376. doi: 10.1093/cvr/cvn120.
12. Ait-Oufella H., Taleb S., Mallat Z., Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. Vol. 31. No. 5. P. 969-979. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207415.
13. Ramji D.P., Davies T.S. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. Vol. 26. No. 6. P. 673-685. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.
14. Moss J.W., Ramji D.P. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med. Chem.* 2016. Vol. 8. No. 11. P. 1317-1330. doi: 10.4155/fmc-2016-0072.
15. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983. Vol. 80. No. 12. P. 3734-3737.
16. Aghagolzadeh P., Bachtler M., Bijarnia R. et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016. Vol. 251. P. 404-414. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044.
17. 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. Vol. 8. No. 4. P. e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904.
18. Peng H.H., Wu C.Y., Young D. et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013. Vol. 9. No. 13. P. 2297-2307. doi: 10.1002/sml.201202270.