



УДК 616.13.002.2-004.6

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33

АНАЛИЗ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ СЦЕНАРИЕВ ФОРМИРОВАНИЯ ОЧАГОВ КАЛЬЦИФИКАЦИИ В ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КЛАПАНАХ СЕРДЦА И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ

Л.А. Богданов¹, Н.Ю. Осяев¹, Ю.Д. Богданова², Р.А. Мухамадияров¹, А.Р. Шабаев¹,
А.В. Евтушенко¹, А.Г. Кутихин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет», ул. Красная, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650000

Основные положения

• На данный момент процесс морфологического развития кальцификата в литературе почти не описан. Расшифровка механизма морфологического роста кальцификата в атеросклеротической бляшке и створке аортального клапана позволит унифицировать фармакотерапию, направленную на ингибирование кальцификации элементов сердечно-сосудистой системы.

Цель

Проанализировать топографические сценарии формирования кальцификатов в дисфункциональных аортальных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках.

Материалы и методы

Дисфункциональные аортальные клапаны сердца ($n = 18$) и атеросклеротические бляшки ($n = 20$) фиксировали в формалине, постфиксировали в 1% тетраоксиде осмия, последовательно окрашивали 2% тетраоксидом осмия и 2% уранилацетатом и заключали в эпоксидную смолу Епон с последующей шлифовкой и полировкой сформованных блоков. После контрастирования цитратом свинца и напыления углеродом проводили визуализацию образцов методом сканирующей электронной микроскопии в обратно рассеянных электронах и элементный анализ кальцификатов методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Измерение соотношения Са/Р в кальцификатах аортальных клапанов и бляшек произведено по схеме «бильярдного стола» в центре кальцификата и часовой стрелке в ближней и дальней окружностях, а также в контрольных участках возле и вдали от кальцификата. Топографические сценарии формирования кальцификатов моделировали при помощи корреляционного анализа.

Результаты

Выявлена значимая корреляция соотношения Са/Р в центре кальцификата с таковой в ближней и дальней окружностях как в клапанных ($r = 0,35-0,78$ в ближней окружности; $r = 0,63-0,69$ в дальней окружности), так и атеросклеротических ($r = 0,37-0,56$ в ближней окружности; $r = 0,48-0,63$ в дальней окружности) кальцификатах, что свидетельствует об иерархическом принципе формирования очагов кальцификации.

Заключение

Кальцификация в кальцинированных аортальных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках развивается по концентрическому принципу (от центра к периферии).

Ключевые слова

Атеросклероз • Кальцинирующий аортальный стеноз • Минерализация • Кальцификация • Элементный анализ • Фосфат кальция

Поступила в редакцию: 29.05.2021; поступила после доработки: 04.06.2021; принята к печати: 21.07.2021

ELEMENTAL ANALYSIS OF VALVULAR AND ATHEROSCLEROTIC CALCIFICATION

L.A. Bogdanov¹, N.Yu. Osyayev¹, Yu.D. Bogdanova², R.A. Mukhamadiyarov¹, A.R. Shabaev¹,
A.V. Evtushenko¹, A.G. Kutikhin¹

Для корреспонденции: Лев Александрович Богданов, bogdanovleone@gmail.com; адрес: Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Leo A. Bogdanov, bogdanovleone@gmail.com; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

¹ Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State University”, 6, Krasnaya St., Kemerovo, Russian Federation, 650000

Highlights

- The lack of scientific data hinders understanding of morphological patterns of calcification. Deciphering the mechanism of morphological growth of calcification in the atherosclerotic plaque and the aortic valve leaflet will allow clinicians to advance the development of unified therapy aimed at successful treatment of calcifications of the cardiovascular system.

Aim	To analyze the topographic patterns of valvular and atherosclerotic calcification growth.
Methods	Dysfunctional aortic valves (n = 18) and atherosclerotic plaques (n = 20) were fixed in formalin, postfixed in 1% osmium tetroxide, consecutively stained by 2% osmium tetroxide and 2% uranyl acetate, and embedded into epoxy resin (Epon) with the further grinding and polishing of the samples. Upon the counterstaining by lead citrate and sputter coating with carbon, samples were visualized by backscattered scanning electron microscopy. Elemental analysis was conducted via energy-dispersive X-ray spectroscopy. Measurement of Ca/P ratio within the mineral deposits was carried out employing a pool table principle (i.e., in the center of the deposit, in the near and far circumferences (clockwise), and in control regions around the mineral deposit). Topographic patterns of calcifications were modeled using the correlation analysis.
Results	Significant correlation was revealed between the Ca/P ratio in the deposit center and in the near and far circumferences of deposit in both in valvular (r = 0,35–0,78 – near circumference; r = 0,63–0,69 – far circumference) and atherosclerotic mineral deposits (r = 0,37–0,56 – near circumference; r = 0,48–0,63 – far circumference), suggesting the hierarchical growth of cardiovascular calcification around the initial nucleation sites.
Conclusion	Valvular and atherosclerotic calcifications development is concentric.
Keywords	Atherosclerosis • Calcific aortic stenosis • Mineralization • Calcification • Elemental analysis • Calcium phosphate

Received: 29.05.2021; received in revised form: 04.06.2021; accepted: 21.07.2021

Введение

Патологические механизмы минерализации элементов сердечно-сосудистой системы гетерогенны и представляют собой предмет дискуссий на протяжении последних десятилетий. К примеру, макрокальцификация (более 100 мкм) неоинтимы играет положительную роль, сдерживая прогрессирование атеросклеротической бляшки [1], микрокальцификация (от 5 до 100 мкм) неоинтимы, напротив, нарушает целостность фиброзной покрышки и способствует нестабильности бляшки [1–3], а кальцификация меди в любом ее проявлении играет отрицательную роль, критически нарушая способность артерий реагировать на изменения артериального давления и приводя к их механической недостаточности [4]. В то же время кальцификация клапанов сердца носит сугубо негативный характер, препятствуя физиологическим движениям их створок и вызывая развитие аортального стеноза, как следствие приводящего к хронической сердечной недостаточности [5–7].

На протяжении долгого времени считалось, что патологическая минерализация сердечно-сосудистой

системы является пассивным дегенеративным процессом, однако последние исследования доказали обратное, при этом эктопическая кальцификация в сосудах и клапанах сердца протекает аналогично ортопической оссификации в костной ткани [8, 9]. В ходе онтогенетического остеогенеза матриксные везикулы отделяются от плазматической мембраны остеобластов/osteocитов и могут служить центрами нуклеации гидроксиапатита [10]. Матриксные везикулы сосудистых гладкомышечных клеток с остеохондрогенной дифференцировкой содержат кальций-связывающие аннексины A2, A5, A6 [11], а также щелочную фосфатазу, которая участвует в разложении пирофосфата, выступающего в роли ингибитора минерализации, и приводит к генерации свободных фосфат-анионов [7]. Ультраструктурные исследования продемонстрировали в стенке патологических сосудов и клапанов сердца матриксные везикулы, содержащие гидроксиапатит, что позволяет предположить их участие в формировании очага кальцификации [7, 12, 13].

Образующийся в результате действия щелочной фосфатазы неорганический фосфат активно

поглощается интерстициальными клетками клапанов через натрий-зависимый переносчик фосфатов Pit-1, после чего от клеток отделяются кальцифицирующиеся матриксные везикулы [14]. Сосудистые гладкомышечные клетки также играют ключевую роль в иницировании и регулировании кальцификации сосудов, выделяя при остеохондрогенной дифференцировке кальцифицирующиеся матриксные везикулы и экспрессируя специфические кальций-связывающие белки, синтез которых в норме ограничен костной тканью [15–17]. Остеохондрогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток в нормальных физиологических условиях не происходит в результате регулирующего действия тканевых ингибиторов минерализации матриксного Gla-белка (MGP), Gla-богатого белка (GRP) и фетуина-А, связывающих избыточные ионы кальция и фосфора в микроокружении сосудистых гладкомышечных клеток [18]. Справедливым является и обратное утверждение – уровень внеклеточного кальция и фосфора ассоциирован с кальцификацией сосудов [19, 20].

