

УДК 616-004.6:543.456

**Т.А. Алексеева²,
С.В. Горобець¹,
О.Ю. Горобець¹,
І.В. Дем'яненко¹,
О.М. Лазаренко³**

МАГНІТНА СИЛОВА МІКРОСКОПІЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧНИХ БЛЯШОК

Національний технічний інститут України «Київський політехнічний інститут»¹
пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова НАН України²
бул. Академіка Вернадського, 36, Київ, 03680, Україна

Державна наукова установа «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини»³
вул. Верхня, 5, Київ, 01133, Україна

National technical institute of Ukraine "Kiev polytechnic institute"¹,

Pobedy str., 37, Kiev, 03056, Ukraine

pitbm@ukr.net

Institute of metallophysics named after G.V. Kurdumov NAS of Ukraine²

Academic Vernadsky str., 36, Kiev, 03680, Ukraine

o_lazarenko@ukr.net

State Scientific Institution "Scientific-Practical Centre of Preventive and Clinical Medicine"³

Verchnya str., 5, Kiev, 01133, Ukraine

o_lazarenko@ukr.net

Ключові слова: атеросклеротична бляшка, магнітна силова мікроскопія, біогенний магнетит, магнітна фаза
Key words: atherosclerotic plaque, magnetic force microscopy, biogenic magnetite, magnetic phase

Реферат. Магнитная силовая микроскопия атеросклеротических бляшек. Алексеева Т.А., Горобец С.В., Горобец О.Ю., Демьяненко И.В., Лазаренко О.Н. В работе методами сканирующей зондовой микроскопии, а именно атомно-силовой и магнитно-силовой микроскопии, было проведено исследование фрагментов срезов атеросклеротических бляшек разной природы. Фрагменты атеросклеротического сосуда с элементами незрелой бляшки были получены при проведении операции шунтирования клубковой артерии аллопротезом. В результате исследования было выявлено наличие магнитоупорядоченной фазы эндогенного происхождения во фрагменте массивной бляшки смешанного строения. Данная фаза представляет собой биогенные магнитные наночастицы и их кластеры с характерными размерами 200 - 400 нм.

Abstract. Magnetic force microscopy of atherosclerotic plaque. Alexeeva T.A., Gorobets S.V., Gorobets O.Yu., Demianenko I.V., Lazarenko O.M. In this work by methods of scanning probe microscopy, namely by atomic force microscopy and magnetic force microscopy the fragments of atherosclerotic plaque section of different nature were investigated. The fragments of atherosclerotic vessels with elements of immature plaque were taken during the coiled artery bypass surgery by alloprosthesis. As the result of investigation we found magnetically ordered phase of endogenous origin in the fragment of solid plaque of mixed structure. This phase is presents biogenic magnetic nanoparticles and their clusters with average size characteristic of 200-400 nm.

Залізо є одним з найважливіших компонентів у біохімічних процесах в організмі людини, особливо в процесі утворення вільних радикалів, оскільки вони можуть існувати у декількох валентностях та зв'язувати до 6 лігандів [9]. Також потрібно відзначити роль заліза у ферментативних реакціях, оскільки більша половина ферментів є залізовмісними, від гемоглобіну до цитохромів [9]. Тому порушення роботи залізовмісних білків та зміна концентрації заліза в організмі в цілому призводять до ряду захво-

рювань, наприклад, до нейродегенеративних захворювань (захворювання Альцгеймера, Паркінсона, Хантінктона та епілепсія) [17], онкологічних (меланома, рак молочної залози, яєчника, яєчка, саркома, менінгіома, гліобластома, астроцитоза, гліома, при метастазуванні пухлин) [13] та захворювань серцево-судинної системи (інфаркт міокарда) [15]. Останнім часом до цього переліку віднесли ще й розвиток атеросклерозу [8].

