

Определение механизма кальцификации неоинтимы при атеросклерозе при помощи элементного анализа

Л.А. Богданов, Н.Ю. Осяев, В.Е. Маркова, Р.А. Мухамадияров,
А.Р. Шабаев, А.Г. Кутихин

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

Резюме

Введение. Формирование атеросклеротических бляшек в большинстве случаев сопровождается их кальцификацией, однако патобиохимические механизмы ее инициации и прогрессирования остаются неясными. В частности, неизвестно, как именно образуется макрокальцификат – путем постепенного роста от центра к периферии или посредством последовательного слияния микрокальцификатов. Цель исследования – изучить пространственно-временные аспекты химической трансформации фосфата кальция в атеросклеротических бляшках для оценки основных гипотез механизма созревания кальцификатов в неоинтиме. **Материал и методы.** Материалом исследования служили 20 кальцинированных атеросклеротических бляшек, удаленных в процессе каротидной эндартерэктомии. После фиксации в формалине, постфиксации и окрашивания тетраоксидом осмия, обезвоживания и окрашивания уранилацетатом бляшки заключали в эпоксидную смолу с дальнейшей шлифовкой, полировкой и контрастированием цитратом свинца. После напыления углеродом визуализировали микроструктуру бляшек методом сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. Элементный анализ кальцификатов проводили при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии также в режиме обратнорассеянных электронов в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ. Анализ выполняли на 11 радиально расположенных внутри кальцификата и четырех контрольных точках на различном удалении от кальцификата. **Результаты.** Как атеросклеротические бляшки, так и участки одной и той же бляшки различались по соотношению содержания кальция и фосфора в кальцификатах. Корреляционный анализ выявил статистически значимую связь между величиной данного соотношения на периферии и в центре кальцификата. Участки кальцификатов с разной электронной плотностью также имели различное соотношение содержания кальция и фосфора, однако убедительной корреляции данных показателей не выявлено. **Заключение.** Корреляция соотношения содержания кальция и фосфора в центре и на периферии кальцификата свидетельствует о его созревании от центра к периферии, а не об оссификации (слиянии небольших очагов кальцификации в один крупный).

Ключевые слова: атеросклероз, кальцификация, минерализация, элементный анализ, фосфат кальция, гидроксипатит.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Автор для переписки: Богданов Л.А., e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Для цитирования: Богданов Л.А., Осяев Н.Ю., Маркова В.Е., Мухамадияров Р.А., Шабаев А.Р., Кутихин А.Г. Определение механизма кальцификации неоинтимы при атеросклерозе при помощи элементного анализа. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (1): 81–90. doi: 10.18699/SSMJ20210108

Elemental analysis insights into atherosclerotic calcification

L.A. Bogdanov, N.Yu. Osyayev, V.E. Markova, R.A. Mukhamadiyarov,
A.R. Shabaev, A.G. Kutikhin

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6

Abstract

Background. Atherosclerosis is frequently accompanied by an extensive calcification, yet the mechanisms behind its initiation and progression remain obscure. In particular, there is unclear whether large mineral deposits grow concentrically or by merging of microcalcifications. Aim of the study was to investigate calcium phosphate maturation during atherosclerotic calcification employing an elemental analysis approach. **Material and methods.** We collected 20 calcified atherosclerotic plaques excised during carotid endarterectomy. After being fixed in formalin and postfixed in osmium tetroxide, plaques were dehydrated and stained in uranyl acetate with the subsequent embedding into epoxy resin, grinding, polishing, and lead citrate counterstaining. Upon the sputter coating with carbon, we visualised the plaque microanatomy by means of backscattered scanning electron microscopy. Elemental analysis was carried out using energy-dispersive X-ray spectroscopy in the backscattered mode at high vacuum and 20 kV voltage. The analysis was performed at 11 radial points within the calcium deposit and 4 control points at ascending distance from the deposit. **Results.** Calcium to phosphate ratio differed between the calcium deposits in distinct plaques and also within the same plaque. We found a statistically significant correlation between calcium to phosphate ratio in the center and periphery of the calcium deposit. Areas with distinct electron density had different calcium to phosphate ratio; however, there was no clear correlation between these parameters. **Conclusion.** Correlation of calcium to phosphate ratio in the center and periphery of the calcium deposit suggests that its maturation develops from the center to the periphery rather than by merging of neighboring calcium deposits.

