

УДК 616-092

DOI 10.23648/UMBJ.2017.25.5242

ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ АОРТАЛЬНЫХ ПОЛУЛУНИЙ И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК У БОЛЬНЫХ КАЛЬЦИНИРУЮЩИМ АОРТАЛЬНЫМ СТЕНОЗОМ*

Н.И. Гуляев¹, М.В. Жуков^{2,3}, Г.Л. Куранов⁴, Ю.А. Борисов⁵,
Е.Д. Суглобова⁵, С.Г. Ястребов⁶, В.В. Кузнецов¹, А.С. Перемышленко¹,
А.В. Гордиенко¹, О.В. Костина¹, А.С. Пелешок¹

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики», г. Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУН «Институт аналитического приборостроения» Российской академии наук,
г. Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия;

⁵ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия;

⁶ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе» Российской академии наук,
г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: nig27@mail.ru

С целью изучения механизмов формирования первичного ядра кальцификации в матриксе аортальных полулуний исследованы адгезивные свойства эндотелиальной поверхности, субэндотелиальных структур аортальных полулуний и атеросклеротической бляшки основания аорты.

Материалы и методы. Исследованы 10 клапанов аорты и 10 участков корня аорты (в т.ч. участки с атеросклеротической бляшкой на стадии атероматоза без повреждения покрышки), взятых от пациентов без заболеваний сердца, а также 16 клапанов аорты, забранных у больных с тяжелой стадией аортального стеноза интраоперационно. С помощью рентгенодифракционного анализа выполнено исследование химического состава депозитов солей кальция аортальных полулуний. Изучение адгезивных свойств аортальных полулуний и атеросклеротических бляшек к частицам гидроксипатита (ГА) проведено методом атомно-силовой микроскопии с использованием специализированных зондов с ГА.

Результаты. В результате исследования химического состава кальцинатов аортальных полулуний определено, что их основу составляет ГА. Показано, что сила адгезии эндотелия основания аорты по отношению к фосфату кальция при формировании в этой области атеросклеротической бляшки увеличивается в 4 раза, что указывает на развитие дисфункции эндотелия. При повреждении эндотелия сила адгезии субэндотелиального пространства возрастает в 14–23 раза.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о патогенетической значимости в развитии кальциноза аортального клапана и корня аорты таких факторов, как дисфункция эндотелия, изменение его адгезивных свойств и обнажение субэндотелиальных структур. Результаты исследований демонстрируют эффективность использования разработанных специализированных зондов на основе ГА для моделирования процессов образования кальцийсодержащих структур клапана аорты.

Ключевые слова: кальцинирующий аортальный стеноз, патогенез, атомно-силовая микроскопия, рентгенодифракционный анализ, сканирующая электронная микроскопия, кальциноз, атеросклеротическая бляшка, адгезия, эндотелий, гидроксипатит (гидроксипатит).

* Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01). Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Геомодель» и «Рентгенодифракционные методы исследования».

Введение. В течение последних лет в России наметился рост средней продолжительности жизни, а вместе с этим и рост количества больных пожилого возраста с кальцинозом клапана аорты. Около 30 % пожилых людей имеют эхокардиографические и рентгенологические признаки склероза аортального клапана, ранние и субклинические формы кальцинирующей болезни аортального клапана.

Несмотря на повышенный интерес к этой проблеме, процесс формирования депозитов солей кальция в структурах аортального клапана остается в полной мере не изученным. В настоящее время доказано участие в регуляции отложения фосфатов кальция более 30 различных биологически активных соединений белковой или неорганической природы, ряда фенотипически измененных клеток, а также мембранно-везикулярных структур [1, 3]. При этом попытки терапевтического воздействия на эти звенья не привели к значимому замедлению формирования депозитов кальция. Следовательно, существуют некие дополнительные механизмы отложения солей кальция в экстрацеллюлярном матриксе клапана аорты. Не оспаривая доказанную в многочисленных исследованиях роль механизма активного накопления нерастворимых солей кальция в структуре аортальных полулуний, следует отметить, что в формирование данных отложений могут вносить вклад и различные физико-химические процессы. Как известно, при $pH > 4,2$ единственным термодинамически стабильным фосфатом кальция в водном растворе является гидроксилapatит (ГА) [4], который идентифицируется в депозитах солей кальция артерий человека [3, 4]. При этом механизмы формирования первичного «ядра» ГА в межклеточной ткани до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

В медицинских исследованиях часто имеется необходимость получения не только визуальных данных о биологических объектах, но и информации о топологических свойствах поверхности, включая силу адге-

зии, шероховатость, модули упругости и иные характеристики объектов [6, 7]. Происходит постепенная переориентация на наноразмерные области изучения поверхности, в т.ч. клеточный и субклеточный уровни исследования.

