

Maciej Pawlikowski\*, Zbigniew Ryskala\*\*

## **Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna fosforanowej mineralizacji wybranych naczyń tętnicznych człowieka**

### Streszczenie

Badania przeprowadzono na wycinkach naczyń tętnicznych pobranych podczas badań sekcyjnych zwłok 23 osób, obojga płci, w wieku 45-87 lat, u których stwierdzono kliniczne następstwa mieżdżycy. Wycinki naczyń o długości 2,5 cm pobrano z lewej tętnicy biodrowej, lewej tętnicy wieńcowej i lewej tętnicy podstawy mózgu. Celem pracy było określenie składu mineralnego i chemicznego oraz postaci występowania złogów nieorganicznych w tych tętnicach.

Badania wykonano przy pomocy: mikroskopu skanningowego, mikrosondy elektronowej, dyfraktometru rentgenowskiego oraz metody spektroskopii w podczerwieni.

Stwierdzono, że minerały krystalizujące w tętnicach reprezentują fosforany wapnia o strukturze hydroksyapatytu, którym towarzyszy substancja o słabo uporządkowanej strukturze atomowej. W złogach mineralnych stwierdzono także obecność grup  $\text{CO}_3^{2-}$  oraz niewielkie ilości siarki i magnezu.

Złogi mineralne zlokalizowane są zarówno na śródbłonku tętnic jako idiomorficzne kryształy oraz tzw. zwapnienia, jak również pod śródbłonkiem w formie mineralnych ziaren.

Rozmieszczenie złogów w badanych odcinkach tętnic okazało się nierównomierne. Tętnice biodrowe i wieńcowe były silniej zmineralizowane niż tętnice podstawy mózgu. W tętnicach biodrowych i wieńcowych mineralizacja występowała na i pod śródbłonkiem. Tętnice podstawy mózgu zmineralizowane były wyłącznie na śródbłonku.

---

\* Zakład Petrografii Akademii Górniczo-Hutniczej im. St. Staszica w Krakowie.

\*\* Klinika Chorób Zawodowych Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie.

## WSTĘP

Powszechnie przyjmuje się, że istotą procesu miażdżycowego jest ogniskowe nagromadzenie złogów lipidowych w błonie wewnętrznej tętnic i przerost tkanki łącznej. Odkładanie złogów wapnia w ścianie naczyń tętnicznych uważa się za powikłanie zmian miażdżycowych. Zwapnienia tkanek miękkich nie wynikające z pierwotnych zaburzeń gospodarki fosforanowo-wapniowej stwierdzono oprócz naczyń tętnicznych w ogniskach gruźliczych, koksoplazmozie, grzybicy i innych chorobach przebiegających z martwicą tkanek.

W piśmiennictwie mineralogicznym opracowania tej problematyki są nieliczne. Liczniejsze są natomiast publikacje, które posiadają charakter kliniczny (Britton W. N., Stokstad E. I. R., 1970; Eistein R., Zeurolis L., 1977; Maynard i inn. 1958; Mitschell J. R. A., Adams J. H., 1977; Ury D. W., i in. 1976) oraz prace zawierające wyniki badań o charakterze histologicznym lub epidemiologicznym (Alex S., i in. 1976; Eanes E. D., i in. 1973; McConnel D., 1973; Peagle R., 1969; Spector M., i in. 1969).

Znajomość zagadnień mineralizacji organizmu człowieka, w tym również mineralizacji naczyń krwionośnych wydaje się być niewystarczająca, zwłaszcza, że proces ten rozpoczyna się już pomiędzy 25 a 30 rokiem życia (Mitschell I. R. A., Adams J. H., 1977). Badania tego zjawiska mogą mieć istotne znaczenie dla poznania i ewentualnej profilaktyki klinicznej manifestacji miażdżycy (Calstrom F., i in. 1953; Fleisch H., 1976).

## MATERIAŁ I METODA

Wycinki naczyń tętnicznych o długości 2,5 cm pobrano ze zwłok w czasie badań sekcyjnych. Reprezentowały one fragmenty lewej tętnicy biodrowej, lewej tętnicy wieńcowej i lewej tętnicy podstawy mózgu. Pobrano je od 23 osób płci obojga, w wieku 45-87 lat, u których stwierdzono życiowo kliniczne następstwa miażdżycy (udar mózgu, zawał serca, miażdżycową martwicę kończyn dolnych).

Wyeliminowano osoby, u których stwierdzono proces nowotworowy, pierwotne zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz choroby kości. Do



Ryc. 1. Płytkowe skupienia kryształów apatytu. Śródbłonek tętnicy biodrowej. ♂ 63 lata. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 1800 x



Ryc. 2. Słupkowe kryształy fosforanu Ca zawierające siarkę. Odgałęzienie tętnicy biodrowej. Śródbłonek. ♂ 80 lat. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 2000 x



weryfikacji rozpoznać klinicznych posłużono się rozpoznaniem anatomiczno-patologicznymi.

Badania wycinków tętnic przeprowadzono na powierzchni około  $10 \text{ mm}^2$ . Fragmenty tętnic ze zwapnieniami mineralnymi i kryształami przemywano wstępnie w alkoholu etylowym 99% i suszono. Obserwowane makroskopowo pod śródbłonkiem skupienia mineralne (ziarna) wypreparowano mechanicznie poddając je wstępnie przemywaniu w rozcieńczeniu 1:1  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Przemywanie to wykonywano w temperaturze  $40^\circ\text{C}$  przez okres około 10 min. Następnie próbki wysuszono w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ .

Analizy fazowe wykonano przy pomocy dyfrakcji rentgenowskiej. Badania rentgenowskie prowadzono na dwóch typach dyfraktometrów TUR M-65 i DRON 2,5. Stosowano odpowiednie, zmonochromatyzowane filtrem Fe promieniowanie  $\text{Cu K}\alpha$ . Preparaty wykonano ze sproszkowanego materiału nanosząc go na zmatowioną płytkę szklaną. Oznaczono wartości odległości międzypłaszczyznowych  $d_{\text{hkl}}$ , wykonano identyfikację faz mineralnych, wyznaczono parametry komórki elementarnej fosforanów oraz ustalono wielkość krystalitów w złożach i ziarnach mineralnych.

Badania spektroskopowe w podczerwieni wykonano w zakresie  $400\text{--}3800 \text{ cm}^{-1}$  przy pomocy spektrometru UR 10. Stosowano preparaty pastylkowe wykonane z krystalicznego KBr oraz badanej, sproszkowanej substancji.

Badania mikroskopowe przeprowadzono przy pomocy mikroskopu skaningowego STEREOSKAN S 10. Fragmenty tętnic po wysuszeniu w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przyklejono do stolika klejem metalicznym, a następnie napyłono węglem i złotem. Równocześnie z obserwacjami morfologii próbek wykonano ich półilościowe analizy chemiczne metodą fluorescencji rentgenowskiej przy zastosowaniu spektrometru KEVEX.

