

Стационарный и импульсный высокочастотный ЭПР кальцифицированной атеросклеротической бляшки

В. А. Абдульянов⁺, Л. Ф. Галиуллина*, А. С. Галявич⁺, В. Г. Изотов*, Г. В. Мамин*, С. Б. Орлинский*,
А. А. Родионов*, М. Х. Салахов*¹⁾, Н. И. Силкин*¹⁾, Л. М. Ситдикова*, Р. Н. Хайруллин⁺, Ю. А. Челышев*[∇]

* Казанский государственный университет, Федеральный центр коллективного пользования физико-химических измерений
420008 Казань, Россия

⁺ Межрегиональный клинико-диагностический центр Республика Татарстан, 420101 Казань, Россия

[∇] Казанский государственный медицинский университет, 420012 Казань, Россия

Поступила в редакцию 29 мая 2008 г.

Показаны новые возможности применения высокочастотного ЭПР в медицине на примере исследования кальцифицированной атеросклеротической бляшки. После облучения атеросклеротической бляшки рентгеновскими лучами обнаружен новый тип парамагнитных центров – органоминеральные радикалы. Спектральные и релаксационные характеристики таких радикалов зависят от степени кальцификации атеросклеротической бляшки и могут быть использованы для диагностических целей.

PACS: 83.80.Lz, 87.64.–t

Введение. Внедрение в экспериментальную практику высокочастотных ЭПР спектрометров ($\nu > 90$ ГГц) открыло новые возможности метода ЭПР. Высокочастотный ЭПР плодотворно используется в молекулярной биологии для изучения сложной динамики и межмолекулярных взаимодействий [1], расшифровки сложных спектров свободных радикалов, металлопротеинов, биологических мембран [2], наноструктурированных систем [3].

Природа кальцификации стенки сосудов является одной из наиболее актуальных проблем сердечно-сосудистой патологии. Кальцификация сопутствует образованию атеросклеротических бляшек, осложняет течение атеросклеротического процесса и приводит к инфаркту миокарда, инсульту и острой ишемии ткани. Кальцификация является индикатором нестабильности атеросклеротической бляшки. Так, в [4] выдвинута гипотеза о том, что именно нанокристаллы фосфата кальция вызывают локальное напряжение, которое ведет к межфазному разрыхлению и разрыву атеросклеротической бляшки.

По данным рентгеноструктурного анализа, неорганической составляющей биоминерального матрикса атеросклеротической бляшки являются различные фосфаты кальция (отношения количества атомов кальция к фосфору $Ca/P = 1.33–2.0$), в основном карбонатизированный гидроксипатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, ($Ca/P = 1.67$) [5, 6].

Отметим, что разнообразие кристаллической структуры и физико-химических свойств апатитов [7] делает их, с одной стороны, перспективными материалами для биомедицины, физики и химии, а с другой стороны, создает много проблем при их изучении. Дискуссионными являются вопросы о стехиометрии состава, точной локализации карбонат-иона CO_3^{2-} , степени присутствия в решетке гидроксил иона OH^- [8], механизмах ассоциации органической и неорганической компонент [9], биологической роли нанокристалличности [8]. В данной работе рассматривается применение высокочастотного ЭПР для изучения кальцифицированного тканевого матрикса в атеросклеротической бляшке.

Материалы и методы исследования. Изучено 15 образцов из стенки аорты больных атеросклерозом мужчин в возрасте 40–60 лет. Материал получен в ходе патологоанатомических исследований, проведенных в соответствии с требованиями комитета по этике Межрегионального клинико-диагностического центра (г. Казань). Часть материала изучена при помощи стандартных гистологических методов. Полученные образцы ткани промывались физиологическим раствором и подвергались лиофильной сушке ($P = 5 \cdot 10^{-5}$ мбар, $T = -50^\circ C$). Исследования на реальных патологических объектах, ввиду сложности их строения, требуют привлечения различных физико-химических методов. Лиофилизированные образцы фрагментов стенки сосудов, пораженных атеросклерозом, исследовались методами электронной сканирующей микроскопии (Philips XL30ESEM),

¹⁾ e-mail: myakzyum.salakhov@ksu.ru; nikolai.silkin@ksu.ru

рентгеноспектрального электронно-зондового (микронного) (приставка EDAX) и рентгеноструктурного анализов.

