

Особенности локализации и состав минеральных отложений атеросклеротических бляшек коронарных артерий по данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа

Д. Э. Пухов¹, С. В. Васильев¹, А. С. Зотов², М. В. Ильин³, А. С. Рудый^{1,2}

¹Центр коллективного пользования "Диагностика микро- и наноструктур", Ярославский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технологического института Российской академии наук, Ярославль

²Кафедра микроэлектроники Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова, Ярославль

³Отделение кардиохирургии, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Областная клиническая больница», Ярославль

Абстракт

Цель. *Подробное исследование морфологии, локализации и состава кальцификатов атеросклеротических бляшек коронарных артерий сердца для выявления связи процесса кальцификации с некоторыми ключевыми стадиями атеросклеротического поражения.*

Материалы и методы. *Образцы для исследования – атеросклеротические бляшки, полученные от пяти пациентов во время аортокоронарного шунтирования. Методом сканирующей электронной микроскопии изучена микроморфология и локализация минеральных отложений. Элементный и фазовый состав кальцификатов идентифицирован методами энергодисперсионного и рентгенодифракционного анализа.*

Результаты. *Кальцификация коронарных артерий сопряжена с тремя стадиями (типами) атеросклеротического поражения. Массивные кальцификаты фиброзных участков обладают слоистым или плитчатым сложением, включают относительно большое количество остаточного органического вещества. Минеральные отложения в зрелых атероматозных очагах имеют слитное сложение с минимальным количеством органического углерода. Участки кровоизлияния и тромбообразования также подвержены петрификации с формированием рыхлых депозитов с высоким содержанием органического вещества. Образование скоплений микро- и наноразмерных частиц гидроксипатита является начальной фазой развития обширных кальцификатов в атеросклеротических бляшках. Особенности распределения кальцийсодержащих частиц по размерам свидетельствуют о различных механизмах их формирования внутри бляшек и в области контакта с кровью. В первом случае косвенно подтверждается механизм активного синтеза гидроксипатита с участием мембранных везикул, во втором – формирование минеральных наночастиц вероятнее всего является результатом процесса кристаллизации из раствора.*

Заключение. *Продолжение исследований с помощью применяемых в данной работе методов позволит установить количественную связь между типами или стадиями атеросклеротического поражения коронарных артерий и выраженностью процесса петрификации.*

Ключевые слова: *атеросклеротическая бляшка, кальцификация, гидроксипатит, фиброз, очаги некроза, кровоизлияние, тромбоз.*

Localization habits and composition of mineral deposits in atherosclerotic plaques of coronary arteries according to the scanning electron microscopy and X-ray diffractometry

D.E. Pukhov¹, S.V. Vasilev¹, A.S. Zotov², M.V. Ilin², A.S. Rudy^{1,3}

¹Facilities Sharing Centre "Diagnostics of Micro- and Nanostructures", Yaroslavl Branch of Physics and Technology Institute of Russian Academy of Sciences, Yaroslavl, Russia

²Division of Cardiac Surgery, State Budgetary Health Care Institution of Yaroslavl Region «Re-gional Clinical Hospital», Yaroslavl, Russia

³Department of Microelectronics, P.G. Demidov's Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Abstract

The research objective *is the detailed examination of morphology, localization and composition of calcificats of atherosclerotic plaques for revealing relationship of a calcification process with some key stages of an atherosclerotic lesion.*

Materials and methods. *Samples for examination were the atherosclerotic plaques explanted from five patients during an aortocoronary by-passing. In order to study the micromorphology and localization of mineral deposits, scanning electron microscopy was performed. The element content and the phase composition of calcificats were determined by energy dispersive X-ray microanalyses and X-ray diffractometry.*

Main results. *The calcareous infiltration of coronary arteries is interfaced to three stages/types of an atherosclerotic lesion. Massive calcificats of fibrous fields have stratoze or tile structure, include a lot of residual organic matter. Mineral deposits in the end-stage atheromatosis sites have conjoint structure with a minimum quantity of organic Carboneum. Fields of a hemorrhage and thrombogenesis also are subject to a petrification with formation of quaggy deposits with the high maintenance of organic matter. Formation of clumps of hydroxyapatite micro- and nanoparticles is an initial evolution phase of extensive calcificats in atherosclerotic plaques. Size distribution features of calcified particles testify to differences of mechanisms of their formation within plaques and in the field of contact to blood. In first case the mechanism of active hydroxyapatite synthesis with participation of membranous vesicles has been obliquely proved, in the second to be true - mineral nanoparticles formation most likely is process of a crystallization from solution.*

Conclusion. *Continuation of researches by means of methods applied in this work will allow to explore quantitative relationship between types or stages of an atherosclerotic lesion of coronary arteries and an degree of petrification.*

Keywords: *atherosclerotic plaque, calcification, hydroxyapatite, fibrosis, focus of necrosis, hemorrhage, thrombosis.*

Интерес к атеросклеротическому кальцинозу коронарных артерий определяется следующими обстоятельствами. Во-первых, это – всё большее распространение чувствительных и специфических методов визуализации кальцинозов, в первую очередь многоспиральной компьютерной томографии, электроннолучевой томографии, внутрикоронарных ультразвуковых исследований. Обзоры, выполненные по результатам применения данных методов [1-3], указывают на диагностическую и прогностическую значимость кальциноза коронарных артерий.

Во-вторых, остается спорным вопрос о том, как сказывается петрификация атеросклеротической бляшки на её дальнейшем развитии. С одной стороны, в качестве одного из типов нестабильных бляшек можно выделить дистрофически-некротический тип с деградирующей фиброзной покрывкой и образованием кальцификатов, склонных к прорыву в просвет сосуда или приводящих к стенозу [4-6]. С другой стороны, минерализация вокруг очагов некрозов может приводить к стабилизации бляшки, уменьшению или полному исчезновению некротического ядра, таким образом, являясь защитным механизмом [3, 7, 8]. По всей видимости, конкретный сценарий развития кальцинированной бляшки является строго индивидуальным, определяется множеством трудно учитываемых факторов.

