© 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., ДОЛГАНЮК В. Ф., БАРБАРАШ О. Л., КУТИХИН А. Г.

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

DOI: 10.20333/2500136-2019-3-34-42

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МАГНИЙ-ФОСФАТНЫХ И КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

Д. К. Шишкова¹, Т. В. Глушкова¹, О. С. Ефимова², А. Н. Попова², В. Ю. Малышева², Р. П. Колмыков^{2,3}, З. Р. Исмаилов², А. К. Гутаковский³, Ю. А. Живодков³, А. С. Кожухов³, В. Ф. Долганюк⁴, О. Л. Барбараш¹, А. Г. Кутихин¹

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово 650002, Российская Федерация

²Институт углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии, Кемерово 650000, Российская Федерация

³Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова, Новосибирск 630090, Российская Федерация

⁴Научно-исследовательский институт биотехнологии, Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, Кемерово 650056, Российская Федерация

Цель исследования. Сравнить морфологию, минеральный и органический профиль магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) для оценки пригодности МФБ как группы сравнения с целью тестирования специфичности эндотелиотоксического действия КФБ.

Материал и методы. МФБ и КФБ были искусственно синтезированы посредством перенасыщения имитирующей состав крови среды солями магния и кальция соответственно. Морфологические свойства МФБ и КФБ были изучены при помощи электронной и атомно-силовой микроскопии, элементный состав – посредством энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии и CHNSO-анализа, функциональные группы – инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье и спектроскопией комбинационного рассеяния света, формула входящих в состав бионов химических соединений – рентгеновской порошковой дифрактометрией. Белковый профиль МФБ и КФБ был исследован методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра.

Результаты. Как МФБ, так и КФБ представляли собой сферические частицы губчатой структуры диаметром 80–200 нм и средним диаметром около 120 нм, склонные к формированию кластеров из нескольких частиц. И МФБ, и КФБ состояли из углерода, кислорода, азота, водорода и фосфора, однако МФБ содержали магний и характеризовались минимальным содержанием кальция. МФБ и КФБ содержали фосфатные, карбонатные и гидроксильные группы, при этом МФБ состояли из магния фосфат гидрата и хантита, а КФБ – из гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита. Белковый профиль МФБ и КФБ был схожим.

Заключение. МФБ сходны с КФБ во всем, кроме формулы входящих в их состав соединений, и поэтому могут рассматриваться как подходящая группа сравнения для оценки специфичности токсического действия КФБ на эндотелий.

Ключевые слова: наночастицы, бионы, токсичность, эндотелий, атеросклероз, элементный анализ, минеральный состав, органический состав.

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

Для цитирования: Шишкова ДК, Глушкова ТВ, Ефимова ОС, Попова АН, Малышева ВЮ, Колмыков РП, Исмаилов ЗР, Гутаковский АК, Живодков ЮА, Кожухов АС, Долганюк ВФ, Барбараш ОЛ, Кутихин АГ. Морфологическая и химическая характеристика магний фосфатных и кальций фосфатных бионов. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(3):34-42. DOI: 10.20333/2500136-2019-3-34-42

MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MAGNESIUM PHOSPHATE AND CALCIUM PHOSPHATE BIONS

D. K. Shishkova¹, T. V. Glushkova¹, O. S. Efimova², A. N. Popova², V. Yu. Malysheva², R. P. Kolmykov^{2,3}, Z. R. Ismagilov², A. K. Gutakovskiy³, Yu. A. Zhivodkov³, A. S. Kozhukhov³, V. F. Dolganyuk⁴, O. L. Barbarash¹, A. G. Kutikhin¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo 650002, Russian Federation

²Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo 650000, Russian Federation

³Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk 630090, Russian Federation

⁴Research Institute of Biotechnology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo 650056, Russian Federation

The aim of the research is to compare morphology, mineral and organic profile of magnesium phosphate bions (MPB), and calcium-phosphate bions (CPB) to evaluate MPB acceptability as a comparison group in order to test specificity of CPB endotheliocytes action.

Material and methods. MPB and CPB were synthesized artificially with the aid of blood environment oversaturation by magnesium and calcium salts, respectively. Morphological properties of MPB and CPB were studied by means of electron and atomic-force microscopy, the elemental composition was studied with the help of energy-dispersive X-ray spectroscopy, atomic-emission spectroscopy and CHNSO- analyses, functional groups were studied by means of infrared spectroscopy with Fourier transform and Raman spectroscopy, X-ray powder diffractometry was used to study the formula included in bions composition of chemical compounds. The protein MPB and CPB was examined by polyacrylamide gel electrophoresis followed by staining it with silver nitrate.