Атеросклероз — це хронічне захворювання артерій еластичного та м'язово-еластичного типу, яке виникає в результаті порушення ліпідного обміну, внаслідок чого відбувається відкладення холестерину та деяких фракцій ліпопротеїдів в інтимі судин. Основною причиною виникнення атеросклерозу вважають зміну концентрації заліза або феритину у сироватці крові [10]. Така зміна може виникати внаслідок оксидного стресу, тобто надмірного утворення реактивних форм кисню, зокрема супероксидних радикалів [8]. Наявність супероксидних радикалів запускає в організмі ряд реакцій, пов'язаних з імунним відгуком, наприклад, реакцію дисмутації супероксиду, яка каталізується супероксиддисмутазою, та реакцію Фентона [18]. Дослідження, проведені за допомогою ЕПР в роботі [11], виявили рівень заліза в атеросклеротичній тканині більший у 17 разів за рівень у здоровій тканині [4]. При цьому процес накопичення заліза та цинку відбувається в місцях кальцинування атеросклеротичної бляшки [4].

Відомо такі форми заліза в організмі людини: у складі залізовмісних білків, у плазмі крові (0,1%) та у вигляді біогенних магнітних наночастинок, які представляють собою нанорозмірні кристали магнетиту або магеміту [12]. Так, у нормальних тканинах головного мозку, серця, печінки та селезінки знайдено біогенні магнітні наночастинок [7]. Підвищену кількість таких наночастинок (порівняно з нормальними тканинами) виявлено, наприклад, у пухлинних тканинах [14] та при низці нейродегенеративних захворювань [3]. При цьому в роботі [5] показано, що в організмі людини є гомологи всіх основних білків, які відповідають за біомінералізацію внутрішньоклітинних наночастинок магнетиту у магнітотаксисних бактерій. Тому виникає питання: в якій формі накопичується надлишок заліза у тканинах, уражених атеросклерозом?

Основними інструментальними методами дослідження атеросклерозу є ультразвукове дослідження судин [19], комп'ютерна томографія-ангіографія (КТ АГ) [10], магнітна резонансна томографія-ангіографія (МРТ АГ), мас-спектрометрія з індуктивно-зв'язаною плазмою (ІЗП-МС), електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) [8].

Але ці методи не дають змогу виявити наноструктурну локалізацію біогенних магнітних наночастинок у тканині та відрізнити їх від інших

форм заліза в організмі [8]. Ефективним методом визначення локалізації магнітних наночастинок та їх кластерів є скануюча зондова мікроскопія, а саме метод магнітно-силової мікроскопії [1].

Метою цієї роботи є дослідження атеросклеротичної тканини методами скануючої зондової мікроскопії для перевірки гіпотези про можливу наявність заліза у формі магнітних наночастинок ендogenous походження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

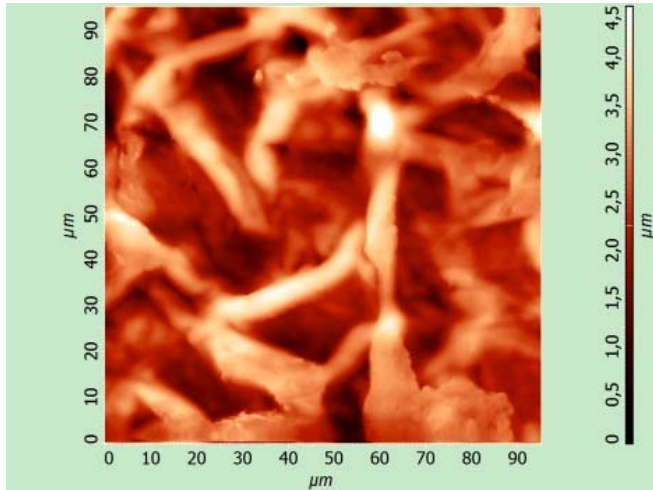
У цій роботі за допомогою скануючого-зондового мікроскопу SOLVER PRO-M [2, 6] досліджено фрагменти атеросклеротичної тканини: 1) масивна бляшка змішаної будови (тобто наявні атеросклеротичні зміни, кристали холестерину та кальцію, частини стінки судини, заміщені сполучною тканиною); 2) атероматозно-фіброзна кальцинована бляшка; 3) склероз судини. Ці фрагменти бляшок були надані Державною науковою установою «Науково-практичний центр профілактичної і клінічної медицини» Державного управління справами.

Під час дослідження використовувалась двопробірна методика, яка складалась з мікроскопії двох видів: атомно-силової мікроскопії (АСМ) напівконтактним методом та магнітно-силової мікроскопії (МСМ) [2, 6]. Використовувався режим сканування – напівконтактний та магнітний, тип зонду – магнітний кобальтовий (NSG01/Co), а відстань від зонда до поверхні клітини – 450 нм.

