

Жилкин Б. А., Докторов А. А., Денисов-Никольский Ю. И.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ СТРУКТУР ПРИ АТЕРОКАЛЬЦИНОЗЕ

НИЦ биомедицинских технологий (руководитель — акад. РАМН Ю. И. Денисов-Никольский) Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений

Методами световой, сканирующей, трансмиссионной электронной микроскопии и крио-фрактографии изучали минеральный компонент обызвествленных атеросклеротических бляшек. Он образован кристаллами ($12 - 13 \times 6 - 7 \times 3 - 4$ нм), которые формируют копланарные объединения ($30 - 32 \times 17 - 19 \times 3 - 4$ нм). Выявлены особенности распределения минеральных частиц в областях кальцифицированной соединительной ткани, а также в минерализованных атероматозных массах. Проведено сравнение минеральных структур, сформированных в ходе процесса физиологической минерализации и патологического обызвествления.

В настоящее время атеросклероз широко распространен среди населения экономически развитых стран мира, а связанный с ним кальциноз сосудов коррелирует со значительной смертностью больных [13]. Для данного типа биоминерализации И. В. Давыдовский употребил термин «атерокальциноз», получивший широкое распространение в литературе [1].

Развитие атерокальциноза может сопровождаться нарастанием клинических проявлений атеросклероза [10, 14, 15, 16]. Изучение процесса минерализации и минеральных отложений в сосудистой стенке является важным для понимания патогенеза атеросклероза, так как в процессе минерализации при атерокальцинозе задействованы как клетки, так и многие матриксные компоненты [1, 13]. Однако минерал атеросклеротических бляшек до настоящего времени изучен мало, что связано с трудностью подбора гистологических методов исследования.

Цель исследования — выяснение закономерностей структурной организации минерального компонента при атерокальцинозе.

Материалом для исследования служили брюшные отделы аорты с признаками атерокальциноза, взятые от 23 умерших в возрасте 75–89 лет. Для гистологических исследований образцы объемом 1–2 мм³ заключали в эпоксидную смолу Эпон 812 по стандартной методике. Полутонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-V, окрашивали толуидиновым синим.

Подготовка образцов для изучения пространственной организации минерального компонента методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) включала обработку 5 % раствором гипохлорита натрия марки А, проводку по спиртам восходящей концентрации, обезжиривание в эфире и высушивание на воздухе. Высушенные образцы приклеивали на предметные столики токопроводящим клеем и напыляли медью при помощи прибора JEOL YEE-4B. Материал изучали в микроскопе SEM-515 (Philips).

Для исследования методом ТЭМ образцы объемом 1 мм³ заключали в смолу (Эпон 812) по стандартной методике. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-V с помощью алмазного ножа, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца.

В работе также использовали технику замораживания-скалывания. Для этого образцы объемом около 1,5 мм³ помещали в 20–30 % водный раствор глицерина, закрепляли на столиках, замораживали в переохлажденном жидком азоте в тече-

ние 3–5 с, устанавливали в рабочую камеру высоковольтной напылительной установки VAF-400D (Balzers) и выполняли скалывание и травление поверхности при температуре -105°C . В отдельной серии экспериментов для изучения естественной поверхности объектов скалывания перед напылением не производили. Напыление платиной (слой 2–3 нм) осуществляли под углом 45° , а углеродом (слой 20–22 нм) — под углом 90° . Реплики очищали в соляной кислоте и после неоднократного промывания в бидистиллированной воде помещали на медные сетки. Платиноуглеродные реплики и ультратонкие срезы изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа EM-420 (Philips).

Общая характеристика обызвествляющихся участков артериальной стенки при атерокальцинозе. Минеральные отложения при атерокальцинозе окружены прослойками соединительной ткани и областями атероматозного распада, включающими в свой состав фрагменты эластических мембран толщиной 0,4–1 мкм и более (рис. 1, а). Образующийся при атерокальцинозе минерал представлен кристаллами $12 \times 6 - 7 \times 3 - 4$ нм и их копланарными объединениями, имеющими вид пластин неправильной формы и размеры $30 - 32 \times 17 - 19 \times 3 - 4$ нм (рис. 1, б, в).

