

Рагино Ю. И.¹, Каштанова Е. В.¹, Мурашов И. С.², Волков А. М.², Кургузов А. В.², Садовский Е. В.¹, Маслацов Н. А.¹, Щербакова Л. В.¹, Чернявский А. М.², Полонская Я. В.¹

¹ НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ

«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ КАЛЬЦИФИКАЦИИ СТАБИЛЬНЫХ И НЕСТАБИЛЬНЫХ БЛЯШЕК В КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Цель исследования	Изучение биохимических факторов кальцификации в стабильных и нестабильных бляшках коронарных артерий (КА) и крови у пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом, поиск ассоциаций биохимических факторов кальцификации с развитием нестабильной атеросклеротической бляшки (АСБ).
Материал и методы	В исследование были включены 25 мужчин (средний возраст $60,4 \pm 6,8$ года), поступивших на операцию коронарного шунтирования. В ходе операции по интраоперационным показаниям у мужчин проведены эндартерэктомия из КА и гистологический и биохимический анализы образцов сосудистой стенки, содержащей как атеросклеротически пораженную интиму и часть среднего слоя коронарной артерии, так и участки без атеросклеротических повреждений. Из 85 образцов КА было определено 15 сегментов без атеросклеротического повреждения, 39 фрагментов стабильной атероматозной АСБ и 31 фрагмент нестабильной АСБ. В гомогенатах образцов (после измерения белка по методу Лоури) и в крови иммуноферментным методом определяли биохимические факторы кальцификации: остеопротегерин, остеокальцин, остеопонтин, остеонектин, а также факторы воспаления (цитокины, хемокины).
Результаты	Выявлена корреляция ($r_s=0,607$; $p<0,01$) между стадиями развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки и степенью кальцификации. Содержание остеокальцина в атеросклеротических бляшках в 3,3 раза выше по сравнению с образцами сосудистой стенки без повреждений. В образцах с кальцификатами уровень остеокальцина более чем в 2 раза выше, в сравнении с образцами без кальцификатов. По данным многофакторного логистического регрессионного анализа, риск развития нестабильной АСБ в КА связан со сниженным содержанием в ней остеокальцина (отношение шансов — ОШ 0,99 при 95% доверительном интервале – ДИ от 0,978 до 0,999; $p=0,028$). Риск развития кальцификатов в АСБ в КА связан с повышенным содержанием в ней остеокальцина (ОШ 1,01 при 95% ДИ от 1,001 до 1,015; $p=0,035$). У мужчин с выраженным коронарным атеросклерозом обнаружена статистически значимая обратная корреляция ($r_s=-0,386$; $p=0,022$) между содержанием остеопротегерина в сосудистой стенке и в крови.
Выводы	В атеросклеротических бляшках выше уровень остеокальцина по сравнению с образцами без атеросклеротического поражения. Риск развития нестабильной АСБ в КА связан со сниженным содержанием в ней остеокальцина. Риск развития кальцификатов в АСБ в КА связан с повышенным содержанием в ней остеокальцина.
Ключевые слова	Коронарный атеросклероз; стабильная и нестабильная атеросклеротические бляшки; кальцификация бляшек; остеокальцин; остеопротегерин
Для цитирования	Ragino Yu.I., Kashtanova E.V., Murashov I.S., Volkov A.M., Kurguzov A.V., Sadovskii E.V., Maslatsov N.A., Scherbakova L.V., Chernjanskii A.M., Polonskaya Ya.V. The Study of Biochemical Factors of Calcification of Stable and Unstable Plaques in the Coronary Arteries of Man. <i>Kardiologiia</i> . 2020;60(2):83–88. [Russian: Рагино Ю.И., Каштанова Е.В., Мурашов И.С., Волков А.М., Кургузов А.В., Садовский Е.В., Маслацов Н.А., Щербакова Л.В., Чернявский А.М., Полонская Я.В. Исследование биохимических факторов кальцификации стабильных и нестабильных бляшек в коронарных артериях человека. <i>Кардиология</i> . 2020;60(2):83–88]
Автор для переписки	Полонская Яна Владимировна. E-mail: yana-polonskaya@yandex.ru

Актуальной фундаментальной проблемой медицины является изучение этиологических и патофизиологических механизмов сосудистого кальциноза, атеросклероза и его осложнений. Весьма спорным остается

вопрос о том, потенцирующее или ингибирующее действие оказывает сосудистый кальциноз, особенно выраженный, на развитие нестабильных атеросклеротических бляшек (АСБ), являющихся патогенетической ос-

