

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.15372/ATER20180201

ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛИНГА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

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

*ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6*

Цель исследования. Идентифицировать тип гибели эндотелиальных клеток при воздействии кальций-фосфатных бионов (КФБ) и определить, вызывают ли КФБ специфичный молекулярный ответ по основным клеточным сигнальным путям. **Материал и методы.** Культура иммортализованных лимфатических эндотелиальных клеток мыши линии 2Н-11 экспонирована магний-фосфатным бионом (МФБ) либо сферическим или игольчатым кальций-фосфатным бионом (СКФБ и ИКФБ соответственно) в течение 24 ч, после чего выделяли белок RIPА-буфером с последующим иммуноблоттингом: 1) на эффекторные белки апоптоза (расщепленную каспазу-3 (cleaved caspase-3, cCasp-3) и расщепленную поли(АДФ-рибоза) полимеразу (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cParp-1)); 2) на белки внутреннего пути апоптоза (X-связанный ингибитор апоптоза (X-linked inhibitor of apoptosis protein, Xiap), сурвивин (survivin), ингибитор активатора плазминогена (plasminogen activator inhibitor 1, Pai-1), митохондриальную сериновую протеазу HtrA2/Omi, цитохром с (cytochrome c), р53-зависимый модулятор апоптоза (р53 up regulated modulator of apoptosis, Puma)); 3) на белки основных сигнальных путей (фосфорилированную киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pErk), фосфорилированную митоген-активируемую протеинкиназу (phosphorylated mitogen-activated protein kinase, pMapk), фосфорилированную киназу очаговой адгезии (phosphorylated focal adhesion kinase, pFak), фосфорилированный ядерный фактор каппа В (phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, рNf-κB), Itch (E3 убиквитин-белковую лигазу), Gli (глиома-ассоциированный онкоген)). Оценка результата проводилась качественно (путем хемилюминесцентной детекции) и количественно (при помощи алгоритма программы ImageJ для анализа хемилюминесцентных гелей). **Результаты.** Как СКФБ, так и ИКФБ обладали сходным действием, кратно повышая содержание эффекторных белков апоптоза cCasp-3 и cParp-1, а также снижая уровень основного ингибитора внутреннего пути апоптоза Xiap в эндотелиальных клетках в сравнении с МФБ и контрольным чистым раствором фосфатно-солевого буфера. Напротив, содержание другого ингибитора внутреннего пути апоптоза сурвивина и антиапоптотического белка Pai-1 в экспонированных СКФБ и ИКФБ клетках было повышено предположительно вследствие активации внутриклеточного механизма отрицательной обратной связи. Не было выявлено надежного изменения уровня различных белков основных клеточных сигнальных путей между экспериментальными группами. **Заключение.** КФБ запускают внутренний путь апоптоза в эндотелиальных клетках, однако не вызывают специфичного молекулярного ответа по основным клеточным сигнальным путям.

Ключевые слова: бионы, фосфат кальция, эндотелиальные клетки, эндотелий, атеросклероз, апоптоз, сигнальные пути.

Кутихин Антон Геннадьевич – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Шишкова Дарья Кирилловна – младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: shidk@kemcardio.ru

Великанова Елена Анатольевна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: veliea@kemcardio.ru

Понасенко Анастасия Валериевна – канд. мед. наук, зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: ronaav@kemcardio.ru

© Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Понасенко А.В., 2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КФБ	– кальций-фосфатные бионы	Xiap	– X-связанный ингибитор апоптоза
МФБ	– магний-фосфатные бионы	Pai-1	– ингибитор активатора плазминогена-1
СКФБ	– сферические кальций-фосфатные бионы	HtrA2/Omi	– митохондриальная сериновая протеаза
ИКФБ	– игольчатые кальций-фосфатные бионы	Puma	– p53-зависимый модулятор апоптоза
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер	pErk	– фосфорилированная киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
DMEM	– среда Игла, модифицированная по Дульбекко	pMapk	– фосфорилированная митоген-активируемая протеинкиназа
HEPES	– N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоукислота	pFak	– фосфорилированная киназа очаговой адгезии
МкФ	– стандарт МакФарланда	pNf-κB	– фосфорилированный ядерный фактор каппа В
SV40	– обезьяний вакуолизирующий вирус 40	Itch	– E3 убиквитин-белковая лигаза
RIPA-буфер	– буфер для радиоиммунопреципитации	Gli	– глиома-ассоциированный онкоген
cCasp-3	– расщепленная каспаза-3	Apafl	– активирующая апоптотическая протеаза-1
cParp-1	– расщепленная поли(АДФ-рибоза)полимераза		