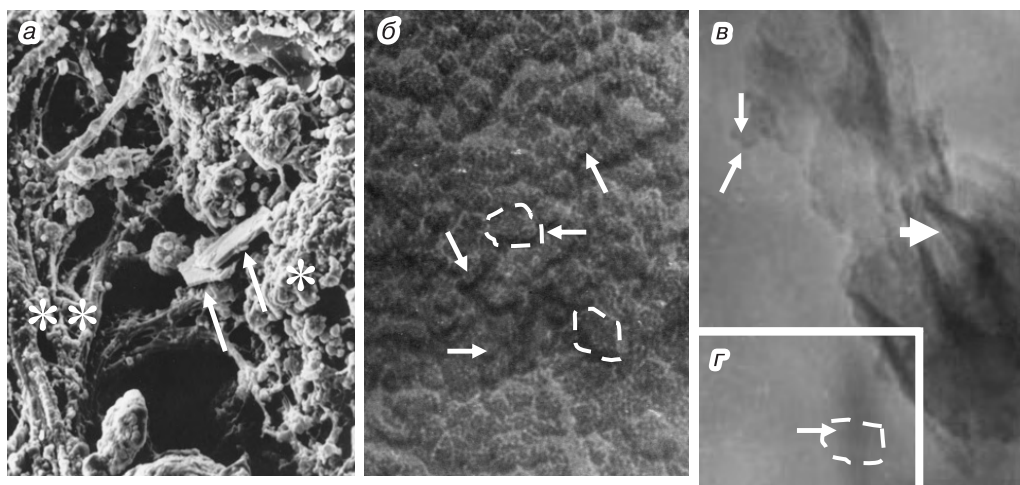


Рис. 1. Структурные образования в обызвествляющейся атеросклеротической бляшке (ув.: а — 902; б — 188 125; в — 309 589; г — 357 078): а — участок атероматозного распада (*), фрагменты эластических мембран (↑) и коллагеновые волокна (**) в атеросклеротической бляшке. СЭМ; б — кристаллы минерала (↑), копланарные объединения кристаллов (---). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; в, г — кристаллы минерала (↑), копланарное объединение кристаллов (---). Минеральная частица, расположенная ребром по отношению к наблюдателю (широкая стрелка). Обработка гипохлоритом натрия. Деагрегированный минерал

Области минерализованной соединительной ткани. В обызвествленных коллагеновых волокнах соединительной ткани дифференцируются занимающие большую часть их объема минерализованные коллагеновые фибриллы. Многочисленные кальцифицированные матричные везикулы размещены в обызвествленном основном веществе, заполняющем межфибриллярные промежутки.

Везикулярный пул минеральных частиц формирует округлую структуру диаметром 381–676 нм, отграниченную от окружающих неорганических отложений

(рис. 2, *a*). В обызвествленных коллагеновых фибриллах выявляются параллельные пласти минеральных частиц (рис. 2, *б*). Пласти ориентированы под углом 12–17° по отношению к длинной оси фибриллы.

Вокруг кальцифицированных коллагеновых фибрилл располагаются циркулярно окружающие их минеральные частицы, формирующие околофибриллярные