Для исследования спектров ЭПР использовался спектрометр W -диапазона (93.5 ГГц) Elexsys 680 фирмы Брукер, с применением стационарного и импульсного режимов. Размеры образцов для исследований в W -диапазоне – $0.3 \times 0.3 \times 2$ мм. Использовались стандартные двух- и трехимпульсные последовательности для измерения времен релаксации и спектров ЭПР по амплитуде первичного электронного спинового эха. Исследования проводились при температурах 50 и 300 К.

Для создания парамагнитных комплексов исследуемые образцы облучались рентгеновскими лучами при комнатной температуре на установке УРС-55 ($U = 55$ кВ, $I = 16$ мА, W -антикатод), доза облучения для всех образцов составляла 10 Мрад. Образцы изучались до и после рентгеновского облучения.

Результаты и обсуждение. Исследование образцов с максимальной степенью кальцификации. В спектре ЭПР необлученных образцов атеросклеротических бляшек наблюдалась одиночная линия слабой интенсивности с g -фактором 2.003. В некоторых образцах зарегистрированы сигналы от парамагнитных центров – комплексов переходных элементов, в частности, ионов Mn^{2+} . Природа и характеристики этих центров не обсуждаются в настоящем сообщении.

После облучения образцов максимально кальцифицированной атеросклеротической бляшки (гистологические данные) наблюдался спектр ЭПР, характерный для облученных биоминералов, содержащих гидроксиапатит [10]. Спектр ЭПР не изменялся в течение всего срока исследования. На рис.1а представлен спектр ЭПР атеросклеротической бляшки, полученный в стационарном режиме. Для сравнения приведены спектры ЭПР облученной зубной эмали и бивня мамонта (рис.1b, c) – физиогенные биоминералы, содержащие гидроксиапатит.

Спектры ЭПР также были детектированы по амплитуде сигнала первичного электронного спинового эха (рис.1d–f). Измерение кинетики релаксации при значении магнитного поля, соответствующему g -фактору 2.001, при комнатной температуре показали наличие в атеросклеротической бляшке двух парамагнитных центров с различными временами релаксации: центр I – $T_1 = 6.5 \pm 0.6$ мкс, $T_2 = 1.10 \pm 0.08$ мкс и центр II – $T_1 = 103 \pm 3$ мкс, $T_2 = 3.8 \pm 0.2$ мкс.

Центр I, быстро релаксирующий и интенсивный, по своим спектроскопическим (g -фактора: 2.001, 2.000, 1.996) и релаксационным характеристикам интерпретирован нами как неорганический радикал

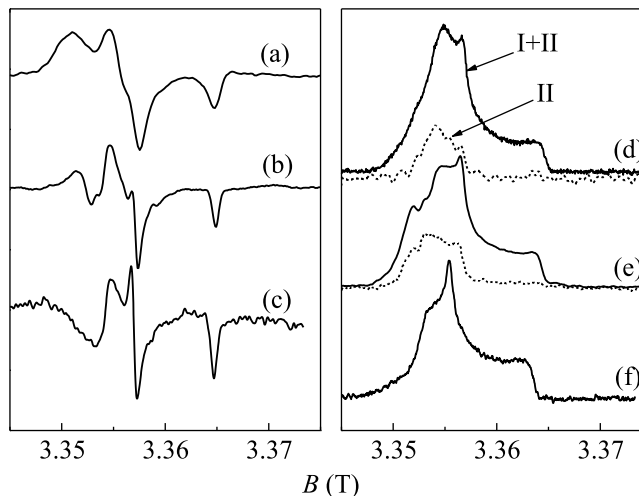


Рис.1. Стационарные спектры ЭПР (a)–(c) и спектры, полученные с использованием методики детектирования спинового эха (d)–(f), в W -диапазоне в различных группах образцов: (a), (d) – атеросклеротическая бляшка с максимальной степенью кальцификации, (b), (e) – зубная эмаль, (c), (f) – бивень мамонта. Штриховой линией показана компонента спектра ЭПР центра II

