



# MORPHOLOGIA

**МОРФОЛОГІЯ**

**ISSN 1997-9665**

**2016 • Том 10**

**2016 • Volume 10**

**Номер 3 • Частина 1**

**Number 3 • Part 1**

<p><b>Р.А.Москаленко</b> <b>А.М.Романюк</b></p>	<p>УДК 616-008.9-003.84</p>
<p>Сумський державний університет</p>	<p><b>ЕВОЛЮЦІЯ УЯВЛЕНЬ ПРО ПАТОЛОГІЧНЕ БІОМІНЕРАЛОУТВОРЕННЯ У М'ЯКИХ ТКАНИНАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)</b></p> <p><i>Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Дослідження змін у кістках при переломах за умов використання наноматеріалів для метал-остеосинтезу з урахуванням функції м'язового апарату» (номер державної реєстрації 011611006815).</i></p>
<p><b>Ключові слова:</b> біомінералізація, ектопічна кальцифікація, м'які тканини, патологія.</p>	<p><b>Реферат.</b> Ектопічні відкладення сполук кальцію у людському організмі представлені солями кальцію фосфату, переважно гідроксиапатитом. Оскільки патологічна біомінералізація завжди представлена сполуками кальцію, то термін «ектопічна кальцифікація» можна вважати тотожним або дуже близьким за значенням. Багато нещодавно відкритих специфічних механізмів регуляції кальцифікації м'яких тканин свідчать про активність цього процесу та його подібність до процесів окостеніння у скелетній системі. Ектопічна біомінералізація може провокуватися не тільки підвищенням активуючих факторів, але й зниженням інгібуючих факторів. Отже, різні форми патологічної біомінералізації можуть бути обумовлені: 1) тільки посиленням активуючих факторів, 2) тільки зменшенням або втратою інгібіторів мінералізації, 3) комбінацією порушення активації та інгібіції мінералоутворення.</p>
<p>Надійшла: 20.08.2016</p>	<p><b>Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 24-32.</b></p>
<p>Прийнята: 08.09.2016</p>	<p>© Р.А.Москаленко, А.М.Романюк, 2016 eriugen@ukr.net</p>

Moskalenko R.A., Romaniuk A.M. Evolution of ideas about pathological mineralization in soft tissues (literature review).

**ABSTRACT.** Ectopic deposition of calcium compounds in the human body is represented by salts of calcium phosphate, mainly by hydroxyapatite. The formation of stones in the urinary system is the exception, there calcium oxalate and phosphate octacalcium are formed. As pathological biomineralization are presented by calcium compounds, the term "ectopic calcification" can be considered as identical or very similar in the meaning. Ectopic calcification is defined as unnatural mineralization of soft tissue of a living organism. Basing on the fact, that pathologic biomineralization is the result of cells and tissues damage, diseases, aging and systemic metabolic disorders, this process was viewed as degenerative and passive. This approach had dived pathological calcification into dystrophic and metastatic, and in native science also metabolic is marked out. Many recently opened specific regulatory calcification mechanisms of soft tissues indicate an activity of this process and its similarity to the processes of ossification of the skeletal system. A whole amount of new observations and researches convinces that the process of calcium compounds depositing in soft tissues are regulated and evolutionarily caused by compensatory and adaptive process. The concentration of calcium and phosphates in the extracellular fluid is close to that, which is necessary for the spontaneous formation of calcium phosphate crystals. Precipitation of minerals is prevented by inhibiting factors, the number of which is at enough basic level. Thus, ectopic biomineralization can be encouraged not only by activating factors increase, but also by an inhibitory factors decrease. Thus, various forms of pathological biomineralization can be caused by: 1) only activating factor increase 2) only decrease or loss of mineralization inhibitors, 3) a combination of violations of mineral formation activation and inhibition.

**Key words:** biomineralization, ectopic calcification, soft tissues, pathology.

**Citation:**

Moskalenko RA, Romaniuk AM. [Evolution of ideas about pathological mineralization in soft tissues (literature review)]. Morphologia. 2016;10(3):24-32. Ukrainian.

**Вступ**

У здорових людей процес фізіологічного мінералоутворення обмежений спеціалізованими тканинами, такими як скелет і зуби. Впродовж всього життя організму формування мінеральної

тканини та кальцієво-фосфорний гомеостаз знаходиться під жорстким контролем різних систем організму. Наприклад, зміна концентрації іонів кальцію у сироватці крові навіть на 1% негайно приводить до дії механізмів, які відновлюють

його рівновагу [1].

#### *Історичний екскурс*

Дослідження процесу біомінералізації почалося з роботи Quekett у 1849 році «Про внутрішню будову кісток скелету чотирьох великих класів тварин: ссавців, птахів, рептилій та риб...». У 1894 році Levy ідентифікував основний скелетний мінерал як карбонат-фосфат кальцію. Лише в 1926 році de Jong у роботі “La substance minérale dans les os” описав структуру кісткових мінералів як погано структурований кристалічний карбонатний апатит [2]. На теренах України першим звернув увагу на проблеми біомінералізації академік В.І.Вернадський у 20-х роках ХХ століття [3]. Фактично першою роботою у сучасному розумінні предмету стала видана в м. Київ монографія Б.І. Сребнодольського «Биологическая минералогия» у 1983 році, яка була присвячена мінералізаційним процесам у організмі тварин [4]. Серед інших робіт з проблем біомінералізації, необхідно виділити фундаментальну монографію В.Ф. Зузюка «Мінералогія уролітів» в 3 томах, опубліковану в 2002-2004 роках [5].

