

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI 10.15372/ATER20200201

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ КАЛЬЦИФИКАТОВ
В СОСТАВЕ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК СОННОЙ АРТЕРИИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ
В ОБРАТНОРАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ****Р.А. Мухамадияров, А.Г. Кутихин***ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6*

Цель исследования – изучить типы кальцификатов в составе атеросклеротических бляшек сонных артерий, используя оригинальный метод окрашивания тканей, их заключения в эпоксидную смолу и сканирующую электронную микроскопию в обратнорассеянных электронах. **Материал и методы.** Атеросклеротические бляшки, извлеченные в процессе каротидной эндартерэктомии, фиксировались 10%-м забуференным формалином в течение 24 часов, окрашивались 2%-м тетраоксидом осмия в течение 60 часов и спиртовым раствором уранилацетата в течение 5 часов с последующим заключением в эпоксидную смолу, шлифовкой, полировкой, контрастированием цитратом свинца по Рейнольдсу в течение 7 минут, напылением углеродом и сканирующей электронной микроскопией в обратнорассеянных электронах. На цифровых микрофотографиях идентифицировали локализацию кальцификатов, их структурные особенности, клеточное и неклеточное окружение. **Результаты.** Наиболее характерным типом кальцификации в атеросклеротических бляшках были крупные компактные гомогенные кальцификаты; также встречались обширные продольные гетерогенные очаги минерализации, предположительно образующиеся преимущественно в результате направленной дезинтеграции коллагеновых и эластических волокон вследствие действия матриксных протеаз. Возле обоих типов макрокальцификатов с неровными краями обнаруживались многочисленные микрокальцификаты, количество которых постепенно уменьшалось по мере удаления от макрокальцификата. При этом даже в относительно гомогенных компактных кальцификатах наблюдалась некоторая неоднородность электронной плотности, что в сочетании с близко расположенными группами кальцификатов различной степени зрелости с зарождающимися кальцификатами или постепенно объединяющимися микрокальцификатами свидетельствовало об активно идущих процессах химической трансформации фосфата кальция и оссификации. Компактные, постепенно подвергающиеся оссификации кальцификаты с ровными и гладкими краями в завершающей стадии оссификации часто имели плотную соединительнотканную оболочку. Также микроокружение кальцификатов, как правило, содержало новообразованные кровеносные сосуды с разной площадью и толщиной стенок. **Заключение.** Полученные данные достаточно наглядно демонстрируют многообразие форм кальцификации и процесс оссификации, что позволяет провести патогенетические параллели с пороками нативных клапанов сердца и дисфункций их биопротезов. Примененный методический подход в комплексе с другими методами (в частности, дезагрегацией атеросклеротических бляшек с дальнейшей проточной цитометрией и полнотранскриптомным секвенированием одиночных клеток) может внести свой вклад в понимание кальцификации при атеросклерозе и поможет идентифицировать терапевтические мишени с целью ее предотвращения и ингибирования.

Ключевые слова: атеросклероз, атеросклеротические бляшки, кальцификация, оссификация, биоминерализация, остеохондрогенная дифференцировка, электронная микроскопия.

Мухамадияров Ринат Авхадиевич – канд. биол. наук, с. н. с. лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, e-mail: rem57@gambler.ru

Кутихин Антон Геннадьевич – канд. мед. наук, зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Образование атеросклеротических бляшек представляет собой многофакторный и многоэтапный хронический процесс, одним из фенотипических проявлений которого является формирование очагов эктопической (внеклеточной) минерализации [1]. Появление кальцификатов в бляшках приводит к снижению эластичности сосудов и увеличивает характерную для фибротического ремоделирования гетерогенность компонентов внеклеточного матрикса, что может увеличивать риск разрыва бляшки [2].

Исследование структурных особенностей кальцинированных атеросклеротических бляшек представляет значительные трудности, связанные со сложностью получения качественных гистологических срезов вследствие несовпадения плотности кальцификатов и окружающих тканей, что приводит к разрыву ткани возле очагов минерализации [3]. Растворение кальцификатов перед резкой образцов также может сопровождаться потерей целостности ткани вследствие обработки кислотами [3].

Вариантом решения этой проблемы является разработанный нами ранее оригинальный метод заключения образцов в эпоксидную смолу с предварительным окрашиванием тетраоксидом осмия и уранилацетатом и последующей шлифовкой и полировкой поверхности с дальнейшим контрастированием цитратом свинца, напылением углеродом и сканирующей электронной микроскопией в обратнорассеянных электронах [3–5]. Данный метод позволяет выявить наличие, локализацию, структуру и состав кальцификатов в атеросклеротических бляшках, а также изучить их клеточное и неклеточное окружение с разрешением, на порядок превышающим таковое при световой микроскопии, и в качестве, приближающемся к получаемому при просвечивающей электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследованы атеросклеротические бляшки, извлеченные у пациентов в процессе каротидной эндартерэктомии, выполнявшейся в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ) по поводу острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу или хронической ишемии головного мозга. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации по протоколу, одобренному локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. До включения в исследование от всех пациентов получено письменное информированное согласие.