Механизм химической трансформации фосфата кальция при формировании кальцификата *in vivo* изучен достаточно хорошо [21, 22], тогда как процесс морфологического развития кальцификата в литературе почти не описан. На данный момент имеются две основные теории: концентрическая (рост кальцификата из центра к периферии с выраженной корреляцией отношения содержания кальция к содержанию фосфора (Ca/P) от центра к периферии) [21, 22] и мультицентричная (множественные очаги кальцификации сливаются друг с другом, образуя единый кальцификат с неоднородным соотношением Ca/P в различных участках, неравномерно распределенных по всей площади кальцификата) [23–25].

Цель исследования – проанализировать релевантность каждой из представленных гипотез происходящему в нативных кальцинированных аортальных клапанах и атеросклеротических бляшках сценарию, используя элементный анализ и расчет соотношения кальция к фосфору в репрезентативных кальцификатах и их участках.

Материалы и методы

Получены нативные створки аортального клапана сердца ($n = 18$), удаленные при их протезировании по причине аортального стеноза или недостаточности, и атеросклеротические бляшки ($n = 20$), удаленные в ходе каротидной эндартерэктомии из-за гемодинамически значимого стеноза. Оба вида операций проведены в НИИ КПССЗ (Кемерово, Россия). До включения в исследование от всех пациентов получено письменное информированное согласие, протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (№ ЛФАА-ЛБ-3 от 25.06.2019).

Эксплантированные створки аортального клапана и бляшки были промыты в физиологическом растворе и перенесены в забуференный 10% формалин (рН 7,4) (B06-003, ООО «БиоВитрум», Россия) для фиксации на 24 ч с однократной сменой формалина через первые 2 ч. На следующем этапе образцы постфиксировали в 1% тетраоксиде осмия (OsO₄, 19110, Electron Microscopy Sciences, США), приготовленном на 0,1М фосфатном буфере, в течение 12 ч и далее окрашивали 2% водным раствором тетраоксида осмия в течение 48 ч. На следующем этапе биоптаты обезживали в этаноле возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80, 95%, по две 15-минутных смены в каждой из указанных концентраций). Далее биоптаты докрашивали 2% спиртовым раствором уранилацетата (22400-2, Electron Microscopy Sciences) в течение 5 ч, обезживали в изопропанол (06-002, ООО «БиоВитрум») в течение 5 ч и ацетоне (150495, АО «ЛенРеактив», Россия) в течение часа.

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 °С в течение 24 ч. Получившиеся эпоксидные блоки шлифовали до поверхности образца и полировали на установке TegraPol-11 (Struers, Дания) 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 отмытки в бидистиллированной воде на блоки наносили углеродное напыление толщиной в 10–15 нм с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica, Австрия).

Визуализацию образцов производили методом сканирующей электронной микроскопии (Hitachi S-3400N, Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP (обратно рассеянных электронов) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Элементный анализ кальцификатов выполняли при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (XFlash 4010, Bruker, США). Анализ проводился также в режиме обратно рассеянных электронов в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Корреляционный анализ производили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Корреляцию считали значимой при значении коэффициента корреляции $r \geq 0,4$ и $p \leq 0,05$.

Результаты

При электронно-микроскопическом анализе выявлена массивная кальцификация как дисфункциональных аортальных клапанов, так и атеросклеротических бляшек. Особенностью кальцификации клапанов были множественные макрокальцификаты, распределенные по всей створке клапана (рис. 1, *a*), в то время как в подавляющем большинстве атеросклеротических бляшек отмечены лишь один или несколько крупных очагов кальцификации (рис. 1, *b*).