*Дефініції.* Ектопічна кальцифікація визначається як невластива біомінералізація м'яких тканин [1]. Ектопічні відкладення сполук кальцію, як правило, представлені солями кальцію фосфату, переважно гідроксиапатитом. При локалізації депозитів кальцію в сечостатевої системі також виявляються октакальцій фосфат та оксалат кальцію, переважно в ниркових каменях [6]. Поширена ectopic кальцифікація, що виникає на основі системного порушення мінерального обміну, описується як метастатична кальцифікація [7]. Вона пов'язана із виникненням гіперкальціємії, яка може спричинитися порушенням ендокринної регуляції обміну кальцію (підвищення секреції паратгормону, зниження продукції кальцитоніну), порушення виведення кальцію з організму (хронічний нефрит, полікістоз нирок, ураження товстої кишки), підвищене надходження в організм (гіпервітаміноз Д), вихід іонів кальцію з депо (мієлома хвороба, переломи кісток, кісткові метастази) [8]. Метастатична кальцифікація характеризується спорідненістю до деяких органів і тканин, таких як легені, нирки, міокард, слизова оболонка шлунку, стінки артерій. Це пояснювалося тим, що через легені, нирки та шлунок виділяються кислі продукти і тканини цих органів внаслідок більшої лужності, менш здатні втримувати іони кальцію у розчині, ніж тканини інших органів. Відкладення сполук кальцію у міокарді і стінках судин пов'язується з омиванням артеріальною кров'ю, бідною на вуглекислий газ. Кальцієві метастази уражають у паренхіматозних органах клітини паренхіми і сполучнотканинні волокна, у стінках судин і в сполучній тканині сполуки кальцію випадають за ходом волокон і мембран [8]. Як правило, відкладення кальцію починається з мітохондрій і

фаголізосом [9].

За відсутності порушення загального мінерального обміну ectopic кальцифікацію, як правило, називають дистрофічною кальцифікацією. Дистрофічна кальцифікація часто спостерігається у м'яких тканинах як результат ушкодження, захворювань або старіння [9]. Серед м'яких тканин найбільшу схильність до мінералізації проявляють серцево-судинна система, сухожилля, шкіра, нирки, щитоподібна залоза в залежності від їх патології [8, 10]. Раніше вважалося, що для дистрофічної кальцифікації характерне відкладення сполук кальцію в тканинах, які знаходяться у стані некрозу або глибокої дистрофії. Механізм дистрофічної кальцифікації описувався наступним чином: тканини, що руйнуються, є джерелом фосфатаз і залуження середовища. Важливим моментом уявлень про дистрофічну кальцифікацію є фізико-хімічні зміни тканин, що призводить до абсорбції сполук кальцію з тканинної рідини та крові [8]. Депозити кальцію утворюються в інфарктах, при туберкульозному запаленні, гуммах, у вогнищах хронічного запалення, загнблх паразитах, рубцях, атеросклеротичних бляшках, хрящах. Необхідно відмітити, що осифікація, яка іноді виявлялась при цих же хворобах, також вважається проявом дистрофічної кальцифікації [8].

Радянська школа патологічної анатомії, ґрунтуючись на переважанні загальних або місцевих факторів у механізмах розвитку кальцифікації виділила крім метастатичної і дистрофічної форми біомінералізації, ще і метаболічну. До метаболічної кальцифікації відносили так звану «вапняну подагру», захворювання неясної етіології, яке пов'язували з нестійкістю буферних систем організму [8].

За дві останні декади років було досліджено багато нових факторів мінералізації, встановлені та уточнені існуючі механізми цього процесу.

*Метою* даного огляду є вивчення нових клітинних і молекулярних факторів та механізмів біомінералізації.

*Клітини-джерела* мінералізації у судинній стінці та м'яких тканинах походять з кількох попередників. Серед них: резидентні напівстовбурові клітини, циркулюючі мезенхімальні клітини з строми кісткового мозку, як поступають з кровообігу, субендотеліальні періцитоподібні клітини, судинні мезенхімальні клітини (також відомі як судинні клітини, що кальцифікуються), адвентиційні міофібробласти, гладенькі м'язові клітини (ГМК - зрілі і незрілі), ендотеліоцити. Останні дві клітини можуть перетворюватися в остеобластичні клітини шляхом епітеліально-мезенхімальної трансформації [11].

*Особливості ectopic біомінералізації.* Внутрішньомембранна осифікація відбувається у випадку прямої мінералізації матриксу мезенхімальними клітинами, які підлягають остеогенній

диференціації. Енхондральна осифікація відбувається в хрящах як проміжний етап мінералізації [12]. Наприклад, при рості пластинки довгої кістки хондроцити займають місця майбутньої кістки, створюючи градієнт хондроцитів на етапах дозрівання кістки: проліферації, передгіпертрофії, гіпертрофії і апоптозу. Апоптотичні тільця виступають у ролі центрів нуклеації кристалів фосфату кальцію, що продукуються кальцифікованим хрящем. Кальцифікований хрящ виступає як матриця, в яку вростають мікросудини, приносячи ендотеліальні клітини та перицити [13]. Хондрокласти, що походять з моноцитів, розчиняють кальцифікований хрящ і перицити мікроциркуляторного русла (МЦР) під впливом кальцифікованого матриксу та його компонентів підлягають остеогенному диференціюванню. Таким чином, остеогенні клітини, що утворилися з перицитів, стають джерелом утворення кісткового матриксу, остеонів, матриксних везикул (МВ), нових кристалів гідроксиапатиту, які заміщують хрящ. Ендотеліоцити та перицити, після дозрівання у остеобласти або хондроцити, починають експресувати «остеохондрогенні» гени і виділяти МВ у екстрацелюлярний матрикс. Також було встановлено трансформуючу дію кристалів гідроксиапатиту на перицити та ГМК, які в їх присутності набувають остеобластичного диференціювання [14,15].