Таким образом, намечается переход от оптических методов исследования к более точным и функциональным методам изучения тонкой структуры нативных биообъектов, наиболее развитым из которых является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [8–11]. Это вызвано необходимостью в многостороннем моделировании и последующем установлении процессов, протекающих в организме, включая изучение новых болезней и выработку лекарственных средств к ним.

Одной из актуальных и мало изученных проблем, к решению которой можно подойти с помощью АСМ, является кальцинирующее поражение аортальных полулуний человека. Информация о топологии клапана и силе адгезии ГА к его поврежденным участкам важна для понимания процессов инициации формирования депозитов кальция в матриксе полулуний.

Цель исследования. Выявление возможных механизмов формирования первичного ядра кальцификации в матриксе субэндотелиального слоя, базирующихся на адгезивных свойствах эндотелия, субэндотелиальных структур аортальных полулуний и атеросклеротической бляшки основания аорты.

Материалы и методы. Адгезивные свойства эндотелия и субэндотелиальных структур клапана аорты были изучены на 16 клапанах с тяжелой стадией аортального стеноза (рис. 1) при протезировании, а также на 10 клапанах аорты и стенках корня аорты (в т.ч. участки с атеросклеротической бляшкой на стадии атероматоза без повреждения покрышки), взятых от пациентов без заболеваний сердца. Весь исследуемый материал помещался в 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия. Изучение структур методом АСМ проводилось в течение 6 ч с момента забора биологического материала.

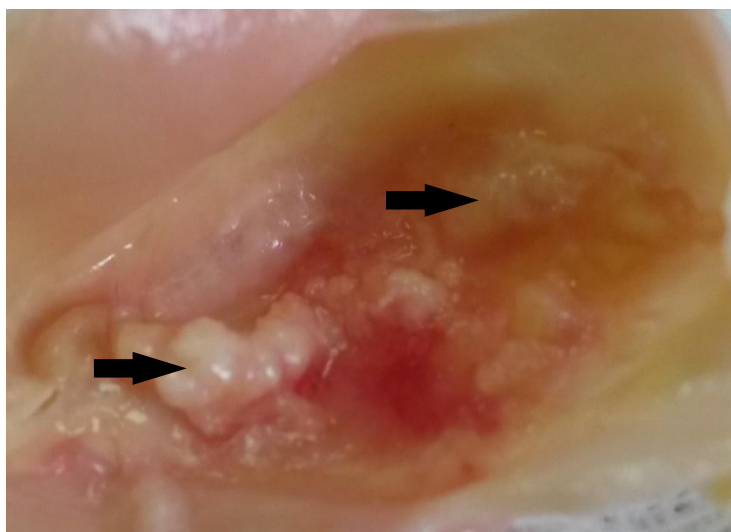


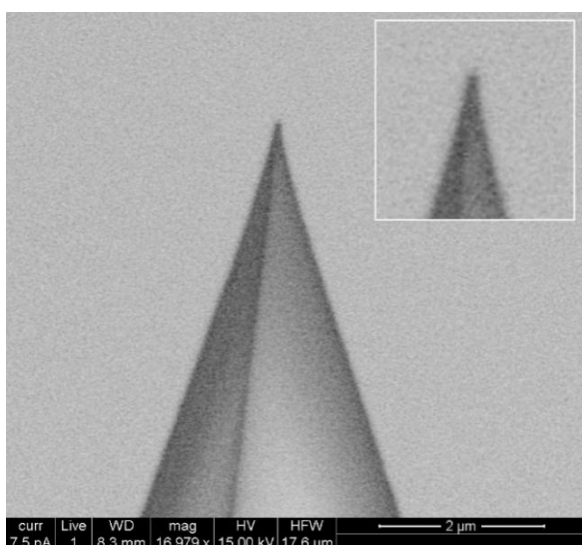
Рис. 1. Биоптат аортального полулуния. Больной К., 64 года, тяжелый аортальный стеноз. Крупные отложения депозитов кальция (стрелки)