Key words: atherosclerosis, calcification, mineralization, elemental analysis, calcium phosphate, hydroxyapatite.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

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

Corresponding author: Bogdanov L.A., e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Citation: Bogdanov L.A., Osyayev N.Yu., Markova V.E., Mukhamadiyarov R.A., Shabaev A.R., Kutikhin A.G. Elemental analysis insights into atherosclerotic calcification. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (1): 81–90. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210108

Введение

Несмотря на значительное количество проведенных исследований, кальцификация артерий является предметом активных обсуждений патофизиологов и клиницистов. С одной стороны, она играет отрицательную роль, снижая эластичность сосудов и придавая их ткани выраженную неоднородность, что, в свою очередь, увеличивает риск развития аневризм и разрыва фиброзной покрышки атеросклеротических бляшек вследствие неравномерного распределения механической нагрузки [1–3]. В то же время гетерогенность самих кальцификатов обуславливает их различную роль в развитии нестабильного фенотипа атеросклеро-

тической бляшки [1]. Последние исследования показали, что микрокальцификаты размером менее 5 мкм содержатся практически во всех бляшках и не опасны в контексте возможного разрыва, хотя увеличение их диаметра в результате созревания неизбежно приведет к изменению патофизиологической значимости [2]. Считается, что множественные микрокальцификаты (размером от 5 до 100 мкм) в целом способствуют разрыву бляшки, создавая в ней зоны, уязвимые к повышению увеличивающейся с ростом бляшки гемодинамической нагрузки [4–6], в то время как макрокальцификаты (размером более 100 мкм), напротив, придают фиброзной покрышке стабильность [4, 6].

Образовавшиеся липидное ядро из пенистых клеток или поврежденные коллагеновые волокна в неоинтима служат морфологическим субстратом для инициации кальцификации [7], а повышенное содержание ионов кальция и фосфора в микроокружении вследствие нарушенного минерального гомеостаза ускоряет его рост [8]. Инициация кальцификации сопровождается отложением растворимых форм фосфата кальция, например, дикальцийфосфата, который далее при наличии свободных ионов кальция и фосфора переходит в более устойчивый октакальцийфосфат и нерастворимый гидроксиапатит [9, 10].

Хотя химическая трансформация фосфатов кальция при формировании кальцификатов *in vivo* расшифрована достаточно хорошо, этого нельзя сказать о морфологическом развитии кальцификатов. В настоящее время существует две основные теории этого процесса. Первая из них предполагает, что рост кальцификата происходит из центра (концентрически или эксцентрически), который состоит из более зрелого, чем на периферии, фосфата кальция, и соотношение содержания кальция и фосфора в целом уменьшается по мере удаленности от центра [11]. Вторая теория гласит о множественных очагах инициации кальцификации, которые по мере роста сливаются друг с другом, формируя единый кальцификат по аналогии с образованием костной ткани (так называемый процесс оссификации) [12–14]. Таким образом, образовавшийся кальцификат должен иметь неоднородную структуру, отражаемую стохастическими различиями соотношения содержания кальция и фосфора в анализируемых участках [12–14].

Целью данного исследования было изучить пространственно-временные аспекты химической трансформации фосфата кальция в атеросклеротических бляшках для оценки указанных выше двух гипотез механизма созревания кальцификатов в неоинтима.

Материал и методы

Для проведения данной работы использованы атеросклеротические бляшки, удаленные из внутренней сонной артерии по причине гемодинамически значимой хронической ишемии головного мозга или ишемического инсульта в процессе эндартерэктомии, выполненной в клинике НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. От всех пациентов получено письменное информированное согласие на включение в исследование, протокол его проведения одобрен локальным этическим комите-

том НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № ЛФАА-ЛБ-3 от 25.06.2019).

Полученные атеросклеротические бляшки ($n = 20$) промывали физиологическим раствором и переносили в забуференный 10%-й формалин (рН 7,4) (B06-003, БиоВитрум) для фиксации на 24 ч с однократной сменой формалина через первые 2 ч. На следующем этапе образцы постфиксировали в 1%-м тетраоксиде осмия (19110, Electron Microscopy Sciences, США), приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере, в течение 12 ч и окрашивали 2%-м водным раствором тетраоксида осмия в течение 48 ч. На следующем этапе биоптаты обезживали в этаноле возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80, 95 %), по две смены (каждая по 15 мин) в каждой из указанных концентраций. Далее биоптаты докрасивали 2%-м спиртовым раствором уранилацетата (22400-2, Electron Microscopy Sciences) в течение 5 ч, обезживали в изопропанол (06-002, БиоВитрум) в течение 5 ч и в ацетоне (150495, Лен-Реактив) в течение 1 ч.

Затем образцы пропитывали смесью эпоксидной смолы Epon (14120, Electron Microscopy Sciences) и ацетона в соотношении 1 : 1 в течение 6 ч, чистой эпоксидной смолой в течение 24 ч и полимеризовали в свежей эпоксидной смоле при 60 °C в течение 24 ч. Получившиеся эпоксидные блоки шлифовали до образца и полировали на установке TegraPol-11 (Struers Inc., США) с последовательным использованием шлифовальных дисков с диаметром зерна 9, 6 и 3 мкм. После полировки образцы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (17810, Electron Microscopy Sciences) в течение 15 мин путем нанесения раствора на отполированную поверхность блока. После отмывки в бидистиллированной воде на блоки наносили углеродное напыление толщиной в 10–15 нм с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica Microsystems GmbH, ФРГ).

