

# BADANIE KORELACJI POMIĘDZY WYBRANYMI METALAMI CIĘŻKIMI, BIOPIERWIASTKAMI I WSKAŹNIKAMI HEMATOLOGICZNYMI U DZIECI

Joanna Chłopicka

*Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków*

## 1 WSTĘP

Znaczenie pierwiastków dla zdrowia człowieka jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Przynoszą one nowe informacje o ich funkcjach w podstawowych procesach fizjologicznych [2, 4, 5, 6, 11]. Wiele z nich wchodzi w skład enzymów katalizujących szereg reakcji biochemicznych, jednakże nie wyjaśnione są dokładnie wszystkie mechanizmy ich działania, jak również wzajemne relacje pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami.

Do pierwiastków niezbędnych do życia należą między innymi wapń, magnez, cynk, miedź, żelazo, mangan, zaś metale ciężkie (np. ołów i kadm) są uznawane za toksyczne. Ilość nagromadzonych pierwiastków w organizmie człowieka zależy od pożywienia oraz środowiska.[11, 15, 14].

Trudno jest ocenić rzeczywisty status mineralny poszczególnego człowieka. Rutynowo oznacza się stężenie pierwiastków w krwi, jednakże jeśli otrzymane wyniki mieszczą się w zakresach uznawanych za prawidłowe, to nie jest to jeszcze dowód, iż nie występują niedobory poszczególnych pierwiastków w innych kompartmentach organizmu. Dlatego poszukuje się innych biologicznych materiałów, które można by pobrać od ludzi i oznaczyć w nich zawartość pierwiastków. Jednym z takich materiałów są włosy. Wielką zaletą ich jest to, że odzwierciedlają one długi czas akumulacji pierwiastków a ich pobieranie odbywa się w sposób bezinwazyjny. Ponadto są trwałe i łatwe do przechowywania. Jednakże wiele niewyjaśnionych jeszcze do końca czynników wpływa na skład mineralny włosów

u poszczególnych ludzi, stąd cenne są wszelkie badania zmierzające do ustalenia reguł opisujących dystrybucję pierwiastków we włosach i próby powiązania danych z wynikami otrzymanymi z analizy krwi [9,10].

W przeciwieństwie do metali niezbędnych do życia, metale ciężkie takie jak ołów i kadm powodują zaburzenia w organizmie człowieka. Dokładnie przebadane są skutki ostrego zatrucia tymi metalami, natomiast obecnie śledzi się wpływ subtoksycznych stężeń tych pierwiastków na zdrowie ludzi. Populacją szczególnie wrażliwą na działanie metali toksycznych są dzieci.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach na świecie wykazały, że przewlekłe narażenie dzieci na niskie poziomy ołowiu powodują u nich zaburzenia funkcji poznawczych i trudności w nauce. Dlatego w 1991 roku w USA obniżono wartość maksymalnego dopuszczalnego stężenia ołowiu we krwi dzieci, a CDC (Centers for Disease Control) wydało zalecenie powszechnego badania przesiewowego dzieci w wieku 1-2 lat.

W Polsce terenami szczególnie skażonymi metalami ciężkimi były okolice zakładów przemysłowych na Górnym Śląsku, w dawnym województwie krakowskim i legnickim. Dlatego do badań, jako teren najsilniej zanieczyszczony wybrano dzieci z Miasteczka Śląskiego (rejon I). Ponadto przebadano dzieci mieszkające na obszarach, gdzie wydobywa się siarkę, z okolic Tarnobrzega (rejon II). Dzieci z Krakowa (rejon III), a także z okolic kombinatu metalurgicznego w Krakowie (rejon IV). Jako teren odniesienia wybrano Brzozów i Humniska (rejon V) położone niedaleko Krosna.

## 2 CEL PRACY

Medycyna XXI wieku oprócz leczenia, będzie zajmować się w coraz większym stopniu, profilaktyką chorób. Dużą rolę odegra tu odpowiednie żywienie, to znaczy dostarczanie organizmowi potrzebnych składników pokarmowych, między innymi mikro i makropierwiastków. Ich znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu jest coraz lepiej udokumentowane, stąd pojawiają się na rynku preparaty farmaceutyczne zawierające biopierwiastki. W wielu krajach, w tym również w Polsce obserwuje się jednak niekontrolowany wzrost ich spożycia, a powinny one być używane jedynie przez osoby z niedoborami tych składników. Nie ma jednak dotąd jednoznacznych wskaźników określających status mineralny człowieka, a analiza krwi pozwala jedynie na wykrycie ciężkich odchyłeń od normy. Również nie wyjaśnione są dotąd w pełni relacje między poszczególnymi pierwiastkami oraz wpływ nadmiaru jednych na poziom innych (np. wpływ metali ciężkich pochodzących ze środowiska na biopierwiastki zawarte w organizmie człowieka).

Dlatego celem mojej pracy było przebadanie korelacji między metalami toksycznymi (ołów, kadm), wybranymi biopierwiastkami oraz wskaźnikami hematologicznymi u dzieci.

Jako szczegółowe cele pracy przyjęto:

- analizę porównawczą zawartości badanych pierwiastków w krwi i we włosach dzieci mieszkających w Polsce południowej, w pięciu rejonach różniących się stopniem zanieczyszczenia przemysłowego;
- analizę korelacji zachodzących pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami we krwi dzieci;
- analizę korelacji zachodzących pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami we włosach dzieci;
- analizę korelacji stężenia poszczególnych pierwiastków we krwi z ich zawartością we włosach dzieci.
- analizę zależności pomiędzy płcią a zawartością pierwiastków we krwi i we włosach.

## 3 MATERIAŁ I METODYKA

### 3.1 Populacja badanych osób

Materiał do badań stanowiła krew oraz włosy pobrane od 660 dzieci (324 chłopców, 336

dziewcząt) mieszkających na terenach Polski Południowej.

