

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО КАРТИРОВАНИЯ МАКРОЭЛЕМЕНТАРНОГО СОСТАВА ТКАНИ СЕРДЦА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОДХОДОВ НАНОТЕХНОЛОГИЙ, А ИМЕННО СКАНИРУЮЩЕГО ТРАНСМИССИОННОГО МИКРОСКОПА

Комисов А. А.¹, Осипова О. А.¹, Шепель Р. Н.², Драпкина О. М.³, Осипов П. Г.¹, Плаксина К. Г.¹, Малай Н. В.¹

Цель. Разработка полуколичественного и количественного неразрушающего метода анализа распределения химических элементов в миокарде массой до 100 мг (аутопсия).

Материал и методы. Разработка методики количественного картирования макроэлементного состава проводилась на биологических образцах аутопсии сердца 18 здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии, погибших в результате дорожно-транспортных происшествий. Биологические образцы делились на 3 части, из которых две части по 1 г и одна 0,1 г, соответственно. Части массой 1 г использовались для установления референтных значений и калибровки детектора, при этом часть в 0,1 г являлась исследуемым образцом. Пробоподготовка для атомно-эмиссионной спектроскопии осуществлялась по стандартной методике. Результаты определения концентраций интересующих макроэлементов принимались за референтные значения. Картирование элементного состава ткани проводилось с использованием методов нанотехнологий: сканирующей (СЭМ FEIQuanta 200) и сканирующей трансмиссионной (СТЭМ; FEI NovaNanoSEM) электронной микроскопии.

Результаты. В результате выполненного проекта впервые получена методика повышения точности картирования макроэлементного состава биологических образцов, в частности тканей органов человека, методом РФА. Полученные данные позволяют исследовать распределение микро и макроэлементов в миокарде, что, в свою очередь, даст возможность при сравнительном анализе судить о дислокациях, очагах и областях патологических концентраций химических элементов в ткани у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Заключение. Разработанный метод картирования макроэлементного состава биологических образцов методом РФА позволяет увеличить точность картирования макроэлементного состава биологических образцов в сто раз до 10-30 ppm, что является количественным картированием макроэлементного состава биологических образцов и несет практическую значимость для медицины. Полученные данные позволяют исследовать распределение микро и макроэлементов в миокарде, что открывает возможность при сравнительном анализе судить о распределении, очагах и областях патологической кон-

центрации химических элементов в ткани у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Российский кардиологический журнал 2016, 12 (140): 18–22

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-12-18-22>

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ, макроэлементы, микроэлементы, миокард, картирование.

¹ФГАОУ ВПО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород; ²ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва; ³ФГБУ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава России, Москва, Россия.

Комисов А. А. — инженер-электроник, соискатель кафедры госпитальной терапии, Осипова О. А. — д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной терапии, Шепель Р. Н.* — аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, Осипов П. Г. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной хирургии, Плаксина К. Г. — аспирант кафедры госпитальной терапии, Малай Н. В. — д.ф.-м.н., профессор кафедры теоретической и математической физики.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): r.n.shepel@mail.ru

РФА — рентгенофлуоресцентный анализ.

Рукопись получена 25.03.2016

Рецензия получена 30.03.2016

Принята к публикации 06.04.2016

SCANNING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY FOR QUANTITATIVE MAPPING OF MACROELEMENT CONTENTS OF CARDIAC TISSUE

Komisov A. A.¹, Osipova O. A.¹, Shepel R. N.², Drapkina O. M.³, Osipov P. G.¹, Plaksina K. G.¹, Malay N. V.¹

Aim. Development of semiquantitative and quantitative nondestructing method to analyze the spread of chemical elements in myocardium mass up to 100 mg (autopsy).

Material and methods. The development was performed on biological specimens of cardiac autopsy of 18 healthy persons without cardiovascular pathology died in traffic accidents. Biological specimens were divided into 3 parts, of those 2 parts by 1 g and one — 0,1 g, respectively. Parts of 1 g mass were used for reference range grounding and fine tune of the detector, and the 0,1 g part was the studied specimen. Preparation of specimens was done by standard methodology. The results of macroelements concentration measurement were taken as reference range. Mapping of element contents was done with nanotechnologies: scanning (SEM FEIQuanta 200) and scanning-transmission (STEM; FEI NovaNanoSEM) electronic microscopy.