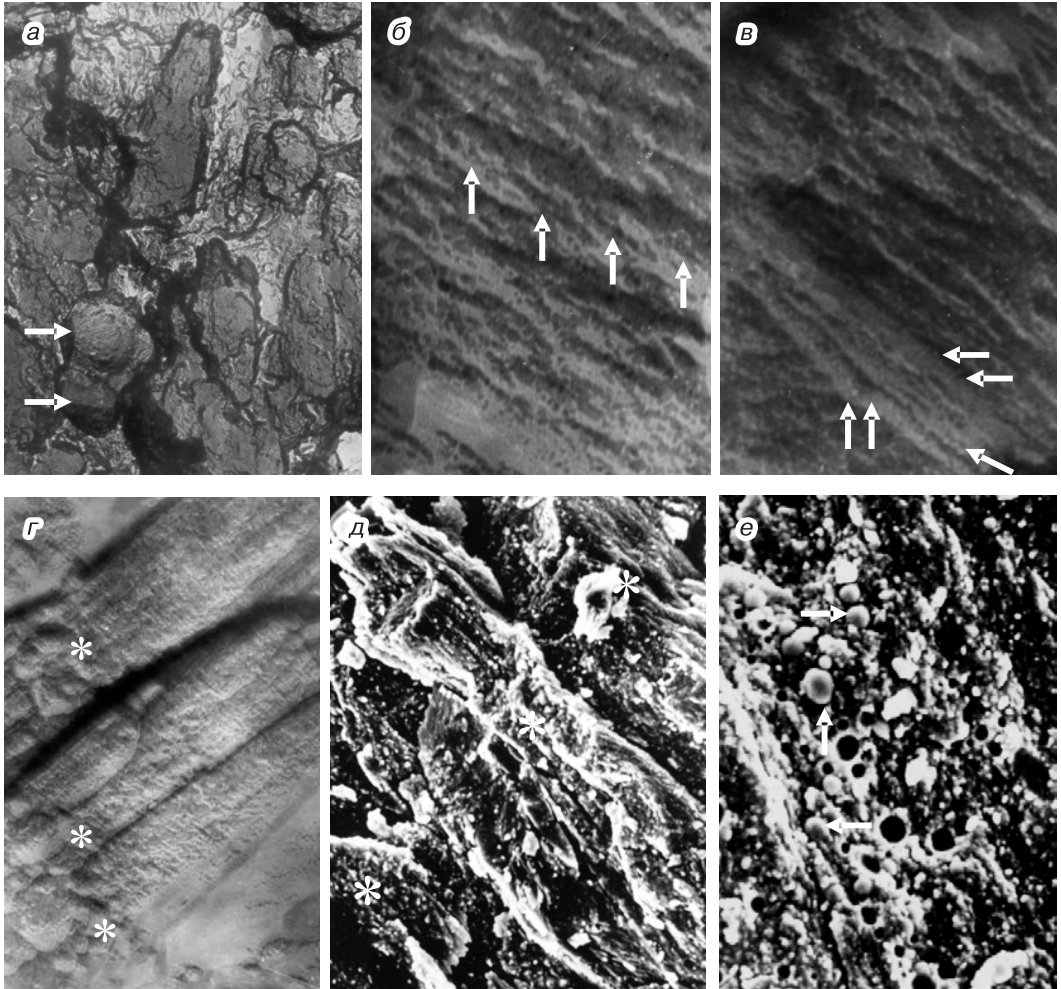


Рис. 2. Минеральные структуры в областях соединительной ткани атеросклеротической бляшки (ув.: *a* – 3364; *б* – 172081; *в* – 175978; *г* – 78750; *д* – 1423; *е* – 2902): *a* – минерализованные матричные везикулы (↑). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *б* – внутрифибриллярные минеральные пласти (↑). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *в* – околофибриллярная минеральная манжетка (↑↑), внутрифибриллярные минеральные структуры (↑). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *г* – плотные группы минеральных частиц в межфибриллярных промежутках (*). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *д* – пучки (*) минерализованных коллагеновых волокон. Обработка гипохлоритом натрия. СЭМ; *е* – глобулярные минеральные структуры (↑) в составе пучка обызвествленных коллагеновых волокон. Обработка гипохлоритом натрия. СЭМ

Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *г* – плотные группы минеральных частиц в межфибриллярных промежутках (*). Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *д* – пучки (*) минерализованных коллагеновых волокон. Обработка гипохлоритом натрия. СЭМ; *е* – глобулярные минеральные структуры (↑) в составе пучка обызвествленных коллагеновых волокон. Обработка гипохлоритом натрия. СЭМ

минеральные манжетки (рис. 2, *в*). Такие манжетки могут прилежать друг к другу, контактируя между собой, но могут соединяться и посредством плотных групп минеральных частиц, заполняющих промежутки между ними (рис. 2, *з*).

Минерализованные матриксные везикулы, коллагеновые фибриллы и основное вещество входят в состав обызвествленных коллагеновых волокон, которые размещаются в виде пучков (рис. 2, *д*). Их пучки имеют различную толщину из-за разного количества входящих в их состав волокон и могут быть ориентированы как в одном направлении, так и под разными углами по отношению друг к другу. В толще пучков минерализованных волокон встречаются как отдельные минерализованные конгломераты (478–934 нм в диаметре), так и калькосфериты (1,5–2,0 мкм в диаметре) (рис. 2, *е*).

Кальцифицированные области атероматозного распада. В областях атероматозного распада встречаются многочисленные кальцифицированные матриксные везикулы размерами 85–573 нм (рис. 3, *а*). Они находятся в окружении обызвествленных атероматозных масс. При этом плотные группы кристаллов и их объединений в атероматозных массах прилегают к поверхности везикул. На удалении от обызвествленных везикул частицы минерала расположены в виде плотных групп, ориентированных под разными углами по отношению друг к другу и служащих связующими звеньями между обызвествленными везикулами (рис. 3, *б*).