После извлечения атеросклеротические бляшки помещали в забуференный (pH 7,4) 10%-й водный раствор формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 часов каждая) биоматериал постфиксировали 1%-м тетраоксидом осмия в 0,1М фосфатном буфере в течение 12 часов, затем окрашивали 2%-м тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50%-, 60%-, 70%-, 80%- и 95%-й этанол, все по две смены, каждая смена по 15 минут), окрашивали 2%-м уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-м этаноле (5 часов), обезвоживали 99,7%-м изопропанолом (BioVitrum) в течение 5 часов и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences) в соотношении 1:1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences) при 60 °С. После этого образцы в эпоксидных блоках шлифовали и полировали на установке TegraPol-11 (Struers, Дания). Контрастирование цитратом свинца выполняли по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее на полированную поверхность эпоксидных блоков напыляли углерод (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста EM ACE200 (Leica, Германия). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

На цифровых микрофотографиях идентифицировали локализацию кальцификатов, их структурные особенности, клеточное и неклеточное окружение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гетерогенный и многофакторный процесс кальцификации в атеросклеротических бляшках [6] приводит к различным морфологическим типам (паттернам) кальцификатов, представленным на рис. 1. Наиболее характерным типом являются крупные, плотные (компактные) гомогенные кальцификаты (рис. 1, а). Также встречаются обширные продольные гетерогенные очаги минерализации, предположительно образующиеся преимущественно в результате направ-

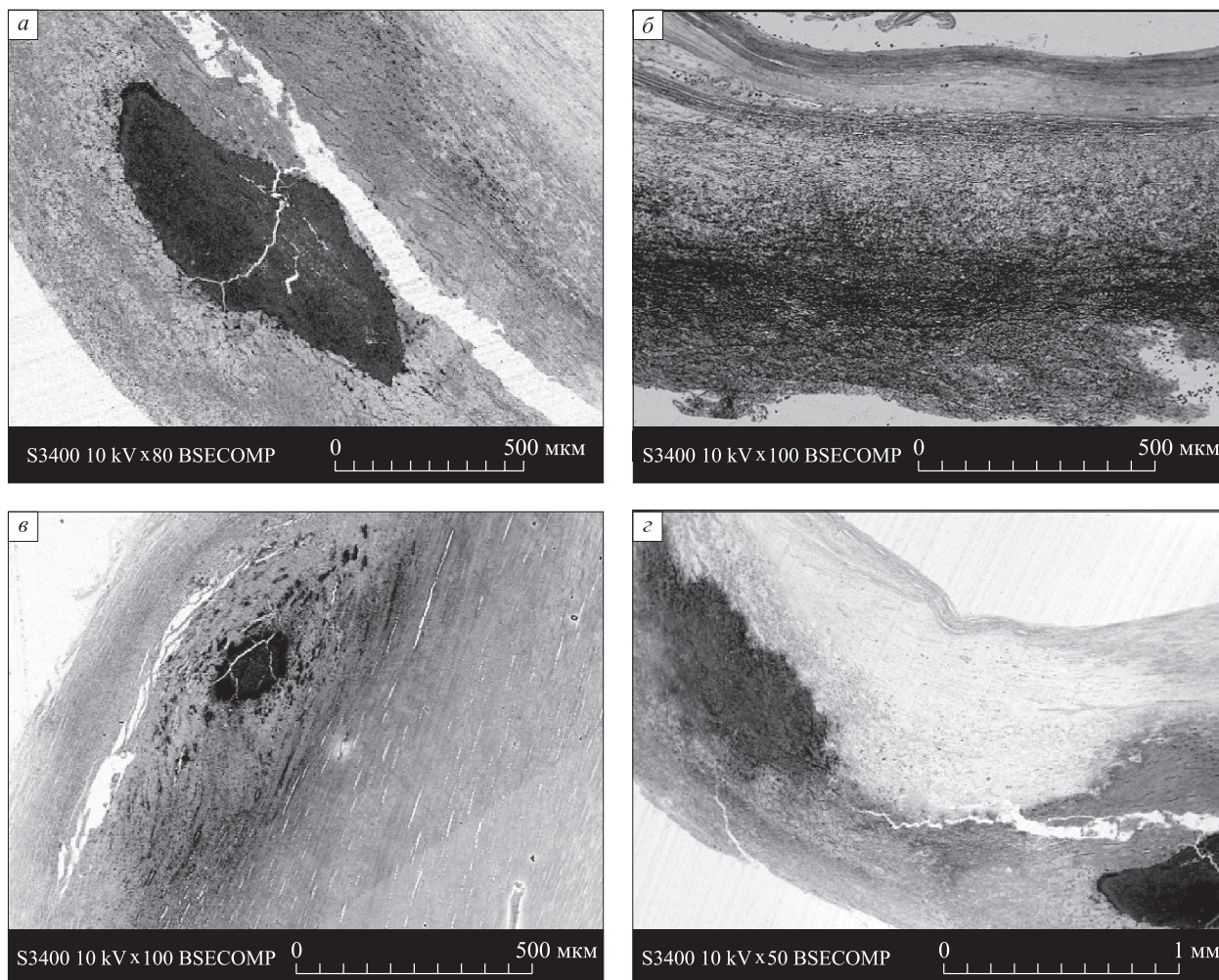


Рис. 1. Типы локализации, формы, размерности и стадии химической трансформации очагов кальцификации в атеросклеротических бляшках. *а* – крупный компактный гомогенный кальцификат с гладкими краями; *б* – обширный продольный гетерогенный кальцификат с сопутствующими микрокальцификатами; *в* – одновременное совместное присутствие плотных гомогенных (в центре), рыхлых гетерогенных (справа и снизу) макро- и микрокальцификатов (сверху и слева); *г* – находящиеся на расстоянии кальцификаты на ранней (слева) и поздней (справа) стадиях химической трансформации фосфата кальция (созревание кальцификата)

ленной дезинтеграции коллагеновых и эластических волокон вследствие действия матричных протеаз (рис. 1, б). Логичным является сочетание обоих типов очагов кальцификации при возможном наличии микрокальцификатов (рис. 1, в). Кроме того, следует отметить постепенное созревание кальцификатов в результате последовательной химической трансформации фосфата кальция (рис. 1, г).

