

# ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ПЛАЦЕНТЫ ПО ДАННЫМ ЭНЕРГОДИСПЕРСИОННОГО РЕНТГЕНОВСКОГО МИКРОАНАЛИЗА НА БАЗЕ СЭМ

**Л.Деев, д.м.н., П.Лопашин, д.т.н., Э.Нивеницын, к.т.н., Е.Соловьева,**  
Смоленский государственный медицинский университет,  
**А.Доросевич, д.м.н., С.Моисеев,**  
Смоленский областной институт патологии,  
**И.Новиков, Н.Пахомова,**  
Научно-исследовательский институт глазных болезней,  
glazbol@smolgmu.ru

УДК 618.231, 618.46;  
БАК 02.00.02, 03.01.04

Исследовано процентное содержание некоторых элементов в биопробах плаценты родильниц при нормальном сроке гестации 39–40 недель. Определяли содержание C, N, O, Ca, Cl, K, Na, P, S, Al, Fe, Mg, Si в 70 биоптатах с забором ткани в пяти точках плаценты. Проведена статистическая обработка результатов для двух групп элементов. Выявлены достоверно значимое различие массовых долей некоторых химических элементов ( $p < 0,05$ ) в биоптате независимо от точки забора, а также последовательность представления элементов от большего содержания к меньшему: углерод (C) > кислород (O) > азот (N). Соотношение некоторых химических веществ – общий кислород-углерод, хлор-калий, калий-натрий и хлор-натрий – было стабильным и не зависело от места забора материала.

## ВВЕДЕНИЕ

На основании приказа Минздравсоцразвития РФ от 27.12.2011 года № 1687м установлены новые критерии живорождения в полном соответствии с рекомендациями ВОЗ. С 1 января 2012 года все родившиеся с массой 500 г и более при сроке гестации 22 недели подлежат регистрации в органах ЗАГС [1]. Изменилась структура младенческой смертности и заболеваемости [2, 3]. С 2012 года в официальной статистике учитываются дети с ретинопатией недоношенных (РН), которая составляет 21,6 на 100 тысяч детского населения в возрасте от рождения до 14 лет [4]. Поэтому необходим комплексный подход к изучению проблемы РН для выявления причин возникновения осложнений у детей.

Воздействие различных неблагоприятных факторов на мать и развивающийся плод нарушает процесс накопления в достаточных количествах всех необходимых питательных веществ, что выражается в перераспределении химических элементов [5, 6]. Плацента является полноценным компонентом системы мать – плацента – плод с многочисленными функциями, нарушение которых приводит к разнообразным осложнениям беременности [7]. На настоящий момент детально изучены

отдельные биохимические аспекты в патогенезе РН, которые не представляется возможным корректно обобщить без оценки физико-химического статуса плаценты на уровне органа.

Изучение транспорта химических элементов через плаценту матери к плоду может играть значительную роль в оценке среды обитания, оказывающей значительное влияние на состояние здоровья и адаптацию новорожденного в постнатальной жизни. Наше внимание к изучению уровней содержания некоторых химических веществ в плаценте матерей, родивших как в нормальные (39–40 недель), так и в преждевременные сроки гестации, связано с участием плаценты в жизнедеятельности плода. При этом проводимые исследования неинвазивны и высокоинформативны. Данное исследование посвящено изучению содержания некоторых химических элементов в биопробах плацент родильниц при сроке гестации 39–40 недель. Отметим, что попытки описания элементной химии плаценты были предприняты в середине 20 столетия с применением плазменной спектроскопии и рентгено-флуоресцентного анализа. При относительно высокой чувствительности этих методов они не позволяют контролировать структуру

образца при получении данных о его химическом составе. Это затрудняет анализ сложных неоднородных биологических объектов, приводит к возникновению существенной погрешности, а также исключает корректную оценку содержания главных компонентов электролитов в тканях. Приведем пример химического микрокартирования поверхности биоптатов плаценты (рис.1), выполненного на подготовительном этапе исследования. Очевидна необходимость визуального контроля поверхности образца для исключения влияния следующих факторов:

- паразитных накоплений солевых компонентов электролита в биоптате, возникающих при нарушении условий лиофилизации;
- крупных сосудов, химические компоненты которых не относятся к накоплению элементов в тканях плаценты;
- соединительно-тканых образований, имеющих самостоятельную элементную химию;
- крупных обособленных петрификатов, формально характеризующих патологический процесс, но приводящих к избыточным статистическим выбросам;
- механического загрязнения поверхности биопробы.