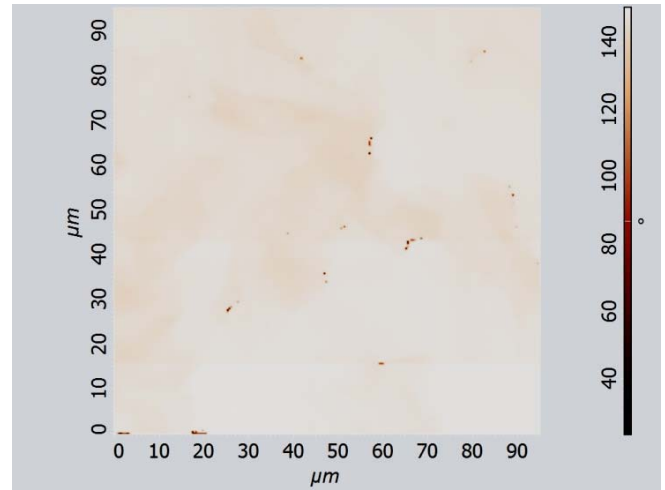
Зразки атеросклеротичної судини з елементами незрілої бляшки були отримані при проведенні операції з шунтування клубової артерії алопротезом. Вилучені судини були одразу внесені до 10% розчину формаліну для проведення подальшої дегідратації у батареї спиртів при підвищенні їх концентрації. Після цього зразки судин заливали парафіном та готували зрізи товщиною 5 мкм. Отримані зрізи після видалення парафіну були вивчені за допомогою оптичної мікроскопії з відповідними забарвленнями (гематоксилином та еозинном, за ван Гізеном) для встановлення ступеня атеросклеротичного процесу. Друга серія зразків тих самих зрізів була досліджена за допомогою АСМ і МСМ без попереднього фарбування.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

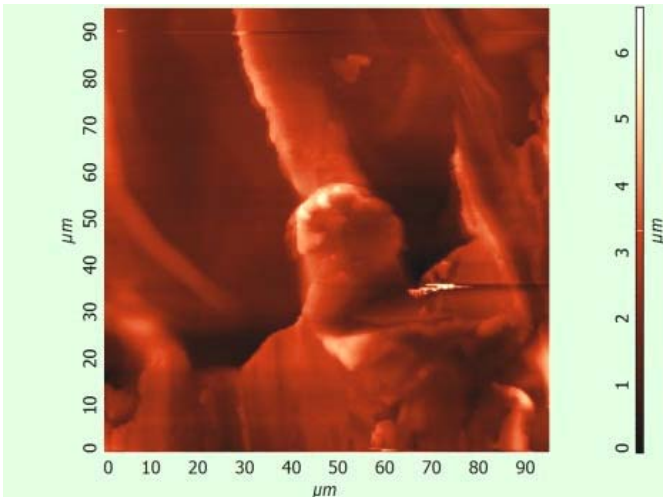
На рисунку 1 представлено АСМ та МСМ зображення різних ділянок зрізів масивної бляшки змішаної будови.



