

## РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

Т.А. Куприянова<sup>1</sup>, О.И. Лямина<sup>1</sup>, М.Н. Филиппов<sup>1</sup>, Т.М. Юрина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова “Российский геронтологический научно-клинический центр”, Москва

Методом рентгенофлуоресцентного микроанализа проведено сравнение аналитических сигналов – относительных интенсивностей  $K_{\alpha}$ -линий элементов. Получены признаки, характерные для проб с различной патологией желудка. Показана возможность выявления особенностей проб биоптатов слизистой оболочки желудка без количественных определений содержаний элементов. Найдено значимое различие аналитических сигналов Zn, Ca, Fe, Cu, K и P в пробах с атрофическим гастритом, эрозией, язвой и гиперплазией желудка. Предложенный способ анализа был использован для исследования динамики состояния слизистой желудка.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный микроанализ, микроэлементы, медицинские объекты, слизистая оболочка желудка

### Введение

Одним из важнейших и обязательных условий нормального функционирования организма является стабильность химического состава его тканей. Отклонения в содержании химических элементов вызываются экологическими, профессиональными, климатогеографическими факторами, а также заболеваниями, и могут быть маркерами состояния здоровья.

В состав желудка входят основные химические элементы: O, C, H, N, K, Cl, P, S, Na, (в порядке убывания содержания от 67 % для O до 0,1 % для Na), суммарное их количество составляет 99,97 % всей массы желудка. Содержания Mg, Ca, Fe, Zn составляют от 0,01 % (Mg) до 0,002 % (Zn). Значения содержаний микроэлементов Br, Rb, Cu, Zr составляют от  $6 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \div 2 \cdot 10^{-4}$  %. Содержания остальных элементов находятся на еще более низком уровне – до  $10^{-8}$  %.

Слизистая оболочка желудка имеет сложное строение: ее поверхность помимо клеток

покровного эпителия включает еще 5 типов клеток, составляющих желудочную железу, а также мышечную пластинку и подслизистую основу. Толщина слизистой оболочки варьируется от 0,2 до 2,5 мм [1]. Эти факторы в значительной мере ограничивают получение правильных результатов ее элементного состава любым инструментальным методом анализа.

Задача настоящего исследования – методом рентгенофлуоресцентного микроанализа (РФМА) выявить возможные идентификационные признаки, характеризующие количественное содержание макро- и микроэлементов слизистой оболочки желудка при различных патологических состояниях.

Систематические исследования подобного рода не проводились. В литературе имеются отдельные работы, по определению содержания микроэлементов в слизистой оболочке желудка в основном в связи с онкологической патологией [2–5].

## Объекты анализа

Объектом исследования служили биоптаты слизистой оболочки желудка. Отбор проб производили при гастродуоденальном эндоскопическом исследовании. Исследованы пробы пациентов с различной патологией желудка: атрофический гастрит (13 проб), острая язва желудка (13 проб), гиперплазия слизистой желудка (6 проб). Перед проведением исследования пробы площадью 2–5 мм<sup>2</sup> и толщиной от 1 до 3 мм высушивали на воздухе и закрепляли на химически чистом двустороннем углеродном скотче.

## Аппаратура и методика анализа

Для изучения элементного состава использовали метод РФМА, позволяющий определять элементы от Na до U в широком диапазоне содержаний (от 100 % до 10<sup>-3</sup> %, а в некоторых случаях до 10<sup>-4</sup> %). РФМА выполнен на рентгенофлуоресцентном микроанализаторе Orbis (EDAX, США)\* с капиллярной оптикой, позволяющем получать аналитический сигнал от области пробы диаметром 30 мкм. Условия анализа: Rh-трубка, напряжение 40 кВ, ток 400 мкА, вакуум, детектор с дисперсией по энергии с разрешением 132 эВ. В каждом образце исследовали по 5–10 зон. Время регистрации рентгеновского спектра от одной зоны составляло 100 с.

В основу методики анализа было положено сравнение аналитических сигналов – интенсивностей (и их отношений) характеристического рентгеновского излучения элементов в исследуемых пробах. Вычисления содержаний элементов и построения градуировочной характеристики при таком подходе не требуется, следовательно, нет необходимости и в подборе адекватных образцов сравнения с известным элементным составом.