Results. Both MPB and CPB were spherical particles of sponge-like structure, 80–200 nm in diameter and average diameter is approximately 120 nm that tend to form clusters of several particles. Both MPB and CPB consist of carbon, oxygen, nitrogen, hydrogen and phosphorus, but MPB contained magnesium and

is characterized by minimum calcium content. MPB and CPB contained phosphate, carbonate and hydroxyl groups, wherein MPB consisted of magnesium phosphate hydrate and hantit, while CPB contained hydroxyapatite and carbonate-hydroxyapatite. MPB and CPB protein profile was similar.

Conclusion. MPB and CPB are similar in all ways, except for the formula of their constituent compounds, that is why they can be considered as suitable comparison group to assess the specificity of CPB toxic effect on endothelium.

Key words: nanoparticles, bions, toxicity, endothelium, atherosclerosis, elemental analysis, mineral composition, organic composition.

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

Citation: 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 characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. *Siberian Medical Review*. 2019;(3):34-42. DOI: 10.20333/2500136-2019-3-34-42

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) представляют собой эндогенные наночастицы, формируемые при перенасыщении крови ионами кальция (гиперкальциемии) и фосфора (гиперфосфатемии) в качестве механизма защиты от прямой эктопической кальцификации тканей [1, 2]. Вместе с тем, в нашей предыдущей работе было обнаружено, что КФБ выделяются из приблизительно 75 % атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, оказывают токсическое действие на эндотелиальные клетки *in vitro* и вызывают гипертрофию внутренней оболочки (интимы) брюшной аорты крыс, являющуюся характерным признаком атеросклероза [2]. Таким образом, защищая организм от «большого зла» - быстрой и массивной кальцификации сосудов [3, 4], КФБ тем не менее способны являться одним из триггеров атеросклероза – хронического воспалительного процесса, характеризующегося формированием гетерогенных бляшек из клеток, внеклеточного матрикса и липидов во внутренней оболочке артерий [5, 6]. При критическом сужении артериального просвета или разрыве бляшки с последующим тромбозом происходит критическое падение уровня необходимого кровотока, что приводит к острому несоответствию объема поступающего в ткани кислорода необходимому для поддержания их жизнеспособности объему [5, 6]. Клинически это проявляется инфарктом миокарда (при нарушении сердечного кровотока), острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу (при нарушении мозгового кровотока) и заболеваниями периферических артерий [5, 6].

Поскольку атеросклероз продолжает оставаться ведущей причиной смерти, как в развитых, так и развивающихся странах [7], а повреждение внутренней выстилки артерий (эндотелия) является обязательным условием для его развития [8, 9], изучение механизмов эндотелиотоксического действия КФБ имеет достаточно большую актуальность. Однако остается неизвестным, чем обусловлено токсическое действие КФБ на эндотелий - их специфическим химическим составом или их корпускулярной природой, общей для всех типов эндогенных наночастиц и многих вводимых в кровь наноразмерных средств таргетной доставки лекарственных препаратов [10, 11].

Для получения ответа на данный вопрос представляется необходимым решить задачу искусственного синтеза «идеальной группы сравнения» - наночастиц, которые бы не могли быть синтезированы эндогенно в условиях человеческого организма, но которые бы не отличались от КФБ ничем, кроме собственно составляющих их минералов. Было предположено, что в качестве подобной группы сравнения могут выступить магний-фосфатные бионы (МФБ), поскольку: 1) МФБ не способны образовываться в организме человека вследствие кратно превышающей летальную дозу ионов магния (Mg^{2+}), необходимой для их синтеза; 2) по литературным данным, МФБ наиболее близки к КФБ по размерности и форме [1]. Поэтому целью данного исследования стало сравнить морфологические характеристики и химический состав МФБ и КФБ.