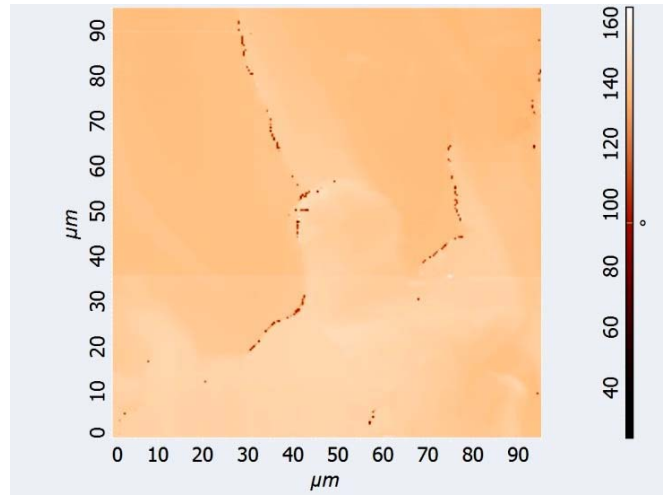
а



б



в



г

**Рис. 1. Зображення різних ділянок бляшки змішаної будови:
а, в – АСМ зображення, б, г – МСМ зображення**

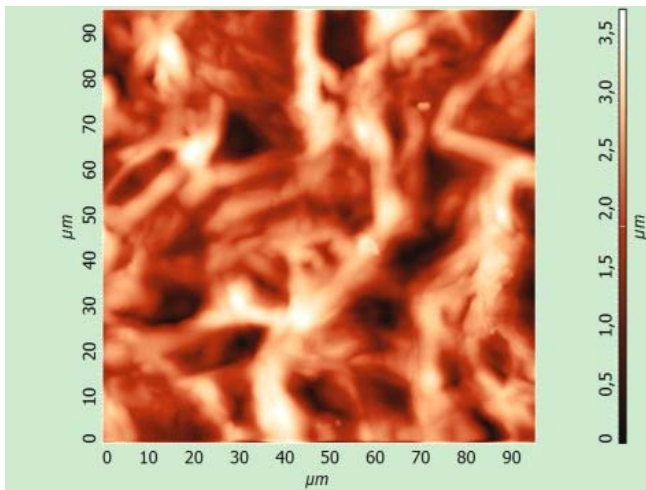
На рисунку 2 представлено АСМ та МСМ зображення різних ділянок атероматозно-фіброзної кальцинованої бляшки.

На рисунку 3 представлено АСМ та МСМ зображення фрагментів склерозу судини.

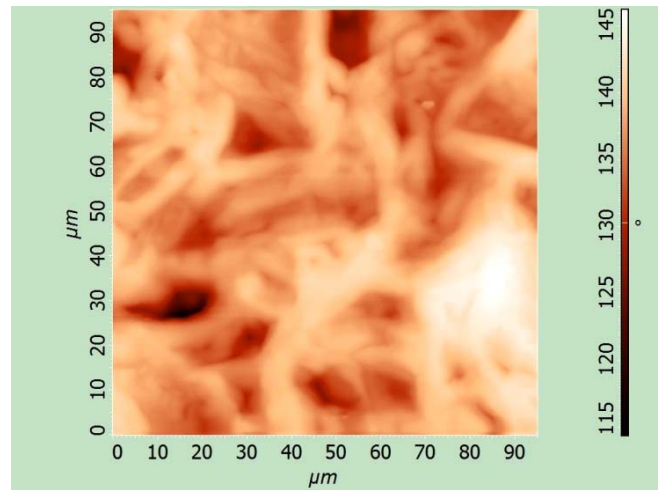
Проаналізувавши отримані МСМ зображення атеросклеротичної бляшки першого зразку, можна зробити висновок, що певні його ділянки (рис. 1б та 1г) містять магнітопорядковану фазу ендogenous походження. Ця фаза представляє собою біогенні магнітні наночастинки та їх кластери.

При аналізі отриманих МСМ зображень другого (рис. 2б, 2г) та третього (рис. 3б, 3г та 3е) зразків біогенних магнітних наночастинок не виявлено.

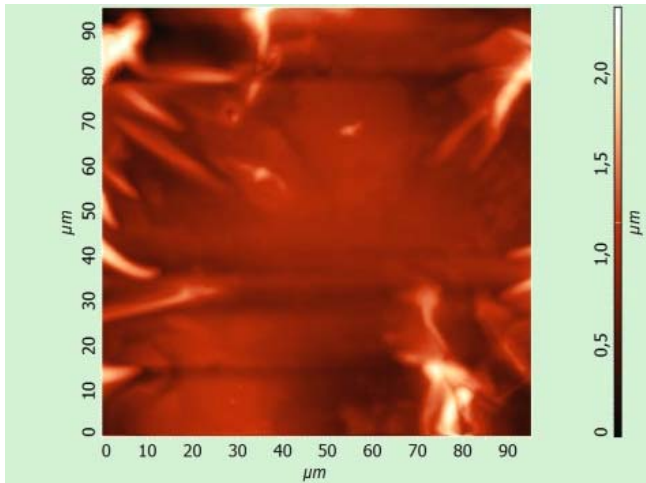
Кількість біогенних магнітних наночастинок є різною, залежно від ділянки бляшки. Найбільша їх кількість спостерігається в ділянці кальцинування або на ділянках із залишками тканини судин. Біогенні магнітні наночастинки розташовані у вигляді ланцюгів (від декількох до десятків частинок або їх кластерів).