*Матриксні везикули.* Ініціація кальцифікації відбувається всередині матриксних везикул (МВ), позаклітинних утворень, які походять з клітинної мембрани [16]. Кальцифіковані МВ містять високі рівні  $Ca^{2+}$ , який зв'язаний з кислими фосфоліпідами, з фосфатидилсерином і мембранними фосфатазами (в т.ч. тканинну неспецифічну лужною фосфатазою (ТНЛФ)). Вони гідролізують різні ефіри фосфорної кислоти природнього походження, що в кінцевому рахунку, дає початок утворення кальцій-фосфатних мінералів. Оточене мембраною внутрішнє мікрооточення захищає ядра мінералізації у передкристалізаційному стані перед перетворенням їх у гідроксиапатит. З рештою, МВ зливаються з уже існуючими кристалами гідроксиапатиту, що веде до подальшої мінералізації [17].

Існує кілька механізмів утворення МВ. Уперше МВ були описані Кларком Х Андерсоном у 1967 році у вигляді бруньок на мембранах дегенеруючих клітин у матриці кісток та культурах кісткових клітин [18]. Згодом подібні утворення були знайдені в інших тканинах, у тому числі судинах та культурах клітин ендотелію, дедритних клітин (ДК) та гладеньких м'язових клітин [19]. Вони були названі різними термінами - екстрацелюлярні везикули, апоптотичні тільця та мікровезикули [15]. Склад МВ ГМК був детально досліджений і порівняний з МВ скелетних тканин. Було встановлено відповідність молекулярного складу МВ різного походження, до

складу яких входили лужна фосфатаза, значна кількість анексинів та кальцієві мінерали у стані нуклеації [19, 20]. При дослідженні патологічної мінералізації в атеросклеротичних бляшках нещодавно було виявлено можливість утворення МВ макрофагами та, можливо, іншими запальними клітинами [21,22].

#### *Молекулярне мікрооточення біомінералізації*

*Лужна фосфатаза та PHOSPHOL.* Тканинна неспецифічна лужна фосфатаза (ТНЛФ) - це фосфатаза, яка руйнує інгібітор мінералізації пірофосфат (PPi) [23]. У МВ нещодавно була виявлена додаткова фосфатаза - PHOSPHO1. За умов недостатності PHOSPHO1 в експериментальних мишей з'являються аномалії скелету, остеомаліція та зниження рівнів ТНЛФ та PPi [24]. У мишей з недостатністю PHOSPHO1 гіперекспресія ТНЛФ не корегує мінералізацію скелета, не зважаючи на корекцію рівня PPi, оскільки в мутантних мишей з дефіцитом PHOSPHO1 та ТНЛФ повністю відсутня мінералізація скелету [23]. Отже, можна припустити, що PHOSPHO1 не є резервним ініціатором біомінералізації. Також на експериментах *in vitro* було встановлено, що фармакологічне пригнічення PHOSPHO1 в ГМК сповільнює мінералізацію матриксу [25].

*Ектонуклеотид-пірофосфатаза / фосфодіестераза (ENPP1).* Ектонуклеотид - пірофосфатаза/фосфодіестераза (ЕПФ1) - це трансмембранний глікопротеїн, який допомагає регулювати мінералізацію кісток і хрящів за допомогою продукції неорганічного фосфату [23]. Ґрунтуючись на результатах дослідження тварин з подвійним нокаутуванням генів ТНЛФ та ЕПФ1 було встановлено, що ці два ферменти мають важливе значення для балансу активності інших факторів мінералізації. Подвійний нокаут генів цих білків корегує відхилення в біомінералізації, які виникають у випадку простого ушкодження (наприклад, делеції) гену кожного з них. З цього випливають функції ЕПФ1 як продуцента інгібіторів мінералізації пірофосфатів та під впливом зниження активності лужної фосфатази як генератора позаклітинного неорганічного фосфату (через фосфодіестеразну активність), що сприяє росту кристалів мінералів [24].

*Матриксний білок гамма-карбоксіглутамінової кислоти (MGP).* Невеликий білок MGP був ідентифікований як ключовий інгібітор судинної мінералізації [26]. Відомо, що за відсутності або дефіциті цього білка у мишей розвивається швидка і виразна судинна кальцифікація [27]. Вважається, що MGP може зв'язуватися з кісткоутворювальними білками (BMP) та/або прямо з мінералами кальцію. Швидкий розвиток патологічної біомінералізації за відсутності MGP пояснюють безальтернативним впливом BMP на експресію генів, відповідних за остеобластичне диференціювання клітин. Фор-

мування мінералів потенціюється внаслідок ендокриного впливу нанокристалів фосфату кальцію, який має індуктивний вплив на остеохондрогенні гени [14]. Цікавою особливістю MGP є його залежність від вітаміну К, який бере участь у посттрансляційній модифікації шляхом гамма-глутамілової карбоксилації [28]. Це підтверджується тим, що варфарин, який блокує активність вітаміну К, посилює екстрацелюлярну біомінералізацію [29].