новой риска развития острого коронарного синдрома (ОКС) и инфаркта миокарда. Существует традиционное представление, что в большинстве случаев нестабильные АСБ, ответственные за развитие ОКС, – это бляшки с мягкой, тонкой фиброзной капсулой, богатые липидами и некальцинированные, и выраженная коронарная кальцификация служит признаком стабильности АСБ, не склонной к разрыву. Однако ряд исследований показывает, что коронарная кальцификация является самостоятельным и надежным предиктором развития нестабильной бляшки и осложнений атеросклероза, отдаленных сердечно-сосудистых осложнений (ССО) [1–8].

Интерпретация коронарной кальцификации у пациентов с верифицированным коронарным атеросклерозом зависит от ультраструктуры кальцинирующего поражения. Плотная, очаговая кальцификация может свидетельствовать о стабилизации АСБ, в то время как диссеминированные очаги микрокальцификации могут свидетельствовать о наличии нестабильных атеросклеротических очагов и о высоком риске их разрыва с развитием осложнений, обусловленных атеротромбозом [9]. По данным J.M. Davaine и соавт., распространенность кальцификации в коронарных артериях (КА) с атеросклеротическими поражениями может достигать 90%, являясь независимым фактором риска развития ССО [10].

В кальцифицированной АСБ были обнаружены остеобластоподобные клетки, выявлена активная резорбция очагов эктопической кальцификации сосудов [11, 12]. Известно, что остеобласты участвуют в синтезе основных компонентов межклеточного вещества, таких как коллаген I типа, остеокальцин, остеоонектин и др. [13]. В состав сосудистых кальцификатов входят вещества, которые характерны и для костной ткани, такие как соли кальция, фосфаты, остеоонектин, остеопонтин, остеопротегерин, остеокальцин, коллаген I типа и другие соединения. Во многом сопоставимый с остеогенезом процесс кальцификации сосудистой стенки регулируется теми же белками [14, 15].

Настоящее исследование было посвящено изучению биохимических факторов кальцификации стабильных и нестабильных бляшек в КА и крови у пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом, поиску ассоциаций биохимических факторов кальцификации с развитием нестабильной АСБ.

Материал и методы

Исследование проводилось в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН и НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина в 2017–2020 гг. Исследование одобрили этические комитеты учреждений. В исследование включили 25 мужчин со стабильной стенокардией напряжения III функ-

ционального класса, средний возраст которых составил $60,4 \pm 6,8$ года. Все пациенты характеризовались избыточной массой тела (индекс массы тела $>25 \text{ кг/м}^2$). Все мужчины, включенные в исследование, перенесли в клинике НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина операцию коронарного шунтирования. Критерии исключения пациентов из исследования: инфаркт миокарда давностью менее 6 мес, острые и обострение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, почечная недостаточность, тяжелые заболевания печени, онкологические заболевания, гиперпаратиреоз. Все пациенты до проведения операции заполняли форму информированного согласия на участие в исследовании.

Образцы крови у пациентов брали при поступлении в стационар до операции. В ходе операции по интраоперационным показаниям у мужчин была выполнена эндартерэктомия из КА. Каждый образец послеоперационного материала под визуальным контролем был продольно и поперечно симметрично разделен на несколько фрагментов для проведения гистологических и биохимических исследований. Проводили макроскопическое описание 85 образцов КА и их гистологический анализ на бинокулярном микроскопе AxiostarPlus. Гистологический анализ выполняли с подробным описанием состояния покрышки атеросклеротического очага (толстая, тонкая, истонченная, фиброзная, рыхлая, плотная, гиалинизированная, участок истонченной покрышки, кровоизлияния в покрышку, разрыв, изъязвление, обызвествление, атерокальциноз покрышки), его эндотелиальной поверхности, ядра бляшки, периферии бляшки/очага. По результатам гистологического анализа было выявлено 15 фрагментов без атеросклеротического поражения, 39 фрагментов стабильной атероматозной бляшки и 31 фрагмент нестабильной бляшки, где нестабильная – это поврежденная бляшка с толщиной фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрированная макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения диаметром 0,3 мм), с крупным липидным ядром ($>40\%$). Кроме того, проводилось деление изучаемых образцов КА на три типа: 1) без кальцификации; 2) с мелкими и пылевидными кальцификатами; 3) с крупноглыбчатыми кальцификатами.