Материал и методы

Искусственный синтез бионов

МФБ были синтезированы при помощи последовательного добавления 100 мкл 0,2М $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 100 мкл 0,2М Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) в 700 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), содержащей 100 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco). КФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,45М $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich) и 22,5 мкл 0,2М Na_2HPO_4 в 1318 мкл среды DMEM, содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки. После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов инкубировались при $+37^{\circ}C$ (МСО-18АІС, Sanyo) в течение 24 ч с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и $+4^{\circ}C$ в течение 1 ч (Optima MAX-XP, Beckman Coulter). С целью получения рабочего раствора осадок МФБ растворялся в 500 мкл, а осадок КФБ – в 300 мкл бидистиллированной воды, что позволяло достичь оптической плотности (ОП) в 0,5 стандарта Мак-Фарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой и патофизиологически релевантной величиной концентрации бионов в растворе. Все вышеуказанные процедуры проводились в стерильных условиях. Измерение ОП проводилось на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм. В случае необходимости получения сухого порошка

для экспериментов раствор МФБ или КФБ замораживался при -40°C (Sanyo) и лиофилизировался в течение суток (FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System, Labconco).

Визуализация бионов

Визуализация бионов проводилась методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для СЭМ несколько капель раствора МФБ или КФБ помещались на стекло для микроскопии (Thermo Scientific) и высушивались в течение 2 ч при 37°C . Далее образец помещался на углеродный скотч (Ted Pella) и напылялся Au-Pd (SC7640, Emitech), с дальнейшим выполнением непосредственно СЭМ (Hitachi SU8220, Hitachi). Для ПЭМ несколько капель раствора МФБ или КФБ помещались на медную сеточку с углеродным напылением (Structure Probe, Inc.) с последующим проведением непосредственно ПЭМ (JEM-4000 EX, JEOL). Для АСМ несколько капель раствора МФБ или КФБ помещались на диск из слюды (Ted Pella), и далее осуществлялась непосредственно АСМ (Cypher™ Atomic Force Microscope, Asylum Research).

Определение распределения размерности и поверхностного заряда

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

Элементный анализ

Для определения химических элементов, входящих в состав бионов, помещали несколько капель раствора МФБ или КФБ на углеродный скотч, высушивали в течение 2 ч при 37°C и проводили элементный анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (XFlash® 4010, Bruker). Для каждого образца определялись три квадранта с четко визуализируемыми бионами с последующим расчетом среднего атомного процента для каждого элемента. Атомно-эмиссионная спектроскопия лиофилизированного порошка МФБ или КФБ проводилась после его растворения в HNO_3 в течение 1 ч при 80°C . CHNSO-анализ проводился посредством каталитического окисления бионов при 1060°C .

Определение функциональных групп

Функциональные группы соединений, из которых состоят бионы, определялись методами инфракрасной спектроскопии (ИК) с преобразованием Фурье (Инфралюм ФТ-801, Симэкс, разрешение 4 см^{-1} на длинах волн от $4,000\text{ см}^{-1}$ до 500 см^{-1}) и спектроскопии комби-

национного рассеяния света (LabRam HR800, Horiba Scientific, разрешение $0,222\text{ см}^{-1}$ на от $4,000\text{ см}^{-1}$ до 100 см^{-1}). Каждый представленный спектр рассчитывался как среднее 25 последовательных сканирований лиофилизированного порошка МФБ или КФБ.

Определение химических соединений и степени кристалличности

Собственно химические соединения, входящие в состав бионов, определялись путем анализа лиофилизированного порошка МФБ или КФБ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии (Bruker D8 ADVANCE, Bruker) с медной рентгеновской трубкой при 40 кВ. Дифрактометрия проводилась по 2θ углу от 20 до 120 градусов при скорости в 0,02 градуса в секунду. Полученные спектры сравнивались с базой Объединенного комитета порошковых дифракционных стандартов для идентификации химической формулы соединения. Кроме того, при помощи этого же метода посредством сопоставления ширины получаемых пиков проводилось сравнение степени кристалличности МФБ и КФБ.

Определение белкового профиля

Белки, входящие в состав бионов, определялись методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра (AgNO_3). Аликвоты одинакового объема (20 мкл) раствора МФБ или КФБ с оптической плотностью 0,5 МкФ были смешаны с буфером Лэммли (1,5М Tris-HCl с pH 6,8, глицерол, β -меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, 1 % бромфеноловый синий, дитиотреитол) в отношении 4:1 и затем загружены на 1 мм NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris гель (Life Technologies). В качестве положительного контроля и маркера молекулярной массы белков использовался белковый стандарт Precision Plus (Bio-Rad). Белки разделялись при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при 100 В в течение 1 ч. Гель окрашивался при помощи набора SilverQuest (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. При появлении полос добавлялся стоп-раствор (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в концентрации 39 мМ). Гели фотографировались с использованием сканера HP Scanjet Enterprise Flow (Hewlett Packard).

