

DOI 10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16

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

ШИШКОВА Д.К.¹, ГЛУШКОВА Т.В.¹, ЕФИМОВА О.С.², ПОПОВА А.Н.², МАЛЫШЕВА В.Ю.², КОЛМЫКОВ Р.П.²,
ИСМАГИЛОВ З.Р.², ГУТАКОВСКИЙ А.К.³, ЖИВОДКОВ Ю.А.³, КОЖУХОВ А.С.³, СЕВОСТЬЯНОВ О.Г.⁴,
ДОЛГАНЮК В.Ф.⁴, КУДРЯВЦЕВА Ю.А.¹, КУТИХИН А.Г.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

²Институт углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля
и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия

³ФГБУН Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

ORIGINAL RESEARCH

MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MAGNESIUM PHOSPHATE AND CALCIUM PHOSPHATE BIONS

DARIA K. SHISHKOVA¹, TATIANA V. GLUSHKOVA¹, OLGA S. EFIMOVA², ANNA N. POPOVA², VALENTINA YU. MALYSHEVA²,
ROMAN P. KOLMYKOV², ZINFER R. ISMAGILOV², ANTON K. GUTAKOVSKY³, YURIY A. ZHIVODKOV³, ANTON S. KOZHUKHOV³,
OLEG G. SEVOSTYANOV⁴, VIATCHESLAV F. DOLGANYUK⁴, YULIYA A. KUDRYAVTSEVA¹, ANTON G. KUTIKHIN¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002), Russian Federation

²Institute of Coal Chemistry and Material Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (18, Sovietskiy Avenue, Kemerovo, 650000), Russian Federation

³Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (13, Prospekt Lavrentieva, Novosibirsk, 630090), Russian Federation

⁴Kemerovo State University (6, Krasnaya Street, Kemerovo, 650000), Russian Federation

Резюме

Цель. 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.

Материалы 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 рас-

сеяния 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 хангита, а КФБ – из гидроксипатита и карбонат-гидроксипатита. Белковый профиль МФБ и КФБ был схожим.

Заключение. МФБ сходны с КФБ во всем (размерность, форма, степень кристалличности, элементный состав, функциональные группы), кроме компонентов неорганической составляющей, 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.

Abstract

Aim. To compare morphological properties, mineral, and organic pattern of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB) for the assessment of MPB as a control group for the evaluation of CPB-specific endothelial toxicity.

Materials and Methods. Both MPB and CPB were artificially synthesized employing blood-mimetic medium supersaturated of magnesium and phosphorus salts, respectively. Morphology of MPB and CPB was investigated by electron and atomic force microscopy, elemental analysis was performed utilizing energy-dispersive X-ray spectroscopy, atomic emission spectroscopy, and CHN-SO analysis, functional groups were examined using Fourier-transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, while chemical formula was identified by X-ray powder diffraction analysis. Protein profile of MPB and CPB was screened employing polyacrylamide gel electrophoresis with the following silver staining.

Results. Both MPB and CPB represented spherical spongy particles of 80-200 nm diameter and mean diameter of around 120 nm, tending to form clusters of several particles. Both MPB and CPB contained carbon, oxygen, nitrogen, hydrogen, and phosphorus. However, MPB also contained magnesium but had minimum calcium content while CPB had a significant amount of calcium but were devoid of magnesium. Both MPB and CPB contained phosphate, carbonate, and hydroxyl functional groups but MPB consisted of magnesium phosphate hydrate and huntite while CPB were comprised of hydroxyapatite and carbonate-hydroxyapatite. Protein composition of MPB and CPB was similar.

Conclusion. MPB are similar to CPB excepting the chemical formula; hence, MPB can be considered as an appropriate control group to evaluate specificity of CPB-related endothelial toxicity.

Keywords: nanoparticles, bions, toxicity, endothelium, atherosclerosis, elemental analysis, mineral profile, organic profile.

