

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-1-78-93>

КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЕ БИОНЫ: НА ПУТИ К ФОРМИРОВАНИЮ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИИ

КУТИХИН А.Г.

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

Резюме

Перенасыщение крови ионами кальция и фосфора ассоциировано с повышенным риском сердечно-сосудистых событий, однако патофизиологические основы данной клинико-эпидемиологической связи остаются неясными. В ответ на превышение физиологических уровней кальция и фосфора в результате действия минерального шаперона фетуина-А происходит агрегация избыточных минеральных ионов в кальций-фосфатные бионы (КФБ), которые далее необратимо интернализуются эндотелиальными клетками, вызывая пермеабиллизацию их лизосомальной мембраны и приводя к неспецифическому провоспалительному ответу и клеточной гибели. В сочетании данные процессы приводят к формированию патологического микроокружения, потенцирующего развитие дисфункции эндотелия, остеохондрогенного фенотипического сдвига сосудистых гладкомышечных клеток и воспаления адвентиции; данные последствия, в свою очередь, вызывают формирование неинтимы и кальцификацию меди. Хотя корреляция между повышенным уровнем КФБ в крови и повышенным риском сердечно-сосудистых событий и сердечно-сосудистой смерти впервые была выявлена у пациентов с хронической болезнью почек, последние исследования указывают на ее присутствие и у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца и без почечной дисфункции, предполагая общий и единый патофизиологический механизм.

В данном обзоре обсуждаются существующие данные о формировании КФБ и их влиянии на развитие различных сердечно-сосудистых заболеваний, методы, которыми они исследуются, и недостатки моделей, применяемых на сегодняшний день для оценки их патофизиологических эффектов и механизмов потенцирования сердечно-сосудистых патологий. Также обсуждается диагностическая значимость измерения уровня КФБ в сыворотке крови и терапевтический потенциал различных видов специфической терапии для когорты пациентов с хронической болезнью почек, ишемической болезнью сердца и ишемией головного мозга.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы; минеральный гомеостаз; хроническая болезнь почек; сердечно-сосудистые события; дисфункция эндотелия; кальцификация сосудов; атеросклероз.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

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».

Для цитирования:

Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы: на пути к формированию патогенетической концепции. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020;5(1): <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-1-78-93>

*Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич, 6650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6, E-mail: antonkutikhin@gmail.com
©Кутихин А.Г.

ORIGINAL RESEARCH

CALCIUM PHOSPHATE BIONS: TOWARDS A PATHOGENETIC CONCEPT

ANTON G. KUTIKHIN

*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation***Abstract**

Supersaturation of blood with calcium and phosphate is associated with higher risk of major adverse cardiovascular events; however, pathophysiological basis of such association remains unclear. Upon an excess of serum calcium and phosphate, mineral chaperone fetuin-A aggregates mineral ions into calcium phosphate bions (CPB, alternatively termed calciprotein particles), which are irreversibly internalised by endothelial cells causing lysosome membrane permeabilisation, non-specific inflammatory response and cell death. Altogether, these processes contribute to pathological microenvironment potentiating endothelial dysfunction, osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells, and adventitial inflammation which in turn culminate into intimal hyperplasia and medial arterial calcification. Albeit the correlation between increased CPB count in the blood and higher risk of cardiovascular events/cardiovascular death has initially been found in patients with chronic kidney disease, recent investigations suggest similar scenario in patients with arterial hypertension and coronary artery disease without renal dysfunction testifying to the general pathophysiological mechanism. Here we dis-

cuss the existing data on how CPB do form and how they affect the development of cardiovascular disease. We further consider advantages and shortcomings of the relevant experimental models as well as diagnostic significance of measuring CPB in the serum and clinical potential of anti-CPP therapies for the patients with chronic kidney disease, coronary artery disease, and cerebrovascular disease.

Keywords: calcium phosphate bions; mineral homeostasis; chronic kidney disease; cardiovascular events; endothelial dysfunction; vascular calcification; atherosclerosis.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

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

For citation:

Anton G. Kutikhin. Calcium phosphate bions: towards a pathogenetic concept. *Fundamental and clinical medicine*. 2020; 5(1); <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-1-78-93>

****Corresponding author:**

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

© Dr. Anton G. Kutikhin

Природа и биологический смысл кальций-фосфатных бионов

Из клинических исследований достаточно давно известно, что повышенный уровень ионов кальция и фосфора в крови ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями (ишемической болезнью сердца, острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболеваниями

периферических артерий) [1, 2, 3]. Кроме того, сниженный уровень ингибиторов эктопической кальцификации фетуина-А и альбумина в крови также ассоциирован с повышенным риском развития ишемической болезни сердца [4, 5]. В то же время свободные ионы кальция и фосфора могут приводить к прямой кальцификации средней оболочки сосудов (медии), однако не вызывают собственно атеросклероза [6, 7] – хронического воспалительного процесса, ха-

◀ English

рактеризующегося формированием гетерогенных бляшек из клеток, внеклеточного матрикса и липидов во внутренней оболочке артерий [8, 9]. При критическом сужении артериального просвета или разрыве бляшки с последующим тромбозом происходит критическое падение уровня необходимого кровотока, что приводит к острому несоответствию объема поступающего в ткани кислорода необходимому для поддержания их жизнеспособности объему [8, 9]. Клинически это проявляется инфарктом миокарда (при нарушении сердечного кровотока), острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу (при нарушении церебрального кровотока) и заболеваниями периферических артерий [8, 9].

Ингибирование кальцификации меди в крови осуществляется за счет функционирования ряда белков, при этом три различных механизма связывания кальция представлены альбумином, остеонектином и фетуином-А [10]. Альбумин связывает ионизированный кальций посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, а остеонектин – при помощи EF-руки, специфического белкового домена [10]. Связывание кальция фетуином-А обусловлено отрицательными зарядами β -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [10]. Таким образом, альбумин и остеонектин связывают свободный кальций с низкой и высокой аффинностью соответственно, а фетуин-А отвечает за высокоаффинное связывание фосфата кальция [10]. Кроме альбумина, остеонектина и фетуина-А в систему эндогенных ингибиторов внескелетной кальцификации также входят матриксный Gla-белок и Gla-богатый белок, относящиеся к семейству витамин К-зависимых белков и содержащих 5 и 15 групп γ -карбоксилированного глутамата (Gla) соответственно [11–13]. Образующие в результате витамин К-зависимой посттрансляционной модификации (γ -карбоксилирования) Gla-группы позволяют этим белкам связывать как ионизированный кальций, так и кальций в составе различных химических соединений [14–17]. Другой ингибитор эктопической кальцификации – трансмембранный белок Klotho является корецептором для фактора роста фибробластов-23, снижая реадсорбцию фосфатов в проксимальных канальцах почек и синтез кальцитриола (1,25-дигидроксивитамина D) [18]. В свою очередь остеопротеге-

рин является нейтрализующим рецептором для RANK-лиганда [19] и за счет этого препятствует остеокластной дифференцировке и дезинтеграции костного материала остеокластами, предотвращая развитие остеопенического синдрома [20, 21]. Несмотря на то, что механизм антикальцифицирующего действия остеопонтина неясен, его роль в поддержании минерального гомеостаза также считается доказанной [22, 23].

Помимо указанных белков к эндогенным ингибиторам эктопической минерализации относятся неорганический пирофосфат, образующийся при гидролизе АТФ эктонуклеотидпирофосфатазами/фосфодиэстеразами, состоящий из связанных гидролизуемым эфиром двух фосфатных групп и препятствующий нуклеации аморфного фосфата кальция, его кристаллизации до гидроксиапатита, а также ингибирующий рост кристаллов гидроксиапатита путем связывания с его поверхностью [13].

В свою очередь, связывание фосфата кальция основным ингибитором внескелетной минерализации фетуином-А также осуществляется по двум различным механизмам [26]. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция [26]. Несмотря на теоретическую возможность их физико-химической характеристики методами высокоразрешающей электронной микроскопии и элементного анализа, на данный момент изучение роли таких кластеров в нормальной и патологической физиологии представляется технически затруднительным вследствие их чрезвычайно малой размерности, не позволяющей проводить биологические эксперименты на должном уровне. Вторым механизмом связывания фетуином-А фосфата кальция является формирование кальций-фосфатных бионов (КФБ) – кристаллических частиц гидроксиапатита и карбонатгидроксиапатита 80-500 нм в диаметре, имеющих губчатую структуру и включающих в себя еще ряд белков сыворотки крови [10, 24-30]. Таким образом, при избытке ионов кальция и фосфора или нарушении их выведения КФБ способны накапливаться в крови человека [29, 30]. В целом семейство бионов представляет собой минерало-органические частицы, формирующиеся в биологических жидкостях при их перенасыщении определенными катионами и анионами [29, 30].