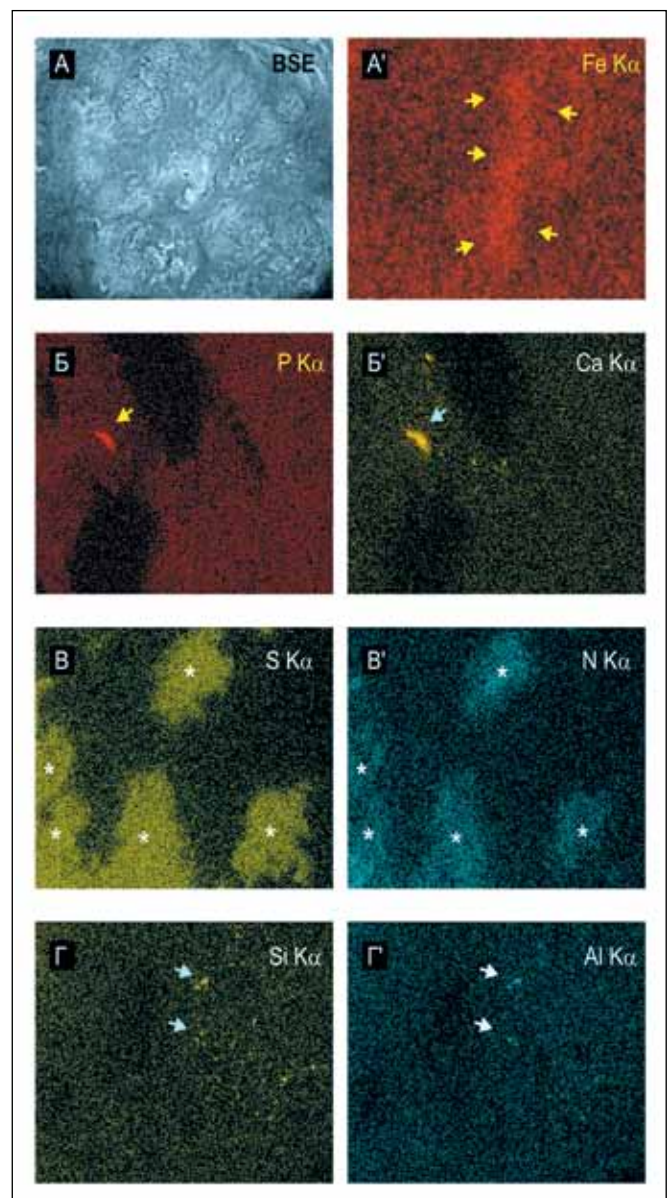
Необходимость визуального контроля распределения химических элементов в биопробах плаценты во время проведения элементного анализа сделала рациональным применение энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС) на базе сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Этот метод допускает качественное и полуколичественное изучение химического состава поверхности биологического образца в режиме низкого вакуума без дополнительной химической обработки, глубокого обезвоживания и напыления токопроводящими материалами.

Цель исследования состояла в изучении содержания химических элементов в биопробах плацент родильниц при сроке гестации 39–40 недель с применением ЭДС на базе СЭМ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало три основных этапа: забор материала плацент, определение содержания некоторых химических элементов в пяти локализациях в плаценте, статистический анализ полученных данных.

Последы для исследования забирали непосредственно после родов, работа проводилась на базе ОГБУЗ "Перинатальный центр" Смоленска. Вырезка плаценты осуществлялась на базе ОГБУЗ "Смоленский областной институт патологии". Изучение особенностей накопления содержания некоторых химических элементов в биоптатах плаценты проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа СЭМ EVOL510 (Zeiss, Германия) с ЭДС Oxford-X-MAX-50 (Oxford, Велико-



**Рис.1.** Примеры биопроб, исключенных из статистической выборки по результатам предварительного качественного химического микрокартирования поверхности. А и А' – изображение в обратно-рассеянных электронах участка биоптата плаценты (А) и данные о распределении Fe на том же участке (А'), которые позволили обнаружить не проявленный в микротопографии сосуд в подповерхностном слое (отмечен стрелками на А'); Б и Б' – пространственное совпадение зон с высоким содержанием фосфора (Б) и кальция (Б'), связанное с наличием обособленного петрификата (отмечен стрелками); В и В' – высокая пространственная корреляция содержания серы (В) и азота (В') в пределах соединительно-тканых образований (отмечено звездочками); Г и Г' – пространственное совпадение зон с высоким содержанием кремния (Г) и алюминия (Г'), связанное с механическим загрязнением частицами силикатного стекла

Таблица 1. Значения описательных статистик химических элементов первой группы

Элемент	M <sub>в</sub> , %	M <sub>с</sub> , %	X <sub>min</sub> , %	X <sub>max</sub> , %	D <sub>в</sub>	σ <sub>в</sub> , %	±Δ, %	γ
C	59,86	60,36	53,65	64,73	7,39	2,72	0,65	0,95
N	12,57	12,66	9,85	14,83	0,9	0,95	0,23	
O	23,27	22,54	18,4	31,27	8,36	2,89	0,69	

британия) в режиме низкого вакуума (70 Па) при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе на образце 470 пА. С этой целью брали биоптаты, предварительно замороженные при температуре -70°C. Избегая полного размораживания, на охлажденной поверхности термokonденсатора из ткани выкраивались уплотненные квадратные блоки со стороной 3 мм и толщиной 0,7 мм.

Для снижения влияния неоднородности структуры и усреднения данных о химическом составе пробы накопление рентгеновского спектра производилось в режиме сканирования прямоугольной области поверхности 2 мм на 2,5 мм с экспозицией 15 мин (включая мертвое время детектора 25–27%) с одновременной визуализацией распределения химических элементов в пределах сканируемого участка. По результатам качественного химического микрокартирования, при выявлении значительных неоднородностей в структуре распределения одного из химических элементов в пределах оцениваемого участка проба исключалась из дальнейшей обработки. Данные о содержании химических элементов условно нормировались и были приведены к 100%-ному весу по каждому образцу, что позволило сравнивать данные на качественном уровне.

В исследовании приняли участие 14 женщин, родивших доношенных детей со сроком гестации в 39–40 недель. Возраст рожениц составлял от 21 года до 33 лет (в среднем 27,35 года).

На качественном уровне (по метрологической классификации) было определено весовое содержание C, N, O, Ca, Cl, K, Na, P, S, Al, Fe, Mg, Si в 70 биоптатах с забором ткани в пяти точках плаценты у каждой испытуемой: в хориальной пластинке, в базальной пластинке, в ворсинчатом хорионе, в пуповине, в оболочках.

После первичной обработки материала химические элементы распределили по трем группам в зависимости от их концентрации в биоптатах. В первую группу вошли вещества, на долю которых приходилось 95,7% веса пробы: углерод, азот и общий кислород. Вторую группу составили химические элементы, общее процентное содержание которых – 4,1%: кальций, хлор, калий, натрий, фосфор, сера. В третью группу попали элементы, удельный вес которых не превышал 1%: алюминий, железо, магний, кремний. Поскольку процентное содержание химических элементов третьей группы в пробах мало, а ошибки округления приво-

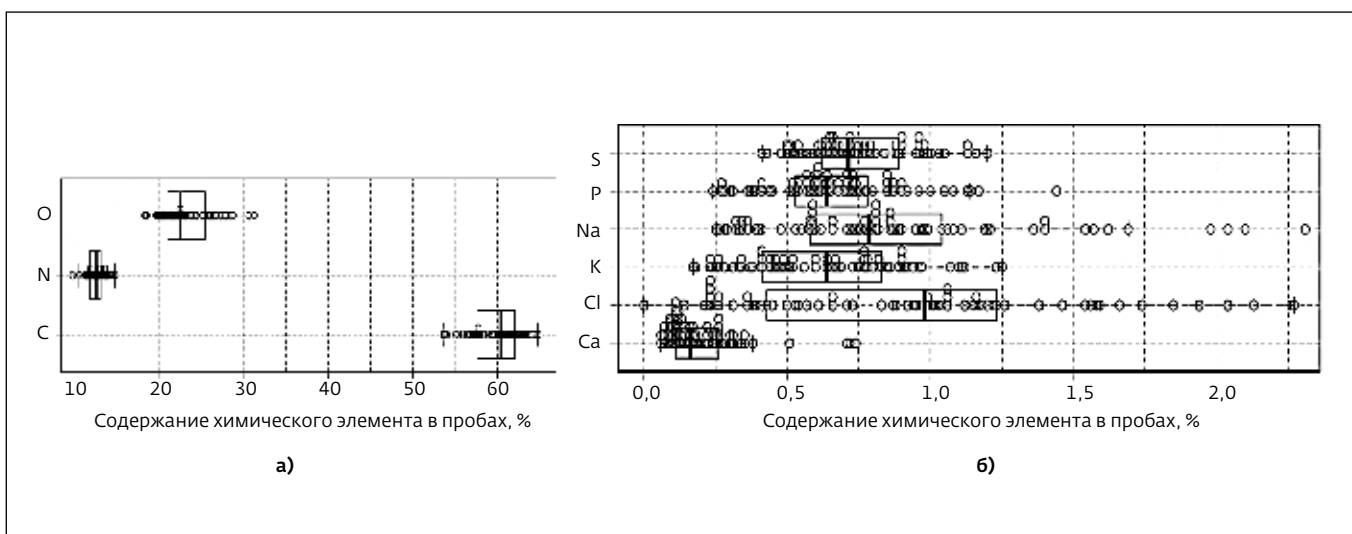


Рис.2. Диаграмма размаха процентных долей химических элементов первой (а) и второй (б) групп

Таблица 2. Значения описательных статистик химических элементов второй группы

Элемент	$M_B, \%$	$M_e, \%$	$X_{\min}, \%$	$X_{\max}, \%$	$D_B$	$\sigma_B, \%$	$\pm\Delta, \%$	$\gamma$
Ca	0,21	0,16	0,06	0,74	0,02	0,14	0,03	0,95
Cl	0,98	0,98	0,14	2,81	0,4	0,63	0,15	
K	0,63	0,64	0,17	1,25	0,07	0,27	0,07	
Na	0,86	0,79	0,25	2,31	0,22	0,47	0,11	
P	0,67	0,64	0,24	1,44	0,06	0,24	0,06	
S	0,75	0,72	0,41	1,20	0,03	0,19	0,04	

дили к большим искажениям экспериментальных данных, элементы этой группы из анализа исключили.

Проверку гипотезы о нормальном законе распределения осуществляли графическим критерием ("метод огибающих" – бутстреппинг) и формальным критерием Пирсона (критерий "хи-квадрат"). Оценку достоверности различий между химическими элементами в первой и второй группе производили непараметрическим критерием Крускала – Уоллиса [8]. При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона, если данные подчинялись нормальному закону распределения, в противном случае использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистического анализа и визуализации данных R версии 3.2.2.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные результаты оценки процентной доли химических элементов в пробе для элементов первой группы представлены на рис.2а.

Описательные статистики химических элементов первой группы представлены в табл.1:  $M_B$  – выборочное среднее;  $M_e$  – медиана;  $X_{\min}$  – минимальное значение;  $X_{\max}$  – максимальное значение;  $D_B$  – дисперсия;  $\sigma_B$  – среднее квадратичное отклонение;  $\pm\Delta$  – предельная ошибка среднего;  $\gamma$  – доверительная вероятность.

Экспериментальные результаты оценки доли химических элементов в пробе для второй группы представлены на рис.2б, а описательные статистики – в табл.2.

Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения процентной доли химических элементов первой группы использовали графический критерий ("метод огибающих" – бутстреппинг), который заключался в извлечении из нормального закона с заданными параметрами 1000 случайных выборок, по 70 наблюдений каждая, их совокупный статистический разброс позволяет дать оценку гипотезы о нормальном распределении вероятности с заданным уровнем значимости (рис.3).