При этом следует отметить, что и гомогенные (рис. 2, а), и гетерогенные (рис. 2, б) макрокальцификаты с гладкими (ровными) краями характеризовались отсутствием или малым количеством макрокальцификатов в своем окружении,

в то время как их, как правило, было значительное количество вблизи гомогенных (рис. 2, в) и гетерогенных (рис. 2, г) макрокальцификатов с выражено неровными краями. При этом количество микрокальцификатов постепенно уменьшалось по мере удаления от макрокальцификата (см. рис. 2, в, г). Неровность краев может быть обусловлена кальцификацией коллагеновых или эластиновых волокон (см. рис. 2, г).

При подборе настроек яркости и контрастности даже в структуре относительно гомогенных компактных кальцификатов наблюдалась некоторая неоднородность электронной плотности (более электронно-плотные очаги в сочета-

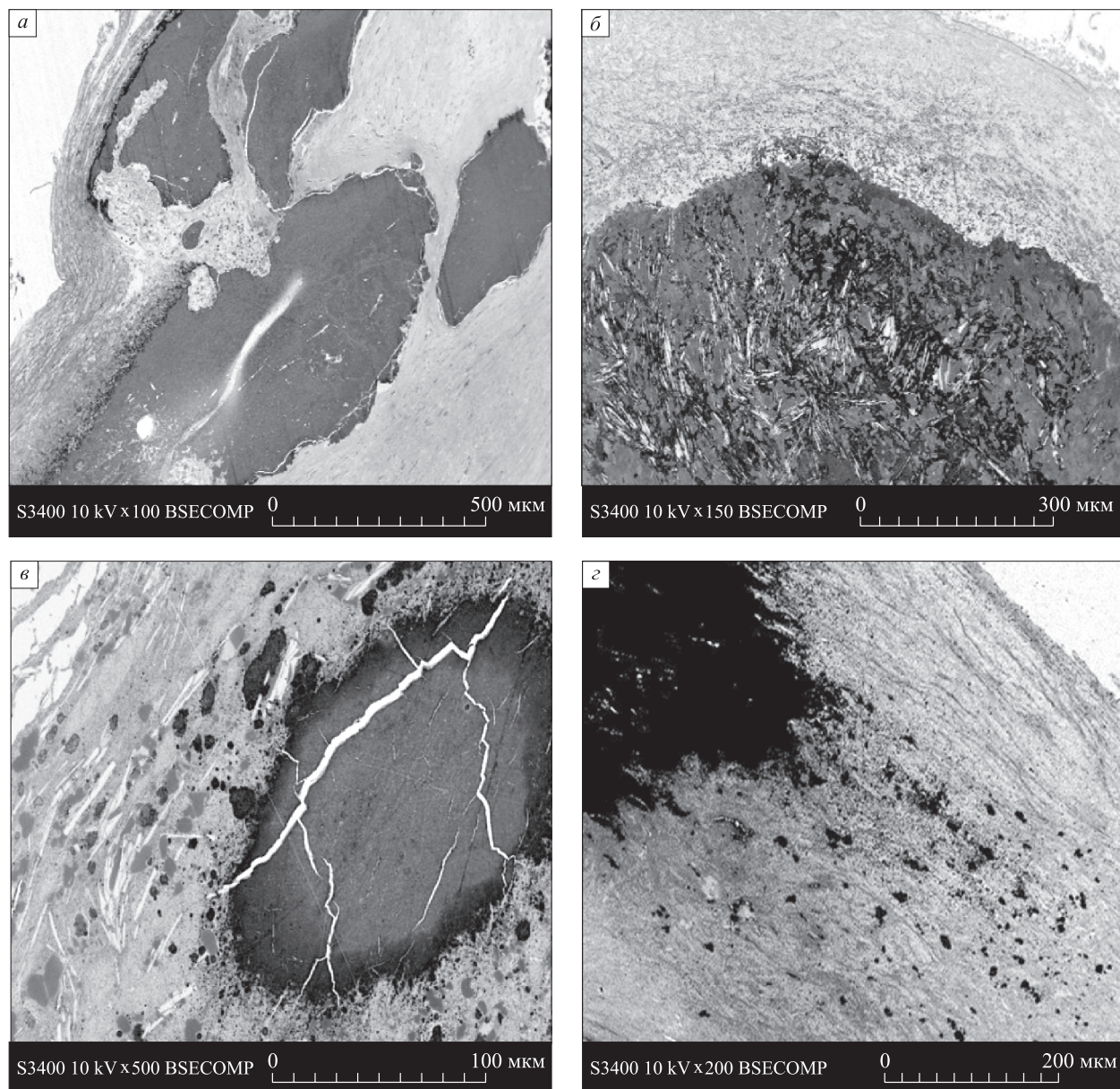


Рис. 2. Зависимость присутствия микрокальцификатов от формы краев макрокальцификатов. *а* – ряд крупных компактных гомогенных кальцификатов с ровными краями, отсутствие микрокальцификатов в окружающих тканях; *б* – крупный гетерогенный кальцификат, отсутствие микрокальцификатов в окружающих тканях; *в* – крупный компактный гомогенный кальцификат с неровными краями, многочисленные микрокальцификаты в окружающих тканях; *г* – крупный гетерогенный кальцификат с неровными краями, многочисленные микрокальцификаты в окружающих тканях

нии с менее электронно-плотными внутри тела кальцификата, рис. 3, *а* и *б* и края кальцификата, рис. 3, *г*), что можно рассматривать как доказательство формирования кальцификатов путем оссификации (постепенного обызвествления ткани между микрокальцификатами, в итоге приводящего к интеграции отдельных микрокальцификатов в единый макрокальцификат)

с его параллельным созреванием вследствие фаз химической трансформации фосфата кальция. Стоит отметить, что внутри кальцификатов также встречались очаги интактной ткани с клетками (см. рис. 3, *г*).