В процессе исследования микроразмерной морфологии, элементного и фазового состава депозитов солей кальция с выделением субмикронных частиц кальцината использовался метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

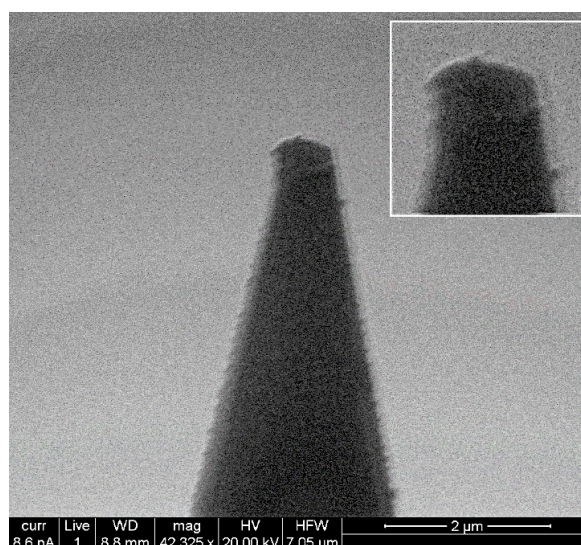
Изучение адгезивных свойств аортальных полулуний и атеросклеротических бляшек к частицам ГА проводилось методом АСМ с использованием специализированных

зондов с ГА. Создание зондов с ГА проводилось путем закрепления частицы ГА на вершине пирамиды стандартного кантилевера (рис. 2) с использованием полимерного адгезива, отверждаемого под действием УФ-излучения.

Поиск и закрепление ГА-частиц на вершине зонда осуществлялись с применением метода АСМ. Контроль параметров зондовых датчиков на основе ГА велся с помощью метода СЭМ.



(a)



(б)

Рис. 2. СЭМ-изображение стандартного зондового датчика до (а) и после (б) переноса ГА

Изучение адгезивных свойств аортального клапана к специализированным зондам на основе ГА проводилось в состоянии образца, близком к нативному (образец находился во влажном состоянии). Закрепление объекта исследования осуществлялось путем механического закрепления и растягивания участка клапана на слюдяной подложке. Измерение топографии проводилось в полуконтактном режиме для снижения инвазивности метода, тогда как кривые отвода для определения сил адгезии измерялись в контактном режиме АСМ. Для исследования свойств внутренней области клапана проводился надрез его поверхности.

Для повышения объективности и согласованности результатов проводилось свыше 500 последовательных измерений в случайных точках на поверхности различных участков сердечного клапана и атеросклеротической бляшки стенки аорты в зоне с общей площадью около 100 мм². Сравнительные исследования выполнялись с использованием стандартных зондов.

Сила адгезии определялась на участке кривой отвода (рис. 3), отвечающей за прилипание зонда к поверхности образца (отрезок АВ на кривых отвода). Отклонение зонда, обусловленное силами адгезии, устанавливалось по длине проекции отрезка АВ на ось X (отрезок А'В').