Results. As a result of the study, first time the method for quality improvement was defined for the mapping of macroelementary contents of biological specimens, i.e. tissues of human organs, with x-ray fluorescent analysis. The data makes it to study the spread of micro- and macroelements in myocardium that provides benefits in comparatory analysis, assessing dislocations, foci of pathological concentrations of elements in tissues of cardiovascular patients.

Conclusion. The method of macroelement contents mapping of biological specimens with x-ray fluorescence makes it to improve the precision of mapping of macroelementary contents in biological specimens 100 times up to 10-30 ppm, which is itself a quantitative mapping, and has benefits for practical implication in clinical medicine. The data makes it to study the spread of micro- and macroelements in myocardium, which opens the opportunity to do comparison of the spread, foci and regions of pathological concentration of chemical elements in the tissue of cardiovascular patients.

Russ J Cardiol 2016, 12 (140): 18–22

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-12-18-22>

Key words: x-ray fluorescent analysis, macroelements, microelements, myocardium, mapping.

¹Belgorod State National Research University, Belgorod; ²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health, Moscow; ³National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Health, Moscow, Russia.

На протяжении многих десятилетий и по сегодняшний день проводятся исследования, направленные на выявление взаимосвязи между патологическими процессами и метаболизмом макроэлементов в живом организме. Круг заболеваний, при которых исследуются изменения элементного состава тканей ограничен, к ним относятся онкологические заболевания, сахарный диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы [1].

При изучении активности метаболических процессов в организме необходимо измерить или оценить объем разных пулов, чтобы получить информацию о скорости, а также интенсивности биохимического процесса [2]. Гораздо более информативным может представляться изучение количественных соотношений между элементами и выявление корреляций между их содержанием. Значения атомных и ионных радиусов, энергий ионизации, координационных чисел, склонность к образованию связей с одними и теми же биолигандами обуславливают эффекты, наблюдаемые при взаимном замещении ионов. Механизмы взаимодействия на молекулярном уровне между двумя и более элементами являются очень сложными и знания в этой области все еще очень поверхностны [3].

Нанотехнологии, и в частности, сканирующая электронная микроскопия обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами. Например, по сравнению с традиционной световой микроскопией она отличается значительно большими разрешающей способностью и глубиной резкости; относительной легкостью в интерпретации полученных изображений благодаря их трёхмерному представлению; возможностью подключения дополнительных приборов для анализа в нанодиапазоне при достаточной простоте в адаптации и управлении этими приборами [4]. Также необходимо отметить сравнительно низкие требования к пробоподготовке. По сравнению со сканирующей зондовой сканирующая электронная микроскопия позволяет исследовать существенно большие участки поверхности; работать с сильно рельефными поверхностями [5]; использовать значительно более широкий диапазон увеличений; получать информацию не только о поверхности, но и о прилегающих к поверхности “подповерхностных” слоях [6].

Концентрирование анализируемых элементов требует химически грамотного подхода к выбору используемых реагентов. Процедура разложения образцов биологических тканей может внести существенный вклад в общую погрешность анализа, является трудоемкой, длительной, а также требует использования дорогих высококачественных реагентов. Поэтому в практике рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) предпочтение отдается способам пробоподготовки без предварительного разложения образца [7].

Наиболее сложным представляется анализ образцов биотканей малой массы, от десятков до нескольких миллиграммов. Эта проблема часто возникает при исследо-

вании конкретных локальных участков, затронутых патофизиологическими процессами, при исследовании материала биопсии. В таком случае, количество сухого биологического образца может составлять менее 20 мг, последующее растирание и прессование таких образцов может быть вообще невозможно из-за неизбежных потерь материала [8]. Примеры работ, где количественный РФА цельных образцов биологических тканей проводится напрямую, крайне немногочисленны [9]. При данных обстоятельствах проблема несоответствия характеристик стандартных и исследуемых образцов возникает особенно остро. Прямой анализ цельных образцов биологической ткани с минимальной пробоподготовкой является перспективной возможностью и неоспоримым достоинством метода РФА.