Образцы визуализировали методом сканирующей электронной микроскопии (Hitachi S-3400N, Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP (обратнорассеянных электронов) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Элементный анализ кальцификатов выполняли при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (XFlash 4010, Bruker, США) в режиме BSECOMP условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Корреляционный анализ производили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Корреляцию считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты

При электронно-микроскопическом исследовании атеросклеротических бляшек наблюдали кальцификаты, существенно различающиеся по форме и размеру (рис. 1). Результаты элементного анализа показали, что как атеросклеротические бляшки (рис. 2, а), так и участки одной и той же бляшки (рис. 2, б) различались по соотношению содержания кальция и фосфора (Са/Р) в кальцификатах.

Для определения механизма химической трансформации фосфата кальция измеряли элементный состав различных участков внутри одного кальцификата по следующей схеме: центр (участок 1), первая линия на 1, 3, 5, 7, 9 и 11 ч (участки 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно), вторая линия вокруг центра на 3, 6, 9 и 12 ч (участки 9, 10, 11 и 8 соответственно) (рис. 3). Результаты показали неоднородность соотношения Са/Р внутри кальцификата, которое варьировало в зависимости от удаленности от центра и составляло от 2,01 до 3,08 (рис. 4). Подавляющее большинство кальцификатов имело соотношение Са/Р в

диапазоне 2,2–2,8, что соответствовало структуре аморфного фосфата кальция. Минимальные и максимальные соотношения Са/Р наблюдали в центрах различных кальцификатов – 1,92 и 3,08 соответственно. Соотношение Са/Р в центре коррелировало с таковым в первой и второй линиях (таблица). Таким образом, можно предположить, что созревание кальцификата происходит от его центра к периферии.

Также отмечено, что внутри одного кальцификата присутствуют участки с неоднородной электронной плотностью. Визуально это выражалось в том, что некоторые участки внутри кальцификата были светлее других (рис. 5). При элементном анализе обнаружены некоторые различия в соотношении Са/Р между темными и светлыми участками: наибольшую величину наблюдали в темном (2,61), а наименьшую – в светлом (1,92), однако четкой закономерности не было – и высокие, и низкие соотношения Са/Р регистрировали как на темных, так и на светлых участках кальцификата.

Несмотря на соотношения Са/Р, обнаруженные в ходе эксперимента, которые соответству-

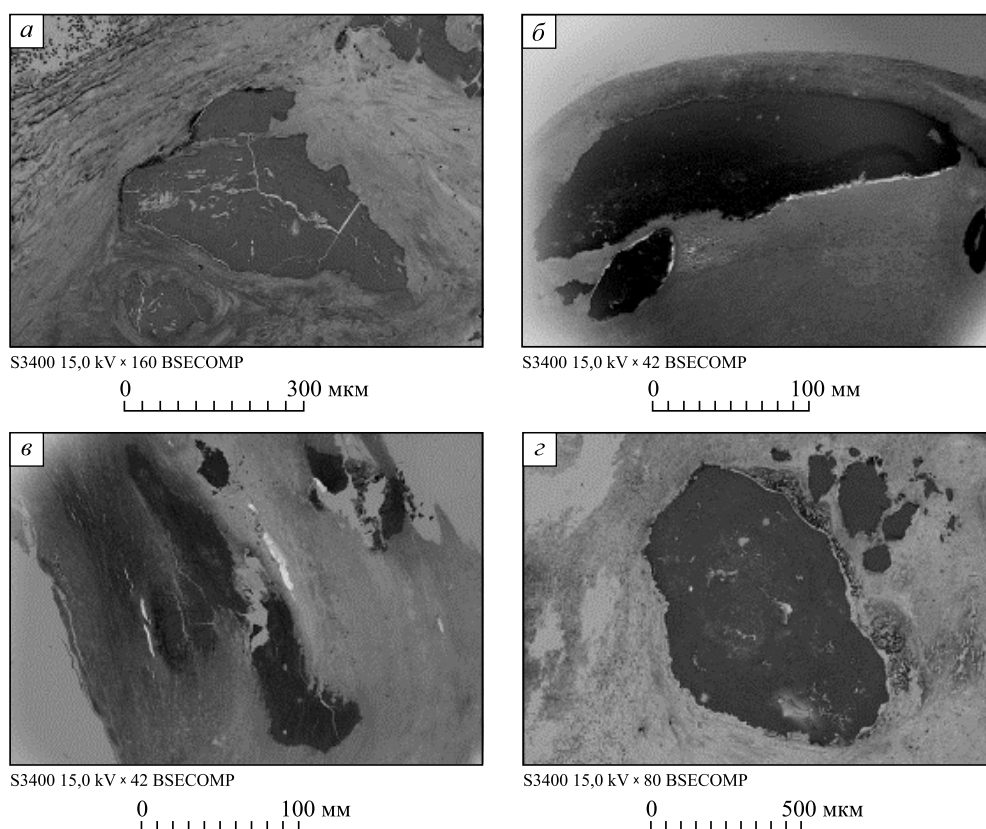


Рис. 1. Кальцификаты в составе атеросклеротических бляшек характеризуются различной размерностью и формой; а – ув. ×160, б, в – ув. ×42, з – ув. ×80

