

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ПРОБЛЕМЫ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА ПО ДАННЫМ СПЕКТРОМЕТРИИ ВОЛОС

PROBLEMS OF INTEGRAL ESTIMATION OF HUMAN ELEMENTAL STATUS BY SPECTROMETRIC ANALYSIS OF HAIR

В.И. Петухов^{1,2*}, Е.В. Дмитриев³, А.П. Шкестерс², А.В. Скальный⁴
V.I. Petukhov^{1,2*}, E.V. Dmitriev³, A.P. Shkesters², A.V. Skalny⁴

¹ Высшая школа психологии, Рига, Латвия

² Рижский университет Страдыня, Рига, Латвия

³ Институт вычислительной математики РАН, Москва, Россия

⁴ АНО «Центр Биотической Медицины», Москва, Россия

¹ Higher School of Psychology, Riga, Latvia

² Riga's Stradin's University, Riga, Latvia

³ Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ ANO "Centre for Biotic Medicine", Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химические элементы, анализ волос, распределение данных, продолжительность жизни, модель Кокса

KEYWORDS: chemical elements, hair analysis, statistical distribution, life duration, Cox's proportional hazard model

РЕЗЮМЕ: В работе изучен характер распределения значений в выборке по результатам определения 26 химических элементов в волосах у 310 здоровых жителей Риги. Обнаружено, что концентрации большинства химических элементов не распределены по нормальному закону, что ограничивает возможности статистической обработки и существенно снижает значимость получаемых данных. Применение фильтрации по правилу 3 Sigma оказывается неэффективным. В этой связи для объективной оценки результатов элементного анализа волос авторами предложено использовать метод непараметрического регрессионного анализа цензурированных данных (модель Кокса) с определением связи содержания химических элементов в волосах с продолжительностью жизни индивида.

ABSTRACT: Statistical distribution of 26 chemical elements in human hair was studied on the basis of spectrometric hair analysis in 310 residents of Riga (Latvia). It was found that majority of the elements did not meet criteria of normal distribution, thus limiting usable statistical methods and diminishing significance of obtained results. Normalization of the data by 3 Sigma method appeared to be ineffective. For proper estimation of hair elemental analysis the authors offered

nonparametric regression analysis of censored data (Cox's model) with determining relations between hair element contents and individual life duration.

Необходимость объективной оценки биоэлементного гомеостаза для лечения и профилактики многих болезней сегодня ни у кого уже не вызывает сомнений. О минеральном статусе человека обычно судят по содержанию химических элементов в доступных биосубстратах (кровь, моча, клетки крови, плазма или сыворотка крови, придатки кожи и т.п.). Однако насколько безупречен и надежен такой подход? Можно ли, например, избежать ошибочных представлений о балансе в организме химических элементов, если полагаться на их содержание в волосах, заметно варьирующее при индивидуальных измерениях?

Ранее нами (совместно с сотрудниками Центра Биотической Медицины, г. Москва) был сделан анализ минерального состава волос у 106 здоровых жителей Риги в возрасте от 18 до 76 лет (20 мужчин и 86 женщин) методом атомно-эмиссионной спектрометрии на приборе Optima 2000 DV (Perkin Elmer Inc., USA) (Петухов В.И., 2004а, 2004б). Обращал на себя внимание выраженный разброс данных спектрометрии практически у всех (за исключением Zn) биоэлементов: коэффициент вариации (CV) колебался от 34,1% до 226,5% (в среднем $125,5 \pm 17,5\%$). Очевидно, что при таком разбросе индивидуальных измерений, когда стандартное отклонение (S) в 1,5-2 раза превышает величину средней арифметической

* Адрес для переписки:
Петухов Валерий Иванович
e-mail: ommi@inbox.lv

(M), не только теряется смысловая и статистическая значимость самого показателя M, но и становится несостоятельной сравнительная оценка найденных значений M с помощью стандартных методов, если не находит подтверждения гипотеза о нормальном распределении выборки.