Наиболее близким по своим признакам, принятым за прототип, является метод картирования элементного состава образца при помощи сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 200 и программного пакета Edax Genesis[®] (2015, EDAX inc.), заключающийся в анализе характеристического рентгеновского излучения от исследуемого объекта, возникающего вследствие его облучения электронами с энергией 15-30 кэВ. Основным недостатком прототипа является то, что он дает приемлемые результаты в случаях, когда исследуемыми образцами являются материалы неорганического происхождения, которые не деформируются под длительным воздействием электронного излучения.

Целью данной работы являлась разработка полуколичественного и количественного неразрушающего метода анализа распределения химических элементов в тканях массой до 100 мг (аутопсия).

Материал и методы

Работа выполнена на базе Центра трансплантации органов Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа, на кафедрах госпитальной терапии и госпитальной хирургии Медицинского института НИУ “БелГУ” и Научно-образовательного и инновационного центра “Наноструктурные материалы и нанотехнологии” НИУ “БелГУ”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-34-51236 “мол_нр” — “Компоненты межклеточного матрикса в формировании фиброза почек и миокарда у пациентов с артериальной гипертензией”.

Разработка методики количественного картирования макроэлементного состава проводилась на биологических образцах аутопсии сердца 18 здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии, погибших в результате дорожно-транспортных происшествий.

Критериями включения в исследование считали: 1) верифицированный в условиях судебно-медицинской экспертизы результат аутопсии здоровых тканей у лиц без сердечно-сосудистой патологии, погибших

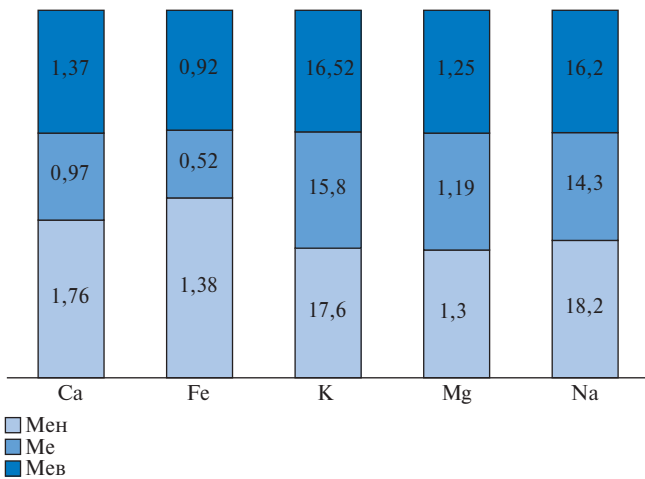


Рис. 1. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых (mg/L).

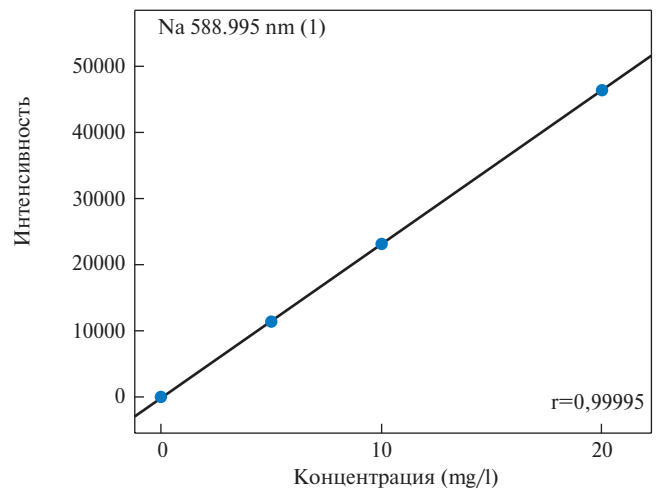


Рис. 2. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых. Содержание Na (mg/L).