В экспериментах нашей группы [30] было показано, что при добавлении в культураль-

ную среду КФБ не происходит кальцификации используемого для изготовления биопротезов бычьего и свиного перикарда независимо от способа его химической обработки, в то время как обогащенная солями кальция и фосфора среда приводит к формированию массивных минеральных отложений. Кроме того, внутривенное введение КФБ не вызывало гипертрофии интимы брюшной аорты крыс [30], что также косвенно демонстрирует их неспособность индуцировать формирование очагов эктопической (в частности, сосудистой) кальцификации. Данные результаты подтвердили гипотезу о том, что формируемые эндогенно при перенасыщении крови ионами кальция и фосфора КФБ являются механизмом защиты от прямой эктопической кальцификации тканей, в том числе препятствуя патологической минерализации элементов системы кровообращения [29, 30].

Клиническое значение КФБ

Вместе с тем было выявлено, что КФБ выделяются из приблизительно 75% атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, оказывают прямое цитотоксическое действие на эндотелиальные клетки *in vitro*, стимулируют выделение ими провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8, а при предварительном повреждении интимы брюшной аорты крыс баллоном вызывают ее гипертрофию, являющуюся характерным признаком атеросклероза [30]. Таким образом, защищая организм от «большого зла» – быстрой и массивной кальцификации сосудов [31, 32], КФБ тем не менее потенциально могут являться одним из триггеров атеросклероза.

Поскольку атеросклероз продолжает оставаться ведущей причиной смерти как в развитых, так и в развивающихся странах [33], а повреждение внутренней выстилки артерий (эндотелия) является обязательным условием для его развития [34, 35], изучение триггеров дисфункции и повреждения эндотелия имеет достаточно большую актуальность. Вместе с тем при повреждении стенки сосуда со стороны просвета различными агентами первичный клеточный ответ поступает в том числе со стороны адвентиции [36]. В результате воздействия различных провоспалительных молекул [37], поступающих из системного кровотока посредством парацеллюлярного транспорта к *vasa vasorum* и лимфатическим сосудам адвен-

тиции [37, 38], осуществляется активация адвентициальных фибробластов с формированием синтетически активных миофибробластов, пролиферация миофибробластов и их миграция из адвентиции в сторону просвета сосуда [39, 40], а также увеличивается количество макрофагов, лимфоцитов [41, 42] и *vasa vasorum* (система сосудов, ответственная за кровоснабжение стенки основного сосуда) [43], что в конечном счете ведет к образованию неинтимы. Также стоит отметить, что большое скопление лимфоцитов в адвентиции при воспалении вызывает образование лимфоидных фолликулов [36]. Увеличение количества *vasa vasorum* влечет за собой повышенную секрецию эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, способствующих прикреплению моноцитов к эндотелию и их миграции в интиму с последующей дифференцировкой в макрофаги и образованием пенных клеток [36]. Все вышеуказанное позволяет предположить, что воздействие КФБ также может вызывать определенный патологический ответ не только со стороны просвета сосуда, но и в адвентиции.

Ранее сферические наночастицы гидроксиапатита были идентифицированы в коронарных артериях и аорте пациентов с атеросклерозом [44], а также в аорте и подвздошных артериях больных с уремией, являющейся фактором риска развития атеросклероза [45, 46]. Клиническая значимость феномена образования КФБ в крови также обусловлена повышенной склонностью сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью и больных артериальной гипертензией к формированию КФБ в сравнении с сывороткой условно здоровых доноров крови [47]. Кроме того, повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с хронической болезнью почек 3 и 4 стадий [48], а также у больных терминальной хронической почечной недостаточностью [49], включая перенесших трансплантацию почки [50–52]. При этом пациенты с увеличенной склонностью сыворотки крови к формированию КФБ характеризуются повышенным риском смерти как от всех, так и отдельно от сердечно-сосудистых причин [50–52], а также повышенным риском развития инфаркта миокарда и заболеваний периферических артерий [49]. Последние исследования также демонстрируют, что повышен-

ная склонность сыворотки к формированию КФБ ассоциирована с более выраженным коронарным кальцинозом и более высоким риском прогрессирования этого патологического процесса у пациентов с хронической почечной недостаточностью на различных стадиях, исключая начальную и терминальную [53]. Это косвенно подтверждается данными о том, что высокое содержание КФБ в системном кровотоке может служить суррогатным маркером коронарного атеросклероза, коррелируя как с объемом бляшки в целом, так и с объемом ее липидного компонента, а также превалируя у пациентов с острым коронарным синдромом в сравнении с субъектами со стабильной стенокардией [54].

Кроме того, в последних исследованиях удалось успешно детектировать КФБ в сыворотке крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [55] и преддиализной ее стадией [56, 57] при помощи проточной цитометрии с использованием специфичных к фосфату кальция и клеточным мембранам флюоресцентных маркеров [55, 56] и динамического рассеяния света [57]. Проточная цитометрия при помощи аналогичного окрашивания также позволила детектировать КФБ в перитонеальном диализате пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [58]. Электронная и атомно-силовая микроскопия являются альтернативным методом детекции КФБ в осадке после центрифугирования сыворотки пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью [57, 59–61], однако данные методы в силу трудоемкости и относительной малодоступности едва ли могут быть применены в клинической практике.

Идентификация КФБ как биомаркера и тем более – как пускового фактора дисфункции и повреждения эндотелия требует предложения способов их элиминации из системного кровотока после выполнения ими своей защитной функции – нейтрализации избыточных ионов кальция и фосфора. В этом отношении интересны результаты рандомизированного клинического испытания ТАСТ (Trial to Assess Chelation Therapy), которое включило 1708 пациентов (50 лет и старше) с инфарктом миокарда в анамнезе, получавших (839 больных) или не получавших (869 больных) в течение 30 недель 40 внутривенных инфузий объемом 500 мл, включавших 3 г динатриевой соли этилендиаминтетра-

уксусной кислоты (1,5 г/л) как хелатирующего агента в сочетании с витаминной и электролитной смесью. У получавших указанную терапию пациентов в 1,22 раза реже регистрировалась первичная комбинированная конечная точка (в которую входили летальный исход независимо от причины, повторный инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, коронарная реваскуляризация или госпитализация по поводу стенокардии) [62]. Данный эффект был особенно выражен на когорте пациентов с сахарным диабетом, первичная комбинированная конечная точка у которых отмечалась в 1,69 раза реже [63], и на субкогорте пациентов с сахарным диабетом и заболеваниями периферических артерий, являющихся клиническим проявлением мультифокального атеросклероза, у которых снижение частоты первичной комбинированной конечной точки достигло 1,92 раза [65]. Эти результаты приобретают особый интерес в свете того, что пик формирования КФБ в крови приходится на первые 2 часа после приема пищи; таким образом, существует ассоциативная связь между постпрандиальной гликемией и образованием КФБ [64]. Положительным эффектом протестированного в исследовании ТАСТ режима терапии также является его безопасность [66]. В то же время низкая биодоступность динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты при пероральном употреблении (около 5%) [67] существенно ограничивает ее клиническое применение, а внутривенный путь введения лекарственных средств в регулярной терапевтической практике в настоящее время считается сопряженным с достаточно высоким риском осложнений.

Таким образом, как с позиции частной патологической физиологии и фундаментальной кардиологии, так и с клинической точки зрения представляется важным подробное изучение механизмов патогенного, а в особенности – эндотелиотоксического действия КФБ, поскольку именно эндотелиальные клетки непосредственно контактируют с находящимися в системном кровотоке минерало-органическими частицами.

Физико-химические свойства КФБ и их связь с их патогенными эффектами

Проведенные ранее эксперименты позволили предположить, что при умеренном перенасыщении крови ионами кальция и фосфора могут образовываться КФБ сферической формы, а

при тяжелом перенасыщении – КФБ игольчатой формы [68, 69]. При этом известно, что форма наночастиц гидроксипатита является одним из основных факторов, определяющих их токсичность; в частности, наночастицы игольчатой формы значительно токсичнее сферических [70–72], причем данная зависимость также характерна и для других типов наночастиц, не являясь специфичной для гидроксипатита или форм фосфата кальция в целом [73]. Токсичность кристаллов гидроксипатита определяется в том числе другими физико-химическими параметрами, такими как размерность [69, 70, 74], степень кристалличности [75], площадь поверхности [76], соотношение продольного и поперечного диаметров [76], а также наличие или отсутствие белковой оболочки [59]. Интересно, что значение для цитотоксичности КФБ имеют даже на первый взгляд незначительные различия их формы; так, игольчатые КФБ токсичнее палочковидных [76].

В целом принято считать, что токсичность наночастиц является мультифакториальным феноменом и определяется их размерностью, формой, степенью кристалличности, зарядом и площадью поверхности, а также минеральным и органическим составом [77–79]. Надлежащая характеристика физических и химических свойств бионов требует сочетания современных методов визуализации и химического материаловедения, включая электронную и атомно-силовую микроскопию, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, методы элементного анализа и определения функциональных групп, рентгеновскую дифрактометрию, аналитический электрофорез и хромато-масс-спектрометрию [77–79]. Важными особенностями физико-химического анализа бионов являются необходимость использования электронной и атомно-силовой микроскопии высокого разрешения, а также оценки органического профиля, так как бионы характеризуются адсорбцией макромолекул из окружающей биологической жидкости [80–82]. Кроме того, при перенасыщении окружающей среды определенными ионами может происходить смена входящих в состав бионов функциональных групп; так, искусственно синтезированные кальций-карбонатные и кальций-сульфатные бионы могут переходить в КФБ при перенасыщении среды фосфат-анионом посредством реакций ионного обмена, а также путем растворения и повторной преципитации, однако реле-

вантность этих экспериментов происходящим *in vivo* биохимическим процессам остается неясной [83].

В то же время результаты приведенных выше работ существенно различаются в зависимости от сочетания указанных факторов. К примеру, окруженные белковой оболочкой сферические наночастицы гидроксипатита (КФБ) менее 300 нм в диаметре не вызывали выброса активных форм кислорода или выделения провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β в экспериментах на линии макрофагов человека THP-1 [69] в сравнении с микроразмерными (более 1 мкм) частицами, в то время как сферические наночастицы гидроксипатита без белковой оболочки диаметром около 100 нм, напротив, стимулировали выделение интерлейкина-1 β первичными полученными из костного мозга дендритными клетками мыши в сравнении с аналогичными частицами диаметром 20 и 100 мкм [70]. Частицы гидроксипатита с меньшей степенью кристалличности были более токсичными для первичных клапанных интерстициальных и эндотелиальных клеток свиньи, чем более кристаллизированные частицы [75], однако для первичных аортальных гладкомышечных клеток человека состоящие из аморфного фосфата кальция частицы были нетоксичны, в отличие от кристаллов гидроксипатита [84]. Кроме того, эксперименты на иммортализованных макрофагах крысы продемонстрировали, что именно кристаллические, но не аморфные КФБ способны вызывать опосредованное сигнальным путем Толл-подобных рецепторов выделение интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли [85]. Различия в форме и кристалличности КФБ также влияют на их интернализацию и распределение в организме, что с целью сохранения логичности описания их токсических эффектов и их механизмов будет описано в последующих разделах.

Патогенные эффекты КФБ *in vivo*

Возможность формирования КФБ на животной модели была впервые показана при курсовом введении ингибитора костной минерализации этидроната [86]. Подкожная инъекция этидроната крысам в дозировке 8 мг/100 г массы тела приводило к повышению уровня общего кальция в 1,8 раза (до 4,3 ммоль/л), фосфора в 1,6 раза (до 5,6 ммоль/л), а матриксного Gla-белка – в 25 раз (до 12 мкг/мл), что в ре-

зультате приводило к образованию в системном кровотоке минерало-органических наночастиц, на 80% состоявших из фетуина-А, на 18% – из минеральной составляющей и на 2% – из матричного Gla-белка [86]. Максимальная концентрация КФБ в сыворотке наблюдалась через 6 часов после введения этидроната, при этом выведение КФБ осуществлялось в течение 24 часов [86]. Напротив, введение ингибиторов костной резорбции кальцитонина, алендроната, ибандроната и остеопротегерина предотвращало подобные эффекты этидроната, доказывая причинно-следственную связь между опосредованной функционированием остеокластов костной резорбцией, повышением уровня кальция и фосфора в крови и формированием КФБ [87, 88]. При помощи повышения дозировки этидроната до 32 мг/100 г массы тела удалось провести осаждение КФБ при помощи стандартного центрифугирования (16,000 x g), в то время как дозировка в 8 мг/100 г массы тела позволяла седиментировать КФБ лишь при ультрацентрифугировании (164,000 x g) [89]. Осаждение КФБ также возможно с использованием модели аденин-индуцированной почечной недостаточности крыс [90] и крыс, получающих питание с очень низким содержанием белка (2,5% вместо стандартных 19%) [91], что соответствует подобным клиническим сценариям. Последующий искусственный синтез *in vitro* подтвердил роль фетуина-А в формировании КФБ, воспроизведя полученные при введении этидроната крысам результаты [92].

Флюоресцентное мечение входящего в состав КФБ фетуина-А в процессе искусственного синтеза позволило установить, что период полувыведения КФБ из системного кровотока после их формирования составляет всего лишь 45 минут, при этом КФБ частично депонируются в клетках Купфера (резидентных макрофагах печени) уже через 2 минуты после введения, и период их полувыведения в них составляет 3 минуты [93] с практически полной элиминацией через 25 минут [85]; в то же время эксперименты с различными видами КФБ указывают на длительное задерживание флюоресцентного сигнала в клетках Купфера, не ослабевающее даже через 30 минут после введения, что может зависеть от степени кристалличности и вида фосфата кальция, входящего в состав КФБ [85]. Через 25 минут после инъекции высококристаллические КФБ также наблюдались и в эндотелиальных клетках синусоидных капил-

ляров печени [85]. В целом скорость элиминации КФБ в печени и участие эндотелиальных клеток синусоидных капилляров печени в этом процессе определялось их физико-химическими свойствами, что подчеркивает важность их изучения и детального описания протокола искусственного синтеза КФБ.

Отражаемый флюоресцентным сигналом максимум накопления КФБ в печени наблюдался через 30 минут после их внутривенного введения и составлял 31% от введенного количества частиц [93]. Кроме того, КФБ также частично депонировались в макрофагах краевой зоны селезенки, хотя в и полутора- или двукратно меньшем объеме по сравнению с печенью [93]. При этом нокаут гена скавенджер-рецептора AI/II существенно снижал эффективность выведения КФБ из системного кровотока макрофагами печени и селезенки [93]. В свою очередь, нокаут кодирующих фетуин-А и аполипопротеин Е генов у мышей способствовал развитию каротидных атеросклеротических бляшек, сопровождавшихся колокализацией CD68-положительных макрофагов и флюоресцентно меченных КФБ [93].

Внутривенное введение КФБ нормолипидическим крысам после баллонной ангиопластики провоцировало развитие концентрической или эксцентрической гипертрофии интимы, выражающейся в увеличении толщины отношения интимы к меди, уже через 5 недель после введения, однако эти результаты были получены на относительно небольшой выборке животных ($n = 7$ на группу) и поэтому нуждаются в подтверждении [30]. Аналогичные результаты были получены в предыдущих экспериментах на новозеландских белых кроликах, подвергшихся баллонной ангиопластике сонной артерии, однако в них объем выборки был еще меньшим ($n = 2-3$) [94] или эквивалентным ($n = 7$) [95]. Альтернативной моделью могли бы стать мыши с нокаутированными генами, кодирующими аполипопротеин Е или рецептор к липопротеинам низкой плотности, которые вследствие этого обладают врожденной склонностью к развитию атеросклероза, однако в этом случае представляется невозможным отдифференцировать атеросклеротические очаги, сформированные в результате воздействия КФБ. В то же время, возможно, имело бы смысл оценить общий объем атеросклеротического поражения при помощи тотального окрашивания аорты специфичными к липидам кра-

сителями (к примеру, Oil Red). В целом исследований по токсичности КФБ *in vivo* было проведено немного, и особенности формирования неоинтимы при их внутривенном введении, а также способность КФБ вызывать гипертрофию интимы *per se* (без предварительного повреждения артерии) остаются неясными, требую дальнейшего изучения. Также неясно, влияют ли КФБ на развитие воспаления в адвентиции и периваскулярной жировой ткани, которое вносит существенный вклад в развитие атеросклероза наряду с происходящими в неоинтими процессами [36]. Наконец, остается неизвестным, различается ли выраженность патогенных эффектов КФБ в сосудистых сегментах с ламинарным и турбулентным кровотоком.