CO_2^- в гидроксиапатите. Исследованию CO_2^- радикала в биоминералах, природных и синтетических гидроксиапатитах посвящено значительное число работ, выполненных методом ЭПР и ДЭЯР, см. например, [10–12]. В работе [13] приводятся данные по релаксационным характеристикам CO_2^- в зубной эмали и синтетическом гидроксиапатите.

Радикал CO_2^- в гидроксиапатите может быть локализован в позиции OH^- -группы (A -позиция), PO_4^- группы (B -позиция) и на поверхности. Для синтезированного гидроксиапатита [13] было показано, что времена релаксации для центров CO_2^- в различных позициях будут существенно отличаться. В нашем случае распад поперечной (T_2) и восстановление продольной (T_1) намагниченностей на компоненте спектра с $g_z = 1.996$ был одноэкспоненциальным, то есть в исследуемых образцах атеросклеротической бляшки детектировался только один тип CO_2^- -центра (центр I). Такую ситуацию можно объяснить либо преимущественным типом замещения, как в случае зубной эмали (B -позиция), либо близостью спектроскопических параметров CO_2^- -радикалов в различных позициях [14] и неоднородным уширением линий ЭПР. Для определения его точной локализации планируется проведение экспериментов методом ДЭЯР.

Центр II, медленно релаксирующий, был идентифицирован с использованием методики электронного спинового эха (штриховая линия на рис.1d), благода-