В настоящей работе была сделана проверка гипотезы о нормальности распределения генеральной совокупности и отдельных возрастных групп с помощью теста Колмогорова по результатам спектрометрии волос у здоровых жителей Риги (310 чел.) разного возраста: от 3 до 32 лет – 107 чел. (I группа); от 33 до 44 лет – 104 чел. (II группа); от 45 до 82 лет – 99 чел. (III группа) (см. рис. 1, 2). В тестах TN и TNF нулевая гипотеза состоит в том, что выборка принадлежит генеральной совокупности, распределенной по нормальному закону с параметрами математического ожидания и дисперсии, определяемыми с помощью стандартных несмещенных оценок по данной выборке. Альтернатива отвергает нулевую гипотезу. В тестах TLn и TLnF нулевая гипотеза состоит в том, что выборка принадлежит генеральной совокупности с логнормальным распределением и параметрами, определяемыми с помощью несмещенных оценок математического ожидания и дисперсии

натуральных логарифмов значений данной выборки. Альтернатива та же. Тесты проводились как для нефilterованной выборки (TN и TLn), так и для выборки с фильтрацией по правилу 3 Sigma (TNF и TLnF). Обнаружено, что концентрации большинства элементов **не распределены по нормальному закону**. Таким образом, достоверно судить об элементном статусе человека по данным количественного анализа волос на содержание в них минералов (за исключением Zn) оказывается проблематичным, несмотря на высокую разрешающую способность и надежность современных приборов для атомно-эмиссионной спектрометрии.

Более оправданным (по сравнению с прямым измерением концентрации химических элементов) нам представляется поиск возможных корреляций между количественными характеристиками минералов в том или ином биосубстрате. Такой подход учитывает реальные события элементного гомеостаза, не допускающего существования биоэлементов в «свободном» (несвязанном) виде. Металлы, например, образуют структурно-координационные связи с белками, аминокислотами, гормонами, витаминами и другими лигандами (металлолигандные комплексы), что позволяет обезопасить клетки и ткани организма

