

УДК 616.132-007.64

А.С. Сажин

Пермский государственный медицинский университет
им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

Н.А. Пахтусова

Клиника неврологии, Пермь, Россия

О.В. Колесова, В.З. Пойлов

Пермский национальный исследовательский политехнический
университет, Пермь, Россия

**СПОСОБЫ АНАЛИЗА СОСТАВА
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК**

В последнее время атеросклероз все чаще и чаще называют эпидемией XXI в. По статистике, 35 % смертей в мире и России происходят по причине холестериновых отложений в организме человека, вызывающих инсульт или инфаркт. Тесная взаимосвязь микроэлементов и обмена липидов предполагает вклад химических элементов в патогенез атеросклероза. Мишенью атеросклеротического процесса является сосудистая стенка, в которой под действием патологических факторов происходит нарушение метаболических процессов. Одной из причин формирования сосудистой патологии является возникновение дисбаланса химических элементов. Однако большинство исследований в этом направлении касается содержания кальция в стенке аорты. Немногочисленные работы по содержанию других химических элементов в тканях крайне противоречивы. Однако этот вопрос не должен оставаться без внимания, по причине того, что именно состав атеросклеротической бляшки, а не ее размер или объем в большей степени определяет, в какой момент времени произойдет ее разрыв. Кроме того, для разработки эффективного метода удаления отложений в сосудах человека как химическими, так и физическими методами, необходимо знать их состав. В связи с этим одной из задач исследования являлось изучение элементного состава атеросклеротической артериальной бляшки человека с целью определения концен-

траций и локализации различных химических элементов. Целью работы являлось проведение анализа литературных данных и выявление основных способов анализа состава атеросклеротических бляшек и изучение элементного состава атеросклеротических отложений стенки аорты методом сканирующей электронной микроскопии.

Ключевые слова: атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, кальцинаты, элементный состав, сканирующая электронная микроскопия.

A.S. Sazhin

Perm State Medical University name acad. E.A. Vagner,
Perm, Russian Federation

N.A. Pakhtusova

Clinic of Neurology, Perm, Russian Federation

O.V. Kolesova, V.Z. Pojlov

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

**METHODS OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES
COMPOSITION ANALYSIS**

The current epidemic of obesity with the associated increasing incidence of insulin resistance, diabetes mellitus and atherosclerosis affecting a large proportion of the population all over the world has generated a strong interest in the field atherosclerosis development of and its complications. Atherosclerosis and cardiovascular disease take a huge toll on our society. More than 50 per cent of deaths in Russia come form of cardiovascular disease, making it the leading cause of death in the country. According to the World Health Organization statistics circulatory diseases kill more than 16 million people each year all over the world. Despite the fact that cardiovascular disease is the single most deadly disease in Russia, most individuals, including most mainstream physicians, have a flawed fundamental understanding of the disease. The fact is, long before any symptoms are clinically evident, vascular disease begins as a malfunction of specialized cells that line our arteries. Chemical element composition of atherosclerotic plaque has a huge impact on the development of the disease. There are few amount of stud-

ies on this topic and they are very contradictory. Therefore the aim of the study was to analyze the literature and to identify the main methods for analyzing the composition of atherosclerotic plaques.

Keywords: *atherosclerosis, coronary heart disease, calcification, elemental composition, scanning electron microscopy.*

По данным ВОЗ сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Около 70 % инфарктов происходят из-за разрыва атеросклеротической бляшки [1]. К 2020 г. прогнозируется рост летальности населения от заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС), связанных с атеросклерозом, до 60 %.