Еще одним патоморфологическим доказательством оссификации является наличие близко расположенных групп кальцификатов раз-

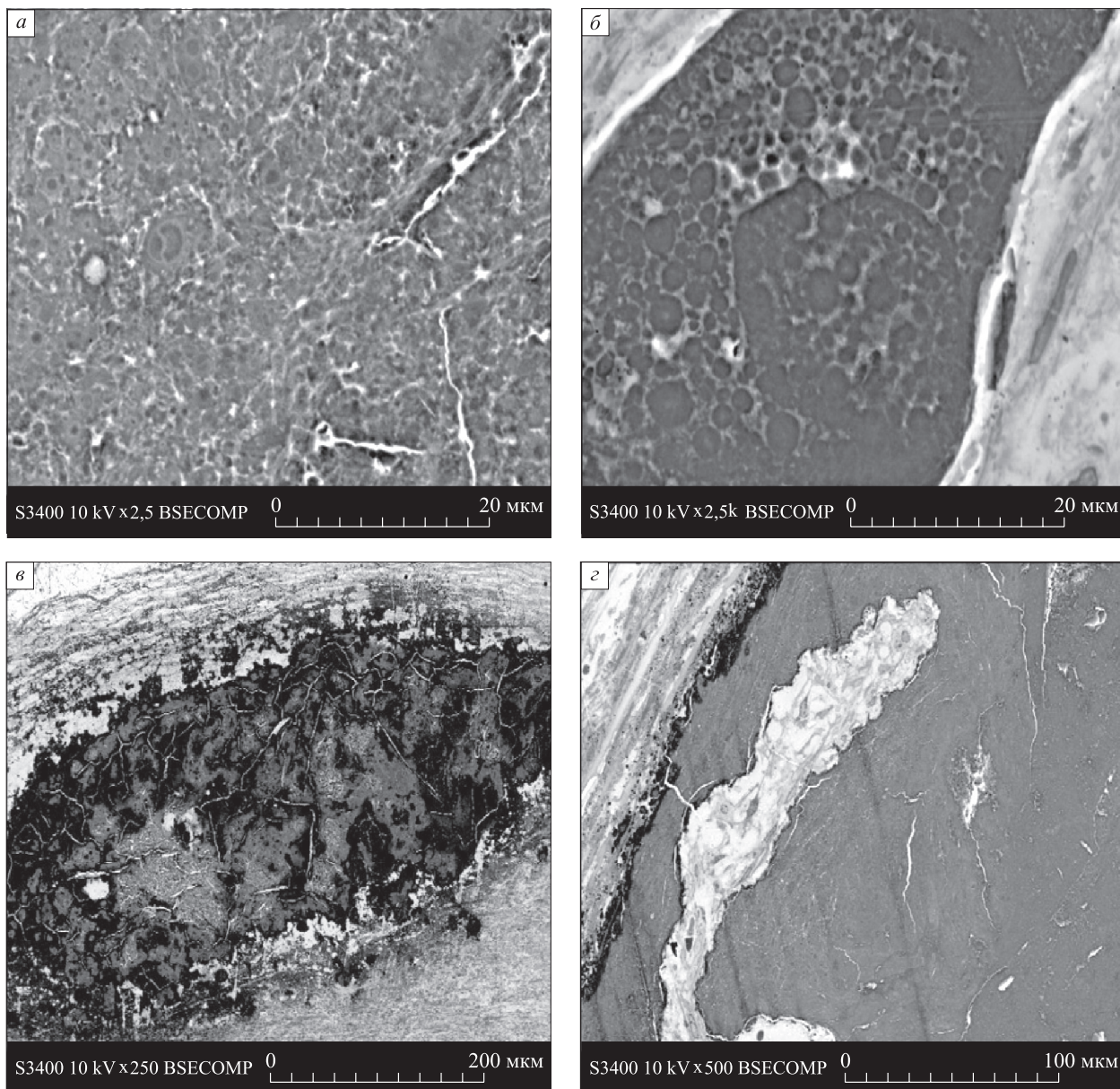


Рис. 3. Неоднородность структуры кальцификатов, выявляемая при оптимизации настроек яркости и контрастности. *а* – равномерная оссификация, отражаемая малой гетерогенностью электронной плотности; *б* – относительно равномерная оссификация с преобладанием компонента с высокой электронной плотностью; *в* – неравномерная оссификация с приблизительно равным соотношением компонентов с высокой и низкой электронной плотностью; *г* – выраженная гетерогенность электронной плотности между краем и телом кальцификата. В центре заметен очаг интактной ткани с небольшим количеством клеток

личной степени зрелости с явно отмечаемыми зарождающимися кальцификатами (рис. 4, *а*) или постепенно объединяющимися микрокальцификатами (рис. 4, *б*). Для компактных, постепенно подвергающихся оссификации кальцификатов, имеющих ровные и гладкие края, в завершающей стадии оссификации бывает характерна плотная соединительнотканная

оболочка (рис. 4, *в*). Напротив, обширные продольные кальцификаты, предположительно образующиеся по ходу коллагеновых и эластических волокон, никогда не имели плотной соединительнотканной оболочки, характеризующейся неровными краями и постепенным переходом в некальцифицированные волокна (рис. 4, *г*).