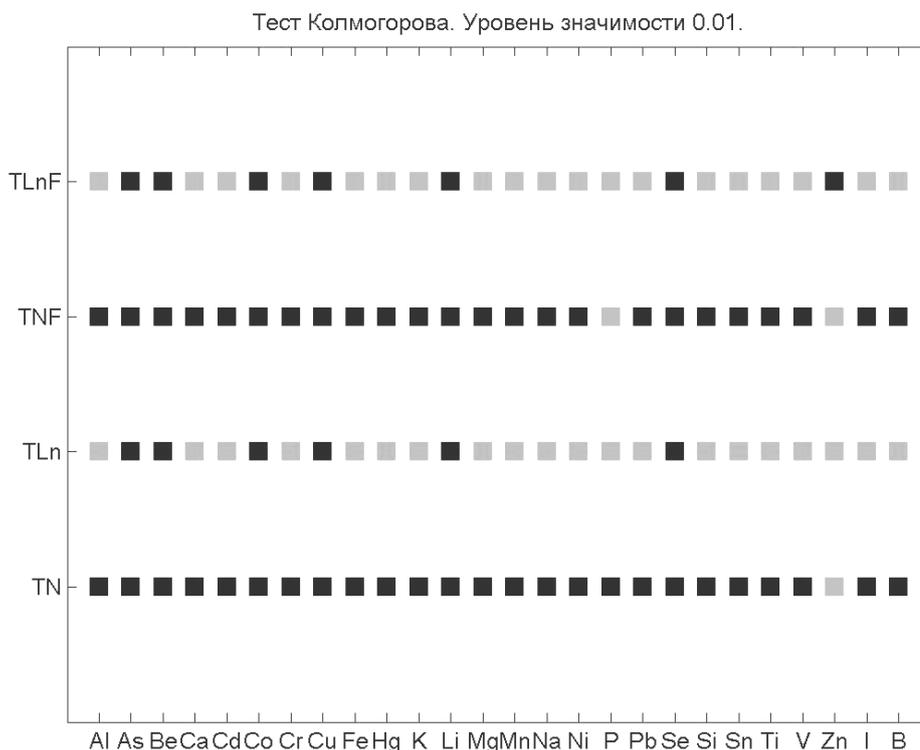


Рис. 1. Тест Колмогорова для проверки гипотезы о принадлежности выборки "total" нормальному и логнормальному распределениям. Уровень значимости 0,01. TN – проверка нефilterованных данных на принадлежность нормальному распределению; TLn – проверка нефilterованных данных на принадлежность логнормальному распределению; TNF – проверка фilterованных данных по правилу 3 Sigma на принадлежность нормальному распределению; TLnF – проверка фilterованных данных по правилу 3 Sigma на принадлежность логнормальному распределению. Черные квадраты означают, что нулевая гипотеза отвергается (с вероятностью 0,99 данная выборка не принадлежит соответствующему распределению). Светлые квадраты означают, что нулевая гипотеза принимается.

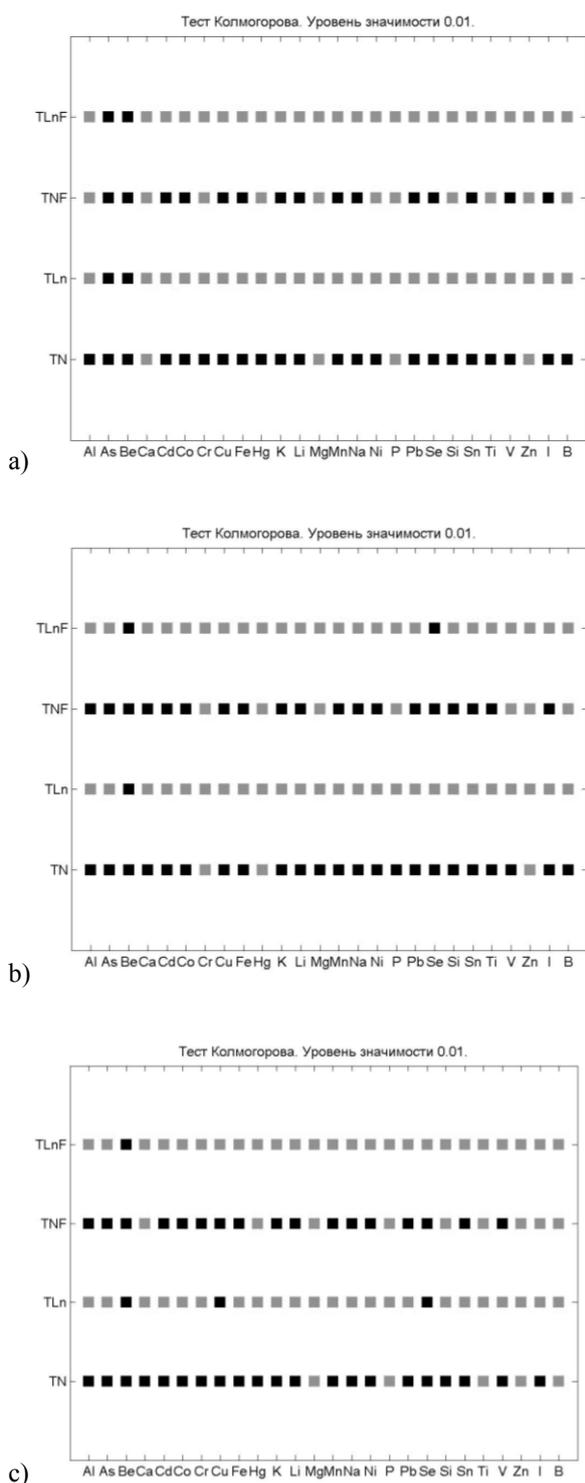


Рис. 2. Тесты Колмогорова для проверки гипотезы о принадлежности выборок “I гр.” – а); “II гр.” – б); “III гр.” – в) нормальному и логнормальному распределениям. Обозначения те же, что и на рис. 1.