Результаты, полученные по критерию Пирсона для химических элементов первой и второй группы, приведены в табл.3:  $\chi^2_{\text{набл}}$  – наблюдаемая величина,  $\chi^2_{\text{крит}}$  – критическое значение  $\chi^2$ .

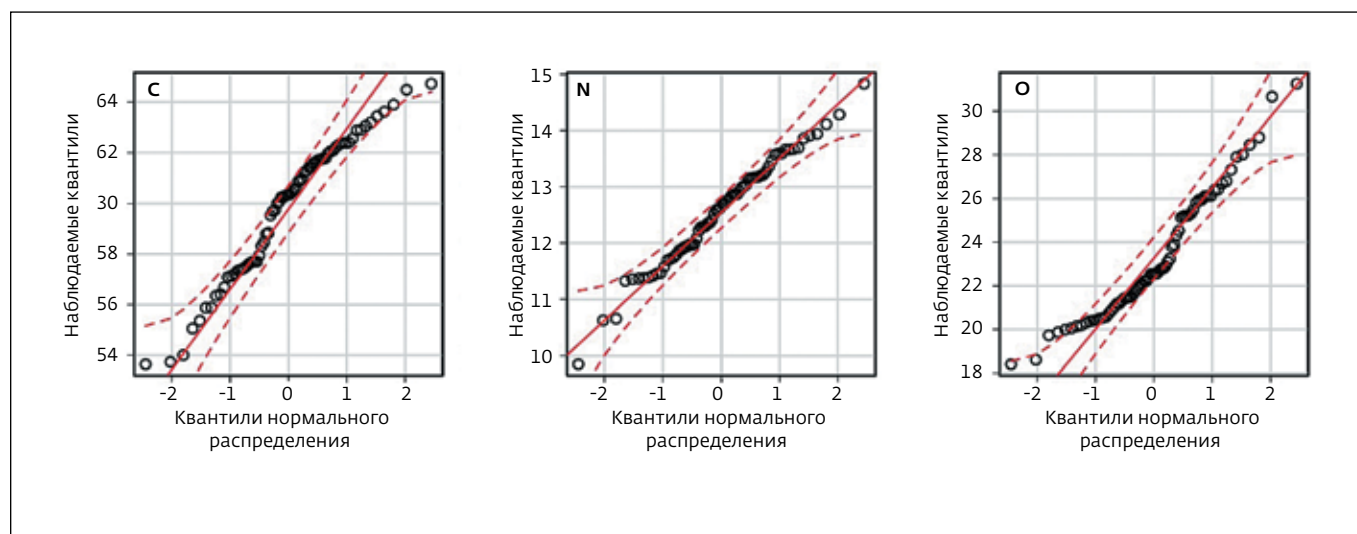


Рис.3. Графики эмпирических квантилей распределения (точки) и границы доверительного интервала (пунктирные линии), полученные в процессе бутстреппинга с уровнем значимости  $p < 0,05$

Таблица 3. Проверка гипотезы на нормальность закона распределения химических элементов первой и второй группы

Элемент	$\chi^2_{набл}$	$\chi^2_{крит}$	$\gamma$	Но*
O	17,36	11,07	0,95	Нет
C	8,72	12,59		Да
N	0,76	9,49		
Ca	2,46	7,81		
Cl	2,79	11,07		
K	2,42	12,59		
Na	4,9	9,46		
P	3,15	11,07		
S	4,19	12,59		

\* Нулевая гипотеза Но – выборка распределена по нормальному закону.

Анализ матриц диаграмм рассеяния позволил выявить наличие корреляционных связей в пробах между процентным содержанием углерода-кислорода, хлора-натрия, хлора-калия (рис.4). Процентное содержание C, N, O в биоплате в зависимости от точки забора показано на рис.5.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Применение для элементного анализа энергодисперсионного спектрометра на базе сканирующего электронного микроскопа позволяет проводить качественный и полуколичественный химический анализ неоднородных биологических объектов. Предварительная визуализация распределения химических элементов в пределах анализируемого участка биопробы необходима для исключе-

ния из статистической выборки проб со значительными выбросами содержаний химических элементов.

