

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

# Procedura przygotowania próbki ludzkiej chrząstki stawu biodrowego do ilościowego oznaczenia metali metodą Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej

## *Procedure of the human articular cartilage sample preparation for the metals' determination by means of Atomic Absorption Spectrometry*

Natalia Merchut, Witold Reczyński

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

---

**ABSTRAKT:** Niniejsza praca dotyczy oznaczania stężeń wapnia, magnezu, cynku, żelaza oraz ołowiu w ludzkiej chrząstce stawowej. Została w niej przedstawiona procedura przygotowania próbki oraz ilościowej analizy wybranych metali w materiale biologicznym. W pierwszej części pracy przedstawiono, z czego składa się i jak funkcjonuje układ ruchu człowieka oraz morfologię chrząstki stawowej. Opisano również zawartość badanych pierwiastków oraz ich rolę w organizmie człowieka. Druga część odnosi się do przygotowania próbki, wybrania metody i doboru odpowiednich parametrów pomiaru.

**ABSTRACT:** This project to determine the concentrations of calcium, magnesium, zinc, iron and lead in human joint cartilage. It will be presented the procedure for preparing the sample for the determination and the development of the related procedure with the designation of complex biological material. The first part of the project presents of which consists the system of human motion, or function, morphology of cartilage damage. The content of studied elements and their role in the human body are also described. The second part refers to sample preparation, selection of the method and selection of appropriate measurement parameters.

---

**Słowa kluczowe:** chrząstka stawowa, Atomowa Spektrometria Absorpcyjna, metale

### 1. Wstęp

Choroby narządu ruchu są poważnym problemem dzisiejszego, starzejącego się społeczeństwa. Łączą się one z bólem, długą i ciężką rehabilitacją, a niekiedy nawet z kalectwem lub implantacją. Postaci choroby zwyrodnieniowej jest wiele, dotyczą one różnych obszarów naszego ciała, jednak etiologia powstawania zwyrodnienia jest podobna i prawie zawsze ma swój początek w chrząstce stawowej. Chrząstki stawowe są nieodłączną i ważną częścią naszego organizmu. Ich główną rolą jest ochrona stawu przed tarciem, jak również jego amortyzacja oraz odpowiedni rozkład obciążeń. Kiedy chrząstka ulega uszkodzeniu i zużyciu przekłada się to na ruchomość całego stawu. Uszkodzenie prowadzi do zapalenia kości oraz stawu. Zapalenie i zużycie stawu według statystyk w większej części dotyczy osób po 50 roku życia (głównie kobiet) oraz osób młodszych, u których spowodowane jest to wcześniejszymi urazami lub chorobami stawów. Choroba zwyrodnieniowa stawów niestety jest chorobą, której nie można wyleczyć, a jedynie łagodzić jej objawy rehabilitacją, czy też leczeniem farmakologicznym lub chirurgicznym.

Leczenie chirurgiczne wiąże się z oczyszczeniem stawu, które ma zmniejszyć ból i poprawić jego funkcję lub z całkowitym wycięciem chorego stawu i wstawieniu w jego miejsce endoprotezy. Najczęściej wymienianymi z powodu chorób zwyrodnieniowych stawami są staw kolanowy oraz staw biodrowy. Czas oczekiwania na taki zabieg uzależniony jest od renomy placówki, w której jest on wykonywany. W większych i uznanych placówkach czas oczekiwania wynosi powyżej jednego roku, a koszt prywatnego zabiegu oscyluje w granicach 20 tysięcy złotych.

Warto więc zapobiegać chorobie zwyrodnieniowej stawów, aby uniknąć bolesnych powikłań z tym związanych. Ważnym etapem jest utrzymywanie stawów w dobrej kondycji ruchowej, co stymuluje

wydzielanie płynu stawowego oraz odpowiednia dieta, która będzie dostarczać organizmowi potrzebnych witamin oraz makro i mikroelementów.