## Результаты анализа

На рис. 1 приведено оптическое изображение пробы слизистой оболочки желудка. Черным выделена зона генерации аналитического сигнала. Для каждой исследуемой зоны



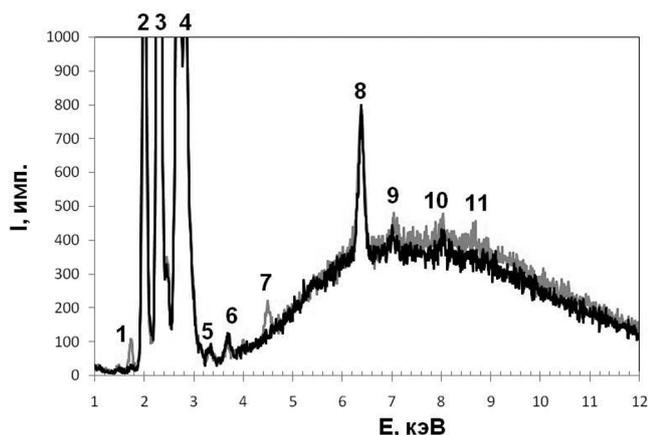
0.5 mm Mag : 70x

**Рис. 1.** Изображение поверхности анализируемой пробы биоптата слизистой оболочки желудка

получен рентгеновский спектр, по которому проводили идентификацию элементного состава анализируемой области. Среди полученных спектров можно выделить отличающиеся как набором элементов, так и интенсивностью отдельных характеристических линий. В спектрах, полученных от разных проб, зафиксированы значимые превышения над фоновым излучением характеристических линий K-серии элементов: Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr, Zr.

При этом набор достоверно фиксируемых линий различается не только для разных проб, но иногда и в одной пробе в разных зонах пробы. Так, например, можно выделить спектры, в которых отсутствуют характеристические линии Zn, спектры, в которых присутствуют линии Ni, или спектры, в которых наблюдается одновременное повышение интенсивности характеристических линий Ca и Zn. На рис. 2 приведены спектры в диапазоне энергий от 1 до 12 кэВ от двух зон, полученные от пробы с атрофическим гастритом. Видно значимое превышение над фоном для линий  $K\alpha$ ,  $CaK\alpha$ ,  $FeK\alpha$ ,  $FeK\beta$ ,  $CuK\alpha$ ,  $ZnK\alpha$ . В диапазоне 2–3 кэВ имеется ряд высокоинтенсивных линий:  $PK\alpha$ ,  $SK\alpha$ , а также линии L-серии Rh (анод рентгеновской трубки) с  $ClK\alpha$ . Следует заметить, что в спектрах из различных участков одной и той же пробы могут регистрироваться различные элементы. Например, в одной зоне пробы надежно фиксируются аналитические линии  $SiK\alpha$  и  $TiK\alpha$ , тогда как в другой зоне их нет (рис. 2).

\* Аппаратура предоставлена ООО "Системы для микроскопии и анализа"