◀ English

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 формировани-

ем 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 в развивающихся странах [7], а повреждение внутренней выстилки артерий (эндотелия) является обязательным условием для его развития [8, 9], изучение механизмов эндо-

телиотоксического 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 вследствиекратно превышающей летальную дозы 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.

Цель исследования

Провести сравнительный анализ морфологических характеристик и химический состав МФБ и КФБ.

Материалы 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 $+37^\circ C$ (MCO-18AIC, Sanyo) в течение 24 ч с дальней-

шим центрифугированием при $200,000 \times g$ 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 МакФарланда (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 $-40^\circ C$ (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 $37^\circ C$. 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 были определены при помощи динамического и электрофоретического рассеяния света соответственно (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Перед измерением суспензия бионов термостатировалась при $25^\circ C$ в течение 10 мин. 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 HNO₃ 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 см⁻¹ до 500 см⁻¹) и спектроскопии комбинационного рассеяния света (LabRam HR800, Horiba Scientific, разрешение 0,222 см⁻¹ на от 4,000 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 ни-

тратом серебра (AgNO₃). 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 этилендиамина тетрауксусной 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 про-

токолу. 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 показана кратно 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 (рисунки 1, рисунок 2, рисунок 3), что соответствует ранее полученным нами данным в от-

ношении 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 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 (рисунки 4А). Дзета-потенциал МФБ и КФБ варьировал от -19 до -24 мВ, что подтвердило склонность бионов к агрегации (рисунки 4Б).

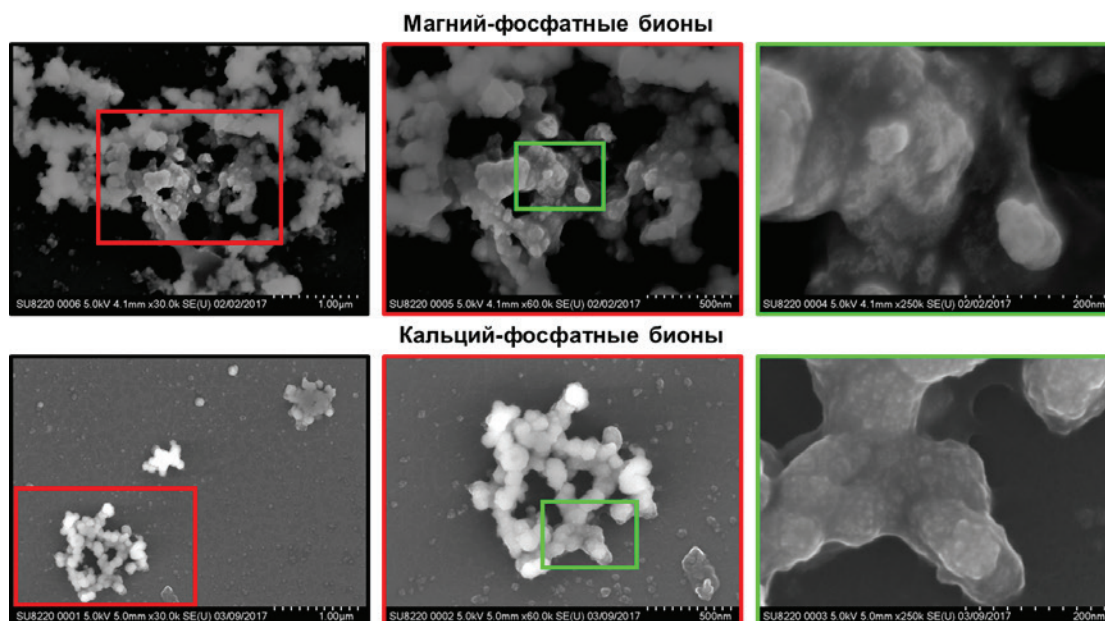
Другим не менее важным параметром сравнения МФБ и КФБ является их химический состав (минеральный и органический профиль). В идеале для оценки специфичности токсич-

Рисунок 1.

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

Figure 1.

