

Wpływ chorób przyzębia na stężenie wybranych metali w ślinie

Małgorzata HERMAN¹
 Magdalena GOLASIK¹
 Anna KURHAŃSKA-FLISYKOWSKA²
 Maksymilian KULZA³
 Paulina CHĘSY¹
 Marzena WYGANOWSKA-ŚWIĄTKOWSKA²
 Anna WOŹNIAK³
 Wionika SEŃCZUK-PRZYBYŁOWSKA³
 Janina STOPA²
 Andrzej PARCZEWSKI¹
 Ewa FLOREK³
 Wojciech PIEKOSZEWSKI^{1,4}

¹Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii,
 Uniwersytet Jagielloński, Kraków
 Kierownik:
 Prof. dr hab. Paweł Kościelniak

²Katedra i Klinika Stomatologii Zachowawczej
 Periodontologii
 Uniwersytetu Medycznego
 m. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik:
 Prof. dr hab. n. med. