

рование долгоживущих метаболитов данных анаболических стероидов и/или заблаговременной отменой приема данных анаболических стероидов атлетами. Дальнейшая идентификация и изучение метаболического профиля оксаболонина и норболонина позволит сформировать новые подходы для долгосрочного допинг-контроля данных запрещенных в спорте соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rzeppa, S.* Analysis of sulfate metabolites of the doping agents oxandrolone and danazol using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry / S. Rzeppa, L. Viet // *J. Chromatogr.* – 2016. В. 1029. P. 1–9.
2. *Massé, R.* Studies on Anabolic Steroids 11-Gas Chromatography-Mass Spectrometric Characterization of Oxandrolone Urinary Metabolites in Man / R. Massé, H. Bi, Ch. Ayotte, R. Dugal // *Biomedical and environmental mass spectrometry.* – 1989. – Vol. 18. – P. 429–438.
3. *Barbarulo, M. V.* Capillary GC-MS Investigation of the Metabolism and Excretion of Oxabolone in Man / M. V. Barbarulo, Fr. Buiarelli, M. Ciardi, A. Giarrusso, F. Hosati // *J. High Resol. Chromatogr.* – 1995. – Vol. 18. – P. 705–708.
4. *Guddat, S.* Synthesis, characterization, and detection of new oxandrolone metabolites as long-term markers in sports drug testing / S. Guddat, G. Fußhöller, S. Beuck, A. Thomas // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – P. 405.
5. *Marcos, J.* Current LC-MS methods and procedures applied to the identification of new steroid metabolites / J. Marcos, O. J. Pozo // *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 2016. – Vol. 162. – P. 41–56.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТА СЕЛЕНА В БИОСУБСТРАТАХ ДЕТЕЙ С КОСТНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ МЕТОДОМ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО-СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

RESEARCH OF SELENIUM MICROELEMENT CONTENT IN CHILDREN'S BIOSUBSTRATES WITH BONE PATHOLOGY BY ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY WITH INDUCTIVELY COUPLED PLASMA

И. В. Дребенкова¹, В. А. Зайцев¹, Т. В. Жукова²

I. Drebenkova¹, V. Zaitsev¹, T. Zhukova²

¹Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь
spectrometric@rspch.ru

²Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии,
г. Минск, Республика Беларусь
ortoped@mail.belpak.by

¹Scientific practical centre of hygiene, Minsk, Republic of Belarus

²Republican scientific and practical centre for traumatology and orthopedics,
Minsk, Republic of Belarus

Исследовано содержание микроэлемента селена в сыворотке крови у пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника. Показано, что содержание селена в сыворотке крови детей с костной патологией находится в интервале 0,001–52,26 мкг/л. Проведен сравнительный анализ результатов исследования по отношению к «условной норме». Выявлена недостаточность содержания селена в сыворотке крови у пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника.

Selenium microelement content in the blood serum of the patients' with progressive inborn spinal deformations was studied. It was shown that selenium content in the blood serum of children with bone pathology is between 0,001–52,26 mcg/l. The results' comparative analysis was performed in relation to the conventional rate. The lack of selenium content in the blood serum of patients with progressive inborn spinal deformations was detected.

Ключевые слова: атомно-эмиссионная спектрометрия, деформация позвоночника, сыворотка крови, биосубстраты, минерализация, микроэлемент, селен, методика.

Keywords: atomic emission spectrometry, spinal deformation, blood serum, biosubstrates, mineralization, microelement, selenium, methodology.

С помощью современных методов медицинской диагностики ученые предпринимают попытки найти взаимосвязь содержания микроэлементов в биосубстратах человека и вероятностью возникновения различных заболеваний.

Широко известна проблема низкого содержания микроэлементов в организме при различных патологических состояниях, в том числе при остеопорозе, заболеваниях костей и суставов [1].

Нормальный метаболизм костей возможен только при естественном содержании макро- и микроэлементов в окружающей среде, отклонения от которого любого из них оказывает влияние на состояние костной ткани.