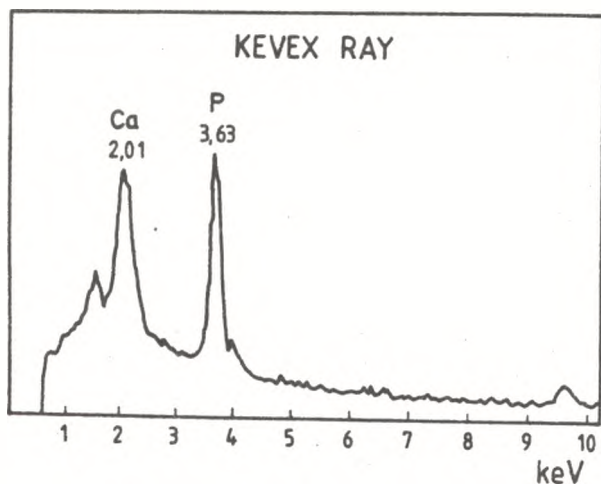
Badania chemiczne wykonano przy pomocy mikrosondy elektronowej CAMECA. Po zatopieniu preparatów w żywicy epoksydowej i ich wypolerowaniu próbki napyłono złotem. Wykonano fotografie topografii złożeń i ziarn mineralnych. Prześledzono rozmieszczenie Ca i P oraz C. Dokonano punktowych analiz chemicznych z obszarów o powierzchni  $2 \mu\text{m}^2$ . Błędy pomiarów wynoszą:  $\text{CaO} \pm 0,3\%$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5 \pm 0,4\%$ . W miejscach szczególnie interesujących przeprowadzono półilościowe, liniowe analizy pierwiastków.

## WYNIKI

### Tętnice biodrowe - kryształy powstające na śródbłonku

Obserwacje przy pomocy mikroskopu skaningowego (SEM) pozwoliły stwierdzić, że sposób występowania tych kryształów jest zróżnicowany. Wśród obserwowanych kryształów dominują formy płytkowe (ryc. 1) o zmiennej gęstości zapełnienia śródbłonka. Obok ziarn o zarysie ksenomorficznym (nieregularnym) obserwuje się także liczne kryształy idiomorficzne (geometryczne) o typowym dla apatytu pokroju słupkowym (ryc. 2). Ten ostatni typ kryształów zdecydowanie dominuje wśród fosforanów nad innymi formami krystalicznymi. Spotyka się jednak także niekiedy kryształy o pokroju igiełkowym. Tworzą one rzadkie małe skupienia o wielkości do kilku mikronów.

Z wykonanych oznaczeń chemicznych omawianych kryształów wynika, że zawierają one zarówno P, jak i Ca (ryc. 3), które to pierwiastki w spektrach energetycznych dają odpowiednie piki w zakresie: 2,015 KeV i 3,631 KeV. Natomiast kryształy o pokroju igiełkowym zawierają jedynie śladowe ilości Ca i P, co może sugerować ich organiczny charakter.



Ryc. 3. Energetyczne spektrum rentgenowskie kryształów przedstawionych na ryc. 1 (KEVEX)

Należy zauważyć, że w wymienionych typach kryształów nie obserwuje się innych towarzyszących pierwiastków możliwych do wykrycia metodą fluorescencji rentgenowskiej. Natomiast obserwowany na spektrach energetycznych pik o wartości 1,254 KeV związany jest, podobnie jak w przypadku pozostałych próbek, ze świeceniem aluminiowego stolika, na którym umocowany był preparat.

W mikroskopie skanningowym obok wymienionych kryształów i ich skupień obserwuje się także liczne koncentracje nieregularnych naciekowych skupień, które zupełnie pozbawione są P, Ca, zawierają natomiast znaczną ilość C. Wskazuje to, że reprezentują one związki organiczne, najprawdopodobniej cholesterol.

Wśród fosforanów obserwowano liczne skupienia kryształów grubosłupkowych, koncentrujących się w duże agregaty, których średnica przekraczała nawet 400  $\mu\text{m}$ . Ułożenie kryształów w tych agregatach posiada przeważnie przypadkowy charakter. Analizy chemiczne tych kryształów wykazały, że są to wyłącznie fosforany wapnia.

Omawiane formy kryształów tworzą się nie tylko na prostych odcinkach tętnic, lecz także w miejscach gdzie tętnice się rozgałęziają. W miejscach tych obserwowano szczególnie duże kryształy wielkości do 50  $\mu\text{m}$ , które charakteryzują się pokrojem cienkopłytkowym. Niektóre z występujących kryształów zawierały obok P i Ca także niewielkie ilości S. Spół wiązania siarki w strukturze kryształów jest trudny do ustalenia. Siarka może być wiązana w odrębnej fazie (np. siarczan wapnia) bądź jako grupy  $\text{SO}_4^{2-}$  można podstawiać grupy  $\text{PO}_4^{3-}$  (McConnell D., 1973). Nie da się także wykluczyć, że obecność siarki w omawianym typie kryształów wynika z obecności (współwystępowania) towarzyszących faz organicznych lub połączeń organiczno-mineralnych.

#### Tętnice biodrowe - złogi mineralne na śródbłonku

Widoczne są one nawet makroskopowo jako wyraźne zgrubienia i wybrzuszenia. Wydaje się, że mogą być połączone z opisanymi dalej zianami mineralnymi zlokalizowanymi pod śródbłonkiem.

Powierzchnia tych złogów dochodzi w ekstremalnych przypadkach do  $1 \text{ cm}^2$ , a ich grubość osiąga 2 mm (ryc. 4). Rozmieszczenie tego typu złogów jest nieregularne. Generalnie są one rzadziej spotykane niż pozostałe formy skupień mineralnych. Współwystępując ze złogami organicznymi mogą one powodować niekiedy niemal całkowite miejscowe usztywnienie ściany tętnic przyczyniając się równocześnie do znacznego zmniejszenia ich wewnętrznej średnicy (ryc. 5).

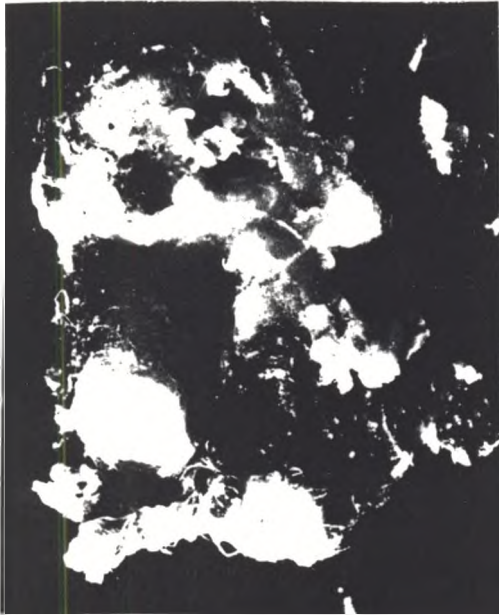
Badania metodą mikros sondy elektr onowej wykonane na przekroju złogów w kierunku prostopadłym do ściany tętnicy pozwoliły stwierdzić, że posiadają one niejednorodną budowę. Z obserwacji topografii tak wyciętych przekrojów zwapnień wynika, że obok zasadniczej substancji apatytowej w złogach obecne są ziarniste skupienia organiczne. Kształty tych skupień są nieregularne, a ich średnica może przekraczać nawet  $200 \mu\text{m}$ . Są one rozproszone w substancji apatytowej w sposób nierównomierny.

Organiczny charakter tych skupień potwierdzony został liniowymi analizami chemicznymi wykonanymi metodą mikros sondy elektr onowej (ryc. 6). Wykazały one w omawianych skupieniach wyraźny wzrost zawartości węgla przy równocześnie minimalnych zawartościach fosforu i wapnia. Obserwacje te potwierdziły punktowe analizy chemiczne (tab. 1, pkt.3).

Stwierdzono także, że omawiane złogi mineralne są niekiedy wyraźnie warstwowe. Zaznacza się to wyraźniej w strefie leżącej bliżej centrum tętnicy. Warstwowanie to jest dowodem cyklicznego odkładania się zwapnień i jest niewątpliwie odzwierciedleniem cyklicznej zmiany warunków ich powstawania.

