

## ТКАНЕВАЯ КАЛЬЦИФИКАЦИЯ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ

С помощью поляризационной микроскопии, рентгеноструктурного и микрозондового методов были изучены более чем 500 кальцинированных тканей сердечно-сосудистой системы (ССС). Впервые определена последовательность кристаллизации патогенного биоапатита в СССР. Эктопическая минерализация в тканях инициируется матричными везикулами (МВ). Процесс кристаллизации в МВ проходит в три стадии. На первой стадии матричные везикулы изотропны в скрещенных николях, т.к. линейные размеры зарождающихся кристаллов слишком малы для оптической микроскопии. Вторая стадия характеризуется уплощением овально-продолговатых МВ, приобретающих неоднородное двупреломление во внешней прозрачной части везикулы. При этом в центре МВ появляется и концентрируется мутное вещество. На третьей стадии происходит прорывание растущими кристаллами апатита мембраны МВ и слияние эллипсоидальных везикул в параллельные слои. Мутные ядра при этом превращаются в прерывистые линейные включения в эктопическом апатите, которые абсолютно непрозрачны и имеют четкие границы. В физиогенном биоапатите не отмечается аналогичных включений. На основании рентгеноструктурного, поляризационно-микроскопического и микрозондового анализа был сделан вывод, что эктопический апатит характеризуется закономерной изменчивостью линейных, кристаллографических, оптических, микро- и макрохимических свойств.

**Ключевые слова:** матричные везикулы; сердечно-сосудистая система; биоминерализация; внеклеточная минерализация; гидроксилapatит; тканевая кальцификация; поляризационная микроскопия; иммерсионный метод.

Выявление процессов и закономерностей минерализации в организме человека является непосредственной задачей биоминералогии, а конкретно – медицинской минералогии. Современной медициной досконально изучен вопрос костеобразования у человека. Практически во всем мире признано, что патогенная минерализация тканей сердечно-сосудистой системы развивается по схеме естественной оссификации, хотя минерализация в кровеносной системе медиками изучалась только на начальной стадии, когда массивные апатитовые агрегаты еще не являются помехой для изготовления гистологических и морфологических препаратов [1].

Главной неорганической фазой патогенной кальцификации коллагеновых и мышечных тканей, так же как в костной и зубной тканях, является фосфат кальция, который с определенной степенью приближения и идеализации относят к карбонатсодержащему гидроксилapatиту, как правило, слабо окристаллизованному и нестехиометрическому из-за присутствия значительных количеств посторонних ионов. Некоторые из этих ионов входят в кристаллическую решетку апатита, другие же только адсорбируются на поверхности апатита. Этот апатит является типичным биогенным минералом, тесно связанным пространственно, генетически структурно и морфологически с протеинами, липидами и полисахаридами тканей организма.

Патогенный апатит не имеет такой тесной связи с обменными процессами в организме, как физиогенный. Степень дефектности его всегда высока и зависит в большей степени от локальных процессов, чем от состояния организма в целом. Соотношение Са/Р в кальцинатах, по многочисленным литературным данным, варьирует в значительных пределах. В матричных везикулах это соотношение может быть около 0,66, а в зрелом апатите доходит до 2. Размер кристаллов в процессе созревания биоапатита увеличивается от наноразмерных до 100 и даже более микрон.

В России первые работы по минералогии кальцифицированных тканей сердечно-сосудистой системы появились в Новосибирске. В ИГГМ в этом направлении работали две независимые группы: группа А.Т. Титова [2] и группа Л.И. Гилинской [3–6]. При несомненной научной ценности данных исследований в их методиках имеется одна характерная тактическая ошибка. Биоапатит рассматривается как обычный апа-

тит из геологических объектов: однородный и неизменный в пространстве и времени, вследствие чего исключительно важная в биоминералогии область взаимодействия минерал – ткань исключается из сферы исследования. Группа А.Т. Титова полностью освобождается от органики, прокаливая образцы при 600°C, при этом исчезают не только минералообразующие структуры «матричные везикулы», но и сам апатит теряет кристаллизационную воду. За счет местного повышения температуры озоления (от сгорания липидов) из структуры минерала может выделиться CO<sub>2</sub>, а значит, изменяются и параметры элементарной ячейки.