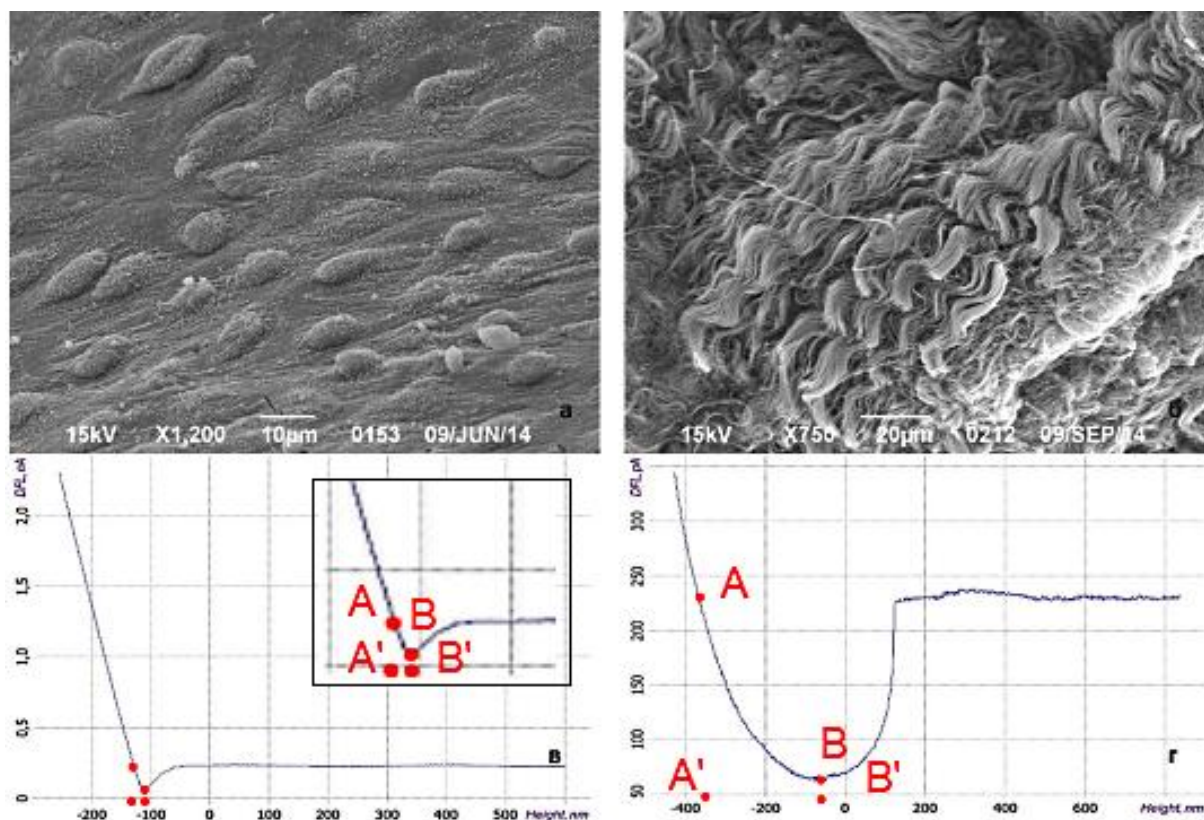


Рис. 3. Поверхность эндотелия аортальных полулуний (а) и субэндотелиального слоя (б), сканирующая электронная микроскопия. Характерные кривые отвода, полученные при АСМ на эндотелии (в) и субэндотелиальном слое (г) аортального клапана с использованием специализированных ГА-зондов

Результаты. При исследовании минерального состава отложений в аортальных полулуниях методом рентгенодифракционного анализа регистрировали депозиты солей кальция в виде гидроксилapatита с элемен-

тами аморфной фазы фосфата кальция, возможно, имеющими незначительные замещения карбонатными группами, которые не изменяют параметры кристаллической решетки [3, 4]. На рис. 4 представлены рентгенодиаф-

рактограммы (XRD-спектры) двух образцов кальцината в сравнении со спектром синтетического ГА. Полуколичественный элементный состав отложений оценивали по энергодисперсионным спектрам (EDX). Соотношение количеств атомов кальция и фос-

фора составляло в среднем 1,73 (в стехиометрическом ГА эта величина равна 1,67). Таким образом, результаты XRD- и EDX-исследования позволяют утверждать, что изучаемые нами кальциаты представляют собой в основном ГА.