от токсичных и реактогенных ионов металлов. Интересно, что диагностика элементозов по уровню металлобелковых комплексов (в том числе и обладающих энзимной активностью) оказывается более достоверной, чем данные количественного анализа

самых минералов. Например, информативность и достоверность уровня ферритина в крови для диагностики железодефицитных состояний значительно превосходит по этим параметрам анализ сывороточного железа (Петухов и др., 2003).

Для выявления линейных взаимоотношений между концентрациями элементов в волосах здоровых жителей Риги были найдены коэффициенты корреляции Пирсона в общей группе (total) и в разных возрастных группах. Наиболее заметные корреляции представлены в таблицах 1, 2.

Проведено сравнение коэффициентов корреляции Пирсона для общей группы (рис. 3) и для двух крайних возрастных групп I и III (рис. 4, 5).

Судить о значимом различии между корреляциями для I и III группы можно лишь при условии, что их доверительные интервалы не перекрываются. При этом, для того чтобы показать “незначимость” различия, необходимо построить доверительные интервалы для разности корреляций. Вместе с тем результаты теста Колмогорова для проверки нормальности распределения в выборках (см. рис. 1, 2) убеждают нас в том, что стандартный метод, применяемый для нахождения доверительных интервалов нормальной корреляции Пирсона, в данном случае не применим. Следовательно, для определения значимости полученных оценок корреляции необходимо воспользоваться альтернативными методами. Наиболее подходящим методом определения доверительных интервалов в данном случае может оказаться так называемый «бутстреппинг», который позволяет получить большую статистику для оцениваемого параметра, построить для данного параметра эмпирическую функцию распределения вероятностей и оценить доверительные интервалы. С помощью этого метода были получены статистики коэффициентов корреляции Пирсона объемом 1000 элементов и найдены 95-процентные доверительные интервалы для общей группы и трех возрастных групп. Было обнаружено, что даже очень высокие значения оценок корреляции, сделанные по исходным данным (без фильтрации 3 Sigma), могут быть незначимыми с вероятностью более 0,05% (причем, это не может быть выявлено с помощью стандартного теста для нормальной корреляции). Ситуация существенно улучшается при использовании фильтрации данных по правилу 3 Sigma. При этом доверительные интервалы, оцененные стандартным методом для нормальной корреляции и методом «бутстреппинга», оказываются намного ближе (впрочем, различие все равно существенно и стандартный метод по-прежнему не применим). Это указывает на то, что основная причина неустойчивости полученных корреляций – слишком большой разброс измеряемых значений (даже фильтрация не делает исходные данные распределенными по нормальному закону).

Результаты сравнительного анализа коэффициентов корреляций Пирсона в двух крайних возрастных группах (I и III) позволяют судить о значимости возрастных различий, по крайней мере, для 5 парных корреляций: Al-As; Ca-Mg; Ca-Zn; Mg-Mn и Mg-Zn (см. рис. 4). Об этом свидетельствуют и доверитель-

Таблица 1. Заметные корреляции Пирсона между элементами в разных возрастных группах, вычисленные по нефилтрованным выборкам