Группа Л.Г. Гилинской использует более щадящую методику: кальцинат не прокалывают, но после высушивания на воздухе полностью отделяют от тканевого материала. При этом нарушается и полностью уничтожается самая важная для патогенного минералообразования зона контакта: органоминеральный агрегат-ткань. Именно в этой области находятся патогенные минералообразующие матричные везикулы, имеющие мицеллярную и коацерватную природу.

К сожалению, обе группы из Новосибирска не использовали информативный в данном случае иммерсионный метод исследования минерального вещества. Впрочем, игнорирование собственно минералогических методов при исследовании тканей организма характерно для отечественной и зарубежной науки в целом. Даже общепризнанный авторитет А.Л. Боски в своем обзоре применимых в рекогносцировке процессов биоминерализации методик не упоминает ни одного минералогического метода.

Автором исследована коллекция более чем из 500 кальцинатов, содержащихся в стенках сосудов, в сердечных клапанах, склеротических бляшках, миокарде и перикарде кардиобольных, любезно предоставленная НИИ кардиологии РАМН г. Томска. Извлеченные из формалина кальцинированные ткани предварительно изучались под бинокулярном, отбирались образцы отдельных кристаллов на микрозонд, после чего ткани с кальцинатами высушивались на воздухе в течение одних суток. Затем образцы разрезались с помощью тонкого алмазного диска. Поверхность среза изучалась под бинокулярном. При этом выявлялись структура и текстура кальцинатов, взаимоотношения минерального вещества и структурных элементов биологической ткани. Далее

отбирались образцы на спектральный, рентгеновский и, при необходимости, на микронзондовый анализ.

По мере необходимости производилась фотосъемка структур кальцинов под бинокляром, реже под микроскопом в шлифах. Отдельные зерна изучались под микроскопом в иммерсионном препарате. Иммерсионный метод оказался очень информативным для изучения процессов патогенной минерализации кардиоваскулярных тканей. В процессе изучения кальцинов выявлены общие закономерности патологического отложения минерального вещества в кровеносной системе человека. Патогенные агрегаты апатита в кардиоваскулярных тканях человека формируют слоистые отложения в стенках сосудов, глобулярные скопления в сердечных клапанах и отложения смешанного типа в атеросклеротических бляшках. Несмотря на некоторые отличия в структурах отложения минерального вещества, абсолютно все так называемые «кальциваты» кровеносной системы характеризуются сходным минеральным составом (до 90% апатита) и рядом общих, сопутствующих и способствующих минерализации условий.

1. Отложению минерального вещества предшествуют отложение внеклеточных капель жира и деструкция волокон коллагена, эластина и клеток гладкой мускулатуры сосудистых стенок.

2. Начальным этапом естественного (физиогенного) и патогенного минералообразования является образование так называемых матричных везикул «matrix vesicles» [8]. В случае патогенного минералообразования внутри везикул находятся «обломки» разрушенных клеток. Группа ученых из Австралии под руководством Юрия Боброчева на основании своих гистохимических данных считает образование патогенных матричных везикул физико-химическим процессом, независимым от клеточной регуляции, довольно удачно назвав содержимое внеклеточных матричных везикул коктейлем из протеинов, кальцийсвязывающих кислых липидов, металлопротеиназ, щелочной фосфатазы, ионов металлов и т.д. [9].

Размер матричных везикул в кости 100 нм [8]. В патогенных кальцинатах, по собственным наблюдениям автора, это более крупные коллоидные, мицеллярные и/или коацерватные структуры различного размера от 30 до 300 мкм (рис. 1, а). Причем встречаются как одиночные везикулы, так и группы везикул, сгруппированные в одну более крупную фрамбонидовидную везикулу. Зона матричных везикул находится на границе минерал – ткань (рис. 1, б). В везикулах протекают сложные процессы концентрации одних веществ и распада других, в частности происходят омыление жиров, распад ферментов и т.д. В поляризационном микроскопе матричные везикулы выглядят сначала как полупрозрачные капсулы шаровидной формы, затем в центре капсул появляется мутное пятно. На этом этапе в скрещенных николях двупреломление полностью отсутствует.