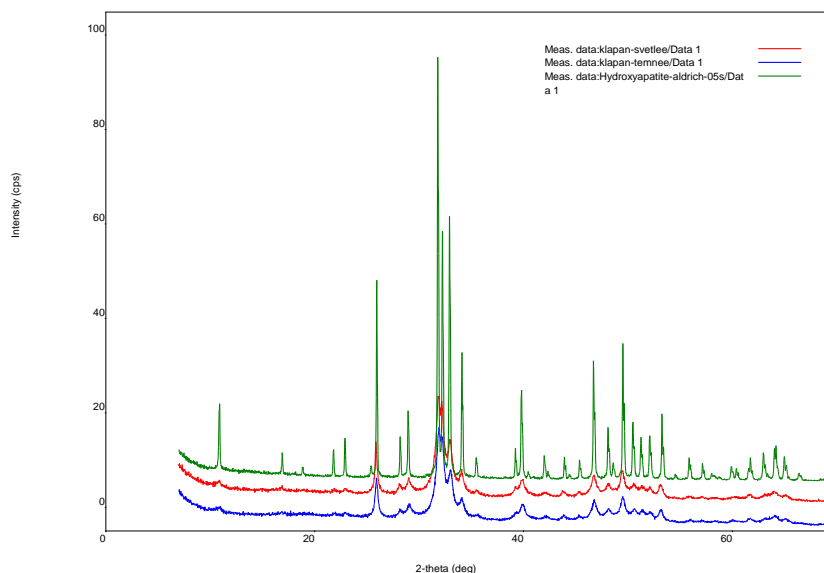


Рис. 4. Сравнение XRD-спектров образцов кальцината аортальных полулуний и синтетического ГА

Результаты экспериментов показали, что в области неповрежденного эндотелия (рис. 3а) на аортальной и желудочковой поверхностях аортальных полулуний значение Z составило $22,5 \pm 2,5$ нм, что соответствует средней силе адгезии 56,7 нН (рис. 3в). Аналогичные результаты были получены для неповрежденного эндотелия корня аорты. Величины тех же параметров, определенные для субэндотелиального слоя (рис. 3б), оказались на порядок выше и составили 300 ± 20 нм и 850 нН соответственно (рис. 3г). Следует отметить, что кривые адгезии имели высокую степень совпадения при многократных исследованиях различных участков сердечного клапана. Наиболее характерные кривые адгезии представлены на рис. 3в, г. Как видно из данных, представленных на рис. 3, для кривой отвода в случае субэндотелиального слоя, в отличие от неповрежденного эндотелия, характерен плавный переход от нижней точки В (прилипание) к начальному

положению кантилевера (горизонтальная линия напротив точки А) в правой части кривой (рис. 3г), что объясняется постепенным отлипанием зонда от внутренней поверхности клапана при отводе. Аналогично с использованием стандартного и специализированного зондов выполнены исследования силы адгезии поверхности эндотелия и субэндотелиального слоя атеросклеротической бляшки синуса Вальсальвы (стадия атероматоза). Полученные результаты представлены в табл. 1.

Обсуждение. По совокупности наблюдений можно утверждать, что степень адгезии различных материалов к эндотелию и субэндотелиальному слою изменяется в широком диапазоне (табл. 1). Следовательно, силу адгезии необходимо измерять, используя не стандартные АСМ-зонды (как правило, кремниевые), а специализированные, воспроизводя при их помощи непосредственный контакт тех материалов, силу адгезии которых необходимо изучить.

Таблица 1

**Величина силы адгезии аортального полулуния
и атеросклеротической бляшки синуса Вальсальвы, нН**

	Специализированный ГА-зонд		Стандартный АСМ-зонд (кремний, серия NSG01)	
	Эндотелиальная поверхность	Субэндотелиальная область	Эндотелиальная поверхность	Субэндотелиальная область
Неизмененное аортальное полулуние	57	850	3238	1114
Холестериновая бляшка стенки корня аорты (синус Вальсальвы)	191	1322	244	637

Исследование силы адгезии специализированным зондом показало, что ее значение минимально у неизмененного эндотелия. При этом показатели силы адгезии эндотелия аортальных полулуний не отличались от таковых в области стенки аорты синусов Вальсальвы. При формировании атеросклеротической бляшки на стадии атероматоза формируется дисфункция эндотелия покровышки, что проявляется в виде увеличения силы адгезии почти в 4 раза. При повреждении покровышки степень адгезии структур ядра бляшки в от-

ношении фосфата кальция возрастает более чем в 23 раза – до 1322 нН (рис. 5), в то же время при повреждении неизмененного эндотелия аортальных полулуний сила адгезии увеличивается в 14 раз. Следовательно, субэндотелиальные структуры обладают крайне высоким сродством по отношению к ионам кальция и остатку фосфорной кислоты, что предопределяет высокий потенциал развития кальциноза при микроповреждении и дисфункции эндотелия [12].