## 2. Układ narządu ruchu

Układ ruchowy człowieka dzieli się na 2 części - czynną i bierną. Do pierwszej z nich zaliczamy mięśnie. Dzięki swojej przyczepności do kości poruszają całym szkieletem. Druga natomiast składa się ze szkieletu, wraz z jego połączeniami, co stanowi podporę dla części miękkich układu. Sam szkielet dorosłego człowieka składa się z 206 kości [1, 2]. Cały obszar kości pokrywa tzw. okostna z wyłączeniem powierzchni stawowych. Te z kolei pokrywa chrząstka stawowa. Pełni ona kluczową rolę w organizmie człowieka, ponieważ dzięki niej jesteśmy w stanie się poruszać.

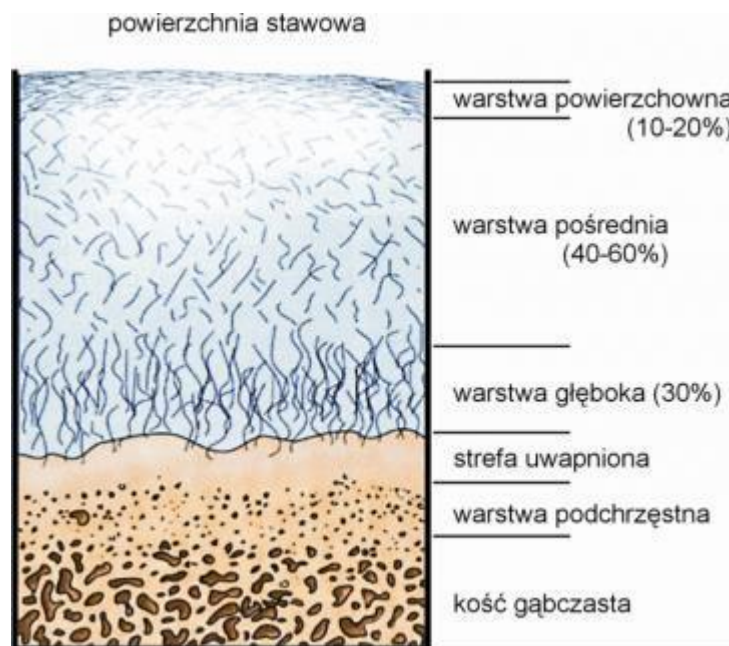
### 2.1. Morfologia chrząstki stawowej

Chrząstka stawowa ze względu na swoją funkcję w organizmie ma wysoką odporność na ścieranie oraz na obciążenia mechaniczne. Sprężystość tkanki, która buduje chrząstkę stawową powoduje możliwość odkształcania się w zależności od sił przenoszonych na stawy, podczas poruszania się całego ciała. Nie posiada ona ani naczyń krwionośnych, ani chłonnych, a co najważniejsze nie jest unerwiona. Odżywianie chrząstki odbywa się drogą dyfuzji składników odżywczych, pochodzących z mazi stawowej, a ta jednocześnie nawilża chrząstkę. Następuje to podczas poruszania się stawów. Niestety jej regeneracja nie jest możliwa, ponieważ nie posiada ona ochrzęstnej, od której mogłaby się odbudować. Może to prowadzić do ograniczeń ruchomości stawu, co powoduje zrastanie się jamy stawowej [4, 5].

### 2.2. Struktura chrząstki stawowej

Chrząstka budowana jest z komórek mezenchymalnych chondrocytów oraz z macierzy wraz ze zrębem proteoglikanowym i włóknami kolagenowymi [6].