Scanning electron microscopy of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)



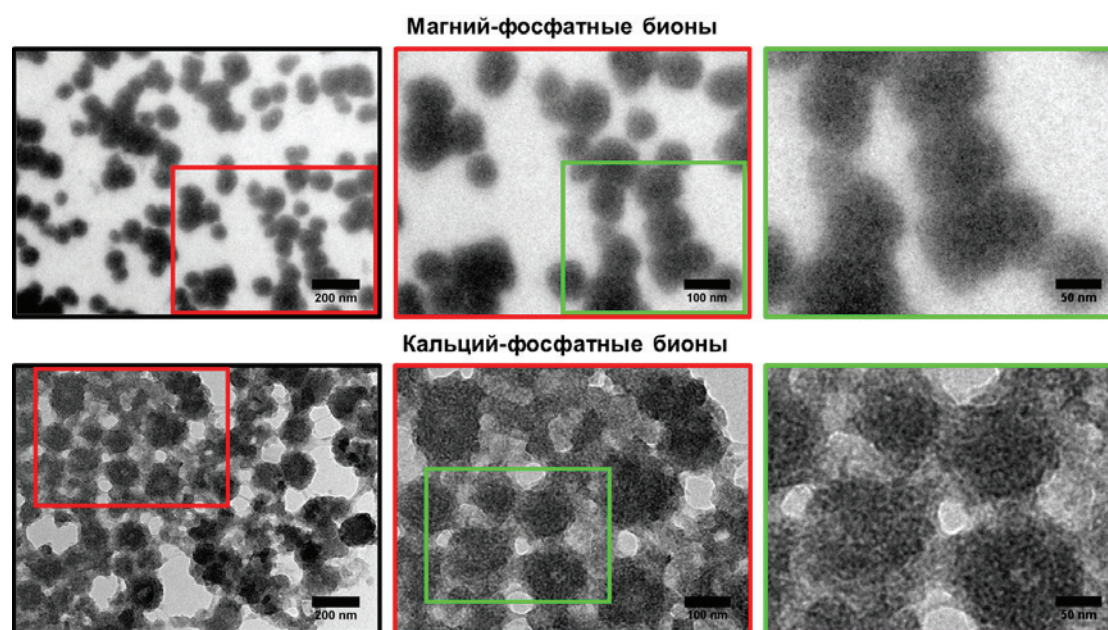


Рисунок 2.

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

Figure 2.

Transmission electron microscopy of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)