Матриксний у-карбоксіглютарової кислоти протеїн вперше був виділений з кістки. Для того щоб стати повнофункціональним, він вимагає вітаміну К-залежне у-карбоксілювання, але саме некарбоксілюваний MGP пов'язаний із судинною кальцифікацією. Зв'язуючись з BMP-2, MGP блокує його активність відносно остеобластної трансдиференціації ГМК та диференціації мезенхімальних клітин. MGP також зв'язується з кристалами солей кальцію та інгібує їх зростання [28]. Разом з фетуїном вони виступають ключовими регуляторами еволюції пов'язаних з мембраною матриксних везикул.

*Фетуїн-А (protein a2 Heremans-Schmid)*. Фетуїн А - кальцій-зв'язуючий білок, що продукується переважно в печінці. Миші з «вбитим» геном фетуїну А демонструють розвиток масивної кальцифікації легень, судин та інших тканин, яка чомусь обходить аорту. Глобулін фетуїну А - транспортер статевих гормонів у крові, що може бути асоційоване з кліматом та наступним початком прогресуючої біомінералізації. Тоді як MGP, OPN і OPG є локальними факторами, фетуїн-А - значний «системний» циркулюючий інгібітор судинної кальцифікації [30]. ГМК здатні включати в себе сироватковий фетуїн-А та депонувати його у внутрішньоклітинних, зв'язаних з мембраною матриксних везикулах. Ці везикули вивільняються клітинами в матрикс і там служать центрами кристалізації мінералів, але не у випадку, якщо вони багаті фетуїном - А. Фетуїн А в комплексі з нерозчинними кристалами в деяких роботах носить назву кальцій-протеїнові частинки (calciprotein particles - CPP) [31, 32]. Включення фетуїну-А в ГМК посилюється позаклітинним кальцієм, але не позаклітинними фосфатами. Надходження фетуїну - А в ГМК збільшує потік  $Ca^{2+}$  в них і опосередковується активністю анексину кальцієвих каналів, що полегшує інгібуючу роль фетуїну-А на мінералізацію ГМК [31]. У мишей, які не продукують фетуїн А розвиваються мікрокальцифікати у дрібних судинах і підвищується депонування сполук кальцію у м'язях тканинах [33].

*Рецептори активатора ліганда ядерного каппа-В фактора (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand - RANKL) та остеопрогеніну (OPG)*. RANKL є ключовим фактором резорбтивної остеокластичної активності, яка запускається продуктами перекисного окислення лі

підів (ПОЛ). OPG - це рецептор-приманка для RANKL, який має іншу назву «пригнічуючий фактор остеокластогенезу» (osteoclastogenesis inhibitory factor - OIF). OPG належить до сімейства фактора некрозу пухлин (ФНП) і є цитокіновим рецептором [34]. Активація RANKL у судинних ГМК мишей відбувається через остеогенний фактор диференціації Runx2 у дозозалежний спосіб: спочатку продукти ПОЛ та активні форми кисню (АФК) спричиняють активацію Runx2, у відповідь на що починає синтезуватися RANKL [35]. Раніше було встановлено, що у мишей, дефіцитних на рецептори RANKL та OPG, розвивається виразна судинна кальцифікація [36]. В іншій роботі показується, що застосування OPG зменшує судинну кальцифікацію у мишей з гіперхолестеринемією [37]. Антимінералізаційний ефект OPG реалізується через знижувальну регуляцію метаболічного шляху Notch 1-RBP-Лкарра і послідовного зниження медіаторів Mx2 та TGF- $\beta$  [38]. OPG інгібує диференціацію остеокластів і є ключовим модулятором кісткової резорбції завдяки своїй дії як рецептора-пастки для активатора рецептор-ліганда нуклеарного фактора  $\kappa$ B (RANKL). Досліджено, що він відвертає кальцифікацію меді, можливо завдяки імуномодуючому впливу на неінтенсивний (low-grade) запальний процес в стінці судини [39].

При дослідженні OPG<sup>-/-</sup>-нокаутованих мишей у них було виявлено активну резорбцію кісткової речовини через активацію остеокластичної диференціації і масивний «витік» мінерального компоненту кісткової тканини [40].

*Фактор росту фібробластів 23 (FGF23), Klotho та хронічна ниркова недостатність (ХНН)*. FGF23 синтезується в скелетних остеоцитах у відповідь на гіперфосфатемію за принципом негативного зворотного зв'язку [15]. Фактор росту фібробластів 23 (FGF - 23) - білок з молекулярною вагою 30 кДа, який синтезується переважно остеоцитами. FGF-контролює ниркову екскрецію фосфатів, регулюючи нирковий натрій-залежний котранспортер фосфатів (NaPi2a і NaPi2c). Оскільки гіперфосфатемія є постійним метаболічним наслідком ХНН, до регуляції кальцій-фосфорного обміну залучаються ниркові білки, а саме Klotho - протеїн, який експресується переважно в дистальних каналцях нефрона [41]. Він може діяти в якості циркулюючої форми, або як гормон. Klotho зв'язується з рецепторами FGF-23 і відкриває різним клітинам можливість відповідати на FGF-23, діючи, як кофактор. FGF-23 і Klotho відіграють важливу роль у системній регуляції гомеостазу фосфатів, знижуючи їх резорбцію та знижуючи активність вітаміну D. Після застосування вітаміну D рівні FGF - 23 зростають, знижуючи нирковий синтез кальцитріолу через вплив на ген 1 $\alpha$  гідроксилази. FGF-23 впливає і на паратгормон (ПТГ), будучи

