

Mineralization of human carotids

Mineralizacja tętnic szyjnych człowieka

Agnieszka Bieniek¹, Roman Pfitzner², Maciej Pawlikowski¹

¹Department of Mineralogy, Petrography and Geochemistry, AGH-University of Science and Technology, Cracow, Poland

(Zakład Mineralogii, Petrografii i Geochemii Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie)

²Department of Cardiovascular Surgery and Transplantology, Jagiellonian University John Paul II Hospital, Cracow, Poland

(Klinika Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii, Instytut Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

Abstract

Background. Mineralization is a chemical process that supervenes on specific environmental conditions. Conditions in tissues of the human body foster the creation of different sorts of crystalline phases. The aim of this research was to indicate the mineral composition of carotid sclerosis lodgement in a group of patients in which critical narrowing of carotids reducing blood vessel lumen by 75–80% was diagnosed.

Material and methods. The material for the research was retrieved from 43–71-year-old patients, 6 women (average age: 67 years) and 20 men (average age: 61.3 years). All of them had atheromatosis. The patients were qualified to operation of thromboendarterectomy methodology. In 13 of 26 samples mineral grains were observed. The examination was conducted with a Scanning Microscope (SEM) coupled with an Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), X-ray Diffraction Analysis (XRD), and Infrared Absorption Spectroscopy (IR).

Results. Mineral grains were observed in 13 of 26 samples. Scanning microscope observations allowed us to ascertain that the mineralization of carotids manifest itself in the form of mineral-organic agglomerations. Chemical analyses that were carried out in the EDS system proved the existence of calcium and phosphate in sclerosis lodgement. X-ray diffraction analysis also proved that the sclerosis lodgement contained phosphates represented by hydroxyapatite and fluoroapatite. Spectra obtained from examinations of samples carried out by infrared absorption spectroscopy indicated PO_4^{3-} group existence, organic material, and hydroxyl groups. Organic material from the examined samples is represented by phospholipids and cholesterol. The performed analyses prove that wide waves coming from hydroxyl complexes can originate from OH⁻ ions as well as from H₂O particles.

Conclusions. The inorganic phase of the sclerosis lodgement is composed of calcium phosphate, while the organic phase is composed mainly of cholesterol. Research suggests that both organic and inorganic mineralization is created primarily at locations of biological structure damage. Patients with critical structures, who necessitate surgical treatment, are dominated by “soft” and fibrous atherosclerotic plaques with low content of non-organic mineralization.

Key words: atheromatosis, mineralization, carotid, calcium phosphate

Streszczenie

Wstęp. Mineralizacja jest procesem chemicznym zachodzącym w określonych warunkach środowiskowych. Warunki panujące w tkankach organizmu człowieka sprzyjają tworzeniu się różnego rodzaju faz krystalicznych.

Address for correspondence:

mgr inż. Agnieszka Bieniek
Zakład Mineralogii, Petrografii i Geochemii
Akademia Górniczo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30, 30–059 Kraków
tel.: (+48 12) 617 23 73, fax: (+48 12) 633 43 30
e-mail: bieniek@geol.agh.edu.pl

Celem pracy było określenie składu mineralnego złogów miażdżycowych tętnic szyjnych w grupie pacjentów, u których rozpoznano krytyczne zwężenia tętnic szyjnych, redukujących światło w naczyniach krwionośnych nawet o 75–80%.

Materiał i metody. Materiał do badań został pobrany od 26 pacjentów w wieku 43–71 lat — 6 kobiet (śr. wieku — 67 lat) i 20 mężczyzn (śr. wieku — 61,3 roku) podczas operacji metodą trombandarteriektomii przez wycisowanie. Badaniom poddano ziarna mineralne wyseparowane z próbek. Wykonano analizy metodą mikroskopii skaningowej (SEM) wraz z mikroanalizą EDS, rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej (XRD) oraz spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (IR).

Wyniki. Ziarna mineralne zaobserwowano w 13 na 26 próbek. Obserwacje w SEM pozwoliły stwierdzić, że mineralizacja tętnic przejawia się w formie skupień mineralno-organicznych. Analiza chemiczna EDS wykazała zwiększone stężenie wapnia i fosforu, a XRD potwierdziła obecność fosforanów wapnia, reprezentowanych głównie przez hydroksyapatyt i fluorapatyt. Widma otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań metodą IR wskazują także na występowanie w próbkach grupy PO₄³⁻, materii organicznej oraz ugrupowań wodorotlenowych. Materia organiczna w próbkach jest reprezentowana przez fosfolipidy oraz cholesterol. Wykonane analizy dowodzą, że szerokie pasma pochodzące od kompleksów wodorotlenowych mogą pochodzić zarówno od jonu OH⁻, jak i od cząsteczki H₂O.

Wnioski. Fazę nieorganiczną złogów miażdżycowych tętnic szyjnych stanowią głównie fosforany wapnia, natomiast organiczną — przede wszystkim cholesterol. W badaniach sugeruje się, że mineralizacja powstaje głównie w miejscach uszkodzenia struktur biologicznych. U chorych z krytycznymi zwężeniami, wymagającymi leczenia operacyjnego, dominują „miękkie”, włókniste blaszki miażdżycowe o stosunkowo małej zawartości mineralizacji nieorganicznej.

Słowa kluczowe: miażdżycyca, mineralizacja, tętnice szyjne, fosforany wapnia

Acta Angiol 2012; 18, 1: 23–34

Background

Mineralization is a chemical process that supervenes on specific environmental conditions, which include, among others, temperature, pH, and concentration of the substance participating in the reactions [1]. Conditions in the tissues of the human body foster the creation of different sorts of crystalline phases. Similarly, in environments like seawater or lake water, volcanic magma, or the atmosphere, as well as in the human body, crystals are formed. In favour of this phenomena are constant temperature and specific chemical conditions [2].

Substances that crystallize in the human body can be generally divided into two groups:

- essential substances, without which the organism cannot function. These are crystallizing substances in bones and teeth;
- substances that have a negative influence on the human body. These are substances crystallizing in pathological states or those that are formed during the body's aging process.

The circulatory system is a basic net of transport in an organism. All disorders in the functioning of this system or its elements lead to deterioration in the functioning of the whole body. The main factor deteriorating the function of the circulatory system is its mineralization,

Wstęp

Mineralizacja jest procesem chemicznym zachodzącym w określonych, sprzyjających warunkach środowiskowych, obejmujących między innymi: temperaturę, pH, stężenie substancji uczestniczących w reakcjach [1]. Warunki panujące w tkankach organizmu człowieka sprzyjają tworzeniu się różnego rodzaju faz krystalicznych. Podobnie jak w innych środowiskach, takich jak woda morska lub jeziorna, magma wulkaniczna czy atmosfera, w tkankach organizmu ludzkiego powstają kryształy. Zjawisku temu sprzyja stała temperatura organizmu oraz panujące tu warunki chemiczne [2].

Krystalizujące w organizmie człowieka substancje mineralne można ogólnie podzielić na dwie grupy:

- substancje niezbędne, bez których organizm nie może sprawnie funkcjonować. Są to substancje krystalizujące w kościach i zębach;
- substancje niekorzystnie wpływające na ludzki organizm. Są to substancje krystalizujące w stanach patologicznych oraz tworzą się w czasie starzenia się organizmu.

Układ krwionośny stanowi podstawową sieć transportową organizmu. Wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu tego układu lub jego elementów prowadzą do

which develops along with aging and is called calcification [3].