Fig. 1. Atherosclerotic calcium deposits of different size and shape; а – magnification ×160, б, в – ×42, з – ×80

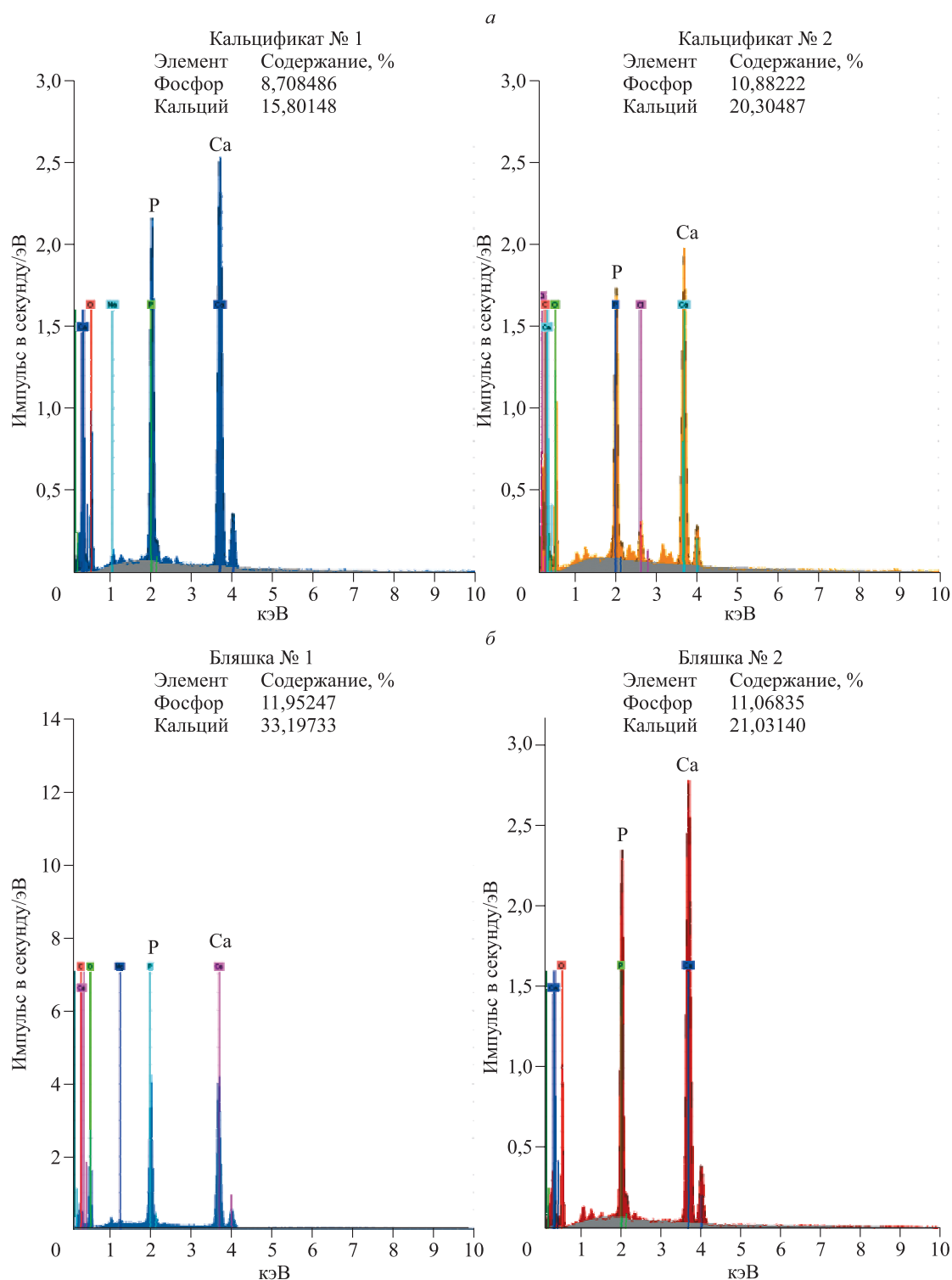


Рис. 2. Репрезентативный график соотношения Ca/P в кальцификатах разных атеросклеротических бляшек (а) и внутри одной бляшки (б)

Fig. 2. Calcium to phosphorus ratio in calcium deposits from distinct atherosclerotic plaques (а) and within the same plaque (б). Representative graph

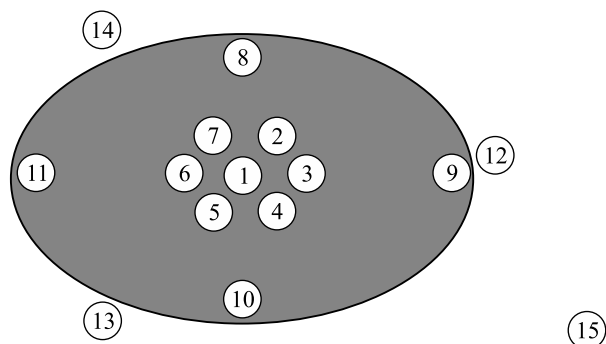


Рис. 3. Схема проведения элементного анализа внутри одного кальцификата; 1–11 – участки внутри кальцификата, 12–14 – контрольные участки вокруг кальцификата, 15 – контрольный участок вдали от кальцификата