Определение липидного профиля

Липиды выделялись из раствора МФБ или КФБ по методу Фолча с использованием традиционного протокола и детектировались методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии, которая проводилась в соответствии с ГОСТ 30418-96 «Метод определения жирнокислотного состава» с использованием капиллярной колонки MDN-1 (твердосвязанный метилсиликон, 30 м x 0,25 мм, Sigma-Aldrich) и газового хромато-масс-спектрометра GCMS-QP2010 Ultra

(Shimadzu) в соответствии со следующими параметрами: объем инжектора 1 мкл, температура инжектора 200°C, деление потока 1:10, температура интерфейса 210°C, температура детектора 200°C, скорость потока газа-носителя (He) 0,8 мл/мин, температурная программа: 100°C в течение 2 мин, 5°/мин до 120°C, 20°/мин до 260°C, затем 260°C в течение 2 мин. Идентифицировались массы от 1,5 до 1,900 m/z (отношение массы к заряду).

Определение углеводов

Определение массовой доли углеводов в растворе МФБ или КФБ проводилось в соответствии с ГОСТ Р 54667-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров».

Определение нуклеиновых кислот

Выделение ДНК и РНК из растворов МФБ или КФБ проводилось фенол-хлороформным и тризольным методами по классическому протоколу. Качественная оценка содержания ДНК и РНК (аликвоты по 20 мкл) осуществлялась методом электрофореза (115 В) в 1% агарозном геле (1 г агарозы на 100 мл однократного трис-ацетатного (ТАЕ)-буфера, содержащего 4 мкл бромистого этидия (EtBr)). Количественная оценка содержания ДНК и РНК проводилась на спектрофотометре NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific).

Результаты и обсуждение

Идентичность морфологических свойств бионов является одним из ключевых факторов, позволяющих осуществлять адекватное сравнение их токсичности, поскольку ранее было выявлено, что КФБ диаметром более 300 нм обладают большей цитотоксичностью в сравнении с КФБ диаметром менее 300 нм [12], а в параллельной серии экспериментов нами была показанакратно большая эндотелиотоксичность игольчатых КФБ в сравнении со сферическими (статья в печати). Поэтому с целью оценки размерности и формы МФБ и КФБ были проведены сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия и атомно-силовая микроскопия. Все три метода визуализации показали, что как МФБ, так и КФБ представляют собой сферические частицы губчатой структуры диаметром 80-200 нм и средним диаметром около 120 нм и способны формировать кластеры из нескольких частиц (рис. 1, рис. 2, рис. 3), что соответствует ранее полученным нами данным в отношении КФБ, выделенным из атеросклеротических бляшек, а также подтверждает результаты проведенных нами ранее экспериментов по искусственному синтезу КФБ [2].

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

Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ).

Figure 1. Magnesium phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CPB) scanning electron microscopy.

Рисунок 2. Просвечивающая электронная микроскопия магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ).

Figure 2. Magnesium phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CPB) electron X-ray microscopy.

Рисунок 3. Атомно-силовая микроскопия магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ).

Figure 3: Magnesium phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CPB) atomic-force microscopy.

артефактам вследствие их неравномерного распределения по поверхности подложки, что в том числе может вести к избыточному рассеянию или агрегации частиц. Поэтому нами был дополнительно применен метод динамического рассеяния света, позволяющий оценить распределение размерности бионов в растворе (включая оценку их кластеризации), а также метод электрофоретического рассеяния света для измерения поверхностного заряда (дзета-потенциала) частиц, определяющего их склонность к агрегации. Динамическое рассеяние света подтвердило данные, полученные при визуализации МФБ и КФБ, причем как в отношении диаметра отдельных частиц, так и в отношении формирования кластеров до 1000 нм в диаметре (рис. 4А). Дзета-потенциал МФБ и КФБ варьировал от -19 до -24 мВ, что подтвердило склонность бионов к агрегации (рис. 4Б).

Рисунок 4. Анализ распределения размерности и поверхностного заряда магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ) на анализаторе наночастиц Zetasizer Nano ZS.