На основании результатов, представленных на рис.3, можно сделать вывод о том, что процентное содержание углерода и азота в пробах распределено по нормальному закону, а нулевая гипотеза о нормальном распределении кислорода подтверждения не получила, так как квантили эмпирического распределения выходят за границы доверительного интервала.

Так как гипотеза нормальности закона распределения для каждого из элементов первой группы подтверждения не получила, а элементы второй группы дисперсии имеют большой разброс (0,02–0,22), то для проверки статистически значимых отличий между химическими элементами, как в первой, так и во второй группах, применялся непа-

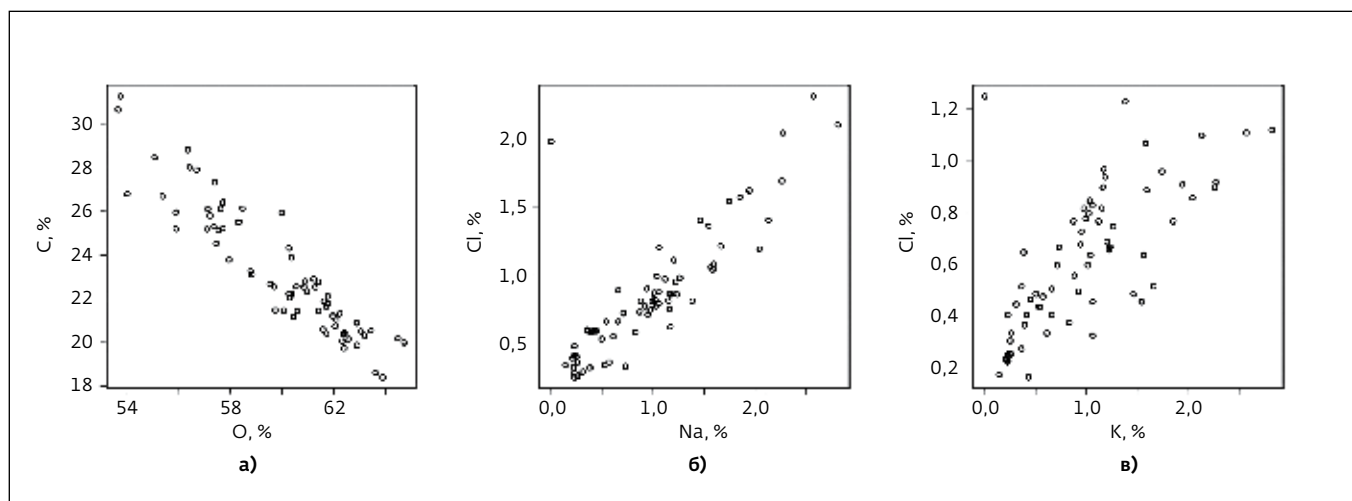


Рис.4. Диаграммы рассеяния химических элементов



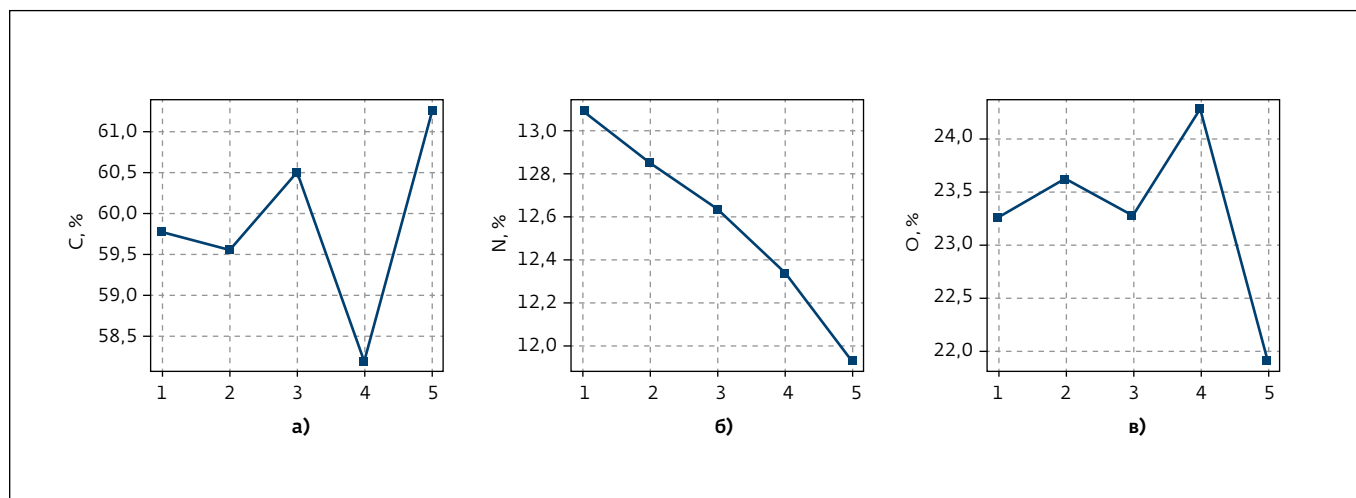


Рис.5. Процентные содержания доли химических элементов (С, N, O) в пробе в зависимости от точки забора биоптата первой группы

раметрический критерий Крускала – Уоллиса. Расчеты показали, что вероятность ошибки первого рода не будет превышать  $p < 0,001$ . Следовательно, различия в процентных долях химических элементов первой группы (С, N, O) и второй группы (Ca, Cl, K, Na, P, S, Al, Fe, Mg, Si) в пробах статистически значимо. По данным литературы уровень концентрации таких макро- и микроэлементов, как O, Na, S, Cl, C, K, Fe, наиболее чувствителен к патологическим изменениям в плаценте [9].

При анализе матричной диаграммы рассеяния химических элементов первой и второй группы выявлены обратно пропорциональная зависимость между изменениями содержания углерода и общего кислорода (рис.4а) и прямо пропорциональная зависимость между процентным содержанием хлор-калий, калий-натрий и хлор-натрий (рис.4б, в). Такое синхронное поведение описано в литературе в отношении содержания таких элементов, как натрий и калий, которое не зависит от точки забора материала [10].