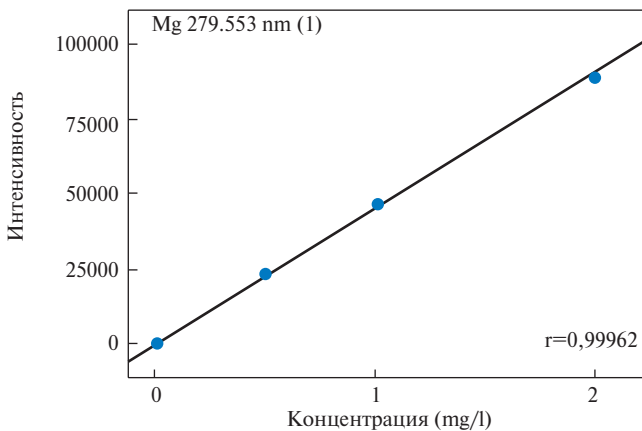


Рис. 3. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых. Содержание Mg (mg/L).

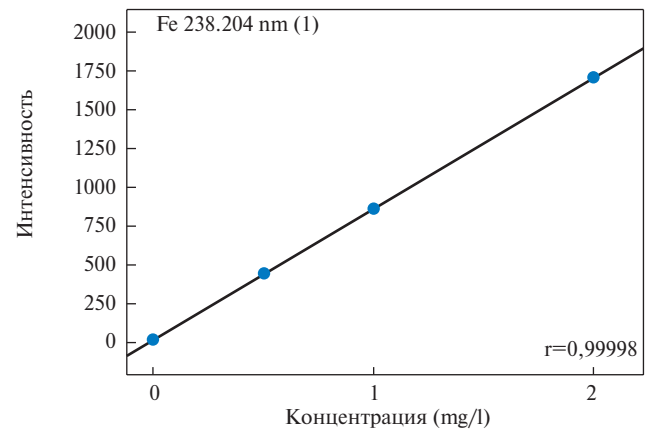


Рис. 4. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых. Содержание Fe (mg/L).

в результате дорожно-транспортных происшествий; 2) наличие массы образца ткани не менее 2,1 г.

В исследование не включались пациенты: с сопутствующими острыми воспалительными, инфекционными, онкологическими, аутоиммунными заболеваниями; с хроническими заболеваниями в стадии обострения; со стабильными нарушениями внутрижелудочковой проводимости; с острой и хронической почечной недостаточностью (креатинин плазмы >2,5 мг/дл); с хроническими неспецифическими заболеваниями легких; с анемией, с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, в том числе: с острым инфарктом миокарда; с критическими стенозами митрального и аортального клапанов (площадь митрального отверстия <0,8 см², площадь отверстия аортального клапана 0,7-0,5 см²); с врожденными пороками сердца, патологией перикарда, кардиомиопатией,

с перенесенными оперативными вмешательствами в ближайшие 6 месяцев, с высокой злокачественной артериальной гипертензией.

Биологические образцы делились на 3 части, из которых две части по 1 г и одна 0,1 г. Части массой 1 г использовались для установления референтных значений и калибровки детектора, а часть в 0,1 г являлась исследуемым образцом. Пробоподготовка для атомно-эмиссионной спектрометрии осуществлялась по стандартной методике [10]. Результаты определения концентраций интересующих макроэлементов принимались за референтные значения.

Пробоподготовка для электронной микроскопии. Калибровочный образец спрессовывался до размеров тонкой пластинки толщиной 1-2 мм с целью минимизации эффекта поглощения рентгеновского излучения в образце, эффекта матрицы, а также эффекта автофлуоресценции. Далее калибровочный образец дегидри-

ровался при помощи ацетона или методом лиофильной сушки [11]. Для калибровки проводилось исследование элементного состава со всей поверхности образца. Полученные результаты корректировались при помощи дискриминатора до получения результатов количественного анализа РФА одного порядка или до совпадения с данными атомно-эмиссионной спектрометрии. Исследуемый образец массой до 0,1 г дегидрировался при помощи этилового спирта и не подвергался механическому воздействию.