Fig. 3. Scheme of the elemental analysis within the same calcium deposit. 1–11 – areas within the calcium deposit, 12–14 – control areas around the calcium deposit, 15 – control area aside the calcium deposit

Таблица. Корреляция соотношения Ca/P в центре и различных участках атеросклеротических кальцификатов, выбранных по схеме согласно рис. 4

Table. Correlation between the calcium to phosphate ratio in the center and in the hierarchically selected areas at its periphery

Номер участка	r_s	p
Участок 2	0,374	0,104
Участок 3	0,499	0,025
Участок 4	0,520	0,019
Участок 5	0,556	0,011
Участок 6	0,442	0,051
Участок 7	0,135	0,569
Участок 8	0,083	0,729
Участок 9	0,633	0,003
Участок 10	0,481	0,032
Участок 11	0,280	0,232
Участок 12	–0,206	0,384
Участок 13	0,167	0,481
Участок 14	0,499	0,025

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена; p – его статистическая значимость; анализ для участка 15 не выполнен, так как ни кальций, ни фосфор в нем не присутствовали.

ют таковым для аморфного фосфата кальция, мы считаем, что кальцификат находится в терминальной стадии, т.е. состоит из гидроксиапатита. В пользу этого факта свидетельствует макроскопическая оценка кальцификатов атеросклеротических бляшек (рис. 6).

Обсуждение

Обнаруженная корреляция соотношения Ca/P в центре и на периферии может свидетельствовать о созревании кальцификата от центра к периферии, в то время как убедительной корреляции электронной плотности и соотношения Ca/P в кальцификатах не выявлено. Наличие гидроксиапатита в составе кальцификатов свидетельствует о терминальной стадии их обызвествления и характеризуется соотношением Ca/P, равным 1,67 [10, 11, 15]. Зафиксированное нами минимальное значение составляло 1,92, что соответствует аморфному фосфату кальция (соотношение Ca/P до 2,2 включительно) [10, 16, 17]. Согласно данным литературы, большая часть отложений фосфата кальция (до 85 %) в неинтима является аморфным фосфатом кальция, тогда как на конечную фазу кальцификации – гидроксиапатит – приходится лишь 15 % [6]. Таким образом, можно было бы предположить, что большая часть кальцификатов в нашем исследовании представляет собой незрелый растворимый аморфный фосфат кальция, однако в исследованных образцах мы визуальнo наблюдали массивные кальцификаты, которые морфологически напоминали костную ткань и составляли до 30 % площади атеросклеротической бляшки.

Величины соотношения Ca/P не позволяют отнести входящий в состав кальцификатов фосфат кальция к определенному типу, так как полученные нами значения сильно варьировали и зачастую не совпадали с описанными в литературе. Вероятной причиной отличия величин соотношения Ca/P в исследованных кальцификатах от канонических значений является то, что данные образования в биологических тканях характеризуются существенной долей карбоната в составе фосфата кальция (к примеру, карбонат-гидроксиапатита, который также называется биоапатитом); помимо гидроксиапатита, они также могут содержать ди- и октакальцийфосфат [18–22].

Соотношение Ca/P в кальцификатах также зависит от факторов микроокружения, включая pH, количество и соотношение доступных ионов кальция и фосфора [18–22]. Кроме того, определенную погрешность может вносить напыление эпоксидных блоков углеродом с целью предотвращения их дезинтеграции под электронным лучом, обеспечения электропроводности, отсутствия накопления заряда на образце и повышения качества визуализации. В одной из работ при изучении элементного состава кальцификатов в клапанах сердца детектировали разные соотношения Ca/P, однако в большинстве случаев они соответствовали соотношению, свойственному