В первой группе, содержащей углерод, азот и общий кислород, проведен корреляционный анализ между процентным содержанием доли химических элементов в пробе в зависимости от точки забора биоптата. Процентная доля углерода и кислорода имеют большой разброс данных (59,77%; 59,57%; 60,51%; 58,21%; 61,25% и 23,27%; 23,63%; 23,28%; 24,27%; 21,91% соответственно), что подтверждается и рассчитанным коэффициентом линейной корреляции Пирсона 0,08 и ранговым коэффициентом корреляции Спирмена для кислорода 0,07. В то же время, содержание азота (13,09%; 12,85%; 12,64%; 12,34%; 11,94%) в пробах свидетельствует о наличии корреляцион-

ной связи, причем его процентное содержание в пробах обратно пропорционально зависит от номера точки (локализации) забора биоптата с коэффициентом корреляции 0,42.

Таким образом, выявленные закономерности в уровнях содержания исследованных элементов в биоптатах плаценты при доношенной беременности могут служить ориентиром для сравнения с плацентой при недоношенной беременности. На последующих этапах нашего исследования планируется выявить изменения в уровнях содержания химических элементов в плаценте при недоношенной беременности и прогностически оценить их влияние на развитие ретинопатии недоношенных.

## ВЫВОДЫ

Использование ЭДС на базе СЭМ позволяет проводить качественную оценку пространственного распределения и содержания химических элементов в биологических образцах с порогом обнаружения от 0,0п процентной доли по весу.

Установлены достоверно значимое различие ( $p < 0,05$ ) массовых долей некоторых химических элементов в биоптате независимо от точки забора материала, а также последовательность представления элементов от большего содержания к меньшему у элементов первой группы:  $C > O > N$ .

При увеличении содержания в пробе общего кислорода наблюдается одновременное снижение в ней углерода во всех точках забора биоптата.

При анализе матричной диаграммы рассеяния некоторых химических элементов второй группы выявлена

прямо пропорциональная зависимость между процентным содержанием хлор-калий, калий-натрий и хлор-натрий.