Все мужчины были разделены на 2 следующие подгруппы: 1) без нестабильных бляшек в КА согласно результатам гистологического анализа ($n=12$); 2) с нестабильными бляшками в КА согласно результатам гистологического анализа ($n=13$). Статистически значимых различий между подгруппами по показателям возраста, наличия артериальной гипертензии, абдоминального ожирения, сахарного диабета, курения, инфаркта миокарда в анамнезе, функционального класса стенокардии напряжения, приема лекарственных препаратов не было.

Для биохимических исследований замороженные в жидком азоте образцы сосудов гомогенизировали в растворе фосфатно-солевого буфера, получая 1% гомогенаты, которые делили на аликвоты для дальнейших биохимических анализов. В гомогенатах (после измерения белка по методу Лоури) и в крови иммуноферментным методом на анализаторе Multiscan определяли биохимические факторы кальцификации: остеопротегерин, остеокальцин, остеопонтин, остеонектин, а также факторы воспаления (цитокины, хемокины).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS 13.0 версии. Данные представлены в виде среднего и его стандартного отклонения ($M \pm SD$) или медианы и процентилей – Me (25%; 75%). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни в зависимости от типа распределения данных. Множественное сравнение между группами проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с использованием критерия Бонферрони при нормальном распределении или критерия Краскела-Уоллиса при распределении, отличном от нормального. Применяли корреляционный анализ по Спирмену и мно

гофакторный логистический регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По результатам гистологического анализа не обнаружено различий между стабильными и нестабильными АСБ по содержанию в них кальцификатов (табл. 1). Однако корреляционный анализ выявил статистически значимую прямую корреляцию средней силы ($r_s = 0,607$; $p < 0,01$) между стадиями развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки и степенью кальцификации образцов согласно гистологическому заключению.

Содержание биохимических факторов кальцификации на разных стадиях развития атеросклеротического очага представлено в табл. 2. Показано, что уровень остеокальцина и в стабильных и в нестабильных бляшках был в 3,3 раза выше ($p < 0,05$), чем в образцах КА без атеросклеротических повреждений (табл. 2).

Проведена оценка содержания биохимических факторов кальцификации в гомогенатах образцов КА в зависимости от гистологического заключения о степени кальцификации (табл. 3). Выявлено повышенное содержание остеокальцина в образцах с мелкими и пы-

Таблица 1. Содержание кальцификатов в атеросклеротических бляшках коронарных артерий человека (гистологический анализ)

Кальцификаты в бляшках	Стабильная бляшка (n=39)	Нестабильная бляшка (n=31)	p
Нет	12 (31%)	9 (29%)	>0,05
Мелкие и пылевидные	23 (59%)	18 (58%)	>0,05
Крупноглыбчатые	4 (10%)	4 (13%)	>0,05

Таблица 2. Изменения содержания факторов кальцификации на разных стадиях развития атеросклеротического очага

Показатель	Неизменная интима/медиана (n=15)	Стабильная бляшка (n=39)	Нестабильная бляшка (n=31)	p
	1	2	3	
Остеопротегерин, пг/мг белка	167,9±99,3	225,8±102,4	176,4±101,6	>0,05
Остеопонтин, нг/мг белка	6,9±4,0	7,3±4,1	4,0±2,2	>0,05
Остеокальцин, нг/мг белка	23,7 (10,7;	82,4±23,9*	83,2±29,3*	$p_{1-2} = 0,011$ $p_{1-3} = 0,013$
Остеонектин, мкг/мг белка	7,1±3,1	3,4±3,5	3,4±3,0	>0,05

Данные представлены в виде среднего и его стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Таблица 3. Содержание факторов кальцификации в образцах коронарных артерий в зависимости от гистологической оценки степени кальцификации

Показатель	Без кальцификатов (n=36)	Мелкие и пылевидные кальцификаты (n=41)	Крупноглыбчатые кальцификаты (n=8)	p
	1	2	3	
Остеопротегерин, пг/мг белка	134,9±100,3	204,7±109,0	197,4±111,3	>0,05
Остеопонтин, нг/мг белка	5,3±3,3	7,1±4,0	3,6±2,1	>0,05
Остеокальцин, нг/мг белка	39,2±20,1	108,3±25,2*	83,3±28,0*	$p_{1-2} = 0,045$ $p_{1-3} = 0,049$
Остеонектин, мкг/мг белка	4,3±3,0	4,0±3,1	1,8±1,7	>0,05

Данные представлены в виде среднего и его стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Таблица 4. Корреляции между содержаниями биохимических факторов кальцификации и некоторых факторов воспаления и хемокинов в образцах коронарных артерий (коэффициент Спирмена)

Показатель	МСР-1	sVCAM	S-селектин	ММП-9	ИЛ-18
Остеопротегерин	0,783	0,505	–	0,477	0,515
Остеопонтин	0,830	0,673	0,524	0,607	0,636
Остеокальцин	0,426	0,512	–	0,290	0,460
Остеонектин	0,704	0,692	0,444	0,554	0,633

$p < 0,01$ для всех сравнений.