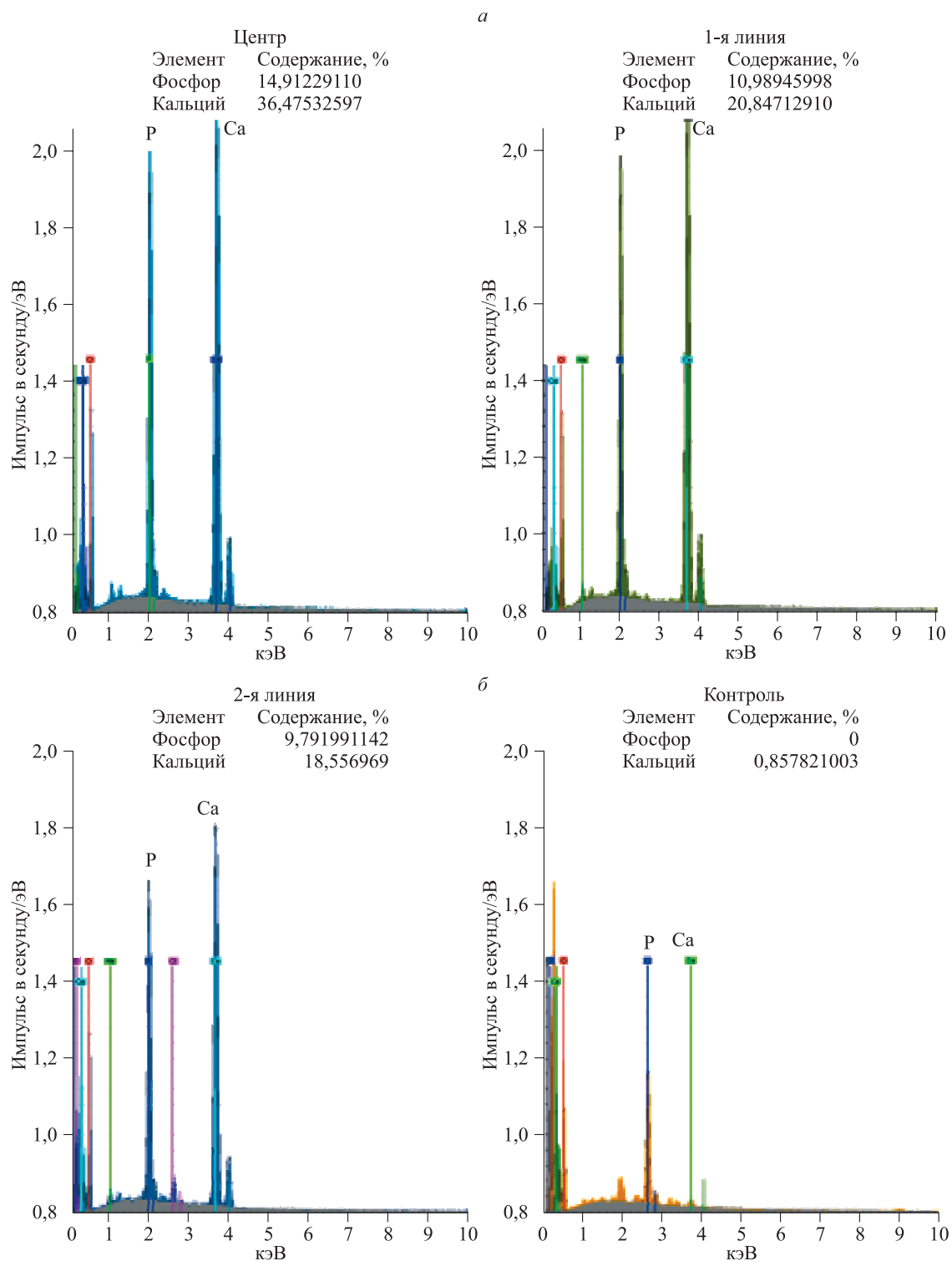


Рис. 4. Различное соотношение Ca/P внутри одного кальцификата в зависимости от удаленности от его центра

Fig. 4. Different calcium to phosphate content ratio from the center to the periphery of the calcium deposit

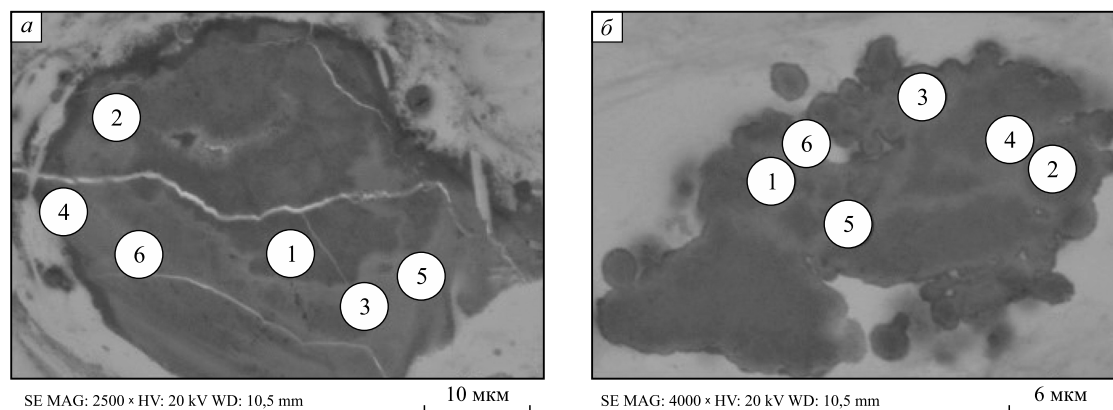


Рис. 5. Участки кальциевого депозита атеросклеротической бляшки с высокой (1, 2, 3, темные участки) и низкой (4, 5, 6, светлые участки) электронной плотностью; а – ув. $\times 2500$, б – ув. $\times 4000$

Fig. 5. Areas of high (1, 2, 3, dark areas) and low electron density (4, 5, 6, light areas) within the atherosclerotic calcium deposit; а – magnification $\times 2500$, б – $\times 4000$