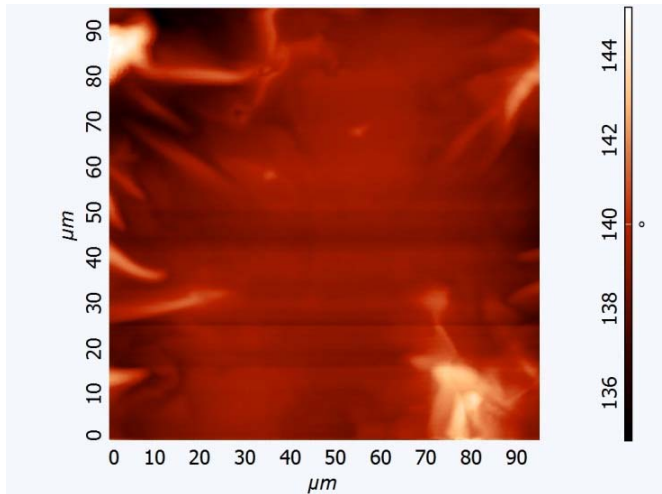
а



б



в



г

Рис. 2. Зображення різних ділянок атероматозно-фіброзної кальцинованої бляшки:
а, в – АСМ зображення, б, г – МСМ зображення

Відомо [16], що низка симбіонтів людини мають у своєму складі біогенні магніточутливі включення, які представляють собою аморфні або кристалічні магнітні наночастинки. Наприклад, такі включення виявлені в *Lactobacillus plantarum* VKM B-2209, *Escherichia coli* VKM B-126, *Staphylococcus sp.* strain MA [16]. Симбіонти з магніточутливими включеннями можуть розвиватися в кальцинованій атеросклеротичній бляшці [16]. Тому важливо визначити, чи відбувається біосинтез біогенних магнітних наночастинок, виявлених у складі такої бляшки

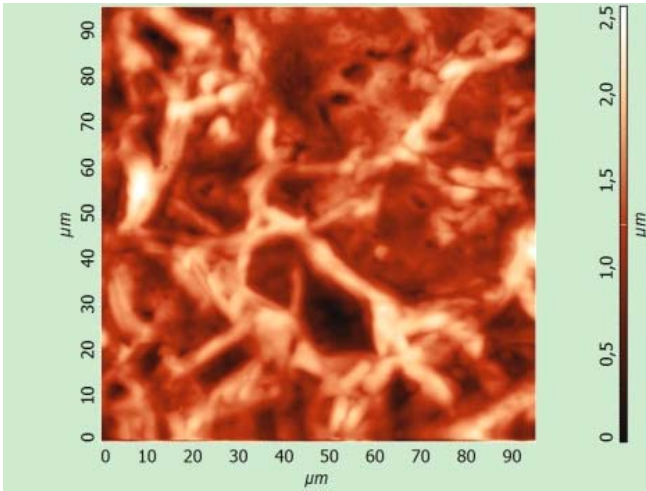
(рис. 1), виключно під генетичним контролем в організмі людини, чи і в його симбіонтах також.

ПІДСУМОК

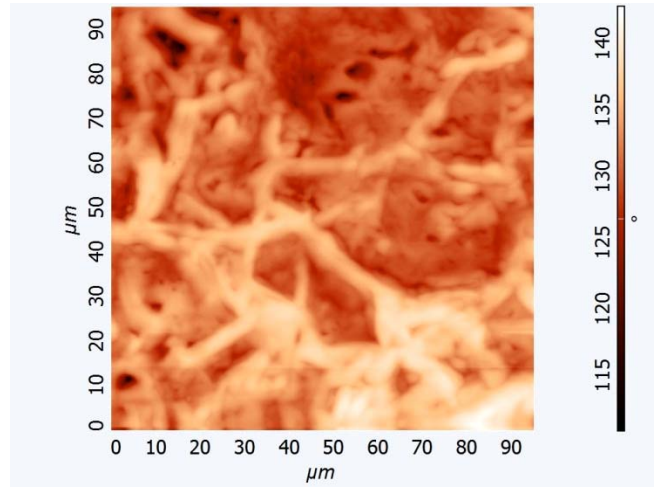
У роботі методами магнітної силової мікроскопії виявлено, що в зразках зрізів атеросклеротичної бляшки змішаної будови є наноструктури ендogenous походження у вигляді магнітовпорядкованих кластерів наночастинок з характерними розмірами окремого кластеру порядку 200-400 нм. Найбільша кількість магнітовпорядкованих структур спостерігаються в зонах кальцинування, які характеризуються виникненням