Кристаллизация апатита становится заметной на следующем этапе, когда шарообразные капсулы начинают принимать эллипсоидную форму, ядро становится более вытянутым, более плотным и менее прозрачным, а внешняя прозрачная оболочка начинает неоднородно двупреломлять в поляризованном свете. На за-

вершающем кристаллизацию апатита этапе оболочка везикул разрушается растущими кристаллами удлиненно-призматического апатита. Эллипсоиды сливаются в пластинчатые или концентрические апатитовые слои, а мутные ядра преобразуются в параллельные вереницы удлиненных совершенно не прозрачных в проходящем свете четко ограниченных частиц невыясненной природы (рис. 1, в). Наличием именно этих частиц патогенный апатит отличается от физиогенного апатита костей. Так завершается кристаллизация патогенного апатита. Так называемый «зрелый апатит» имеет полупрозрачный, слегка опалесцирующий вид с заметными даже под бинокляром непрозрачными белыми параллельно-волокнистыми включениями, пронизывающими все зерно.

С помощью иммерсионного метода выявлена неоднородность состава биоапатита в пространстве. Эта неоднородность прекрасно визуализируется на электронно-микроскопических снимках (рис. 1, г), поскольку наиболее зрелый апатит характеризуется максимально светлым тоном. На примере биоапатита из костей известно, что он непрерывно изменяется и во времени. В процессе старения организма возрастает степень дефектности кристаллической структуры. Изменения физиогенного апатита не прекращаются и *post mortem* и приводят к уменьшению параметра *a*, по сравнению с исходным биоапатитом [10], что связывается авторами с замещением ОН-иона фтор-ионом, а ортофосфат-иона – карбонат-ионом.

Таким образом, использование поляризационно-оптических методов позволило выявить ряд отличий патогенного минералообразования от физиогенного и установить последовательность кристаллизации патогенного апатита в тканях ССС человека.

Изучались и кристаллографические параметры карбонатсодержащего гидроксилapatита из кальцинированных тканей ССС. Исследования проводились на аппарате ДРОН-3 с  $Cu_K$  ( $V = 20$  кВ,  $J = 15$  мА, скорость съемки  $1^\circ/\text{мин}$ ). Рассчитаны параметры 50 образцов биоапатита из тканей ССС. Кристаллография природного неорганического апатита невероятно сложна, а структура биоапатита имеет ряд дополнительных особенностей. Рентгеновская дифракция показывает дифракционные пики в тех же позициях, что и в природном гидроксилapatите, но менее острые и более широкие. Их ширина связывается с маленьким размером кристаллов биоапатита, с наличием вакансий и примесей ионов ( $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$  и т.д.) в кристаллической решетке гидроксилapatита.

Расчет параметров кристаллической решетки биоапатита из ССС показал, что параметр *a* не является постоянным и в процессе созревания апатита уменьшается от  $9,45 \pm 0,02$  Å в незрелом апатите до  $9,39 \pm 0,02$  Å в зрелом.

Параметр *c* в процессе созревания биоапатита изменяется в значительно меньшей степени – от  $6,89 \pm 0,02$  Å до  $6,97 \pm 0,02$  Å. Соответственно уменьшению этих параметров уменьшается и объем кристаллической решетки – от 533,28 до 524,30. Возможно, такое изменение параметров обусловлено замещением иона  $PO_4^{3-}$  ионами  $CO_3^{2-}$  и F.