Figure 4. Magnesium-phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CPB) dimension allocation and surface charge analysis by means of nanoparticles Zetasizer Nano ZS analyzer.

Другим, не менее важным, параметром сравнения МФБ и КФБ является их химический состав (минеральный и органический профиль). В идеале для оценки специфичности токсического действия КФБ их элементный состав, функциональные группы и профиль входящих в их состав органических компонентов должны быть максимально схожими с таковыми у МФБ. С целью сравнительного анализа элементного состава МФБ и КФБ были выполнены энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, атомно-эмиссионная спектроскопия и CHNSO-анализ. Данные методы показали сопоставимые результаты и позволили обнаружить, что КФБ состоят из углерода, кислорода, водорода, азота, кальция и фосфора, а МФБ – из тех же самых элементов и магния (рис. 5А). Более того, количественное содержание всех вышеуказанных элементов, за исключением кальция, в МФБ было схожим с КФБ (рис. 5А). Таким образом, по элементному составу МФБ отличались от КФБ лишь минимальным содержанием кальция и наличием магния. Следующим этапом изучения минерального профиля МФБ и КФБ стала идентификация функциональных групп. При помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и спектроскопии комбинационного рассеяния света было обнаружено, что как МФБ, так и КФБ содержат фосфатные (PO_4^{3-}), карбонатные (CO_3^{2-}) и гидроксильные (OH^-) группы (рис. 5Б). Наконец, посредством рентгеновской порошковой дифрактометрии было выявлено, что МФБ состоят из магния фосфат гидрата ($\text{Mg}_2(\text{P}_2\text{O}_7) \cdot \text{H}_2\text{O}$) и хантита ($\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$), а КФБ – из гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонат-гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$) (рис. 5В). Совпадение ширины пиков соединений указало на сходную степень кристалличности МФБ и КФБ (рис. 5В). Стоит отметить, что основные пики МФБ соответствуют магния фосфат гидрату, а КФБ – гидроксиапатиту, поэтому для наглядности на рисунке 6 представлены сигнатуры именно данных соединений.

Все примененные методы химического анализа позволили сделать вывод, что МФБ и КФБ (помимо различий в содержании магния и кальция) отличаются лишь формулой входящих в их состав химических соединений. Однако в нашей ранней работе и в ряде других исследований было убедительно показано, что КФБ содержат ряд сывороточных белков [1, 2, 13, 14], которые играют протективную роль, ослабляя повреждающие эффекты гидроксиапатита [15]. Кроме того, другие классы биологических макромолекул (липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты) также теоретически могут определять патогенные эффекты бионов. Поэтому, помимо анализа минерального профиля, было решено провести анализ органического профиля КФБ и МФБ.

А Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

CHNSO-анализ

Б Инфракрасная спектроскопия

Спектроскопия комбинационного рассеяния света

В Рентгеновская порошковая дифрактометрия

Рисунок 5. Анализ минерального профиля магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ).

Figure 5. Magnesium phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CPB) mineral profile analysis.

Используя электрофорез в агарозном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием нитратом серебра, было выявлено, что МФБ и КФБ характеризуются присутствием белков с одинаковыми молекулярными массами и незначительными различиями в количественном содержании одних и тех же белков (рис. 6А). Принимая во внимание, что все идентифицированные белки могут происходить лишь из фетальной бычьей сыворотки, необходимой для искусственного синтеза бионов, был проведен эмпирический анализ соответствия молекулярных масс сывороточным белкам. Таким способом, а также на основании проведенного в нашей предыдущей работе

иммуноблоттинга [2] было предположено, что в состав как МФБ, так и КФБ входили альбумин (66,5 кДа) и феттин-А (48,4 кДа), являющиеся по данным литературы основными белками, характерными для бионов [1, 13, 14]. Для более подробного анализа белкового профиля МФБ и КФБ необходимо проведение жидкостной хромато-масс-спектрометрии, которая, однако, является достаточно дорогостоящим и технически сложным методом, требующим длительной оптимизации пробоподготовки образцов.

За исключением белков, ни МФБ, ни КФБ не содержали никаких других классов биологических макромолекул: не было выявлено ни липидов (рис. 6Б), ни

Рисунок 6. Анализ органического профиля магний-фосфатных бионов (МФБ) и кальций-фосфатных бионов (КФБ).