№	Пара МЭ	3 – 32 г. (I гр.) n = 107	33 – 44 г. (II гр.) n = 104	45 – 82 г. (III гр.) n = 99	In toto n = 310
1.	Al-As	r = 0,34	r = 0,67	r = 0,10	r = 0,35
2.	As-V	r = 0,70	r = 0,69	r = 0,54	r = 0,63
3.	Ca-Mg	r = 0,91	r = 0,85	r = 0,53	r = 0,70
4.	Cd-Ni	r = - 0,02	r = 0,31	r = 0,93	r = 0,79
5.	Cr-V	r = 0,67	r = 0,81	r = 0,56	r = 0,65
6.	K-Na	r = 0,69	r = 0,71	r = 0,75	r = 0,72
7.	K-Pb	r = 0,09	r = 0,23	r = 0,59	r = 0,39
8.	P-Sn	r = -0,22	r = 0,80	r = 0,29	r = 0,55
9.	P-Ti	r = -0,05	r = 0,88	r = 0,12	r = 0,62
10.	Sn-Ti	r = -0,23	r = 0,93	r = -0,01	r = 0,87; (n=196)
11.	As-Ca	r = -0,10	r = 0,00	r = 0,70	r = 0,33
12.	Be-Ni	r = 0,76	r = 0,09	r = -0,04	r = 0,12
13.	Ca-Mn	r = 0,49	r = 0,35	r = 0,04	r = 0,19
14.	Ca-Zn	r = 0,37	r = 0,34	r = 0,09	r = 0,23
15.	Cd-Ti	r = 0,48; (n = 60)	r = 0,13; (n = 62)	r = -0,02; (n = 69)	r = 0,03; (n = 196)
16.	Cd-V	r = 0,18	r = 0,10	r = 0,03	r = 0,07
17.	Cd-Cu	r = 0,07	r = 0,15	r = 0,45	r = 0,21
18.	Co-Mg	r = 0,03	r = 0,19	r = 0,30	r = 0,17
19.	Ca-Li	r = 0,18	r = -0,05	r = 0,32	r = 0,01
20.	Cr-Fe	r = 0,01	r = 0,18	r = 0,37	r = 0,16
21.	Na-Li	r = 0,07	r = -0,01	r = 0,34	r = 0,03
22.	Mg-Mn	r = 0,46	r = 0,33	r = 0,08	r = 0,19
23.	Mg-Ni	r = 0,33	r = 0,37	r = -0,02	r = 0,09
24.	Mg-Zn	r = 0,34	r = 0,12	r = -0,05	r = 0,08
25.	Mn-Ni	r = 0,33	r = 0,22	r = 0,01	r = 0,01
26.	Co-Cu	r = 0,52	r = 0,07	r = -0,05	r = 0,26
27.	Se-As	r = 0,39	r = 0,54	r = 0,1	r = 0,28

ные интервалы разности коэффициентов корреляции Пирсона для I и III групп (см. рис. 5). Этот факт настраивает на возможное использование значимых различий в качестве дискриминаторов физиологического (или патологического?) старения волос.

Для объективной оценки значимости получаемых количественных данных о минеральном составе волос представляет интерес анализ возможных нелинейных взаимоотношений между содержанием биоэлементов в волосах (по результатам спектрометрии) и продолжительностью жизни индивида.

Вероятное существование такой связи (или ее отсутствия) можно верифицировать с помощью модели Кокса (непараметрический регрессионный анализ цензурированных данных) (Cox, 1972), реализуемой в статистических компьютерных программах (таких, как SAS, SPSS и др.). При этом объем обучающей выборки (число лиц с известной продолжительностью

жизни, у которых в разные сроки до наступления смерти был сделан спектрометрический анализ волос на содержание биоэлементов) не должен быть менее 500-1000 чел. Очень важно при этом, чтобы анализ проводился на одном и том же приборе как у лиц из обучающей выборки, так и во всех последующих случаях (текущие наблюдения).

Ожидаемые результаты:

а) с помощью нелинейного регрессионного анализа (модель Кокса) удастся обнаружить связь количественных значений отдельных элементов и их совокупности с выживаемостью – в этом случае по величине χ^2 можно установить у какого(-их) элемента(-ов) эта связь является наиболее значимой (имеет наибольшее влияние на длительность выживания), что, с одной стороны, даст возможность получить объективную оценку имеющихся нарушений элементного гомеостаза по конкретным (наиболее значимым

Таблица 2. Корреляции Пирсона между концентрациями элементов в разных возрастных группах после фильтрации 3 Sigma

№	Пара минералов	3–32 г. (I гр.) n = 107	33–44 г. (II гр.) n = 104	45–82 г. (III гр.) n = 99	In toto n = 310
1.	Al-As	0,4773	0,4182	0,0165	0,3064
2.	As-V	0,5445	0,4420	0,4481	0,4620
3.	Ca-Mg	0,8978	0,8734	0,7878	0,8167
4.	Cd-Ni	0,1445	0,2150	0,2074	0,1281
5.	Cr-V	0,5704	0,6730	0,7245	0,6187
6.	K-Na	0,4598	0,7173	0,7039	0,6079
7.	K-Pb	0,2041	0,2577	0,2891	0,2526
8.	P-Sn	-0,0577	-0,1156	0,0052	-0,1104
9.	P-Ti	0,0494	0,2733	0,1186	0,0423
10.	Sn-Ti	-0,2644	0,0363	-0,0569	-0,0479
11.	As-Ca	-0,0384	-0,0620	0,0135	0,0247
12.	Be-Ni	-0,0488	-0,0410	-0,0675	-0,0292
13.	Ca-Mn	0,6432	0,3071	0,4151	0,3901
14.	Ca-Zn	0,3857	0,3616	0,0129	0,2265
15.	Cd-Ti	0,0327	0,0658	0,1116	0,1650
16.	Cd-V	0,1456	0,2160	0,0468	0,0967
17.	Cd-Cu	0,3264	0,0838	0,1293	0,2334
18.	Co-Mg	0,1551	0,1919	0,2601	0,2054
19.	Ca-Li	0,1568	0,0962	0,3458	0,1968
20.	Cr-Fe	0,0089	0,3004	0,1544	0,1450
21.	Na-Li	0,0493	0,3352	0,1915	0,2163
22.	Mg-Mn	0,5623	0,1886	0,3641	0,3197
23.	Mg-Ni	0,2731	0,2595	0,1112	0,1336
24.	Mg-Zn	0,3733	0,2478	-0,1606	0,1281
25.	Mn-Ni	0,2189	0,2087	0,1094	0,2689
26.	Co-Cu	0,0238	0,1574	0,0800	0,1000
27.	Se-As	0,4343	0,4391	0,5972	0,5167

для выживаемости) элементам, а с другой – позволит осуществлять целенаправленную и эффективную коррекцию этих нарушений; при этом величина срока дожития может служить своеобразным интегральным показателем индивидуального (по его вероятностной оценке в незавершенных наблюдениях) и популяционного (обучающая выборка) здоровья (или, точнее, адаптационного потенциала, своеобразного «ресурса жизнестойкости» индивида, информацию о котором было бы целесообразным использовать в общей оценке элементного дисбаланса как показатель «преждевременного старения»);

б) нелинейный регрессионный анализ не позволяет обнаружить заметных корреляций между элементным составом волос и выживаемостью – в таком случае необходим поиск других (более адекватных) способов верификации указанной связи, чтобы подтвердить (или отвергнуть) саму возможность ее существования.

Было бы целесообразным также выполнить

проверку гипотезы о нормальности распределения результатов спектрометрического анализа сыворотки/плазмы на содержание биоэлементов (как в генеральной совокупности, так и в разных возрастных группах: I группа от 0 до 32 лет, II – от 33 до 44 лет и III – старше 45 лет) и анализ линейных связей между концентрациями минералов, которые могли бы служить дискриминаторами крайних (I и III) возрастных групп (в продолжение исследований, где в качестве субстрата были использованы волосы). Для выполнения этой работы можно использовать архивный материал (при условии проведения всех анализов на одном и том же приборе). Проверку нулевой гипотезы (выборка принадлежит генеральной совокупности, распределенной по нормальному закону с параметрами математического ожидания и дисперсии, определяемыми с помощью стандартных несмещенных оценок по данной выборке) следует провести с помощью теста Колмогорова, анализ линейных парных корреляций – с использованием



Рис. 3. Коэффициенты корреляции Пирсона для общей группы. Светлые столбики - данные после фильтрации по правилу 3 Sigma. Темные - фильтрация не применялась.