Патогенные эффекты КФБ *in vitro*

Цитотоксическое действие КФБ было убедительно показано в ряде работ на различных клеточных линиях, включая эндотелиальные клетки [30], сосудистые гладкомышечные клетки [96] и макрофаги [59, 69]. Воздействие КФБ вызывало повышение уровня расщепленных форм ключевых ферментов внутреннего пути апоптоза каспазы-9 и каспазы-3, а также расщепленной формы субстрата каспазы-3 поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1 в эндотелиальных клетках [30], в то время как предварительная обработка макрофагов ингибитором каспаз z-VAD-fmk препятствовала индуцируемой КФБ клеточной гибели [59]. В соответствии с современной классификацией путей клеточной смерти [97] можно предположить, что клеточная гибель при воздействии КФБ действительно идет по внутреннему пути апоптоза, однако проведенные эксперименты не позволяют исключить и других вариантов, в частности, лизосомально-опосредованной клеточной смерти. В то же время КФБ демонстрировали меньшую токсичность для макрофагов в сравнении с кристаллами чистого гидроксиапатита, что свидетельствует в пользу протективной роли входящих в их состав белков (альбумина, фетуина-А и других), в том числе покрывающих их [59].

В качестве морфологического субстрата цитотоксичности КФБ была предположена их интернализация, что было подтверждено при помощи просвечивающей электронной микроскопии после добавления КФБ к культурам иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека [30], первичных аортальных

гладкомышечных клеток свиньи [96] и иммортализованных макрофагов мыши [59]. Предварительная обработка клеток ингибитором полимеризации актина цитохалазином D или ингибитором клатрин-опосредованного эндоцитоза хлорпромазином снижало эффективность интернализации КФБ первичными макрофагами мыши, дифференцированными из соответствующих прогениторов костного мозга, в то время как воздействие ингибитора кавеол-опосредованного эндоцитоза генистеина и ингибитора макропиноцитоза 5-(N,N-диметил)амилорида не оказывало подобного эффекта [93]. Более подробная расшифровка механизма интернализации КФБ показала, что ингибирование опосредующей передачу сигнала при Fcγ-рецептор-опосредованном эндоцитозе фосфоинозитол-3-киназы Ly294002 гидрохлоридом, блокировка активности маннозосвязывающего рецептора маннаном и связывание рецептора конечных продуктов гликирования гликированным сывороточным альбумином также не влияла на интернализацию КФБ вышеуказанной линией первичных макрофагов [93].

В то же время ингибирование скавенджер-рецепторов полиинозиновой кислотой частично препятствовало интернализации КФБ, предполагая их активную роль в этом процессе с учетом участия клатрина и полимеризации актина [93]. Блокирование широкого спектра скавенджер-рецепторов (рецепторов комплемента 3 типа, CD16/CD32, Толл-подобного рецептора 2, Толл-подобного рецептора 4, CD36 и сиалоадгезина) посредством специфических антител не выявило изменений в динамике интернализации КФБ макрофагами, как и нокаут генов, кодирующих CD36, Fcγ-рецептор, аннексины A5 и A6, а также галектины 1 и 3 [93]. Ключевая роль в интернализации КФБ принадлежала скавенджер-рецептору AI/II, нокаут гена которого либо конкурентное связывание со специфическим лигандом ацетилированным липопротеином низкой плотности снижал эффективность этого процесса макрофагами в полтора-два раза [93]. Данные результаты были в дальнейшем подтверждены другой научной группой, в экспериментах которой как полиинозиновая кислота, так и блокада скавенджер-рецептора AI/II специфическим антителом существенно снижали эффективность интернализации КФБ, частично спасали макрофаги от вызываемой КФБ клеточной гибели и снижали выделение ими фактора некроза опухоли [59]. В то же время

воздействие КФБ само по себе провоцировало дозо- и времязависимое увеличение экспрессии этого рецептора на плазматической мембране макрофагов независимо от их апоптоза, запускающая таким образом механизм положительной обратной связи, обуславливающей регуляцию их ускоренной интернализации в аутокринной манере и объясняющей таким образом их высокую цитотоксичность [59]. Специфичность такого эффекта КФБ на молекулярном уровне было подтверждено его неизменностью при добавлении к клеточным культурам ингибитора каспаз z-VAD-fmk [59].

Дальнейшие эксперименты на клеточных культурах продемонстрировали, что объем интернализации КФБ может зависеть от их физико-химических свойств, в частности, формы (сферическая или веретеновидная) и степени их кристалличности [85]. Кроме того, дифференцированные из прогениторов костного мозга первичные макрофаги мыши и первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека характеризовались различной способностью к интернализации вышеуказанных типов КФБ – макрофаги были склонны к интернализации веретеновидных высококристаллических КФБ, в то время как эндотелиальные клетки, напротив, интернализировали сферические низкокристаллические КФБ [85]. Аналогичные результаты были получены на первичных макрофагах человека, дифференцированных из моноцитов, и первичных аортальных эндотелиальных клетках человека [85]. Нокаут гена сквенджер-рецептора AI/II или их блокада соответствующим антителом снижали эффективность интернализации веретеновидных высококристаллических КФБ, однако не влияли на интернализацию сферических низкокристаллических КФБ [85]. Это, в свою очередь, позволило предположить, что КФБ с разными физико-химическими свойствами связываются различными рецепторами, экспрессия которых существенно зависит от типа клеток [85]. В то же время предварительная обработка клеточных культур цитохалазином D, хлорпромазином или полиинозиновой кислотой снижала эффективность интернализации КФБ независимо от их физико-химических свойств [85]. Таким образом, за связывание разных типов КФБ могут быть ответственны различные рецепторы, однако после этого механизм эндоцитоза и внутриклеточного мета-

болизма КФБ является универсальным и поэтому в значительной степени менее зависимым от типа клеток.

Центральную роль в развитии дисфункции эндотелия и нарушении сосудистого гомеостаза играет изменение паракринного профиля эндотелиальных клеток, сопровождающееся выделением провоспалительных цитокинов и сдвигом профиля секретируемых в микроокружение внеклеточных везикул [9, 34, 35, 98, 99]. В настоящее время считается доказанным усиление выделения ряда цитокинов различными типами клеток под воздействием КФБ, включая эндотелиальные [30], сосудистые гладкомышечные [84, 100, 101] и макрофаги [59, 69, 85]. При этом спектры цитокинов, повышено выделяемых указанными видами клеток, частично перекрываются: эндотелиальные клетки независимо от линии характеризуются увеличенной секрецией интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [30], сосудистые гладкомышечные клетки – интерлейкина-1 β , интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли [84, 100, 101], а макрофаги – интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли [59, 69, 85]. Нокаут гена, кодирующего Толл-подобный рецептор 4, приводил к почти полному отсутствию выделения приведенных цитокинов макрофагами как в контрольной культуре, так и при воздействии КФБ, что свидетельствует о его ключевой роли в этом процессе [85]. Интересно, что выделение цитокинов макрофагами также зависело от физико-химических свойств КФБ: сферические низкокристаллические КФБ вызывали повышенную секрецию фактора некроза опухоли, а веретеновидные высококристаллические – интерлейкина-1 β [85]. Выделение провоспалительных цитокинов различными типами клеток сосудистой стенки приводит к их паракринному влиянию друг на друга, что в конечном счете в сочетании с возможным изменением профиля секреции внеклеточных везикул создает провоспалительное микроокружение, способствующее формированию неоинтимы [9, 34, 35, 98, 99].