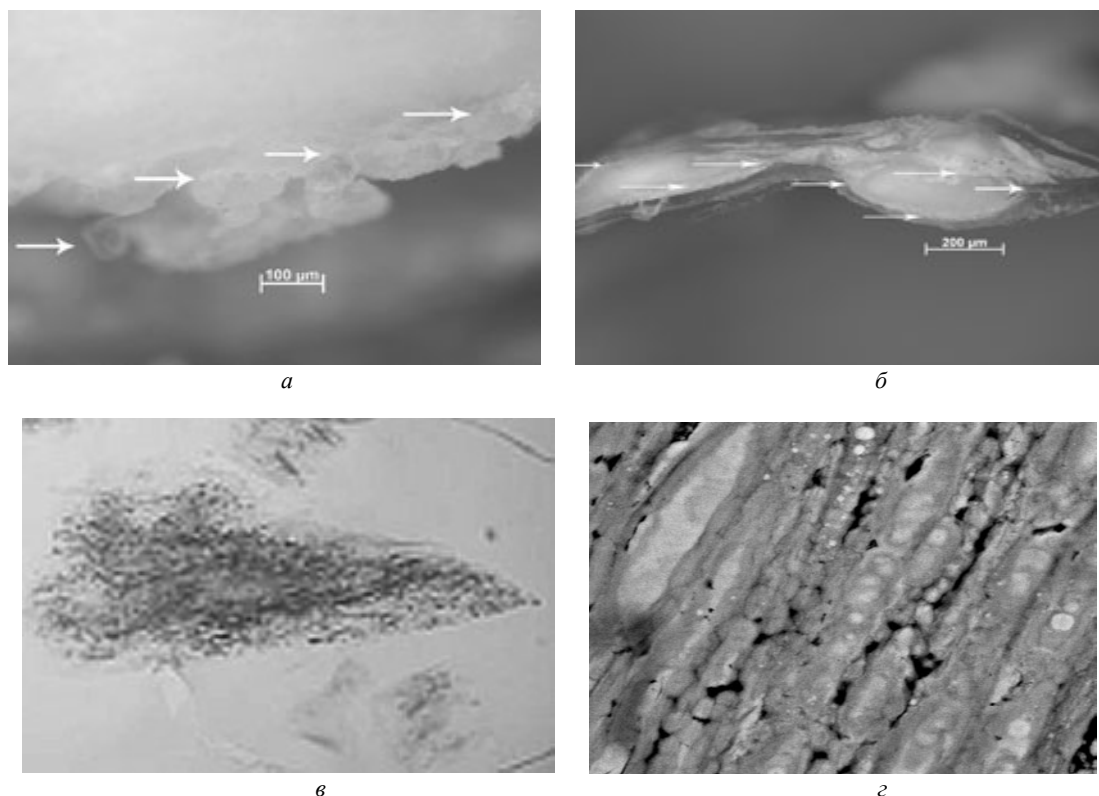


Рис. 1. *a* – стрелки указывают на матричные везикулы из ССС на границе кальцинат – ткань. Размер везикул 40–120 мкм; *б* – стрелками отмечен слой матричных везикул, со всех сторон окружающий кальцинат (белое), в ткани восходящей аорты; *в* – обломок зрелого апатита из ССС в иммерсии. Видны непрозрачные включения (черное) характерного для эктопического биоapatита вещества неясного состава. Увел.  $\times 100$ ; *г* – электронномикроскопический снимок биоapatита из ССС. Белый цвет на снимке соответствует наиболее зрелому биоapatиту. Горизонтальный размер изображения соответствует 100 мкм

Увеличение параметра  $a$  кристаллической решетки гидроксилapatита может быть вызвано с происходящим в решетке минерала замещением группы OH на ион Cl или вхождением в кристаллическую решетку изоморфных примесей более крупных катионов (а именно Sr, Ba, Pb, K и др.), замещающих катионы кальция [11].

Уменьшение объема элементарной ячейки с увеличением содержания фтора объясняют удалением из решетки скелетного апатита OH-иона и занятием его позиции фтор-ионом, т.е. переходом от гидроксил-фторapatита к франколитоподобному карбонат-фторapatиту.

Содержание фтора в решетке биоapatита коррелирует со степенью диабетических изменений в организме [11].

Известны работы по парным замещениям ионов фтора и карбоната  $\text{CO}_3^{2-}$ , которые замещают ионы  $\text{PO}_4^{3-}$  с четырехвалентным углеродным замещением пентавалентного фосфора, в то время как галоген в избытке замещает  $\text{O}^{2-}$ . При этом парные субстанции не только удерживают электронейтральность структуры, но также поддерживают тетраэдрическую координацию для вовлеченных катионов. Частичное замещение  $\text{P}^{5+}$  (ионный радиус 0,35 Å) меньшим ионом  $\text{C}^{4+}$  (ионный радиус 0,16 Å) уменьшает боковую дистанцию между столбиками Ca–O тригональных призм, поэтому укорачивается длина  $a$  кристаллической ячейки. Замещение фосфора на углерод не имеет явного эффекта на величину ячейки  $c$ , которая главным образом определяется расстоянием между кальциевыми и кислород-

ными треугольниками и не зависит напрямую от второстепенных замещений углерода и фосфора. Увеличение содержания ионов хлора в апатите приводит к увеличению параметра  $a$  кристаллической решетки апатита, а увеличение суммарного содержания ионов F, Cl, OH понижает параметр  $a$  [12].

Д. Мак-Коннел считает, что с внедрением  $\text{CO}_3$ -групп, замещающих  $\text{PO}_4$ -группы (фактически  $3\text{PO}_4 \rightarrow 4\text{CO}_3$ ), симметрия понижается, становясь триклинной [13]. Вероятно, в процессе созревания биогенного гидроксилapatита увеличивается триклиннизация. На изученных рентгенограммах на это указывает расщепление пиков (222), (213), (004), хорошо выраженное в наиболее зрелом биоapatите.