The basic pathomorphological changes in sclerosis are sclerotic lamina (plaques) on the internal artery membrane. [4]. Atheromatous plaques, on which base mineral lodgement develops, cause stenosis or can lead to closure of an artery by thrombus. Mineralization develops mainly within imperforate segments of arteries. In segments, where the velocity and the volume of the blood changes, atheromatous changes cumulate most commonly. Examples of this are sites of artery ramification. In the case of carotids, mainly places of ramification of common carotid artery to internal and external carotid.

Damage to vessel walls and the formation of atheromatous plaques bring about perfect conditions for mineralization development. Moreover, inflammatory states, electrolytic disorders, and genetic factors are favourable to this process [1, 5, 6].

Stenosis and occlusion of the carotid artery are crucial reasons for central nervous system ischaemia. Sclerosis is, in 90% of cases, the reason for stenosis and occlusion of the internal carotid artery. Atheromatous plaques are usually placed at ramifications of common carotid artery and at initial segments of external and internal carotid arteries [6–9].

Reduction of the blood flow through any of carotid arteries can cause partial cerebral ischaemia by this carotid. The same result is observed after avulsion of thrombus from atheromatous plaques and their transmission with blood flow to the brain [6].

The aim of this research was to indicate the mineral composition of carotid sclerosis lodgement in a group of patients in which critical narrowing of carotids reducing blood vessel lumen by 75–80% was diagnosed.

Material and methods

The material for the research was gathered from a group of 43–71-year-old patients, 6 women (average age: 67 years) and 20 men (average age: 61.3 years). All of them had atheromatosis. In all of the patients critical narrowing of the carotids was recognized. The narrowing reduced blood vessel lumen by 75–80%. The patients were qualified to operation of thromboendarterectomy methodology. Mineral-organic sclerosis lodgement removed during surgery was kept in formalin (Figure 1–4). In 13 of 26 samples mineral grains were observed. From the received material, crystals were separated (with a scalpel and tweezers) and then dried. The grains were not bigger than 3 mm. Consequently, examination with polarization microscope was rejected. The examination was only conducted with a Scanning Microscope coupled with an Energy Dispersive Spec-

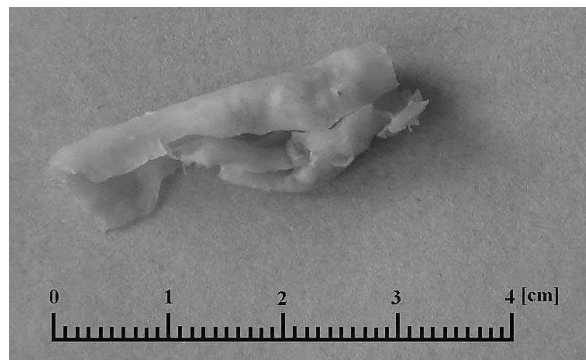


Figure 1. Sclerosis lodgement removed from carotid. A 63-year-old woman

Rycina 1. Złóg miażdżycowy usunięty z tętnicy szyjnej. Kobieta 63 lata

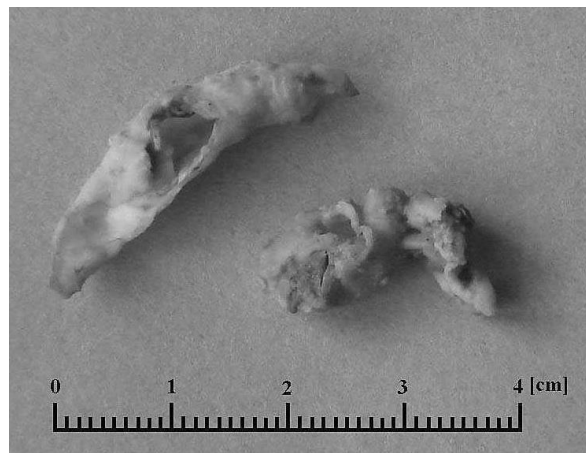


Figure 2. Sclerosis lodgement removed from carotid. A 65-year-old woman

Rycina 2. Złóg miażdżycowy usunięty z tętnicy szyjnej. Kobieta 65 lat

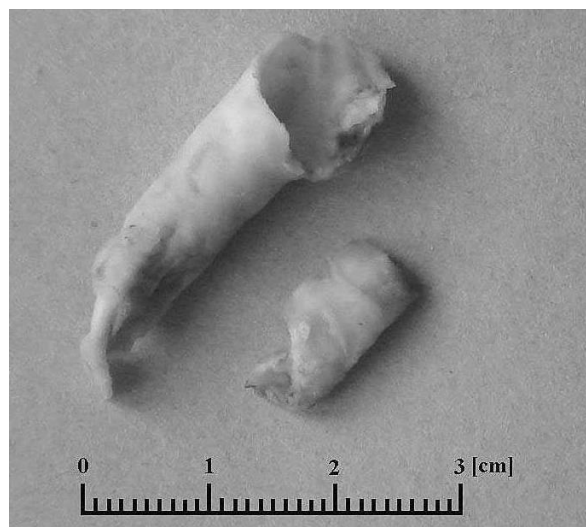


Figure 3. Sclerosis lodgement removed from carotid. A 62-year-old man

Rycina 3. Złóg miażdżycowy usunięty z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 62 lata

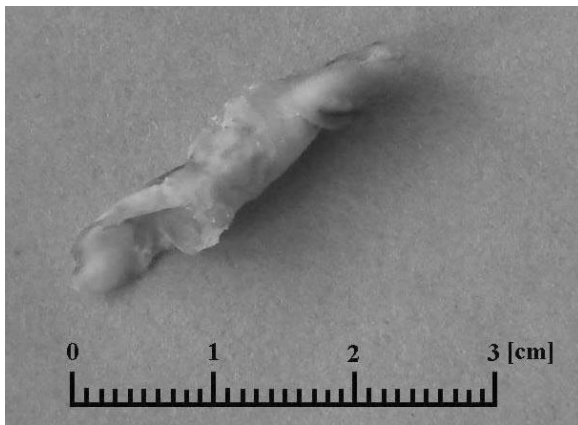


Figure 4. Sclerosis lodgement removed from carotid. A 66-year-old man

Rycina 4. Złóg miażdżycowy usunięty z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 66 lat

troscope (EDS), X-ray Diffraction Analysis (XRD), and Infrared Absorption Spectroscopy (IR).

The method of Electron Scanning Microscopy was used for the observation of the morphological surface of the sclerosis lodgement. The observation was carried out on 10 separated samples. Because of the poor electric conductivity of the examined material, the examples were sputtered with carbon in a vacuum. As well as the micro-pictures that were taken to observe this phenomena, qualitative chemical analysis of samples in the EDS system was also carried out. In the EDS spectrum diagrams C peaks might have increased intensity because of the prior sputtering of the samples. The large depth of focus of the scanning microscope enabled observation the morphology of the examined samples. In the study a scanning microscope FEI, QUANTA 200 FEG model, was used.

X-ray Diffraction analysis is a phase method, which allows the identification of minerals. It is especially helpful in identifying microcrystalline substances [1]. This method was used for 4 samples. The size of the rest of the samples was too small to conduct XRD examinations. The optimal size of crystallite at x-ray analysis should be in the order of $1 \mu\text{m}$ magnitude. That is why the minerals were ground first. Radiographic examinations were conducted using and X-ray diffractometer APD X'PERT PW 3020 (Phillips), which was equipped with a reflective graphite monochromator. Characteristic $\text{CuK}\alpha$ radiation, step registration (1 step = 0.05Θ), and counting time (1 step = 1 s) were applied. Values of inter-surface distances allowed the identification of mineral phases in samples.

Infrared Absorption Spectroscopy is used to identify different types of substances, including minerals. By

pogorszenia funkcjonowania całego organizmu. Ważnym czynnikiem powodującym pogorszenie funkcjonowania układu krwionośnego jest jego mineralizacja, rozwijająca się z wiekiem, nazywana zwapnieniem [3].

Podstawową zmianą patomorfologiczną w miażdżycy są blaszki (płytki) miażdżycowe w błonie wewnętrznej tętnic [4]. Płytki miażdżycowe, na podłożu których rozwijają się złogi mineralne, powodują zwężenia tętnicy, a nawet mogą prowadzić do zamknięcia tętnicy przez skrzeplinę. Mineralizacja rozwija się głównie w obrębie zwężonych i niedrożnych odcinków tętnic. W miejscach, gdzie dochodzi do zmiany prędkości i objętości przepływu krwi, najczęściej gromadzą się zmiany miażdżycowe. Przykładem są miejsca rozgałęzień tętnic, a w przypadku tętnic szyjnych najczęściej powstają one w miejscu rozwidlenia tętnicy szyjnej wspólnej na tętnice szyjne wewnętrzzną i zewnętrzną. Uszkodzenie ściany naczynia oraz tworzenie się płytek miażdżycowych stwarza doskonałe warunki do rozwoju mineralizacji. Ponadto sprzyjają temu stany zapalne, zaburzenia elektrolitowe, czynniki genetyczne [1, 5, 6].

Zwężenie i niedrożność tętnic szyjnych są ważną przyczyną niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Miażdżycy jest powodem 90% zwężeń i niedrożności tętnicy szyjnej wewnętrznej. Blaszki miażdżycowe umiejscowione są zwykle w rozwidleniach tętnicy szyjnej wspólnej i początkowych odcinkach tętnic szyjnych wewnętrznej i zewnętrznej [6–9].

Zmniejszenie przepływu krwi przez którąkolwiek z tętnic szyjnych może spowodować niedokrwienie fragmentu mózgu zaopatrywanego przez te tętnice i udar. Podobne bywają następstwa oderwania się skrzepliny od blaszki miażdżycowej i przeniesienie jej z prądem krwi do mózgu [6].

Celem niniejszej pracy było określenie składu mineralnego złogów miażdżycowych tętnic szyjnych w grupie pacjentów, u których rozpoznano krytyczne zwężenia tętnic szyjnych, redukujących światło w naczyniach krwionośnych nawet w 75–80%.

Materiał i metody

Materiał do badań został pobrany od 26 pacjentów w wieku 43–71 lat — 6 kobiet (śr. wieku — 67 lat) i 20 mężczyzn (śr. wieku — 61,3 roku) chorujących na miażdżycę. U 6 pacjentów rozpoznano krytyczne objawowe (TIA) zwężenia tętnic szyjnych, które w 75–80% zredukowały światło w naczyniach krwionośnych. Rozpoznanie krytycznych zwężeń tętnic szyjnych wewnętrznych ustalono na podstawie badań ultrasonograficznych oraz angiotomografii komputerowej. Chorzy zostali poddani leczeniu operacyjnemu metodą trombendarteriekтомii przez wycisowanie. Usunięte chirurgicznie

means of this, the atomic structure of the examined phases can be recognized [1, 10]. Infrared Absorption Spectroscopy examination consists of the measurement of infrared light wave absorption by the ground sample and the sample mixed with KBr, and the measurement of clear KBr preparation. Both materials were formed in tablet shape. IR method was used for 10 samples. In order to more accurately identify the hydroxyl groups one of the samples was prepared by IR method in two ways. The first of the tablets was prepared by direct grinding of the sample with KBr, while the second one was made from a sample that was dried in 140°C within 3 hours and then ground with KBr. In this way hydration water was removed from the sample. To conduct these analyses Infrared Fourier Spectroscopy (BIO-RAD production, FTS 165 model) was employed.

Results

Mineral grains were observed in 13 of 26 samples. Scanning microscope observation allowed us to deduce that mineralization of carotids manifests in the form of mineral-organic agglomerations. At the site of inorganic formations, identified as calcium phosphate, no distinct crystalline formations are observed (Figure 5). Objects of this kind appear in lumpy form (Figure 6) and very rarely in plate form (Figure 7). Organic mineralization is observed as mixed forms along with inorganic mineralization. Both elements stay in an unstable ratio. In some samples, organic formations exist as characteristic needle agglomerations (Figure 8). Chemical analyses that were carried out in the EDS system proved the existence of calcium and phosphate in sclerosis lodgement (Figures 9–14). In some energetic spectra of the examined samples, some vestigial quantities of other elements were also revealed (sodium, magnesium, sulphur).

X-ray diffraction analysis indicate on the presence of apatite in the examined material. The inter-plane distances marked at the diffraction graphs (Figures 15 and 16) are characteristic for two mineral phases: hydroxyapatite and fluorapatite. All X-ray photographs have peaks the height and width of which indicate the poor grade of internal structure arrangement of the identified mineral phases.

Spectra received from IR method in examined samples indicate PO_4^{3-} groups, organic material, and hydroxyl groups (Figures 17–19). The most intensive absorbing bands come from the phosphate group and their maxima vary between 1035 and 1040 cm^{-1} . The bands at 471.468–962.6 cm^{-1} also give evidence of PO_4^{3-} presence. The organic material in the examined samples is represented by phospholipids and cholesterol. The peaks at 1235.76–1508.7 cm^{-1} and 2861.12–2931.85 cm^{-1} absorbing lines

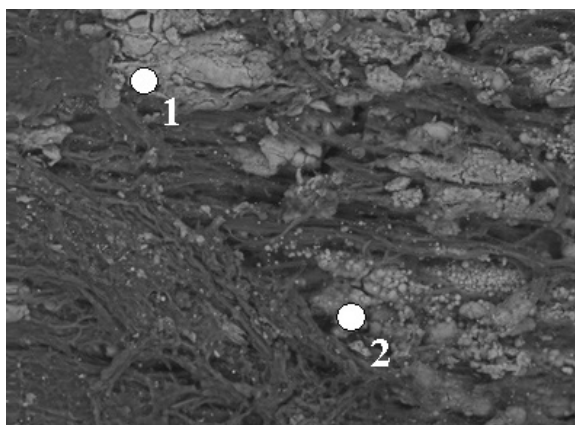


Figure 5. Mineralization of a carotid. A 66-year-old man. SEM, 1000 × zoom. Points 1 and 2 indicate the places where EDS analysis was carried out

Rycina 5. Mineralizacja tętnicy szyjnej. Mężczyzna 66 lat. SEM, powiększenie × 1000. Punkt 1 i 2 oznaczają miejsca wykonania analizy EDS



Figure 6. Mineralization of a carotid. A 67-year-old woman. SEM, 400 × zoom. Point 1 indicates the place where EDS analysis was carried out

Rycina 6. Mineralizacja tętnicy szyjnej. Kobieta 67 lat. SEM, powiększenie × 400. Punkt 1 oznacza miejsce wykonania analizy EDS

złogi miażdżycowe, mineralno-organiczne, przechowywane były w formalinie (ryc. 1–4). W 13 z 26 próbek zaobserwowano ziarna mineralne. Z uzyskanego materiału wyseparowano kryształki za pomocą skalpela i pincety, a następnie wysuszono. Uzyskane ziarna mineralne miały wielkość do 3 mm. Z tego powodu zrezygnowano z badań za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego. Wykonano badania metodą mikroskopii skaningowej (SEM) z mikroanalizą EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*), rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej (XRD) oraz spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (IR).

