

АССОЦИИИ МИНЕРАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ БЛЯШКЕ
ПРИ КОРОНАРНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Э.Я. Журавская¹, Т.И. Савченко², О.В. Чанкина², Я.В. Полонская¹, Е.В. Садовский¹,
Е.М. Стахнёва¹, Ю.И. Рагино¹, А.М. Чернявский³

¹НИИ терапии и профилактической медицины —
филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

²ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр
имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Цель исследования — определить содержание комплекса минеральных элементов в гомогенатах атеросклеротических бляшек коронарных артерий человека. **Материал и методы.** Материал исследования — гомогенаты образцов атеросклеротических бляшек коронарных артерий, полученных во время операции коронарного шунтирования. Методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА СИ) определяли концентрацию химических элементов Ca, Pb, Fe, Cu, Zn, Br, Sr, Zr в гомогенатах атеросклеротических бляшек. **Результаты.** Во всех исследуемых образцах отмечено преобладающее присутствие Ca, в стабильных атеросклеротических бляшках — $1791,93 \pm 3042,25$ мкг/мл, в нестабильных — $2024,33 \pm 1267,13$ мкг/мл. Выявлена ассоциация между содержанием Ca и Fe ($r = 0,798$; $p < 0,01$), Ca и Zn ($r = 0,963$; $p < 0,01$) и Ca и Sr ($r = 0,981$; $p < 0,01$) в атеросклеротическом очаге. Не обнаружено достоверной разницы между концентрацией измеренных элементов в стабильных и нестабильных бляшках. **Заключение.** Методом РФА СИ выявлены особенности минерального состава атеросклеротической бляшки человека. Основная ее минеральная составляющая — кальций, с тенденцией к увеличению концентрации элемента в нестабильном очаге. Минорные составляющие — железо, цинк, стронций — ассоциированы с кальцием. При этом имеется тенденция к уменьшению содержания железа в нестабильном атеросклеротическом очаге, а концентрация стронция и цинка существенно не изменяется.

Ключевые слова: коронарный атеросклероз, атеросклеротическая бляшка, минеральные элементы, кальций, цинк.

Журавская Эмилия Яновна — д-р мед. наук, проф., г.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований, e-mail: emmajurav@yandex.ru

Савченко Татьяна Ивановна — канд. хим. наук, с.н.с. лаборатории дисперсных систем

Чанкина Ольга Васильевна — н.с. лаборатории дисперсных систем

Полонская Яна Владимировна — д-р биол. наук, с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований

Садовский Евгений Викторович — м.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований

Стахнёва Екатерина Михайловна — канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований

Рагино Юлия Игоревна — д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований, зам. руководителя по науке

Чернявский Александр Михайлович — д-р мед. наук, проф., зам. директора по науке

© Журавская Э.Я., Савченко Т.И., Чанкина О.В., Полонская Я.В., Садовский Е.В., Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И., Чернявский А.М., 2019

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) атеросклеротического генеза остаются ведущей причиной смертности во всем мире [1]. Многими исследованиями показано, что токсичное действие минеральных элементов через пищу, окружающую среду, курение ассоциировано с повышением риска развития ССЗ. Так как большинство химических элементов обладает политропным действием на организм человека, то пролонгированное воздействие некоторых элементов индуцирует окислительный стресс и воспаление, которые тесно связаны с развитием атеросклеротического процесса [1–3]. Предполагают, что высокие уровни переходных металлов (Mg, K, Ca, P, Fe, B, Zn, Al, As, Cr, Pt, Hg) инициируют атеросклеротическое поражение сосудов [3].

Целью нашей работы было определить содержание комплекса минеральных элементов в гомогенатах атеросклеротических бляшек коронарных артерий человека методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены пациенты мужского пола (возрастной интервал 40–70 лет), поступившие в клинику ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина на операцию коронарного шунтирования, которым в ходе операции по интраоперационным показаниям проведена эндартерэктомия коронарных артерий. Все участники подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Каждый образец ткани, полученный во время эндартерэктомии, содержал комплекс «интима – медиа» коронарных артерий. Все образцы были продольно и поперечно симметрично разделены на несколько фрагментов для проведения гистологических и биохимических исследований и по результатам гистологического анализа разделены на стабильные и нестабильные атеросклеротические бляшки по классификации R. Waksman, P.W. Seruys [4]. Гомогенизирование образцов проводили с помощью роторного диспергатора IKAT 18 BASIC (Германия) на скорости 7000 об./мин в изотоническом 0,9%-м растворе хлорида натрия, для анализа использовали 10%-й гомогенат. Образцы для анализа получали нанесением 25 мкл гомогената на бумажный фильтр (Whatman grade 41 № 3543) площадью 1 см². Пробы высушивали на воздухе и помещали между двумя слоями фторопластовой пленки ($d = 0,005$ мм), вставленной в сопряженные тefлоновые пальцы.