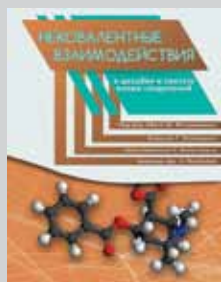
Соотношение содержания некоторых химических веществ – общий кислород-углерод, хлор-калий, калий-натрий и хлор-натрий – остается стабильным независимо от места забора биоптата.

Содержание азота в веществе плаценты обратно пропорционально зависит от точки забора биоптата и снижается от хориальной пластинки до оболочек плаценты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Катаргина Л.А., Михайлова Л.А.** Состояние детской офтальмологической службы в Российской Федерации (2012–2013) // Российская педиатрическая офтальмология. 2015. №1. С. 5–10.
2. **Башмакова Н.В., Мылыгина Г.Б., Литвинова А.М.** Сверхранные преждевременные роды в Уральском федеральном округе: проблемы и перспективы // Акушерство и гинекология. 2014. №7. С. 44–48.
3. **Серова О.Ф., Чернигова И.В., Седая Л.В., Шутикова Н.В.** Анализ перинатальных исходов при очень ранних преждевременных родах // Акушерство и гинекология. 2015. №4. С. 32–36.
4. **Нероев В.В.** Организация офтальмологической помощи населению Российской Федерации // Вестник офтальмологии. 2014. №6. С. 8–12.
5. **Милованов А.П.** Патология системы мать-плацента-плод: руководство для врачей. – М.: Медицина, 1999. 448 с.
6. **Сенькевич О.А., Комарова З.А., Ковальский Ю.Г., Голубкина Н.А., Пучкова Ю.Л.** Содержание в плаценте меди, цинка, селена как предиктор неблагоприятного исхода беременности // Дальневосточный медицинский журнал. 2011. №1. С. 47–50.
7. **Голубкин Н.А.** Флуориметрический метод определения селена // Журнал аналитическая химия. 1995. Т. 5. №5. С. 492–497.
8. **Шпак А.А.** Вопросы статистического анализа в российских офтальмологических журналах // Офтальмология. 2016. №1. С. 73–77.
9. **Малютина Е.А., Павлова Т.В., Петрухин В.А.** Методы сканирующей микроскопии при исследовании структуры матки и плаценты // Научные ведомости. 2011. №22. С. 22–26.
10. **Павлова Т.В., Сумин С.А., Петрухин В.А., Сырцева И.С., Селиванова А.В.** Новое в строении эритроцитов при гипертензивных состояниях на фоне беременности // Научные ведомости. 2012. №22. С. 23–26.

### НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"



Цена 4800 руб.

#### НЕКОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ДИЗАЙНЕ И СИНТЕЗЕ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

под ред. А.М.Маггеррамова, К.Т.Махмудова,  
М.Н.Копыловича, Армандо Дж.Л.Помбейро

В книге проанализированы результаты и движущие силы некоторых реакций, управляемых нековалентными взаимодействиями. В отличие от стандартных учебных курсов по основным химическим дисциплинам, проблема представлена с точки зрения различных областей химии и различных подходов, ее главы написаны учеными разных стран и специальностей. Текст разделен на несколько частей, в которых представлены органический, неорганический и металлоорганический синтез, катализ, получение кристаллов и биоматериалов, а также биохимия и химия материалов. Хотя такое разделение довольно искусственно, оно дает понятие о современных тенденциях исследований и помогает ориентироваться в книге.

Издание будет полезно для читателей, интересующихся разработкой и синтезом новых материалов с ценными свойствами, и приведет к дальнейшему развитию исследований в этой области.

Рекомендовано УМО по классическому университетскому образованию в качестве учебного пособия для студентов старших курсов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Химия».

М.: ТЕХНОСФЕРА,  
2016. – 624 с.  
ISBN 978-5-94836-472-8

#### КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

✉ 125319, Москва, а/я 91; ☎ (495) 234-0110; 📠 (495) 956-3346; ✉ [knigi@technosphera.ru](mailto:knigi@technosphera.ru), [sales@technosphera.ru](mailto:sales@technosphera.ru)