В-третьих, исследования петрификации мягких тканей актуальны и в плане развития фундаментальных знаний о механизмах биоминерализации. По современным представлениям атеросклеротическая кальцификация является сложным контролируемым процессом. По обобщенным данным в регулировании отложения фосфатов кальция участвуют до 30 промоторов и ингибиторов белковой или неорганической природы, мембранно-везикулярные структуры, ряд фенотипически измененных клеток [9-11]. Более подробно кальцификация тканей сердечно-сосудистой системы изучена в экспериментах по подкожной имплантации сердечных клапанов животных и при

исследовании механизмов деградации биопротезных сердечных клапанов.

В работе изложены результаты исследования морфологии, локализации и состава кальцификатов коронарных артерий, направленного на установление связи процесса минерализации с некоторыми характерными стадиями атеросклеротического поражения.

Материалы и методы

В исследование особенностей кальцификации при атеросклерозе вошли пять пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Пациентам выполнялась эндартерэктомия из коронарных артерий с последующим аортокоронарным шунтированием (АКШ).

Два пациента были госпитализированы по поводу хронической ИБС и постинфарктного кардиосклероза (ПИКС), 3 пациента по поводу различных форм острого коронарного синдрома (ОКС). По данным эхокардиографии (ЭхоКГ) у 4 пациентов имелось снижение глобальной сократимости миокарда левого желудочка, что проявлялось снижением фракции выброса (ФВ) по методу Симпсона в диапазоне 33-47%, а клинически – хронической сердечной недостаточностью (ХСН 2А ст.). Только у пациента без инфаркта миокарда в анамнезе зарегистрирована нормальная ФВ по ЭхоКГ. По данным коронароангиографии гемодинамически значимое поражение коронарных артерий выявлено у всех пациентов.

Атеросклеротическая бляшка из коронарных артерий, удаленная во время оперативного вмешательства исследовалась микроморфологически. От момента изъятия атеросклеротической бляшки до момента исследования (0,5-2 суток) материал фиксировали в растворе формальдегида в физиологическом растворе, перед исследованиями отмывали в дистиллированной воде. Подготовка пробы для микроскопии заключалась в получении продольных и поперечных сколов образцов, замороженных в жидком азоте. Количество препаратов

каждой атеросклеротической бляшки составило 8-15 в зависимости от её длины. Изображения получали на двулучевой системе Quanta 3D 2001 (FEI/TEM, Нидерланды). Комплектация микроскопа позволяет получать изображения и проводить элементный анализ в атмосфере паров воды под давлением до 2000 Па. Этот режим предпочтителен для биологических объектов, поскольку не происходит быстрого обезвоживания и деформации образцов, накопления заряда на их поверхности. При получении изображений использовали ускоряющие напряжения 5, 10 и 25 кВ.

Минеральные отложения кальция и фосфора выявляли при помощи элементного картирования. Данные микрорентгеноспектрального анализа были получены с помощью энергодисперсионного дрейфового детектора Apollo-X (Ametek Inc., США) при ускоряющем напряжении электронного пучка 25 кВ.

Дифрактограммы получены на рентгеновском дифрактометре ARL X'TRA (Thermo Scientific, Швейцария) при следующих режимах: Cu K_α – излучение; ускоряющие напряжение 30 кВ; ток пучка 30 мА; диапазон по углам 5-10042°; шаг по углу 0,02°. Минерализованные участки отбирали после высушивания образца в вакуумной камере и измельчали до порошкообразного состояния. При идентификации соединений использовалась база данных PDF-2 Международного центра дифракционных данных ICDD (International Centre for Diffraction Data). В качестве внутреннего стандарта в исследуемое вещество добавлялся ультрадисперсный порошок серебра.

Подбор формы распределения кальцифицированных частиц по размерам проводили в программном пакете STATISTICA 7.0.

Результаты и обсуждение

Основными формами петрификации, обнаруженными в образцах № 1, № 2 и № 5, являются отдельные диффузно расположенные сферические частицы, собранные в цепочки и немоналитные группы, обширные рыхлые или слоистые (плитчатые) отложения, или монолитные отложения.

Скопления одиночных сферических частиц могут располагаться и в толще фиброзного утолщения, и вблизи поверхности фиброзной покрышки. Частицы на поверхности покрышки с диаметром от 100 нм до 6 мкм могут быть локализованы как в деградирующих эндотелиальных клетках, так и во внеклеточном матриксе (рис. 1 а, б). В очагах атероматоза среди деградированных коллагеновых волокон и клеточного детрита минеральные частицы наблюдаются, если линейные размеры самого очага воспаления превышают 20-30 мкм (рис. 1 с). Скопления кальцийсодержащих микро- и наночастиц на фиброзной покрышке наблюдаются на её истонченных до 40 мкм участках, под которыми расположены сплошные зоны петрифи-

кации в виде слоистых или плитчатых отложений (рис. 1 d, e). При этом сплошные отложения могут формироваться как в фиброзном утолщении интимы, так и в неутонченных участках. На поперечных сколах препаратов удается проследить и промежуточные фазы кальцинирования от отдельных частиц до массивных слоистых отложений (рис. 1 f-i).