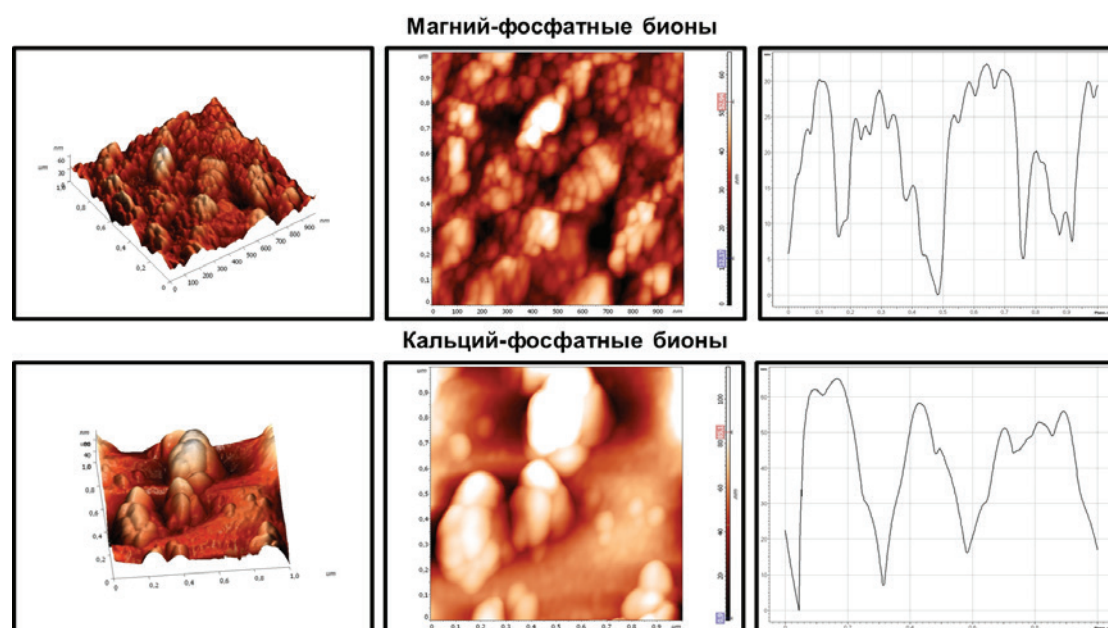


Рисунок 3.

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

Figure 3.

Atomic force microscopy of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)

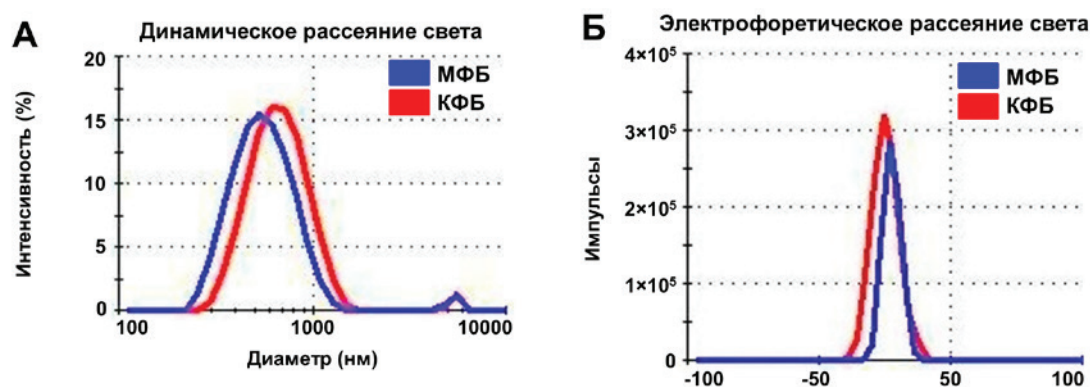


Рисунок 4.

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

Figure 4.