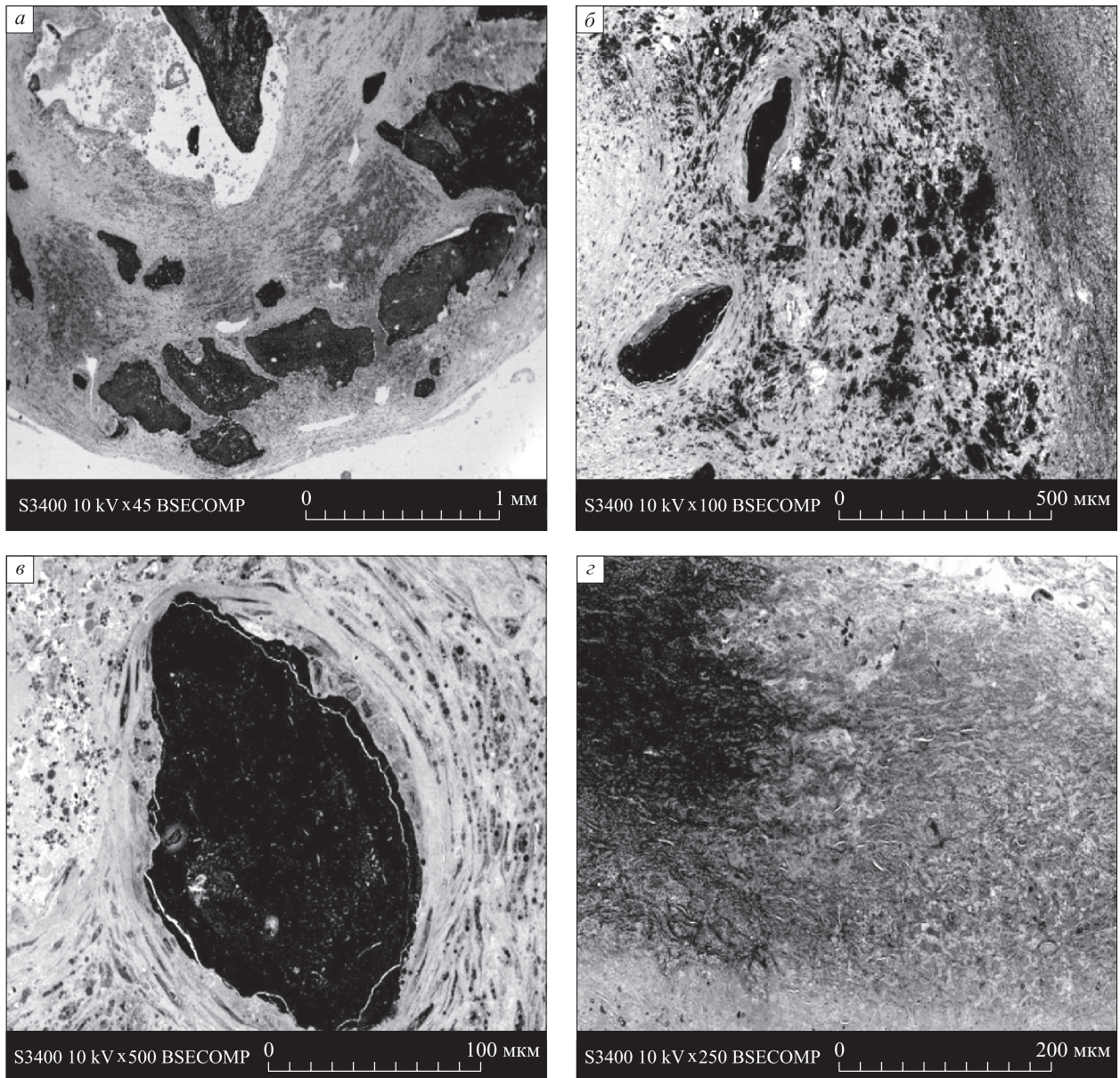


Рис. 4. Формирование кальцификатов путем оссификации. *a* – близко расположенные кальцификаты различной степени зрелости, включая зарождающиеся кальцификаты (в центре); *б* – постепенное слияние микрокальцификатов в кальцификаты большего размера; *в* – выраженная плотная соединительнотканная оболочка вокруг компактных макрокальцификатов с ровными краями в завершающей стадии оссификации; *г* – отсутствие соединительнотканной оболочки вокруг макрокальцификатов, образующихся по ходу коллагеновых и эластических волокон и постепенно переходящих в некальцифицированные волокна

Компактные кальцификаты часто имели неоднородное клеточное микроокружение, в том числе при наличии плотной соединительнотканной оболочки. Например, один из полюсов кальцификата мог быть окружен плотно прилегающими к поверхности фибробластами, а на другом полюсе присутствовало скопление макрофагов, имеющих в цитоплазме многочис-

ленные светлые вакуоли, указывающие на их пенистый фенотип (рис. 5, *a*). Такие кальцификаты независимо от наличия или отсутствия соединительнотканной оболочки обычно находились в составе рыхлой, подвергшейся частичной дезинтеграции, богатой клетками ткани, содержащей большое количество макрофагов с обильными электронно-плотными вакуоля-