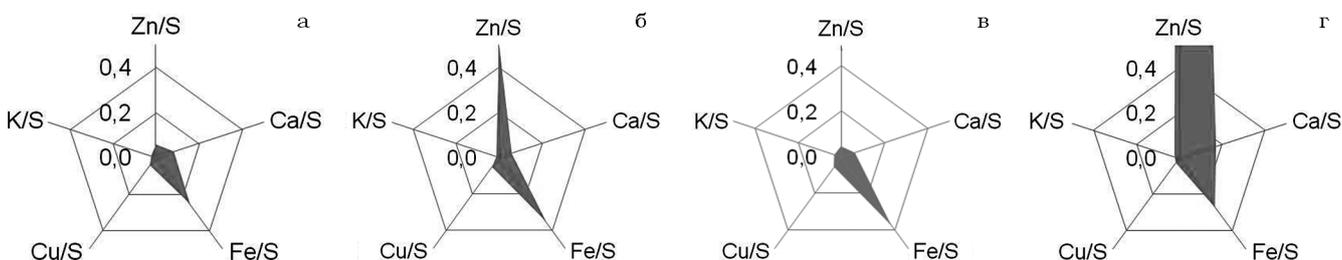


**Рис. 2.** Рентгеновские спектры от двух зон одной и той же пробы (атрофический гастрит): 1 –  $\text{SiK}_\alpha$ , 2 –  $\text{PK}_\alpha$ , 3 –  $\text{SK}_\alpha$ , 4 –  $\text{RhL}_{\alpha,\beta} + \text{ClK}_\alpha$ , 5 –  $\text{KK}_\alpha$ , 6 –  $\text{CaK}_\alpha$ , 7 –  $\text{TiK}_\alpha$ , 8 –  $\text{FeK}_\alpha$ , 9 –  $\text{FeK}_\beta$ , 10 –  $\text{CuK}_\alpha$ , 11 –  $\text{ZnK}_\alpha$

Нами было показано [6], что для решения многих медицинских задач в качестве информативного сигнала достаточно использовать не содержание элемента, а непосредственно сам аналитический сигнал. Неоднородность пробы и связанное с ней изменение аналитического сигнала, полученного от разных зон пробы, изучали сканированием по линии или по площади. На величину такой неоднородности влияет не только неоднородность по составу, а также и меняющаяся локальная плотность пробы. Учет разной плотности пробы в рентгенофлуоресцентном анализе обычно проводят с использованием рассеянного излучения анода рентгеновской трубки [7]. Следует заметить, что используемые при этом пики когерентного и некогерентного рассеяния  $\text{RhK}_\alpha$  (20,2 кэВ и 18,8 кэВ, соответственно) находятся в спектральном диапазоне, весьма удаленном от

большинства аналитических линий изучаемых микроэлементов (например,  $\text{FeK}_\alpha$  – 6,4 кэВ,  $\text{ZnK}_\alpha$  – 8,6 кэВ), и особенно для излучения легких элементов (например,  $\text{SK}_\alpha$  – 2,3 кэВ). В таком случае компенсация влияния локального изменения плотности пробы может быть неэффективной. Рассеянное излучение L-серии Rh находится в изучаемом спектральном диапазоне ( $\text{RhL}_\alpha$  – 2,7 кэВ), но использование его для получения относительных интенсивностей аналитических линий элементов невозможно из-за наложения на линию  $\text{ClK}_\alpha$  (2,62 кэВ), всегда присутствующую в данных объектах. Поэтому для учета различий зон пробы по плотности и возможной толщине интенсивности аналитических линий нормировали на интенсивность  $\text{K}_\alpha$ -линии серы, как наиболее равномерно распределенного элемента в пробе. Для расчета брали интенсивности линий за вычетом фоновой составляющей спектра.

На рис. 3а–в приведены диаграммы в координатах “элемент – относительная интенсивность” для аналитических линий K-серии K, Ca, Fe, Cu, Zn. Значения относительных интенсивностей получены нормировкой на значение интенсивности линии серы и соответствуют средним значениям для групп проб с разными патологиями: с атрофическим гастритом, с язвой желудка, с гиперплазией слизистой желудка. Видно, что диаграммы существенно различаются. Для проб с относительно небольшим поражением слизистой (атрофический гастрит) характерны значения относительных интенсивностей K, Ca, Cu, Zn от 0,02 до 0,08, а Fe – 0,25. Для проб с язвой желудка характерно возрастание относительной интенсивности Zn до 0,5, а Fe – до 0,35. Для проб с гиперплазией – возрастание относительной интенсивности Fe до 0,4 при сохранении низких значений для

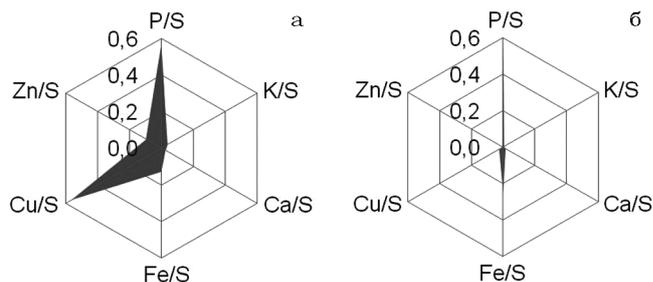


**Рис. 3.** Диаграмма относительных интенсивностей элементов в пробах: а – с атрофическим гастритом (средние значения по 13 пробам); б – с язвой желудка (средние значения по 13 пробам); в – с гиперплазией слизистой желудка (средние значения по 6 пробам); г – с язвой желудка (одна проба, выделяющаяся по Zn).