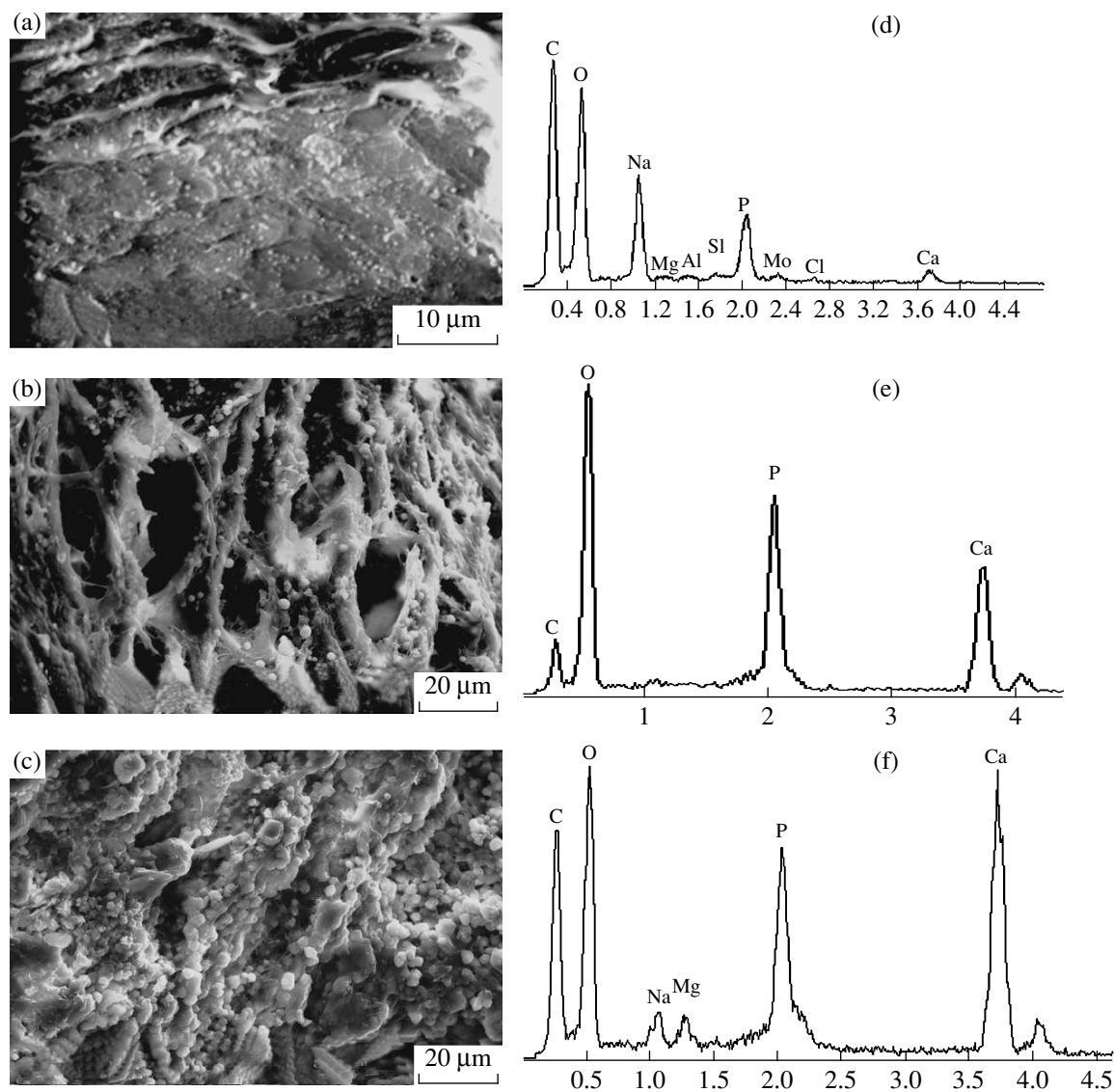


Рис.2. Рельеф (a)–(c) поверхности разреза внутренней оболочки аорты больных атеросклерозом при различных степенях кальцификации: (a), (d) – “слабая” степень $\text{Ca/P} = 0.18$, (b), (e) – “средняя” степень $\text{Ca/P} = 0.64$, (c), (f) – “сильная” степень $\text{Ca/P} = 1.66$. Рентгеновские спектры (d)–(f) – глобулярных фрагментов поверхности разреза, полученные методом микрозондового анализа

ря существенному различию во временах релаксации по сравнению с центром I. Центр II, возможно, связан с радикалом CO_3^{3-} либо с радикалами, принадлежащими к органической компоненте атеросклеротической бляшки, аналогично ситуации в зубной эмали (рис.1e) [15]. Косвенным подтверждением органической природы центра II служит его отсутствие в матриксе бивня мамонта (рис.1f).

Исследование образцов с различной степенью кальцификации. Для определения степени кальцификации тканевого матрикса было определено атомное отношение Ca/P во всех образцах ме-

тодом микрозондового анализа (рис.2d–f). Это отношение характеризует степень кальцификации органоминеральных агрегатов [16].

Для определения корреляции спектроскопических и релаксационных характеристик парамагнитных центров в атеросклеротической бляшке со степенью ее кальцификации были выбраны образцы, отличающиеся по степени кальцификации – “сильная” $\text{Ca/P} = 1.66$, “средняя” $\text{Ca/P} = 0.64$ и “слабая” $\text{Ca/P} = 0.18$. Также на рис.2a–c приведена структура разреза стенки сосуда, полученная с помощью электронной сканирующей микроскопии, для этих образ-

цов. На рис.2а–с хорошо видны изменения в структуре ткани, связанные с увеличением доли минеральной компоненты в атеросклеротической бляшке в виде сферических глобул гидроксиапатита.

На рис.3а–i приведены спектры ЭПР, полученные методом детектирования электронного спинового эха