Metodę skaningowej mikroskopii elektronowej wykorzystano do obserwacji powierzchni morfologicznej złogów miażdżycowych. Obserwacjom poddano wyse-

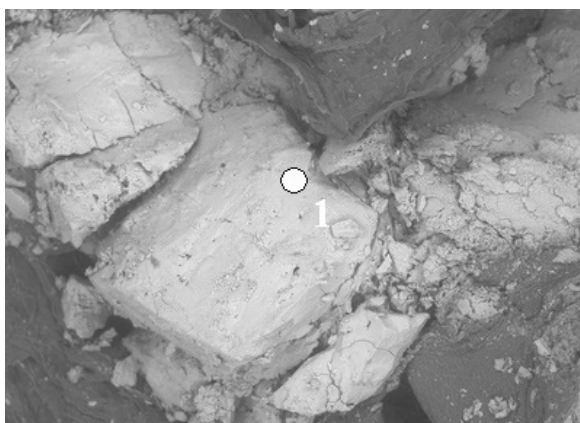


Figure 7. Mineralization of a carotid. A 62-year-old man. SEM, 220 × zoom. Point 1 indicates the place where EDS analysis was carried out

Rycina 7. Mineralizacja tętnicy szyjnej. Mężczyzna 62 lata. SEM, powiększenie × 220. Punkt 1 oznacza miejsce wykonania analizy EDS

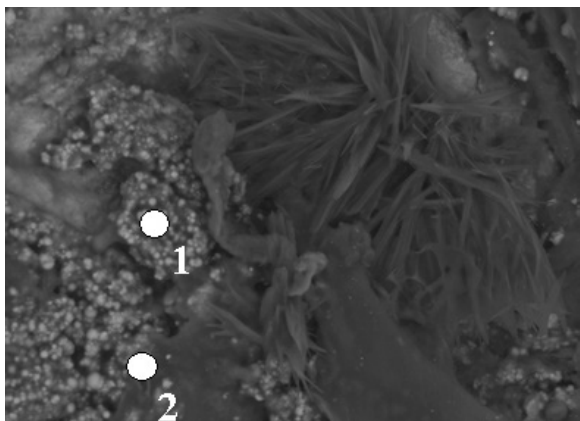


Figure 8. Mineralization of a carotid. A 63-year-old man. SEM, 2000 × zoom. Points 1 and 2 indicate the places where EDS analysis was carried out

Rycina 8. Mineralizacja tętnicy szyjnej. Mężczyzna 63 lata. SEM, powiększenie × 2000. Punkt 1 i 2 oznaczają miejsca wykonania analizy EDS

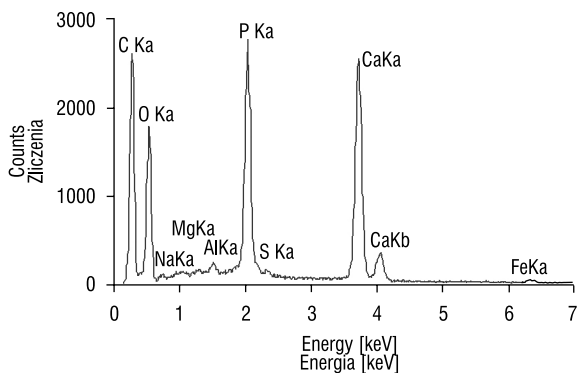


Figure 9. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 5 (point 1). A 66-year-old man

Rycina 9. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 5 (punkt 1). Mężczyzna 66 lat

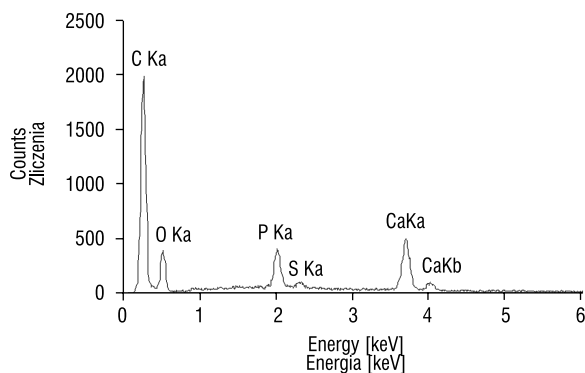


Figure 10. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 5 (point 2). A 66-year-old man

Rycina 10. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 5 (punkt 2). Mężczyzna 66 lat

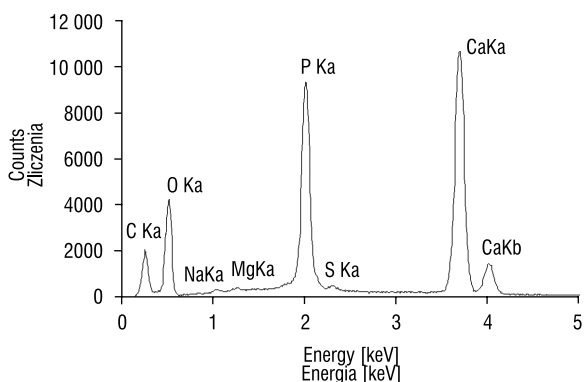


Figure 11. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 6 (point 1). A 67-year-old woman

Rycina 11. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 6 (punkt 1). Kobieta 67 lat

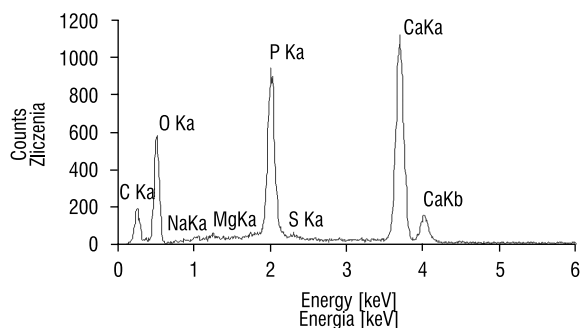


Figure 12. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 7 (point 1). A 62-year-old man

Rycina 12. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 7 (punkt 1). Mężczyzna 62 lata

parowane ziarna mineralne z 10 próbek. Ze względu na złe przewodzenie elektryczne badanego materiału próbki napyłono w próżni węglem. Oprócz mikrofotografii, za pomocą których dokumentowano obserwowane

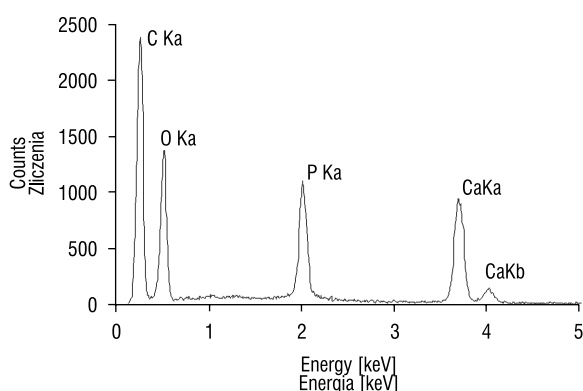


Figure 13. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 8 (point 1). A 63-year-old man

Rycina 13. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 8 (punkt 1). Mężczyzna 63 lata

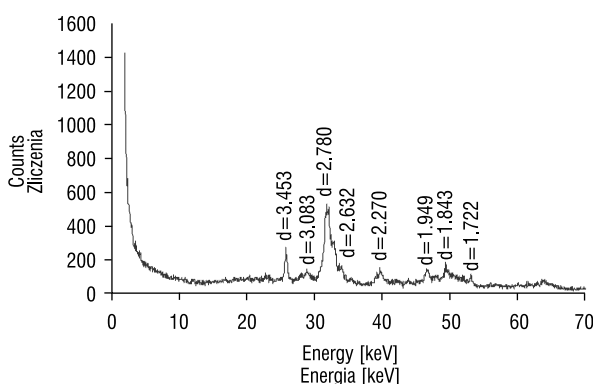


Figure 15. X-ray diffraction graph of mineral grains of the sclerosis lodgement removed from a carotid. A 62-year-old man