С целью определения механизма роста кальцификата в клапанах и бляшках измеряли элементный состав различных зон репрезентативных кальцификатов по схеме «бильярдного стола» (рис. 2). Соотношение Ca/P в различных участках кальцификатов аортального клапана варьировало от 1,85 до 3,43 по сравнению с кальцификатами бляшек, где наблюдали значения от 1,92 до 3,08. По результатам корреляционного анализа полученных данных в очагах и клапанной (рис. 3), и атеросклеротической

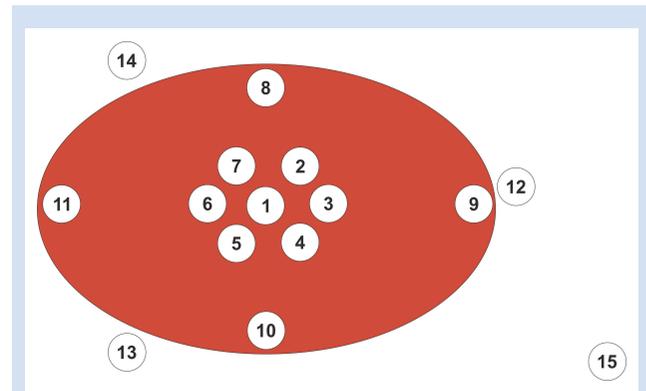


Рисунок 2. Схема проведения элементного анализа внутри одного кальцификата по типу «бильярдного стола»: 1–11 – участки внутри кальцификата (2–7 – ближняя окружность, 8–11 – дальняя окружность), 12–14 – контрольные участки вокруг кальцификата, 15 – контрольный участок вдали от кальцификата

Figure 2. Scheme of elemental analysis employing “pool table principal”. 1–11, regions within the mineral deposit (2–7, near circumference; 8–11, far circumference); 12–14, control regions around the mineral deposit; 15, a control region aside the mineral deposit

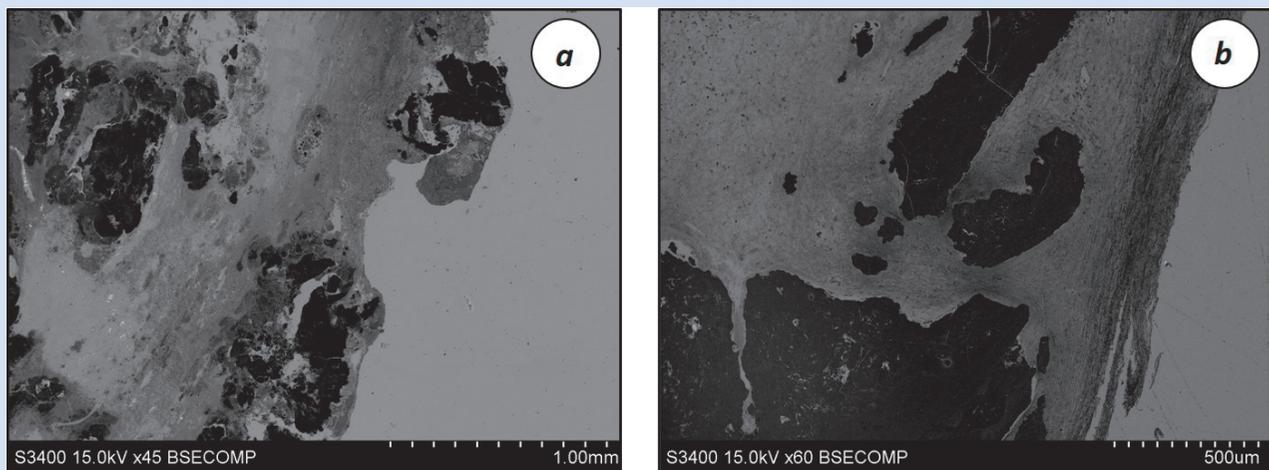


Рисунок 1. Кальцификаты: в составе кальцинированного аортального клапана, ув. $\times 45$ (*a*); в составе атеросклеротической бляшки, ув. $\times 42$ (*b*)

Figure 1. Calcifications in: (a) dysfunctional aortic valve, magnification 45 \times ; (b) atherosclerotic plaque, magnification 42 \times