Атеросклеротическая бляшка (АСБ) состоит из плотной фиброзной капсулы и ядра, с эфирами холестерина [2, 3]. Риск разрыва атеросклеротической бляшки в первую очередь связан с составом бляшек и ее стабильностью. Выделяют две формы АСБ – стабильные и нестабильные. Стабильность бляшки зависит частично от устойчивости фиброзной покрышки и экстрацеллюлярного матрикса. Разрыв наблюдается у бляшек с тонкой фибромускулярной покрышкой и большим липидным ядром. У нестабильных бляшек вблизи места разрыва наблюдается повышенное содержание макрофагов, Т-клеток, тучных клеток, которые секретируют цитокины и протеазы. Цитокины и протеазы подавляют пролиферацию гладкомышечных клеток, индуцируют их апоптоз, ингибируют синтез коллагена и разрушают коллагеновые волокна, что повышает уязвимость фибромускулярной капсулы АСБ. Нестабильные бляшки легко подвергаются эрозии, разрывам, приводят к острым тромбозам, окклюзиям и инфарктам еще до развития стенозов сосудов [3].

Известно, что нестабильность АСБ в большей степени определяется ее химическим и фазовым составами. Следует учитывать, что при одинаковом химическом составе фазовый состав соединений, входящих в АСБ, а следовательно и прочность, может существенно отличаться. Одной из причин формирования сосудистой патологии является возникновение дисбаланса химических элементов [3]. В настоящий момент существует несколько методов, направленных на исследование состава атеросклеротических бляшек: оптическая и электронная микроскопия с энергодисперсионным анализом, рентгенофазовый анализ, магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, хроматография и др.

Сканирующая электронная микроскопия

Ряд работ, направленных на изучение микро- и макроэлементного состава атеросклеротических бляшек при помощи сканирующей электронной микроскопии, выявил в ее составе присутствие таких элементов, как Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, K, Br и Pb [4–11].

Полученная в этих исследованиях информация подтверждает важную роль состава АСБ в ее стабильности. Кроме того, было показано, что содержание различных химических элементов варьируется в зависимости от локализации АСБ.

Содержание химических элементов в составе АСБ стенки аорты отличается от химического состава стенки внутренней грудной артерии и вен одних и тех же больных ишемической болезнью сердца [12]. Результаты исследований указывают на более высокое содержание Ca в АСБ стенке аорты по сравнению с периферическими сосудами.

С прогрессированием атеросклеротической бляшки в ней возрастает доля гидроксипатита кальция [13]. Бляшка, имеющая плотную кальцинированную покрывку, почти в 5 раз более устойчива, чем нормальная сосудистая стенка или «мягкая» бляшка, и гораздо более резистентна к разрывам. Однако это может привести к возрастанию давления в зоне соприкосновения кальцинированной покрывки и некальцинированной интимы. Именно в этой зоне чаще всего происходит разрыв АСБ [13, 14]. Следовательно, разница в жесткости между твердой зоной кальциноза и мягкой стенкой артерии может привести к точечной концентрации напряжений, увеличивая риск разрыва аневризмы. Отложение кальция на стенках аорты может затруднить известные методы лечения атеросклероза, препятствуя прикреплению трансплантатов или стентов к артериальной стенке или стать причиной дефекта катетера для баллонной дилатации [9].

Рамановская спектроскопия

Для оценки количественного и качественного состава атеросклеротической бляшки используется метод рамановской спектроскопии. В ряде работ [15–17] при помощи рамановской спектроскопии были выявлены спектры таких веществ, как эфиры холестерина, свободные холестеринны, триглицериды и фосфолипиды, бета-каротины и соли кальция. Рамановская спектроскопия была использована для расчета

относительных весов (в процентах) шести основных химических компонентов атеросклеротической бляшки.

Типичные рамановские спектры атероматозной бляшки и области кальценоза дают информацию о наличии нелипидных компонентов атеросклеротической бляшки, свободного холестерина, сложных эфиров холестерина, солей кальция, фосфолипидов и триглицеридов [7].

При помощи рамановской спектроскопии Дж. Ромер и соавторы показали, что в атероматозной бляшке содержится большое количество сложных эфиров холестерина, а также в этой области атеросклеротической бляшки содержатся липиды пенистых клеток и кристаллы свободного холестерина. В области кальциноза выявлено повышенное количество солей кальция.