Rycina 15. Dyfraktogram rentgenowski ziaren mineralnych złoży miazdżycowego usuniętego z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 62 lata

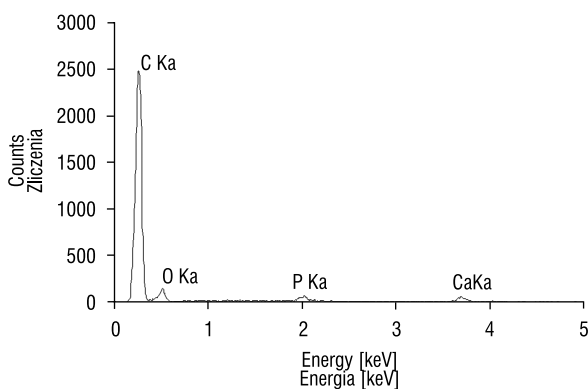


Figure 14. Energetic EDS spectrum of the area marked in Figure 8 (point 2). A 63-year-old man

Rycina 14. Widmo energetyczne EDS obszaru zaznaczonego na rycinie 8 (punkt 2). Mężczyzna 63 lata

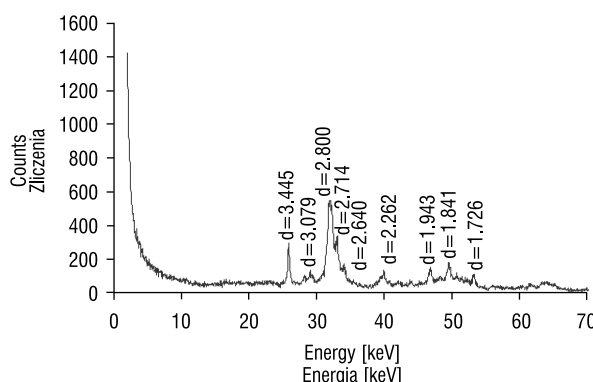


Figure 16. X-ray diffraction graph of mineral grains of the sclerosis lodgement removed from a carotid. A 66-year-old man

Rycina 16. Dyfraktogram rentgenowski ziaren mineralnych złoży miazdżycowego usuniętego z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 66 lat

indicate organic formation presence whereas the bands at $1652.53\text{--}1658.16\text{ cm}^{-1}$ and $3357.88\text{--}3418.21\text{ cm}^{-1}$ show saturation of the sample. The peaks of the absorbing lines at $3357.88\text{--}3418.21\text{ cm}^{-1}$ are very large bands and are due to both water and hydroxyl groups. Infrared spectrophotometric analysis before drying (Figure 17) and after drying (Figure 18) confirm the fact that absorbing bands that come from hydroxyl groups can indicate both the presence of OH-groups and water absorbed superficially. During the observation of spectroscopic spectra of the samples, the movement of a wide band, originating from the water in a dried sample, in the direction of lower wave numbers was noticed. This information can indicate stronger chemical bonding in the sample before drying.

Discussion

Mineralization in a living body is a process that leads to the enlargement or saturation of some structures in

zjawiska, wykonano także jakościowe analizy chemiczne próbek w systemie EDS. Na wykresach widm EDS piki C mogą być o podwyższonej intensywności ze względu na wcześniejsze napylenie preparatów węglem. Duża głębia ostrości mikroskopu skaningowego umożliwiła obserwację morfologii badanych próbek. W badaniach posłużono się mikroskopem skaningowym firmy FEI, model QUANTA 200 FEG.

Rentgenowska analiza dyfrakcyjna jest metodą fazową pozwalającą identyfikować minerały. Okazuje się szczególnie przydatna dla substancji bardzo drobnokrystalicznych [1]. Tą metodą poddano badaniom 4 próbki (pozostałe były zbyt małe). Ponieważ optymalna wielkość kryształitów w analizie rentgenograficznej powinna być rzędu $1\ \mu\text{m}$, ziarna uprzednio rozdrobniono. Badania rentgenograficzne przeprowadzono, wykorzystując dyfraktometr rentgenowski APD X'PERT PW 3020 firmy Phillips wyposażony w monochromator refleksyjny gra-

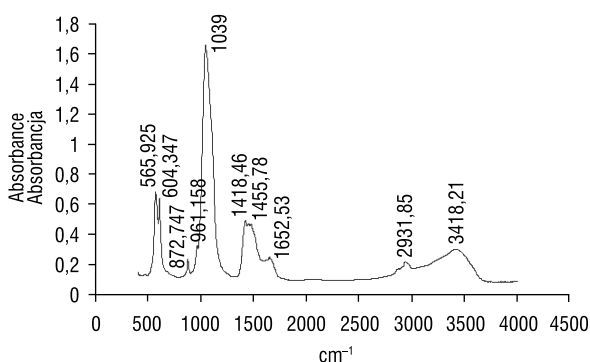


Figure 17. Infrared spectrophotometric spectrum of mineral grains in sclerosis lodgement removed from carotid. A 60-year-old man (sample before drying at 140°C)

Rycina 17. Widmo spektroskopowe w podczerwieni ziaren mineralnych złogu miażdżycowego usuniętego z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 60 lat (próbka przed wysuszeniem w temp. 140°C)

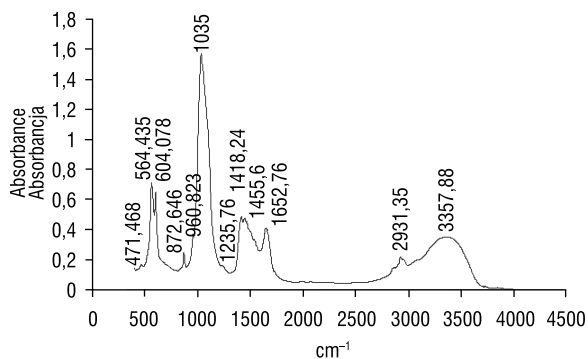


Figure 18. Infrared spectrophotometric spectrum of mineral grains in sclerosis lodgement removed from carotid. A 60-year-old man. (sample after drying at 140°C)

Rycina 18. Widmo spektroskopowe w podczerwieni ziaren mineralnych złogu miażdżycowego usuniętego z tętnicy szyjnej. Mężczyzna 60 lat (próbka po wysuszeniu w temp. 140°C).

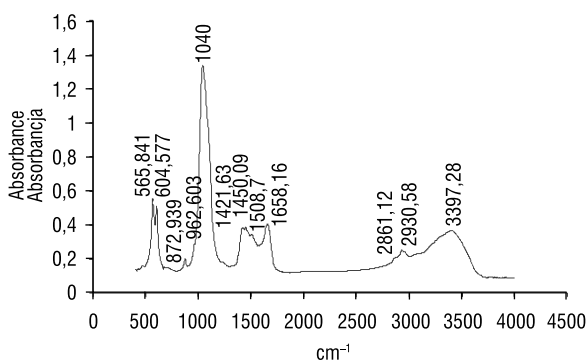


Figure 19. Infrared spectrophotometric spectrum of mineral grains in sclerosis lodgement removed from carotid. A 65-year-old woman

Rycina 19. Widmo spektroskopowe w podczerwieni ziaren mineralnych złogu miażdżycowego usuniętego z tętnicy szyjnej. Kobieta 65 lat

fitowy. Zastosowano promieniowanie charakterystyczne $\text{CuK}\alpha$, rejestrację krokową: krok = 0,05 Θ , czas zliczania na 1 krok = 1 s. Otrzymane z rentgenogramów wartości odległości międzypłaszczyznowych pozwoliły na identyfikację faz mineralnych występujących w próbkach.

Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni służy do identyfikacji różnego typu substancji, w tym także minerałów. Za jej pomocą rozpoznaje się strukturę atomową badanych faz [1, 10]. Badanie metodą spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni polegało na pomiarze absorpcji fal światła podczerwonego przez próbkę utartą i zmieszaną z KBr oraz preparatu czystego KBr. Oba materiały formowane były w postaci pastylek. Metodą IR przebadano 10 próbek. W celu dokładniejszej identyfikacji ugrupowań wodorotlenowych jedną z próbek przygotowano na dwa sposoby. Jedną z pastylek wykonano przez bezpośrednie utarcie próbki z KBr, natomiast druga pastylka powstała z próbki, którą uprzednio suszono w temperaturze 140°C przez 3 godziny, a kolejno utarło z KBr. W ten sposób z próbki została usunięta woda hydratacyjna. W celu przeprowadzenia analiz posłużono się spektrometrem fourierowskim w podczerwieni, produkcji BIO-RAD, model FTS 165.

Wyniki

Ziarna mineralne zostały zaobserwowane jedynie w 13 preparatach. Wielkość największych z nich osiągała 3 mm. Z obserwacji prowadzonych przy pomocy mikroskopu skaningowego wynika, że mineralizacja tętnic szyjnych przejawia się w formie skupień mineralno-organicznych. W formacjach nieorganicznych, zidentyfikowanych jako fosforany wapnia, nie zaobserwowano wyraźnych form krystalicznych (ryc. 5). Obiekty te występowały w formach gruzełkowatych (ryc. 6), bardzo rzadko w formach tabliczkowych (ryc. 7). Mineralizację organiczną obserwuje się jako formy mieszane z mineralizacją nieorganiczną. Oba składniki pozostają w zmiennych wzajemnych proporcjach ilościowych. W niektórych próbkach formacje organiczne tworzą charakterystyczne skupienia igiełkowe (ryc. 8). Wykonane analizy chemiczne próbek w systemie EDS wykazały obecność wapnia i fosforu w złogach miażdżycowych (ryc. 9–14). W niektórych widmach energetycznych badanych próbek pojawiają się również w śladowych ilościach inne pierwiastki: sód, magnez i siarka.

Rentgenowska analiza dyfrakcyjna wskazuje na obecność apatytów w badanym materiale. Odległości międzypłaszczyznowe zaznaczone na dyfraktogramach (ryc. 15 i 16) są charakterystyczne dla dwóch faz mineralnych: hydroksyapatytu oraz fluorapatytu. Wszystkie rentgenogramy mają piki, których wysokość i szerokość wskazują

minerals. Living organisms bring about perfect conditions for crystallizing different sorts of organic and inorganic compounds. Many factors have an influence on this process, for example pH, oxidation-reduction potential (ORP), temperature, and hydrogen ion concentration [1, 11]. Minerals created in a natural way by biological tissues are the source of elements for an organism. They contain mainly phosphorus and calcium, but also small amounts of other elements: magnesium, strontium, barium, fluorine, chlorine, lead, zinc, iron, and others. The basic mineral mass of the human body consists of tricalcium phosphate, especially bioapatites. That is why the metabolism of calcium and phosphorus play the main role in mineralization processes, especially since the amount of other elements taking part in these processes is very small. In the mineral structure of bioapatite, as well as Ca and P, also Na, K, Pb, Sr, Ra, Cu, Mn, Fe and other cations can be found, and they can be built into a particle in small quantities. At the same time, phosphate residue can be replaced by $C_6H_5O_3^{3-}$ -sodium citrate anion, CO_3^{2-} -carbonate anion, etc., and OH^- by F^- . Therefore, the general notation of bioapatite chemical construction can be presented in the following way: $(Ca, Na, Sr, Pb, K)_5(PO_4, CO_3, HPO_4)_3OH, F, Cl$ [1, 11].

The collagen of damaged structures is regarded as the main factor that initiates the crystallization of mineral grains of apatite in an organism and is a part of the composition of cartilage and connective tissue. In the 1930s, research regarding collagen protein structure had begun and corroborated that collagen can have a partially mineral structure. Long-term research proved that collagen largely initiates connecting phosphorus and calcium ions into crystallites. Nucleation of apatite microcrystals is brought about, most often, in the space between collagen fibres. A very important observation was described by Neuman, who proved that systemic liquids can contain phosphates in excess. In the opinion of the scientist, this phenomena appears because it comes to the division of intra- and extra-cellular liquids between biological membranes, which is connected with different concentrations of Ca and P ions in the tissues. Phosphates are also easily caught by

The electrostatic charge which exists on the collagen fibre surface [11]. Another very important factor that takes part in apatite crystal formation is cellular mitochondria. While the calcium is collected by mitochondria, phosphorus is automatically collected from surroundings. Consequently, organic and inorganic compounds are created. In these compounds, the ratio of Ca and P is similar to that seen in hydroxyapatite. Firstly, micro crystals of apatite are formed in the hypochondria and then in micro-inclusions and in large areas of cytoplasm [11, 12].

na niski stopień uporządkowania struktury wewnętrznej zidentyfikowanych faz mineralnych.

Otrzymane widma metodą IR wskazują na występowanie w badanych próbkach grupy PO_4^{3-} , materii organicznej oraz ugrupowań wodorotlenowych (ryc. 17–19). Najintensywniejsze pasma absorpcyjne pochodzą od grupy fosforanowej, których maksima mieszczą się w zakresie $1035–1040\text{ cm}^{-1}$. O obecności grupy PO_4^{3-} świadczą również pasma: $471,468–962,6\text{ cm}^{-1}$. Materia organiczna w badanych próbkach jest reprezentowana przez fosfolipidy oraz cholesterol. Piki o liniach absorpcyjnych: $1235,76–1508,7\text{ cm}^{-1}$ oraz $2861,12–2931,85\text{ cm}^{-1}$ wskazują na obecność formacji organicznej. Natomiast pasma $1652,53–1658,16\text{ cm}^{-1}$ oraz $3357,88–3418,21\text{ cm}^{-1}$ świadczą o uwodnieniu próbek. Piki o liniach absorpcyjnych w zakresie $3320,89–3418,21\text{ cm}^{-1}$ są bardzo szerokimi pasmami i pochodzą zarówno od wody, jak i od grup hydroksylowych. Analizy widm spektrofotometrycznych w podczerwieni próbki przed suszeniem (ryc. 17) oraz po suszeniu (ryc. 18) potwierdzają fakt, że pasma absorpcyjne pochodzące od grup wodorotlenowych mogą wskazywać na obecność zarówno grup OH^- , jak i wody zaadsorbowanej powierzchniowo. Podczas obserwacji widm spektroskopowych próbki można zauważyć przesunięcie szerokiego pasma pochodzącego od wody w próbce wysuszonej w kierunku niższych liczb falowych. Informacja ta może świadczyć o silniejszym wiązaniu chemicznym występującym w próbce przed suszeniem.