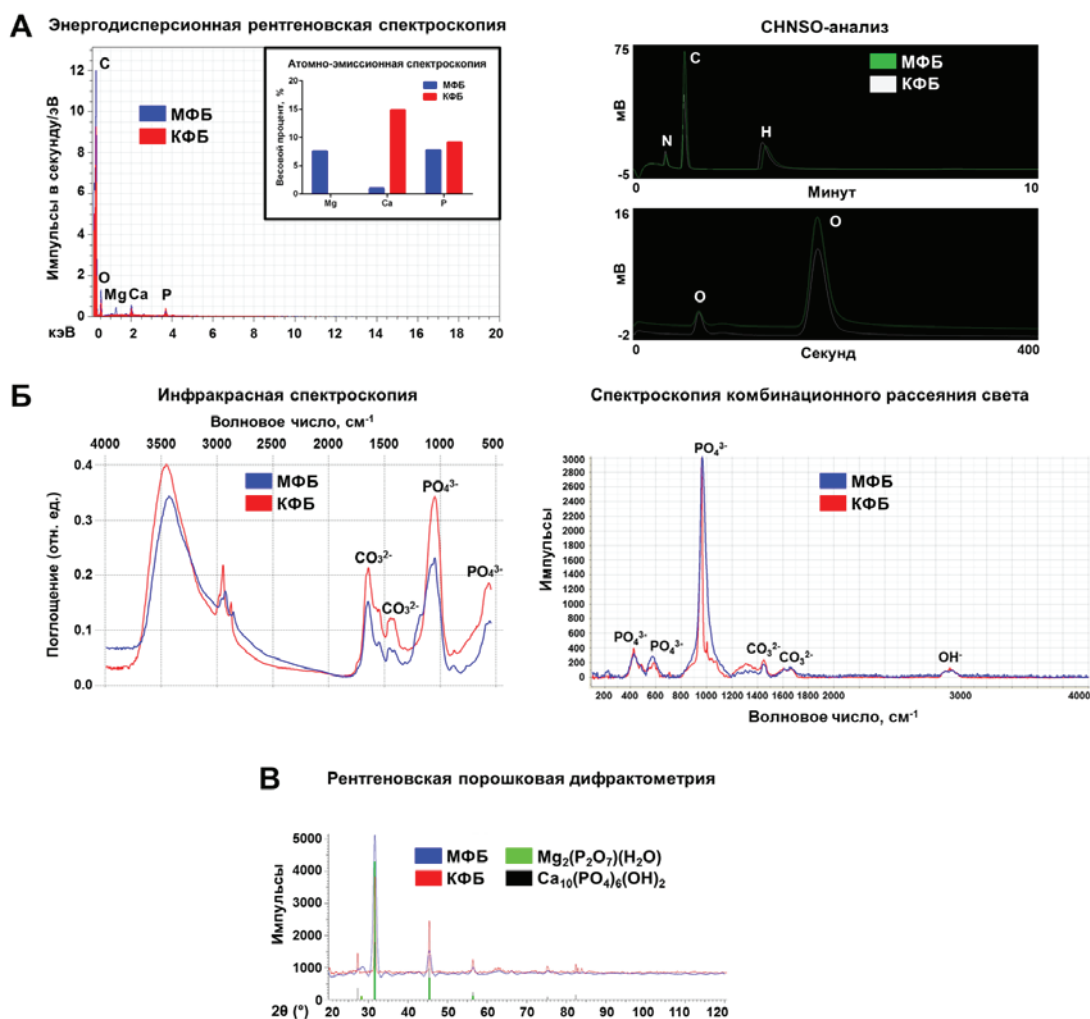
Particle-size distribution and surface charge of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)

Рисунок 5.

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

Figure 5.

Mineral profiling of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)



ческого 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 (рисунки 5А). Более того, количественное содержание всех вышеуказанных элементов, за исключением кальция, в МФБ было схожим с КФБ (рисунки 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 помо-

щи 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 (рисунки 5Б). Наконец, посредством рентгеновской порошковой дифрактометрии было выявлено, что МФБ состоят из магния фосфат гидрата ($\text{Mg}_2(\text{P}_2\text{O}_7)(\text{H}_2\text{O})$) 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 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$) (рисунки 5В). Совпадение ширины пиков соединений указало на сходную степень кристалличности МФБ и КФБ (рисунки 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 каль-

ция) 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 гидроксипатита [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.

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 (рисунок 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 фетуин-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 (рисунок 6Б), ни углеводов (не показано на рисунке вследствие того, что метод их определения не подразумевает какого-либо графика), ни нуклеиновых кислот (рисунок 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.