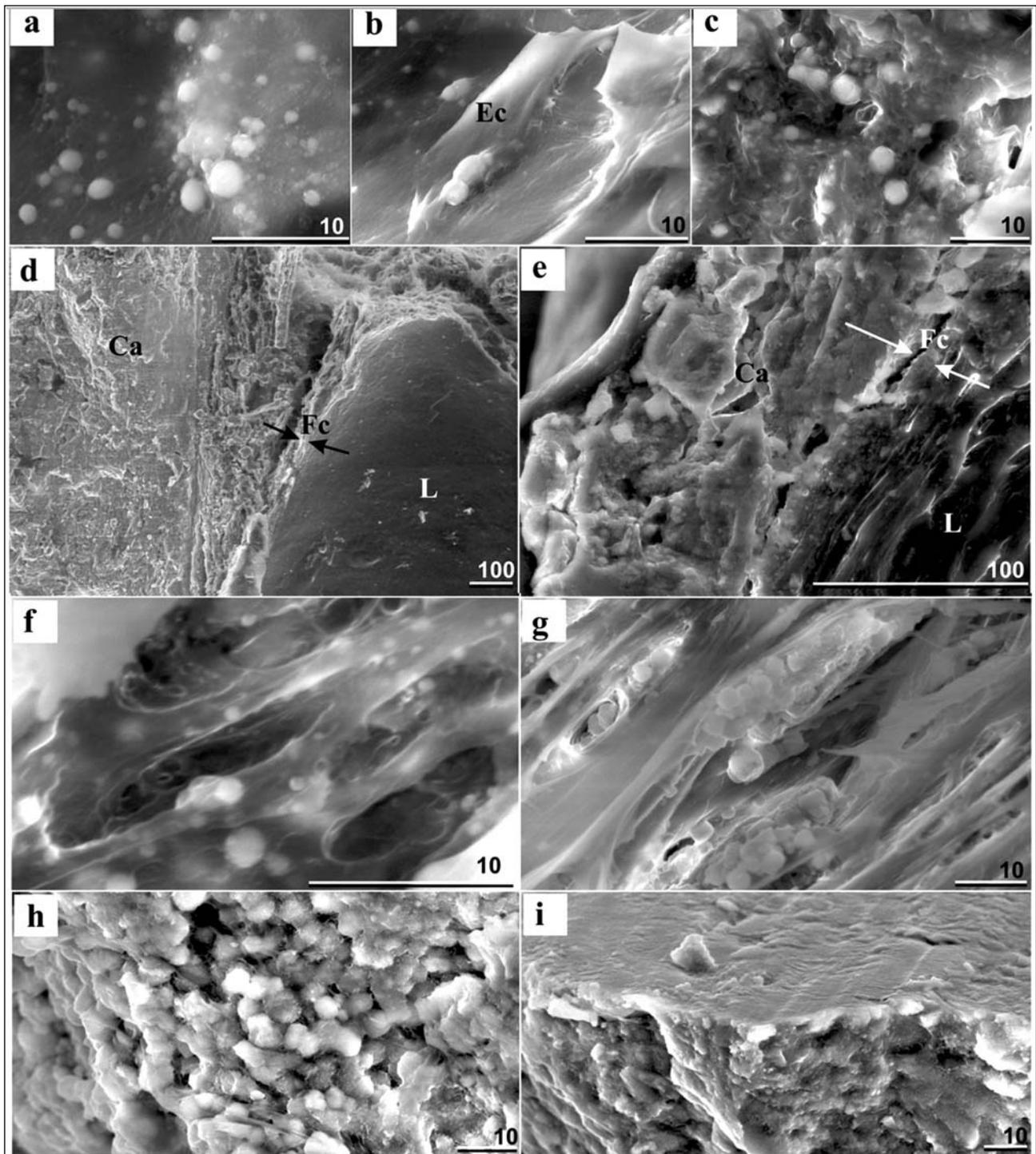
Частицы образуются на поверхности коллагеновых волокон, формируются их скопления, далее происходит уплотнение минеральной части кальцификата, уменьшение доли органической составляющей. Остатки минерализованных органических структур обнаруживаются на сколах кальцинированных отложений в виде полосок и плиток с повышенным содержанием углерода. По-видимому, присутствие упорядоченно расположенных волокон коллагена на начальном этапе образования сплошных отложений и определяет в дальнейшем его слоистое сложение.

Несколько другой морфологией обладают крупные минеральные отложения в атероматозных очагах. Эти кальцификаты всегда расположены в поле кристаллов игольчатой или пластинчатой формы, типичной для кристаллов холестерина, наблюдаемых с помощью электронной сканирующей микроскопии атеросклеротической бляшки [12]. Кальцинированные отложения атероматозных очагов имеют монолитное сложение с достаточно резкой границей, вдоль которой находятся сферические кальцифицированные частицы с диаметром более 500 нм (рис. 2 а, б, с).

Агломераты из таких частиц часто обнаруживаются внутри относительно прозрачного для электронов матрикса (рис. 2 с), элементный состав которого не отличим от состава самих частиц. Отличается и относительное содержание элементов на границе монолитных отложений атероматозных участков и слоистых отложений, сформированных внутри фиброзных областей. Для сравнения качественное распределение элементов краевых зон отложений показано на рисунках 2 d и 2 e. Кальцификаты некротизированных участков характеризуются практически полным отсутствием углерода, в то время как морфологически сходные краевые участки кальцификатов фиброзных участков имеют относительно высокое его содержание.

В образце атеросклеротической бляшки № 5 отмечен тромбированный участок длиной около трёх сантиметров. Переходным к тромбированному является участок с явными признаками некроза в виде областей кристаллизации холестерина по всему периметру артерии. Фиброзная покрышка здесь истончена, не имеет четкого волокнистого строения и проницаема для клеток крови, в том числе для эритроцитов (рис. 3 а). Соседние участки атеросклеротической бляшки с разрушенной покрышкой подверглись массивному кровоизлиянию. На поперечных сколах таких участков по всей толщине вплоть до внешней границы бляшки среди волокон, устойчивых к облучению электронным

Рисунок 1. Различные формы минеральных отложений: сферические частицы на фиброзной покрывке (a, b); сферические частицы в атероматозном очаге (c), сплошные отложения под фиброзной покрывкой (d, e) и переход от отдельных частиц к сплошным отложениям (f – i).