Dyskusja

Mineralizacja w obrębie żywego organizmu jest procesem prowadzącym do wzbogacenia lub wysycenia pewnych jego struktur minerałami. Żywe organizmy stwarzają doskonałe warunki do krystalizacji różnego rodzaju związków organicznych i nieorganicznych. Na ten proces ma wpływ wiele czynników: pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (Eh), temperatura oraz stężenie jonów wodorowych [1, 11]. Minerale wytworzone w naturalny sposób przez tkanki biologiczne stanowią najważniejsze źródło pierwiastków dla organizmu. Zawierają one głównie fosfor oraz wapń, ale również w niewielkich ilościach inne pierwiastki: magnez, stront, bar, fluor, chlor, ołów, cynk, żelazo i inne. Podstawową masę mineralną organizmu człowieka tworzą fosforany wapnia, zwłaszcza bioapatyty. Stąd metabolizm wapnia i fosforu odgrywa kluczową rolę w procesach mineralizacji, zwłaszcza że inne pierwiastki uczestniczące w nich występują w małych ilościach. W strukturze mineralnej bioapatytów, oprócz Ca i P, mogą występować kationy: Na, K, Pb, Sr, Ra, Cu, Mn, Fe itd., które w niewielkiej ilości mogą być wbudowane w strukturę apatyty. Natomiast

The pathological states of carotids have high clinical significance because of the prevalence of possible serious complications, especially neurological ones [7, 8, 9, 13]. The estimation of the morphology of carotid walls, especially the measurement of thickness of the intima-media complex, allows for risk assessment of the appearance of arteriosclerosis of the coronary artery and other areas [14–16].

Mineralogical research has helped in describing the mineralogical and chemical composition of calcification, as well as the morphology of mineralogical agglomeration. Scanning microscope observation allowed the realisation that the mineralization of carotids manifests in the form of mineral-organic agglomerations. Calcium phosphate creates tubercular and rarely tablet forms. Organic mineralization, which sometimes forms needle agglomerations, is observed as mixed forms with inorganic mineralization. Both elements remain in a variable mutual ratio of quantities. Chemical sample analysis carried out in the EDS system proved that calcium and phosphorus exist in sclerosis lodgement. In some energetic spectra of the examined samples trace amounts of other elements were also revealed - sodium, magnesium and sulphur. X-ray diffraction analysis also proved that the sclerosis lodgement contains phosphates represented by hydroxyapatite and fluoroapatite. Spectra received from examinations of samples carried out by infrared absorption spectroscopy indicate PO_4^{3-} group existence, organic material, and hydroxyl groups. Organic material in the examined samples is represented by phospholipids and cholesterol. The analyses that were carried out prove that wide waves coming from hydroxyl complexes can originate from OH^- ions as well as from H_2O particles.

Non-organic mineralization of carotid arteries is represented by calcium phosphate, which has a variable degree of saturation. As well as mineral grains, organic agglomerations (to which sclerosis belongs) also exist here. Research and literature data [1, 12] suggest that both organic and inorganic mineralization is created primarily at sites of biological structure damage.

The mechanism for creating phosphatic mineralization is not sufficiently known. Until now, it has been thought that the main factors which support the creation of mineral lodgement are: vitamin D, diet, and P, Mg, and Fe transported by blood plasma. It can be supposed that blood vessel mineralization is be connected with demineralization of bones, as a potential source of Ca and P. It is also considered that a precursor of mineral apatite creation is amorphous calcium phosphate [17, 18].

The mineralization that was found in patients causes widening of the carotid lumen and contributes to the hard-

reszty fosforanowe mogą być podstawione anionem cytrynianowym $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3^{3-}$, węglanowym CO_3^{2-} itd., a OH^- przez F^- . Dlatego też ogólny zapis budowy chemicznej bioapatytu można wyrazić następująco: $(\text{Ca}, \text{Na}, \text{Sr}, \text{Pb}, \text{K})_5 (\text{PO}_4, \text{CO}_3, \text{HPO}_4)_3 \text{OH}, \text{F}, \text{Cl}$ [1, 11].

Za czynnik inicjujący krystalizację ziaren mineralnych apatyty w organizmie uważa się kolagen o uszkodzonej strukturze, wchodzący, na przykład, w skład chrząstek i tak zwanej tkanki łącznej. W latach 30. rozpoczęto badania nad strukturą białkową kolagenu, które potwierdziły fakt, że kolagen może mieć miejscami strukturę krystaliczną. W wieloletnich badaniach dowiedziono, że kolagen w dużym stopniu inicjuje łączenie jonów fosforu i wapnia w formę krystalitów. Do nukleacji mikrokryształów apatyty najczęściej dochodzi w przestrzeniach pomiędzy włóknami kolagenu. Bardzo ważną obserwację opisał Neuman, który wykazał, że płyny ustrojowe mogą zawierać nadmiar fosforanów. Jego zdaniem zjawisko to ma miejsce, ponieważ następuje oddzielenie płynów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych błonami biologicznymi, co niesie ze sobą zróżnicowanie stężenia jonów Ca i P w różnych tkankach. Fosforany są również łatwo przechwytywane przez ładunki elektrostatyczne występujące na powierzchni włókien kolagenowych [11]. Innym, bardzo ważnym czynnikiem odgrywającym rolę w formowaniu kryształów apatyty są mitochondria komórkowe. Absorpcji wapnia przez mitochondria towarzyszy pobranie fosforu z otoczenia [11].

W konsekwencji prowadzi to do tworzenia się nieorganicznych i niekrystalicznych związków wapnia i fosforu. W związkach tych stosunek Ca/P jest bardzo zbliżony do tego, jaki występuje w hydroksyapatycie. Mikrokryształki apatyty formują się najpierw w mitochondriach, następnie w mikroinkluzyjach oraz w dużych obszarach cytoplazmy [11, 12].

Patologia tętnic szyjnych ma istotne znaczenie kliniczne ze względu na rozpowszechnienie oraz możliwość wystąpienia poważnych powikłań, zwłaszcza neurologicznych [7–9, 13]. Ocena morfologii ściany tętnic szyjnych, nawet nieuwapnionych, a przede wszystkim pomiar grubości kompleksu intima-media, pozwala na określenie ryzyka miażdżycy tętnic wieńcowych oraz innych obszarów [14–16].

Przeprowadzone badania mineralogiczne pozwoliły określić skład mineralny i chemiczny zwapnień, a także morfologię skupień mineralnych. Z obserwacji prowadzonych przy użyciu mikroskopu skaningowego wynika, że mineralizacja tętnic szyjnych przejawiała się w formie skupień mineralno-organicznych. Fosforany wapnia tworzą tu formy gruzelkowe, rzadko tabliczkowe. Mineralizację organiczną, tworzącą niekiedy skupienia igielkowe, obserwuje się jako formy mieszane

ening of their walls, which hampers blood flow [16]. The conducted examinations proved that $\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ apatite is a final product of inorganic haematogenous mineralization. Apatite scores 5 points on the Mohs hardness scale, which poses a threat to surrounding tissues. The existence of mineralization can contribute to mechanical damage of surrounding cells because of the occurrence of sharp-edged forms. Especially dangerous are crystals formed on the endothelium. They can be torn off from the endothelium during arterial pressure increases. Consequently, such a situation can lead to blood vessel blockade during microcrystal transport [1, 11, 12]. The carried out examinations proved that arterial mineralization can be advanced to different extents. Research on carotid calcification fully confirms the information contained in literature about fast sclerosis development in the last decades of human life [5, 6, 11]. The relatively limited advancement of mineralization found in the material is characteristic of so-called soft changes. The occurrence of such changes in carotid shows the high dynamics of the formation of sclerotic plaque within the high artery and the formation of critical stenoses, even before advanced mineralization occurs.

Conclusions

1. The development of atherosclerotic lesions within carotid arteries is characterized by great dynamism.
2. Patients with critical structures, who necessitate surgical treatment, are dominated by "soft" and fibrous atherosclerotic plaques with low content of non-organic mineralization.
3. Non-organic mineralization of carotid arteries is represented by calcium phosphate.
4. Mineralization of early phases with nonorganic-organic complexes is predominant.