Целью данной работы являлось изучение элементного состава АСБ стенки аорты методом сканирующей электронной микроскопии.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 5 полученных при аутопсиях образцов аорты, пораженной атеросклерозом. Средний возраст умерших составил 65 ± 5 лет. Анализ элементного состава был проведен при помощи сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения с рентгенофлуоресцентной приставкой S3400N Hitachi (Япония). Предварительная пробоподготовка включала в себя высушивание пробы при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 80 ч в лиофилизаторе VaCo 2-II (Zirbus technology GmbH, Германия). Контрольному гистологическому исследованию подвергались образцы биотканей из тех же участков, что и для анализа химических элементов по общепринятой методике с помощью программно-микроскопного комплекса, который включал в себя световой микроскоп AXIOSKOP 40 фирмы ZEISS, цифровую видеокамеру AxioCam MRc и компьютер Pentium 4. Полученные с каждого гистологического препарата изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения AxioVision 3.1 (Carl Zeiss). Препараты были окрашены гематоксилином и эозином, а также Суданом III.

Элементный состав холестериновой бляшки изучали на сканирующем электронном микроскопе высокого разрешения с рентгенофлуоресцентной приставкой S3400N Hitachi (Япония). Было показано, что элементный состав холестериновой бляшки, представленной на рисунке, неоднороден и концентрация различных элементов на поверхности и в ядре бляшки неодинакова.

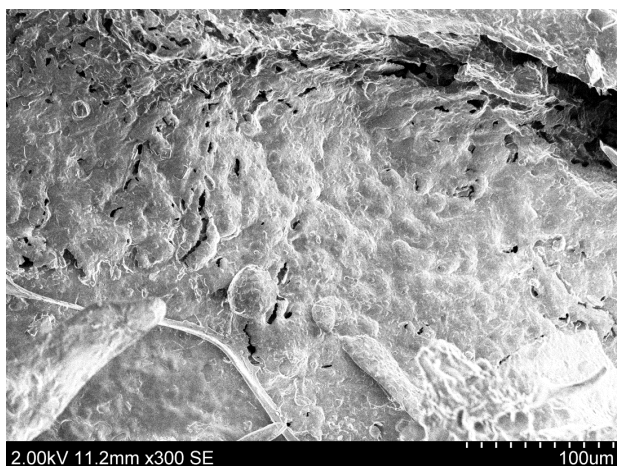


Рис. Поверхность атеросклеротической бляшки при увеличении $\times 300$

Примерный состав ядра и поверхности атеросклеротической бляшки представлен в таблице.

Химический состав атеросклеротической бляшки, %

Элемент	Поверхность бляшки	Липидное ядро
Na	1,1–1,2	0,9–1,01
Si	0,15–0,50	0
Mg	0,3–0,50	0
Ca	1,1–2,03	0,29–0,63
K	0,85–1,13	0
S	0,35–0,44	35–0,57
P	0,3–0,7	0,31–0,62
Cl	0,9–1,12	0,91–1,36

Таким образом, содержание химических элементов, главным образом металлов, существенно отличается в разных областях атеросклеротической бляшки. Кроме того, зная количественный и качественный состав, можно подобрать необходимые параметры для различных методов разрушения отложений холестерина в организме человека.

Список литературы

1. Cormode D., Roessl E. Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles // Radiology. – 2010. – Vol. 256, № 3. – P. 774–782.

2. Masashi Shiomi, Takashi Ito. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol. 157, № 2. – P. 75–84.

3. Рентгенофлуоресцентный анализ состава элементов атеросклеротической бляшки / О.В. Колесова, В.З. Пойлов, С.Ю. Солодников, Д.Д. Аширов, Г.Г. Фрейнд // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология*. – 2014. – Vol. 1, № 2. – С. 7–17.

4. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy / B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang // *Science*. – 2008. – Vol. 319, № 2. – P. 810–813.

5. Griffiths G. Ultrastructure in cell biology: do we still need it? // *European Journal of Cell Biology*. – 2004. – Vol. 83, № 1. – P. 245–251.