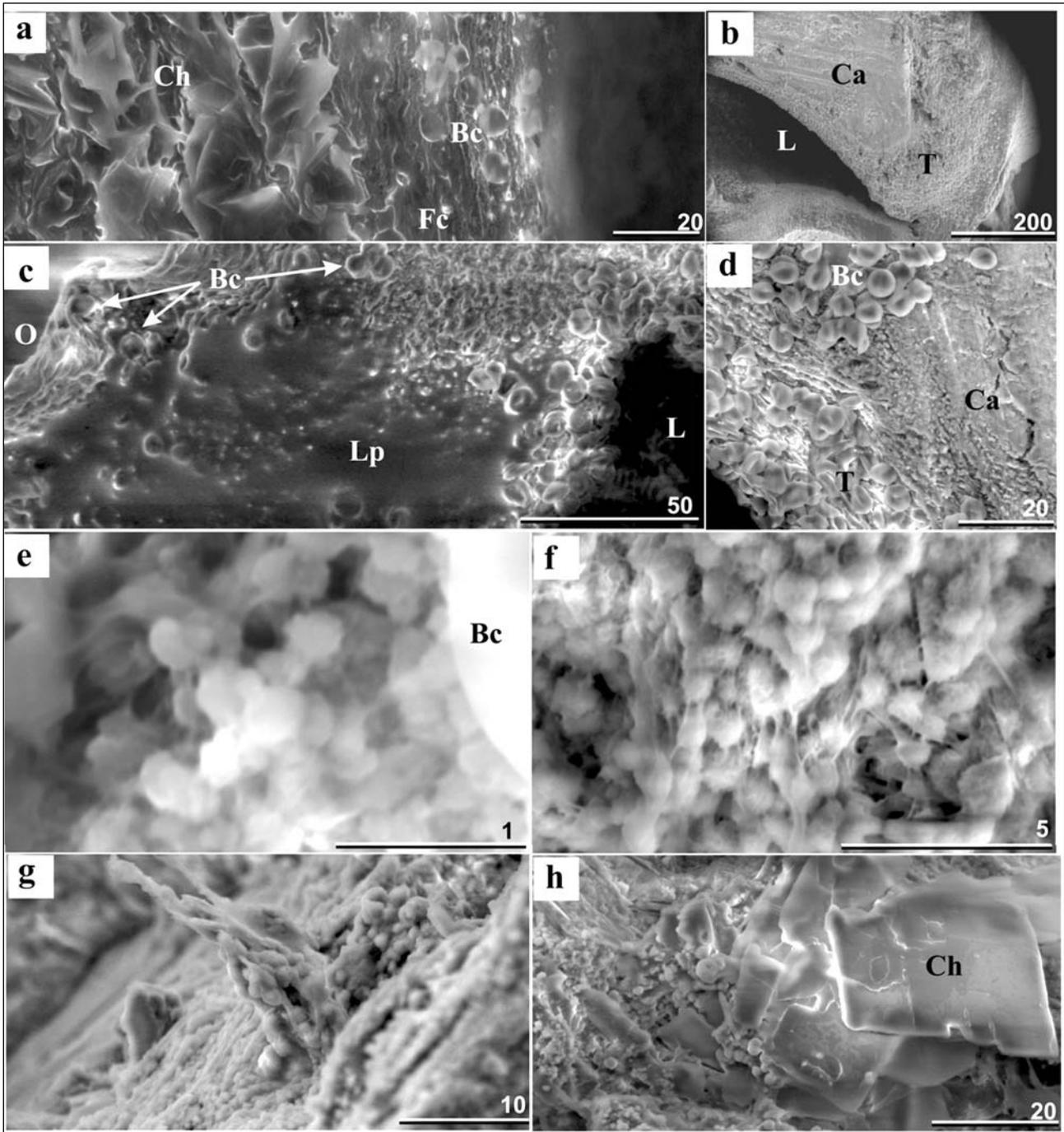
Обозначения: *Ec* – эндотелиальные клетки, *Ca* – кальцификат, *Fc* – фиброзная покрывка; *L* – просвет артерии; длина масштабных отрезков указана в микрометрах.

пучком, обнаруживаются эритроциты (рис. 3 с). Со стороны просвета по всей окружности артерии происходит формирование красного тромба. Очаги тромбообразования отмечены и в областях кровоизлияния внутри атеросклеротической бляшки.

Зоны тромбообразования и кровоизлияния также подвержены кальцификации и образованию в них обширных минерализованных областей

(рис. 3 б). Кальцификаты тромба имеют ряд особенностей. Им свойственно рыхлое сложение, в их толще сохраняются характерные клеточные структуры. Граница кальцификата, обращенная к просвету артерии, сложена сферическими частицами, диаметр отдельных из них не достигает 60 нм (рис. 3 е). Процесс петрификации на границе тромба, по всей видимости, происходит одновре-