Неоднородным является и химический состав патогенного биоapatита. Выше упоминалась изменчивость отношения Ca/P в процессе созревания апатита. Соотношения Na/P изменялись от 0,0683 до 0,0286; Mg/P – от 0,0482 до 0,0121. По данным 20 микрозондовых анализов, выполненных на кафедре минералогии ТГУ, в пределах одного 2-миллиметрового зерна микропримеси изменялись в следующих пределах: Na 0,13–1,20; Mg 0,42–0,74; Si 0–0,25; S 0–0,70; Cl 0–0,14; K 0–0,12; Ti 0–0,12; Cr 0–0,14; Mn 0–0,24; Fe 0–0,13.

Резюмируя, необходимо подчеркнуть, что одним из важнейших свойств патогенного карбонатсодержащего гидроксилapatита является его длительная и непрерывная химическая и биологическая активность после начального зарождения кристаллических

индивидов. Данное обстоятельство проявляется значительной изменчивостью в пространстве линейных, кристаллографических, оптических, микро- и макрохимических свойств апатитовых агрегатов. Из этого следует, что исследование патогенного биоапатита должно вестись с учетом его изменчивости на мик-

ро- и наноуровнях. Изучение патогенного биоапатита и процессов, связанных с его возникновением и взаимодействием с окружающими тканями, невозможно без учета закономерных изменений его строения, состава, размеров и кристаллографических параметров [14].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вихерт А.М., Седов К.Р., Соколова Р.И. Кальциноз артерий. М.: Медицина, 1980. С. 152.
2. Титов А.Т., Ларионов П.М., Щукин В.С., Зайковский В.И. Механизм минерализации сердечных клапанов. Поверхность // Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2001. № 3. С. 74–79.
3. Гилинская Л.Г., Григорьева Т.Н., Окунева Н.Г., Власов Ю.А. Исследование минеральных патогенных образований на сердечных клапанах человека. I. Химический и фазовый состав // Журнал структурной химии. 2003. Т. 44, № 4. С. 678–689.
4. Гилинская Л.Г., Окунева Г.Н., Власов Ю.А. Исследование минеральных патогенных образований на сердечных клапанах человека. II. ЭПР спектроскопия // Журнал структурной химии. 2003. Т. 44, № 5. С. 882–889.
5. Гилинская Л.Г., Рудина Н.А., Окунева Г.Н., Власов Ю.А. Исследование минеральных патогенных образований на сердечных клапанах человека. III. Электронная микроскопия // Журнал структурной химии. 2003. Т. 44, № 6. С. 1122–1129.
6. Гилинская Л.Г., Занан Ю.Н., Рудина Н.А. Бактериальный генезис фосфатов в организме человека и в природе // Литология и полезные ископаемые. 2007. № 1. С. 63–75.
7. Boskey A.L. Mineral Analysis Provides Insights into the Mechanism of Biomineralization // Calcif Tissue Int. 2003. № 72. P. 533–536.
8. Anderson H.C. Matrix vesicles and calcification // Current rheumatology report. 2003. Vol 5, is. 3. P. 222–226.
9. Bobryshev Y.V., Killingsworth M.C., Huynh T.G. et al. Are calcifying matrix vesicles in atherosclerotic lesions of cellular origin? // Basic Res Cardiol. 2007. № 102. P. 133–143.
10. Немлихер Ю.Г., Батурич Г.Н., Калласте Т.Э., Мурдмаа И.О. Преобразование гидроксилapatита костного фосфата со дна океана в ходе фоссилизации // Литология и полезные ископаемые. 2004. № 5. С. 539–551.
11. LeGeros R.Z., Bonel G., Legros R. Types of «H<sub>2</sub>O» in Human Enamel and in Precipitated Apatites // Calcif. Tiss. Res. 1978. № 26. P. 111–118.
12. Binger G., Troll G. Coupled anion substitution in natural carbon-bearing apatite // Contrib. Mineral. Petrol 1989. № 101. P. 393–401.
13. Минералогическая энциклопедия / Под ред. К. Фрея; Пер. с англ. Л.: Недра, 1985. 512 с.
14. Ламанова Л.М. Кристаллические отложения в атеросклеротических бляшках как полиминеральные объекты // IV Международный семинар «Минералогия и жизнь: происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия». Сыктывкар (в печати).

Статья представлена научной редакцией «Науки о Земле» 26 декабря 2009 г.