6. Elemental composition of the human atherosclerotic artery wall / T. Cichocki, D. Heck [et al.] // *Histochemistry*. – 1985. – Vol. 83, № 1. – P. 87–92.

7. Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman Spectroscopy / J.R. Tjeerd, F.B. James [et al.] // *American Heart Association*. – 1998. – Vol. 97, № 10. – P. 878–885.

8. Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques / T. Congiu, L. Schembri [et al.] // *Micron*. – 2010. – Vol. 41, № 5. – P. 532–536.

9. Elemental analysis of soft plaque and calcified plaque deposits from human coronary arteries and aorta / J. Bacso, Y. Lusztig, A. Pal [et al.] // *Journal of Experimental Pathology*. – 1986. – Vol. 29, № 2. – P. 119–125.

10. Elemental Analysis of Soft Plaque and Calcified Plaque Deposits from Human Coronary Arteries and Aorta / J.I. Murungi, S. Thiam, R.E. Tracy [et al.] // *Environmental science health*. – 2004. – Vol. 39, № 6. – P. 1487–1496.

11. Экспериментальный атерогенез у крыс. Морфологическая реконструкция стенки магистральной артерии полисахаридными биополимерами / И.Н. Большаков, Л.А. Шестакова, А.Р. Котиков, Г.И. Каптюк // *Биологические науки*. – 2013. – Т. 3, № 10. – С. 557–563.

12. Распределение химических элементов в сосудистой системе больных ишемической болезнью сердца / Г.Н. Окунева, А.М. Карась-

ков, А.М. Чернявский, А.М. Волков, В.В. Зверева // Ишемическая болезнь сердца. – 2010. – Т. 1, № 5. – С. 22–25.

13. Гагарина Н.В., Сеницын В.Е., Терновой С.К. Кальциноз коронарных артерий: методы диагностики, клинические результаты, практическая значимость // Медицинская визуализация. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 26–35.

14. Structuredependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques / R.T. Lee, A.J. Grodzinsky, E.H. Frank [et al.] // *Circulation*. – 1991. – Vol. 83. – P. 1764–1770.

15. Tjeerd J.R. Histopathology of Human Coronary Atherosclerosis by Quantifying Its Chemical Composition With Raman Spectroscopy // *Atherosclerosis*. – 1998. – Vol. 141, № 1. – P. 117–124.

16. Wang Y., Brennan J. Feld MS. Near-infrared Raman spectrometer systems for human tissue studies // *Applied Spec.* – 1997. – Vol. 51, № 1. – P. 201–208.

17. Congiu T., Schembri L. Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques // *Micron*. – 2010. – Vol. 41, № 1. – P. 532–536.

References

1. Cormode D., Roessl E. Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles. *Radiology*, 2010, vol. 256, no. 3, pp. 774–782.

2. Masashi Shiomi, Takashi Ito. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. *Atherosclerosis*, 2001, vol. 157, no. 2, pp. 75–84.

3. Kolesova O.V., Pojlov V.Z., Solodnikov S.Yu., Ashirov D.D., Frejnd G.G. Rentgeno-fluorescentnyj analiz sostava elementov ateroskleroticheskoy blyashki [X-ray fluorescence elemental analysis of atherosclerotic plaque composition]. *Vestnik Permskogo natsionalnogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Himicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya*, 2014, vol. 1, no. 2, pp. 7–17.

4. Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, vol. 319, no. 2, pp. 810–813.

5. Griffiths G. Ultrastructure in cell biology: do we still need it? *European Journal of Cell Biology*, 2004, vol. 83, no. 1, pp. 245–251.

6. Cichocki T., Heck D. [et al.] Elemental composition of the human atherosclerotic artery wall. *Histochemistry*, 1985, vol. 83, no. 1, pp. 87–92.

7. Tjeerd J.R., James F.B. [et al.] Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman Spectroscopy. *American Heart Association*, 1998, pp. 878–885.