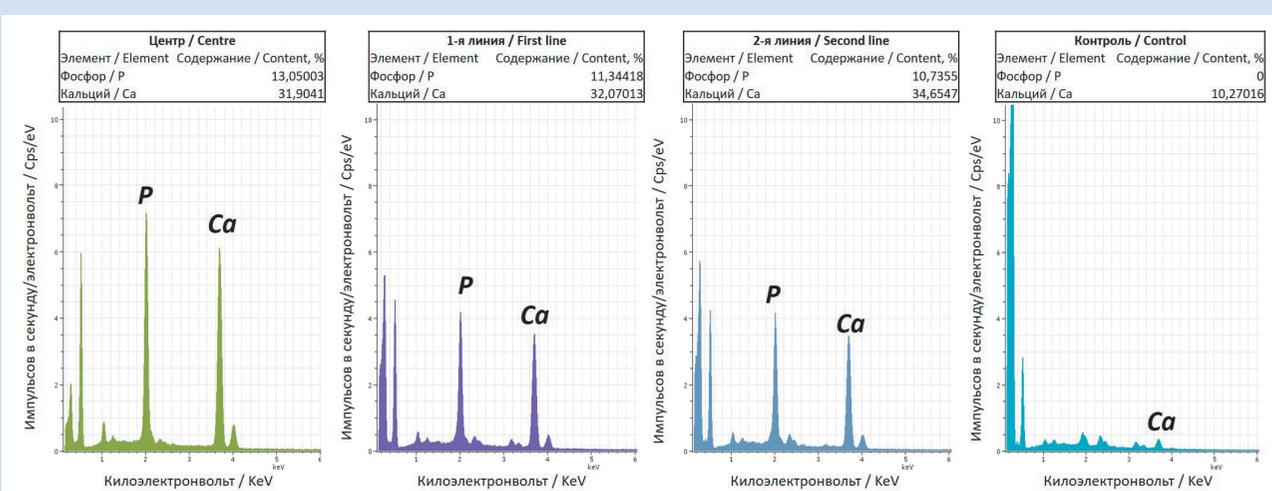


Рисунок 3. Репрезентативное соотношение Ca/P в центре, ближней и дальней окружностях клапанного кальцификата, а также контрольном участке возле кальцификата

Figure 3. Representative Ca/P ratio in the center, near circumference, and far circumference of the valvular calcification and adjacent control region

минерализации (рис. 4) выявлено увеличение соотношения Ca/P по мере удаления от центра кальцификата, свидетельствующее о меньшей зрелости фосфата кальция в периферических зонах. Соотношение Ca/P в центре клапанных кальцификатов коррелировало с таковым в участках ближней ($r = 0,35-0,78$) и дальней ($r = 0,63-0,69$) окружностей (таблица) и было выше, чем в атеросклеротических бляшках ($r = 0,37-0,56$, центр и ближняя окружность; $r = 0,48-0,63$, центр и дальняя окружность) (см. таблицу). Таким образом, созревание минерала от центра к периферии более выражено в клапанных кальцификатах по сравнению с атеросклеротическими, где оно протекает более равномерно. Кроме того, контрольные участки 12, 13 и 14 (см. рис. 2) в непосредственной близости к

кальцификату и в аортальном клапане (см. рис. 3), и в бляшке (см. рис. 4) содержали исключительно кальций, а не фосфор.

Обсуждение

Согласно данным литературы, терминальной стадией кальцификации является гидроксиапатит с соотношением Ca/P, равным 1,67 [26], однако кальцификаты 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 дикальций фосфат и октакальций фосфат [27–30]. По этой причине метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии не позволяет идентифицировать