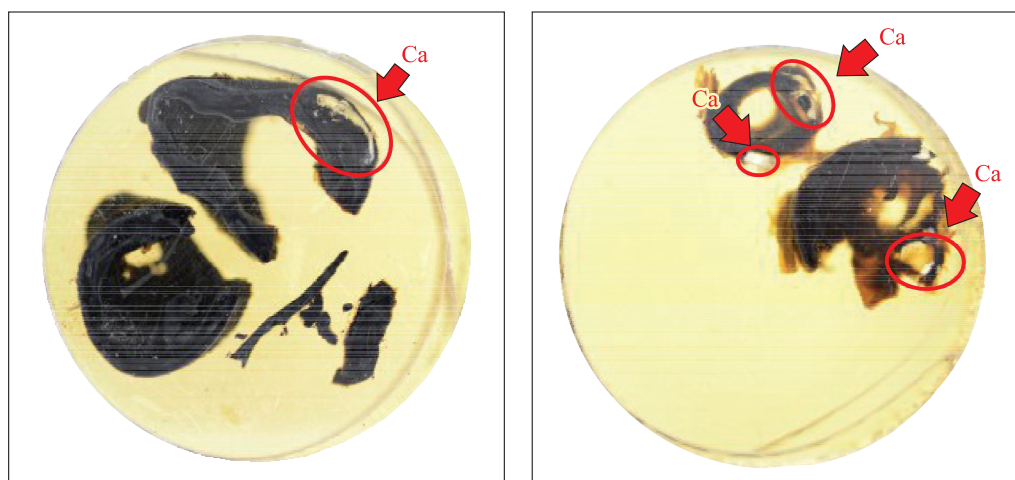


Рис. 6. Кальцинированные атеросклеротические бляшки, заключенные в эпоксидную смолу
Fig. 6. Calcified atherosclerotic plaques embedded into the epoxy resin

гидроксиапатиту (соотношение Ca/P 1,5–1,7) [15]. Однако в данном исследовании элементный анализ проводился после сжигания биологического материала, тогда как в нашем случае элементный анализ проводился на отдельных кальцификатах в составе атеросклеротической бляшки с большим содержанием органического компонента.

Закключение

Результаты корреляционного анализа соотношения Ca/P в радиально расположенных участках атеросклеротических кальцификатов подтвердили гипотезу о постепенной химической трансформации фосфата кальция в этих очагах минерализации от центра к периферии. Предположение о слиянии небольших очагов кальцификации в один крупный не подтвердилось. Хотя соотноше-

ние Ca/P в кальцификатах неоинтимы бляшек и не соответствовало характерному для гидроксиапатита, это может быть объяснимо большим содержанием органического компонента и особенностями биоапатита в образцах.

Список литературы / References

1. Shi X., Gao J., Lv Q., Cai H., Wang F., Ye R., Liu X. Calcification in atherosclerotic plaque vulnerability: Friend or foe? *Front. Physiol.* 2020; 11: 56. doi: 10.3389/fphys.2020.00056
2. Kelly-Arnold A., Maldonado N., Laudier D., Aikawa E., Cardoso L., Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (26): 10741–10746. doi: 10.1073/pnas.1308814110