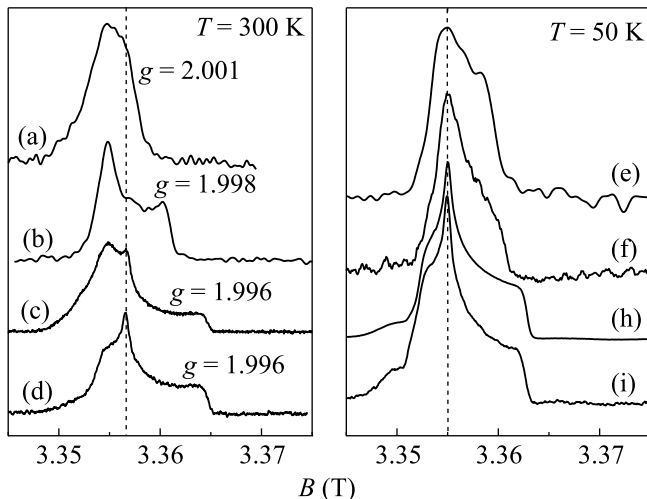


Рис.3. Спектры ЭПР образцов при различных степенях кальцификации: (а), (е) – “слабая” степень, (b), (f) – “средняя” степень, (с), (h) – “сильная” степень, (d), (i) – реперный образец (бивень мамонта), полученные с использованием методики детектирования спинового эха в W -диапазоне при $T = 300$ и 50 К

в W -диапазоне при температуре 300 и 50 К для образцов с различными степенями кальцификации и реперного образца (бивень мамонта). Представленные данные демонстрируют ярко выраженную зависимость формы линии ЭПР и спектроскопических характеристик (g_z) от степени кальцификации образца.

На рис.4 представлена зависимость скорости продольной релаксации от степени кальцификации образца. При температурах 300 и 50 К наблюдается линейная зависимость скорости релаксации центра I от соотношения количеств атомов Са и Р. Для центра II скорость релаксации не изменяется.

Обращает на себя внимание то, что спектр ЭПР и релаксационные характеристики, относящиеся к типу I парамагнитных центров, трансформируются по мере увеличения степени кальцификации к характеристикам CO_2^- радикала в гидроксиапатите. Это означает, что кристаллы гидроксиапатита не следует рассматривать как обособленные включения в тканевый матрикс атеросклеротической бляшки, образующиеся из перенасыщенного раствора. Формирование кальцифицированного матрикса самым тесным образом связано с органической компонентой, они образуют

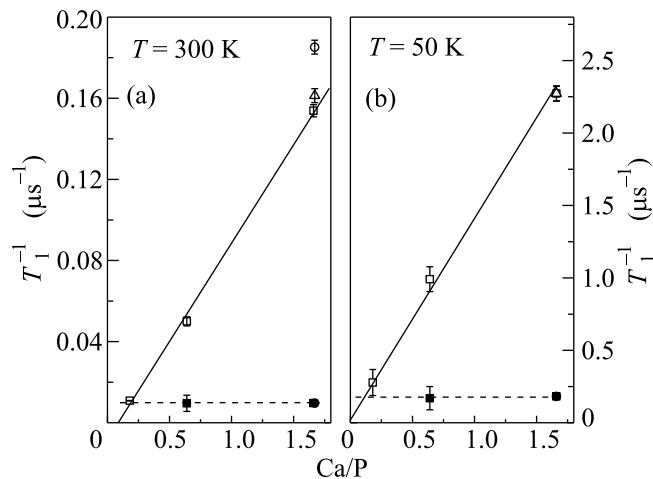


Рис.4. Времена электронной продольной релаксации в зависимости от степени кальцификации образцов (Ca/P) на частоте 93.5 ГГц при значении магнитного поля, соответствующего $g = 2.001$ и $T = 300$ и 50 К. Квадратами отображены времена релаксации парамагнитных центров в атеросклеротической бляшке, кружками – в зубной эмали, треугольниками – в бивне мамонта. Светлые точки – центр I, черные – центр II

единый органоминеральный агрегат атеросклеротической бляшки. Парамагнитные центры, образующиеся под действием ионизирующего излучения в таких системах, можно характеризовать как органоминеральные радикалы – радикалы, обладающие переменными спектроскопическими и релаксационными характеристиками, зависящими от соотношения органической и минеральной компонент.

Важную роль в исследовании таких органоминеральных радикалов играют измерения релаксационных характеристик, именно они в большинстве случаев дают однозначную информацию о наличии различных типов центров, их связи с ближайшим окружением.