Zarówno półilościowe, jak i ilościowe, punktowe, analizy chemiczne wykone przy pomocy mikros sondy elektr onowej wykazały zmienność chemizmu poszczególnych stref złogów. Zmiany te dotyczą zarówno wapnia, jak i fosforu (tab. 1). Równocześnie metoda ta pozwoliła stwierdzić, że domieszki innych pierwiastków w omawianych złogach są akcesoryczne. Ilości niektórych z tych pierwiastków znajdują się poniżej poziomu wykrywalności metodą mikros sondy elektr onowej.





Ryc. 4. Zwapnienie w formie ziarna.  
Śródbłonek tętnicy biodrowej. ♂ 73  
lata. Powiększenie 10 x



Ryc. 5. Skupienie organiczno-mine-  
ralne (w kółku) zarastające tętni-  
cę biodrową. ♂ 57 lat. Powiększe-  
nie 10 x



Tabela 1

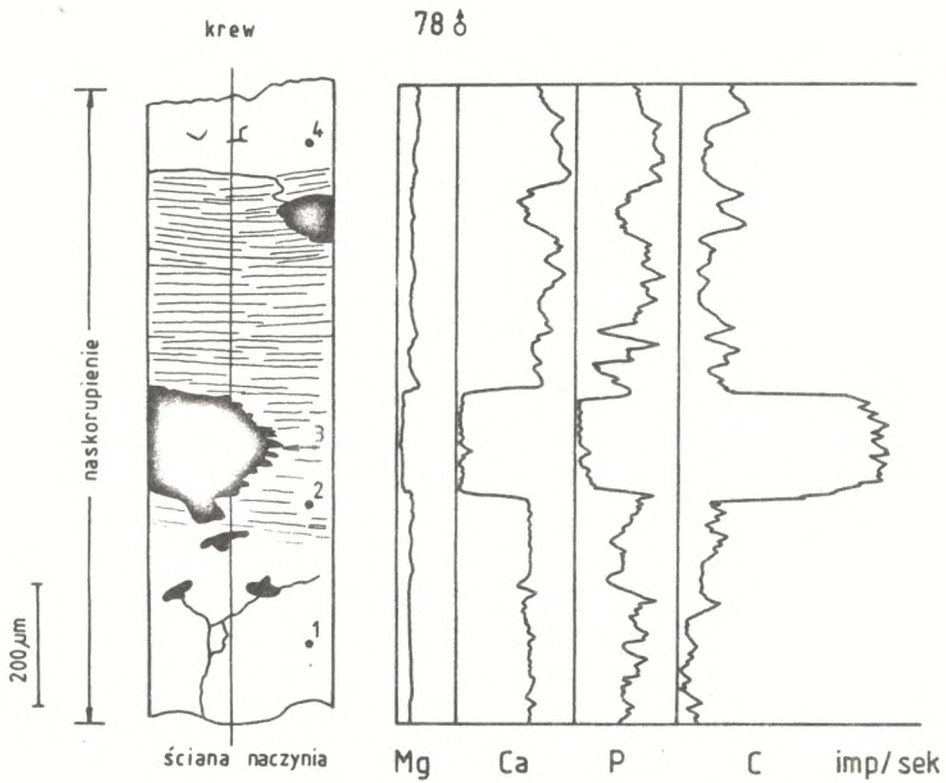
Zmienność zawartości Ca i P w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> w zwapnieniu ze śródbłonka tętnicy biodrowej. 78 lat.  
Metoda mikros sondy elektronowej

Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO
1	32,0	47,3	0,01
2	31,7	40,7	0,02
3	14,8	15,8	-
4	31,9	43,4	0,02

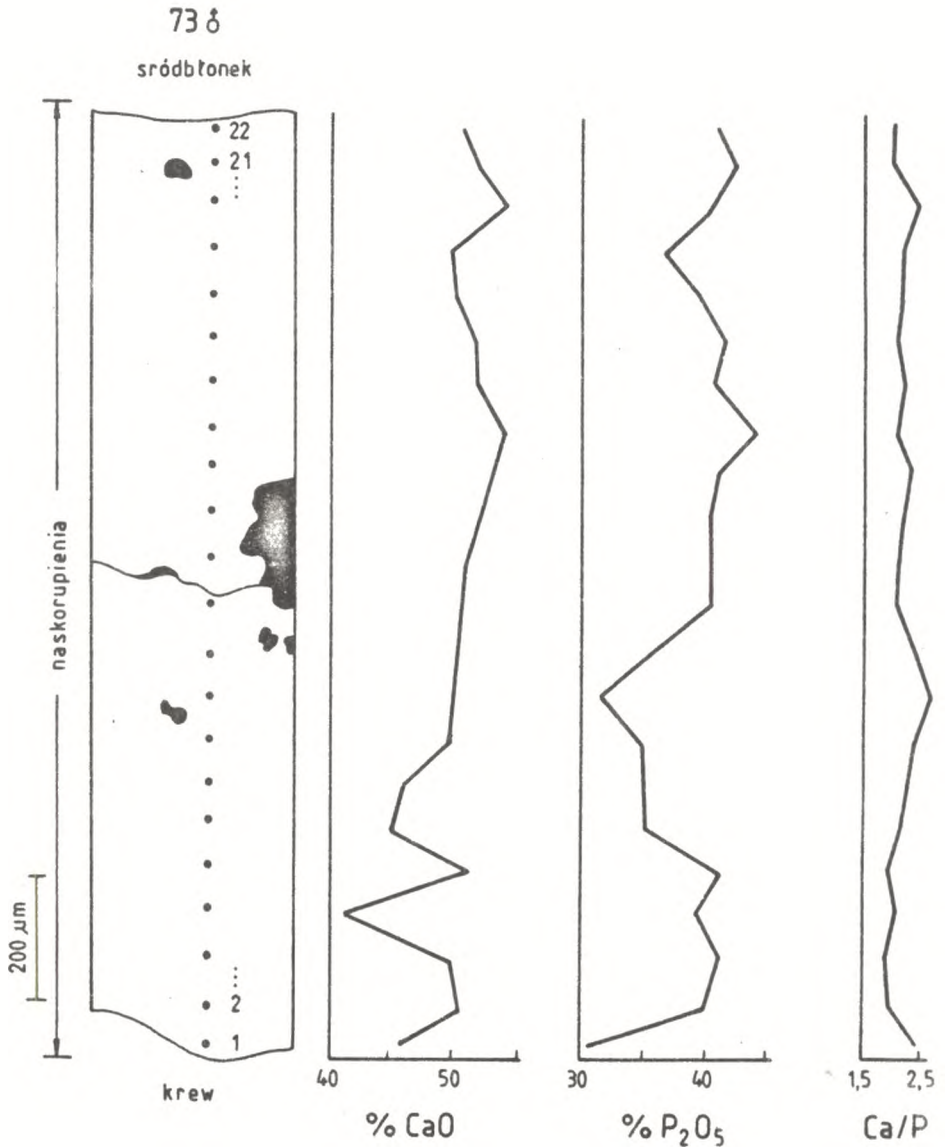
Wśród pierwiastków towarzyszących rozpoznano jedynie Mg, którego zawartości nie przekraczają 0,0x%. Stosunek Ca/P oscyluje w złogach w granicach 1,1 - 1,2, a więc jest nieco niższy niż w apatytach kostnych, gdzie wynosi 1,5 - 2,2 przy średniej 1,7 (Kita B., Pawlikowski M., 1983). Wapń i fosfor stanowią, w przeliczeniu na tlenki, około 70% wagowych substancji występujących w badanych złogach. Reszta to domieszki organiczne i H<sub>2</sub>O. Obecność tych substancji stwierdzono metodą spektroskopii w podczerwieni.