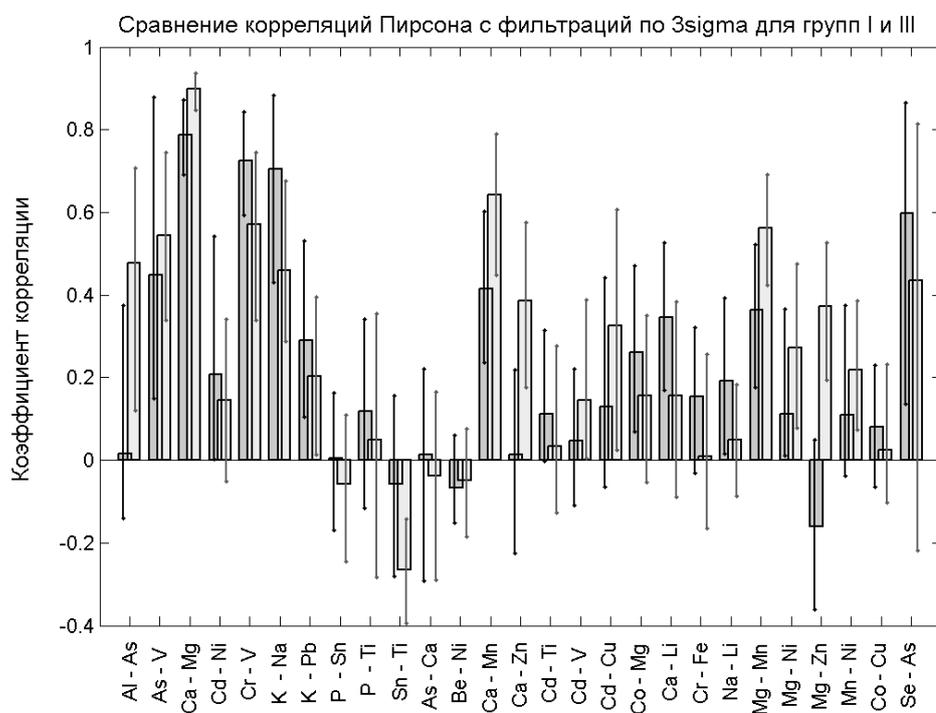


Рис. 4. Сравнение коэффициентов корреляции Пирсона концентраций микро- и макроэлементов в волосах для групп I и III (данные с фильтрацией по правилу 3 Sigma). Темным цветом обозначена группа III, светлым – группа I. Вертикальными линиями с точками на концах обозначены 95% доверительные интервалы для соответствующих коэффициентов корреляции, определяемые с использованием “бутстрепинга”.