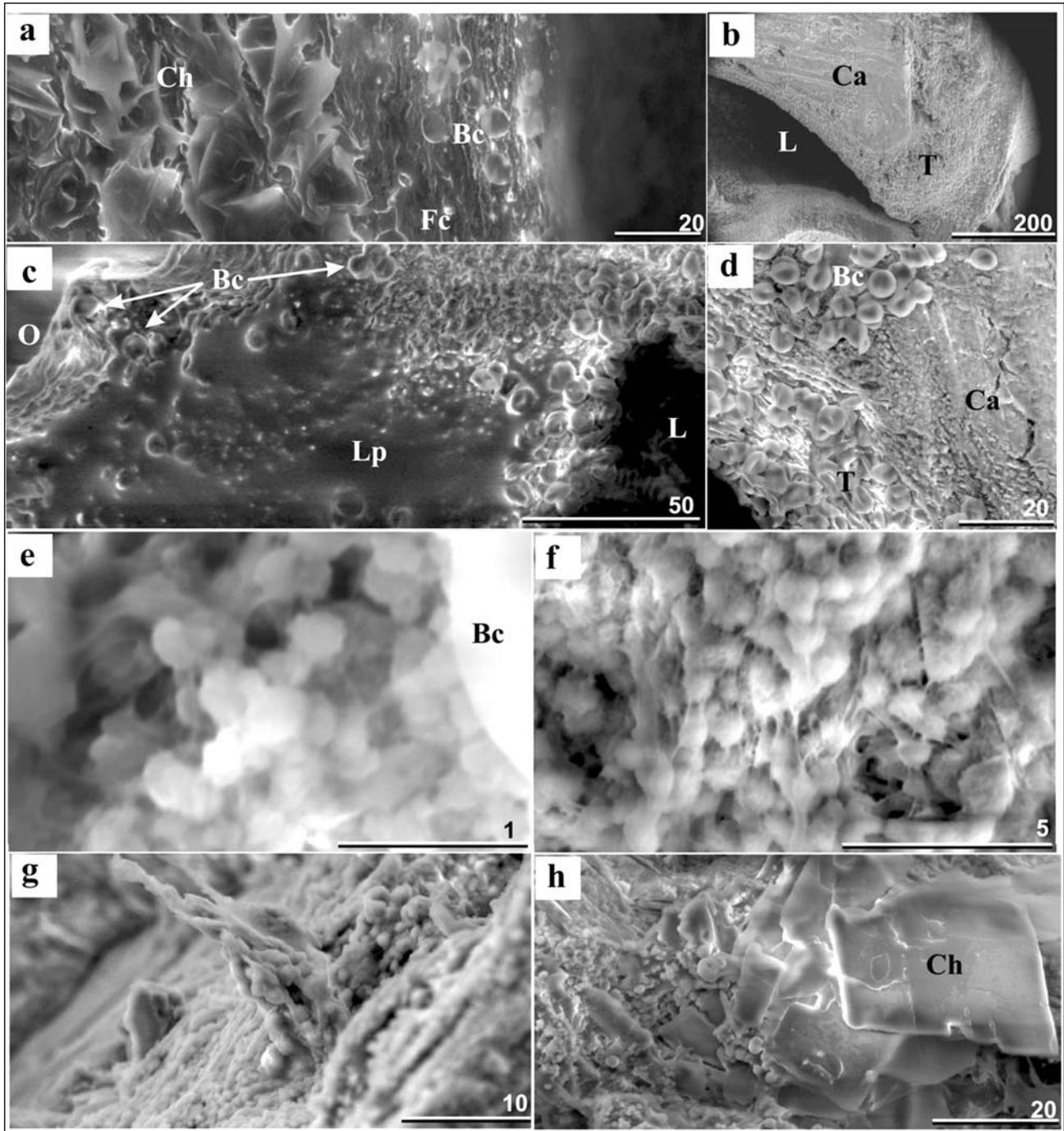
Рисунок 2. Кальцификаты очагов некроза (а–с) и результат картирования по основным элементам краевых зон кальцификатов в очагах некроза (d) и фиброзных участках (e).



Обозначения: Ca – кальцификат, Ch – кристаллы холестерина, N – некротические массы, SE – электронное изображение; длина масштабного отрезка указана в микрометрах.

менно с формированием самого тромба. Об этом свидетельствует то, что наноразмерные кальций-содержащие частицы здесь связаны между собой тонкими органическими волокнами (рис. 3 e, f). В более удаленных от просвета артерии участках отложения кальция основной его структуры являются цепочки минеральных частиц, образующие вздутия внутри частично минерализованных органических волокон (рис. 3 g). К особенностям минерализации тромба можно также отнести то, что кальцификаты

на расстоянии 100-150 мкм от границы содержат крупные включения в виде четко оформленных пластинок, легко разрушающихся под электронным пучком (рис. 3 h). Структуры идентичной морфологии отмечены в фиброзном утолщении атеросклеротической бляшки и охарактеризованы как состоящие из частично кристаллизованного холестерина с примесью полипептидов [12, 13]. В образце №5 жировые пятна отмечены на всех участках очагов кровоизлияний, не подверженных

Рисунок 3. Морфология атеросклеротической бляшки с тромбозом (образец №5).

Обозначения: Bc – эритроциты, Ca – кальцификат, Ch – кристаллы холестерина, Fc – фиброзная покрывка, L – просвет артерии, Lp – отложения липидов; T – тромб; длина масштабного отрезка указана в микрометрах.

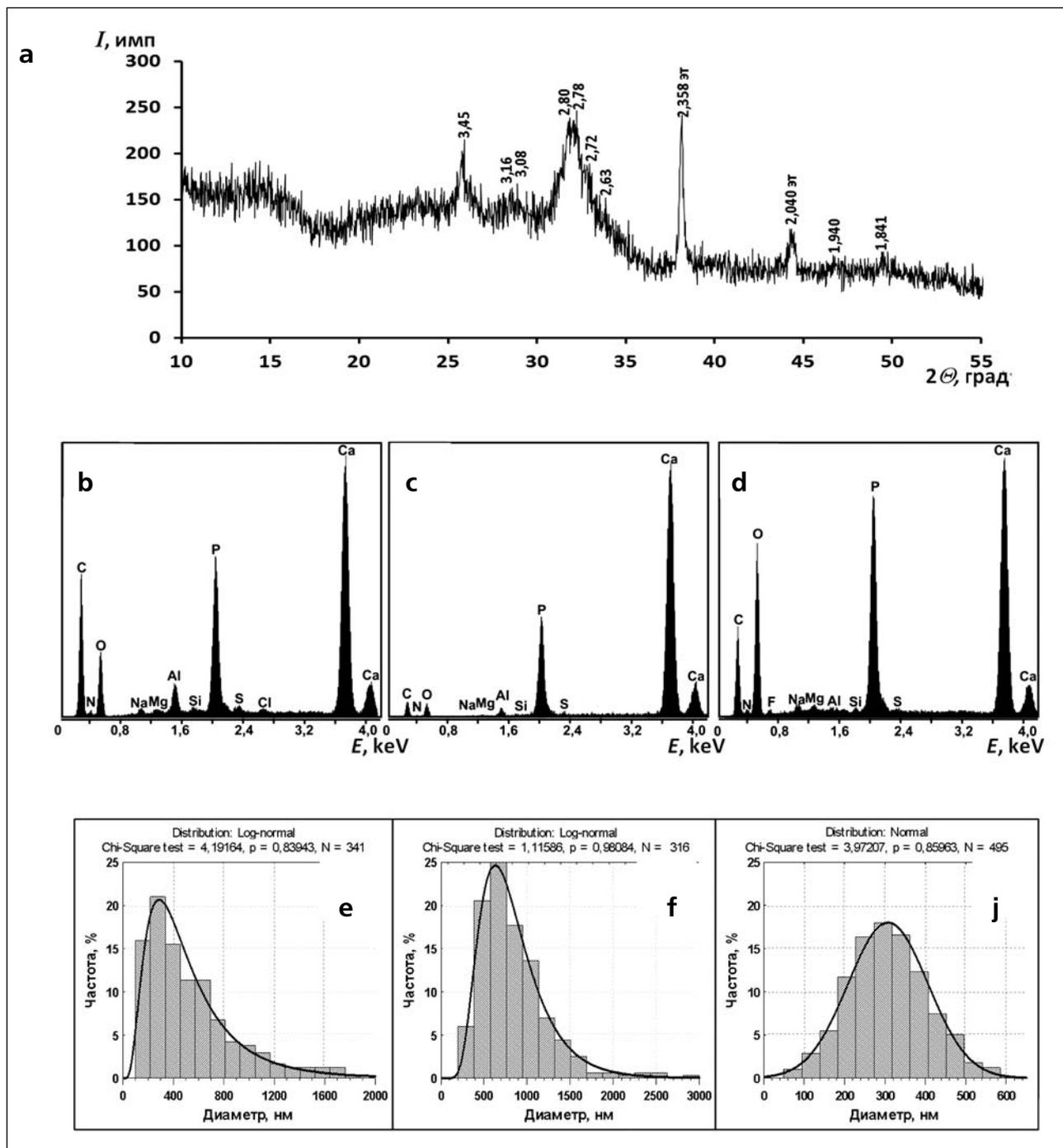
кальцификации. Можно полагать, что отложение липидов и минерализация являются конкурирующими процессами, взаимопроницающими на границе петрификации.