Obok złogów z widoczną mikroskopowo mikrolaminacją napotyka się także złogi niewarstwowe, w których obecne są skupienia organiczne. Wykonane w tychże złogach punktowe analizy chemiczne przeprowadzono w dwudziestu dwu punktach pomiarowych (ryc. 7). Wynika z nich, że pomimo obserwowanej mikroskopowo jednorodności struktury złogów występuje w nich znaczna zmienność zawartości wapnia i fosforu. Zmiany te, w kierunku od śródbłonka do centrum tętnicy nie zawsze są proporcjonalne, tzw. przykładowo zwiększa się zawartość fosforu, a maleje zawartość wapnia lub odwrotnie. Złogi nie są więc koncentracjami fosforanowymi utworzonymi jednorazową, lecz powstającymi w określonym przedziale czasu. Zjawisko to jest dowodem zmian chemizmu środowiska krystalizacji, dlatego też obok obszarów (stref) zawierających 41% CaO obserwuje się strefy zawierające CaO w ilości około 50% przy równocześnie wysokich zawartościach fosforu (tab. 2).

Szczególnie wymagają biochemicznego objaśnienia zmiany proporcji Ca-P w najmłodszej części złogów, która tworzyła się w ostatnim okresie życia człowieka.



Ryc. 6. Liniowe analizy chemiczne zwapnienia. Śródbłonek tętnicy biodrowej. ♂ 78 lat. Mikrosonda elektronowa. 1-4 - miejsca wykonania analiz. Część lewa: przekrój zwapnienia, czarne - związki organiczne, jasne - fosforany wapnia



Ryc. 7. Zmienność zawartości Ca i P (w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) w zwapnieniu. Śródbłonek tętnicy biodrowej. ♂ 73 lata. Mikrosonda elektrowna. 1-22 miejsca wykonania punktowych analiz chemicznych. Część lewa - przekrój zwapnienia

Zmienność zawartości Ca i P w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
w zwapnieniu ze śródbłonka tętnicy biodrowej. d<sup>1</sup> 73 lata.  
Metoda mikros sondy elektronowej

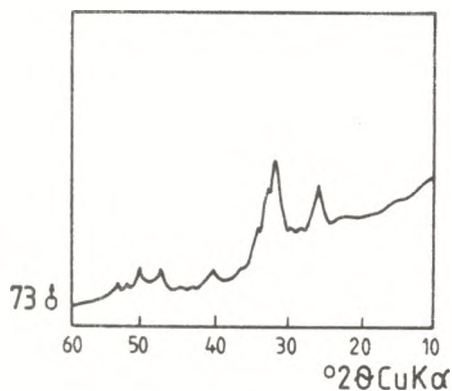
Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
1	46,7	31,9	12	51,5	40,9
2	50,9	40,9	13	53,4	40,5
3	49,8	42,8	14	55,4	41,2
4	41,2	39,5	15	57,4	46,9
5	52,8	43,0	16	53,7	40,5
6	45,5	35,0	17	53,0	42,5
7	46,9	35,0	18	49,8	38,4
8	49,2	35,0	19	48,8	37,0
9	49,7	32,2	20	57,4	40,9
10	50,3	35,6	21	52,9	44,8
11	50,6	40,9	22	50,4	42,3

Badania złogów wykonane metodą dyfrakcji rentgenowskiej wykazały, że są one zbudowane z drobnokrystalicznego apatytu (ryc. 8). Charakteryzuje się on następującymi wartościami odległości międzypłaszczyznowych  $d_{hkl}$ : 3,80, 3,45, 3,09, 2,81, 2,79, 2,72, 2,68, 2,63, 2,29, 2,26, 2,08, 1,94, 1,84, 1,71 Å.

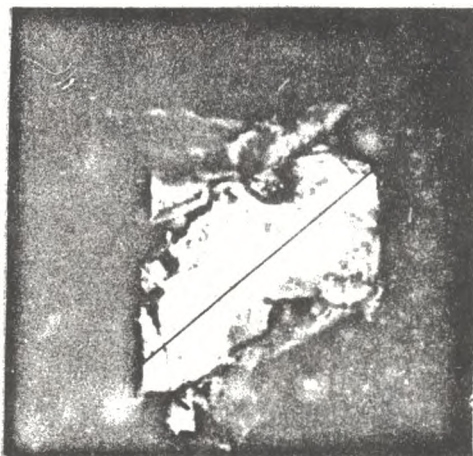
Z analiz spektrofotometrycznych w podczerwieni wynika, że obok apatytu, który ujawnia następujące pasma absorpcji: 475, 575, 605, 940, 1050, 1093  $\text{cm}^{-1}$  (Farmer V. C. 1974) znajdują się pasma w zakresach: 140, 1380, 1455, 1520, 1535, 1660, 1690, 1740  $\text{cm}^{-1}$ . Występujące na widmie pasma absorpcji w zakresie 2850-2960  $\text{cm}^{-1}$  potwierdzają w złogach obecność niewielkich ilości związków organicznych. Prawdopodobnie również z tymi substancjami związana jest część pasm absorpcji w zakresie 1240-1740  $\text{cm}^{-1}$ . Pasma absorpcji od 1600 do 3500  $\text{cm}^{-1}$  dokumentują występowanie w złogach wody strukturalnej, a więc substancji uwodnionych. Linie absorpcyjne w zakresach pomiędzy 1455 a 1535  $\text{cm}^{-1}$  dowodzą występowania grup węglanowych wchodzących w struktury fosforanów lub tworzących osobne fazy kwaśnych węglanów.

## Tętnice biodrowe - ziarna mineralne występujące pod śródbłonkiem

Obecność ziaren w ścianach tętnic ujawnia się jako wybrzuszenia i zgrubienia. Miejsca zawierające ziarna są twarde. Wielkość tych ziaren jest zmienna, największe z badanych miały wielkość główki od zapalki i wagę do 40 mg (ryc.9).



Ryc. 8. Dyfraktogram rentgenowski ze zwapnienia. Śródbłonek tętnicy biodrowej. ♂ 73 lata.

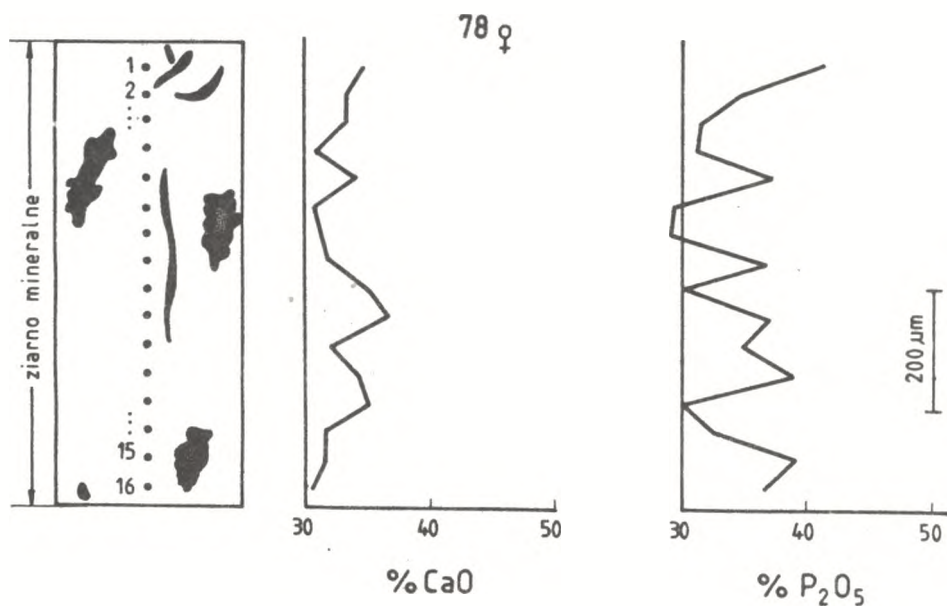


Ryc. 9. Ziarno mineralne spod śródbłonka tętnicy biodrowej. Wzdłuż kreski wykonano analizy chemiczne. ♂ 78 lat. Powiększenie 25 x

Ziarna te po mechanicznym wyseparowaniu i usunięciu z nich resztek substancji biologicznych obserwowano przy pomocy lupy binokularnej. Powierzchnia ziaren jest przeważnie urozmaicona, a obok ziaren o powierzchni gładkiej obserwuje się ziarna ostrokrawędziste posiadające niekiedy liczne ostre wypustki.