левидными, а также с крупноглыбчатыми кальцификатами по сравнению с образцами без кальцификатов в 2,8 и в 2,1 раза соответственно.

Многофакторный логистический регрессионный анализ с построением мультивариантных моделей (где зависимыми переменными являлись либо а) стадийное развитие атеросклеротического очага до нестабильной бляшки, либо б) развитие кальциноза в атеросклеротическом очаге) выявил статистически значимую зависимость только для содержания остеокальцина в образцах КА. Результаты показали, что риск развития нестабильной атеросклеротической бляшки в КА связан со сниженным содержанием в ней остеокальцина (отношение шансов – ОШ 0,99 при 95% доверительном интервале – ДИ от 0,978 до 0,999; $p=0,028$). Риск развития кальцификатов в АСБ в КА также связан с повышенным содержанием в ней остеокальцина (ОШ 1,01 при 95% ДИ от 1,001 до 1,015; $p=0,035$).

Составляющими сосудистого кальцификата являются соли кальция, фосфаты, остеопонтин, остеоонектин, остеопротегерин, остеокальцин и другие компоненты, которые характерны для костной ткани. В АСБ они экспрессируются главным образом в гладкомышечных клетках сосудов и служат маркерами их остеобластической дифференциации. В нашем исследовании из 4 изученных биохимических факторов кальцификации атеросклеротических очагов значимые результаты получены только в отношении остеокальцина. Содержание этого фактора в стабильных и нестабильных бляшках было статистически значимо выше, чем в образцах сосудов без атеросклеротических повреждений, а также в бляшках с кальцификацией. Полученные результаты не противоречат данным других исследований. Кроме основной экспрессии

остеокальцина гладкомышечными клетками сосудов есть и другие клетки, экспрессирующие остеокальцин в бляшке. Так, в исследовании Н. Zhang и соавт. [12] показана положительная корреляция между числом эндотелиальных клеток-предшественников, несущих остеокальцин, и кальцификацией КА у пациентов с ишемической болезнью сердца. С. Foresta и соавт. пришли к выводу, что тромбоциты в области АСБ дополнительно высвобождают в нее остеокальцин [16].

Нами выявлены статистически значимые прямые корреляции средней силы и сильные между содержаниями биохимических факторов кальцификации и некоторых факторов воспаления и хемокинов в образцах КА (табл. 4).

С одной стороны, известно, что выраженная коронарная кальцификация является самостоятельным и сильным предиктором развития отдаленных ССО [17], с другой – регресс АСБ на фоне терапии статинами с одновременным ее укреплением за счет увеличения количества депонированного кальция является, вероятно, благоприятным прогностическим фактором. Видимо, важны не только выявление сосудистой кальцификации как факта, но и учет сопутствующих факторов, таких как, прежде всего, активность факторов сосудистого воспаления, микроскопические особенности самой кальцификации, включая ее расположение внутри бляшки и распространенность [7, 8]. Действительно, в ряде публикаций показано, что атеросклеротическая кальцификация тесно связана с процессами воспаления; имеются данные, что кальциноз сосудов может инициировать воспаление и дальнейшее прогрессирование кальцификации [18, 19]. М. L. Chatrou и соавт. [20] показано усиление воспалительных процессов на стадии микрокальцификации бляшки.

Таблица 5. Содержание биохимических факторов кальцификации в крови у мужчин с атеросклерозом коронарных артерий

Показатель	Нет нестабильных бляшек в коронарных артериях (n=12)	Есть нестабильные бляшки в коронарных артериях (n=13)	p
Остеопротегерин, пг/мл	66,2 [54,5; 78,2]	62,1 [43,9; 80,3]	>0,05
Остеопонтин, нг/мл	28,9 [5,4; 50,1]	24,4 [19,3; 34,2]	>0,05
Остеокальцин, нг/мл	13,2 [9,0; 23,4]	14,3 [9,9; 16,2]	>0,05
Остеонектин, мкг/мл	6,5 [3,4; 7,9]	8,9 [7,5; 9,8]	0,034

Данные представлены в виде медианы и процентиля – Ме [25%; 75%].