анаеробних умов. Це узгоджується із результатами робіт, що експресія генів, відповідальних за біомінералізацію внутрішньоклітинних біоген-

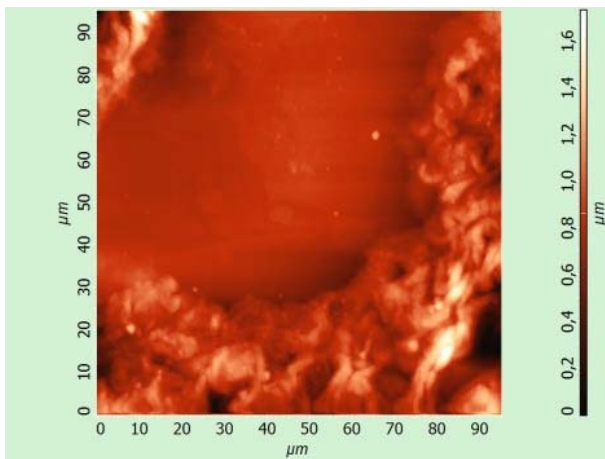
них магнітних наночастинок, збільшується в анаеробних та мікроаеробних умовах і пригнічується в аеробних.



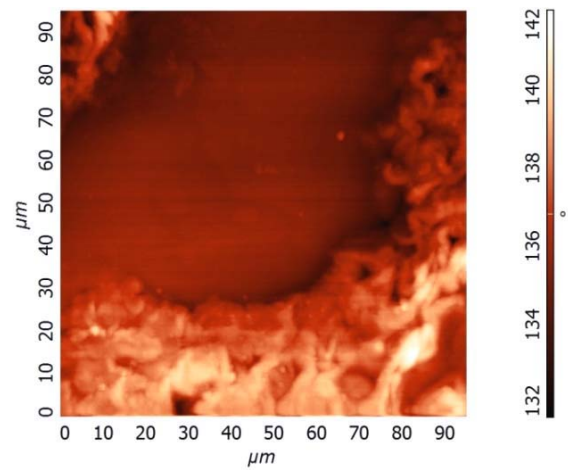
а



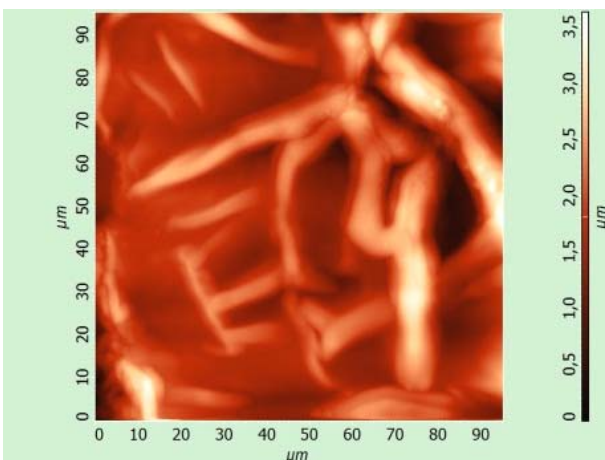
б



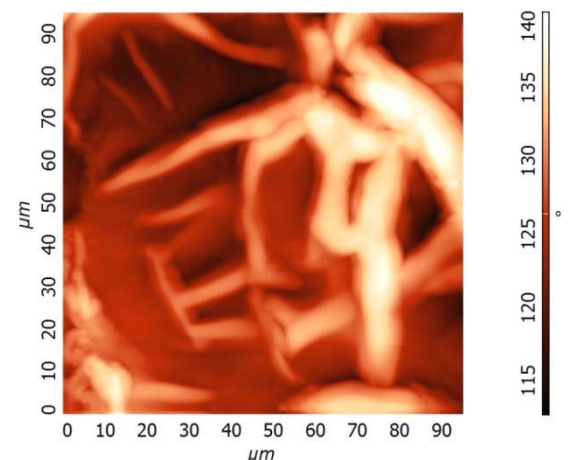
в



г



д



е

**Рис. 3. Зображення фрагментів склерозу судини:
а, б, в – АСМ зображення; г, д, е – МСМ зображення**

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Магніточутливі наноструктури ендogenous походження в клітинах карциноми Ерліха / В.Ф. Чехун, С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко // *Наноструктурное материаловедение*. – 2011. – № 2. – С.102-109.
2. Пат. 78508 Україна, МПК (2013.01) B82Y 35/00. Спосіб визначення місця локалізації магнітної фази в околі біомембрани клітин/ С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко. – № u2012 09374; заявл. 31.07.12, опубл. 25.03.13, Бюл. № 6.
3. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques / M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 1998. – Vol. 158. – P. 47-52.
4. Douglas B. Kell Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples / B. Douglas // *Arch. Toxicol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 825–889
5. Gorobets S.V. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms / S.V.Gorobets, O.Yu. Gorobets // *Functional Materials*. – 2012. – Vol. 19, N 1. – P. 18-26.
6. Gorobets S.V. Self-organization of magnetite nanoparticles in providing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with magnetic properties / S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, I.V Demianenko // *J. Magnetism Magnetic Materials*. – 2013. – P. 53-57.
7. Grassi-Schultheiss P.P. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver/ P.P. Grassi-Schultheiss, F. Heller, J. Dobson // *BioMetals*. – 1997. – N 10. – P. 351-355.