Одним из ведущих механизмов формирования неоинтимы является пролиферация сосудистых гладкомышечных клеток, в патологических условиях меняющих фенотип с сократительного на синтетический и вследствие этого активно синтезирующих белки экстрацеллюлярного матрикса [102, 103], что в том числе вызывается воздействием КФБ [30]. При этом нарушения местного и системного фос-

форнокальциевого гомеостаза способны приводить к биоминерализации неоинтимы, обусловленной остеогенной дифференцировкой сосудистых гладкомышечных клеток [102-105]. В свою очередь, остеогенная дифференцировка сосудистых гладкомышечных клеток может вызываться непосредственно повышением ионов кальция и фосфора в микроокружении [102], индуцироваться содержащими кальций и фосфаты внеклеточными везикулами, дополнительно генерирующими ионы фосфора за счет эктонуклеотидаз (к примеру, щелочной фосфатазы или 5'-нуклеотидазы) и несущими на своей мембране высокоаффинные к ионам кальция аннексины A2, A5 и A6 [106, 108] или вызываться воздействием КФБ [60, 84, 96, 109, 110]. Данное направление клеточной трансдифференцировки сопровождается постепенным снижением экспрессии гладкомышечных маркеров (альфа-гладкомышечный актин, тяжелые цепи миозина гладких мышц, смузелин, кальпонин) и усилением остеогенных маркеров (остеопонтин, остеокальцин, щелочная фосфатаза, коллаген II и X типа) и управляется транскрипционными факторами RUNX2, Osterix, MSX2 и SOX9 [102]. Кроме того, при остеогенной дифференцировке сосудистых гладкомышечных клеток отмечается повышенная секреция провоспалительных цитокинов [102, 103], что также наблюдалось при воздействии на них КФБ [84, 100, 101].

В частности, добавление КФБ к первичным аортальным гладкомышечным клеткам человека приводила к дозозависимому формированию связанных с клетками кальцификатов в течение суток, причем данный процесс был сопряжен с клеточной жизнедеятельностью, сопровождался интернализацией КФБ и не был характерен для фиксированных параформальдегидом клеток [60, 84, 109]. Кальцификация первичных аортальных гладкомышечных клеток человека ускорялась в присутствии рекомбинантного фактора некроза опухоли, который также выделялся ими в результате экспозиции КФБ, и ингибировалась нокдауном гена, кодирующего этот белок, и гена соответствующего рецептора [84], а также добавлением к клеткам донора обладающего вазо- и цитопротективным действием сульфида водорода гидросульфида натрия [109]. Элиминация КФБ из сыворотки крови пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью предотвращала ее прокальцифицирующее влия-

ние на первичные аортальные гладкомышечные клетки человека, также снижая выделение ими интерлейкина-1 β и циклооксигеназы-2 [60]. Напротив, добавление выделенных из сыворотки крови данных пациентов КФБ к сыворотке крови от контрольных пациентов стимулировало остеогенную дифференцировку аортальных гладкомышечных клеток и выброс ими провоспалительных цитокинов в микроокружение [60]. В свою очередь, эти эффекты нейтрализовывались при добавлении к сыворотке γ -карбоксилированного Gla-богатого белка [60]. В то же время эти данные являются противоречивыми, и в некоторых исследованиях КФБ не вызывали выраженной клеточно-опосредованной кальцификации как иммортализованных аортальных гладкомышечных клеток мыши, так и клеток остеосаркомы человека [110]. Более того, добавление КФБ к клеткам остеосаркомы даже замедляло их минерализацию за счет аккумуляции растворенного кальция и фосфора [110]. Динамика клеточно-опосредованной вызываемой КФБ кальцификации может также варьировать от суток [60, 109] до 28 дней [96].

Несмотря на доказанную токсичность КФБ для эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клеток, их роль в нарушении сосудистого гомеостаза остается в значительной степени нерасшифрованной. В частности, остается неизвестным их влияние на некоторые клеточные популяции адвентиции (лимфоциты, фибробласты, первичные адвентициальные макрофаги), а также на периваскулярные адипоциты. Отсутствие транскриптомного или протеомного профилирования первичных сосудистых клеточных линий при воздействии на них КФБ ограничивает понимание специфичности и других характеристик молекулярного ответа на эти частицы. Неясно, вызывает ли воздействие КФБ повышение экспрессии способствующих прикреплению лейкоцитов молекул клеточной адгезии на плазматической мембране эндотелиальных клеток, нарушение эндотелиальной механотрансдукции или развитие феноменов трансдифференцировки, к примеру, эндотелиально-мезенхимального перехода или перехода гладкомышечных клеток в миофибробласты, макрофаги или остеобласты. Также остается совершенно неисследованным изменение профиля секреторируемых в микроокружение внеклеточных везикул сосудистыми клетками под воздействием КФБ.

Актуальные и нерешенные вопросы

К настоящему времени накоплено достаточное количество данных о функционировании системы минерального гомеостаза, обеспечивающей предотвращение эктопической кальцификации в организме человека. Доказано, что равновесие в этой системе поддерживается за счет целого ряда белков-ингибиторов, регулирующих костную резорбцию, связывающих свободные ионы кальция или нейтрализующих сформированные соединения фосфата кальция. Решающая роль в этом процессе принадлежит обладающему наибольшей avidностью и аффинностью к фосфату кальция фетуину-А, а также связывающему ионы кальция с низкой аффинностью, но присутствующему в чрезвычайно большом количестве в крови альбумину.

В случае неспособности системы минерального гомеостаза справиться с перенасыщением кальция и фосфора в крови при помощи связывания соответствующих ионов или нейтрализации фосфата кальция посредством образования субнаноразмерных кластеров в действие вступает еще один ключевой механизм поддержания фосфорнокальциевого гомеостаза – формирование КФБ. Данный механизм по своим возможностям депонирования кальция и фосфора не уступает субнаноразмерной кластеризации; в то же время, в отличие от этого механизма, КФБ не являются безвредными, обладая существенной токсичностью для эндотелия.

Морфологическим субстратом этого феномена является интернализация КФБ эндотелиальными клетками, что вызывает как их гибель по внутреннему пути апоптоза либо имеющим с ним общие эффекторные белки путем клеточной смерти, так и усиливает выделение провоспалительных цитокинов, что паракринно способствует созданию патологически измененного микроокружения и развитию дисфункции эндотелия. В конечном счете это может привести к нарушению целостности эндотелия, которое является доказанным пусковым фактором этиопатогенеза атеросклероза. Последствием вызванного воздействием КФБ повреждения эндотелия может быть формирование неинтимы, являющееся неотъемлемым звеном патогенеза атеросклероза и морфологическим субстратом развития стеноза. В ряде исследований было показано, что КФБ также способны стимулировать выделение гладкомышечными клетками провоспалительных цитокинов в ми-

кроокружение и запускать сдвиг их фенотипа с контрактильного на остеогенный, однако остается неясным, насколько полученные на клеточных культурах данные релевантны происходящему *in vivo* сценарию.

Клиническая актуальность КФБ как звена патогенеза связанных с дисфункцией эндотелия заболеваний обусловлена возможностью их измерения в сыворотке крови при помощи проточной цитометрии или склонности сыворотки крови к их формированию при помощи микропланшетной турбидиметрии. Последние клинико-эпидемиологические работы предоставили достаточно убедительные данные о том, что повышенная склонность сыворотки крови к формированию КФБ связана с увеличенным риском острых сердечно-сосудистых событий, сердечно-сосудистой смерти и, следовательно, неблагоприятным прогнозом как у пациентов с хронической почечной недостаточностью на разных стадиях, так и у других когорт, к примеру, у больных артериальной гипертензией. Кроме того, пациенты с острым коронарным синдромом и без выраженной хронической почечной недостаточности характеризуются более высоким содержанием КФБ в сыворотке крови, чем аналогичные больные со стабильной стенокардией, что может отражать связь КФБ с прогнозом ишемической болезни сердца и без почечной коморбидности. Относительный успех клинического испытания по эффективности динатриевой соли этилендиамина-тетрауксусной кислоты в профилактике острых сердечно-сосудистых событий после инфаркта миокарда, в особенности у больных сахарным диабетом и пациентов с заболеваниями периферических артерий, позволяет также осуществлять фармакологическое воздействие на КФБ как звено патогенеза, хотя низкая биодоступность данного химического соединения при пероральном применении существенно ограничивает возможности его клинического использования.