Jak pokazano na poniższym rysunku (**Rysunek 1**), ma ona budowę warstwową, a każda z warstw pełni złożoną rolę w jej budowie. W warstwie powierzchniowej, która jest w bezpośrednim sąsiedztwie jamy stawowej, znajdują się równolegle ułożone włókna kolagenowe, kwas hialuronowy oraz niewielkie ilości glikozaminoglikanu. Ma ona grubość 3  $\mu\text{m}$  [5] i pełni funkcję ochronną dla głębiej leżących struktur chrzęstnych. W warstwie pośredniej, stanowiącej od 40 – 60 % objętości, włókna kolagenowe ułożone są skośnie. Kolejną warstwą jest warstwa głęboka, w której włókna kolagenu mają ułożenie prostopadłe oraz graniczy ona ze strefą uwapnioną. Ta z kolei bezpośrednio styka się z warstwą podchrzęstną kości. Dzięki układowi warstwowemu włókien kolagenowych, chrząstka odporna jest na ścieranie, obciążenia oraz zapewnia odpowiednią amortyzację, co za tym idzie, idealnie pełni swoją funkcję chroniąc układ ruchu przed uszkodzeniem [4,5].



Rysunek 1. Struktura chrząstki stawowej [6].

### 3. Makroelementy i mikroelementy – charakterystyka badanych pierwiastków i ich rola w organizmie

W organizmie człowieka aż 60 pierwiastków ma wpływ na prawidłowe funkcjonowanie całego układu. Ze względu na ich zawartość w organizmie oraz wartość dziennego zapotrzebowanie dzieli się je na dwie grupy:

- Makroelementy – są to pierwiastki których zawartość przekracza 0.01%, a dzienne zapotrzebowanie wynosi ponad 100 mg, np. magnez i wapń.
- Mikroelementy – pierwiastki, których zawartość w układzie wynosi poniżej 0.01%, a dzienne zapotrzebowanie nie przekracza 100 mg, np. cynk i żelazo [7].

#### 3.1 Żelazo

Żelazo w organizmie ludzkim występuje w ilości ok. 3 – 4 g. Ok. 75 % całego żelaza w postaci jonów dwuwartościowych  $Fe^{2+}$  znajduje się w hemoglobinie i odpowiada za przyłączenie cząstki tlenu lub dwutlenku węgla oraz ich transport z płuc do tkanek. Dodatkowo żelazo znajduje się również w mioglobinie, która jest białkiem umożliwiającym pobieranie tlenu z krwi, które to białko jest niezbędne do prawidłowej pracy mięśni. Pierwiastek ten wchodzi też w skład szpiku kostnego, gdzie zużywany jest do produkcji prekursorów erytrocytów – erytoblastów. Część żelaza magazynowana jest w śledzionie, wątrobie i wcześniej wspomnianym szpiku kostnym w postaci białka (ferrytyny), co stanowi ochronę organizmu w razie jego niedoboru. Wraz z żywnością dostarczamy żelazo hemowe  $Fe^{2+}$  (w mięsie) oraz w postaci niehemowej  $Fe^{3+}$  (produkty pochodzenia roślinnego). Forma hemowa jest dużo lepiej przyswajalna dla całego ustroju (ok. 25-50%), niż forma niehemowa (ok. 1-10%), natomiast organizm redukuje jony  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  co odbywa się dzięki feroreduktazie [7, 8].

#### 3.2 Cynk

W organizmie człowieka zawiera się średnio 2 – 4 g cynku, z czego aż 90 % tego pierwiastka znajduje się w kościach i mięśniach. Jak ważne jest jego znaczenie biologiczne dowodzi fakt, że

wchodzi on w skład ok. 2000 białek, a wśród nich jest 400 enzymów, w których ma swój udział. Cynk wchłaniany jest w przewodzie pokarmowym w granicach 58-77%, natomiast 70 – 80% wydalane jest z kałem [7]. Za transport cynku odpowiedzialny jest transporter metali dwuwartościowych DCT1, który transportuje nie tylko cynk, ale także jony żelaza, kadmu, miedzi, wapnia, magnezu, czy też ołów [9]. Cynk odpowiada głównie za syntezę białek, wzrost i różnicowanie komórek organizmu, prawidłowe działanie hormonów, prawidłowy stan kośćca, wpływa również w dużym stopniu na układ immunologiczny, zwiększając odporność na zakażenia [10].