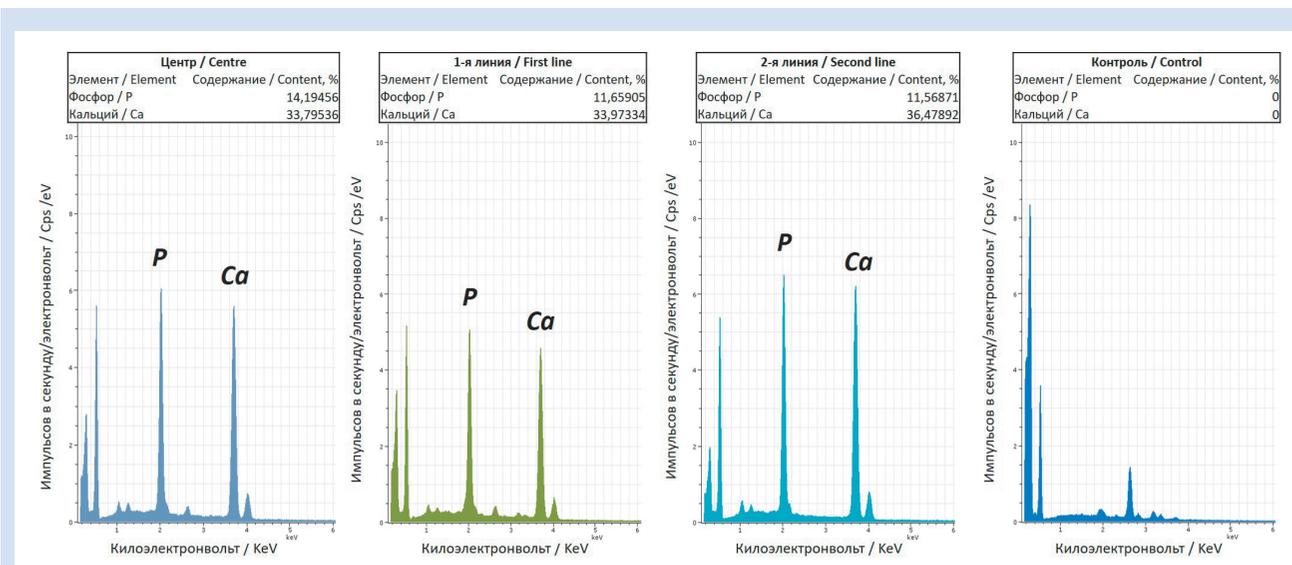


Рисунок 4. Репрезентативное соотношение Ca/P в центре, ближней и дальней окружностях атеросклеротического кальцификата, а также контрольном участке возле кальцификата

Figure 4. Representative Ca/P ratio in the center, near circumference, and far circumference of the atherosclerotic calcification and adjacent control region

Корреляция соотношения Ca/P в центре и различных участках атеросклеротических и клапанных кальцификатов, выбранных по схеме согласно рис. 2

Correlation (Spearman's r) between the Ca/P ratio in the center of valvular calcifications and in hierarchically selected areas at their near circumference (2–7), far circumference (8–11) and control region (12)

Номер участка / Area number	Аортальные клапаны / Aortic valves		Атеросклеротические бляшки / Atherosclerotic plaques	
	коэффициент корреляции Спирмена / Spearman's rank correlation coefficient	p	коэффициент корреляции Спирмена / Spearman's rank correlation coefficient	p
2	0,355	0,148	0,374	0,104
3	0,566	0,014	0,499	0,025
4	0,690	0,002	0,52	0,019
5	0,645	0,004	0,556	0,011
6	0,785	0,001	0,442	0,051
7	0,219	0,383	0,135	0,569
8	0,248	0,321	0,083	0,729
9	0,690	0,002	0,633	0,003
10	0,347	0,158	0,481	0,032
11	0,638	0,004	0,28	0,232
12	-0,079	0,838	-0,206	0,384

точное количество и соотношение Са и Р в биоминералах, а следовательно, достоверно определить в них тип фосфата кальция. Как правило, дифференцировка фаз фосфата кальция осуществляется при помощи рентгеновской порошковой дифрактометрии, однако такой анализ требует предварительного сжигания ткани и поэтому не позволяет провести дифференциальный анализ в различных участках кальцификата [27].

По данным, полученным в ходе элементного анализа различных фаз фосфата кальция во время его созревания, трансформация фосфата кальция до гидроксиапатита происходит за 7–10 дней [25]. Более раннее исследование элементного состава кальцификатов 41 атеросклеротической бляшки с гемодинамически значимым стенозом (>60%) при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии показало, что почти две трети кальцификатов состоят из гидроксиапатита, еще треть – из оксалата кальция [31]. В эксперименте со сжиганием органического компонента биопротезов клапанов сердца и последующим элементным анализом продемонстрировано, что соотношение Са/Р в неорганическом компоненте соответствует гидроксиапатиту [32]. В целом длительность формирования кальцификатов в бляшках позволяет с достаточной долей уверенности предполагать преимущественное преобладание в них терминальной фазы фосфата кальция – гидроксиапатита.

Полученные в представленной работе результаты демонстрируют рост кальцификатов от центра к периферии как в кальцинированных аортальных клапанах сердца, так и атеросклеротических бляшках, что свидетельствует в пользу концентрической, а не мультицентричной теории роста минерала [21, 22]. Безусловно, нельзя исключать того, что в некоторых случаях эктопические кальцификаты в тканях

сердечно-сосудистой системы могут постепенно соединяться в один, однако сильная корреляционная связь соотношения Са/Р от центра к периферии свидетельствует об иерархическом порядке кальцификации вокруг ядер нуклеации, которыми в том числе могут служить секретлируемые сосудистыми гладкомышечными клетками остеохондрогенного фенотипа матриксные везикулы [11].

Заключение

Кальцификация в кальцинированных аортальных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках развивается по концентрическому принципу (от центра к периферии).

Конфликт интересов

Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Н.Ю. Осяев заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.Д. Богданова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Р.А. Мухамадияров заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Р. Шабаев заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Евтушенко заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

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

Информация об авторах

Богданов Лев Александрович, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Осяев Николай Юрьевич, лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5186-7873

Богданова Юлия Дмитриевна, магистрант 2-го курса института биологии, экологии и природных ресурсов федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6607-1544

Author Information Form

Bogdanov Leo A., junior researcher at the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Osyayev Nikolay Yu., MD, research assistant at the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5186-7873

Bogdanova Yulia D., master student, Institute of Biology, Ecology, and Natural Resources, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State University”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6607-1544

Мухамадияров Ринат Ахмедович, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Шаббаев Амин Рашитович, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-9734-8462

Евтушенко Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук заведующий лабораторией пороков сердца отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8475-4667

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Mukhamadiyarov Rinat A., PhD, senior researcher at the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5558-3229

Shabaev Amin R., MD, junior researcher at the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-9734-8462

Evtushenko Aleksey V., Ph.D., Head of the Laboratory of Valvular Heart Disease, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8475-4667

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

БЛА – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ОНО – интерпретация данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

БЮД – интерпретация данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МРА – получение и интерпретация материала, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШАР – получение и интерпретация материала, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЕАВ – получение и интерпретация материала, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

BLA – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

ONYU – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

BYUD – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MRA – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ShAR – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

EAV – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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. 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 U S A.* 2006; 103(40): 14678-83. doi: 10.1073/pnas.0606310103.
3. 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 U S A.* 2013; 110(26): 10741-6. doi: 10.1073/pnas.1308814110.
4. 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.
5. Halevi R., Hamdan A., Marom G., Lavon K., Ben-Zekry S., Raanani E., Haj-Ali R. A New Growth Model for