Содержание химических элементов Ca, Pb, Fe, Cu, Zn, Br, Sr, Zr в гомогенатах атеросклеротических бляшек ($n = 20$) определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА СИ) (накопитель ВЭПП-3) в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения Института ядерной физики им. Г.И. Будкера. Концентрации химических элементов атеросклеротических бляшек измеряли по методу «внешнего стандарта». Тонкий стандарт с известной концентрацией тестируемых элементов был использован для сравнения [5]. Пределы обнаружения для каждого химического элемента определяли при нескольких параллельных измерениях одного и того же образца.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (SD) и представляли в виде $M \pm SD$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой выборке определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В атеросклеротических очагах концентрация Ca составила $1861,65 \pm 581,68$, Pb – $0,37 \pm 0,05$, Fe – $109,25 \pm 18,05$, Cu – $1,38 \pm 0,09$, Zn – $2,31 \pm 0,42$, Br – $0,54 \pm 0,07$, Sr – $0,63 \pm 0,18$, Zr – $0,12 \pm 0,01$ мкг/мл. Статистически значимых различий между содержанием химических элементов в стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшках мы не обнаружили (таблица).

Кальций в атеросклеротических бляшках – основной минеральный компонент, содержание которого может существенно различаться у раз-

Содержание химических элементов в атеросклеротических бляшках, мкг/мл

Химический элемент	Стабильные бляшки ($n = 14$)	Нестабильные бляшки ($n = 6$)
Ca	$1791,93 \pm 3042,25$	$2024,33 \pm 1267,13$
Pb	$0,39 \pm 0,26$	$0,34 \pm 0,14$
Fe	$118,21 \pm 89,92$	$88,33 \pm 54,59$
Cu	$1,33 \pm 0,38$	$1,49 \pm 0,46$
Zn	$2,26 \pm 2,14$	$2,42 \pm 1,12$
Sr	$0,64 \pm 0,95$	$0,60 \pm 0,35$
Br	$0,57 \pm 0,37$	$0,48 \pm 0,21$
Zr	$0,12 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,05$

ных индивидуумов. В образцах стабильных бляшек концентрация Са варьировала от 42,0 до 11585,0 мкг/мл, нестабильных — от 216,0 до 3545,0 мкг/мл (см. таблицу). Установлен высокий уровень корреляции ($p < 0,01$) между содержанием кальция и других химических элементов — железа ($r = 0,798$), цинка ($r = 0,963$) и стронция ($r = 0,981$). При этом концентрация Fe в стабильных бляшках была выше, чем в нестабильных (см. таблицу), но из-за высокой вариабельности (от 26 до 370 мкг/мл) уровень достоверности не достигается. Содержание Zn в стабильных атеросклеротических очагах варьировало от 0,62 до 8,77 мкг/мл, в нестабильных — от 1,05 до 3,63 мкг/мл, уровень Sr — соответственно от 0,07 до 3,75 мкг/мл и от 0,19 до 1,02 мкг/мл.

Если предположить, что накопление Са идет двумя путями — из крови в сосудах и из межклеточного пространства вокруг сосуда, то рост кальцинированной массы не связан с повышением содержания Са в крови. Проникновение Са в стенку сосуда зависит от давления, турбулентности и других физических процессов. Идет ли накопление других элементов (железа, цинка, стронция) параллельно или они являются катализаторами концентрации Са — не ясно. В сыворотке крови содержание Са у «условно здоровых» мужчин составляет в среднем $78,5 \pm 1,3$ мкг/мл (вариации от 34,6 до 138 мкг/мл) [6]. Ранее обнаружено, что отложение Са в стенке сосуда происходит на ранней стадии атеросклероза, при этом существует высокая степень корреляции концентрации Са с уровнем Fe и Zn, что свидетельствует о взаимосвязи между этими микроэлементами и ранним отложением солей кальция [7].

Если железо и цинк представлены в процессах воспаления, то в отношении стронция данных мало. Стронций токсичен, относится к редким элементам, его кругооборот тесно связан с кальцием. В живых организмах Sr выступает как аналог кальция, но менее активно транспортируется через мембраны. Свинец является одним из самых токсичных элементов. Наиболее значимыми источниками загрязнения окружающей среды Pb служат автомобильный транспорт и неконтролируемые электронные отходы (аккумуляторы, резисторы и т.д.) [8]. Большая часть Pb поступает в организм человека с продуктами питания, водой и пылевыми аэрозолями, накапливаясь в крови, тканях, костях.