негативним регулятором його експресії. Навпаки, ПТГ стимулює секрецію FGF-23 з кісткової тканини. Передбачається, що вісь Klotho - FGF-23 функціонує наступним чином: з прогресуванням ХХН за допомогою FGF-23 пригнічується активність ПТГ і 1 $\alpha$ -гідроксилази, що знижує рівень кальцитріолу, знижуючи таким чином вміст фосфатів [42]. У мишей з «нокаутіваними» генами FGF-23 і Klotho розвивається виражена кальцифікація судин і м'яких тканин. У експериментальних дослідженнях було показано, що підвищення рівня FGF-23 і дефіцит білка Klotho можуть безпосередньо індукувати судинну кальцифікацію. Також було встановлено, що Klotho може виступати як циркулюючий інгібітор судинної кальцифікації [41]. Гіперекспресія Klotho знижує уразливість організму мишей при ХНН-індукованій кальцифікації судин, і навпаки, за умов недостатності цього білка значно зростає сприйнятливості судин до зумовленою ХНН патологічної біомінералізації [43].

*Пірофосфати (PPi).* Пірофосфати інгібують утворення кристалів гідроксиапатиту. Вони утворюються з нуклеотид - трифосфатів нуклеотид - пірофосфатазою, дефіцит якої викликає виражену кальцифікацію меді, так само як до неї призводить і дефіцит переносника пірофосфатів - ANK. Більше того, механізм залежного від пірофосфатів накопичення кальцію в судинній стінці охоплює й інгібування остеохондрогенної трансдиференціації - той же процес, що стимулюється фосфатами [44]. Уточнення механізму цього регулювання може відкрити шлях до створення нових фармакологічних засобів на основі біфосфонатів.

*Рецептори кінцевих продуктів гліколізу (Receptors advanced glycation end products - RAGE), та кальгрануліни.* RAGE відіграють важливу роль у патогенезі атеросклерозу і розвитку супутньої патологічної мінералізації. Відмічено, що їх експресія ко-локалізується з фокусами запалення у нестабільних атеросклеротичних бляшках з мікрокальцифікацією [45]. На додаток, виявлена сумісна локалізація і підвищена експресія RAGE з судинними ГМК, які підлягають остеохондрогенній диференціації [46].

Ліганди RAGE «гасять» розчинні форми цих рецепторів. Сироваткові рівні рецепторів-«пасток» RAGE обернено пропорційно асоційовані з судинною кальцифікацією, підтверджуючи роль цих рецепторів у патологічній біомінералізації. Одними з таких лігандів є білки сімейства S100: кальгрануліни А, В та С (S100A8, S100A9, S100A12) [47]. Було встановлено, що гіперекспресія ліганда RAGE S100A12 у судинних ГМК мишей з гіперліпідемією значно посилює васкулярну мінералізацію, частково опосередковано через активацію ПОЛ [48].

*Галектин-3 (Gal-3).* Важливим рецептором продуктів ПОЛ та продуктів глікозилювання

виступає галектин-3. Проте роль галектина-3 у розвитку атеросклеротичного процесу неоднозначна. З одного боку, стимуляція RAGE (в тому числі, галектина-3) сприяє розвитку атеросклерозу через їх прозапальні ефекти [49]. Але в той же час галектин-3 сприяє розпаду продуктів ПОЛ та глікозилювання та їх інтерналізації (ендоцитозу), що має протизапальний ефект [50]. У галектин-3-дефіцитних мишей на фоні дієти, багатій на жири, посилюється атерогенез [51]. Виявлено, що галектин-3 та RAGE мають значення у формуванні та резорбції кістки, модулюючи гомеостаз скелетних тканин [52]. Сучасні дослідження ролі галектину-3 та RAGE показують різні механізми їх дії на процеси патологічної біомінералізації. Для реалізації ефектів галектину-3 необхідне повне набуття остеобластичного фенотипу судинними ГМК, викликаючи в них активацію Р-катеніну на рівні ядра. Runx2 знижує рівень галектину-3, пригнічуючи підвищений остеокластогенез, що виступає ключовим фактором остеогенного диференціювання [54].

Крім того, RAGE та галектин-3 відіграють визначальну роль у вираженні бляшок і клінічних наслідках, зумовлених судинною кальцифікацією та запаленням. У атеросклеротичній бляшці RAGE проваюють і посилюють запалення, яке веде до відкладення мікрокальцифікатів і виникнення нестабільності бляшки. Галектин-3 навпаки, проявляє протизапальну активність лише після того, як процес кальцифікації почався, сприяючи прогресії відкладення сполук кальцію і викликаючи утворення листоподібної макрокальцифікації у стінках судин [47]. Незважаючи на протилежний вплив на запалення та різні сигнальні шляхи, RAGE та галектин-3 посилюють судинну мінералізацію. Зумовлюючи формування макро(галектин-3) і мікрокальцифікації (RAGE), активність цих білків відповідно приводить до стабільності або нестабільності атеросклеротичної бляшки.

*Особливості біомінералізації при атеросклерозі.* Для нормального виконання своїх функцій судинна стінка потребує таких властивостей як еластичність та розтяжність. Отже, тверді, ригідні депозити сполук кальцію у стінках артерій мають важливі наслідки для гемоциркуляції. Очевидно, що підвищена жорсткість стінки судин погіршує вазомоторику. Патологічна біомінералізація судин має значне поширення, уражуючи приблизно 60% осіб старше 60 років та 80% людей старше 80 років [15].