Исследования минерального состава отложений атеросклеротической бляшки показывают, что наиболее часто выявляемой их кристаллической фазой является гидроксипатит, возможно, имеющий замещения карбонатными, хлоридными, фторидными группами, практически не изменяю-

щими параметры кристаллической решетки, а, следовательно, трудно диагностируемыми в составе кристаллизованной структуры минерала [14-16].

Эти исследования касались или кальцификатов в целом или депозитов фиброзных разрастаний атеросклеротической бляшки. Кристаллический состав кальцифицированных участков кровоизлияния и тромбогенеза не уникален (рис. 4 а). Набор дифракционных пиков характерен для гидроксипатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Рефлексы проявляются

Рисунок 4. Рентгенодифрактограмма кальцификата очага кровоизлияния (а) с указанием межплоскостных расстояний в ангстремах; типичные рентгеновские энергодисперсионные спектры кальцификатов фиброзных участков (b), очагов некроза (c), участков тромбообразования (d); распределения сферических частиц гидроксиапатита по размерам в фиброзной покрывке (e), в очагах некроза (f), в пристеночном тромбе (g).



на интенсивном фоне, практически не разрешены пики по кристаллографическим направлениям 410 (1,77 Å) и 402 (1,75 Å). Это свидетельствует о значительной концентрации аморфной фазы. Однако разрешенность двух дифракционных пиков 211 (2,80 Å) и 112 (2,78 Å), как указывается в работе [17], свидетельствует об отсутствии значимых замещений по крайней мере карбонатными группами.

Типичные энергодисперсионные спектры массивных отложений гидроксиапатита представлены

на рисунке 4 b-d. Относительное содержание основных элементов (Ca, C, O, P) может существенно варьировать даже в пределах соседних участков морфологически однородной области отложения минерала. Учитывая также то, что на результат количественного элементного анализа влияет и топография поверхности образца, достоверное определение содержания элементов, даже усредненное по большой поверхности образца, требует разработки специальных методик. Можно лишь констатировать то, что кальцификаты некротических

очагов включают меньшее количество углерода и кислорода, относительно высокое содержание которых в минеральных отложениях фиброзных и тромбированных участков следует отнести на счет остаточного органического вещества. Кроме того, только в участках петрификации очагов кровоизлияния и тромбогенеза всегда присутствует в небольших количествах фтор. Косвенно это свидетельствует о различиях условий формирования гидроксиапатита внутри атеросклеротической бляшки и при непосредственном контакте с кровью.

По совокупности проведенных наблюдений можно утверждать, что исходной стадией формирования массивных отложений гидроксиапатита являются скопления сферических микро- и наночастиц. Частицы гидроксиапатита схожей морфологии, которые еще недавно некоторыми исследователями рассматривались в качестве так называемых «нанобактерий», образуются в плазме при минерализации, контролируемой белками плазмы крови [18, 19]. Минимальный размер таких частиц составляет менее 40 нм, размерное распределение симметричное, близкое к нормальному, что типично для образования минеральных частиц при кристаллизации в гомогенной среде.

Размер сферических частиц гидроксиапатита, образующихся в толще атеросклеротической бляшки хорошо описывается функцией логарифмически нормального распределения (рис. 4e, f). Интерпретируя логарифмически нормальный закон в применении к нашим объектам, можно судить о том, что формирование частиц – процесс направленный, подверженный влиянию большого количества случайно меняющихся факторов (например, концентрация кальция, фосфора, активность ингибиторов или промоторов кальцификации и т.п.). При этом эффект от влияния факторов зависит от уже достигнутого размера частицы. В настоящее время многими исследователями предполагается ведущая роль в формировании костной ткани и инициации минерализации мягких тканей отводится матричным и клеточным мембранным везикулам, образующимся клетками в процессе остеогенеза или при апоптозе. Размер везикул (от 100 нм) в целом соответствует минимальным размерам кальцийсодержащих частиц в участках фиброза и некроза. Наблюдаемые распределения частиц по размерам не исключают механизм везикулярного активного синтеза гидроксиапатита, который замедляется и прекращается при достижении везикулами (частицами) определенного размера. Напротив, краевой участок минерализующегося тромба сложен кальцийсодержащими наночастицами, диаметр которых от 50 нм и более описывается нормальным законом распределения. Это позволяет предполагать, что синтез гидроксиапатита здесь – обычный физико-химический процесс кристаллизации.