Свинец не играет физиологически значимой роли в организме, но является конкурентным биометаллом по отношению к Са, вытесняя его из мест связывания с фосфатными, карбоксильными и сульфатными лигандами в тканях и на

клеточных мембранах. Основное повреждающее действие Pb проявляется через нарушение пассивного транспорта Са. Свинец ассоциирует с атеросклерозом из-за способности этого металла инактивировать параоксоназу, таким образом подавляя кардиопротекторную активность липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и способствуя окислению частиц липопротеинов низкой плотности [9]. Токсичность Pb в отношении сердечно-сосудистой системы связывают с развитием артериальной гипертензии [8] и снижением биодоступности оксида азота за счет увеличения производства активных форм кислорода [10].

В нашем исследовании концентрация Pb в стабильных атеросклеротических очагах составила $0,39 \pm 0,26$ мкг/мл с изменениями от 0,08 до 1,17 мкг/мл, в нестабильных — $0,34 \pm 0,14$ мкг/мл (вариации от 0,24 до 0,61 мкг/мл) (см. таблицу). Популяционные исследования воздействия свинца на сердечно-сосудистую систему в основном сосредоточены на ассоциации увеличения его содержания и повышения артериального давления [11], концентрации в крови маркеров воспаления (Lp-PLA2, IL-6, IL-8, TNF- α), снижения уровня ЛПВП [8]. Содержание Pb у «условно здоровых» мужчин г. Новосибирска составляет в среднем $0,28 \pm 0,2$ мкг/м с вариациями 0,05–1,25 мкг/мл, что несколько выше допустимых показателей [6].

Медь имеет узкий диапазон полезных концентраций, выше которых проявляется токсическое влияние элемента [3]. Дефицит Cu в миокарде — ключевой молекулярный дефект, лежащий в основе нарушения функции левого желудочка при диабете [12]. Показано, что у пациентов на поддерживающем гемодиализе без известных атеросклеротических заболеваний сывороточный уровень меди выше, чем у здоровых лиц. Кроме того, содержание меди в сыворотке положительно коррелирует с толщиной комплекса «интима — медиа» ($p = 0,63$; $p < 0,01$) [13]. В нашем исследовании обнаружена положительная корреляция концентрации Cu и Zn ($r = 0,456$; $p < 0,05$). Уровень Cu (см. таблицу) в стабильных атеросклеротических очагах изменялся от 0,75 до 1,94 мкг/мл, в нестабильных — от 0,80 до 2,14 мкг/мл. Концентрации Vg и Zg (см. таблицу) в стабильных и нестабильных атеросклеротических очагах существенно не различались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании установлено, что основной минеральной составляющей атеросклеротической бляшки является кальций с тенденцией к увеличению концентрации элемента в неста-