Несмотря на огромную важность для организма химических элементов, до настоящего времени нет четкого представления об их конкретной физиологической значимости и количественном содержании в различных средах организма в норме и патологии, а существующие сведения слабо систематизированы.

Сведения об исследовании статуса микроэлементов при патологии костной системы также весьма скудны в связи с небольшим объемом проведенных исследований.

В организме человека селен участвует в метаболических процессах всех органов и тканей. Так, этот микроэлемент участвует в активном выведении из организма тяжелых металлов: ртути, марганца, свинца, кадмия. Без белков, содержащих селен, невозможно протекание процессов формирования костной и хрящевой тканей, а также поддержание работы скелетных и гладких мышц. В сочетании с витамином Е и другими антиоксидантами селен, обладая противовоспалительным свойством, облегчает течение ревматоидного артрита. Этот микроэлемент участвует в формировании ферментов синовиальной оболочки хрящей позвоночника и суставов, способствует увеличению двигательной активности в суставах, в связи с чем применяется в лечении остеохондроза, артроза, остеоидистрофии.

По научным данным недостаточность селена является предрасполагающим фактором достаточно многих патологических состояний, в том числе болезни Кашина-Бека. Изучение патогенеза этих «микроэлементозов природного и техногенного происхождения» помогает в разработке патогенетически обоснованных способов лечения и профилактики этой группы костно-суставных заболеваний [1].

Установлено, что недостаток селена в пище оказывают большое влияние на механические свойства костной ткани. Модули эластичности исследуемых групп экспериментальных животных были на 15–30 % ниже контрольных значений. Исследование костной ткани под световым микроскопом показало, что изменения похожи на остеомаляцию [2].

Во многих странах статус селена у пациентов с остеопорозом в литературе не описан. В Беларуси интерес к исследованию связи между микроэлементами, оказывающими влияние на ортопедические заболевания, в частности, селеном, параметрами костной ткани и возможностью профилактики этих патологий очевиден, так как территория Беларуси относится к так называемым геохимическим провинциям с низким содержанием селена в почве.

Данная работа посвящена исследованию методом атомно-эмиссионной спектроскопии содержания микроэлемента селена в сыворотке крови у пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника.

Объектами исследований являлись биосубстраты – сыворотка крови детей с тяжелыми врожденными повреждениями позвоночника, как наиболее широко используемый наряду с кровью биоматериал для оценки элементного статуса человека.

Образцы сыворотки крови детей представлены РНПЦ травматологии и ортопедии г. Минска, отобранные у 52 пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника.

Процедура пробоподготовки исследуемых биологических проб, состоящая в переведении пробы в растворенную форму, удобную для ввода в аналитический спектрометр, выполнена общепринятым методом «мокрого озоления» в установке микроволнового разложения с возможностью контроля давления и температуры.

Наиболее приемлемым методом анализа минерального состава биосубстратов является метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной аргоновой плазмой (АЭС-ИСП). Применение схемы последовательного сканирования позволяет задавать необходимый список требуемых спектральных линий, отвечающих определяемым элементам. Интенсивность спектральных линий элемента связана с его концентрацией в пробе, что позволяет с использованием сопровождающего спектрометр программного обеспечения получать надежные градуировочные характеристики, прямо пропорциональные в интервале пяти-шести порядков.

Преимуществами метода, выбранного для оценки содержания в биосубстратах микроэлемента селена, являются многоэлементность, низкие пределы обнаружения, малое время анализа, малый объем анализируемых проб. Однако наличие спектральных и матричных влияний при анализе проб сложного состава существенно повышает нижнюю границу определяемых содержаний и осложняет правильность определения элементов в сложных биологических пробах. Для получения точных результатов необходимо применение надежной методики. Для этого были проведены исследования по отработке метода определения селена в биосубстратах с использованием атомно-эмиссионной спектроскопии.