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) образуются в крови человека при ее перенасыщении ионами кальция и фосфора и представляют собой минералоорганические частицы, минеральная фракция которых представляет собой гидроксипатит и карбонат-гидроксипатит, а органическая – основные ингибиторы эктопической кальцификации (альбумин и фетуин-А) и ряд других белков сыворотки крови [1–3]. В проведенных ранее экспериментах показано, что КФБ после своего формирования интернализируются артериальными эндотелиальными клетками, индуцируя секрецию ими провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, запуская процесс клеточной смерти, а также вызывая развитие гипертрофии интимы и воспаление адвентиции брюшной аорты крыс [3]. В ходе предыдущих экспериментов нашей группой обнаружено, что экспонированные КФБ в течение 4 или 24 ч эндотелиальные клетки демонстрируют апоптотический морфотип. Тем не менее остается неясным, по какому из типов клеточной смерти гибнут эндотелиальные клетки при воздействии КФБ и вызывают ли КФБ специфичный молекулярный ответ по основным клеточным сигнальным путям.

Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови обусловлена повышенной склонностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью и с артериальной гипертензией к формированию КФБ в сравнении с сывороткой условно здоровых доноров крови [4]. Кроме того, повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хрониче-

ской болезнью почек 3 и 4 стадий [5], а также у больных с терминальной хронической почечной недостаточностью [6], включая перенесших трансплантацию почки [7, 8]. При этом пациенты с увеличенной склонностью сыворотки крови к формированию КФБ характеризуются повышенным риском смерти как от всех, так и отдельно от сердечно-сосудистых причин [7, 8], а также повышенным риском развития инфаркта миокарда и заболеваний периферических артерий [6]. Поэтому как с позиции фундаментальной кардиологии, так и с клинической точки зрения представляется важным подробное изучение механизмов патогенного и, в частности, эндотелиотоксического действия КФБ.

Цель исследования – определить запускаемый КФБ в эндотелиальных клетках тип клеточной смерти и выявить, нарушают ли они функционирование основных молекулярных путей внутриклеточного гомеостаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Искусственный синтез бионов. Для повышения надежности результатов все эксперименты проведены с использованием четырех групп: 1) чистого однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, 1X phosphatebufferedsaline, отрицательный контроль); 2) магний-фосфатных бионов (МФБ), не обладающих эндотелиотоксичностью; 3) КФБ сферической формы (СКФБ); 4) КФБ игольчатой формы (ИКФБ). Такой экспериментальный подход был применен с целью максимального снижения вероятности случайных эффектов (по сути предполагая наличие двух контрольных и двух опытных групп).

МФБ синтезировали при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2 М $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 100 мкл 0,2 М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) в 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco), содержащей 100 мкл (10 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (fetal calf serum, Gibco). СКФБ синтезировали путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5 М $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 21,5 мкл 0,2 М Na_2HPO_4 в 1319 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. ИКФБ синтезировали путем последовательного добавления 22 мкл 0,5 М $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 50 мкл 0,2 М Na_2HPO_4 в 918 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1 % от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. pH контролировали предварительным добавлением 5 мл буфера HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, Gibco) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация HEPES-буфера в среде – 1 %).

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировали при +37 °С, 5 % CO_2 и высокой влажности (МСО-18АІС, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при $200,000 \times g$ и 4 °С в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочего раствора для добавления к клеткам осадок МФБ растворяли в 500 мкл, осадок СКФБ – в 300 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (Gibco), что позволяло достичь оптической плотности на длине волны 650 нм (OP_{650}) в 0,08–0,10 (УНИПЛАН/АИФР-01, Пикон). Данная оптическая плотность соответствует мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), что является минимально измеримой и патофизиологически релевантной концентрацией бионов в растворе [3]. Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях.

Культивирование клеток. Для экспериментов использовали клеточную линию 2Н-11 (American Tissue Culture Collection, каталожный номер CRL-2163), полученную путем иммортализации первичной культуры лимфатических эндотелиальных клеток мыши вирусом SV40 (simian virus 40) и сохраняющую основные морфологические и функциональные особенности лимфатических эндотелиальных клеток [9]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco), содержащей 10 % фетальной телячьей сыво-

ротки, 2 % гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco), 1 % HEPES-буфера (Gibco), 1 % L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4 % амфотерицина В (Gibco). Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37 °С, 5 % CO_2 и 90 % влажности (МСО-18АІС, Sanyo).