Krew pobierano z żyły łokciowej igłami jednorazowymi w systemie zamkniętym do probówek próżniowych typu Becton Dickinson Vacutainer Systems. Do oznaczeń metali ciężkich używano probówek z heparynianem sodu jako antykoagulantem, do oznaczeń innych składników mineralnych bez antykoagulanta. Włosy cięto bezpośrednio przy skórze, z różnych miejsc głowy i przechowywano w torebkach papierowych. Do analizy wykorzystywano 3 cm odcinki włosów mierząc od skóry głowy. Nie analizowano włosów farbowanych oraz po trwałej ondulacji.

Populacja dzieci to uczniowie szkół podstawowych umiejscowionych na obszarach oddziaływania przemysłu oraz jako grupa odniesienia dzieci mieszkające i uczące się na terenach określanych jako czyste ekologicznie. W badanej populacji dzieci wyodrębniono pięć rejonów (Miasteczko Śląskie, Tarnobrzeg, Kraków, Humniska, Brzozów).

### 3.2 Metody użyte do oznaczania badanych parametrów

Stężenie kadmu i ołowiu oraz wybranych biopierwiastków oznaczono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej przy użyciu aparatu firmy PERKIN-ELMER 51000 z Zeemanowską korekcją tła wyposażonego w komputer z oprogramowaniem w wersji GEM lub WINLAB i kufkę grafitową z automatycznym dozownikiem AS 70. Ołów oraz kadm w krwi oznaczono przez bezpośrednie wprowadzenie do kufki grafitowej spektrometru uprzednio przygotowanej mieszaniny próbki krwi i modyfikatora [skład modyfikatora: 20 ml 1% triton + 0,8 ml roztw. EDTA (2.5/100) + 4 ml 5% (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1 ml 5% HNO<sub>3</sub> uzupełnione do objętości 100 ml H<sub>2</sub>O].

Zawartość cynku, wapnia, magnezu i miedzi w surowicy krwi oznaczano metodą płomieniową absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS). Parametry pracy aparatu oraz programy temperaturowe nagrzewania kufki były przystosowywane do każdej serii oznaczeń w Pracowni Biopierwiastków przy Zakładzie Bromatologii Collegium Medicum UJ gdzie ta praca została wykonana.

Wartości wskaźników hematologicznych (stężenie hemoglobiny, hematokryt, ilość krwinek

czerwonych, ilość leukocytów, średnia objętość krwinki czerwonej) oznaczano automatycznym analizatorem hematologicznym Coulter S560. Kontrolę oznaczeń wykonywano wykorzystując krew wzorcową HAEM-QC holenderskiej firmy J.T. Baker.

Pomiar poziomów cynkoprotoporfiryny (poziom protoporfiryny cynkowej w erytrocytach) wykonywano w Centralnym Laboratorium Metali Ciężkich, przy Hucie Cynku w Miasteczku Śląskim hematofluorymetrem firmy Aviv (USA). Na przeprowadzenie badań stanowiących doświadczalną część przedstawionej przeze mnie pracy uzyskano zgodę Komisji Etycznej d/s Eksperymentalnych Badań Klinicznych przy Collegium Medicum UJ (KEEBK/V/40/93), (KEEBK/V/108/96).

Rodzice dzieci wyrazili pisemną zgodę na pobranie próbek krwi i próbek włosów od swoich dzieci

### 3.3 Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy pakietu *STATISTICA* (firmy StatSoft Polska Sp. z o.o.).

- 1 Dla wszystkich badanych zmiennych sprawdzano typ rozkładu. Zastosowano testy Chi-kwadrat oraz Kołmogorowa-Smirnova. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto  $p=0.05$ .
- 2 Dla uzyskanych wyników obliczono: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, średnią geometryczną, odchylenie od średniej geometrycznej, medianę, wariancję, wartość maksymalną, wartość minimalną, 5 i 95 percentyl, skośność, kurtozę.
- 3 W celu porównania wartości średnich dla parametrów nie spełniających warunków stosowania analizy wariancji, zastosowano test Kruskala-Wallisa (jako nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji).
- 4 Związki między poszczególnymi parametrami zbadano stosując test korelacyjny Pearsona lub Spearmana i wyliczając odpowiednie współczynniki korelacji.
- 5 Dodatkowo, strukturę korelacji w zbiorze danych opisano następującymi metodami: analiza składowych głównych (Principal Components Analysis, PCA), analiza korelacji kanonicznej (Canonical Corelation Analysis, CCA), analiza korelacji cząstkowych (Partial Correlation, PC), analiza wzajemnych oddzia-

ływań parametrów (Mutual Contribution Analysis, MCA) [8, 3, 12, 13,].

## 4 WYNIKI

W celu określenia stopnia w jakim badane przeze mnie zmienne są ze sobą powiązane, wykonano analizę korelacyjną. Dla wszystkich parametrów stwierdzono rozkłady różne od normalnego, dlatego aby znaleźć współzależności między parami zmiennych wybrano test korelacyjny rang Spearmana. Dla wszystkich badanych par parametrów wyliczono korelacje, jednakże w poniższej tabeli, zestawiono jedynie te dla, których  $p \leq 0.01$ .