8. In Vivo MRI Atherosclerotic Plaque Characterization Using Magnetic Susceptibility Distinguishes Symptom-Producing Plaques / V. Subha Raman, W. Marshall Winner III, Tam Tran [et al.] // *JACC Cardiovasc Imaging*. – 2008. – N 1. – P. 49-57.
9. Iron and thrombosis / M. Franchini, G. Targher, M. Montagnana, G. Lippi // *Ann. Hematol.* – 2008. – Vol. 87. – P.167-173.
10. Iron Status Is Associated with Carotid Atherosclerotic Plaques in Middle-Aged Adults / N. Ahluwalia, A. Genoux, J. Ferrieres [et al.] // *J. Nutr.* – 2010. – Vol. 140. – P. 812-816.
11. Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes / K. Stadler, M.G. Bonini, S. Dallas [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45. – P. 866-874.
12. Kirschvink J.L. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue / J.L. Kirschvink // *J. Exp. Biol.* – 1981. – Vol. 92. – P. 333-335.
13. Kobayashi A. Studies of Inorganic Crystals in Biological Tissue: Magnetite in Human Tumor / A. Kobayashi, N. Yamamoto, J. Kirschvink // Reprinted from *J. Japan Society of Powder and Powder Metallurgy*. – 1997. – N 44. – P. 94.
14. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampus tissue / F. Brem, A.M. Hirt, M. Winklhofer, K. Frei [et al.] // *J. Res. Soc. Interface*. – 2006. – N 3. – P. 833-841.
15. Moos T. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review / T. Moos, E.H. Morgan // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2004. – P. 1012-1014.
16. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells / M. Vainshtein, N. Suzina, E. Kudryashova, E. Ariskina // *Biology Cell*. – 2002. – Vol. 94. – P. 29-35.
17. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue / D. Hautot, Q.A. Pankhurst, N. Khan, J. Dobson // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 270, N 7. – P. 62-64.
18. Short-term hyperglycemia increases arterial superoxide production and iron dysregulation in atherosclerotic monkeys / P.A. Rowe, K. Kavanagh, L. Zhang, H. James Harwood Jr. [et al.] // *Metabolism*. – 2011. – Vol. 60, N 8. – P. 1070-1080.
19. Soloperto G. Progress in atherosclerotic plaque imaging/ G. Soloperto, S. Casciaro // *World J. Radiol.* – 2012. – Vol. 4, N 8. – P. 353-371.