Загальновідомий факт, що судинна кальцифікація є несприятливою ознакою розвитку атеросклерозу і є предиктором кардіоваскулярної патології і смертності хворих [55]. Розрив бляшки є руйнівним наслідком атеросклерозу [15]. Біомеханічний аналіз показує, що ригідні (щільні) вклучення - кальцифікати в стінці артерій посилюють тиск на стресованій поверхні судини

у ділянках прямого впливу негативного фактора, підвищуючи таким чином ризик розриву [55]. Подальші дослідження цієї проблеми показують, що вірогідність такого ускладнення значно зростає у випадку близької локалізації двох депозитів-мікрокальцифікатів [56]. У випадку локалізації в серцевих клапанах, наслідки можуть бути більш тяжкими, так як відбувається порушення гемодинамічного потоку. Наприклад, у випадку

кальцифікованого аортального стенозу блокується зворотній відтік з лівого шлуночка. Загалом, біомінералізація судин та серцевих клапанів призводить до таких несприятливих клінічних наслідків як систолічна гіпертензія, гіпертрофія лівого шлуночка, коронарна ішемія, застійна серцева недостатність, розрив атеросклеротичної бляшки, тромбоз, інфаркт міокарда [15].

Таблиця 1

Про- і антимінералізаційні фактори

Фактор	Транскрипція	Дія	Джерело	
Тканинно-неспецифічна фосфатаза	лужна	ТНЛФ	Сприяє мінералізації	23-24
РЬоБрЬоІ фосфатаза		PHOSPHO1	Сприяє мінералізації, є частиною вмісту МВ	23-24
Ектонуклеотид-пірофосфатаза/ фосфодіестераза		ENPP1	Продукує неорганічний фосфат, сприяє мінералізації	23,25
Фактор росту фібробластів 23, білок Клото		FGF23, Klotho	Протидіють гіперфосфатемії і мінералізації	41-43,61
Матриксний Сіа-протеїн		MGP	Пригнічує мінералізацію	14,26-29
Остеопротегерин		OPG	Пригнічує диференціацію остеобластів, модулятор кісткової резорбції	34, 36-40
Рецептори активатора ліганда ядерного каппа-В фактора		RANKL	Сприяє остеокластогенезу, промінералізаційний фактор	34,35
Фетуїн А		Fetuin A	Інгібітор кальцифікації	30-33
Пірофосфат		PPi	Пригнічує розвиток біомінералізації	44
Галектин-3		GAL-3	Пригнічує підвищений остеокластогенез, сприяє макрокальцифікації	49-54
Рецептори кінцевих продуктів гліколізу		RAGE	Прозапальний фактор, сприяє мікрокальцифікації, нестабільність бляшки	46-50
Кальгрануліни А, В, С		S100A8, S100A9, S100A12	Секвеструють кальцій, частково сприяють кальцифікації	47-48

Однак, зростає доказова база про те, що різні паттерни кальцифікації мають різні або навіть протилежні гістологічні і клінічні властивості. Початкове відкладення депозитів кальцію відбувається у відповідь на прозапальні стимули у вигляді точкового або гранулярного відкладення сполук кальцію. Такий паттерн відомий як «мікрокальцифікація», він також характеризується індукцією запалення за типом «хибного кола» [45, 54]. Така форма патологічної біомінералізації у атеросклеротичній бляшці може сприяти її розриву. Утворення гомогенних листоподібних кальцифікатів у аорті, судинах та серцевих клапанах формує паттерн «макрокальцифікації», який навпаки, стабілізує атеросклеротичну бляшку і слугує бар'єром на шляху запалення [54]. Молекулярний механізм, за яким регулюється розвиток певного типу патологічної біомінералізації, достеменно невідомий.

*Апоптоз і біомінералізація у м'яких тканинах.* У вогнищі хронічного запалення надзвичайно поширені ушкодження та смерть клітин, що включають у себе ушкодження ДНК, аутофагію

та апоптоз. У процесі апоптозу судинні ГМК вивільняють МВ та апоптотичні тільця, здатні концентрувати кальцій та формувати кристали кальцію фосфату [13]. Таким чином, фактори, що сприяють загибелі клітин, також посилюють процеси біомінералізації. Наприклад, преламінін А блокує репарацію ДНК, і, одночасно, сприяє остеобластичній диференціації і мінералізації судинних клітин [57].

Присутність кісткоутворювальних білків та неколагенових білків кісткового матриксу, таких як остеопонтин, остеонектин і матриксний ОЬА- протеїн (МОР) при атеросклеротичних ураженнях судинної стінки показує кальцифікацію як активний процес з неясним механізмом розвитку. Доповненням до активної остеогенної кальцифікації м'яких тканини іншим важливим механізмом є дефіцит інгібіторів мінералізації, які в нормі експресуються в стінках судин [28].

Деякі вчені розглядають патологічну біомінералізацію як результат невдалого адаптивно-приспосувального механізму. Еволюційний тиск численних паразитів та бактеріальних інфекцій

призводить до об'єднання запального та імунного процесів. Хронічне запалення у м'яких тканинах (абсцеси, виразки і тд) часто призводить до ектопічної осифікації, так як організм формує «кісткову стінку» для обмеження та локалізації об'єктів, резистентних до звичайної імунної відповіді [54].

Також було помічено, що хронічне запалення здійснює протилежні ефекти на м'які і тверді тканини, сприяючи мінералізації перших та де-мінералізації других. Прикладом може слугувати остеомієліт та кальцифікуючий тендоніт [12]. Взагалі, хронічне запалення виступає основним фактором ектопічної кальцифікації м'яких тканин. Хронічне запалення судинної стінки в експерименті стає локалізацією атеросклеротичної кальцифікації у мишей [58]. Ці результати були підтверджені при аналізі радіологічних даних 137 пацієнтів, яких спостерігали впродовж 5 років. Місця фокального запалення аорти, виявлені за допомогою <sup>18</sup>F дезоксиглюкози при ПЕТ - скануванні, статистично значуще асоціювалися з заміщенням кальцифікатами, що виявлялися при комп'ютерній томографії (КТ) [59]. Важливим елементом у розвитку хронічного запалення судинної стінки є перекисне окислення ліпідів (ПОЛ). Наприклад, ПОЛ відіграє критичну роль у патогенезі атеросклерозу, коли у бляшці відбувається накопичення окислених ліпідів. Відомо, що ненасичені жирні кислоти риб'ячого жиру, які можуть пригнічувати ПОЛ, також пригнічують судинну кальцифікацію [60].

**Висновки.** Цілий масив нових спостережень і досліджень переконує у необхідності перегляду системи поглядів на ектопічну кальцифікацію, як пасивний і дегенеративний процес. Саме на цій застарілій парадигмі заснований поділ кальцифікації на дистрофічну, метастатичну і метаболічну [8]. Багато нещодавно відкритих специфічних механізмів регуляції кальцифікації м'яких тканин свідчать про активність цього процесу та його подібність до окостеніння у скелетній системі.

Концентрація кальцію та фосфатів у позаклітинній рідині близька до такої, яка необхідна для спонтанного утворення кристалів кальцію фосфату [61]. Преципітація мінералів запобігається інгібуючими факторами, кількість яких знаходиться на достатньому базовому рівні. Логічно, що ектопічна біомінералізація може провокуватися не тільки підвищенням активуючих факторів, але й зниження інгібуючих факторів. Отже, різні форми патологічної біомінералізації можуть бути обумовленими: 1) тільки посиленням активуючих факторів, 2) тільки зменшенням або втратою інгібіторів мінералізації, 3) комбінацією посилення активації та зниження інгібіції біомінералізації.

#### **Перспективи подальших досліджень**

Передбачається проведення низки клінічних та експериментальних досліджень з вивчення генезу ектопічної біомінералізації у м'яких тканинах за умов різних патологічних процесів.

### **Літературні джерела References**

1. Cotran RS, Kumare V, Robbins SL: Cellular injury and cellular death. Pathological basis of disease, 5th ed. Edited by SL Robbins. Philadelphia, WB Saunders; 1994. p. 1-35.
2. Grynypas M. New insights into the mechanisms of biomineralization. Calcif Tissue Int. 2013; 93: 297-8.
3. Vemadskiy VI. Biosfera [Biosphera]. I—II. Leningrad: Nauch-techn izd-vo; 1926. 147 p. Russian.
4. Srebnodolskiy BI. Biologicheskaiia minera- logiia [Biological mineralogy]. Kyiv: Naukova dumka; 1983. 101 p. Russian.
5. Zuzuk FB. Mineralogiia urolitiv [Mineralogy of uroliths]. I-III. Lutsk: Vezha; 2004. 582 p. Ukrainian.
6. Giachelli CM. Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification. Orthod Craniofac Res. 2005; 8 (4):229-31.
7. Block GA, Hulbert-Shearon TE. Association of serum phosphorus and calcium X phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. Am J Kidney Dis. 1998; 31:607-17.
8. Strukov AI, Serov VV, Sarkissov DS. editors. [General human pathology] Moscow: Meditsina; 1990. 447 p. Russian.
9. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. Curr Rheumatol Rep. 2003; 5(3):222-6.
10. Moskalenko R, Rieznik A, Gapchenko A, et al. [Morphological examination of thyroid diseases accompanied by biomineralization]. World of medicine and biology. 2015; (3): 324-31. Ukrainian.
11. Tang Z, Wang A, Yuan F et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. Nat Commun. 2012; 3: 875.
12. Schiller A.L, Teitelbaum S.L. Bones and joints. In: Rubin E.; Farber JL, editors. Pathology. Lippincott-Raven; 1999. P. 1337-47.
13. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. Circ Res. 2000; 87: 1055-62.
14. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystal upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopon-