Tabela 1. Korelacje obliczone dla poszczególnych par zmiennych dla całej badanej populacji.

| Pary zmiennych      | N   | $R_S$ | p      |
|---------------------|-----|-------|--------|
| Pb-włosy / Cd-włosy | 660 | 0.80  | 0.0001 |
| Pb-krew / Pb-włosy  | 660 | 0.61  | 0.0001 |
| Pb-krew / Cd-włosy  | 656 | 0.58  | 0.0001 |
| Cd-włosy / Mg-włosy | 503 | 0.50  | 0.0001 |
| Pb-krew / Mg-włosy  | 504 | 0.48  | 0.0001 |
| Cd-włosy / Fe-włosy | 215 | 0.44  | 0.0001 |
| Pb-włosy / Mn-włosy | 215 | 0.40  | 0.0001 |
| Cd-włosy / Mn-włosy | 215 | 0.36  | 0.0001 |
| Pb-włosy / Zn-włosy | 504 | -0.34 | 0.0001 |
| Pb-włosy / Fe-włosy | 215 | 0.32  | 0.0001 |
| Pb-włosy / Mg-włosy | 504 | 0.30  | 0.0001 |

Pb-włosy - zawartość ołowiu we włosach, Pb-krew - stężenie ołowiu w krwi, Cd-włosy - zawartość kadmu we włosach, Mg-włosy - zawartość magnezu we włosach, Fe-włosy - zawartość żelaza we włosach, Mn-włosy - zawartość manganu we włosach, Zn-włosy - zawartość cynku we włosach.

Oceniając siłę związku przyjęto za Staniszem [1998] następującą skalę:

- współczynnik korelacji  $r=1$ , zmienne nie są skorelowane
- $0 < \text{współczynnik korelacji } r < 0.1$  - korelacja niska
- $0.1 \leq \text{współczynnik korelacji } r < 0.3$  - korelacja słaba
- $0.3 \leq \text{współczynnik korelacji } r < 0.5$  - korelacja przeciętna
- $0.5 \leq \text{współczynnik korelacji } r < 0.7$  - korelacja wysoka
- $0.7 \leq \text{współczynnik korelacji } r < 0.9$  - korelacja bardzo wysoka

$0.9 \leq$  współczynnik korelacji  $r < 1.0$  – korelacja prawie pełna

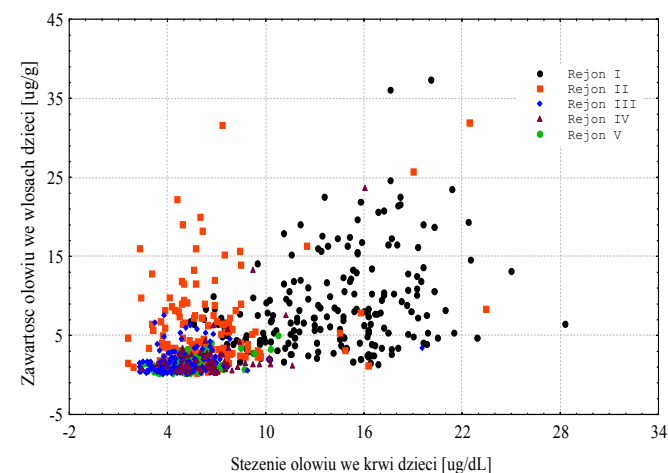
W całej badanej populacji dzieci ołów we krwi najsilniej korelował z ołowiem we włosach ( $r=0.61$ ,  $p \leq 0.0001$ ), wysoką korelację zaobserwowano również dla ołowiu we krwi i kadmu we włosach ( $r=0.58$ ,  $p \leq 0.0001$ ).

Przeciętną korelację stwierdzono pomiędzy ołowiem we krwi a magnezem we włosach ( $r=0.84$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Słabą korelację wykazano dla ołowiu we krwi i magnezu w osoczu krwi ( $r=0.22$ ,  $p \leq 0.001$ ) oraz ołowiu we krwi i manganu we włosach ( $r=0.24$ ,  $p \leq 0.001$ ), podobnie dla ołowiu we krwi i erytrocytów ( $r=0.20$ ,  $p \leq 0.0001$ ).

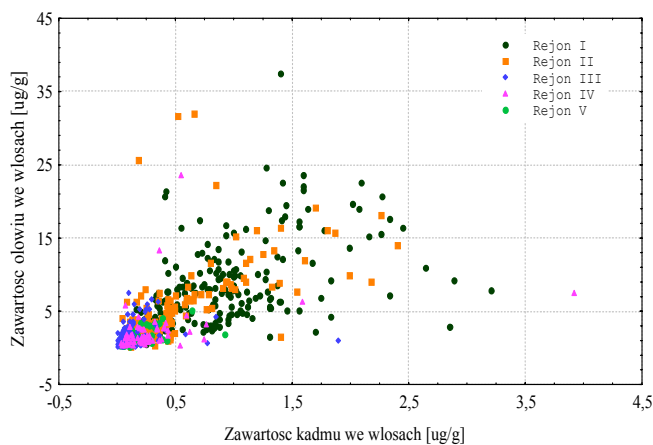
Ołów we włosach wykazywał bardzo wysoką korelację z kadmem we włosach ( $r=0.80$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Zaobserwowano również przeciętną korelację ołowiu we włosach z manganem we włosach ( $r=0.40$ ,  $p \leq 0.0001$ ), z żelazem we włosach ( $r=0.32$ ,  $p \leq 0.0001$ ), oraz z magnezem we włosach ( $r=0.30$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Ujemną przeciętną korelację wykazano dla ołowiu we włosach i cynku we włosach ( $r = -0.34$ ,  $p \leq 0.0001$ ).

Nie wykazano żadnej istotnej korelacji pomiędzy kadmem we krwi i badanymi parametrami.

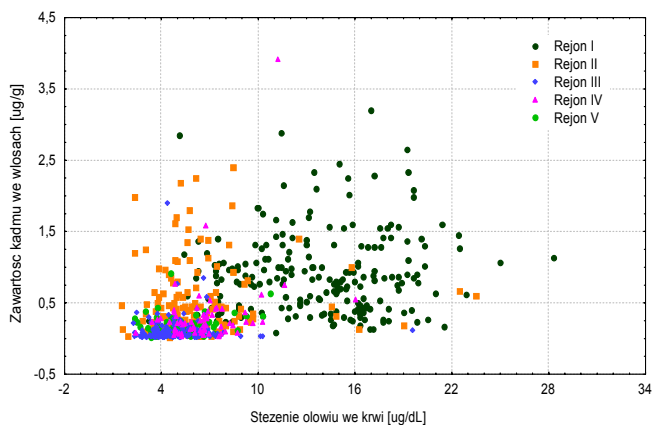
Kadm we włosach korelował bardzo wysoko z ołowiem we włosach, co uprzednio podano, wysoko z magnezem we włosach ( $r=0.50$ ,  $p \leq 0.0001$ ) oraz przeciętną z żelazem we włosach ( $r=0.50$ ,  $p \leq 0.0001$ ) i manganem we włosach ( $r=0.36$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Poniżej przedstawiono wykresy rozrzutu dla par parametrów wykazujących najwyższą wartość współczynnika korelacji Spearmana.