REFERENCES

1. Chekchun VF, Gorobets SV, Gorobets OYu, Demianenko IV. [Magnet-sensitive nanostructures of endogenous origin in the cells of Erhli's carcinoma]. *Nanostrukturnoe materialovedenie*. 2011;2:102–9. Ukrainian.
2. Gorobets SV, Gorobets OYu, Demianenko IV. [Means of defining place of localization of magnet phase in biomembrane cells structures. – N u2012 09374; statement 31.07.12, published 25.03.13 Bulletin N 6. Patent on the model 78508 B82Y 35/00 2013.01]. Ukrainian.
3. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol. Sci.* 1998;158:47–52.
4. Douglas B. Kell Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol.* 2010;84:825–89.
5. Gorobets SV, Gorobets Oyu. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms. *Functional Materials*. 2012;1(19):18–26.
6. Gorobets SV, Gorobets OYu, Demianenko IV. Self-organization of magnetite nanoparticles in providing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with magnetic properties. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2013:53–57.
7. Grassi-Schultheiss PP, Heller F, Dobson J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. *BioMetals*. 1997;10:351–5.

8. Subha V Raman, Marshall W Winner III, Tam Tran. In Vivo MRI Atherosclerotic Plaque Characterization Using Magnetic Susceptibility Distinguishes Symptom-Producing Plaques. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008;1:49–57.
9. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Iron and thrombosis. *Ann Hematol*. 2008;87:167–73.
10. Ahluwalia N, Genoux A, Ferrieres J, Perret B, Carayol M, Drouet L, Ruidavets J-B. Iron Status Is Associated with Carotid Atherosclerotic Plaques in Middle-Aged Adults. *J. Nutr*. 2010;140:812–6.
11. Stadler K, Bonini MG, Dallas S, Jiang JJ, Mason RP, Kadiiska MB. Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:866–74.
12. Kirschvink JL. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. *J Exp Biol*. 1981;92:333–5.
13. Kobayashi A, Yamamoto N, Kirschvink J. Studies of Inorganic Crystals in Biological Tissue: Magnetite in Human Tumor. Reprinted from *Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy*. 1997;44:94.
14. Brem F, Hirt AM, Winklhofer M, Frei K, Yonekawa Y, Wieser H-G, Dobson J. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampus tissue. *JR. Soc. Interface*. 2006;3:833–41.
15. Moos T, Morgan EH. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann. NY Acad. Sci*. 2004:1012–4.
16. Vainshtein M, Suzina N, Kudryashova E, Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. *Biology of the Cell*. 2002;94:29–35.
17. Hautot D, Pankhurst QA, Khan N, Dobson J. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue. *Proc. Biol Sci.* – 2003;7(270):62–64.
18. Rowe PA, Kavanagh K, Zhang L, James H, Harwood Jr, Wagner JD. Short-term hyperglycemia increases arterial superoxide production and iron dysregulation in atherosclerotic monkeys. *Metabolism*. 2011;60(8):1070–80.
19. Soloperto G, Casciaro S. Progress in atherosclerotic plaque imaging. *World J Radiol*. 2012;4(8):353–71.

Стаття надійшла до редакції
05.07.2013



УДК 616.44-008.6:616.891-092.9

О.М. Демченко

ПСИХО-ЕМОЦІЙНИЙ СТАТУС ЩУРІВ ЗА УМОВ ДИСФУНКЦІЇ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра фізіології

(зав. – д. мед. н., проф. О.Г. Родинський)

Дніпропетровськ, 49044, Україна

SE "Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine"

Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

e-mail: demchenko-em@rambler.ru

Ключові слова: психо-емоційний стан, експериментальний гіпер- гіпотиреоз, спонтанна поведінкова активність, тривожність, анксиолітичний ефект, гамааміномасляна кислота (ГАМК)

Key words: psycho-emotional state, experimental hyper- and hypothyroidism, spontaneous behavioral activity, anxiety, anxiolytic effect, gamma-aminobutyric acid (GABA)

Реферат. Психо-емоциональный статус крыс при дисфункции щитовидной железы. Демченко Е.М. Исследовалась спонтанная поведенческая активность белых крыс и концентрация глутамата, глицина и ГАМК в неокортексе в условиях экспериментального гипер- и гипотиреоза. Было установлено, что избыток тиреоидных гормонов сопровождался эмоциональным дефицитом и анксиолитическим эффектом по показателям уменьшения продолжительности грумिंगа на 37%, увеличению количества переходов и времени пребывания в освещенных рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (26% и 35%). Такие изменения поведения происходили на фоне увеличения концентрации ГАМК в неокортексе животных с экспериментальным гипертиреозом на 52% ($p < 0,05$). Возможно, психо-емоциональный статус организма модулируется тиреоидными гормонами через ГАМК-эргическую медиаторную систему неокортекса.