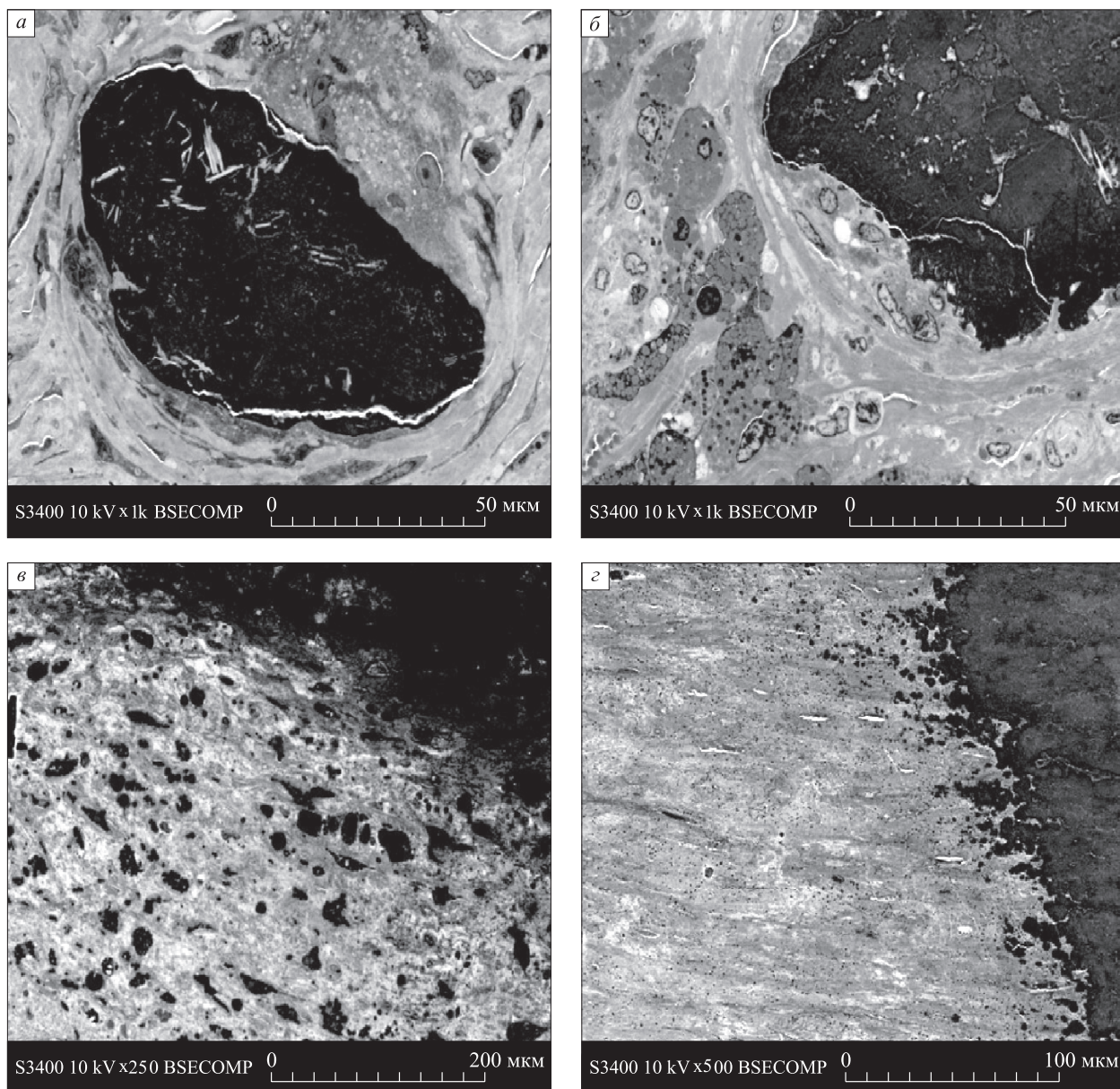


Рис. 5. Клеточное микроокружение кальцификатов. *а* – сочетание фибробластов соединительнотканной оболочки компактного гомогенного кальцификата (внизу) и пенистых клеток (сверху); *б* – пенистые клетки в составе рыхлой соединительной ткани вблизи компактного гомогенного кальцификата; *в* – отсутствие клеток вблизи продольного кальцификата по ходу коллагеновых волокон с большим количеством микрокальцификатов в окружающих тканях; *г* – отсутствие клеток вблизи продольного кальцификата по ходу коллагеновых волокон с малым количеством микрокальцификатов в окружающих тканях

ми в цитоплазме (рис. 5, б). В то же время формирующиеся в направлении коллагеновых и эластических волокон продольные обширные кальцификаты, как правило, практически не имели клеток в микроокружении независимо от количества и типа расположения микрокальцификатов вблизи их неровного края (рис. 5, в, г).

Новообразованные кровеносные сосуды атеросклеротических бляшек (*vasa plaquorum*) вблизи кальцификатов имели различную площадь и толщину стенок (рис. 6, а, б и в). В целом тонкостенные сосуды были представлены в большем количестве по сравнению с толстостенными и имели только слой эндотелиальных клеток в отличие от толстостенных, которые также со-