W przekroju, makroskopowo, ziarna te ujawniają zwięzłą jednorodną budowę. Jednak przy obserwacjach topografii przekroju wykonanych metodą mikroskopy elektronowej ujawnia się ich urozmaicona budowa. Obserwuje się liczne spękania i szczelinki, których średnica wynosi 2-4  $\mu\text{m}$ . W ziarnach występują skupienia substancji organicznej, mają one wielkość do 120  $\mu\text{m}$  i charakteryzują się gruzełkową budową. Analizy chemiczne

liniowe, wykonane przy pomocy mikrosondy elektronowej, wykazały niejednorodność chemiczną opisanych ziaren (ryc. 10). Są one nieco uboższe w Ca i P w porównaniu ze złoгами mineralnymi tworzącymi się na powierzchni śródbłonka tętnic (tab. 3). Dzieje się tak prawdopodobnie z powodu mocniejszego uwodnienia zawartych w tych ziarnach fosforanów. Interesujący jest fakt, że w poszczególnych mikroobszarach tych ziaren występują znaczne różnice w zawartości fosforu ( $P_2O_5$  29,2 - 40,9%). Również zróżnicowane są zawartości wapnia i występują w nieco mniejszym przedziale (tab. 3).



Ryc. 10. Zmienność zawartości Ca i P w przeliczeniu na CaO i  $P_2O_5$  wzdłuż linii pomiarowej pokazanej na ryc. 9. 1-16: miejsca wykonania punktowych analiz chemicznych



Tabela 3

Zmienność zawartości Ca i P w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> w ziarnie mineralnym występującym pod śródbłonkiem tętnicy biodrowej. ♂ 78 lat. Metoda mikrosondy elektronowej

Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
1	34,7	40,9	9	35,2	30,1
2	33,3	34,7	10	36,7	37,2
3	33,3	31,5	11	32,2	34,7
4	30,9	31,3	12	34,4	39,1
5	34,3	37,2	13	35,1	30,1
6	30,9	29,6	14	31,6	32,9
7	31,5	29,2	15	31,6	39,2
8	32,3	36,4	16	30,9	36,8

#### Tętnice wieńcowe - kryształy występujące na śródbłonku

Charakteryzują się one, podobnie jak w przypadku tętnic biodrowych, zmiennością pokroju. Dominują kryształy o kształtach słupków i płytek, choć obserwowano także ziarna o nieregularnym pokroju i nierównomierne wykształconych ścianach (ryc. 11).

Kryształy płytkowe tworzą agregowate skupienia (ryc. 12), które niekiedy lokują się w większych ilościach w pobliżu naczyń odżywiających naczynia (vasa vasorum). Wielkość tych agregatów może przekraczać nawet 300-400  $\mu\text{m}$ . Niekiedy kryształy występują także w postaci płytek rozsianych w masie substancji organicznej pokrywającej śródbłonek. Ułożenie kryształów jest przeważnie chaotyczne, choć obserwuje się obszary, gdzie kryształy mają zdecydowanie zorientowane ułożenie. Badania przy pomocy mikrosondy elektronowej oraz obserwacje w mikroskopie skaningowym pozwoliły stwierdzić, że kryształy i ziarna o bardzo nieregularnym kształcie nie zawierają fosforu, a wapń występuje w nich tylko w ilościach śladowych. Reprezentują one więc związki organiczne. Z tymi skupieniami współwystępują często kryształy o zarysach geometrycznych, któ-

rych wielkość osiąga 40  $\mu\text{m}$ . Ich skład chemiczny badany metodą fluorescencji rentgenowskiej wykazuje niemal stały stosunek Ca/P. Należy jednak podkreślić, że pomiary te wykonane były na zewnętrznych powierzchniach kryształów. Nie można więc wykluczyć zmienności chemizmu ich wnętrza (budowa zonalna).

### Tętnice wieńcowe serca - ziarna mineralne występujące pod śródbłonkiem

Ziarna te widoczne są wyraźnie jako wybrzuszenie w ścianie tętnic. Napotkano je głównie w miejscach znacznego stwardnienia ścian. Największe z badanych ziaren miało 4,1 mm długości, przy szerokości 2,5 i grubości 2,4 mm, a jego waga wynosiła 87 mg.

Zewnętrzna morfologia opisywanych ziaren jest przeważnie mocno urozmaicona (ryc. 13). W powierzchni ziaren obserwuje się liczne zagłębienia i nierówności. Ich brzegi są często ostre, a niekiedy nawet zakończone różnego kształtu wypustkami. Można przypuszczać, że ziarna te mogą powodować dolegliwości bólowe.

Wewnętrzne przekroje ziaren ujawniają ich niejednorodną budowę. Obok obszarów o budowie jednolitej występują strefy spękane, a niekiedy nawet porowate. Obserwowane we wnętrzu tych ziaren spękania miały wielkość nawet do 250  $\mu\text{m}$ .

Wykonane metodą mikrosondy elektronowej analizy punktowe (chemiczne) poszczególnych obszarów wnętrza ziaren (tab. 4, ryc. 14) wykazały także niejednorodność chemiczną poszczególnych ich części. Zawartości wapnia (w przeliczeniu na  $\text{CaO}$ ) wahają się od 29,8 do 35,7%, zaś zawartości fosforu (w przeliczeniu na  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) zamykają się w przedziale 27,8 - 39,7%. Charakter zmian chemizmu nie wykazuje uchwytnej prawidłowości.