8. Congiu T., Schembri L. [et al.] Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques. *Micron*, 2010, vol. 41, no. 5, pp. 532–536.

9. Bacso J., Lusztig Y., Pal A. [et al.] Elemental analysis of soft plaque and calcified plaque deposits from human coronary arteries and aorta. *Journal of Experimental Pathology*, 1986, vol. 29, no. 2, pp. 119–125.

10. Murungi J.I., Thiam S., Tracy R.E. [et al.] Elemental Analysis of Soft Plaque and Calcified Plaque Deposits from Human Coronary Arteries and Aorta. *Environmental science health*, 2004, vol. 39, no. 6, pp. 1487–1496.

11. Bolshakov I.N., Shestakov L.A., Kotikov A.R., Kaptyuk G.I. Eksperimentalnyy aterogenez u krys. Morfologicheskaya rekonstrukciya stenki magistralnoy arterii polisakharidnymi biopolimerami [Experimental rats atherogenesis. Morphological reconstruction of the main artery wall polysaccharide biopolymers]. *Biologicheskie nauki*, 2013, vol. 3, no. 10, pp. 557–563.

12. Okuneva G.N., Karaskov A.M., Chernyavskij A.M., Volkov A.M. Raspredelenie khimicheskikh elementov v sosudistoj sisteme bolnykh ishemicheskoy boleznju serdtsa [Chemical elements distribution in vascular system of patients with ischemic heart disease]. *Ishemicheskie bolezni serdtsa*, 2010, vol. 1, no. 5, pp. 22–25.

13. Gagarina N.V., Sinitsyn V.E., Ternovoj S.K. Kaltsinoz koronarnykh arterij: metody diagnostiki, klinicheskie rezultaty, prakticheskaya znachimost [The calcification of the coronary arteries: methods of diagnosis, clinical outcomes, practical significance]. *Meditinskaya vizualizatsiya*, 2010, vol. 3, no. 4, pp. 26–35.

14. Lee R.T., Grodzinsky A.J., Frank E.H. [et al.] Structuredependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 1991, vol. 83, pp. 1764–1770.

15. Tjeerd J.R. Histopathology of Human Coronary Atherosclerosis by Quantifying Its Chemical Composition With Raman Spectroscopy. *Atherosclerosis*, 1998, vol. 141, no. 1, pp. 117–124.

16. Wang Y., Brennan J. Feld MS. Near-infrared Raman spectrometer systems for human tissue studies. *Applied Spec.*, 1997, vol. 51, no. 1, pp. 201–208.

17. Congiu T., Schembri L. Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques. *Micron*, 2010, vol. 41, no. 1, pp. 532–536.

Получено 21.09.2015

Об авторах

Сажин Алексей Сергеевич (Пермь, Россия) – студент лечебного факультета Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: vip.sazhin@bk.ru).

Пахтусова Наталья Александровна (Пермь, Россия) – кандидат медицинских наук, невролог в Клинике неврологии (614990, г. Пермь, ул. Советская, 3; e-mail: nevrolog.perm@gmail.com).

Колесова Ольга Владиславовна (Пермь, Россия) – аспирант кафедры химических технологий Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: goldasox@mail.ru).

Пойлов Владимир Зотович (Пермь, Россия) – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой химических технологий Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: Vladimirpoilov@mail.ru).

About the authors

Aleksej S. Sazhin (Perm, Russian Federation) – Student, Perm State Medical University name acad. E.A. Vagner (26, Petropavlovskaya str., Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: vip.sazhin@bk.ru).

Nataliya A. Pakhtusova (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Medical Sciences, neurologist in the Clinic of Neurology (3, Sovetskaya str., Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: nevrolog.perm@gmail.com).

Olga V. Kolesova (Perm, Russian Federation) – Postgraduate Student, Department of Chemical technology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: goldacox@mail.ru).

Vladimir Z. Pojlov (Perm, Russian Federation) – Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of Department of chemical technology, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: Vladimirpoilov@mail.ru).