Rys. 1. Wykres rozrzutu dla wyników stężenia ołowiu we krwi i zawartości ołowiu we włosach.



Rys. 2. Wykres rozrzutu wyników dla zawartości kadmu we włosach i zawartości ołowiu we włosach.



Rys. 3. Wykres rozrzutu wyników dla stężenia ołowiu we krwi i zawartości kadmu we włosach.

#### 4.1 Analiza struktury korelacyjnej w grupie dzieci z Miasteczka Śląskiego

Analizę struktury korelacji w grupie dzieci z Miasteczka Śląskiego przeprowadzono w oparciu o następujące metody statystyczne:

- 1 analiza kanoniczna (CCA),
- 2 analiza składowych głównych (PCA),

Z bazy danych usunięto te przypadki, dla których brakowało więcej niż trzech parametrów (pozostałe przypadki, tam gdzie to było potrzebne, uzupełniono wartościami średnimi). Po tej operacji pozostało 179 przypadków. Zmienne przed analizą zostały zlogarytmowane oraz unormowane na średnią równą zero i odchylenie standardowe równe jeden. Następnie wykonano transformację logarytmiczną umożliwiającą zbliżenie rozkładu parametrów do rozkładu normalnego.

## 4.1.1 Wyniki analizy kanonicznej

Analiza korelacji kanonicznej (ang. canonical correlation analysis, CCA) jest uogólnieniem regresji liniowej dwóch pojedynczych parametrów - na dwa zbiory parametrów. Dzięki takiemu podejściu można wyjaśnić zależności liniowe parametrów należących do dwóch różnych zbiorów. Wykonuje się to poprzez wyznaczenie kombinacji liniowych tych parametrów (czyli dobranie odpowiednich współczynników wagowych, tzw. wag kanonicznych, do poszczególnych parametrów) - osobno dla każdego zbioru - tak, aby współczynnik korelacji pomiędzy uzyskanymi kombinacjami liniowymi (zwanymi w tym wypadku zmiennymi kanonicznymi) był jak największy. Jeśli następnie przemnożyć poszczególne wartości pierwotnych parametrów przez te współczynniki wagowe, to otrzymuje się wyniki w nowej przestrzeni (nowym układzie współrzędnych), wyznaczonej przez odpowiednią parę zmiennych kanonicznych.

W analizie korelacji kanonicznej zakłada się, że zależności zarówno w obrębie dwóch zbiorów zmiennych jak i między samymi zbiorami są zależnościami liniowymi. Założenie normalności rozkładu analizowanych zmiennych nie jest warunkiem koniecznym do przeprowadzenia tej analizy, aczkolwiek jest wymagane przy testach sprawdzających statystyczną istotność znalezionych zależności. Redundancja przy danym drugim zbiorze określa proporcję wariancji parametrów jednego zbioru wyjaśnioną przez zmienną kanoniczną, przy znanych wartościach parametrów drugiego zbioru.

Analizę korelacji kanonicznej przeprowadzono dla dwóch zbiorów parametrów.

I. Pierwszy zbiór obejmuje parametry będące stężeniami metali ciężkich i biopierwiastków we włosach [Pb-W (zawartość ołowiu we włosach), Cd-W (zawartość kadmu we włosach) Mg-W (zawartość magnezu we włosach), Fe-W (zawartość żelaza we włosach)].

II. Drugi zbiór obejmuje parametry hematologiczne [(ZPP (poziom cynkoprotoporfiryny), RBC (ilość erytrocytów), HGB (stężenie hemoglobiny) MCV (średnia objętość erytrocytów)].

Analizę wykonano w czterech podgrupach:

- 1 Dziewczeta, stężenie ołowiu we krwi < 10 µg/dL, n=29
- 2 Dziewczeta, stężenie ołowiu we krwi > 10 µg/dL, n=43

- 3 Chłopcy, stężenie ołowiu we krwi < 10 µg/dL, n=16
- 4 Chłopcy, stężenie ołowiu we krwi > 10 µg/dL, n=89

Wyniki dla dziewcząt, u których stężenie ołowiu we krwi < 10 µg/dL, n=29 (wyniki dla dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych, dalsze zmienne kanoniczne były statystycznie nieistotne).

Tabela 2. Wyniki statystyki korelacji kanonicznej.

| Nr korelacji | Wartość korelacji kanonicznej | Lambda Wilksa | $\chi^2$ | Liczba stopni swobody | p      | Redundancja przy danym drugim zbiorze |
|--------------|-------------------------------|---------------|----------|-----------------------|--------|---------------------------------------|
| 1            | 0.778                         | 0.184         | 39.8     | 16                    | 0.0008 | 10.3                                  |
| 2            | 0.684                         | 0.466         | 18.0     | 9                     | 0.0356 | 9.9                                   |