Картирование элементного состава ткани проводилось с использованием методов нанотехнологий: сканирующей (СЭМ FEIQuanta 200) и сканирующей трансмиссионной (СТЭМ; FEI NovaNanoSEM) электронной микроскопии.

Результаты и обсуждение

В ходе выполнения исследовательской работы нами был разработан и опробован новый метод картирования макро- и микроэлементного состава биологических тканей малой массы (биопсии, аутопсии).

Первым этапом исследования было определение референтных значений элементного состава здоровых тканей методом атомно-эмиссионной спектрометрии (рис. 1-6). Установлено, что по данным калибровочной кривой определена линейная зависимость интенсивности исследуемого излучения от концентрации химического элемента. Анализ состава основных элементов показал, что медиана химического состава тканей миокарда распределялась следующим образом [Me (Мев; Мен), mg/L]: Ca 1,37 (0,97; 1,76), Fe 0,92 (0,52; 1,38), K 16,52 (15,8; 17,6), Mg 1,25 (1,19; 1,30). Полученные данные согласуются с результатами РФА-СИ [12]. Выявлено, что в группе здоровых тканей величина коэффициента корреляции по абсолютной величине для Na составила $r=0,99995$, Mg — $r=0,99962$, Fe — $r=0,99998$, K — $r=0,99927$, Ca — $r=0,99971$, что говорит о наличии тесной корреляционной связи концентрации и интенсивности излучения света определенной длины волны (для Ca 393,366 нм; Fe 238,204 нм; K 766,490 нм; Mg 279,553 нм; Na 588,995 нм).

В работе произведен способ количественного картирования макроэлементного состава биологических образцов с корректировкой получаемого сигнала характеристического рентгеновского излучения (ХРИ) от биологического образца при помощи дискриминатора, т.е. осуществлено увеличение точности результатов картирования до 10-30 ppm. Установлено, что методика картирования должна быть выполнена по элементам, для которых определены референтные значения концентраций, полученные при помощи атомно-эмиссионной спектрометрии ($p<0,05$) (рис. 7). В других случаях эксперимента выявлена недостоверная точность исследования, которая не превышала предела разрешения РФА (1000-3000 ppm) ($p>0,05$) (рис. 8).

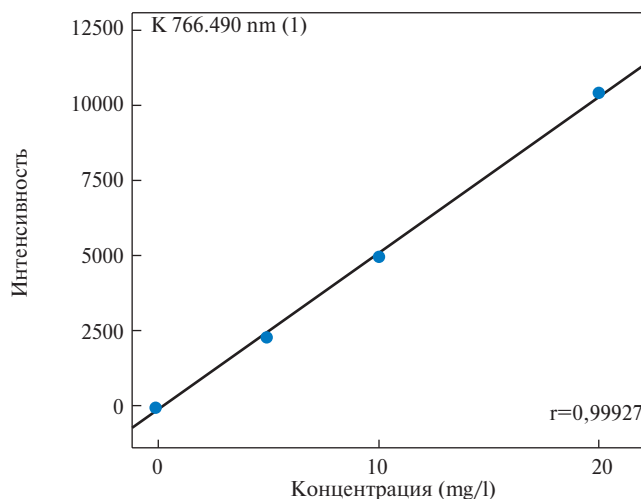


Рис. 5. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых. Содержание K (mg/L).