Несмотря на убедительные доказательства токсического действия КФБ на эндотелий, остается неизвестным, чем обусловлено это явление – специфическим химическим составом КФБ или их корпускулярной природой, общей для всех типов эндогенных наночастиц и многих вводимых в кровь наноразмерных средств таргетной доставки лекарственных препаратов [111, 112]. Для получения ответа на данный вопрос представляется необходи-

мым решить задачу искусственного синтеза «идеальной группы сравнения» – наночастиц, которые бы не могли быть синтезированы эндогенно в условиях человеческого организма, но которые бы не отличались от КФБ ничем, кроме собственно составляющих их минералов. Было предположено, что в качестве подобной группы сравнения могут выступить магний-фосфатные бионы (МФБ), поскольку: 1) по литературным данным МФБ наиболее близки к КФБ по размерности и форме [29];

2) МФБ не способны образовываться в организме человека вследствиекратно превышающей летальную дозы ионов магния (Mg^{2+}), необходимой для их синтеза. Таким образом, использование МФБ в качестве контрольной группы позволяет надежно дифференцировать механизм эндотелиотоксического действия КФБ и сопоставить его с происходящим *in vivo* сценарием. В то же время эта гипотеза нуждается в экспериментальной проверке.

Литература / References:

- Lind L, Skarfors E, Berglund L, Lithell H, Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J Clin Epidemiol*. 1997;50(8):967-973. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(97\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(97)00104-2).
- Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*. 2008;156(3):556-563. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.05.016>.
- Larsson TE, Olauson H, Hagström E, Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, Sundström J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):333-339. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.196675>.
- Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000;321(7255):199-204. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7255.199>.
- Sun ZL, Xie QY, Guo GL, Ma K, Huang YY. Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:691540. <https://doi.org/10.1155/2014/691540>.
- El-Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, Yang HY, Bartley BA, Quan KK, Ingalls CM, Liao HW, Giachelli CM. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int*. 2009;75(12):1297-1307. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.83>.
- Sonou T, Ohya M, Yashiro M, Masumoto A, Nakashima Y, Ito T, Mima T, Negi S, Kimura-Suda H, Shigematsu T. Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(11):1197-1206. <https://doi.org/10.5551/jat.28647>.
- Yurdagul A Jr, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J*. 2016; 473 (10): 1281-1295. <https://doi.org/10.1042/BJ20150844>.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
- Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jähnen-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem*. 2003;278(15):13333-13341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210868200>.
- Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81.
- Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R, Luís IM, Costa RM, Santos S, Cavaco S, Neves J, Macedo AL, Willems BA, Vermeer C, Simes DC. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):399-408. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304823>.
- Bäck M, Aranyi T, Cancela ML, Carracedo M, Conceição N, Leftheriotis G, Macrae V, Martin L, Nitschke Y, Pasch A, Quagliano D, Rutsch F, Shanahan C, Sorribas V, Szeri F, Valdivielso P, Vanakker O, Kempf H. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front Cardiovasc Med*. 2019;5:196. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00196>.
- Berkner KL. Vitamin K-dependent carboxylation. *Vitam Horm*. 2008;78:131-156. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00007-6).
- Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol Med*. 2013;19(4):217-226. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.008>.
- Rafael MS, Cavaco S, Viegas CS, Santos S, Ramos A, Willems BA, Herfs M, Theuwissen E, Vermeer C, Simes DC. Insights into the association of Gla-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and γ -carboxylation status. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(8):1636-1646. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300941>.
- Tesfamariam B. Involvement of Vitamin K-Dependent Proteins in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019;24(4):323-333. <https://doi.org/10.1177/1074248419838501>.
- Mencke R, Hillebrands JL; NIGRAM consortium. The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology. *Ageing Res Rev*. 2017;35:124-146. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.001>.
- Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin.

- Circ Res. 2004;95(11):1046-1057.
20. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-1268.
 21. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000;192(4):463-474.
 22. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 2002;161(6):2035-2046.
 23. Paloian NJ, Leaf EM, Giachelli CM. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. *Kidney Int.* 2016;89(5):1027-1036. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.12.046>.
 24. Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schäfer C, Jahn-Dechent W. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14815-14825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709938200>.
 25. Heiss A, Jahn-Dechent W, Endo H, Schwahn D. Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids. *Biointerphases.* 2007;2(1):16-20. <https://doi.org/10.1116/1.2714924>.
 26. Heiss A, Pipich V, Jahn-Dechent W, Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J.* 2010;99(12):3986-3995. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.030>.
 27. Rochette CN, Rosenfeldt S, Heiss A, Narayanan T, Ballauff M, Jahn-Dechent W. A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study. *Chembiochem.* 2009;10(4):735-740. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800719>.
 28. Chang JC, Miura RM. Regulatory inhibition of biological tissue mineralization by calcium phosphate through post-nucleation shielding by fetuin-A. *J Chem Phys.* 2016;144(15):154906. <https://doi.org/10.1063/1.4946002>.
 29. Wu CY, Young L, Young D, Martel J, Young JD. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013;8(9):e75501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075501>.
 30. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filip'ev DE, Golovkin AS, Shishkova DK, Burago AY, Frolov AV, Dolgov VY, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Vladimirov AA, Sozinov SA, Ismagilov ZR, Russakov DM, Lomzov AA, Pyshnyi DV, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Demidov EA, Peltek SE, Dolganyuk VF, Babich OO, Grigoriev EV, Brusina EB, Barbarash OL, Yuzhalin AE. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep.* 2016;6:27255. <https://doi.org/10.1038/srep27255>.
 31. Molenaar FM, van Reekum FE, Rookmaaker MB, Abrahams AC, van Jaarsveld BC. Extrasosseous calcification in end-stage renal disease: from visceral organs to vasculature. *Semin Dial.* 2014; 27 (5): 477-487. <https://doi.org/10.1111/sdi.12177>.
 32. Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, Goverman J, Malhotra R, Jackson VA, et al. Calciphylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. *Am J Kidney Dis.* 2015; 66 (1): 133-146. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.01.034>.
 33. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017; 390 (10100): 1151-1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9).
 34. Jensen HA, Mehta JL. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2016; 14 (9): 1021-1033. <https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1207527>.
 35. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis.* 2016; 248: 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>.
 36. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries. *Circulation.* 2014;129:2557-2566. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189>.
 37. Michel JB, Thauat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1259–1268. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.137851>;
 38. Gössl M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2019–H2026. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00399.2003>;
 39. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;94:1655–1664. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.7.1655>;
 40. Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation.* 1996;93:340–348. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.93.2.340>;
 41. Jabs A, Okamoto E, Vinten-Johansen J, Bauriedel G, Wilcox JN. Sequential patterns of chemokine- and chemokine receptor-synthesis following vessel wall injury in porcine coronary arteries. *Atherosclerosis.* 2007;192:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.050>;
 42. Moos MP, John N, Gräbner R, Nossman S, Günther B, Vollandt R, Funk CD, Kaiser B, Habenicht AJ. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2386–2391. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000187470.31662.fe>;
 43. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR, Richardson DM, Ritman EL, Lerman A. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res.* 2001;51:762–766. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00347-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00347-9);
 44. Bertazzo S, Gentleman E, Cloyd KL, Chester AH, Yacoub MH, Stevens MM. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat Mater.* 2013;12(6): 576-583. <https://doi.org/10.1038/nmat3627>.
 45. Schlieper G, Grottemeyer D, Aretz A, Schurgers LJ, Krüger T, Rehbein H, Weirich TE, Westenfeld R, Brandenburg VM, Eitner F, Mayer J, Floege J, Sandmann W, Ketteler M. Analysis of calcifications in patients with coral reef aorta. *Ann*