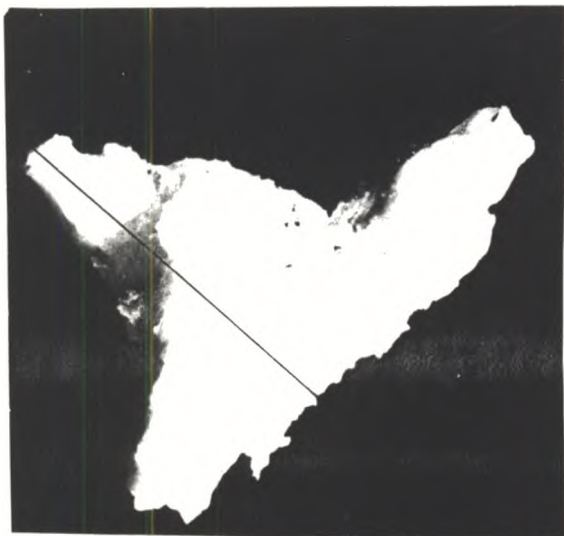
Badania ziaren mineralnych metodą dyfrakcji rentgenowskiej (ryc. 15) wykazały, że posiadają one odległości między płaszczyznami sieciowymi typowe dla apatytu. Równocześnie jednak na dyfraktogramach obserwowano wyraźne podwyższenie tła w zakresie 3,5 - 2,2  $\text{\AA}$  przy jednoczesnym znacznym poszerzeniu refleksów. Wskazuje to, że krystalicznemu apatytowi towa-



Ryc. 11. Agregatowe skupienia związków organicznych (cholesterol) współwystępujące z nieregularnymi skupieniami apatyty. Śródbłonek tętnicy wieńcowej. ♂ 68 lat. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 1600 x

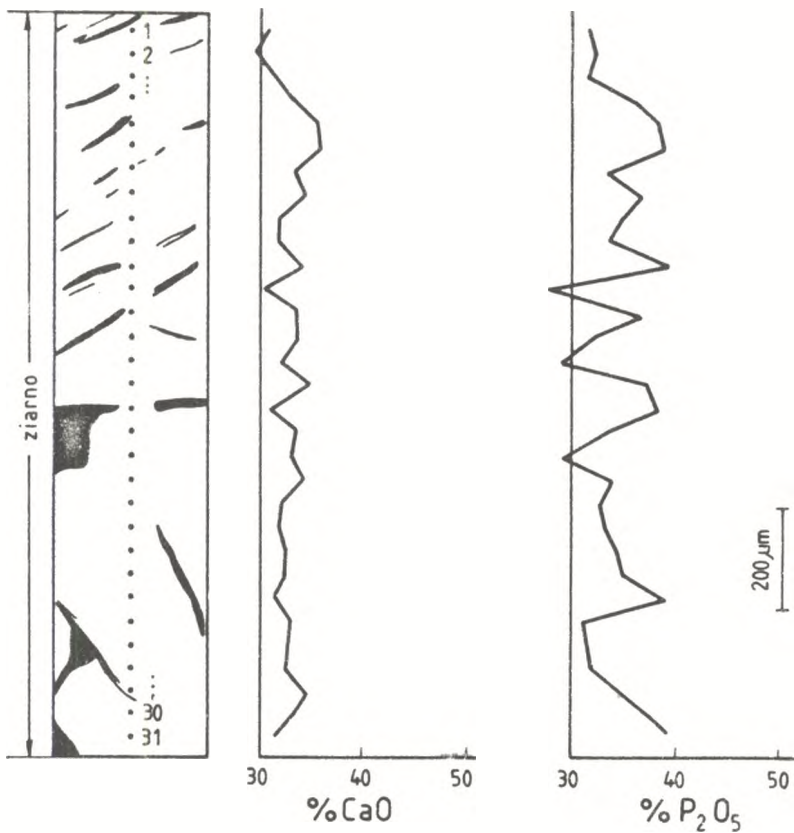


Ryc. 12. Kryształy apatyty wokół wlotu do vasa vasorum (strzałka). ♂ 56 lat. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 1200 x

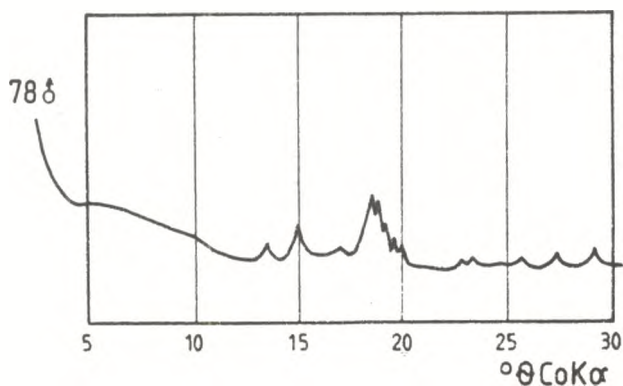


Ryc. 13. Ziarno mineralne występujące pod śródbłonkiem tętnicy wieńcowej. Kreska: linia, wzdłuż której wykonano punktowe analizy chemiczne. ♂ 70 lat. Zdjęcie makroskopowe, powiększenie 10 x





Ryc. 14. Zmienność zawartości Ca i P (w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) wzdłuż linii pomiarowej pokazanej na ryc. 13. Część lewa - obraz przekroju ziarna



Ryc. 15. Dyfraktogram rentgenowski ziarna mineralnego pokazanego na ryc. 13

Zmienność zawartości Ca i P w przeliczeniu na CaO i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
w ziarnie mineralnym występującym pod śródbłonkiem  
tętnicy wieńcowej. ♂ 68 lat. Metoda mikrosondy elektronowej

Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Punkt pomiaru	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
1	30,9	31,9	17	31,2	38,1
2	29,8	32,4	18	33,8	33,3
3	31,2	31,9	19	33,4	29,4
4	33,0	36,3	20	33,4	34,0
5	35,5	38,7	21	32,4	32,8
6	35,7	39,1	22	33,2	33,1
7	33,3	33,4	23	32,9	34,2
8	34,0	35,5	24	32,9	34,7
9	31,9	34,7	25	31,7	38,4
10	31,9	33,5	26	33,3	31,0
11	34,3	39,3	27	33,1	31,7
12	30,5	27,8	28	32,7	31,9
13	33,6	36,8	29	34,7	34,5
14	33,6	31,9	30	33,4	37,7
15	32,4	28,7	31	31,5	39,7
16	35,0	37,2			

rzyszy substancja mineralna o nie w pełni uporządkowanej strukturze atomowej, zaś apatyt ma charakter bardzo drobnokrystaliczny.

Z otrzymanych danych rentgenowskich, stosując wzór Sherera, obliczono wielkość kryształów budujących ziarna mineralne znajdujące się pod śródbłonkiem tętnic wieńcowych.

$$L_{hkl} = \frac{K \lambda R}{B \cos \theta}$$

gdzie:  $L_{hkl}$  = rozmiar krystalitu w kierunku prostopadłym do płaszczyzny hkl

$\lambda$  = długość fali w Å

R = promień kamery w mm

B = różnica połówek szerokości pasm substancji wzorcowej ( $B_c$ ) i badanej (B).

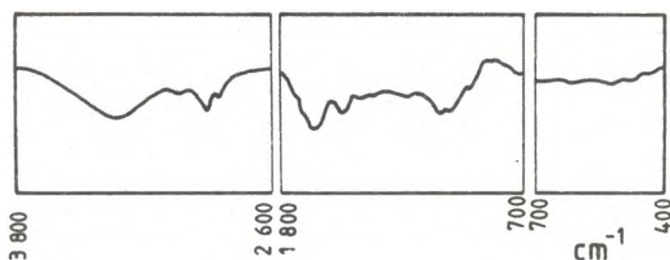
Wielkość kryształów obliczono dla refleksów 2,801 Å oraz 3,477 Å. Wynosi ona od 96,7 do 258 Å. Wyliczone wielkości komórki elementarnej apatytu z ziarna z tętnicy wieńcowej wynoszą:

$$a = 9,368 (\pm 0,003), \quad c = 695 (\pm 0,003), \quad c/a \ 0,736$$

Otrzymane wartości nie odbiegają od parametrów komórki elementarnej apatytów kostnych (Molnar Z., 1959; Smith C. B., Smith D. A., 1976).

Z badań wykonanych metodą fluorescencji rentgenowskiej wynika, że w badanych kryształach spotyka się niekiedy śladowe ilości Sr i Ba.