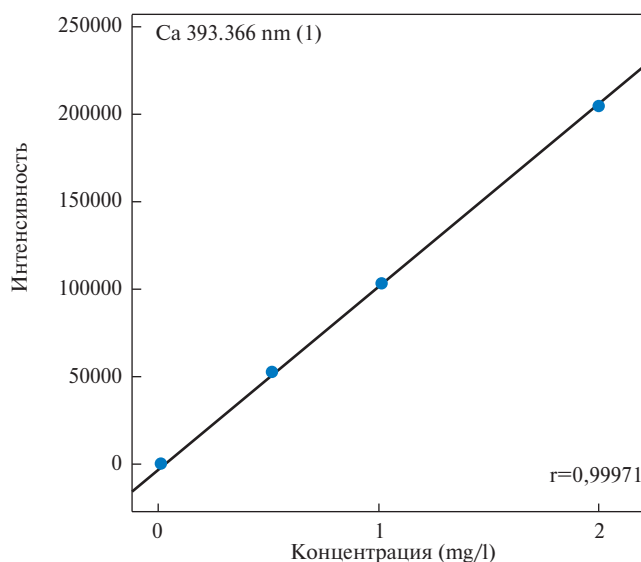


Рис. 6. Элементный состав аутопсии сердца здоровых лиц без сердечно-сосудистой патологии. Концентрация химических элементов методом калибровочных кривых. Содержание Ca (mg/L).

Полученные данные в нашей работе по разработке нового метода исследования тканей миокарда относятся к медицинской биофизике. Методика может быть использована для количественного определения распределения концентраций химических элементов в биологическом образце.

В результате выполненного проекта впервые получена методика повышения точности картирования макроэлементного состава биологических образцов, в частности тканей органов человека, методом РФА. Используемый в данной работе способ пробоподготовки образцов биологической ткани миокарда является простым, доступным и эффективным.

Полученные данные позволяют исследовать распределение микро и макроэлементов в мио-

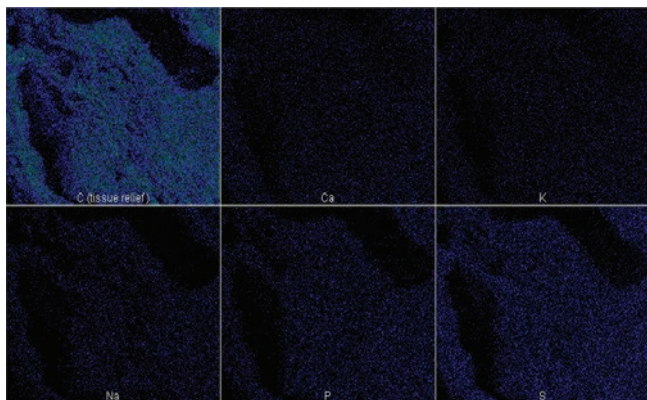


Рис. 7. Картирование ткани миокарда левого желудочка человека по С, Са, К, Na, P, Sc калибровкой детектора. Показатели концентраций согласуются с результатами атомно-эмиссионной спектрометрии.

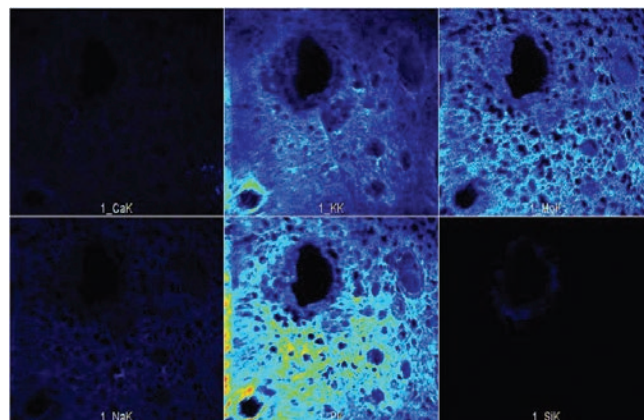


Рис. 8. Картирование ткани легкого человека по, Са, К, Na, Mg, P, Si без калибровки детектора. Очевидное завышение показателей концентрации элементов.

карде, что, в свою очередь, даст возможность при сравнительном анализе судить о дислокациях, очагах и областях патологических концентраций химических элементов в ткани у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Эта информация является клинически важной и информативной, т.к. каждый химический элемент напрямую связан с одним или несколькими биохимическими процессами в организме человека, нарушение которых является прямым маркером патологических процессов.

Из недостатков метода следует отметить, что точность метода до сих пор уступает разрушающим методам анализа, таким как атомно-эмиссионная спектрометрия и масс-спектрометрия, дающим точность результатов до 1 ppb. Однако, главным достоинством полученного способа картирования является минимальное количество операций и реагентов, применяемых к исследуемому образцу биоткани. При необходимости исследование может проводиться на кали-

бровочном образце, выбор зависит от поставленных перед исследователем задач.