Следует обозначить и типичные стадии атеросклеротического поражения коронарных артерий,

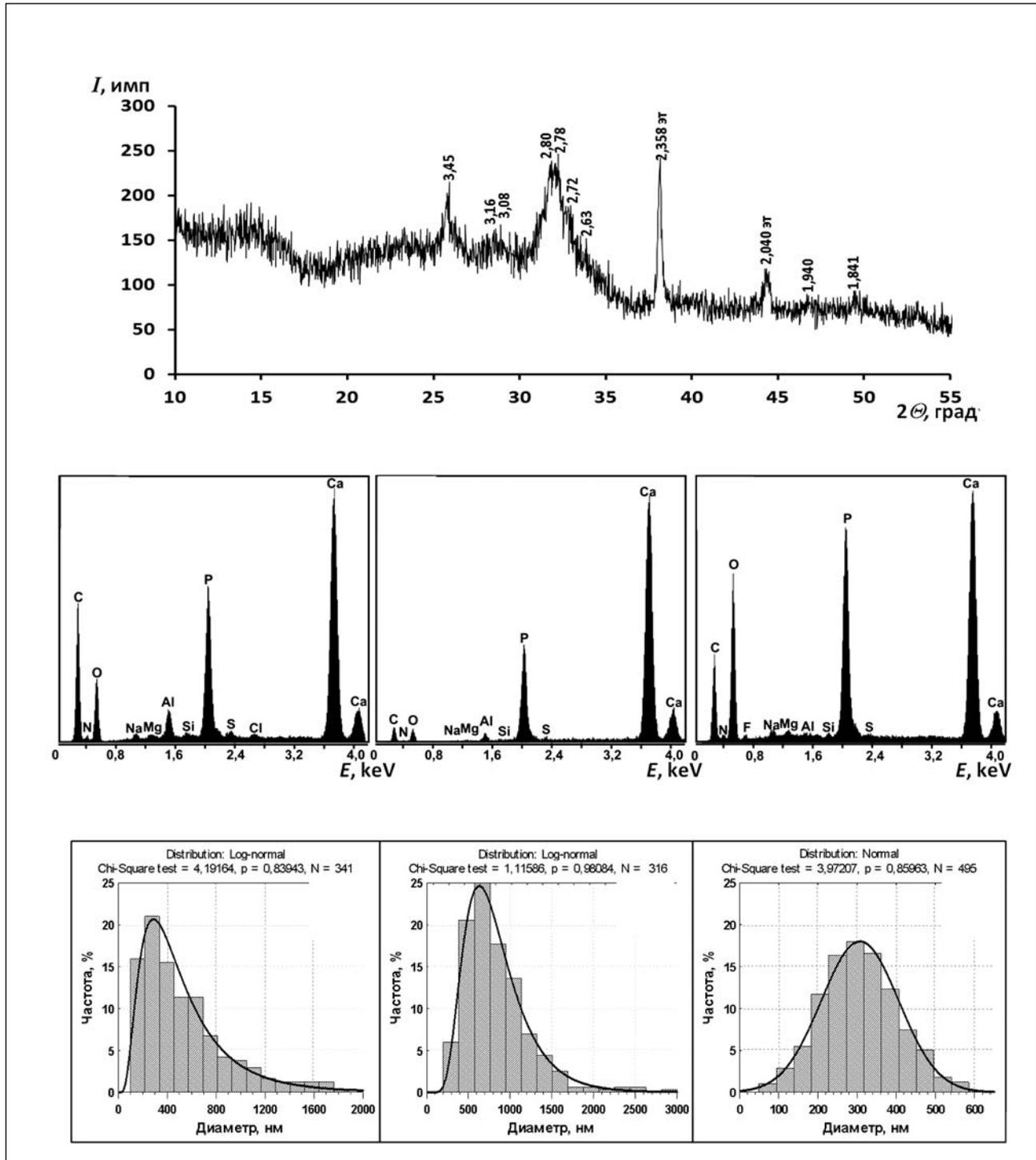
не сопряженные с минерализацией. Два образца атеросклеротических бляшек (№ 3, 4), полученные от пациентов с меньшей степенью гемодинамической значимости поражения коронарных артерий, не имеют признаков петрификации. Несмотря на отсутствие дифференцирующего окрашивания и иммуноморфологического дифференцирования, удается визуализировать основные структуры. Характерно, что признаков минерализации не обнаруживается в областях, где происходит отложение жиров даже при сильном развитии фиброзных утолщений (рис. 5 a, b, e, f). Не происходит образования кальцификатов в зонах с клеточной активностью в виде пролиферирующих гладкомышечных клеток (рис. 5 c), скоплений пенистых клеток на поверхности покрышки (рис. 5d), внедряющихся в атеросклеротическую бляшку клеток воспалительной реакции (рис. 5g), а также в очагах некрозов с накоплением макрофагов под покрышкой атеро-склеротической бляшки (рис. 5 h).

По соотношению площадей, занимаемых стабилизирующими и дестабилизирующими элементами в образцах №3 и №4, сделана попытка определить индексы нестабильности бляшек при детальном просмотре 5-6 участков по 0,05-0,1 мм² на каждом сколе. В зависимости от участка, где прошел скол, индексы варьируют от 0,2 до 1,6 и при таком разбросе не могут служить надежным критерием стабильности бляшек. Следует отметить, что степень соответствия данных результатов и результатов, которые могли быть получены при традиционной оптической микроскопии тех же участков, может быть невысока по причине принципиальных отличий в процессах подготовки пробы и получения изображений. По причине простоты подготовки препаратов и легкости визуализации гистологических особенностей атеросклеротической бляшки методом сканирующей электронной микроскопии сравнение получаемых результатов с данными оптических исследований представляет несомненный интерес для дальнейшего изучения.