Dodatkowo sprawdzono istotność parametru lambda Wilksa w oparciu o statystykę F korzystając z poniższego wzoru [7]

$$F = \frac{1 - \Lambda^{1/t}}{\Lambda^{1/t}} \cdot \frac{mt - pq/2 + 1}{pq}$$

przy  $f_1 = pq$  i  $f_2 = (mt - pq/2 + 1)$  stopniach swobody, gdzie:

$$\Lambda - \text{lambda Wilksa}, \Lambda = \prod_{i=1}^s (1 - R_{ci}^2)$$

$R_{ci}$  - wartość i-tej korelacji kanonicznej

p - liczba zmiennych w pierwszym zbiorze

q - liczba zmiennych w drugim zbiorze

$$m = [N - 0,5(p+q+1)]$$

$$t = [(p^2q^2 - 4)/(p^2 + q^2 - 5)]/2$$

dla obu powyższych wartości lambdy Wilksa

$$F > F_{kryt.}$$

Na podstawie wartości ładunków czynnikowych (odpowiadających współczynnikom korelacji poszczególnych parametrów ze zmiennymi kanonicznymi w obu zbiorach) pierwszej zmiennej kanonicznej można stwierdzić, że Fe-W (zawartość żelaza we włosach) koreluje dodatnio z MCV (średnią objętością erytrocytów), natomiast w obrębie tej samej grupy parametrów Fe-W (zawartość żelaza we włosach) koreluje dodatnio z Cd-W (zawartość kadmu we włosach); na podstawie wartości ładunków czynnikowych drugiej zmiennej kanonicznej można stwierdzić, że MgW (zawartość magnezu we włosach) koreluje dodatnio z ZPP (poziom cynkoprotoporfiryny). Pomimo wysokiej istotności

zmiennych kanonicznych, wartość redundancji wskazuje na stosunkowo słaby związek między parametrami z obu grup parametrów.

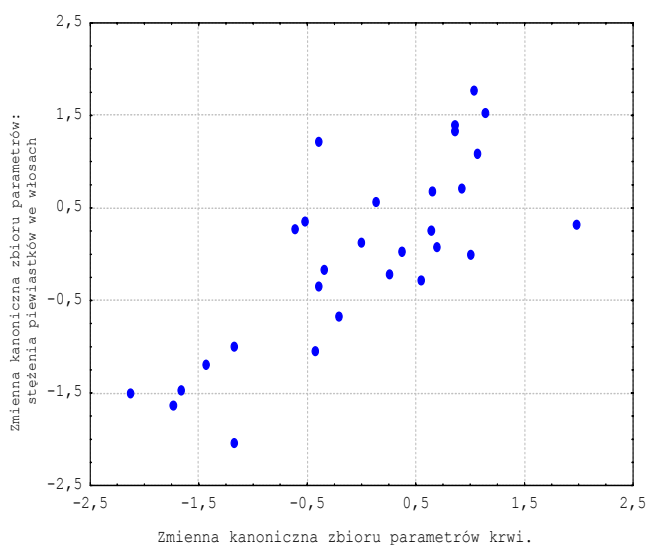
Tabela 3. Wagi kanoniczne oraz ładunki czynnikowe dla pierwszej i drugiej zmiennej kanonicznej.

| Zmienna | I zmienna kanoniczna |                    | II zmienna kanoniczna |                    |
|---------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|         | wagi kanoniczne      | ładunki czynnikowe | wagi kanoniczne       | ładunki czynnikowe |
| PbW     | -0.768               | -0.157             | -0.033                | -0.492             |
| CdW     | 0.866                | 0.408              | -0.727                | -0.311             |
| MgW     | -0.214               | 0.282              | 1.035                 | 0.732              |
| FeW     | 0.800                | 0.733              | -0.001                | 0.061              |
| ZPP     | 0.044                | -0.330             | 0.948                 | 0.820              |
| RBC     | 2.767                | -0.280             | -0.124                | -0.251             |
| HGB     | -1.975               | -0.333             | 0.239                 | -0.019             |
| MCV     | 1.828                | 0.618              | 0.578                 | 0.340              |

PbW - zawartość ołowiu we włosach, CdW - zawartość kadmu we włosach, MgW - zawartość magnezu we włosach, ZPP - cynkoprotoporfiryna, RBC - ilość erytrocytów, HGB - ilość hemoglobiny, MCV - średnia objętość erytrocytów.

Korelacje kanoniczne w pozostałych podgrupach były statystycznie nieistotne:

- W grupie dziewcząt u których stwierdzono stężenie ołowiu we krwi  $> 10 \mu\text{g/dL}$ ,  $p=0,0502$ , lambda Wilksa = 0,496;  $F < F_{\text{kryt}}$ .
- W grupie chłopców ze stężeniem ołowiu we krwi  $< 10 \mu\text{g/dL}$ ,  $p=0,664$ , lambda Wilksa = 0,287;  $F < F_{\text{kryt}}$ .
- W grupie chłopców ze stężeniem ołowiu we krwi  $> 10 \mu\text{g/dL}$ ,  $p=0,046$ , lambda Wilksa = 0,724;  $F < F_{\text{kryt}}$ .



Rys. 4. Rozrzut punktów (representujących dzieci) w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych.