Эффекты, индуцируемые бионами в культурах эндотелиальных клеток 2Н-11, изучали при помощи добавления суспензии МФБ, СКФБ или ИКФБ (100 мкл на лунку 6-луночного планшета, мутность суспензии 0,5 МкФ) к клеточным культурам высокой степени конfluэнтности (85–90 %) с дальнейшим культивированием в течение 24 ч. В качестве контрольной группы использовали клетки, к которым вместо бионов в аналогичном объеме добавляли стерильный ФСБ с последующим аналогичным временем культивирования.

Выделение белка и иммуноблоттинг. После трехкратной отмывки от остаточной культуральной среды однократным ФСБ выделяли белок посредством добавления к клеткам 1 мл RІPА-буфера (radioimmunoprecipitation assay buffer, содержит 0,15 М $NaCl$, 1 % NP-40, 1 % дезоксихолат натрия, 0,1 % додецилсульфат натрия и 0,025 М Tris-HCl pH 7,6; Thermo Scientific), в который дополнительно вносили коктейль ингибиторов протеаз (Thermo Scientific) и коктейль ингибиторов фосфатаз (Thermo Scientific). Для определения экспрессии белков и детекции посттрансляционных модификаций методом иммуноблоттинга 10 мкл белка (на каждую группу) смешивали с буфером Лэммли (Laemmli Buffer, содержит 4 % додецилсульфат натрия, 20 % глицерол, 10 % 2-меркаптоэтанол, 0,004 % бромфеноловый синий и 0,125 М Tris-HCl pH 6,8; Sigma) 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). В качестве маркера молекулярных масс применяли белковый стандарт Precision Plus (Bio-Rad). Белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при 100 В в течение 1 ч, перенос белков на мембрану осуществляли при 30 В в течение 1,5 ч при 4 °С. Блоттинг проводился с антителами к расщепленной каспазе-3 (cleaved caspase-3, cCasp-3; Abcam, ab49822), расщепленной поли(АДФ-рибоза)полимеразе (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cParp-1; Abcam, ab194586); X-связанному ингибитору апоптоза (X-linked inhibitor of apoptosis protein, Xiap; Abcam, ab21278), сурвивину (survivin; Abcam, ab469), ингибитору активатора

плазминогена (plasminogen activator inhibitor 1, Pai-1; Abcam, ab66705), митохондриальной сериновой протеазе HtrA2/Omi (Abcam, ab75982), цитохрому с (cytochrome c; Abcam, ab90529), р53-зависимому модулятору апоптоза (р53 upregulated modulator of apoptosis, Puma; Abcam, ab9643), фосфорилированной киназе, регулируемой внеклеточными сигналами (phosphorylated extra cellular signal-regulated kinase, pErk; Cell Signaling Technology, 9101), фосфорилированной митоген-активируемой протеинкиназе (phosphorylated mitogen-activated protein kinase, pMapk; Cell Signaling Technology, 9211), фосфорилированной киназе очаговой адгезии (phosphorylated focal adhesion kinase, pFak; Cell Signaling Technology, 3283), фосфорилированному ядерному фактору каппа В (phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, pNf-κB; Cell Signaling Technology, 3031), Itch (E3 убиквитин-белковой лигазе; Abcam, ab108515), Gli (глиома-ассоциированному онкогену; Abcam, ab151796)). Для хемилюминесцентной детекции результата использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козьиные противокроличьи вторичные антитела (Abcam, ab205718). Белки визуализировали с использованием реагента для детекции Amersham

ECL Prime (General Electric Healthcare) и цифрового сканера хемилюминесцентных блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Количественный анализ снимков хемилюминесцентных гелей проводили при помощи стандартного алгоритма в программе ImageJ. Графическое представление результатов экспериментов выполняли в программе GraphPad Prism (GraphPad Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе посттрансляционного расщепления эффекторных белков апоптоза сCasp-3 и сParp-1 выявлено кратное повышение их содержания в эндотелиальных клетках, экспонированных СКФБ и ИКФБ, в сравнении с клетками, экспонированными МФБ, а также контрольными клетками (рис. 1). В результате анализа белков внутреннего пути апоптоза выявлено, что уровень основного ингибитора внутреннего пути апоптоза Xiap при воздействии СКФБ и ИКФБ на эндотелиальные клетки снижается, а содержание другого ингибитора внутреннего пути апоптоза сурвивина и антиапоптотического белка Pai-1 – напротив, повышается (см. рис. 1). Причиной таких противоположных эффектов может быть активация внутриклеточного

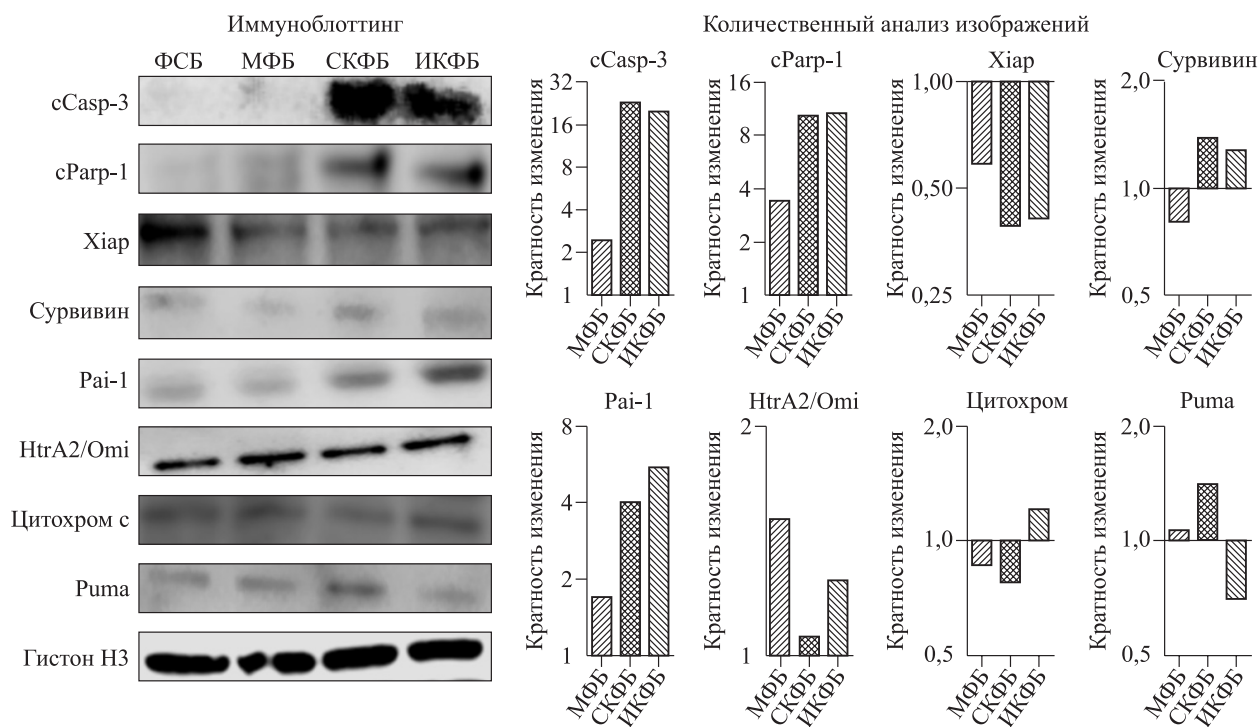


Рис. 1. Оценка воздействия КФБ на экспрессию и/или посттрансляционные модификации эффекторных белков апоптоза и белков внутреннего пути апоптоза в эндотелиальных клетках линии 2H-11 методом иммуноблоттинга с последующим количественным анализом изображений

механизма отрицательной обратной связи в ответ на про-апоптотическое действие КФБ. В отношении белков HtrA2/Omi (деактивирует Xiap) и цитохрома с (активирует HtrA2/Omi) однонаправленного изменения экспрессии обнаружено не было (см. рис. 1). На основании полученных данных сделан вывод, что экспозиция КФБ способна приводить к запуску внутреннего пути апоптоза.

В то же время, несмотря на определенный молекулярный ответ со стороны апоптотического сигналинга, не было детектировано никаких изменений в центральных сигнальных путях, отвечающих за нормальную клеточную физиологию. Так, при экспозиции различными типами бионон не выявлено существенной и доказательной разницы в уровне фосфорилированных белков pErk и pMapk (ключевых регуляторов клеточного метаболизма), pFak (основного звена, связанного с клеточной адгезией сигналинга) и pNf-κB (транскрипционного фактора, в значительной степени реализующего синтез и секрецию провоспалительных молекул) (рис. 2). Кроме того, не обнаружено различий в уровне белка Itch (молекулы, ответственной за убиквитинирование) и Gli (кодируемого одним из онкогенов белка в составе Hedgehog-пути) (см. рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, внутренний путь апоптоза запускается в ответ на ряд изменений в клеточном микроокружении, в число которых входят снижение факторов роста до недостаточного для поддержания жизнедеятельности уровня, критическое повреждение структуры ДНК, избыточное образование в клетке активных форм кислорода и нарушение микротрубочкового аппарата [10]. На ранних стадиях апоптоза клетка сохраняет целостность мембран и, до некоторой степени, метаболическую активность [10], однако на поздних стадиях происходят дезинтеграция плазматической мембраны и приобретение некротического морфотипа с последующим поглощением апоптотических тел фагоцитами (эффероцитозом) [11]. В предыдущих экспериментах нашей группой показано, что экспозиция КФБ приводит к появлению в культуре от 10 до 35 % эндотелиальных клеток (в зависимости от формы КФБ и клеточной линии) с запущенным процессом клеточной смерти, при этом от 30 до 40 % клеток имеют апоптотический морфотип (сохраненную плазматическую мембрану), соответствующий ранним стадиям апоптоза, а от 60 до 70 % клеток – некротический мор-

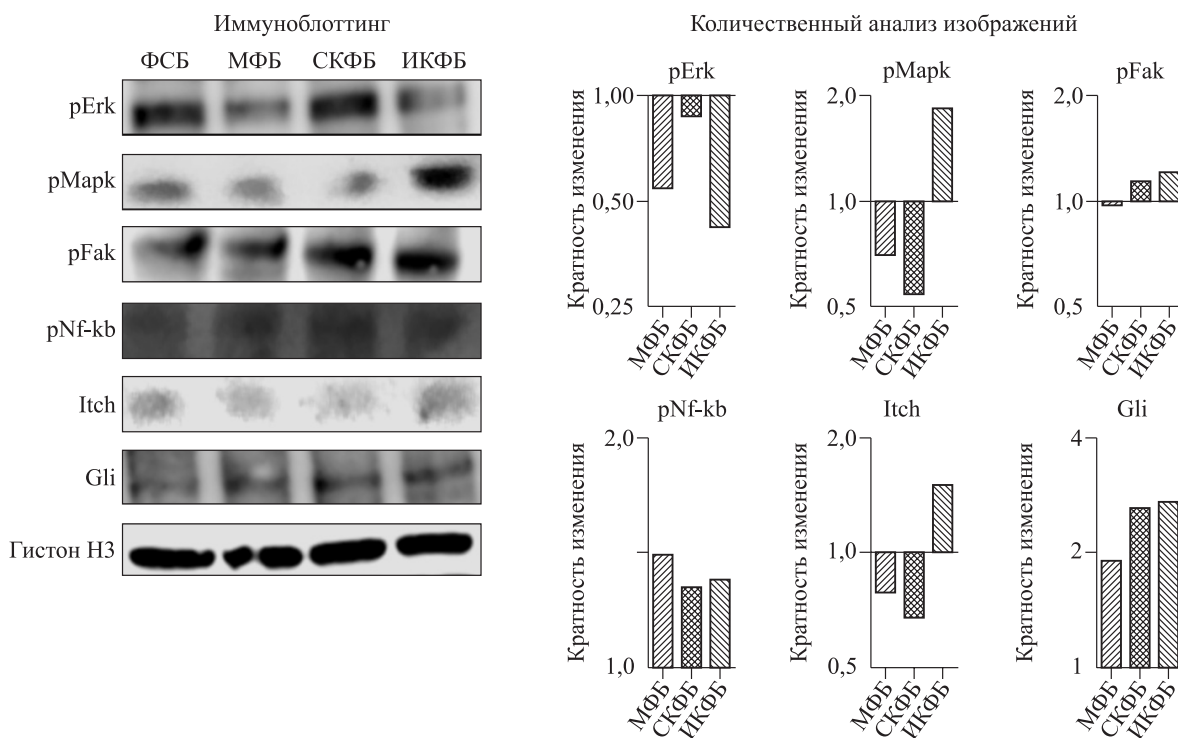


Рис. 2. Оценка воздействия КФБ на экспрессию и/или посттрансляционные модификации белков основных сигнальных путей в эндотелиальных клетках линии 2Н-11 методом иммуноблоттинга с последующим количественным анализом изображений

фотип (дезинтегрированную плазматическую мембрану), соответствующий поздним стадиям апоптоза.

На основании этих данных предположено, что цитотоксичность КФБ для эндотелиальных клеток обусловлена индукцией ими именно апоптоза, а не некроза. Эта гипотеза была частично подтверждена в нашей предыдущей работе [3], в которой показано, что экспозиция эндотелиальных клеток КФБ в течение 24 ч вызывает повышение экспрессии каспазы-3 и каспазы-9. Однако при этом оставалось неясным, характерно ли такое действие для всех эндогенных корпускулярных частиц или только для КФБ, а также была не известна выраженность данных эффектов под воздействием различных типов КФБ. В данной работе выявлено, что 24-часовая экспозиция КФБ конфлюэнтных культур эндотелиальных клеток приводит к увеличению содержания расщепленных каспазы-3 и ее субстрата Parp-1, являющихся эффекторами апоптоза [12], а также снижению основного ингибитора внутреннего пути апоптоза Xiap, блокирующего про-апоптотическое действие каспазы-3 и каспазы-9 [13]. В то же время не обнаружено значимого изменения уровня белка HtrA2/Omi, осуществляющего протеолитическую деградацию Xiap [14], и цитохрома с, активирующего каспазу-9 путем олигомеризации фактора, активирующего апоптотическую протеазу (apoptotic protease-activating factor 1, Araf1) [15]. Это может быть обусловлено тем, что про-апоптотическое действие HtrA2/Omi и цитохрома с опосредовано не увеличением их экспрессии и/или специфическими посттрансляционными модификациями, а выходом из митохондрий в цитозоль [15].

Представленные эксперименты указали на то, что принцип и величина апоптотического молекулярного ответа специфичны для КФБ, однако не зависят от их формы. Данные наблюдения позволили предположить, что КФБ вследствие своей неорганической природы могут не вызывать какого-либо изменения в функционировании центральных клеточных сигнальных путей, так как не являются лигандами для их рецепторов и, вероятнее всего, интернализируются с кевенджер-рецепторами [16], хотя точный механизм интернализации КФБ эндотелиальными клетками остается неизвестным. Для проверки этой гипотезы проведен иммуноблоттинг на фосфорилированные белки p44/42 Mapk (Erk1/2) и p38 Mapk, составляющие Mapk/Erk-путь сигналинга, регулирующий процессы клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки, метаболизма и миграции [17], фосфорилированную киназу очаговой ад-

гезии, ответственную за осуществление адгезии эндотелиальных клеток к субстрату (к примеру, к базальной мембране) [18], фосфорилированный ядерный фактор-каппа В, влияющий на транскрипцию генов, ответственных за выделение провоспалительных молекул, реализацию апоптоза и клеточной дифференцировки [19], а также белок Itch, отвечающий за убиквитинирование и деградацию белков в протеасомах [20]. Ни один из данных белков не продемонстрировал значимого повышения или снижения в эндотелиальных клетках при воздействии КФБ, что свидетельствовало в пользу указанного выше предположения.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что КФБ инициируют внутренний путь апоптоза в эндотелиальных клетках, однако не изменяют функционирование основных клеточных сигнальных путей.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Heiss A., Pipich V., Jahnchen-Dechent W., Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, N 12. P. 3986–3995.
2. 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, N 9. P. e75501. doi: 10.1371/journal.pone.0075501.
3. 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.
4. Pruijm M., Lu Y., Megdiche F. et al. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease // *J. Hypertens.* 2017. Vol. 35, N 10. P. 2044–2052.
5. Smith E.R., Ford M.L., Tomlinson L.A. et al. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014. Vol. 25, N 2. P. 339–348.
6. Pasch A., Block G.A., Bachtler M. et al. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE

- Trial // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2017. Vol. 12, N 2. P. 315–322.
7. **Keyzer C.A., de Borst M.H., van den Berg E. et al.** Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016. Vol. 27, N 1. P. 239–248.
 8. **Dahle D.O., Esberg A., Hartmann A. et al.** Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients // *Am. J. Transplant.* 2016. Vol. 16, N 1. P. 204–212.
 9. **O'Connell K.A., Edidin M.** A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells // *J. Immunol.* 1990. Vol. 144, N 2. P. 521–525.
 10. **Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al.** Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* 2018. Vol. 25, N 3. P. 486–541.
 11. **Green D.R., Oguin T.H., Martinez J.** The clearance of dying cells: table for two // *Cell Death Differ.* 2016. Vol. 23, N 6. P. 915–926.
 12. **Morris G., Walker A.J., Berk M. et al.** Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists // *Mol. Neurobiol.* 2017 Oct 19. doi: 10.1007/s12035-017-0793-y. [Epub ahead of print].
 13. **Holcik M., Korneluk R.G.** XIAP, the guardian angel // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 2, N 7. P. 550–556.
 14. **Van de Walle L., Lamkanfi M., Vandenabeele P.** The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview // *Cell Death Differ.* 2008. Vol. 15, N 3. P. 453–460.
 15. **Tait S.W., Green D.R.** Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11, N 9. P. 621–632.
 16. **Herrmann M., Schäfer C., Heiss A. et al.** Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111, N 5. P. 575–584.
 17. **Kolch W.** Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. Vol. 6, N 11. P. 827–837.
 18. **Mitra S.K., Hanson D.A., Schlaepfer D.D.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. Vol. 6, N 1. P. 56–68.
 19. **Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S.** Crosstalk in NF- κ B signaling pathways // *Nat. Immunol.* 2011. Vol. 12, N 8. P. 695–708.
 20. **Aki D., Zhang W., Liu Y.C.** The E3 ligase Itch in immune regulation and beyond // *Immunol. Rev.* 2015. Vol. 266, N 1. P. 6–26.

**ALTERATION OF SIGNALING PATHWAYS IN ENDOTHELIAL CELLS
BY CALCIUM PHOSPHATE BIONS**

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

*Federal State Budgetary Research Institution
«Scientific-research Institute for Complex Problems of cardiovascular disease»
650002, Kemerovo, Sosnovy boul., 6*

Aim. To identify death subroutine of endothelial cells upon the exposure to calcium phosphate bions (CPB) and to define whether CPB induce specific molecular response. **Materials and Methods.** Immortalized murine lymphatic endothelial cells (2H-11, 85–90 % confluence) were exposed to either magnesium phosphate bions (MPB), spherical calcium phosphate bions (SCPB), or needle-shaped calcium phosphate bions (NCPB) for 24 hours with the subsequent protein extraction using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer followed by Western blotting to: 1) apoptosis effector proteins (cleaved caspase-3 (cCasp-3), cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (cParp-1)); 2) intrinsic apoptosis proteins ((X-linked inhibitor of apoptosis protein (Xiap), survivin, plasminogen activator inhibitor 1 (Pai-1), HtrA2/Omi, cytochrome c, p53 upregulated modulator of apoptosis (Puma)); 3) proteins relate to central signaling pathways (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pErk), phosphorylated mitogen-activated protein kinase (pMapk), phosphorylated focal adhesion kinase (pFak), phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (pNF- κ B), Itch, and Gli). Results were assessed by chemiluminescence detection and using the standard ImageJ algorithm for analysis of chemiluminescent gels. **Results.** We found increased levels of cleaved effector caspase 3 and its cleaved substrate, cPARP-1, in endothelial cells exposed to SCPB or NCPB as compared to those exposed to MPB or control phosphate buffered saline. Further, we documented decreased level of Xiap, a key inhibitor of intrinsic apoptosis, in endothelial cells exposed to SCPB or NCPB. In contrast, survivin, an other major inhibitor of intrinsic apoptosis, and anti-apoptotic protein Pai-1 were abated upon the SCPB or NCPB exposure, possibly due to the activation of negative feedback loop. In addition, we did not detect any significant changes in master regulators of cell signaling pathways after exposure to CPB. **Conclusion.** CPB induce intrinsic apoptosis in endothelial cells but do not cause any specific molecular signaling response.

Keywords: bions, calcium phosphate, endothelial cells, endothelium, atherosclerosis, apoptosis, signaling pathways.

*Статья поступила 21 мая 2018 г.,
принята в печать 7 июня 2018 г.*