### 3.3 Wapń

Wapń jest jednym z głównych makroelementów, który w 99 % wchodzi w skład kości w postaci związanej jako apatyty. Pozostała część występuje w płynie śródkomórkowym i pozakomórkowym w postaci zjonizowanej [11]. Według badań, w naszym organizmie znajduje się go ok. 900 – 1300 g. Zapotrzebowanie tego pierwiastka zależy od etapu rozwoju człowieka: dzieci i młodzież potrzebują go ze względu na to, że występuje gwałtowny wzrost kośćca, dorosły osobnik natomiast potrzebuje go tyle, aby utrzymać odpowiednią masę i twardość kości, a z kolei ludzie starsi do spowolnienia procesu degeneracji kośćca [9]. Sam etap mineralizacji kości jest procesem złożonym, wynikającym z samej przyswajalności wapnia w organizmie. Aby zwiększyć inhibicję absorpcji wapnia niezbędne jest dostarczanie szeregu związków do ustroju. Składniki diety, które warunkują przyswajalność wapnia przez kość to między innymi: fosfor, witamina C i D, magnez, białko i inne mikroelementy. Wszystkie te związki powinny być dostarczane w odpowiedniej ilości, bo ich nadmiar może prowadzić do niebezpiecznych powikłań. Dzięki temu, że w kościach odkłada się większa część wapnia, pełnią one funkcję magazynu tego pierwiastka. W ciągu 24h u osoby dorosłej z kości wydzielają się do płynów ustrojowych i krwioobiegu ok. 700 mg wapnia i tyle samo odkłada się w nich ponownie. Wobec tego wapń w kościach zostaje w równowadze ilościowej z poziomem wapnia w osoczu krwi [12].

### 3.4 Magnez

Magnez to biopierwiastek, który jest niejako pierwiastkiem życia z uwagi na to, że aktywuje ponad 300 enzymów odpowiedzialnych za procesy życiowe komórek w naszym organizmie. Dotyczą one między innymi: metabolizmu kwasów nukleinowych, tłuszczów i węglowodanów, obniżają poziom cholesterolu we krwi, chronią układ krążeniowy np. przed niedokrwieniem, wspomagają układ nerwowy oraz pracę naszego mózgu [8]. Magnez jest również głównym pierwiastkiem potrzebnym do mineralizacji i odpowiedniego rozwoju kości. Jego funkcja głównie opiera się na aktywacji syntezy kolagenu oraz procesów kostnienia, ponad to stymuluje komórki kościotwórcze, aby umożliwić wbudowanie wapnia w strukturę kośćca. Głównym warunkiem dla prawidłowego funkcjonowania gospodarki wapnia i magnezu jest ich stosunek ilościowy, który powinien wynosić 2:1 [12].

### 3.5 Ołów

Zaliczany jest do metali ciężkich, który w środowisku nie ulega degradacji ani rozpadowi, a ponadto kumuluje się w organizmach żywych. Głównymi źródłami narażenia człowieka na ołów są farby, woda pitna, żywność, gleba oraz samo powietrze. Ołów jest dostarczany do organizmu człowieka głównie przez układ pokarmowy (dzienna dopuszczalna dawka nie powinna przekraczać 100 µg) oraz układ oddechowy (dopuszczalne stężenie ołowiu w powietrzu w Polsce to 0.5 µg/m<sup>3</sup> na dobę) i u osoby dorosłej wchłaniany w ok. 10%, natomiast u dzieci aż w 50%. Pierwiastek ten dzieli się na wolnowymienne (okres półtrwania 2 – 27 lat) oraz szybkowymienne (30 dni). Forma szybkowymienne gromadzi się w krwi i tkankach miękkich, natomiast forma wolnowymienne w kościach, zębach i paznokciach. Ołów obecny w krwi łączy się z białkami osocza, dodatkowo blokuje działanie makro- i mikroelementów, co powoduje zaburzenie pracy centralnego i ośrodkowego układu nerwowego,