#### 4.1.2 Wyniki analizy składowych głównych

Analiza składowych głównych (ang. principal components analysis, PCA) służy do określenia zależności pomiędzy pierwotnymi parametrami, poprzez zbadanie zależności pomiędzy nimi a układem ich niezależnych kombinacji liniowych, które noszą nazwę składowych głównych. Kolejne składowe główne wybierane są jako te zmienne, które posiadają największą wariancję spośród wszystkich możliwych kombinacji liniowych pierwotnych parametrów. W interpretacji geometrycznej, PCA jest metodą transformacji wielowymiarowego zbioru danych w przestrzeń dwuwymiarową, w nowy układ współrzędnych. Współrzędne pierwotnych parametrów (zwane współczynnikami składowych głównych) w nowym układzie stanowią miarę struktury korelacji w zbiorze danych. W celu zwiększenia zróżnicowania współczynników korelacji składowych głównych z pierwotnymi parametrami (czyli znalezienia grup skorelowanych parametrów) i przez to ułatwienia końcowej interpretacji, wykonuje się rotację ortogonalną składowych głównych. W zastosowanej tutaj metodzie rotacji Varimax dąży się do osiągnięcia maksimum wariancji kwadratów współczynników korelacji parametrów ze składowymi głównymi. Innym wynikiem zastosowania metody PCA jest prezentacja graficzna zbioru obserwacji jako dwuwymiarowego wykresu, przy pomocy którego można analizować wizualnie rozrzut punktów, reprezentujących poszczególne obiekty (w tym przypadku dzieci). Redukcja liczby składowych głównych była przeprowadzona w oparciu o następujące reguły: 1. Uwzględniano tylko składowe główne o wariancjach większych od jedności, ponieważ składowe o wariancji mniejszej od jedności mniej różnicują obiekty (dzieci) niż każdy z unormowanych wcześniej pierwotnych parametrów (posiadający po unormowaniu wariancję równą 1) 2. Uwzględniano tylko te składowe, dla których suma wariancji względem wariancji łącznej wszystkich składowych była większa od 70%. Współczynniki składowych głównych zostały unormowane tak, aby suma ich kwadratów była równa kolejnym wartościom własnym. Zrzutowanie indywidualnych punktów (reprezentujących poszczególne dzieci) z przestrzeni oryginalnych parametrów na płaszczyznę wyznaczoną przez dwie pierwsze składowe główne, wykonano w celu pokazania przenikania się

grupy dzieci u których stężenie ołowiu we krwi  $< 10 \mu\text{g/dL}$  z grupą dzieci ze stężeniem Pb we krwi powyżej tej wartości. Posługując się kryteriami sformułowanymi powyżej, postanowiono uwzględnić trzy pierwsze składowe główne. Wyniki analizy składowych głównych przedstawiono w tabelach 4 i 5.

Tabela 4. Wartości własne macierzy korelacji parametrów oraz % zmienności wymienionych parametrów wyjaśniony przez trzy pierwsze składowe główne.

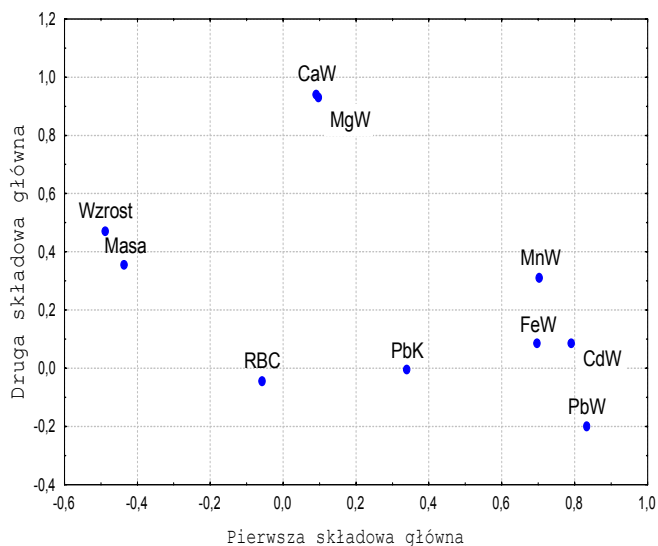
|                    | I składowa | II składowa | III składowa |
|--------------------|------------|-------------|--------------|
| Wartości własne    | 2.95       | 2.53        | 1.57         |
| Procent zmienności | 29.5       | 54.7        | 70.5         |

Tabela 5. Współczynniki pierwszej, drugiej i trzeciej składowej głównej oraz zasoby wspólne.

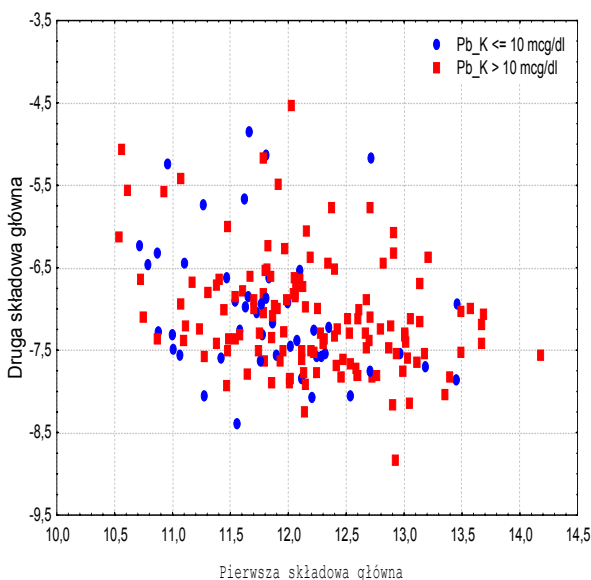
| Parametr | I składowa | II składowa | III składowa | Zasoby wspólne |
|----------|------------|-------------|--------------|----------------|
| PbK      | -0.076     | -0.480      | -0.650       | 0.414          |
| PbW      | -0.726     | -0.294      | -0.438       | 0.659          |
| CdW      | -0.750     | -0.295      | 0.079        | 0.552          |
| CaW      | 0.155      | -0.772      | 0.524        | 0.815          |
| MgW      | 0.164      | -0.793      | 0.469        | 0.821          |
| FeW      | -0.690     | -0.224      | 0.148        | 0.411          |
| MnW      | -0.484     | -0.636      | -0.113       | 0.454          |
| RBC      | 0.259      | -0.271      | -0.575       | 0.223          |
| Wzrost   | 0.732      | -0.433      | -0.099       | 0.795          |
| Masa     | 0.698      | -0.424      | -0.283       | 0.793          |

PbK- stężenie ołowiu w krwi, PbW- zawartość ołowiu we włosach, CdW- zawartość kadmu we włosach, CaW- zawartość wapnia we włosach, MgW- zawartość magnezu we włosach, FeW- zawartość żelaza we włosach, MnW- zawartość manganu we włosach, RBC-ilość erytrocytów

Całkowity procent zmienności parametrów wyjaśniony przez trzy pierwsze składowe wynosił 70.5%. Zasoby wspólne, czyli proporcje zmienności parametrów wyjaśnione przez model, były w zakresie od 0.224 dla (RBC-ilość erytrocytów) do 0.822 dla (Mg-W-zawartość magnezu we włosach). Na rysunku 5 przedstawiono współczynniki składowych głównych po rotacji Varimax, natomiast na rysunku 6 przedstawiono rozrzut wszystkich analizowanych obiektów (wszystkich dzieci) w układzie dwóch pierwszych, zrotowanych składowych głównych.