- tin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int.* 2011;74:414-22.
15. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2014; 34 (4): 715-23.
  16. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biominerals. *Front Biosci.* 2005; 10:822-37.
  17. Kirsch T. Determinants of pathological mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008; 18 (1):1-9.
  18. Anderson HC. Mineralization by matrix vesicles. *Scan Electron Microsc.* 1984; (Pt 2):953-64.
  19. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 2011; 109:el-12.
  20. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res.* 2008; 23: 1798-805.
  21. New SE, Alikawa E. The role of extracellular vesicles in de novo mineralization: an additional novel mechanism of cardiovascular calcification. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2013; 33 (8): 1753- 8.
  22. New SE, Goettsch C, Aikawa M, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013; 113: 72-7.
  23. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulations of bone mineralization. *PNAS.* 2002 ; 99 :9445-9.
  24. Yadav MC, Simao AM, Narisawa S, et al. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 286-97.
  25. Kiffer-Moreira T, Yadav MC, Zhu D, et al. Pharmacological inhibition of PHOSPHO1 suppresses smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res.* 2013; 28: 81-91.
  26. Ueland T, Dahl CP, Gullestad L, et al. Circulating levels of non-phosphorylated undercarboxylated matrix Gla protein are associated with disease severity in patients with chronic heart failure. *Clin Sci (Lond).* 2011; 121: 119-27.
  27. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature.* 1997;386:78-81.
  28. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2005; 25: 1629-33.
  29. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma- carboxyglutamic acid. *Blood.* 1999; 93 (6): 1798- 808.
  30. Jahnen-Dechent W, Shafer C, Heiss A, Grotzinger J. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein alpha 2-HS glycoprotein/fetuin. *Z Kardiol.* 2001; 90 (Suppl 3): 47-56.
  31. Jahnen W, Shafer C, Ketteler M, McKee MD. Mineral shaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med.* 2008; 86: 379-89,
  32. Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, et al. Hierarchical role of fetuin A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008; 283: 14815-25.
  33. Gorski JP. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Front Biosci.* 2015; 16: 2598-621.
  34. Simonet WS, Lacey D, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89 (2): 309-19.
  35. Maziere C, Salle V, Gomilla C, Maziere JC. Oxidized low density lipoprotein enhanced RANKL expression in human osteoblast-like cells. Involvement of ERK, NfκappaB and NFAT. *Biochim Bio- phys Acta.* 2013 ; 1832 : 1756-64.
  36. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 ; 12 : 1260-8.
  37. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr (-/-) mice. *Circulation.* 2008 ; 117 : 411-20.
  38. Zhou S, Fang X, Xin H, Li W, Qui H, Guan S. Osteoprotegerin inhibits calcification of vascular smooth muscle cells via downregulation of the Notch 1-RBP-Jkappa/Msx2 signaling pathway. *PloS One.* 2013 ;8 :e68987.
  39. Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, et al. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 4104-12.
  40. Callegari A, Coons M, Ricks JL, Yang HL, Gross TS, et al. Bone marrow- or vessel wall- derived osteoprotegerin is sufficient to reduce atherosclerotic lesion size and vascular calcification. *Atheroscler Thromb Vase Biol.* 2013 ; 33 : 2491-500. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301755.
  41. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem.* 2008; 389: 233-41.
  42. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol.* 2007;

195: 125-31.

43. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 124-36.

44. Towler DA. Inorganic pyrophosphate: A paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 2005;25:651-4.

45. Menini S, Iacobini C, Ricci C, et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2013; 100: 472-80.

46. Nguyen N, Naik V, Speer MY. Diabetes mellitus accelerates cartilaginous metaplasia and calcification in atherosclerotic vessels of LDRr mutant mice. *Cardiovasc Pathol*. 2013; 22: 167-75.

47. McCormick M, Rahimi F, Bobryshev YV, Gaus K, et al. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. *The journal of biological chemistry*. 2005;280(50):41521-9.

48. Hofman Bowman MA, Gawdzik J, Buchari U, Husain AN, Toth PT, Earley J, McNally EM. S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic genes regulators program. *Arterioscler Thromb Vase Bio*. 2011; 31: 337-44.

49. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanism to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008; 196:9-21.

50. Zhu W, Sano H, Nagai R, et al. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Bi- ochem Biophys Res Commun*. 2001; 280: 1183-8.

51. Iacobini C, Menini S, Ricci C, et al. Accelerated lipid-induced atherogenesis in galectin-3- deficient mice: role of lipoxidation via receptor- mediated mechanisms. *Arterioscl Thromb Vase Biol*. 2009; 29: 831-6.

52. Stock M, Schafer H, Strieker S, et al. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled

by Runx2. *J Biol Chem*. 2003; 17360-7.

53. Li Q, Jiang Q, Uitto J. Ectopic mineralization disorders of the extracellular matrix of connective tissue: molecular genetics and pathomechanisms of aberrant calcification. *Matrix Biol*. 2014 Jan;33:23-8. doi: 10.1016/j.matbio.2013.06.003.

54. Pugliese G, Iacobini C, Blasetti- Fantanaucchi C, Menini S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis*. 2015; 238 (2):220-3.

55. Hoshino T, Chow LA, Hsu JJ, et al. Mechanical stress analysis of a rigid inclusion in distensible material: a model of atherosclerotic calcification and plaque vulnerability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H802-10.

56. Kelly-Amold A, Maldonado N, Laudier D, et al. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries, *PNAS*. 2013; 110: 10741-6.

57. Liu Y, Drozdov I, Shroff R, Beltran LE, Shanaban CM. Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in a vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2013; 112: e99-109.

58. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007; 116: 2841-50.

59. Abdelbaky A, Corsini E, Figueroa AL, et al. Focal arterial inflammation precedes subsequent calcification in the same location: a longitudinal FDG-PET/CT study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013; 6: 747-54.

60. Abedin M, Lim J, Tang TB, et al. N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38- mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathways. *Circ Res*. 2006; 98: 727-9.

61. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2004; 95: 560-7.

**Москаленко Р.А, Романюк А.М. Эволюция представлений о патологической биоминерализации в мягких тканях (обзор литературы).**

**Реферат.** Эктопические отложения соединений кальция в человеческом организме представлены солями кальция фосфата, преимущественно гидроксипатитом. Поскольку патологическая биоминерализация всегда представлена соединениями кальция, то термин «эктопическая кальцификация» можно считать тождественным или очень близким по значению. Много недавно открытых специфических механизмов регуляции кальцификации мягких тканей свидетельствуют об активности этого процесса и его сходство с окостенением в скелетной системе. Эктопическая биоминерализация может провоцироваться не только повышением активирующих факторов, но и снижением ингибирующих факторов. Таким образом, различные формы патологической биоминерализации могут быть обусловленными: 1) только усилением активирующих факторов, 2) только уменьшением или потерей ингибиторов минерализации, 3) комбинацией нарушения активации и ингибирования минералообразования.

**Ключевые слова:** биоминерализация, эктопическая кальцификация, мягкие ткани, патология.