- Vasc Surg. 2010;24(3): 408-414. [https://doi.org/ 10.1016/j.avsg.2009.11.006](https://doi.org/10.1016/j.avsg.2009.11.006).
46. Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes SC, Krüger T, Behets GJ, Ghadimi R, Weirich TE, Rohrmann D, Langer S, Tordoir JH, Amann K, Westenfeld R, Brandenburg VM, D'Haese PC, Mayer J, Ketteler M, McKee MD, Floege J. Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4): 689-696. [https://doi.org/ 10.1681/ASN.2009080829](https://doi.org/10.1681/ASN.2009080829).
 47. Pruijm M, Lu Y, Megdiche F, Piskunowicz M, Milani B, Stuber M, Bachtler M, Vogt B, Burnier M, Pasch A. Serum calcification propensity is associated with renal tissue oxygenation and resistive index in patients with arterial hypertension or chronic kidney disease. *J Hypertens.* 2017;35(10):2044-2052. [https://doi.org/ 10.1097/HJH.0000000000001406](https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001406).
 48. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Bodenham E, McMahon LP, Farese S, Rajkumar C, Holt SG, Pasch A. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):339-348. [https://doi.org/ 10.1681/ASN.2013060635](https://doi.org/10.1681/ASN.2013060635).
 49. Pasch A, Block GA, Bachtler M, Smith ER, Jahn-Dechent W, Arampatzis S, Chertow GM, Parfrey P, Ma X, Floege J. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE Trial. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(2):315-322. [https://doi.org/ 10.2215/CJN.04720416](https://doi.org/10.2215/CJN.04720416).
 50. Keyzer CA, de Borst MH, van den Berg E, Jahn-Dechent W, Arampatzis S, Farese S, Bergmann IP, Floege J, Navis G, Bakker SJ, van Goor H, Eisenberger U, Pasch A. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):239-248. [https://doi.org/ 10.1681/ASN.2014070670](https://doi.org/10.1681/ASN.2014070670).
 51. Dahle DO, Åsberg A, Hartmann A, Holdaas H, Bachtler M, Jenssen TG, Dionisi M, Pasch A. Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2016;16(1):204-212. [https://doi.org/ 10.1111/ajt.13443](https://doi.org/10.1111/ajt.13443).
 52. Bostom A, Pasch A, Madsen T, Roberts MB, Franceschini N, Steubl D, Garimella PS, Ix JH, Tuttle KR, Ivanova A, Shireman T, Gohh R, Merhi B, Jarolim P, Kusek JW, Pfeffer MA, Liu S, Eaton CB. Serum Calcification Propensity and Fetuin-A: Biomarkers of Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *Am J Nephrol.* 2018;48(1):21-31. [https://doi.org/ 10.1159/000491025](https://doi.org/10.1159/000491025).
 53. Bundy JD, Cai X, Scialla JJ, Dobre MA, Chen J, Hsu CY, Leonard MB, Go AS, Rao PS, Lash JP, Townsend RR, Feldman HI, de Boer IH, Block GA, Wolf M, Smith ER, Pasch A, Isakova T; CRIC Study Investigators. Serum Calcification Propensity and Coronary Artery Calcification Among Patients With CKD: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *Am J Kidney Dis.* 2019;73(6):806-814. [https://doi.org/ 10.1053/j.ajkd.2019.01.024](https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.01.024).
 54. Nakazato J, Hoshida S, Wake M, Miura Y, Kuro-O M, Kario K. Association of calciprotein particles measured by a new method with coronary artery plaque in patients with coronary artery disease: A cross-sectional study. *J Cardiol.* 2019 May 15. pii: S0914-5087(19)30115-30117. [https://doi.org/ 10.1016/j.jjcc.2019.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2019.04.008).
 55. Smith ER, Hewitson TD, Cai MMX, Aghagolzadeh P, Bachtler M, Pasch A, Holt SG. A novel fluorescent probe-based flow cytometric assay for mineral-containing nanoparticles in serum. *Sci Rep.* 2017;7(1):5686. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-017-05474-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05474-y).
 56. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H, Kuro-O M. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2018;8(1):1256. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-018-19677-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19677-4).
 57. Chen W, Anokhina V, Dieudonne G, Abramowitz MK, Kashyap R, Yan C, Wu TT, de Mesy Bentley KL, Miller BL, Bushinsky DA. Patients with advanced chronic kidney disease and vascular calcification have a large hydrodynamic radius of secondary calciprotein particles. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34(6):992-1000. [https://doi.org/ 10.1093/ndt/gfy117](https://doi.org/10.1093/ndt/gfy117).
 58. Cai MMX, Smith ER, Kent A, Huang L, Hewitson TD, McMahon LP, Holt SG. Calciprotein Particle Formation in Peritoneal Dialysis Effluent Is Dependent on Dialysate Calcium Concentration. *Perit Dial Int.* 2018;38(4):286-292. [https://doi.org/ 10.3747/pdi.2017.00163](https://doi.org/10.3747/pdi.2017.00163).
 59. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One.* 2013;8(4):e60904. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0060904](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060904).
 60. Viegas CSB, Santos L, Macedo AL, Matos AA, Silva AP, Neves PL, Staes A, Gevaert K, Morais R, Vermeer C, Schurgers L, Simes DC. Chronic Kidney Disease Circulating Calciprotein Particles and Extracellular Vesicles Promote Vascular Calcification: A Role for GRP (Gla-Rich Protein). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(3):575-587. [https://doi.org/ 10.1161/ATVBAHA.117.310578](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310578).
 61. Smith ER, Hewitson TD, Hanssen E, Holt SG. Biochemical transformation of calciprotein particles in uraemia. *Bone.* 2018;110:355-367. [https://doi.org/ 10.1016/j.bone.2018.02.023](https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.023).
 62. Lamas GA, Goertz C, Boineau R, Mark DB, Rozema T, Nahin RL, Lindblad L, Lewis EF, Drisko J, Lee KL; TACT Investigators. Effect of disodium EDTA chelation regimen on cardiovascular events in patients with previous myocardial infarction: the TACT randomized trial. *JAMA.* 2013;309(12):1241-1250. [https://doi.org/ 10.1001/jama.2013.2107](https://doi.org/10.1001/jama.2013.2107).
 63. Escolar E, Lamas GA, Mark DB, Boineau R, Goertz C, Rosenberg Y, Nahin RL, Ouyang P, Rozema T, Magaziner A, Nahas R, Lewis EF, Lindblad L, Lee KL. The effect of an EDTA-based chelation regimen on patients with diabetes mellitus and prior myocardial infarction in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2014;7(1):15-24. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663](https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000663).
 64. Yamada H, Kuro-O M, Ishikawa SE, Funazaki S, Kusaka I, Kakei M, Hara K. Daily variability in serum levels of calciprotein particles and their association with mineral metabolism parameters: A cross-sectional pilot study. *Nephrology (Carlton).* 2018;23(3):226-230. [https://doi.org/ 10.1111/nep.12994](https://doi.org/10.1111/nep.12994).
 65. Ujueta F, Arenas IA, Escolar E, Diaz D, Boineau R, Mark DB, Golden P, Lindblad L, Kim H, Lee KL, Lamas GA. The effect of EDTA-based chelation on patients with diabetes and peripheral artery disease in the Trial to Assess Chelation Therapy (TACT). *J Diabetes Complications.* 2019;33(7):490-494. [https://doi.org/ 10.1016/j.jdiacomp.2019.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.04.005).
 66. Avila MD, Escolar E, Lamas GA. Chelation therapy after the trial to assess chelation therapy: results of a unique trial. *Curr Opin Cardiol.* 2014;29(5):481-488. [https://doi.org/ 10.1097/HCO.0000000000000096](https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000096).
 67. Foreman H, Trujillo TT. The metabolism of C14 labeled