Отметим, что в процессе патологической кальцификации сосудов, кроме множества факторов, в приведенных в [17], существенную роль могут играть бактериальные факторы. Эту гипотезу в нашем случае косвенно подтверждают данные электронной микроскопии (рис.2), выявляющие глобулярную структуру агрегатов гидроксиапатита в атеросклеротических бляшках, характерную для бактериального синтеза. Бактериальная природа кальцификации искусственных клапанов сердца показана в работе [18].

Заключение. Основные результаты проведенного исследования можно сформулировать следующим образом:

1. Кальцифицированная атеросклеротическая бляшка представляет собой органоминеральный агрегат, в образовании которого существенную роль играет гидроксипатит.

2. При исследовании атеросклеротической бляшки обнаружен новый тип парамагнитных центров – органоминеральные радикалы с переменными спектроскопическими и релаксационными характеристиками, зависящими от структуры и состава органоминерального агрегата. В атеросклеротической бляшке при высокой степени кальцификации конечной формой органоминеральных радикалов является CO_2^- радикал в гидроксипатите.

3. Спектральные и релаксационные характеристики органоминеральных радикалов коррелируют со степенью кальцификации атеросклеротической бляшки и могут служить для диагностических целей.

4. Высокая чувствительность при малых размерах образцов в спектроскопии ЭПР W -диапазона создает предпосылки к созданию новых, в том числе малоинвазивных, диагностических методов при атеросклерозе и других заболеваниях.

Авторы благодарны за обсуждение и ценные замечания А.Ю. Розанову, О.Н. Франк-Камеиной, Н.М. Низамутдинову и И.Н. Куркину.

Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки РФ # 1.2.08 (ДЗН-08-02).

1. M. Bennati and T. F. Prisner, Rep. Prog. Phys. **68**, 411 (2005).
2. С. Б. Орлинский, И. В. Боровых, В. Цильке, Х.-Ю. Штейнхоф, Письма в ЖЭТФ **86**, 158 (2007).

3. S. B. Orlinkii, J. Schmidt, P. G. Baranov et al., Phys. Rev. B **77**, 115334 (2008).
4. Y. Vengrenyuk, S. Carlier, S. Xanthos, et al., Proc. of the Natural Academy of Sciences **103**, 14678 (2006).
5. T. M. Doherty, K. Asotra, L. A. Fitzpatrick et al., Proc. of the Natural Academy of Sciences **100**, 11201 (2003).
6. B. C. Wopenka and J. D. Pasteris, Material Science and Engineering **25**, 131 (2005).
7. T. J. White, D. Zhili Acta Crystallographica B **59**, 1 (2003).
8. J. D. Pasteris, B. Wopenka, J. J. Freeman et al., Biomaterials **25**, 229 (2004).
9. D. F. Laird, M. R. Mucalo, and Y. Yokogawa, Journal of Colloid and Interface Science **295**, 348 (2006).
10. M. Ikeya ESR Dating, Dosimetry and Microscopy for Terrestrial and Planetary Materials, Osaka Univ. World Scientific, (1993).
11. S. Ishchenko, I. Vorona, and S. Okulov, Sem. Phys., Quantum Electr. & Optoelectr. **2**, 84 (1999).
12. D. U. Schramm, J. Terra, A. M. Rossi, and D. E. Ellis, Physical Review B **63** (2000).
13. H. Sato, B. A. Filas, S. S. Eaton et al., Radiation Measurements **42**, 997 (2007).
14. D. U. Schramm and A. M. Rossi, Applied Radiation and Isotopes **52**, 1085 (2000).
15. Л. Г. Гишинская, Г. Н. Окунева, Ю. А. Власов, Журнал структурной химии **44**, 882 (2003).
16. А. А. Кораго, Введение в биоминералогию, СПб.: Недра, 1992.
17. T. M. Doherty, K. Asotra, and L. A. Fitzpatrick, PNAS **100**, 11201 (2003).
18. Л. Г. Гишинская, Г. Н. Окунева, Ю. А. Власов, Журнал структурной химии **44**, 1122 (2003).