По данным различных авторов о границах физиологических значений содержания селена в сыворотке крови нижняя граница нормы здорового человека составляет от 46 до 110 мкг/л [3]. Чувствительность ИСП-АЭС по селену в водных растворах составляет 1,5 мкг/л, следовательно, позволяет определять анализируемый элемент в естественной концентрации, в которой он содержится в сыворотке крови.

При применении в качестве окислителя концентрированной азотной кислоты в количестве 10 мл полученные минерализованные растворы содержат 15–25 % азотной кислоты. Как правило, методики измерения на атомно-эмиссионном спектрометре рекомендуют использовать растворы с содержанием азотной или соляной кислоты не

выше 5 %. В связи с использованием в исследованиях минерализатов с высокой степенью кислотности авторы провели оценку влияния содержания азотной кислоты на точность определения селена.

Результаты анализа содержания селена (150 мкг/л) в растворах с разной концентрацией азотной кислоты приведены в табл. 1.

Изучены матричные влияния минеральных элементов, содержащихся в минерализованных образцах сыворотки крови, на определение содержания в них селена. В каждую колбу с минерализованной сывороткой крови (один и тот же образец, одинаковые навески) внесли раствор селена для получения конечной концентрации этих элементов 20, 40 и 100 мкг/л. Растворы с такими же концентрациями были приготовлены с использованием 0,5 %-ной азотной кислоты. Результаты измерений приведены в табл. 2.

Таблица 1 – Влияние содержания азотной кислоты на результаты определения селена в растворе

Содержание азотной кислоты, %	Концентрация Se в растворе	
	мкг/л	% от внесенного
0,5	159,3	106,2
5,0	143,3	95,5
10,0	153,2	102,1
20,0	152,2	101,5
30,0	113,5	75,7

Таблица 2 – Результаты анализа содержания селена в водных растворах и в минерализованных образцах сыворотки крови

Вариант	Концентрация Se в растворе	
	мкг/л	% от внесенного
0,5 % HNO ₃ + 20 мкг/л Se	18,4	91,9
Минерализованные образцы + 20 мкг/л Se	13,5	68,0
0,5 % HNO ₃ + 40 мкг/л Se	41,1	103,0
Минерализованные образцы + 40 мкг/л Se	32,5	81,0
0,5 % HNO ₃ + 100 мкг/л Se	102,5	103,0
Минерализованные образцы + 100 мкг/л Se	85,7	86,0

Из анализа данных табл. 2 очевидно, что селен при концентрации 20 мкг/л определяется только в количестве 68 % от внесенного, при концентрации 40 мкг/л – 81 % от внесенного и только при высоком содержании селена в растворе (100 мкг/л) возможно получить достоверные результаты анализа с незначительными погрешностями.

Наиболее надежным методом определения селена является метод атомно-абсорбционной или атомно-эмиссионной спектроскопии с гидридной генерацией или атомно-абсорбционный метод с графитовой атомизацией и генерацией гидридов. При использовании данных методов на результаты анализа не влияют матричные эффекты. Однако эти методы имеют большой недостаток. Минерализация образцов сыворотки крови осуществляется в среде азотной кислоты, и для того, чтобы эффективно шли процессы образования гидридов, необходимо удалить азотную кислоту и перевести остаток в солянокислый раствор. Данная операция может сопровождаться потерями легколетучего элемента селена, увеличивает продолжительность анализа, приводит к большой погрешности результатов.

В связи с изложенным и для снижения матричных влияний минеральных элементов, содержащихся в минерализованных образцах сыворотки крови, на определение содержания в них селена методом атомно-эмиссионной спектроскопии вместо пневматического распылителя использовали ультразвуковой, который позволяет значительно (в 5–10 раз) понизить предел обнаружения селена, что составляет 0,2 мкг/л.

Для получения достоверных результатов подобраны и оптимизированы условия проведения измерений для микроэлемента селена.