Заключение

По результатам данного исследования можно сделать выводы:

- Выделены три независимых фазы атеросклеротического поражения коронарных артерий, сопряженные с кальцификацией атеросклеротической бляшки: а) фиброзные участки бляшки с незначительным содержанием липидов; б) заключительная стадия формирования некротических очагов; в) кровоизлияние и тромбообразование. Кальцификаты указанных зон атеросклеротической бляшки имеют собственные характерные морфологические и композиционные особенности.
- Единственной кристаллизованной фазой кальцификатов является гидроксиапатит.
- Начальной стадией петрификации являются ско-

Рисунок 4. Участки типичной морфологии атеросклеротической бляшки №3 (а-d) и №4 (е-h).

пления микро- и наночастиц гидроксиапатита, при этом механизмы их формирования в толще атеросклеротической бляшки и на поверхности при тромбогенезе различны. Не исключено, что минерализация участков, непосредственно контактирующих с кровью, является пассивным физико-химическим процессом.

- Методом сканирующей электронной микроскопии не обнаружены признаки кальцификации участков формирования липидных ядер

атеросклеротической бляшки, а также участков с относительно высоким присутствием гладкомышечных клеток и клеток воспалительной реакции.

Продолжение исследований с помощью применяемых в данной работе методов позволит установить количественную связь между типами или стадиями атеросклеротического поражения коронарных артерий и выраженностью процесса петрификации.

Благодарности

Работа выполнена в Центре коллективного пользования «Диагностика микро- и нано-структур» при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки РФ.

Список литературы

1. Gagarina N.V., Sinitsyn V.E., Ternovoi S.K.. Coronary artery calcinosis: diagnostic techniques, clinical outcomes, practical significance. *Medical imaging*. 2000;3:23-6. Russian (Гагарина Н.В., Сеницын В.Е., Терновой С.К.. Кальциноз коронарных артерий: методы диагностики, клинические результаты, практическая значимость. *Медицинская визуализация*. 2000;3:23-6).
2. Boev S.S., Dotsenko N.Ia., Gerasimenko L.V., et al. Coronary artery calcification as a marker of the risk of coronary artery disease and a predictor of cardiovascular complications. *Health of Chuvashia*. 2012;1:74-5. Russian (Боев С.С., Доценко Н.Я., Герасименко Л.В., с соавт. Кальцификация коронарных артерий как маркер риска коронарной болезни артерии и предиктор кардиоваскулярных осложнений. *Здравоохранение Чувашии*. 2012;1:74-5).
3. Vliegenthart R. Coronary Calcification and risk of Cardiovascular Disease: An epidemiologic study. Rotterdam: Optima Grafische Communicatie. 2003;231p.
4. Zhdanov V. S., Drobkova I. P., Tsyplenkova V. G., et al. Structural features and some of the mechanisms of instability of atherosclerotic plaques in the coronary arteries in coronary heart disease. *Cardio vestnik*. 2012;VII(2):24-5. Russian (Жданов В.С., Дробкова И.П., Цыпенкова В.Г., с соавт. Структурные особенности и некоторые механизмы развития нестабильности атеросклеротических бляшек в коронарных артериях при ишемической болезни сердца. *Кардиологический вестник*. 2012;VII(2):24-5).
5. Shlychkova T. P., Zhdanov V. S., Karpov Yu. A., Chumachenko P. V.. Major types of unstable atherosclerotic plaques and their distribution in coronary arteries in acute myocardial infarction. *Arkh Patol*. 2005;67(3):24-8. Russian (Шлычкова Т.П., Жданов В.С., Карпов Ю.А., Чумаченко П.В.. Основные типы нестабильных атеросклеротических бляшек и их распространенность в коронарных артериях при остром инфаркте миокарда. *Архив патологии*. 2005;67(3):24-8).
6. Mishnev O. D., Shevchenko O. P., Lysova N. L., et al. The anatomical pathology of a vulnerable atherosclerotic plaque and methods of its visualization. *Medical imaging*. 2006;2:111-7. Russian (Мишнев О.Д., Шевченко О.П., Лысова Н.Л., с соавт. Патологоанатомическая характеристика легкоранимой атеросклеротической бляшки и методы ее визуализации. *Медицинская визуализация*. 2006;2:111-7).
7. Lee R.T., Grodzinsky A.J., Frank E.H., et al. Structure dependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1991;83:1764-7.
8. Stary H.C.. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1177-8.
9. Miller C.A. Phosphate binders for treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease: Advisory Committee Meeting of the cardiovascular and renal drugs division of the US food and drug administration, Briefing document. 2007;114 p.
10. Efstratiadis G, Koskinas K., Pagourelas E.. Coronary calcification in patients with end-stage renal disease: a novel endocrine disorder? *Hormones*. 2007;6(2):120-11.
11. Serrano C.V.Jr, Oranges M., Brunaldi V.. Skeletonized coronary arteries: pathophysiological and clinical aspects of vascular calcification. *Vascular Health and Risk Management*. 2011;7:143-9.
12. Abela S.G., Aziz K., Vedre A., et al. Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes. *Am J Cardiol*. 2009;103:959-10.
13. Subalim J.L., Chung Ch-Yu, Lilledahl M.B., et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy. *Biophysical J*. 2012;102:1988-8.
14. Fitzpatrick L.A., Severson A., Edwards W.D., et al. Diffuse calcification in human coronary arteries. *The J of Clinic Invest*. 1994;94:1597-8.
15. Jin H., Ham K., Chan J., et al. High resolution three-dimensional visualization and characterization of coronary atherosclerosis in vitro by synchrotron radiation x-ray microtomography and highly localized x-ray diffraction. *Phys Med Biol*. 2002;47:1-12.
16. Tomazi B.B.. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol*. 2001;90(3):68-13.
17. Prieto R.M., Gomila I., Sñbnel O., et al. Study on the structure and composition of aortic valve calcific deposits: Etiological aspects. *Biophysical Chemistry J*. 2011;2:19-7.
18. Raoult D., Drancourt M., Azza S., et al. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. *PLoS Pathogens*. 2008;4(2,e41):1-8.
19. Wu Ch-Y, Martel J, Young D, et al. Fetuin-A/Albumin-mineral complexes resembling serum calcium granules and putative nanobacteria: demonstration of a dual inhibition-seeding concept. *PLoS One*. 2009;1(1,e8058):1-40.