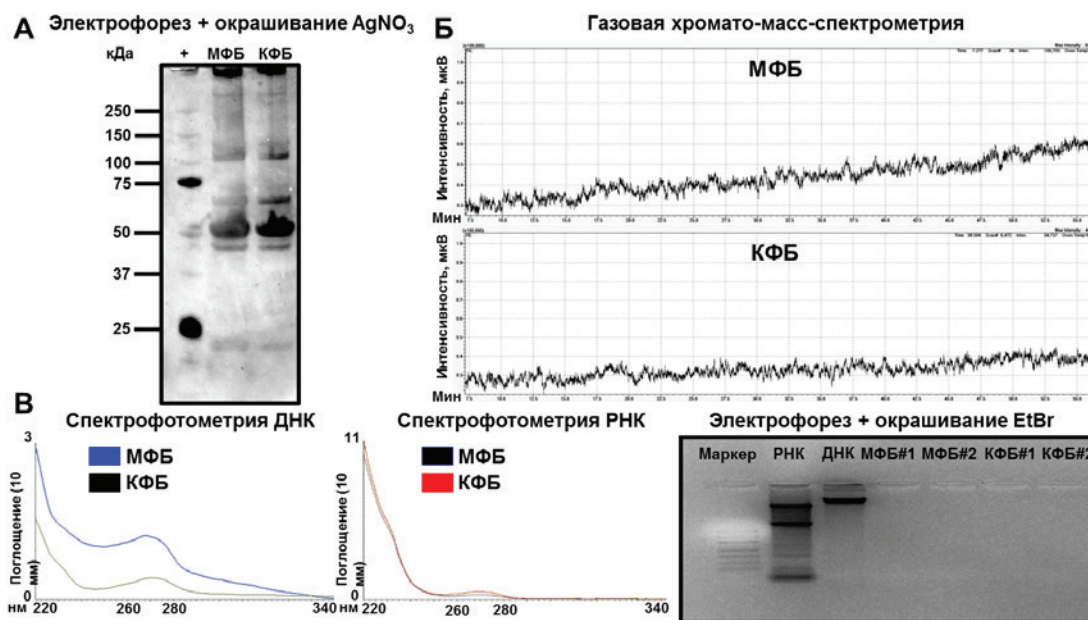


Рисунок 6.

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

Figure 6.

Organic profiling of magnesium phosphate bions (MPB) and calcium phosphate bions (CPB)

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».

Funding

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research according to the research project № 17-04-00570.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

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, 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; 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. Semin Dial. 2014; 27 (5): 477-487. doi: 10.1111/sdi.12177.
4. Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, Gorman J, Malhotra R, Jackson VA, et al. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. Am J Kidney Dis. 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. Biochem J. 2016; 473 (10): 1281-1295. doi: 10.1042/BJ20150844.
6. Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res. 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 Rev Cardiovasc Ther. 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 Resist Updat. 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, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. Int J Nanomedicine. 2017; 12: 5421-5431. doi: 10.2147/IJN.S138624.
12. Peng HH, Wu CY, Young D, Martel J, Young A, Ojcius DM, et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. Small. 2013; 9 (13): 2297-2307. doi: 10.1002/sml.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, et al. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 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 лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: искусственный синтез бионов, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-1518-3888

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

Authors

Mrs. Daria K. Shishkova, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: synthesised the bions; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-1518-3888

Dr. Tatiana V. Glushkova, PhD, Researcher, Laboratory for Novel Biomaterials, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed energy-dispersive X-ray spectroscopy.

ORCID: 0000-0002-1516-9765

Вклад в статью: проведение энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

ORCID: 0000-0002-1516-9765

Ефимова Ольга Сергеевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории высокотемпературных углеродных материалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение измерений методами динамического и электрофоретического рассеяния света.

ORCID: 0000-0003-4495-0983

Попова Анна Николаевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории неорганических наноматериалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение рентгеновской порошковой дифрактометрии.

ORCID: 0000-0001-6970-9542

Малышева Валентина Юрьевна, ведущий технолог лаборатории высокотемпературных углеродных материалов Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье.

ORCID: 0000-0002-1018-6574

Колмыков Роман Павлович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение атомно-эмиссионной спектроскопии.

ORCID: 0000-0001-5647-5759

Исмагилов Зинфер Ришатович, доктор химических наук, член-корреспондент Российской академии наук, директор Института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: координация проведения экспериментов по изучению химических свойств бионов.

ORCID: 0000-0002-1520-9216.

Гутаковский Антон Константинович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Вклад в статью: проведение просвечивающей электронной микроскопии.

ORCID: 0000-0002-1786-5458

Живодков Юрий Алексеевич, ведущий инженер-технолог лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Вклад в статью: проведение сканирующей электронной микроскопии.

ORCID: 0000-0002-1522-1654

Dr. Olga S. Efimova, PhD, Researcher, Laboratory for High Temperature Carbon Materials, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed dynamic and electrophoretic light scattering measurements.

ORCID: 0000-0003-4495-0983

Dr. Anna N. Popova, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Inorganic Nanomaterials, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed X-ray powder diffraction analysis.