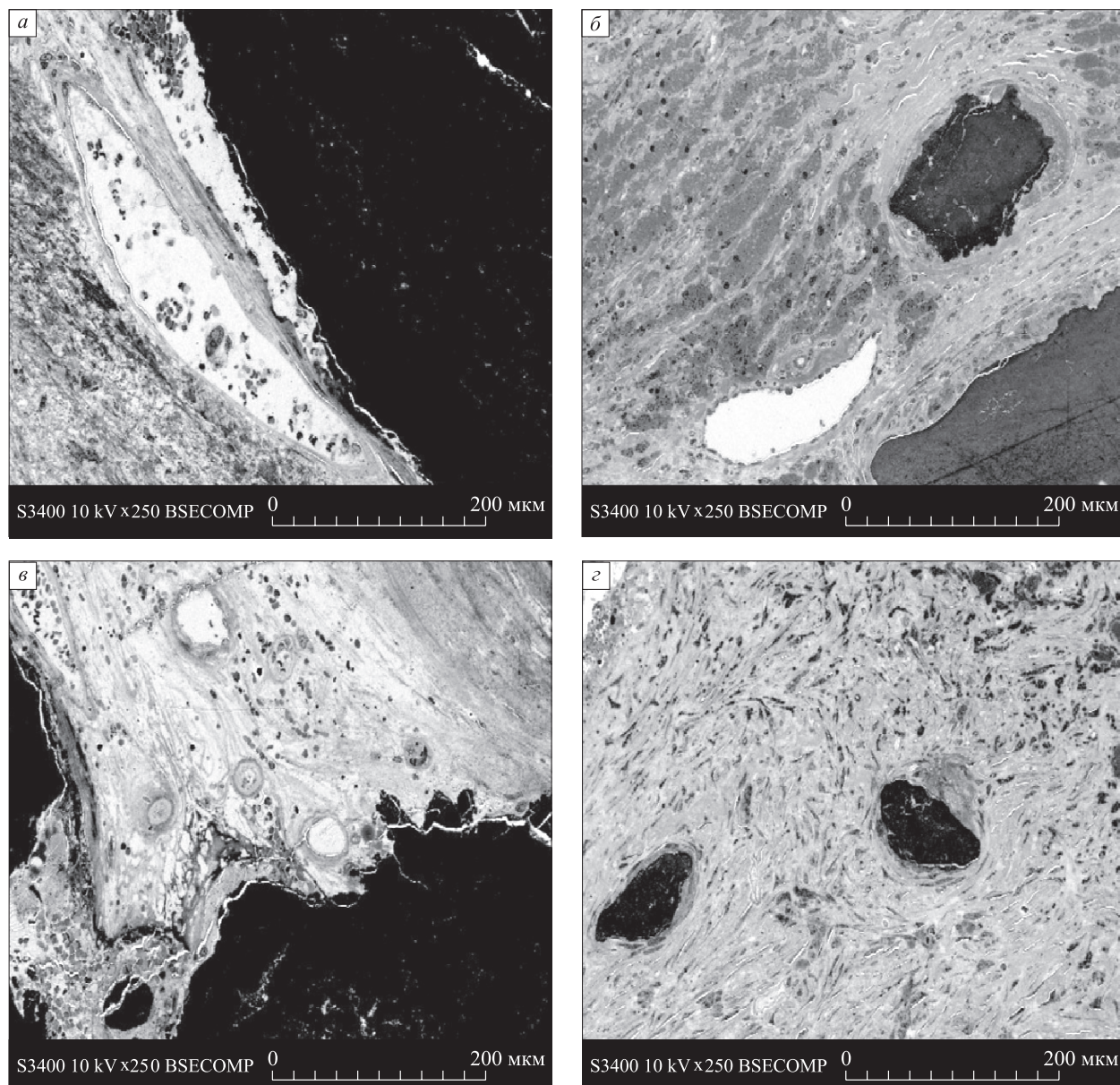


Рис. 6. Кровеносные сосуды вблизи кальциевых депозитов. *а* – крупный толстостенный сосуд в непосредственном контакте с компактным гомогенным макрокальцификатом; *б* – тонкостенный сосуд среднего размера в составе рыхлой соединительной ткани неподалеку от компактного гомогенного макрокальцификата; *в* – сосуды малого калибра с различной толщиной стенок вблизи компактного гомогенного макрокальцификата; *г* – отсутствие сосудов на большом расстоянии от компактного гомогенного макрокальцификата

держали в стенке сосуда соединительную ткань. Кроме того, окружающая кальцификаты ткань могла вообще не содержать сосудов (рис. б, г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Патоморфологический анализ атеросклеротических бляшек демонстрирует многообразие очагов кальцификации в их составе. В частно-

сти, можно выделить компактные гомогенные макрокальцификаты и располагающиеся вдоль коллагеновых и эластических волокон обширные продольные макрокальцификаты, а также микрокальцификаты, как правило, образующиеся возле макрокальцификатов с выражено неровным краем, независимо от их гомогенности. Большинство кальцификатов было неоднородным по электронной плотности, что может от-

ражать различные фазы химической трансформации фосфата кальция и процесс оссификации, заключающийся в постепенном разрастании и слиянии микрокальцификатов в макрокальцификат. Для компактных макрокальцификатов с ровными краями, в отличие от идущих по ходу коллагеновых и эластических волокон обширных продольных кальцификатов, в завершающей стадии оссификации характерна выраженная плотная соединительнотканная оболочка. При этом обращает на себя внимание то, что компактные макрокальцификаты с ровными краями независимо от наличия или отсутствия соединительнотканной капсулы находились в составе дезинтегрированной и богатой клетками ткани, содержащей большое количество пенистых клеток. Также микроокружение кальцификатов, как правило, содержало новообразованные кровеносные сосуды с разной площадью и толщиной стенок.

В настоящее время общепринято, что кальцификация играет важную роль в патогенезе атеросклероза и является одним из признаков прогрессирования атеросклеротической бляшки [6]. Доказано, что образование кальцификатов в атеросклеротических бляшках является сложным, длительным и многостадийным процессом [6]. Рассматриваются различные механизмы кальцификации, включающие потенцируемое перекисным окислением липидов и гема формирование значительного количества активных форм кислорода, патологическое повышение уровня ионов кальция и фосфора в микроокружении и дезинтеграцию экстрацеллюлярного матрикса выделяемыми макрофагами, сосудистыми гладкомышечными клетками и фибробластами протеазами (матриксными металлопротеиназами, дезинтегринами и металлопротеазами семейств ADAM и ADAMTS, катепсинами) [7–9]. Данные факторы в совокупности приводят к постепенному сдвигу фенотипа сосудистых гладкомышечных клеток с контрактильного на синтетический с последующим усилением секреции клетками протеаз и белков матрикса, и на остеогенный, следствием чего является активное выделение клетками внеклеточных везикул с большим содержанием кальция и фосфора [10, 11]. Именно внеклеточные везикулы, как и апоптотические тела и прочий образующийся в результате клеточной гибели дебрис, считаются основными центрами образования кальцификатов в атеросклеротических бляшках [12, 13]. Существенное влияние также оказывают и коморбидные патологические состояния у пациента (гипер- и дислипидемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, хроническая болезнь почек), ускоряющие развитие дисфункции эн-

дотелия, сосудистого воспаления и формирования неинтимы, в сочетании приводящих к прогрессированию атеросклероза и формированию нестабильного фенотипа атеросклеротической бляшки [14, 15].