Analizy spektrofotometryczne w podczerwieni (ryc. 16) wskazują na współdziałanie z apatytem grup tzw. kwaśnych węglanów  $\text{HCO}_3^-$  dających pasma absorpcji w zakresie  $1415 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ . Uwodniony charakter towarzyszących apatytowi faz potwierdzają pasma absorpcji w zakresie  $165 \text{ cm}^{-1}$ .



Ryc. 16. Widmo w podczerwieni apatyty z ziarna pokazanego na ryc. 13

### Tętnice podstawy mózgu - kryształy występujące na śródbłonku

Badane próbki wykazują, że był to jedyny sposób mineralizacji tych tętnic. Stwierdzono także, że ich stopień mineralizacji jest mniejszy w porównaniu z tętnicami biodrowymi i wieńcowymi.

Analizy mikroobszarów wykonane przy pomocy mikroskopu skanningowego wykazały, że śródbłonek pokryty jest jedynie miejscami kryształami o kształtach słupków lub płytek. Kryształy te ułożone są niekiedy równolegle do ścian tętnic (ryc. 17). Dominują jednak kryształy i agregaty kryształów, w których poszczególne jednostki ułożone są niemal prostopadle do ścianki tętnicy. W badanym materiale kryształy obserwowane na

śródbłonku tętnic były mniejsze w porównaniu z identycznymi formami mineralizacji tętnic biodrowych i wieńcowych. Ich wielkość nie przekraczała 15  $\mu\text{m}$ , gdy np. w tętnicznych wieńcowych notowano kryształki o wielkości do 45  $\mu\text{m}$ . Obok kryształów reprezentujących fosforany wapnia obserwuje się na powierzchni śródbłonka skupienia o nieregularnych kształtach (ryc. 18). Część z tych kryształów jest wyraźnie wzbogacona w fosfor przy równocześnie niewielkich zawartościach wapnia. Formy te współwystępują niekiedy z agregatowymi koncentracjami fosforanów wapnia, których wielkość maksymalnie osiąga 100  $\mu\text{m}$ . Sporadycznie napotyka się także drobne skupienia (do 10  $\mu\text{m}$  średnicy) zbudowane z kryształków drobno-igiełkowych, w których wielkość poszczególnych jednostek przekraczała 1,5  $\mu\text{m}$ .

Analizy metodą fluorescencji rentgenowskiej wykazały, że kryształki te reprezentują także fosforany wapnia.

Analizom chemicznym przy pomocy wiązki elektronowej poddano także powierzchnię śródbłonka, na której w mikroskopie skaningowym nie obserwowano form krystalicznych. Stwierdzono, że sama powierzchnia śródbłonka wykazała co prawda niewielkie, lecz wykrywalne wzbogacenia w Ca i P.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że w badanych tętnicach występuje mineralizacja fosforanami wapnia, i to zarówno na, jak i pod śródbłonkiem.

Stwierdzono idiomorficzne kryształy pokrywające śródbłonek, złogi mineralne tworzące się również na śródbłonku oraz ziarna mineralne zlokalizowane pod śródbłonkiem.

Idiomorficzne kryształy apatytowe występowały na śródbłonku wszystkich badanych naczyń tętnicznych, a złogi fosforanowe jedynie w tętnicach biodrowych.

Ziarna mineralne obecne były w tętnicach wieńcowych i biodrowych. Nie stwierdzono obecności ziaren mineralnych w żadnej badanej tętnicy podstawy mózgu.





Ryc. 17. Kryształy krystalizujące na śródbłonku tętnicy podstawy mózgu. ♂ 52 lata. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 2100 x



Ryc. 18. Kryształy krystalizujące na śródbłonku tętnicy podstawy mózgu. ♂ 60 lat. Mikroskop skanningowy. Powiększenie 2100 x



Tętnice wieńcowe i biodrowe okazały się mocniej zmineralizowane niż tętnice podstawy mózgu.

Mechanizm tworzenia się mineralizacji fosforanowej nie jest dostatecznie poznany. Dotychczas udowodniono jednak, że pewną rolę w tym procesie odgrywają fosfolipidy błony komórkowej komórek śródbłonka (Enewer J., 1980; Shapiro I. M., 1970). Wiadomo, że czynnikiem sprzyjającym powstawaniu złogów jest witamina D. (Enstein R., Zeurolis L., 1964; Fine i in. 1968). Stwierdzono też, że wpływ na powstawanie złogów ma dieta (Maynard L. A. i in. 1958), a zwłaszcza transportowane przez osocze krwi jony P i Mg i F (Pyke R. E., 1973; Ziegler R., 1981). Rozpowszechnione są także poglądy, że proces mineralizacji naczyń krwionośnych może być związany z procesem osteoporozy kości jako potencjonalnym źródłem wapnia i fosforu (Anderson H. C., i in. 1964; Bukhirs R., Becker K. L., 1972).

Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że powstawanie zwapnień i ziaren mineralnych odbywa się z pierwotnie strąconej żelowatej uwodnionej substancji fosforanowej, która z osoczem ulega rekrystalizacji oddając wodę. Przemawia za tym znaczny stopień uwodnienia amorficznej substancji fosforanowej towarzyszącej apatytom w złogach i ziarnach. Również wielkość kryształów występujących w tych skupieniach jest znacznie mniejsza w porównaniu z apatytami kostnymi.

Proces krystalizacji substancji fosforanowej o znacznym uwodnieniu i słabo uporządkowanej strukturze atomowej prowadzi do powstawania centrów krystalizacji (Eanes E. P., i in. 1953; Geer J. i in. 1961; Kita B., Pawlikowski M., 1983; Miller A. G., Burnel J. M., 1977; Posner A. S., i in. 1977; Smith C. B., Smith D. A., 1976). Mechanizm powstawania idiomorficznych kryształów tworzących się na śródbłonku wydaje się być odmienny. Rozpoczęcie tego procesu może być powiązane z defektami struktury fosfolipidów błony komórek śródbłonka. Wymaga to jednak dalszych badań.

Zróżnicowanie morfologiczne kryształów tworzących się w naczyniach tętniczych przemawiać może za różnymi warunkami fizykochemicznymi warunkującymi ich powstawanie. Także zróżnicowany skład chemiczny ziaren mineralnych i złogów może świadczyć o odmienności tych warunków.

Dane literaturowe dostarczają informacji o próbach likwidacji mineralizacji naczyń krwionośnych. Obok pochodnych kwasu fosforowego (Fleish H., i in. 1968; 1970; Potokar M., Smith-Dunker M., 1978; Fleckenstein A., 1987) podejmowane są próby zastosowania w tym celu kalcytoniny (Robert L., i in 1977; Stachelin A., 1965, 1977; Zipkin I., i in. 1970).

### Literatura

- Alex S., Tompa W., Watabe N., 1976. Calcified arteries in gastropod. Calc. Tiss. Res., 22, 156.
- Anderson I. B., Barnett F., Nordin B. E. C., 1964. 37, 910. The relation between osteoporosis and aortic calcification. Brit. J. Pathol., 37, 910.
- Britton W. N., Stokstad E. L. R., 1970. Aorta and other soft tissue calcification in the magnesium deficient rat. J. Nat., 100, 1501.
- Bukhirs R., Becker K. L., 1972. Calcification of aorta and osteoporosis. J. Amer. Med. Ass., 219, 1307.
- Calstrom D., Engfeldt B., Engstrom A., Ringertz N., 1953. Studies on the chemical composition of normal and abnormal vessel walls. Lab. Invest., 2, 325.
- Eanes E. D., Termine J. D., Nylen M. V., 1973. An electron microscope study on the formation of amorphous calcium sulphate and its transformation to crystalline apatite. Calcif. Tiss. Res., 12, 143.
- Eistein R., Zeurolis L., 1964. Witamin D induced aortic calcification. Arch. Path., 77, 27.
- Ennever J., Vogel J. J., Riggan J. L., 1980. Calcification by proteolipid from atherosclerotic aorta. Atherosclerosis, 35, 209.
- Farmer V. C., The infrared spectra of minerals, 1974. J. Willey. London.
- Fine B. S., Berkov J. W., Fine S., 1968. Corneal calcification. Science, 162, 129.
- Fleckenstein A., 1987. Model experiments on anticalcinotic and anti-arteriosclerotic arterial protection with calcium antagonists. J. Molecular. and Cellular Cardiol. 19, 110.