Проведен анализ содержания в крови у мужчин с атеросклерозом КА биохимических факторов кальцификации (табл. 5). Выявлено статистически значимое повышение в 1,4 раза содержания в крови остеоонектина у пациентов с нестабильными АСБ в КА по сравнению с таковым у пациентов без нестабильных бляшек.

Корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную корреляцию средней силы ($r_s = -0,386$; $p = 0,022$) между содержанием остеопротегерина в сосудистой стенке и в крови. Других корреляций между содержанием биохимических факторов кальцификации в крови и в сосудистой стенке не было.

Обсуждая полученный результат, важно отметить, что остеопротегерин является модулятором кальцификации стенки сосудов. На это указывают данные, что у мышей с делецией гена остеопротегерина развивается кальцификация артерий, в которых он экспрессируется [10]. М. Krzanowski и соавт. заключили, что повышенный уровень в крови остеопротегерина может быть маркером кальцификации КА и связан с риском развития ССО при тяжелом кальцинозе артерий [21]. При этом в целом механизм регуляции остеопротегерином кальцификации артерий сложный и до конца не изучен.

Выводы

1. Обнаружена статистически значимая прямая корреляция ($r_s = 0,607$; $p < 0,01$) между стадиями развития атеросклеротического очага до нестабильной бляшки и степенью кальцификации образцов развития атеросклеротического очага.
2. Выявлено повышенное содержание остеокальцина в стабильных и в нестабильных бляшках в 3,3 раза

по сравнению с образцами коронарных артерий без атеросклеротических повреждений, а также в образцах с мелкими и пылевидными, с крупноглыбчатыми кальцификатами по сравнению с образцами без кальцификатов в 2,8 и в 2,1 раза соответственно.

3. По данным многофакторного логистического регрессионного анализа, риск развития нестабильной атеросклеротической бляшки в коронарной артерии связан со сниженным содержанием в ней остеокальцина (отношение шансов 0,99 при 95% доверительном интервале от 0,978 до 0,999; $p = 0,028$). Риск развития кальцификатов в атеросклеротической бляшке в коронарной артерии связан также с повышенным содержанием в ней остеокальцина (отношение шансов 1,01 при 95% доверительном интервале от 1,001 до 1,015; $p = 0,035$).
4. У мужчин с выраженным коронарным атеросклерозом обнаружена статистически значимая обратная корреляция ($r_s = -0,386$; $p = 0,022$) между содержанием остеопротегерина в сосудистой стенке и в крови.

Исследование выполнено в рамках бюджетной НИР по Государственному заданию № 0324-2018-0001 и по гранту РФФИ № 19-015-00055а «Роль сосудистого кальциноза в стабильности и нестабильности атеросклеротических бляшек».
В ходе исследования использовался материал биобанка НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов авторами не заявлен.

Статья поступила 18.09.19

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, Spronk HM, ten Cate H, Hofstra L. Accelerated In Vivo Thrombin Formation Independently Predicts the Presence and Severity of CT Angiographic Coronary Atherosclerosis. JACC: Cardiovascular Imaging. 2012;5(12):1201–10. DOI: 10.1016/j.jcmg.2012.01.023
2. Alexopoulos N, Raggi P. Calcification in atherosclerosis. Nature Reviews Cardiology. 2009;6(11):681–8. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.165
3. Shaw LJ, Giambrone AE, Blaha MJ, Knapper JT, Berman DS, Bellam N et al. Long-Term Prognosis After Coronary Artery Calcification Testing in Asymptomatic Patients: A Cohort Study. Annals of Internal Medicine. 2015;163(1):14–21. DOI: 10.7326/M14-0612
4. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS et al. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. New England Journal of Medicine. 2011;364(3):226–35. DOI: 10.1056/NEJMoa1002358
5. Hofmann Bowman MA, McNally EM. Genetic Pathways of Vascular Calcification. Trends in Cardiovascular Medicine. 2012;22(4):93–8. DOI: 10.1016/j.tcm.2012.07.002
6. O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, Kardina SLR, Feitosa MF, Hwang S-J et al. Genome-Wide Association Study for Coronary Artery Calcification With Follow-Up in Myocardial Infarction. Circulation. 2011;124(25):2855–64. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.974899
7. Zhan Y, Zhang Y, Hou J, Lin G, Yu B. Relation Between Superficial Calcifications and Plaque Rupture: An Optical Coherence Tomography Study. Canadian Journal of Cardiology. 2017;33(8):991–7. DOI: 10.1016/j.cjca.2017.05.003
8. Oliveira-Santos M de, Castelo-Branco M, Silva R, Gomes A, Chichorro N, Abrunhosa A et al. Atherosclerotic plaque metabolism in high cardiovascular risk subjects – A subclinical atherosclerosis imaging study with 18 F-NaF PET-CT. Atherosclerosis. 2017;260:41–6. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.014
9. Kashtalap V.V., Hryachkova O.N., Barbarash O.L. Clinical Significance of Coronary Calcification for the Assessment of Cardiovascular Risk. Atherosclerosis and Dyslipidemias. 2016;1(22):5–14. [Russian: Кашталап В.В., Хрячкова О.Н., Барбараш О.Л. Клиническая значимость коронарной кальцификации для оценки сердечно-сосудистого риска. Атеросклероз и дислипидемии. 2016;1(22):5–14]
10. Davaine J-M, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, Guyomarch B et al. Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2016;51(2):259–67. DOI: 10.1016/j.ejvs.2015.10.004
11. Inaba M, Ueda M. Vascular Calcification - Pathological Mechanism and Clinical Application - The significance of arterial calcification