Rys. 5. Współczynniki składowych głównych po rotacji Varimax.



Rys. 6. Rozrzut punktów (reprezentujących dzieci) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych.

Na podstawie otrzymanych wartości współczynników składowych głównych można stwierdzić, że parametrami silnie skorelowanymi są:  
 – [Ca-W (zawartość wapnia we włosach) i Mg-W (zawartość magnezu we włosach)],  
 – [masa i wzrost],  
 – [Pb-W (zawartość ołowiu we włosach) i Cd-W (zawartość kadmu we włosach)],  
 – [FeW (zawartość żelaza we włosach) i Mn-W (zawartość manganu we włosach)].

Zastosowanie kilku metod statystycznych pozwoliło na niezależne obliczenie i zweryfikowanie miar korelacji w badanym zbiorze parametrów.

Przy pomocy każdej metody statystycznej, którą wykonano w niniejszej pracy wykazano istnienie znamienych statystycznie dodatnich korelacji dla niżej wymienionych par parametrów:

- Ca-W (zawartość wapnia we włosach) i Mg-W (zawartość magnezu we włosach),
- Cd-W (zawartość kadmu we włosach) i Fe-W (zawartość żelaza we włosach),
- Cd-W (zawartość kadmu we włosach) i Pb-W (zawartość ołowiu we włosach),
- Fe-W (zawartość żelaza we włosach) i Mn-W (zawartość manganu we włosach),
- Mn-W (zawartość manganu we włosach), i Pb-W (zawartość ołowiu we włosach),
- Pb-K (stężenie ołowiu we krwi) i Pb-W (zawartość ołowiu we włosach),
- [masa ciała i wzrost].

Ponadto metodą CCA stwierdzono, że Fe-W (zawartość żelaza we włosach) koreluje dodatnio z MCV (średnia objętość erytrocytów), a Mg-W (zawartość magnezu we włosach) koreluje dodatnio z ZPP (cynkoprotoporfiryna). Ponadto metodą CCA stwierdzono, że Fe-W (zawartość żelaza we włosach) koreluje dodatnio z MCV (średnia objętość erytrocytów), a Mg-W (zawartość magnezu we włosach) koreluje dodatnio z ZPP (cynkoprotoporfiryna).

## 5 Dyskusja

Wapń we włosach i magnez we włosach są silnie skorelowane ( $r=0.50$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Korelacje tego typu były już wcześniej opisane [8]. Autor ten w swoich badaniach otrzymał korelację między zawartością wapnia i magnezu we włosach określoną przez współczynnik  $r=0.85$ ,  $p \leq 0.001$  dla dzieci z tego samego przedziału wiekowego co w niniejszej pracy. W organizmie wapń i magnez zachowują się przeważnie antagonistycznie w stosunku do siebie. Obydwa pierwiastki w większych ilościach są magazynowane w tkankach depozytowych (kości, zęby). W ustroju człowieka podlegają silnej kontroli homeostatycznej i ich proporcje są ściśle określone. Silne skorelowanie tych pierwiastków we włosach może stanowić odzwierciedlenie tej homeostazy. Z drugiej strony korelacja ta może wynikać z podobieństwa chemicznego obu pierwiastków należących do drugiej grupy układu okresowego. Być może

jest to również spowodowane wymogami prawidłowej struktury włosów.

Stwierdzono korelację ( $r=0.44$ ,  $p \leq 0.0001$ ) pomiędzy zawartością kadmu i żelaza we włosach. W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat podobnych zależności. Korelacje te można próbować wyjaśnić tym, że pierwiastki te charakteryzują się wspólnym, środowiskowym pochodzeniem. Kadm, żelazo i mangan występują razem na terenach silnie skażonych, pochodzą prawdopodobnie z pyłów powstałych w czasie wytopu rud metali i przedostają się do środowiska z kominów (w tym przypadku z huty cynku). Pyły mogą zawierać tlenki żelaza, manganu.

Stosunkowo silna korelacja pomiędzy kadmem i ołowiem we włosach ( $r=0.80$ ,  $p \leq 0.0001$ ) dowodzi wspólnego pochodzenia obu pierwiastków ze źródeł antropogenicznych. Dotyczy to szczególnie terenów o wysokim skażeniu, gdzie naturalnie niska zawartość tych pierwiastków w glebie została zdominowana przez silne skażenie przemysłowe. Potwierdzają to również inni autorzy. Wilhelm i wsp., [17] stwierdził podobną korelację pomiędzy zawartością ołowiu i kadmu we włosach ( $r=0.74$ ,  $p < 0.001$ ) oraz Wibowo i wsp., [16] ( $r=0.56$ ,  $p < 0.01$ ).

Uzyskano korelację między zawartością manganu i ołowiu we włosach we włosach ( $r=0.40$ ,  $p \leq 0.0001$ ). Mangan między innymi jest potrzebny w procesie formowania kości. Ołów łącznie z innymi pierwiastkami jest deponowany w kościach. Występowanie dodatniej zależności między tymi pierwiastkami może świadczyć również o ich wspólnym pochodzeniu ze skażonego środowiska.