Рис. 5. Характеристика адгезивных свойств неизмененного эндотелия, эндотелия над атеросклеротической бляшкой (неповрежденная бляшка), субэндотелиальных структур аортального полулуния и атеросклеротической бляшки в отношении ГА

Известно, что эндотелий и соединительная ткань аортальных полулуний непрерывно подвергаются высокоэнергетическому гидро-

динамическому воздействию потоков крови со значительным градиентом давления, что приводит к выраженной разнонаправленной

деформации структуры полулуний. Все это в совокупности с часто наблюдаемым изменением качественного и количественного состава межклеточного матрикса аортальных полулуний формирует предпосылки к повреждению и нарушению функциональной активности эндотелия, обнажению субэндотелиальных структур. В свою очередь контакт «обнаженных» сульфатированных гликопротеинов и коллагеновых волокон с ионами кальция плазмы крови может приводить к инициированию формирования кристаллических и кристаллоподобных структур непосредственно в матриксе клапана [13].

Следует отметить, что при переходе венозной крови в артериальную в малом круге кровообращения происходит смещение рН в щелочную сторону (7,35–7,45) с развитием целого каскада физико-химических процессов. С одной стороны, при увеличении рН артериальной крови снижается концентрация протонов водорода и, следовательно, облегчается контакт ионов кальция и фосфорилированных боковых цепей аминокислотной основы белка (в рамках механизма конкуренции за связывание с депротонированным гидроксиллом остатка фосфорной кислоты между протонами водорода и ионами кальция). С другой стороны, низкая скорость потока крови в синусах Вальсальвы создает предпосылки для формирования локальной «концентрационной пересыщенности» и образования относительно устойчивых мало-растворимых средних солей – фосфатов кальция $[Ca(OH)]_3PO_4$. При этом на начальном этапе образуются частицы размером около 1 нм, что соответствует размеру ионного ассоциата $Ca_9(PO_4)_6$ [14]. В свою очередь ионные ассоциаты при наличии благоприятных условий (денудация – обнажение субэндотелиального слоя при повреждении эндотелия) и с учетом высокого адгезивного потенциала субэндотелиального слоя аор-

тальных полулуний (табл. 1) могут фиксироваться во внеклеточном матриксе и формировать ядра нуклеации ГА.

В дальнейшем путем пассивного физико-химического процесса на образовавшемся «ядре» формируется аморфный фосфат кальция, являющийся предшественником образования ГА [14]. Данному процессу способствует отрицательный заряд поверхности кристаллов ГА в щелочной среде, придающий им способность сорбировать ионы Ca^{2+} и $CaOH^+$ из плазмы [15], что обеспечивает рост кристаллов в межклеточной ткани клапана.

Закключение. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об эффективности использования разработанных специализированных зондов на основе ГА для моделирования процессов формирования кальцийсодержащих элементов в структуре сердечного клапана и стенки аорты. Разнообразие патологических процессов, протекающих в субэндотелиальном слое, ускоряет формирование дисфункции эндотелия, что подтверждается статистически значимым ростом его адгезивных свойств. Установлено, что сила адгезии фосфата кальция в области субэндотелиальных структур с элементами повреждения многократно выше, чем над неизменным эндотелием. Полученные факты в комплексе с «классическими» патогенетическими механизмами подтверждают возможность формирования первичного ядра нуклеации ГА в очагах повреждения эндотелия.

Следовательно, можно считать, что в минерализации участков, непосредственно контактирующих с кровью, важную роль играют пассивные физико-химические процессы, а нормальное состояние и функционирование эндотелия является одним из ключевых факторов в предотвращении инициации процесса кристаллообразования во внеклеточном матриксе как аортального клапана, так и стенки аорты.

Литература

1. Агеев Ф.Т., Баранова И.В., Серединина Е.М., Орлова Я.А., Кузьмина А.Е. Механизмы формирования кальцификации артерий. Кардиологический вестник. 2012; 7 (2): 57–64.
2. Efstratiadis G., Koskinas K., Pagourelis E. Coronary calcification in patients with end-stage renal disease: a novel endocrine disorder? Hormones. 2007; 6 (2): 120–131.

3. Prieto R.M., Gomila I., Söhnel O., Costa-Bauza A., Bonnin O., Grases F. Study on the structure and composition of aortic valve calcific deposits: Etiological aspects. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2011; 2 (1): 19–25.
4. Вересов А.Г., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д. Химия неорганических биоматериалов на основе фосфатов кальция. *Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева)*. 2004; XLVIII (4): 52–64.
5. Пухов Д.Э., Васильев С.В., Зотов А.С., Ильин М.В., Рудый А.С. Микроморфология, состав, особенности локализации минеральных отложений створок аортальных клапанов по данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. 2014; 9 (1): 23–30.
6. Lim K.P., Tan L.P. Interaction force measurements for the design of tissue adhesives. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5, iss. 1: 84–92.
7. Lisa Manning M., Ramsey A. Foty, Malcolm S. Steinberg, and Eva-Maria Schoetz. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *PNAS*. 2010; 107 (28): 12517–12522.
8. Siamantouras E., Hills C.E., Younis M.Y., Squires P.E., Liu K.K. Quantitative investigation of calcimimetic R568 on beta cell adhesion and mechanics using AFM single-cell force spectroscopy. *FEBS Lett*. 2014; 588 (7): 1178–1183.
9. Zhukov M.V., Kukhtevich I.V., Levichev V.V., Mukhin I.S., Golubok A.O. Specialized probes with nanopillar structures for scanning probe microscopy. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2014; 541 (1): 012042 (6pp).
10. Дедков В.Г., Дедкова Е.Г. Контактная атомно-силовая спектроскопия биологических тканей. *Письма в ЖТФ*. 2010; 36 (3): 76–81.
11. Benoit M., Gaub H.E. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs*. 2002; 172: 174–189.
12. Гуляев Н.И. Дисфункция эндотелия у больных с дегенеративным стенозом клапана аорты: современное состояние проблемы. *Клиническая медицина*. 2015; 5: 37–42.
13. Scott J.E. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2001; 49 (4): 284–289.
14. Omura K., Ito A. Cluster Growth model for hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 1998; 10: 3346–3351.
15. Казанова Т. Неорганические фосфатные материалы (пер. с япон.). Киев: Наукова думка; 1998: 17–109.

ADHESIVE PROPERTIES OF AORTIC SEMILUNAR VALVE AND ATHEROSCLEROTIC PLAQUES IN PATIENTS WITH CALCIFIC AORTIC STENOSIS

N.I. Gulyaev¹, M.V. Zhukov^{2,3}, G.L. Kuranov⁴, Yu.A. Borisov⁵,
E.D. Suglobova⁵, S.G. Yastrebov⁶, V.V. Kuznetsov¹, A.S. Peremyshlenko¹,
A.V. Gordienko¹, O.V. Kostina¹, A.S. Peleshok¹

¹S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Peresburg, Russia;

²ITMO University (Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics), St. Peresburg, Russia;

³Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences (IAI RAS), St. Peresburg, Russia;

⁴Saint Petersburg State University, St. Peresburg, Russia;

⁵Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Peresburg, Russia;

⁶Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, St. Peresburg, Russia

e-mail: nig27@mail.ru

The objective of the paper is to study the source mechanisms of the primary nucleus calcification in the matrix of the aortic semilunar valve and to determine the adhesive properties of the endothelial surface, and subendothelial structures of aortic semilunar valve and atherosclerotic aortic plaques.

Materials and Methods. We studied 10 aortic valves and 10 parts of the aortic root (including areas with atherosclerotic plaques in the atheromatosis stage without wall damage) taken from patients without car-

diac disorders, and 16 aortic valves retrieved intraoperatively from patients with severe aortic stenosis. The chemical composition of aortic calcium deposits was studied using XRD analysis. The study of adhesive properties of aortic leaflets and aortic atherosclerotic plaques to hydroxyapatite (HA) particles was conducted by means of atomic force microscopy and specialized probes with hydroxyapatite structures. The study of the chemical composition of aortic calcium deposits determined that they consisted of hydroxyapatite. It was shown that the endothelium adhesion force of the aortic root toward calcium phosphate increased 4 times if an atherosclerotic plaque was formed in this area, which denoted endothelial dysfunction. If endothelium was damaged adhesion force of subendothelial space increased 14–23 times. Conclusion. The results obtained demonstrate pathogenetic value of adhesive changes of endothelium and subendothelial structures in the development of calcified aortic stenosis. The suggested method of atomic force microscopy and specialized probes with hydroxyapatite structures helps to simulate the processes of ectopic calcification of the aortic valve.