3. Petsophonsakul P., Furmanik M., Forsythe R., Dweck M., Schurink G.W., Natour E., Reutelingsperger C., Jacobs M., Mees B., Schurgers L. Role of vascular smooth muscle cell phenotypic switching and calcification in aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019; 39 (7): 1351–1368. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312787
4. Vengrenyuk Y., Carlier S., Xanthos S., Cardoso L., Ganatos P., Virmani R., Einav S., Gilchrist L., Weinbaum S. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103 (40): 14678–14683. doi: 10.1073/pnas.0606310103
5. Zhan Y., Zhang Y., Hou J., Lin G., Yu B. Relation between superficial calcifications and plaque rupture: An optical coherence tomography study. *Can. J. Cardiol.* 2017; 33 (8): 991–997. doi: 10.1016/j.cjca.2017.05.003
6. Akers E.J., Nicholls S.J., di Bartolo B.A. Plaque calcification: Do lipoproteins have a role? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019; 39 (10): 1902–1910. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.311574
7. Otsuka F., Sakakura K., Yahagi K., Joner M., Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34 (4): 724–736. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302642
8. Bäck M., Aranyi T., Cancela M.L., Carracedo M., Conceição N., Leftheriotis G., Macrae V., Martin L., Nitschke Y., Pasch A., Quagliano D., Rutsch F., Shanahan C., Sorribas V., Szeri F., Valdivielso P., Vanacker O., Kempf H. Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: A consensus statement from the COST action EuroSoftCalcNet. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 5: 196. doi: 10.3389/fcvm.2018.00196
9. Roijers R.B., Debernardi N., Cleutjens J.P., Schurgers L.J., Mutsaers P.H., van der Vusse G.J. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am. J. Pathol.* 2011; 178 (6): 2879–2887. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.004
10. Carino A., Ludwig C., Cervellino A., Müller E., Testino A. Formation and transformation of calcium phosphate phases under biologically relevant conditions: Experiments and modelling. *Acta Biomater.* 2018; 74: 478–488. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.027
11. Chen J., Peacock J.R., Branch J., Merryman W.D. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J. Biomech. Eng.* 2015; 137 (2): 020903. doi: 10.1115/1.4029115
12. Hutcheson J.D., Goettsch C., Bertazzo S., Maldonado N., Ruiz J.L., Goh W., Yabusaki K., Faits T., Bouten C., Franck G., Quillard T., Libby P., Aikawa M., Weinbaum S., Aikawa E. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat. Mater.* 2016; 15 (3): 335–343. doi: 10.1038/nmat4519
13. Burgmaier M., Milzi A., Dettori R., Burgmaier K., Marx N., Reith S. Co-localization of plaque macrophages with calcification is associated with a more vulnerable plaque phenotype and a greater calcification burden in coronary target segments as determined by OCT. *PLoS One.* 2018; 13 (10): e0205984. doi: 10.1371/journal.pone.0205984
14. Fuery M.A., Liang L., Kaplan F.S., Mohler E.R. 3rd. Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone.* 2018; 109: 28–34. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.006
15. Pettenazzo E., Deiwick M., Thiene G., Molin G., Glasmacher B., Martignago F., Bottio T., Reul H., Valente M. Dynamic *in vitro* calcification of bioprosthetic porcine valves evidence of apatite crystallization. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001; 121 (3): 500–509. doi: 10.1067/mtc.2001.112464
16. Murungi J.I., Thiam S., Tracy R.E., Robinson J.W., Warner I.M. Elemental analysis of soft plaque and calcified plaque deposits from human coronary arteries and aorta. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2004; 39 (6): 1487–1496. doi: 10.1081/ese-120037848
17. Balachandran K., Sucusky P., Jo H., Yogananthan A.P. Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenic protein-dependent manner. *Am. J. Pathol.* 2010; 177 (1): 49–57. doi: 10.2353/ajpath.2010.090631
18. Mikroulis D., Mavrilas D., Kapelos J., Koutsoukos P.G., Lolas C. Physicochemical and microscopical study of calcific deposits from natural and bioprosthetic heart valves. Comparison and implications for mineralization mechanism. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2002; 13 (9): 885–889. doi: 10.1023/a:1016556514203
19. Cheng C.L., Chang H.H., Huang P.J., Wang W.C., Lin S.Y. *Ex vivo* assessment of valve thickness/ calcification of patients with calcific aortic stenosis in relation to *in vivo* clinical outcomes. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2017; 74: 324–332. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.06.020
20. Cottignoli V., Relucenti M., Agrosi G., Cavarretta E., Familiari G., Salvador L., Maras A. Biological niches within human calcified aortic valves: towards understanding of the pathological biomineralization process. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 542687. doi: 10.1155/2015/542687
21. Mangialardo S., Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L., Postorino P., Maras A. Pathological biominerals: raman and infrared studies of bioapatite deposits in human heart valves. *Appl. Spectrosc.* 2012; 66 (10): 1121–1127. doi: 10.1366/12-06606
22. Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L., Valfré C., Maras A. Morphological and chemical study of pathological deposits in human aortic and mitral valve stenosis: a biomineralogical contribution. *Patholog. Res. Int.* 2015; 2015: 342984. doi: 10.1155/2015/342984

Сведения об авторах:

Лев Александрович Богданов, ORCID: 0000-0003-4124-2316, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Николай Юрьевич Осяев, ORCID: 0000-0002-5186-7873, e-mail: osyaev.nikolai@mail.ru

Виктория Евгеньевна Маркова, ORCID: 0000-0002-5959-1699, e-mail: kokorosakura@mail.ru

Ринат Авхадиевич Мухамадияров, к.б.н., ORCID: 0000-0002-5558-3229, e-mail: rem57@rambler.ru

Амин Рашитович Шабаров, ORCID: 0000-0002-9734-8462, e-mail: shabar@kemcardio.ru

Антон Геннадьевич Кутихин, к.м.н., ORCID: 0000-0001-8679-4857, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Information about the authors:

Leo A. Bogdanov, ORCID: 0000-0003-4124-2316, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Nikolay Yu. Osyayev, ORCID: 0000-0002-5186-7873, e-mail: osyaev.nikolai@mail.ru

Victoria E. Markova, ORCID: 0000-0002-5959-1699, e-mail: kokorosakura@mail.ru

Rinat A. Mukhamadiyarov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-5558-3229,
e-mail: rem57@rambler.ru

Amin R. Shabaev, ORCID: 0000-0002-9734-8462, e-mail: shabar@kemcardio.ru

Anton G. Kutikhin, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-8679-4857,
e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2020

После доработки 03.09.2020

Принята к публикации 05.10.2020

Received 11.08.2020

Revision received 03.09.2020

Accepted 05.10.2020