References

1. Pawlikowski M, Pfizner R (1999) Mineralizacja serca i dużych naczyń. Wydawnictwo IGSMiE PAN, Kraków.
2. Pawlikowski M (1993) Kryształy w organizmie człowieka. Wydawnictwo Secesja, Kraków.
3. Pawlikowski M (1987) Mineralizacja organizmu człowieka żyjącego (mineralogia człowieka). Prace Mineralogiczne. Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Kraków.
4. Braunwald E (2005) Postępy w kardiologii Harrisona, Wydawnictwo CZELEJ, Lublin.
5. Pasiński T (2002) Patogeneza miażdżycy i występowania zdarzeń wieńcowych. Postęp Nauk Medycznych, 15/1: 6–8.
6. Pasiński T, Gaciong Z, Torbicki A, Szmidt J (ed) (2004) Angiologia. PZWL, Warszawa.
7. Dzierwa K, Pieniążek P, Musiałek P et al (2011) Treatment strategies in severe symptomatic carotid and coronary disease. Medical Science Monitor, 17: RA191–197.
8. Ścibisz A, Michałak M, Kochman J (2011) Angioplastyka tętnic szyjnych w świetle najnowszych wytycznych. Kardiologia po Dyplomie, 10: 70–75.

z mineralizacją nieorganiczną. Oba składniki pozostają w zmiennych wzajemnych proporcjach ilościowych. Analizy chemiczne próbek wykonane metodą EDS wykazały w złogach miażdżycowych obecność wapnia i fosforu. Na niektórych widmach energetycznych badanych próbek pojawiają się również w śladowych ilościach inne pierwiastki: sód, magnez i siarka. Rentgenowska analiza dyfrakcyjna również potwierdziła, że złogi miażdżycowe zawierają fosforany, reprezentowane przez hydroksyapatyt oraz fluorapatyt. Widma otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań metodą spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni wskazują także na występowanie w 12 badanych próbkach grupy PO_4^{3-} , materii organicznej oraz ugrupowań wodorotlenowych. Materia organiczna w badanych próbkach jest reprezentowana przez fosfolipidy oraz cholesterol. Wykonane analizy dowodzą, że szerokie pasma pochodzące od kompleksów wodorotlenowych mogą pochodzić zarówno od jonu OH^- , jak i od cząsteczki H_2O .

W przypadku mineralizacji tętnic szyjnych wśród substancji nieorganicznych dominują fosforany wapnia o zmiennym stopniu uwodnienia. Oprócz ziaren mineralnych występują także skupienia organiczne, do których należy cholesterol. Badania i dane literaturowe [1, 12] sugerują, że mineralizacja zarówno nieorganiczna, jak i organiczna tworzy się głównie w miejscach uszkodzenia struktur biologicznych.

Mechanizm tworzenia się mineralizacji fosforanowej nie jest dostatecznie znany. Dotychczas dowiedziono, że głównymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu złogów mineralnych jest: witamina D, dieta oraz P, Mg, Fe transportowane przez osocze krwi. Przypuszcza się również, że mineralizacja naczyń krwionośnych może być związana z demineralizacją kości, jako potencjalnym źródłem Ca i P. Uważa się, że prekursorem powstania krystalicznego apatyty jest amorficzny fosforan wapnia [17, 18].

Mineralizacja, z jaką spotkano się u badanych pacjentów przyczyniła się do zwężenia światła tętnic i do utwardzenia ich ścian, co utrudnia przepływ krwi [16]. Przeprowadzone badania wykazały również, że końcowym produktem nieorganicznej mineralizacji krwio-pochodnej jest apatyt o wzorze $\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$. Wykazuje on twardość 5 według skali Mohsa. Tak twarde złogi mineralne stwarzają mechaniczne zagrożenie dla otaczających tkanek. Obecność mineralizacji może przyczynić się także do mechanicznego uszkodzenia otaczających je komórek, ze względu na ostrokrawędziste formy ziarn. Szczególnie niebezpieczne są kryształy formujące się na śródbłonku, które mogą podczas wzrostu ciśnienia tętniczego ulec oderwaniu od śródbłonka. W konsekwencji taka sytuacja może doprowadzić do zablokowania naczyń krwionośnych podczas transportu

9. Lapis CD, Bell PRF, Mikhailidis D et al w imieniu twórców wytycznych ESVS (2010) *Acta Angiologica* 16: 190–215.
10. Pawlikowski M, Niedźwiedzki T (2002) *Mineralogia kości*. Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Kraków.
11. Szymański A (ed) (1991) *Biomineralizacja i biomateriały*. PWN, Warszawa.
12. Pawlikowski M, Pfitzner R (1995) Zastosowanie metod mineralogicznych w badaniach tkanek człowieka. *Przegląd Lekarski* 52/4: 124–128.
13. Warot M (2006) Zaburzenia krążenia mózgowego W: Chęciński P (ed) *Choroby naczyń*. Termedia, Poznań: 101–131.
14. Kablak-Ziębicka A, Pasowicz M, Konieczńska M et al (2002) Coronary artery calcification and carotid intima-media thickness in ischaemic heart disease. *Kardiologia Polska* 57: 83–93.
15. Kablak-Ziębicka A, Tracz W, Przewłocki T et al. (2004) Association of increased cardiac infima-media thickness with the extent of coronary artery disease. *Heart* 90: 1286–1290.
16. Pasowicz M, Konieczńska M, Klimeczek P, Wicher-Muniek E, Przewłocki T, Kablak-Ziębicka A, Podolwec P, Tracz W (2002) Nieinwazyjna ilościowa ocena zwapnień w tętnicach wieńcowych. *Kardiologia Polska* 57: 83–93.
17. Kuźniewski M (2007) Rola metabolizmu kostnego w procesie kalcyfikacji naczyń u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych powtarzanymi dializami. Rozprawa habilitacyjna. UJ CM Wydział Lekarski. *Przegląd Lekarski* 64, wydanie specjalne 1.
18. Fołtyn W, Kos-Kudła B, Siemińska L, Strzelczyk J, Kajdaniuk D, Marek B (2003) Osteoporoza i miażdżycza — wspólna etiopatogeneza? *Endokrynologia Polska* 54: 316–320.

mikrokryształów [1, 11, 12]. Przeprowadzone badania wykazały, że mineralizacja tętnic szyjnych może być zaawansowana w różnym stopniu. Badania nad procesem zwapnienia tętnic szyjnych w pełni potwierdzają dane z piśmiennictwa o szybkim rozwoju miażdżycy w ostatnich dekadach życia człowieka [5, 6, 11]. Stosunkowo ograniczone zaawansowanie mineralizacji, stwierdzone w badanym materiale, jest charakterystyczne dla tak zwanych zmian miękkich. Występowanie takich zmian w tętnicach szyjnych świadczy o dużej dynamice tworzenia się płytek miażdżycowych w obrębie tętnicy szyjnej i powstawania krytycznych zwężeń, jeszcze zanim pojawi się mineralizacja zaawansowana.

Wnioski

1. Rozwój zmian miażdżycowych w obrębie tętnic szyjnych charakteryzuje się dużą dynamiką.
2. U chorych z krytycznymi zwężeniami, wymagającymi leczenia operacyjnego, dominują „miękkie”, włókniste blaszki miażdżycowe o stosunkowo małej zawartości mineralizacji nieorganicznej.
3. Mineralizacja nieorganiczna tętnic szyjnych reprezentowana jest przez fosforany wapnia.
4. Dominuje mineralizacja wczesnych faz z kompleksami nieorganiczno-organicznymi.