Заключение

Разработанный способ картирования макроэлементного состава биологических образцов методом РФА заключается в определении референтных значений концентраций макроэлементов методом атомно-эмиссионной спектрометрии и калибровке детектора РФА при помощи дискриминатора таким образом, чтобы результаты исследования калибровочных образцов совпадали. Предлагаемый метод позволяет увеличить точность картирования макроэлементного состава биологических образцов в сто раз до 10-30 ppb, что является количественным картированием макроэлементного состава биологических образцов и несет практическую значимость для медицины. Полученный результат исследования требует продолжения поисков для сравнительного анализа биоматериалов здоровых тканей и при патологии.

Литература

- Sidorina AV. Optimization methods for determining the elemental composition of biological objects by XRF-SR. [dissertation] Novosibirsk; 2015. Russian (Сидорина А.В. Оптимизация методики определения элементного состава биологических объектов методом РФА-СИ: Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск; 2015. Доступно по: <http://niic.nsc.ru/institute/dissertatsionnyj-sovet/predvaritelnoe-rassmotrenie/919-predvaritelnoe-rassmotrenie-14> (24 Декабря 2015)).
- Zholnin AV. Chemistry of nutrients: lecture notes for general chemistry. Chelyabinsk ChelGMA, 2001; 38p. Russian (Жолнин А.В. Химия биогенных элементов: конспект лекций по общей химии. Челябинск: ЧелГМА, 2001; 38 с.).
- Popkov VA, Zholnin AV. General chemistry: textbook. GEOTAR Media 2012; 400p. Russian (Попков В.А., Жолнин А.В. Общая химия: учебник. ГЭОТАР-Медиа 2012; 400 с.).
- Jasnikov IS, Nagornov JuS, Gorbachev IV, et al. Scanning electron microscopy as a method for studying the macroscopic objects electrolytic. Fundamental research in 2013; 1-3: 758-64 Russian (Ясников И.С., Наргоров Ю.С., Горбачев И.В. и др. Сканирующая электронная микроскопия как метод изучения микроскопических объектов электролитического происхождения. Фундаментальные исследования 2013; 1-3: 758-64).
- Nagornov JuS, Jasnikov IS, Tjur'kov MN. Methods for studying surfaces by atomic force and electron microscopy: a tutorial. Togliatti: TSU 2012; 58 p. Russian (Наргоров, Ю.С., Ясников И.С., Торьков М.Н. Способы исследования поверхности методами атомно-силовой и электронной микроскопии: учебное пособие. Тольятти: ТГУ 2012; 58 с.).
- Krishtal MM, Jasnikov IS, Polunin VI, et al. Scanning electron microscopy and microanalysis in the examples of practical application. Technosphere 2009; 208p. Russian (Криштал М.М., Ясников И.С., Полуни В.И. и др. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ в примерах практического применения. Техносфера 2009; 208 с.).
- Margui E, Queralt I, Grieken R. Sample preparation for X-Ray fluorescence analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry: New York, John Wiley & Sons 2009; — a6806m.pub2.
- Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. Spectrochim. Acta. Part B. 1996; 51(3): 291-319.
- Margui E, Queralt I, Hidalgo M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. Trac-Trend. Anal.Chem. 2009; (3): 362-72.
- Zaksas NP, Nevinsky GA. Solid sampling in analysis of animal organs by two-jet plasma atomic emission spectrometry. Spectrochim. Acta. Part B. 2011; 66: 861-5.
- Van Grieken RE, Markowicz AA. Handbook of X-ray Spectrometry — Methods and Techniques, Marcel Dekker, New York, 1993; 704 p.
- Punshon T, Jackson BP, Lanzirrotti A, et al. Application of synchrotron X-ray microbeam spectroscopy to the determination of metal distribution and speciation in biological tissues. Spectrosc. Lett. 2005; 38: 343-63.