- Aortic Valve Calcification. *J Biomech Eng.* 2018; 140(10). doi: 10.1115/1.4040338.
6. Lindman B.R., Clavel M.A., Mathieu P., Iung B., Lancellotti P., Otto C.M., Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2: 16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
 7. Di Vito A., Donato A., Presta I., Mancuso T., Brunetti F.S., Mastroberto P., Amorosi A., Malara N., Donato G. Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 202; 22(2): 913. doi: 10.3390/ijms22020913.
 8. Demer L.L., Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(4): 715-23. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302070.
 9. Massera D., Kizer J.R., Dweck M.R. Mechanisms of mitral annular calcification. *Trends Cardiovasc Med.* 2020 Jul;30(5):289-295. doi: 10.1016/j.tcm.2019.07.011
 10. Shroff R.C., McNair R., Skepper J.N., Figg N., Schurgers L.J., Deanfield J., Rees L., Shanahan C.M. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 103–112. doi: 10.1681/ASN.2009060640.
 11. Kapustin A.N., Chatrou M.L., Drozdov I., Zheng Y., Davidson S.M., Soong D., Furmanik M., Sanchis P., De Rosales R.T., Alvarez-Hernandez D., Shroff R., Yin X., Muller K., Skepper J.N., Mayr M., Reutlingsperger C.P., Chester A., Bertazzo S., Schurgers L.J., Shanahan C.M. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015; 116(8): 1312-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
 12. Mayr M., Grainger D., Mayr U., Leroyer A.S., Leseche G., Sidibe A., Herbin O., Yin X., Gomes A., Madhu B., Griffiths J.R., Xu Q., Tedgui A., Boulanger C.M. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 2: 379–388. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.842849.
 13. New S.E., Goettsch C., Aikawa M., Marchini J.F., Shibasaki M., Yabusaki K., Libby P., Shanahan C.M., Croce K., Aikawa E. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013; 113: 72–77. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301036.
 14. Cote N., El Hussein D., Pepin A., Guauque-Olarte S., Ducharme V., Bouchard-Cannon P., Audet A., Fournier D., Gaudreault N., Derbali H., McKee MD, Simard C, Després JP, Pibarot P, Bossé Y., Mathieu P. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52: 1191–202.
 15. Durham A.L., Speer M.Y., Scatena M., Giachelli C.M., Shanahan C.M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 590-600. doi: 10.1093/cvr/cvy010.
 16. Allahverdian S., Chaabane C., Boukais K., Francis G.A., Bochaton-Piallat M.L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114(4): 540-550. doi: 10.1093/cvr/cvy022.
 17. Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol. (Oxf).* 2015; 214(1): 33-50. doi: 10.1111/apha.12466.
 18. Reynolds J.L., Skepper J.N., McNair R., Kasama T., Gupta K., Weissberg P.L., Jahnen-Dechent W., Shanahan C.M. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 2920–2930. doi: 10.1681/ASN.2004100895.
 19. Ambale-Venkatesh B., Yang X., Wu C.O., Liu K., Hundley W.G., McClelland R., Gomes A.S., Folsom A.R., Shea S., Guallar E., Bluemke D.A., Lima J.A.C. Cardiovascular Event Prediction by Machine Learning: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017; 121(9): 1092-1101. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311312.
 20. Foley R.N., Collins A.J., Herzog C.A., Ishani A., Kalra P.A. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(2): 397-404. doi: 10.1681/ASN.2008020141.
 21. Chen J., Peacock J.R., Branch J., David Merryman W. Biophysical analysis of dystrophic and osteogenic models of valvular calcification. *J Biomech Eng* 2015; 137 (2): 020903. DOI: 10.1115/1.4029115.
 22. 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): 335-43. doi: 10.1038/nmat4519.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Lee J.S., Morrisett J.D., Tung C.H. Detection of hydroxyapatite in calcified cardiovascular tissues. *Atherosclerosis.* 2012; 224(2): 340-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.023.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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): 1121-7. doi: 10.1366/12-06606.
 30. 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.
 31. Bischetti S., Scimeca M., Bonanno E., Federici M., Anemona L., Menghini R., Casella S., Cardellini M., Ippoliti A., Mauriello A. Carotid plaque instability is not related to quantity but to elemental composition of calcification. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017; 27(9): 768-774. doi: 10.1016/j.numecd.2017.05.006.
 32. 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): 500-9. doi: 10.1067/mtc.2001.112464.

Для цитирования: Богданов Л.А., Осяев Н.Ю., Богданова Ю.Д., Мухамадияров Р.А., Шаббаев А.Р., Евтушенко А.В., Кутихин А.Г. Анализ топографических сценариев формирования очагов кальцификации в дисфункциональных клапанах сердца и атеросклеротических бляшках. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(3): 26-33. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33

To cite: Bogdanov L.A., Osyayev N.Yu., Bogdanova Yu.D., Mukhamadiyarov R.A., Shabaev A.R., Evtushenko A.V., Kutikhin A.G. Elemental analysis of valvular and atherosclerotic calcification. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(3): 26-33. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-26-33