układu krwionośnego, nerek i wątroby. W kościach skumulowane jest aż 95 % ołowiu zawartego w organizmie. Wykazuje on zdolność zastępowania jonów wapnia, przez co wbudowuje się w strukturę kości. Odpowiednia dieta bogata w wapń i fosfor pozwala na zapobieganie akumulacji tego metalu w kościach. Oprócz wapnia, dobrym antagonistą ołowiu są też cynk i miedź. Związki ołowiu z organizmu przede wszystkim wydalone są z moczem, kałem oraz mlekiem kobiecym [13, 14].

#### **4. Procedura przygotowania próbek chrząstki stawowej do analizy metodą Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej**

Analiza ludzkiej chrząstki stawowej obejmowała opracowanie procedury przygotowania próbki do ilościowego oznaczania metali metodą Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej (ASA) z użyciem techniki płomieniowej oraz elektrotermicznej, w zależności od badanego metalu.



**Rysunek 1.** Chrząstka przed rozdrobnieniem w moździerz agalitywym.

##### *4.1. Odczynniki*

- Kwas azotowy o stężeniu 65%, Suprapur, Merck, Niemcy
- Nadtlenek wodoru (perhydrol) o stężeniu 30%, Suprapur, Merck, Niemcy
- Woda redestylowana

##### *4.2. Aparatura i wyposażenie*

- Mineralizator firmy Anton Paar Multiwave 3000 (Szwajcaria)
- Kolby miarowe - 25ml
- Pipety na 6 i 2 ml
- Suszarka
- Moździerz agalitywy
- Nożyczki
- Waga analityczna

##### *4.3. Metodyka*

- i. Zliofilizowane próbkę chrząstki umieścić w suszarce w temperaturze 105°C na 1 dobę.
- ii. Próbkę rozdrobnić w moździerz agalitywym lub za pomocą nożyczek.
- iii. Po rozdrobnieniu odważyć na wadze analitycznej po ok. 50 mg próbki.
- iv. Odważoną próbkę ilościowo przenieść do naczyń teflonowych mineralizatora.

- v. Do każdego z naczyń dodać po 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz 6 ml HNO<sub>3</sub>, równocześnie przygotowując próbę odczynnikową „0”.
- vi. Przygotowane wkłady przenieść do naczyń reakcyjnych i umieścić w mineralizatorze.
- vii. Przed uruchomieniem mineralizatora należy ustawić odpowiedni program mineralizacji (**Tabela 1**)
- viii. Po mineralizacji roztwory przenieść ilościowo do kolb na 25 ml i dopełnić wodą redestylowaną do kreski.
- ix. W tak przygotowane próbkach bezpośrednio lub po odpowiednim rozcieńczeniu mierzyć stężenia metali metodą ASA.

**Tabela 1.** Program mineralizacji wraz z parametrami.

Moc [W]	Czas przyrostu mocy mikrofal [min]	Czas procesu [min]
300	10	10
800	10	10
0	5	30

## 5. Podsumowanie

Założeniem prowadzonych badań było opracowanie metodyki dla ilościowego oznaczenia metali w złożonym materiale biologicznym jakim jest chrząstka stawowa.

Już na etapie przygotowania próbki do mineralizacji wystąpiły pierwsze trudności, związane z rozdrobnieniem chrząstki. Włókna kolagenowe, które wchodzi w jej skład uniemożliwiły w znacznym stopniu rozdrobnienie chrząstki w moździerzu, nawet po uprzednim jej wysuszeniu przez 1 dobę w temperaturze 105°C. Dlatego do rozdrobnienia użyto dodatkowo nożyczek. Po wysuszeniu masa próbki pierwotnej zmniejszyła się, czego przyczyną było odparowanie wody, którą chłonie zliofilizowany materiał.