Необходимо отметить, что полученные данные, в частности одновременное присутствие структурно и химически различных кальцификатов в пределах одной и той же атеросклеротической бляшки, не противоречат гипотезе о существовании общего механизма ее кальцификации. Описанные типы кальцификатов могут представлять собой разные варианты и стадии процесса оссификации. На размеры, форму и структуру кальцификатов могут оказывать влияние продолжительность их формирования, особенности гемодинамических воздействий при кровотоке, состояние микроокружения (включая выраженность окислительного стресса и воспаления), уровень кровоснабжения в области формирования кальцификата, коморбидные патологические состояния пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные патоморфологические данные, безусловно, не обладают абсолютной доказательностью в отношении механизмов образования кальцификатов в составе атеросклеротических бляшек, однако убедительно показывают многообразие форм кальцификации и процесс оссификации по аналогии с пороками нативных клапанов сердца и дисфункциями их биопротезов. Кроме того, полученные данные позволяют ожидать, что использованный методический подход в комплексе с другими методами (в частности, дезагрегацией атеросклеротических бляшек с дальнейшей проточной цитометрией и полнотранскриптомным секвенированием одиночных клеток), внесет свой вклад в понимание кальцификации при атеросклерозе и поможет идентифицировать терапевтические мишени с целью ее предотвращения и ингибирования.

Конфликт интересов. Авторы не имеют 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».

ЛИТЕРАТУРА

1. 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
2. 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
3. Mukhamadiyarov R.A., Sevostyanova V.V., Shishkova D.K., Nokhrin A.V., Sidorova O.D., Kutikhin A.G. Grinding and polishing instead of sectioning for the tissue samples with a graft: Implications for light and electron microscopy. *Micron.* 2016; 85: 1–7. doi: 10.1016/j.micron.2016.03.005
4. Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. *Фундам. и клин. медицина.* 2019; 4 (1): 6–14. doi: 10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14
5. Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Оценка сосудов малого диаметра при нормальной микроанатомии и патологической неоваскуляризации с использованием сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. *Бiol. эксперим. биологии и медицины.* 2020; 169 (4): 514–520.
6. Yahagi K., Kolodgie F.D., Lutter C., Mori H., Romero M.E., Finn A.V., Virmani R. Pathology of human coronary and carotid artery atherosclerosis and vascular calcification in diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; 37 (2): 191–204. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.306256
7. Hutcherson J.D., Blaser M.C., Aikawa E. Giving calcification its due: recognition of a diverse disease: a first attempt to standardize the field. *Circ. Res.* 2017; 120 (2): 270–273. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310060
8. Boffa M.B., Koschinsky M.L. Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019; 16 (5): 305–318. doi: 10.1038/s41569-018-0153-2
9. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Ovcharenko E.A., Kutikhin A.G. Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J. Mol. Cell Cardiol.* 2019; 132: 189–209. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.016
10. Basatemur G.L., Jorgensen H.F., Clarke M.C.H., Bennett M.R., Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019; 16 (12): 727–744. doi: 10.1038/s41569-019-0227-9
11. 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
12. 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., Reuteling-sperger 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): 1312–1323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012
13. Kapustin A.N., Shanahan C.M. Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation. *J. Physiol.* 2016; 594 (11): 2905–2914. doi: 10.1113/JP271340
14. Nicoll R., Henein M. Arterial calcification: A new perspective? *Int. J. Cardiol.* 2017; 228: 11–22. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.099
15. Bakhshian N.A., Hutcherson J.D., Aikawa E. Extracellular vesicles as mediators of cardiovascular calcification. *Front. Cardiovasc. Med.* 2017; 4: 78. doi: 10.3389/fcvm.2017.00078

**STRUCTURE OF CALCIFICATES
IN HUMAN CAROTID ARTERY ATHEROSCLEROTIC PLAQUES
BY MEANS OF BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

R.A. Mukhamadiyarov, A.G. Kutikhin

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

Aim of the study was to investigate the atherosclerotic calcification employing our original technique of tissue staining, embedding, and backscattered scanning electron microscopy. **Materials and methods.** Atherosclerotic plaques excised during the carotid endarterectomy have been fixed in 10 % neutral phosphate buffered saline formalin for 24 hours, stained in 2 % osmium tetroxide for 60 hours and in alcoholic uranyl acetate for 5 hours with the subsequent epoxy resin embedding, grinding, polishing, lead citrate counterstaining for 7 minutes, sputter coating with carbon and backscattered scanning electron microscopy. We then analysed localisation, structure, and microenvironment of the calcium deposits. **Results.** Within the atherosclerotic plaques, we identified 3 distinct calcification morphologies: compact homogenous macrocalcifications, sheet-like heterogeneous macrocalcifications along the destructed collagen and elastin fibers, and microcalcifications around large calcium deposits with the sharp margins. However, even relatively homogenous compact macrocalcifications had uneven distribution of electron density. In conjunction with groups of mineral deposits of distinct calcium phosphate phases including nascent calcified loci, this testified to ongoing calcium phosphate maturation while multiple microcalcifications merging into the single macrocalcification indicated ossification. Compact ossifying macrocalcifications with smooth margins frequently had a dense connective tissue capsule. The microenvironment of calcium deposits was often characterised by leaky neovessels. **Conclusion.** Diversity of calcification morphologies and ossification in atherosclerotic plaques is similar to those observed in calcific aortic valve disease and bioprosthetic heart valve failure. Combined with atherosclerotic plaque disaggregation followed by flow cytometry and single-cell RNA sequencing, our technique may improve our understanding of atherosclerotic calcification and lead to the identification of appropriate therapeutic targets to prevent or retard this process.

Keywords: atherosclerosis, atherosclerotic plaques, calcification, ossification, biomineralisation, osteochondrogenic differentiation, electron microscopy.

*Статья поступила 2 мая 2020 г.
Принята к печати 9 июня 2020 г.*