- in unstable plaques. *Clinical Calcium*. 2015;25(5):679–86. DOI: [Cl-Ca1505679686](#)
12. Zhang H, Wang L, Si D, Wang C, Yang J, Jiang P et al. Correlation between osteocalcin-positive endothelial progenitor cells and spotty calcification in patients with coronary artery disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015;42(7):734–9. DOI: [10.1111/1440-1681.12366](#)
13. Wookey PJ, Zulli A, Hare DL. The elevated expression of calcitonin receptor by cells recruited into the endothelial layer and neo-intima of atherosclerotic plaque. *Histochemistry and Cell Biology*. 2009;132(2):181–9. DOI: [10.1007/s00418-009-0600-6](#)
14. Qiao J-H, Mishra V, Fishbein MC, Sinha SK, Rajavashisth TB. Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015;99(3):654–62. DOI: [10.1016/j.yexmp.2015.11.010](#)
15. Higgins CL, Isbilir S, Basto P, Chen IY, Vaduganathan M, Vaduganathan P et al. Distribution of Alkaline Phosphatase, Osteopontin, RANK Ligand and Osteoprotegerin in Calcified Human Carotid Atheroma. *The Protein Journal*. 2015;34(5):315–28. DOI: [10.1007/s10930-015-9620-3](#)
16. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Fabris F, Grego F, Gerosa G et al. Platelets express and release osteocalcin and co-localize in human calcified atherosclerotic plaques. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11(2):357–65. DOI: [10.1111/jth.12088](#)
17. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR et al. Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(13):1336–45. DOI: [10.1056/NEJMoa072100](#)
18. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A et al. Osteoprotegerin Is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2004;109(18):2175–80. DOI: [10.1161/01.CIR.0000127957.43874.BB](#)
19. Polonskaya Ya.V., Kashtanova E.V., Murashov I.S., Volkov A.M., Kurguzov A.V., Chernjavskii A.M. et al. Associations of osteocalcin, osteoprotegerin, and calcitonin with inflammation biomarkers in atherosclerotic plaques of coronary arteries. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;162(12):691–4. [Russian: Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Мурашов И.С., Волков А.М., Кургузов А.В., Чернявский А.М. и др. Ассоциации остеокальцина, остеопротегерина и кальцитонина с воспалительными биомаркерами в атеросклеротических бляшках коронарных артерий. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;162(12):691–4]
20. Chatrou MLL, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, Roijers RB, Mutsaers PHA, Schurgers LJ. Intra-Section Analysis of Human Coronary Arteries Reveals a Potential Role for Micro-Calcifications in Macrophage Recruitment in the Early Stage of Atherosclerosis. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0142335. DOI: [10.1371/journal.pone.0142335](#)
21. Krzanowski M, Krzanowska K, Dumnicka P, Gajda M, Wozniowicz K, Fedak D et al. Elevated Circulating Osteoprotegerin Levels in the Plasma of Hemodialyzed Patients With Severe Artery Calcification: Elevated OPG Levels in HD Patients With Artery Calcification. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 2018;22(5):519–29. DOI: [10.1111/1744-9987.12681](#)