Основные аналитические параметры методики, используемой для определения селена в сыворотке крови пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника, приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Аналитические параметры методики определения селена методом ИСП-АЭС

Параметр	Значение	Параметр	Значение
Минимальная концентрация, мкг/л	0,0	Способ расчета	макс.
Максимальная концентрация, мкг/л	200,0	Длина волны, нм	196,026
Количество точек измерения	5	Входная щель, мкм	20
Количество точек расчета	5	Выходная щель, мкм	15
Время интегрирования, с	2	Шаг, нм	0,001

Методом ИСП-АЭС с применением указанных оптимизированных параметров методики проведено исследование содержания микроэлемента селена в сыворотке крови пациентов с костной патологией. Результаты исследования обеспеченности организма микроэлементом селеном у детей с генетически обусловленными деформациями и повреждениями позвоночника, обработанные статистическими методами, представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Содержание микроэлемента селена в сыворотке крови детей с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника (мкг/л)

Элемент	Среднее значение (M±m)	Медиана	Диапазон значений	Перцентиль (25–75 %)
Se	17,352±1,98	14,650	0,001–52,26	6,77–26,055

В результате анализа полученных данных установлено, что диапазон значений содержания микроэлемента селена в сыворотке крови детей с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника составляет селена – 0,001–52,26 мкг/л с медианой 14,650.

Ввиду ограниченности количества химических элементов, для которых показатели допустимого содержания в биосубстратах разработаны официально, при оценке распространенности дисбаланса химических элементов обычно используются условно допустимые рабочие величины, основанные на данных о верхнем и нижнем пределах физиологического содержания элементов, так называемые «референтные значения».

В литературных источниках [3] приводятся данные различных авторов о границах физиологических значений содержания селена в сыворотке крови, где нижняя граница нормы здорового человека составляет от 46 до 110 мкг/л, верхняя – от 143 до 150 мкг/л. По данным института питания РАМН за норму принято содержание селена 115–120,0 мкг/л [4; 5].

Кроме того, данные, приводимые в научной литературе, о диапазонах содержания некоторых химических элементов в биологических средах человека различаются в зависимости от применяемых для этой цели различных спектральных методов оценки.

Несмотря на противоречивость литературных данных о концентрации исследуемого микроэлемента в биосубстратах, авторами сделана попытка оценки содержания этих микроэлементов в сыворотке крови детей с костной патологией по сравнению с «условной» нормой.

Содержание селена в сыворотке крови детей значительно ниже «условной» нормы, при этом даже максимальное значение (52,26 мкг/л) не достигает нижней границы референсного диапазона [4; 5]. Кроме того, в 19 % представленных образцов сыворотки крови детей с костной патологией не обнаружено присутствие селена при чувствительности используемого метода.

Таким образом, для пациентов с прогрессирующими врожденными деформациями позвоночника актуальной является проблема недостаточности содержания микроэлемента селена в сыворотке крови. Полученные данные указывают на необходимость проведения профилактических и лечебных мероприятий, направленных на коррекцию минеральных нарушений в организме детей с костной патологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зацепи, Т. С. Микроэлементозы // Костная патология взрослых (дата обращения: 09.02.2018).
2. Зацепин, Т. С. Редкие обменные заболевания костей // Костная патология взрослых (Дата обращения: 11.10.2017).
3. Федоров, В. И. К проблеме определения микроэлементов в сыворотке крови человека // Аналитика и контроль. – 2005. – Т. 9. – № 4. – С. 358–366.
4. Зубкова, Л. Л. Корреляционная взаимосвязь распределения селена в органах и тканях человека с показателями обмена веществ при различных патологических состояниях // Вестник Бурятского государственного университета. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-selena-v-organizme-cheloveka-pri-razlichnyh-patologiyah> (дата обращения: 07.07.2018).
5. Пятницкая, С. В. Содержание селена и состояние свободнорадикального окисления в сыворотке крови у больных с острым коронарным синдромом без стойкого подъема сегмента ST / С. В. Пятницкая [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-selena-i-sostoyanie-svobodnoradikalnogo-okisleniya-v-syvorotke-krovi-u-bolnyh-s-ostрым-koronarnym-sindromom-bez-stoykogo> (дата обращения: 07.07.2018).