бильном очаге. Индивидуальные вариации его количества в бляшке очень широки. Минорные составляющие — железо, цинк, стронций — ассоциированы с кальцием. При этом имеется тенденция к уменьшению содержания железа в нестабильном атеросклеротическом очаге, а концентрация стронция и цинка существенно не изменяется. Можно предположить, что в процессе бляшкообразования минорные элементы действуют как катализаторы, способствуя накоплению кальция или замедляя этот процесс. Возможно, некоторые металлы могут быть независимыми маркерами атеросклероза и требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы по Государственному заданию № 0324–2018–0001.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cosselman K.E., Navas-Acien A., Kaufman J.D. Environmental factors in cardiovascular disease // *Nat. Rev. Cardiol.* 2015. Vol. 12. P. 627–642.
2. Csordas A., Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke // *Nat. Rev. Cardiol.* 2013. Vol. 10. P. 219–230.
3. Olcay A., Tezcan E., Canturk E., İnan B., Karaoglu H., Kucuk C., Akdemir B., Yolay O. Multiple non-essential transition metals are accumulated in carotid atherosclerotic plaques: Missing link in atherosclerosis? // *Biol. Trace Elem. Res.* 2018. doi: 10.1007/s12011-018-1481-0.
4. Waksman R., Seruys P.W. Handbook of the vulnerable plaque. London, 2004. P. 1–48.
5. Baryshev V.B., Bufetov N.S., Koutzenogii K.P., Makarov V.I., Smirnova A.I. Synchrotron radiation measurements of the elemental composition of Siberian aerosols // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.* 1995. Vol. 359, N 1-2. P. 297–301.
6. Журавская Э.Я., Куценогий К.П., Чанкина О.В., Савченко Т.И., Андрияшина Н.А., Гырголькау Л.А. Микроэлементы и некоторые параметры здоровья человека // *Бюл. СО РАМН.* 2006. Т. 26, № 4. С. 116–120.
7. Roijers R.B., Debernardi N., Cleutjens J.P., Schurgers L.J., Mutsaers P.H., van der Vusse G.J. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries // *Am. J. Pathol.* 2011. Vol. 178, N 6. P. v2879–v2887.
8. Lu X., Xu X., Zhang Y., Zhang Yul., Wang C., Huo X. Elevated inflammatory Lp-PLA2 and IL-6 link e-waste Pb toxicity to cardiovascular risk factors in preschool children // *Environ. Pollut.* 2018. Vol. 234. P. 601–609.
9. Solenkova N.V., Newman J.D., Berger J.S., Thurston G., Hochman J.S., Lamas G.A. Metal pollutants and cardiovascular disease: Mechanisms and consequences of exposure // *Am. Heart J.* 2014. Vol. 168, N 6. P. 812–822.
10. Peters J.L., Kubzansky L.D., Ikeda A., Fang S.C., Sparrow D., Weisskopf M.G., Wright R.O., Vokonas P., Hu H., Schwartz J. Lead concentrations in relation to multiple biomarkers of cardiovascular disease: The normative aging study // *Environ. Health Perspect.* 2012. Vol. 120, N 3. P. 361–366.
11. Navas-Acien A., Guallar E., Silbergeld E.K., Rothenberg S.J. Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review // *Environ. Health Perspect.* 2007. Vol. 115, N 3. P. 472–482.
12. Zhang S., Liu H., Amarsingh G.V., Cheung C.C., Hogg S., Narayanan U., Zhang L., McHarg S., Xu J., Gong D., Kennedy J., Barry B., Choong Y.S., Phillips A.R., Cooper G.J. Diabetic cardiomyopathy is associated with defective myocellular copper regulation and both defects are rectified by divalent copper chelation // *Cardiovasc. Diabetol.* 2014. Vol. 13. ID 100.
13. Ari E., Kaya Y., Demir H., Asicioglu E., Keskin S. The correlation of serum trace elements and heavy metals with carotid artery atherosclerosis in maintenance hemodialysis patients // *Biol. Trace Elem. Res.* 2011. Vol. 144, N 1-3. P. 351–359.

ASSOCIATION OF MINERAL ELEMENTS
IN THE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE IN CORONARY ATHEROSCLEROSIS

E.Ya. Zhuravskaya¹, T.I. Savchenko², O.V. Chankina², Ya.V. Polonskaya¹, E.V. Sadowski¹,
E.M. Stakhneva¹, Yu.I. Ragino¹, A.M. Chernyavskii³

¹*Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of Federal Research Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

²*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion of SB RAS
630090, Novosibirsk, Institutskaya str., 3*

³*National Medical Research Center named academician E.N. Meshalkin of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechnunovskaya str., 15*

Purpose: to determine the content of mineral elements in the homogenates of atherosclerotic plaques of human coronary arteries. **Methods:** research material – homogenates of samples of atherosclerotic plaques of coronary arteries obtained during coronary bypass surgery. The concentration of chemical elements Ca, Pb, Fe, Cu, Zn, Br, Sr, Zr in the homogenates of atherosclerotic plaques was determined by x-ray fluorescence analysis using synchrotron radiation (SRXRF). **Results:** in all the studied samples the predominant presence of Ca was observed, in stable plaques $1791.93 \pm 3042.25 \mu\text{g/ml}$, in unstable atherosclerotic plaques $2024.33 \pm 1267.13 \mu\text{g/ml}$. Association of Ca with Fe ($r = 0.798$; $p < 0.01$), Zn ($r = 0.963$; $p < 0.01$) and Sr ($r = 0.981$; $p < 0.01$) in the atherosclerotic focus was revealed. No significant difference between the measured elements in stable and unstable plaques was found. **Conclusion:** the method x-ray fluorescence analysis using synchrotron radiation revealed some patterns of the mineral composition of an atherosclerotic plaque of a human. The main mineral component of the atherosclerotic plaque is calcium, with a tendency to increase the concentration of the element in the unstable focus. Minor components-iron, zinc, strontium are associated with calcium. In this case, iron tends to reduce the concentration in an unstable atherosclerotic focus, and the concentration of strontium and zinc does not change significantly.

Keywords: coronary atherosclerosis, atherosclerotic plaque, mineral elements, calcium, zinc.

*Статья поступила 13 февраля 2019 г.,
принята в печать 14 марта 2019 г.*