Keywords: calcific aortic stenosis, pathogenesis, atomic force microscopy, XRD analysis, scanning electronic microscopy, calcification, atherosclerotic plaque, adhesion, endothelium, hydroxyapatite.

References

1. Ageev F.T., Barinova I.V., Seredinina E.M., Orlova Ya.A., Kuz'mina A.E. Mekhanizmy formirovaniya kal'tsifikatsii arteriy [Mechanisms of arteriosteo-genesis]. *Kardiologicheskiy vestnik*. 2012; 7 (2): 57–64 (in Russian).
2. Efstratiadis G., Koskinas K., Pagourelas E. Coronary calcification in patients with end-stage renal disease: a novel endocrine disorder? *Hormones*. 2007; 6 (2): 120–131.
3. Prieto R.M., Gomila I., Söhnel O., Costa-Bauza A., Bonnin O., Grases F. Study on the structure and composition of aortic valve calcific deposits: Etiological aspects. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2011; 2 (1): 19–25.
4. Veresov A.G., Putlyaev V.I., Tret'yakov Yu.D. Khimiya neorganicheskikh biomaterialov na osnove fosfatov kal'tsiya. [Chemistry of inorganic biomaterials on the basis of calcium phosphate]. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal (Zhurnal Rossiyskogo khimicheskogo obshchestva im. D.I. Mendeleeva)*. 2004; XLVIII (4): 52–64 (in Russian).
5. Pukhov D.E., Vasil'ev S.V., Zotov A.S., Il'in M.V., Rudyy A.S. Mikromorfologiya, sostav, osobennosti lokalizatsii mineral'nykh otlozheniy stvorok aortal'nykh klapanov po dannym skaniruyushchey elektronnoy mikroskopii i rentgenodifraktsionnogo analiza [Micromorphology, composition and localization of mineral deposits of aortal valve scusps according to the scanning electronic microscopy and XRD analysis]. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova*. 2014; 9 (1): 23–30 (in Russian).
6. Lim K.P., Tan L.P. Interaction force measurements for the design of tissue adhesives. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5, Issue 1: 84–92.
7. Lisa Manning M., Ramsey A. Foty, Malcolm S. Steinberg, and Eva-Maria Schoetz. Coaction of inter-cellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *PNAS*. 2010; 107 (28): 12517–12522.
8. Siamantouras E., Hills C.E., Younis M.Y., Squires P.E., Liu K.K. Quantitative investigation of calcimimetic R568 on beta cell adhesion and mechanics using AFM single-cell force spectroscopy. *FEBS Lett*. 2014; 588 (7): 1178–1183.
9. Zhukov M.V., Kukhtevich I.V., Levichev V.V., Mukhin I.S., Golubok A.O. Specialized probes with nanowisker structures for scanning probe microscopy. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2014; 541 (1): 012042 (6pp).
10. Dedkov V.G., Dedkova E.G. Kontaktnaya atomno-silovaya spektroskopiya biologicheskikh tkaney [Contact atomic force spectroscopy of biological tissues]. *Pis'ma v ZhTF*. 2010; 36 (3): 76–81 (in Russian).
11. Benoit M., Gaub H.E. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs*. 2002; 172: 174–189.
12. Gulyaev N.I. Disfunktsiya endoteliya u bol'nykh s degenerativnym stenozom klapana aorty: sovremennoe sostoyanie problemy [Endothelial dysfunction in patients with degenerative aortic stenosis: modern problem state]. *Klinicheskaya meditsina*. 2015; 5: 37–42 (in Russian).
13. Scott J. E. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2001; 49 (4): 284–289.
14. Omuna K., Ito A. Cluster Growth model for hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 1998; 10: 3346–3351.
15. Kazanova T. *Neorganicheskie fosfatnye materialy* [Inorganic phosphate materials (translated from Japanese)]. Kiev: Naukova dumka; 1998: 17–109 (in Russian).