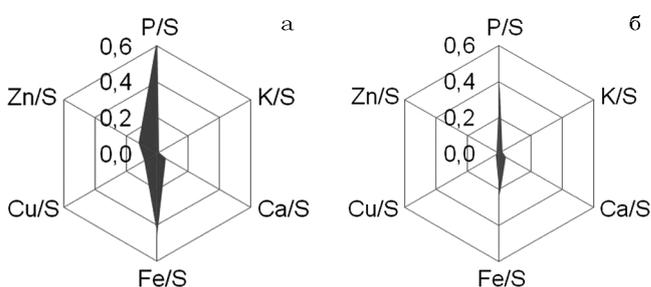
других элементов. Было замечено, что в рамках одной группы проб диаграммы могут довольно существенно различаться. В группе проб с диагностированной язвой желудка одна проба выделялась резко повышенным значением относительной интенсивности Zn до 5,8 (рис. 3г), причем это превышение обнаружено для всех изученных областей пробы.

В основном в пределах одной пробы значения относительных интенсивностей достаточно однородны, эти различия меньше, чем между пробами одной группы. В то же время, возможно наличие характерных особенностей в разных зонах одной пробы. Таким образом, помимо усредненных значений относительных интенсивностей выбранных элементов, спектры, полученные от разных зон, могут нести дополнительную информацию о конкретной пробе.

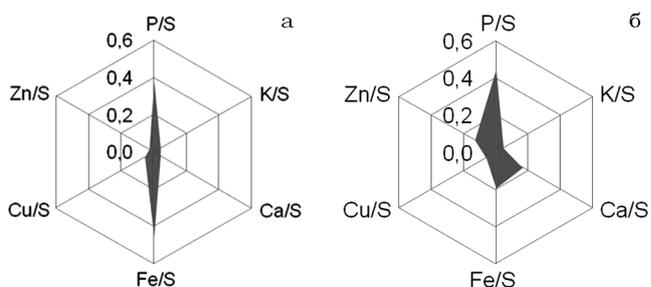
Для оценки возможности изучения динамики заболевания и/или уточнения диагноза были проанализированы начальные и повторные пробы, полученные от трех пациентов, разнесенные по времени. При этом наблюдалась различная динамика развития заболевания. В одном случае лечение шло успешно, во втором были зафиксированы небольшие изменения состояния, в третьем случае наблюдалось обострение заболевания. Результаты исследования течения эпителизации язвы желудка двух пациентов представлены на рис. 4, 5. В обоих случаях при гастродуоденальном эндоскопическом исследовании была диагностирована острая язва желудка. Соответствующие диаграммы относительных интенсивностей элементов представлены на рис. 4а и 5а. На рис. 4б и 5б представлены аналогичные диаграммы от проб с эпителизированной язвой, полученные через 19 и 9 сут лечения соответственно. Видно, что лечение приводит к понижению относительных интенсивностей Ca, Zn, Cu, а в особенности Fe до значений, характерных для относительно спокойного состояния слизистой оболочки желудка. Следует заметить, что после лечения пробы стали более однородны (для всех элементов кроме фосфора и железа). На рис. 6 приведены диаграммы для проб пациента с гиперплазией слизистой желудка. Видно существенное увеличение относительных интенсивностей Zn и Ca. Одновременно было отмечено ухудшение состояния больного через 12 сут.