- ethylenediaminetetraacetic acid in human beings. *J Lab Clin Med.* 1954;43(4):566-571.
68. Young JD, Martel J, Young D, Young A, Hung CM, Young L, Chao YJ, Young J, Wu CY. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One.* 2009; 4 (5): e5421. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0005421](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005421).
69. Peng HH, Wu CY, Young D et al. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small.* 2013;9(13):2297-2307. [https://doi.org/ 10.1002/sml.201202270](https://doi.org/10.1002/sml.201202270).
70. Lebre F, Sridharan R, Sawkins MJ et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci Rep.* 2017;7(1):2922. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-017-03086-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03086-0).
71. Xu Z, Liu C, Wei J, Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J Appl Toxicol.* 2012;32(6):429-435. [https://doi.org/ 10.1002/jat.1745](https://doi.org/10.1002/jat.1745).
72. Zhao X, Ng S, Heng BC, Guo J, Ma L, Tan TT, Ng KW, Loo SC. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Arch Toxicol.* 2013; 87(6):1037-1052. doi: 10.1007/s00204-012-0827-1.
73. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S et al. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):7315. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-017-07588-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9).
74. Shi X, Zhou K, Huang F, Wang C. Interaction of hydroxyapatite nanoparticles with endothelial cells: internalization and inhibition of angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:5781-5795. [https://doi.org/ 10.2147/IJN.S140179](https://doi.org/10.2147/IJN.S140179).
75. Richards JM, Kunitake JAMR, Hunt HB, Wnorowski AN, Lin DW, Boskey AL, Donnelly E, Estroff LA, Butcher JT. Crystallinity of hydroxyapatite drives myofibroblastic activation and calcification in aortic valves. *Acta Biomater.* 2018;71:24-36. [https://doi.org/ 10.1016/j.actbio.2018.02.024](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.024).
76. Santos C, Turiel S, Sousa Gomes P, Costa E, Santos-Silva A, Quadros P, Duarte J, Battistuzzo S, Fernandes MH. Vascular biosafety of commercial hydroxyapatite particles: discrepancy between blood compatibility assays and endothelial cell behavior. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):27. [https://doi.org/ 10.1186/s12951-018-0357-y](https://doi.org/10.1186/s12951-018-0357-y).
77. Love SA, Maurer-Jones MA, Thompson JW, Lin YS, Haynes CL. Assessing nanoparticle toxicity. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2012; 5: 181-205. [https://doi.org/ 10.1146/annurev-anchem-062011-143134](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143134).
78. Lai DY. Toward toxicity testing of nanomaterials in the 21st century: a paradigm for moving forward. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012; 4 (1): 1-15. [https://doi.org/ 10.1002/wnan.162](https://doi.org/10.1002/wnan.162).
79. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett.* 2018; 13 (1): 44. [https://doi.org/ 10.1186/s11671-018-2457-x](https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x).
80. Martel J, Young D, Young A, Wu CY, Chen CD, Yu JS, Young JD. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2011;418(1):111-125. [https://doi.org/ 10.1016/j.ab.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.06.018).
81. Martel J, Wu CY, Hung CY, Wong TY, Cheng AJ, Cheng ML, Shiao MS, Young JD. Fatty acids and small organic compounds bind to mineralo-organic nanoparticles derived from human body fluids as revealed by metabolomic analysis. *Nanoscale.* 2016; 8 (10): 5537-5545. [https://doi.org/ 10.1039/c5nr08116e](https://doi.org/10.1039/c5nr08116e).
82. Wu CY, Martel J, Young JD. Comprehensive organic profiling of biological particles derived from blood. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 11310. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-018-29573-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-29573-6).
83. Wu CY, Young D, Martel J, Young JD. A story told by a single nanoparticle in the body fluid: demonstration of dissolution-reprecipitation of nanocrystals in a biological system. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(17):2659-2676. [https://doi.org/ 10.2217/nmm.15.88](https://doi.org/10.2217/nmm.15.88).
84. Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, Jackson C, Smith ER, Odermatt A, Radpour R, Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis.* 2016;251:404-414. [https://doi.org/ 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044).
85. Köppert S, Büscher A, Babler A, Ghallab A, Buhl EM, Latz E, Hengstler JG, Smith ER, Jahnen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol.* 2018 Sep 4;9:1991. [https://doi.org/ 10.3389/fimmu.2018.01991](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01991).
86. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem.* 2002;277(6):3926-3934.
87. Price PA, Caputo JM, Williamson MK. Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: biochemical evidence for the cancellous bone-remodeling compartment. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1171-1179.
88. Price PA, Williamson MK, Nguyen TM, Than TN. Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat. *J Biol Chem.* 2004;279(3):1594-600.
89. Price PA, Nguyen TM, Williamson MK. Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex. *J Biol Chem.* 2003;278(24):22153-22160.
90. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Fujii N, Takabatake Y, Nagasawa Y, Kawada N, Ito T, Rakugi H, Imai E, Isaka Y. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int.* 2009;75(9):915-928. [https://doi.org/ 10.1038/ki.2008.700](https://doi.org/10.1038/ki.2008.700).
91. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Tsuruya K, Kitazono T, Ooboshi H. Very low protein diet enhances inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremic rats. *Life Sci.* 2016;146:117-123. [https://doi.org/ 10.1016/j.lfs.2015.12.050](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.050).
92. Price PA, Lim JE. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *J Biol Chem.* 2003;278(24):22144-22152.
93. Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, Gräber S, Kinkeldey A, Büscher A, Schmitt MM, Bornemann J, Nimmerjahn F, Herrmann M, Helming L, Gordon S, Jahnen-Dechent W. Clearance of fetuin-A--containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res.* 2012;111(5):575-584. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCRESAHA.111.261479](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261479).
94. Schwartz MA, Lieske JC, Kumar V, Farrell-Baril G, Miller VM. Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: proof of principle. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):243-248.
95. Cenizo Revuelta N, Gonzalez-Fajardo JA, Bratos MA, Alvarez-Gago T, Aguirre B, Vaquero C. Role of calcifying nanoparticle

- in the development of hyperplasia and vascular calcification in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014;47(6):640-646. [https://doi.org/ 10.1016/j.ejvs.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.03.002).
96. Hunter LW, Charlesworth JE, Yu S, Lieske JC, Miller VM. Calcifying nanoparticles promote mineralization in vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:2689-2698. [https://doi.org/ 10.2147/IJN.S63189](https://doi.org/10.2147/IJN.S63189).
 97. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. [https://doi.org/ 10.1038/s41418-017-0012-4](https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4).
 98. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):969-979. [https://doi.org/ 10.1161/ATVBAHA.110.207415](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207415).
 99. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(6):673-685. [https://doi.org/ 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.04.003).
 100. Callegari A, Coons ML, Ricks JL, Rosenfeld ME, Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6. *J Vasc Res.* 2014;51(2):118-131. [https://doi.org/ 10.1159/000358920](https://doi.org/10.1159/000358920).
 101. Zickler D, Luecht C, Willy K, Chen L, Witowski J, Girndt M, Fiedler R, Storr M, Kamhieh-Milz J, Schoon J, Geissler S, Ringden O, Schindler R, Moll G, Dragun D, Catar R. Tumour necrosis factor-alpha in uraemic serum promotes osteoblastic transition and calcification of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinases and activator protein 1/c-FOS-mediated induction of interleukin 6 expression. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(4):574-585. [https://doi.org/ 10.1093/ndt/gfx316](https://doi.org/10.1093/ndt/gfx316).
 102. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 2018;114(4):590-600. [https://doi.org/ 10.1093/cvr/cvy010](https://doi.org/10.1093/cvr/cvy010).
 103. Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, Francis GA, Bochaton-Piallat ML. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018;114(4):540-550. [https://doi.org/ 10.1093/cvr/cvy022](https://doi.org/10.1093/cvr/cvy022).
 104. Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med.* 2006;260(3):192-210. [https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x).
 105. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res.* 2011;109(6):697-711. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCRESAHA.110.234914](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234914).
 106. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M, Shanahan CM. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 2011;109(1):e1-12. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCRESAHA.110.238808](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238808).
 107. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, Furmanik M, Sanchis P, De Rosales RT, Alvarez-Hernandez D, Shroff R, Yin X, Muller K, Skepper JN, Mayr M, Reutelingsperger CP, Chester A, Bertazzo S, Schurgers LJ, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015;116(8):1312-1323. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305012).
 108. New SE, Goetsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan CM, Croce K, Aikawa E. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013;113(1):72-77. [https://doi.org/ 10.1161/CIRCRESAHA.113.301036](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301036).
 109. Aghagolzadeh P, Radpour R, Bachtler M, van Goor H, Smith ER, Lister A, Odermatt A, Feelisch M, Pasch A. Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via KEAP1/NRF2/NQO1 activation. *Atherosclerosis.* 2017;265:78-86. [https://doi.org/ 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.012](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.012).
 110. Cai MMX, Smith ER, Tan SJ, Hewitson TD, Holt SG. The Role of Secondary Calciprotein Particles in the Mineralisation Paradox of Chronic Kidney Disease. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(6):570-580. [https://doi.org/ 10.1007/s00223-017-0313-0](https://doi.org/10.1007/s00223-017-0313-0).
 111. Blau R, Krivitsky A, Epshtein Y, Satchi-Fainaro R. Are nanotheranostics and nanodiagnosics-guided drug delivery stepping stones towards precision medicine? *Drug Resist Updat.* 2016; 27: 39-58. [https://doi.org/ 10.1016/j.drup.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.06.003).
 112. Matea WCT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: 5421-5431. [https://doi.org/ 10.2147/IJN.S138624](https://doi.org/10.2147/IJN.S138624).

Сведения об авторе

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6).
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Статья поступила: 03.02.2020г.

Принята в печать: 29.02.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Author

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Received: 03.02.2020

Accepted: 29.02.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.