Минерализованные везикулы и кальцифицированные атероматозные массы входят в состав конгломератов глобулярной формы (диаметр 257–844 нм). Плотные группы конгломератов соединяются друг с другом, формируя калькосфериты

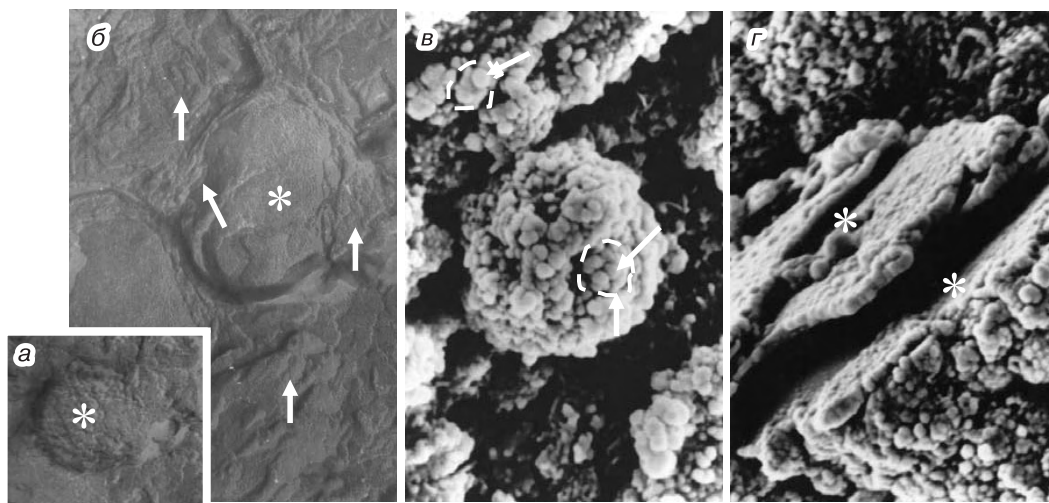


Рис. 3. Минеральные структуры в областях атероматозного распада
(ув.: *а* — 82146; *б* — 82485; *г* — 3097; *з* — 2528):

а — обызвествленная везикула матрикса (*). Обработка гипохлоритом натрия.

Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *б* — плотные группы (↑) кристаллов и их объединений, располагающиеся вокруг везикул (*) и на удалении от них. Обработка гипохлоритом натрия. Платиноуглеродная реплика. ТЭМ; *г* — минерализованные конгломераты (↑) в составе калькосферитов (---). Обработка гипохлоритом натрия.

СЭМ; *з* — минеральные футляры (*) с просветом, соответствующим по форме и размерам фрагментам эластических мембран. Обработка гипохлоритом натрия. СЭМ

с округлыми очертаниями (диаметр 0,9–3,0 мкм) (рис. 3, *в*). Контакт калькосферитов между собой осуществляется при помощи небольшого количества рыхло упакованных конгломератов. Слияние калькосферитов обеспечивает формирование полностью обызвествленного очага атероматозного распада.

Особенностью минеральных структур в обызвествленных атероматозных массах является наличие минеральных футляров вокруг фрагментов эластических мембран (рис. 3, *г*). Стенка таких футляров образована плотно упакованными конгломератами и калькосферитами. После удаления органической составляющей просветы футляров имеют размеры 0,8–2,0 мкм. Минеральные футляры расположены в окружении менее плотно упакованных калькосферитов.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования показаны особенности структурной организации минерализованных областей при атерокальцинозе (рис. 4). Основные черты строения минерала в прослойках соединительной ткани атеросклеротической бляшки подобны таковым в пластинчатой кости и в интертерриториальном матриксе фиброзного хряща [2, 3, 4, 5]. Это может быть обусловлено высоким содержанием коллагена I типа, с фибриллами которого связано самостоятельное отложение неорганических веществ, обуславливающее существующую картину распределения минеральных частиц [7, 11].

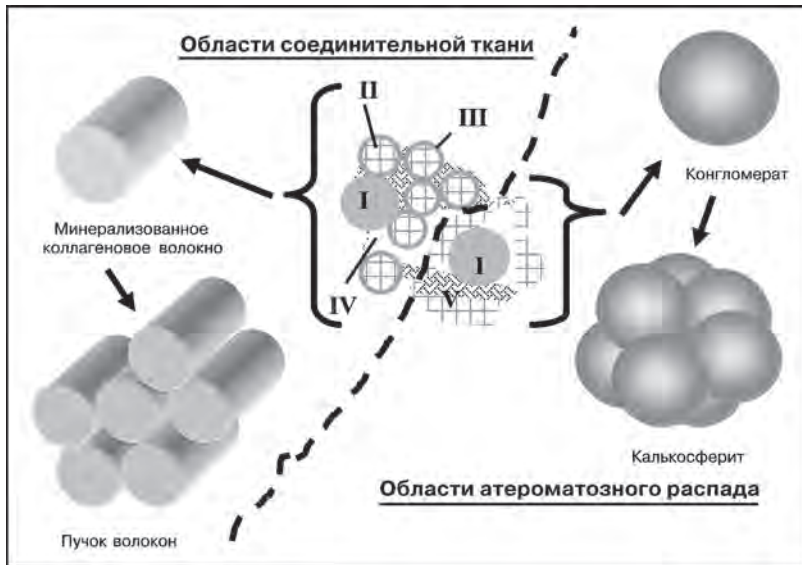


Рис. 4. Схема организации минерализованных структур в атеросклеротической бляшке:

- I — обызвествленные матричные везикулы; II — кальцифицированные коллагеновые фибриллы; III — околофибриллярные минеральные манжетки; IV — плотные группы минеральных частиц в межфибриллярных промежутках;
- V — кальцифицированные атероматозные массы

Размещение минеральных образований в атероматозных массах близко к таковому в гиалиновом хряще и территориальном матриксе фиброзного хряща [4, 5]. Очевидно, что здесь играет значительную роль механизм нуклеации минеральных частиц в микрокомпартаментах с последующим обызвествлением близлежащих участков, что проявляется в глобулярном строении минеральных отложений [6, 8, 12, 17].

Характерной особенностью атероматозных очагов является наличие минерализованных футляров вокруг необызвествленных фрагментов эластических мембран. Не исключено, что участки, занимаемые эластическими структурами, могут минерализоваться лишь в том случае, когда в процессе вакуолизации эластина и проникновения в глубь эластических волокон нейтральных жиров и неэстерифицированного холестерина эластические мембраны полностью утрачивают свою структурную организацию [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вихерт А. М., Седов К. Р., Соколова Р. И.* Кальциноз артерий. — М.: Медицина, 1970.
2. *Денисов-Никольский Ю. И., Жилкин Б. А., Докторов А. А., Матвейчук И. В.* Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста // *Морфология*. 2002. Т. 122. № 5. С. 79–83.
3. *Жилкин Б. А., Денисов-Никольский Ю. И., Докторов А. А.* Структурная организация минерального компонента пластинчатой кости и процесс его формирования // *Успехи современной биол.* 2003. Т. 123. № 6. С. 590–598.
4. *Жилкин Б. А., Докторов А. А., Денисов-Никольский Ю. И.* Минеральные структуры в скелете человека // *Технологии живых систем*. 2004. Т. 1. № 3. С. 28–41.
5. *Жилкин Б. А., Докторов А. А., Денисов-Никольский Ю. И.* Взаимосвязь пузырьков матрикса с пространственным распределением минерального компонента волокнистого и гиалинового хрящей // *Морфология*. 2004. Т. 126. № 5. с. 60–64.
6. *Anderson H., Sipe J., Hessle L., Dhamyramraju R., Atti E., Camacho N., Millan J.* Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice // *Am. J. of Pathol.* 2004. V. 164. № 3. P. 841–847.
7. *Andre-Frei V., Chevallay B., Orly I., Boudeulle M., Huc A., Herbage D.* Acellular mineral deposition in collagen-based biomaterials incubated in cell culture media // *Calcif. Tissue Int.* 2000. V. 66. № 3. P. 204–211.
8. *Balcerzak M., Hamade E., Zhang L., Pikula S., Azzar G., Radisson J., Bandorowicz-Pikula J., Buchet R.* The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process // *Acta Biochimica Polonica*. 2003. V. 50. № 4. P. 1019–1038.
9. *Bobryshev Y.* Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis*. 2005. V. 180. № 2. P. 293–303.
10. *Burke A., Taylor A., Farb A., Malcolm G., Virmani R.* Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims // *Z. Kardiol.* 2000, Bd. 89. № 14, S. 49–53.
11. *Christoffersen J., Landies W.* A contribution with review to the description of mineralisation of bone and other calcified tissue in vivo // *Anat. Rec.* 1991. V. 230. № 4. P. 435–450.
12. *Garimella R., Bi X., Camacho N., Sipe J., Anderson H.* Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization // *Bone*. 2004. V. 34. № 6. P. 961–970.
13. *Proudfoot D., Shanahan C.* Biology of calcification in vascular cells: intima versus media // *Herz*. 2001, Bd. 26. № 4, S. 245–251.
14. *Schmermund A., Erbel R.* Progression of coronary calcium for monitoring of treatment of hyperlipidemia // *Herz*. 2001, Bd. 26. № 8, S. 545–551.