**Рис. 4.** Диаграммы относительных интенсивностей элементов для пробы с острой язвой желудка до лечения (а) и пробы с эпителизированной язвой после лечения (б)



**Рис. 5.** Диаграммы относительных интенсивностей элементов в пробе с острой язвой желудка до лечения (а) и с эпителизированной язвой после лечения через 9 сут (б)



**Рис. 6.** Диаграммы относительных интенсивностей элементов в пробе с гиперплазией слизистой желудка: а – до лечения, б – через 12 сут

## Выводы

Сравнение относительных интенсивностей  $K_{\alpha}$ -линий элементов позволило выделить признаки, характерные для проб с различной патологией, без количественных определений содержаний элементов.

Использование отношения интенсивности линии определяемого элемента к  $K_{\alpha}$ -линии серы позволило скомпенсировать различия проб по толщине и плотности.

Наиболее информативными при анализе исследованных проб оказались относительные интенсивности  $K_{\alpha}$ -линий Zn, Ca, Fe, Cu, K и P.

Сравнение однородности аналитических сигналов в рамках одной пробы и одной группы проб по выявленному при помощи гистологического исследования заболеванию показало, что однородность каждой отдельной пробы выше. Несмотря на различия аналитических сигналов в пределах одной группы проб, можно выявить существенные различия между группами, относящимися к разным заболеваниям.

Предложенный способ позволяет за 5–10 мин выявить характерные особенности рентгеновского спектра биоптата, связать полученные признаки с имеющейся патологией, и, следовательно, предварительно установить имеющуюся патологию.

Проведенное сопоставление полученных информативных признаков с данными гастродуоденоскопии, цитологических исследований и результатами на наличие *Helicobacter pylori* показало перспективность использования метода рентгенофлуоресцентного микроанализа при гистологических исследованиях, при определении степени тяжести заболевания, динамики развития и уточнения диагноза.

## Список литературы

1. Трифонов Е.В. Пневмапсихосоматология человека. Русско-англо-русская энциклопедия // Санкт-Петербург, Россия, 18 изд. 1996–2015 [Электронный ресурс]: <http://tryphonov.ru/tryphonov2/terms2/stomh.htm#0> (дата обращения 02.09.2015).
2. Yaman M., Kaya G., Yekeler H. Distribution of trace metal concentrations in paired cancerous and non-cancerous human stomach tissues // *World J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 13. № 4. P. 612–618.
3. Reddy S.B., Charles M.J., Raju G.J.N. et al. Trace elemental analysis of carcinoma kidney and stomach by PIXE method // *Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B.* 2003, Vol. 207. № 3, P. 345–355.
4. Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 1997, Vol. 52, No. № 7, P. 1047–1052.
5. Mulware S.Ju. Comparative trace elemental analysis in cancerous and noncancerous human tissues using PIXE. Review Article // *J. Biophys.* 2013. P. 1–8.
6. Куприянова Т.А., Лямина О.И., Филиппов М.Н. и соавт. Рентгенофлуоресцентный анализ тканей молочной железы для выявления онкологической патологии // *Мед. физика.* 2014. № 2(62). С. 32–37.
7. Antoniassi M., Conceizro A.L.C., Poletti M.E. Characterization of breast tissues using Compton scattering // *Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. A.* 2010. Vol. 619. P. 375–378.

## X-RAY FLUORESCENCY ANALYSIS OF GASTRIC MUCOSA

T.A. Kupriyanova<sup>1</sup>, O.I. Lyamina<sup>1</sup>, M.N. Filippov<sup>1</sup>, T.M. Jurina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of Russian Academy of Science, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)

“Russian Gerontology Research Center”, Moscow, Russia

By means of X-ray fluorescent microanalysis the analytical signals – relative intensities of  $K_{\alpha}$  lines of elements are compared. Characteristic signs of probe with various stoma pathology are obtained. The detection possibility of specificity of stomach mucous membrane biopstat without quantitative definitions of elements is shown. Significant distinction of analytical signals of Zn, Ca, Fe, Cu, K and P is found in probes with atrophic gastritis, an erosion, an ulcer and a hyperplasia of a stomach. Possibility of use of the offered way of the analysis for research of dynamics of a state mucous a stomach is shown.

Key words: X-ray spectral analysis, medical objects, microelements, gastric mucosa

E-mail: [kupr@igic.ras.ru](mailto:kupr@igic.ras.ru)