Figure 6. Magnesium phosphate bions (MPB) and calcium-phosphate bions (CFB) organic profile analysis.

углеводов (не показано на рисунке вследствие того, что метод их определения не подразумевает какого-либо графика), ни нуклеиновых кислот (рис. 6В), что является логичным вследствие отсутствия данных классов молекул в фетальной бычьей сыворотке или иных компонентах среды для искусственного синтеза бионов. Таким образом, можно заключить, что МФБ и КФБ обладают сходным органическим профилем.

Заключение

Имея идентичные с КФБ морфологические свойства, белковый и минеральный состав (за исключением различий в содержании магния и кальция, а также собственно формул составляющих химических соединений), МФБ могут применяться в биологических экспериментах для оценки специфичности токсического действия КФБ *in vitro* и *in vivo*.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 17-04-00570 «Оценка специфичности токсического действия кальций-фосфатных бионов на эндотелий».

Литература / References

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

2. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filipov 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. *Scientific Reports*. 2016;(6):27255. DOI: 10.1038/srep27255

3. Molenaar FM, van Reekum FE, Rookmaaker MB, Abrahams AC, van Jaarsveld BC. Extraosseous calcification in end-stage renal disease: from visceral organs to vasculature. *Seminars in Dialysis*. 2014;27(5):477-487. DOI: 10.1111/sdi.12177

4. Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, Gorman J, Malhotra R, Jackson VA, Kamdar MM, Steele DJ, Thadhani RI. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. *American Journal of Kidney Diseases*. 2015;66(1):133-146. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.01.034

5. Yurdagul A Jr, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochemical Journal*. 2016;473(10):1281-1295. DOI: 10.1042/BJ20150844

6. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis.

Circulation Research. 2016;118(4):620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301

7. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1151-1210. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32152-9

8. Jensen HA, Mehta JL. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2016;14(9):1021-1033. DOI: 10.1080/14779072.2016.1207527

9. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;(248):97-109. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007

10. Blau R, Krivitsky A, Epshtein Y, Satchi-Fainaro R. Are nanotheranostics and nanodiagnosics-guided drug delivery stepping stones towards precision medicine? *Drug Resistance Updates*. 2016;(27):39-58. DOI: 10.1016/j.drug.2016.06.003

11. Matea CT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, Iancu C, Mocan L. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;(12):5421-5431. DOI: 10.2147/IJN.S138624

12. Peng HH, Wu CY, Young D, Martel J, Young A, Ojcus 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. DOI: 10.1002/smll.201202270

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

14. Martel J, Young D, Young A, Wu CY, Chen CD, Yu JS, Young JD. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2011;418(1):111-125. DOI: 10.1016/j.ab.2011.06.018

15. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013;8(4):e60904. DOI: 10.1371/journal.pone.0060904

Сведения об авторах

Шишкова Дарья Кирилловна, младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, ул. Сосновый бульвар, д. 6; тел.: +7(3842)644527; e-mail: shishkovadk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Глушкова Татьяна Владимировна, к.б.н., Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, ул. Сосновый бульвар, д. 6; тел.: +7(3842)644527; e-mail: bio.tv@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1516-9765>

Ефимова Ольга Сергеевна, к.х.н., Институт углей и химического материало-ведения Федерального исследовательского центра угля и углей; адрес: Российская Федерация, 650000, г. Кемерово, пр. Советский, д. 18; тел.: +7(3842)365586; e-mail: efimovaos@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4495-0983>

Попова Анна Николаевна, к.х.н., Институт углей и химического материало-ведения Федерального исследовательского центра угля и углей; адрес: Российская Федерация, 650000, г. Кемерово, пр. Советский, д. 18; тел.: +7(3842)365586; e-mail: h991@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6970-9542>

Малишева Валентина Юрьевна, инженер-технолог, Институт углей и химического материало-ведения Федерального исследовательского центра угля и углей; адрес: Российская Федерация, 650000, г. Кемерово, пр. Советский, д. 18; тел.: +7(3842)365586; e-mail: v23091@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1018-6574>

Колмыков Роман Павлович, к.х.н., Институт углей и химического материало-ведения Федерального исследовательского центра угля и углей; адрес: Российская Федерация, 650000, г. Кемерово, пр. Советский, д. 18; тел.: +7(3842)365586; e-mail: kolmykoff.roman@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5647-5759>