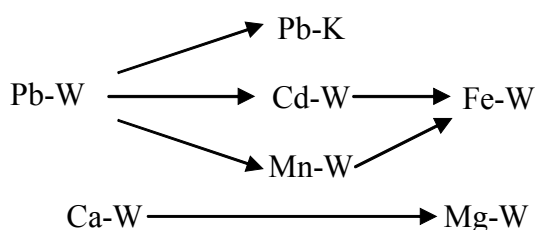
Metodą korelacji kanonicznej stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy zawartością żelaza we włosach a średnią objętością erytrocytów; zawartością magnezu we włosach a ilością cynkoprotoporfiryny; między stężeniem magnezu w osoczu i stężeniem cynku w osoczu krwi dzieci.

Przełóżając dostępną literaturę nie napotkano na podobne zależności między pierwiastkami i wskaźnikami hematologicznymi.

Należy podkreślić, że każda z uzyskanych korelacji może być przedmiotem dalszych sprofilowanych badań, a próby ich interpretacji mogłyby być odrębnymi hipotezami roboczymi. Stąd zweryfikowanie uzyskanych w niniejszej pracy zależności wymaga dalszych badań.

## 6 WNIOSKI

- ◆ Istnieją wyraźne różnice w zawartości ołowiu i kadmu oraz wybranych biopierwiastków we krwi i we włosach dzieci w zależności od miejsca zamieszkania.
- ◆ Istnieje zależność między płcią dzieci a zawartością wybranych pierwiastków w ich krwi i włosach (u chłopców stwierdzono istotnie wyższe stężenia ołowiu we krwi oraz ołowiu, żelaza i manganu we włosach) (u dziewcząt wykazano wyższą zawartość wapnia, magnezu i cynku we włosach).
- ◆ Stwierdzono występowanie następujących, istotnych, dodatnich korelacji:



(gdzie Pb-K - stężenie ołowiu we krwi dzieci, Pb-W, Cd-W, Fe-W, Mn-W, Ca-W, Mg-W - zawartość pierwiastków we włosach).

- ◆ Wykazane korelacje świadczą o tym, że:
  - w badaniach populacyjnych dzieci, zawartość Pb we włosach odzwierciedla poziom ołowiu we krwi
  - pochodzenie analizowanych metali ciężkich (Pb, Cd, Fe, Mn) we włosach jest wspólne i związane z przemysłową działalnością człowieka
  - silna korelacja pomiędzy biopierwiastkami Ca i Mg we włosach prawdopodobnie odzwierciedla ich relacje w organizmie.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Andrzejak R., Antonowicz J., Kochel B., (1996) Heavy metals as indirect causative factors of capillaropathy, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 629-632.
- 2) Hammad T.A., Sexton M., Langenberg P., (1996), Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study, *Ann. Epidemiol.*, 6(1), 30-33.
- 3) Kochel B., (1993), New aspects of ecotoxicology through a systemic approach, *Kybernetes*, 22, 69-77.
- 4) Koreckova-Sysalova J., (1997), Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GFAAS, *Biol. Trace Elem. Res.*, 56, 321-329.
- 5) Koziellec T., Kaszczyk-Kaczmarek K., Późniak J., Nociń I., (1994), Poziom wapnia, magnezu, cynku, miedzi i żelaza we włosach u dzieci i młodzieży w wieku 5-18 lat, *Przeg. Lek.*, 51(9), 401-405.
- 6) Koziellec T., Starobrat-Hermelin B., Kotkowiak L., (1994) Występowanie niedoborów wybranych pierwiastków u dzieci z nadpobudliwością, *Psychiatria Polska*, 3, 345-353.
- 7) Levine M.S., (1977) *Canonical analysis and factor comparison*, London, Sage Publications Inc./ Beverly Hills,
- 8) Morita H., Shimomura S., Kimura A., Morita M., (1986), Interrelationships between the concentration of magnesium, calcium and strontium in the hair of Japanese school children, *Sci. Total Environ.*, 54, 95-105.
- 9) Paszkowski T., Sikorski R., (1987), Przydatność włosów ludzkich w badaniach metabolizmu metali śladowych *Wiad.Lek.*, 19, 1322-1326.
- 10) Radomska K., Graczyk A., Konarski J., Adamowicz B., (1991) Ocena zawartości makro- i mikroelementów w organizmie ludzkim na podstawie analizy włosów, *Pol. Tyg. Lek.*, 24-25, 461-463.
- 11) Schramel P., Hasse S., Ovcár-Pavlu J., (1988), Selenium, cadmium, lead and mercury concentrations in human breast milk, in placenta, maternal blood and the blood of newborn. *Biol.Trace. Elem. Res.*, 15, 111-124.
- 12) Stanisław A., (1998) *Przystępny kurs statystyki – w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny*, Kraków StatSoft Polska Sp. z o.o.
- 13) Stanisław A., (2000), *Przystępny kurs statystyki – z wykorzystaniem programu STATISTICA PL na przykładach z medycyny, Tom II*, Kraków StatSoft Polska Sp. z o.o.
- 14) Strugała-Stawik H., Dembicka D., Pastuszek B., (1995), Badania poziomu kadmu u dzieci na tle stanu środowiska naturalnego, *Med.Prac.*, 46 (5) suplement, 159.
- 15) Vavilis D., Bontis J., Agorastos T. i wsp., (1997), Lead concentrations in early human milk of urban and rural mothers, *Clin.Exp.Obst.&Gyn.*, XXIV (4).
- 16) Wibowo A.A.E., Herber R.F.M., Das H.A., Roeleveld N., Zielhuis R.L., (1986), Levels of metals in hair of young children as an indicator of environmental pollution, *Environ., Res.*, 40, 346-356.
- 17) Wilhelm M., Hafner D., Lombeck I., Ohnesorge F.K., (1991) Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc using toenails: comparison with scalp hair, *Sci. Total Environ.*, 103 (2-3), 199-207.
- 18) Zaborowska W., Wierciński J., (1996), Oznaczanie ołowiu, kadmu, miedzi i cynku we włosach dzieci z Lublina jako próba oceny zanieczyszczenia środowiska, *Roczn. PZH*, 47(2), 217-222.