ORCID: 0000-0001-6970-9542

Mrs. Valentina Yu. Malysheva, MSc, Leading Technologist, Laboratory for High Temperature Carbon Materials, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed Fourier-transform infrared spectroscopy.

ORCID: 0000-0002-1018-6574

Dr. Roman P. Kolmykov, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Inorganic Nanomaterials, Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed atomic emission spectroscopy.

ORCID: 0000-0001-5647-5759

Prof. Zinfer R. Ismagilov, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Institute of Coal Chemistry and Material Science, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: supervised the chemical analysis of bions.

ORCID: 0000-0002-1520-9216

Dr. Anton K. Gutakovsky, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Nanodiagnostics and Nanolithography, Department of Physics and Technology of Low-Dimensional Semiconductors, Micro- and Nanostructures, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation.

Contribution: performed transmission electron microscopy.

ORCID: 0000-0002-1786-5458

Mr. Yuriy A. Zhivodkov, MSc, Leading Engineer-Technologist, Laboratory of Nanodiagnostics and Nanolithography, Department of Physics and Technology of Low-Dimensional Semiconductors, Micro- and Nanostructures, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation.

Contribution: performed scanning electron microscopy.

ORCID: 0000-0002-1522-1654

Mr. Anton S. Kozhukhov, MSc, PhD Student, Laboratory of Nanodiagnostics and Nanolithography, Department of Physics and Technology of Low-Dimensional Semiconductors, Micro- and Nanostructures, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics, Novosibirsk, Russian Federation.

Contribution: performed atomic force microscopy.

ORCID: 0000-0001-7769-1637

Dr. Oleg G. Sevostyanov, PhD, Associate Professor, Department of Experimental Physics, Institute for Basic Science, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed Raman spectroscopy.

ORCID: 0000-0002-1786-5458

Dr. Viatcheslav F. Dolganyuk, PhD, Senior Researcher, Research Institute for Biotechnology, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed polyacrylamide gel electrophoresis with silver staining and gas chromatography-mass spectrometry.

ORCID: 0000-0002-1875-1436

Кожухов Антон Сергеевич, аспирант лаборатории нанодиагностики и нанолитографии отдела физики и технологии полупроводников пониженной размерности, микро- и наноструктур Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Вклад в статью: проведение атомно-силовой микроскопии.
ORCID: 0000-0001-7769-1637

Севостьянов Олег Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры экспериментальной физики Института фундаментальных наук Кемеровского государственного университета, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение спектроскопии комбинационного рассеяния света.
ORCID: 0000-0002-1786-5458

Долганюк Вячеслав Федорович, кандидат технических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института биотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: проведение электрофореза в полиакриламидном геле с окрашиванием нитратом серебра и газовой хромато-масс-спектрометрии.
ORCID: 0000-0002-1875-1436

Кутихин Антон Геннадьевич, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

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

Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич,
650002, г. Кемерово, б-р Сосновый, д. 6
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Corresponding author:

Dr. Anton G. Kutikhin,
6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002,
Russian Federation
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

Для цитирования:

Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Севостьянов О.Г., Долганюк В.Ф., Кутихин А.Г. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов // Фундаментальная и клиническая медицина. 2019. Т. 4. № 2. С. 6-16. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16>.

For citation:

Daria K. Shishkova, Tatiana V. Glushkova, Olga S. Efimova, Anna N. Popova, Valentina Yu. Malysheva, Roman P. Kolmykov, Zinifer R. Ismagilov, Anton K. Gutakovskiy, Yuriy A. Zhivodkov, Anton S. Kozhukhov, Oleg G. Sevostyanov, Viatcheslav F. Dolganyuk, Anton G. Kutikhin. Morphological and chemical characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. Fundamental and Clinical Medicine. 2019; 4 (2): 6-16. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16>.

Статья поступила: 06.05.2019

Принята в печать: 31.05.2019

Received: 06.05.2019

Accepted: 31.05.2019