Исмаилов Зинфер Ришатович, д.х.н., профессор, Институт углей и химического материало-ведения Федерального исследовательского центра угля и углей; адрес: Российская Федерация, 650000, г. Кемерово, пр. Советский, д. 18; тел.: +7(3842)365586; e-mail: zinfer1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1520-9216>

Гутаковский Антон Константинович, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник, Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова; адрес: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 13; тел.: +7(383)3309082; e-mail: gut@isp.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1786-5458>

Живодков Юрий Алексеевич, ведущий инженер-технолог, Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова; адрес: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 13; тел.: +7(383)3309082; e-mail: yuriy.zhivodkov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1522-1654>

Кожухов Антон Сергеевич, аспирант, Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова; адрес: Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 13; тел.: +7(383)3309082; e-mail: antonkozukhov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7769-1637>

Долганюк Вячеслав Федорович, к.т.н., Научно-исследовательский институт биотехнологий; адрес: Российская Федерация, 650056, г. Кемерово, б-р Строителей, д. 47; тел.: +7(3842)396873; e-mail: nemesida_90@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1875-1436>

Барбараш Ольга Леонидовна, д.м.н., профессор, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, ул. Сосновый бульвар, д. 6; тел.: +7(3842)643308; e-mail: olb61@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

Кутихин Антон Геннадьевич, к.м.н., Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, ул. Сосновый бульвар, д. 6; тел.: +79609077067; e-mail: antonkutikhin@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Author information

Daria K. Shishkova, Junior Researcher, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +7(3842)64-45-27; e-mail: shishkovadk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1518-3888>

Tatiana V. Glushkova, Cand.Biol.Sci., Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +7(3842)64-45-27; e-mail: bio.tv@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1516-9765>

Olga S. Efimova, Cand.Chem.Sci., Institute of Coal Chemistry and Material Science; Address: 18, Sovetskiiy Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650000; Phone: +7(3842)365586; e-mail: efimovaos@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4495-0983>

Anna N. Popova, Cand.Chem.Sci., Institute of Coal Chemistry and Material Science; Address: 18, Sovetskiiy Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650000; Phone: +7(3842)365586; e-mail: h991@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6970-9542>

Valentina Yu. Malysheva, Engineer-Technologist, Institute of Coal Chemistry and Material Science; Address: 18, Sovetskiiy Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650000; Phone: +7(3842)365586; e-mail: v23091@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1018-6574>

Roman P. Kolmykov, Cand.Chem.Sci., Senior Researcher, Institute of Coal Chemistry and Material Science; Address: 18, Sovetskiiy Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650000; Phone: +7(3842)365586; e-mail: kolmykoff.roman@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5647-5759>

Zinifer R. Ismagilov, Dr.Chem.Sci., Professor, Institute of Coal Chemistry and Material Science; Address: 18, Sovetskiiy Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650000; Phone: +7(3842)365586; e-mail: zinfer1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1520-9216>

Anton K. Gutakovskiy, Cand.Phys.-Mat.Sci., Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics; Address: 13, Prospekt Lavrentieva, Novosibirsk, Russian Federation 630090; Phone: +7(383)3309082; e-mail: gut@isp.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1786-5458>

Yuriy A. Zhivodkov, Leading Engineer-Technologist, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics; Address: 13, Prospekt Lavrentieva, Novosibirsk, Russian Federation 630090; Phone: +7(383)3309082; e-mail: yuriy.zhivodkov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1522-1654>

Anton S. Kozhukhov, Graduate Student, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics; Address: 13, Prospekt Lavrentieva, Novosibirsk, Russian Federation 630090; Phone: +7(383)3309082; e-mail: antonkozukhov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7769-1637>

Viatcheslav F. Dolganyuk, Cand. Tech. Sci., Research Institute of Biotechnology; Address: 47, Stroiteley Boulevard, Kemerovo, Russian Federation 650056; Phone: +7(3842)396873; e-mail: nemesida_90@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1875-1436>

Olga L. Barbarash, Dr.Med.Sci., Professor, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +7(3842)643308; e-mail: olb61@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4642-3610>

Anton G. Kutikhin, Cand.Med.Sci., Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +79609077067; e-mail: antonkutikhin@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Поступила 28.10.2018 г.

Принята к печати 09.04.2019 г.

Received 28 October 2018

Accepted for publication 09 April 2019