Przed bezpośrednimi pomiarami próbek opracowano procedurę przygotowania próbki oraz metodykę oznaczania stężenia pierwiastków, których spodziewano się w najwyższych stężeniach – magnez i wapń. Sprawdzono również, czy nie występują interferencje pochodzące ze składników matrycy próbki. Aborbancja była liniowa dla próbek rozcieńczonych w stosunku 1:2, co świadczyło o tym, że nie występują interferencje chemiczne. Do pomiarów wybrano technikę płomieniową z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej ze względu na niewielkie różnice w porównaniu z metodą dodatku wzorca.

Opracowana procedura przygotowania próbki do oznaczenia oraz dobranie odpowiednich parametrów pozwoliło dokładnie i precyzyjnie oznaczyć badane pierwiastki oraz stwierdzić, że efekty matrycowe nie występują w istotnym stopniu.

## Literatura

- [1] prof. dr med. A. Krechowicki, prof. zwyczaj. dr med. F. Czemiński, Zarys anatomii człowieka, PZWL Warszawa, 2014
- [2] prof. dr hab. A. Michajlik, prof. dr hab. W. Ramotowski, Anatomia i fizjologia człowieka, wyd. V, Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2006
- [3] Anatomia człowieka z elementami fizjologii, pod redakcją J. Skrzat oraz J. Wołoch, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2010
- [4] Chrząstka stawowa – budowa, biomechanika i etiologia powstawania uszkodzeń, dr inż. P. Kaczka,
- [5] Morfologia i funkcja chrząstki stawowej, B. Cizek, Zakład Anatomii Prawidłowej Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie, Acta Clinica, Tom 1 Nr 1, Marzec 2011

- [6] <http://www.widuchowski.medycynasportowa.pl/aktualnosci/40/nowoczesne-leczenie-uszkodzen-chrzastki-stawowej>, data wejścia: 05.03.2018
- [7] Iron and zinc – the main trace elements necessary for the proper body function, dr n. farm. M. Kuras, dr n. farm. M. Zielińska-Pisklak, K. Perz, mgr farm. Ł. Szeleszczuk, *Lek w Polsce*, VOL 25 NR 05'15 (288), s. 6-13.
- [8] Magnez, wapń, żelazo – jak mądrze je suplementować, M. Miernik, *Świat przemysłu farmaceutycznego*, 2/2016, s. 94-98
- [9] *Journal of Laboratory Diagnostics*, B. Gapys, A. Raszeja-Specht, H. Bielarczyk, 2014; 50(1), s. 45-52
- [10] [http://www.sfd.pl/Rola\\_cynku\\_w\\_organismie\\_21-t102318.html](http://www.sfd.pl/Rola_cynku_w_organismie_21-t102318.html), data wejścia: 07.05.2018
- [11] <http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/1403Szeleszczuk/Szeleszczuk.html>, data wejścia: 08.05.2018
- [12] [https://www.pfm.pl/baza\\_chorob/mineraly-w-ustroju/wchlaniania-wapnia-a-tempo-wzrostu-kosci-i-jej-sila/1068](https://www.pfm.pl/baza_chorob/mineraly-w-ustroju/wchlaniania-wapnia-a-tempo-wzrostu-kosci-i-jej-sila/1068), data wejścia: 08.05.2018
- [13] Ołów – Czy jest się czego obawiać?, I. Krzywy, E. Krzywy, M. Pastuszak-Gabinowska, A. Brodkiewicz, *Roczniki Pomorskiej Akademiai Medycznej w Szczecinie*, 2010, 56, 2, s. 118–128
- [14] [https://www.pfm.pl/baza\\_chorob/mineraly-w-ustroju/olow-8211-ciagle-niebezpieczny-dla-zdrowia/1002](https://www.pfm.pl/baza_chorob/mineraly-w-ustroju/olow-8211-ciagle-niebezpieczny-dla-zdrowia/1002), data wejścia: 08.05.2018