- Fleisch H., Russel R. G. G., Bisaz S., Cassey P. A., Muhlbauer R., 1968. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium sulphate in vitro and in vivo. *Calcif. Tiss. Res.*, 2 suppl., 10-10 A.
- Fleisch H., Russell R. G. G., Bisaz S., Muhlbauer R., Williams D. A., 1970. The inhibitory effect of phosphates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Europ. J. Clin. Invest.*, 1, 12.
- Feisch H., Bonjour P., Trochler V., 1976. Homeostasis of inorganic Phosphate: an introductory review. *Calcif. Tiss. Res.*, suppl. to 21, 327.
- Geer J., McGill H., Strong J., 1961. The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Amer. J. Path.*, 38, 263.
- Kita B., Pawlikowski M., 1983. Badania mineralogiczne kości udowej człowieka w aspekcie procesu starzenia. *Chir. Narz. Ruchu Ortop. Pol.*, 48.
- Maynard L. A., Bogga D., Fiak G., 1958. Dietary mineral interrelations as a cause of soft tissue calcification in guinea pigs. *J. Nat.*, 64, 25.
- McConnell D., 1973. Apatite. Ist crystal chemistry, mineralogy, utilization and geologic and biologic occurrences. Springer Verlag. Wien, New York.
- Miller A. G., Burnell J. M., 1977. The effect of crystal size distributions on the crystallinity analysis of bone mineral. *Calcif. Tiss. Res.*, 24, 113.
- Mitchell J. R. A., Adams J. H., 1977. Aortic size and calcification. *Atherosclerosis*, 27, 437.
- Molnar Z., Development of the parietal bone of young mice. I. Crystals of bone mineral on the frozen-dried preparations, 1959. *J. Ultrastruc. Res.*, 21, 75.
- Peagle R.,: Ultrastructure of calcium deposits in atherosclerotic human aortas, 1969. *J. Ultrastruc. Res.*, 26, 412.
- Posner A. S., Betts F., Blumenthal N. C., 1977. Role of ATP and Mg in the stabilization of biological and synthetic amorphous sulphate. *Calcif. tiss. Res.*, suppl. to 22, 20.

- Potokar M., Smidt-Dunker M., 1978. The inhibitory effect on new diphosphonic acid on aortic and kidney calcification in vivo. *Atherosclerosis*, 30, 313.
- Pyke R. E., 1973. Relationship of calcium, phosphorus, magnesium and fluoride in hard and soft tissue calcification. In: *Biological mineralization* Zipkin. I ed. New York. J. Willey and sons.
- Robert L., Breichmeir D., Godeau A., Labat L. M., Milhaud G., 1977. Prevention of experimental immuno-arteriosclerosis by calcitonin. *Biochem. Pharmacol.*, 26, 2129.
- Shapiro J. M., 1970. The association of phospholipides with anorganic bone. *Calcif. Tiss. Res.*, 5, 13.
- Smith C. B., Smith D. A., 1976. An X-ray diffraction investigation of age related changes in the crystal structure of bone apatite. *Calcif. Tiss. Res.*, 22, 219.
- Spektor M., Krokowsky E., Sax M., Plether J., 1969. Atherosclerotic plaque: x-ray investigation. *Science*, 165, 711.
- Stachelin A., 1977. Zur Behandlungsmöglichkeit der Arteriellen Durchblutungsstörungen mit Calcitonin. *Schweiz. Med. Wochr.*, 107, 1865.
- Stachelin A., 1977. Beobachtungen über die verträglichkeit und Dosierung von Calcitonin und über seine Wirkung auf die Arteriellen Durchblutungsstörungen. *Praxis*, 19, 580.
- Ury D. W., Hendrix C. F., Long. M. M., 1976. Calcification of  $\alpha$  - elastin coacerates. A bulk property of elastin. *Calcif. Tiss. Res.*, 22, 2.
- Ziegler R., 1981. Zastosowanie kalcytoniny w lecznictwie. *Sandoz Revue*, 2, 33.
- Zipkin I., Lucas S. M., Lavender H. M., Fulmer H. M., Schiffmann E., Corcoran B. A., 1970. Fluoride and calcification of rat aorta. *Calcif. tiss. Res.*, 6, 193.

Минералогическо-химическая характеристика фосфатной минерализации избранных артериальных сосудов человека

Резюме

Исследования проводились на отрезках артериальных сосудов, отбор которых производился во время вскрытия трупа. Исследовались 23 останка обоих полов в возрасте 45-87 лет, у которых обнаружены клинические последствия склероза. Отрезки сосудов длиной около 2,5 см были отобраны из левых бедренной и веночной артерий, а также из левой артерии основания мозга.

Целью работы было определить химический и минеральный составы, а также присутствие неорганических отложений в этих артериях. Исследования проводились при помощи: сканнигового микроскопа, электронного микрозонда, рентгеновского дифрактометра, а также с применением метода инфракрасной спектроскопии.

Исследователи констатируют, что минералы отложенные в артериях принадлежат к группе фосфатов кальция со структурой велькерита с участием небольшого количества фосфатной субстанции со слабо упорядоченной атомной структурой. С ними выступает второстепенное количество органических соединений.

В минеральных отложениях обнаружено присутствие группы  $\text{CO}_3^{2-}$ , а также серы. Минеральные отложения находятся или на эндотелии артерии в виде идиоморфичных кристаллов и затверделостей, или под эндотелием сосудов в виде минерального

зерна. Размещение минеральных отложений в исследуемых отрезках артерий – нерегулярное. В бедренных и веночных артериях минерализация больше чем в артерии основания мозга. В бедренных и веночных артериях минерализация выступает на и под эндотелием, а в артерии основания мозга лишь только на эндотелии сосуда.

MINERALOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTIC OF PHOSPHATE  
MINERALISATION OF SAME ARTERIES OF MAN

Summary

The studies were carried out on the arteries obtained from bodies of peoples (23 persons) representing both sexes, who died in the ages 45 to 87 years. The consequences of sclerosis of these peoples were earlier recognized clinically.

The 2,5 cm long segments of: hip, coronary and brain-base arteries were examined using ERD, XRD, IR spectroscopy, SEM and chemical methods. The aim of the investigation was mineralogical and chemical identification of substances crystallising in the arteries.

The studies revealed that mineralisation contains two different mineral substances i.e. crystalline and noncrystalline ones. The crystalline substance is hydroxyapatite containing  $\text{CO}_3^{2-}$  groups. The noncrystalline phosphate substance has not fixed mineral and chemical composition.

The calcification was observed on and beneath the intima. The calcification present on intima is represented by crystals of apatite as well as by phosphate deposits showing sometime lamination. The mineralisation beneath the intima was noticed as grains. Each of these three types of artery mineralization is hazardous but hip and coronary arteries were, in analyzed samples, stronger mineralized than brain-base arteries. The calcification of hip and coronary arteries was present on and beneath the intima, whereas brain-base arteries were mineralized mainly on the intima.