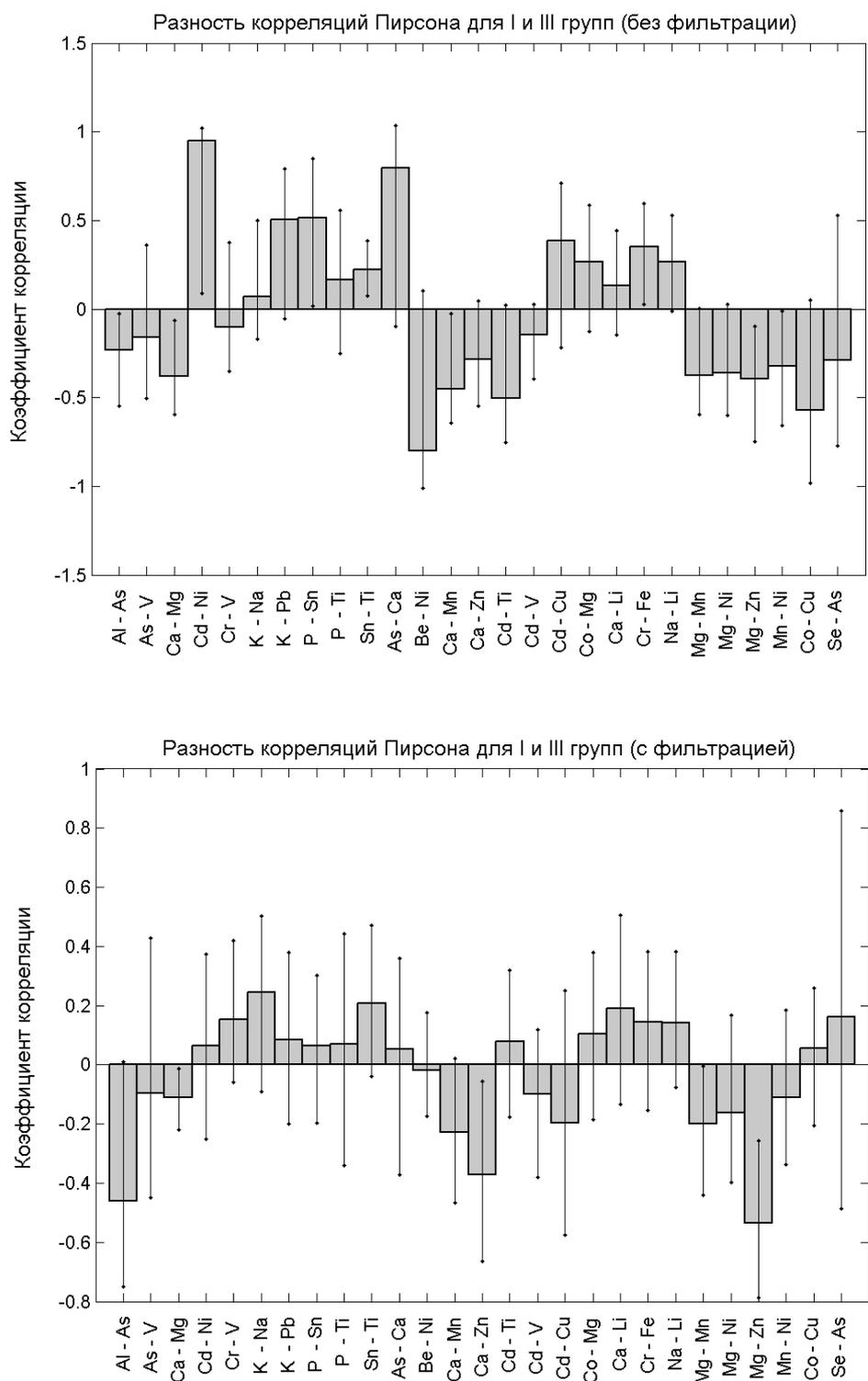


Рис. 5. Доверительные интервалы разности коэффициентов корреляции Пирсона для групп I и III а) - без применения фильтрации; б) - данные с фильтрацией по правилу 3 Sigma. Вертикальными линиями с точками на концах обозначены 95% доверительные интервалы для соответствующих коэффициентов корреляции, определяемые с использованием "бутстреппинга".

коэффициента корреляции Пирсона, нахождение доверительных интервалов для полученных коэффициентов корреляции – с помощью альтернативного метода определения доверительных интервалов («бутстреппинг»), который позволяет получить значительно большую статистику для оцениваемого параметра и построить для него эмпирическую функцию распределения вероятностей.

Ожидаемые результаты:

а) представляется важным, что в результате исследования будет установлено, у каких элементов распределение концентраций не противоречит гипотезе о соответствии нормальному закону, т.к. только при этом условии к ним могут быть применимы стандартные методы последующего статистического анализа;

б) весьма вероятно обнаружение возрастных различий среди парных линейных корреляций в элементном составе плазмы/сыворотки (как это

имело место в наших исследованиях, где субстратом служили волосы испытуемых).

Литература

- Петухов В.И., Быкова Е.Я., Бондаре Д.К. и др. Сывороточный ферритин в диагностике железодефицитных состояний // Гематол. и трансфузиол. 2003. Т.48. №2. С.36-41.
- Петухов В.И., Калвиныш И.Я., Шестакова И.К. и др. Нитрозирующий стресс: понятие о «функциональном дефиците» эссенциальных биоэлементов // Микроэлементы в медицине. 2004а. Т.5. Вып.4. С.110-111.
- Петухов В.И., Быкова Е.Я., Бондаре Д.К. и др. Содержание в волосах меди (Cu), цинка (Zn), марганца (Mn) и активность супероксиддисмутазы (SOD) эритроцитов у здоровых жителей Риги // Успехи совр. естествозн. 2004б. № 6 (прилож. 1). С 52-54.
- Cox D.R. Regression models and life-tables // J.R.Stat. Soc.B. 1972. Vol.34. P. 187-202.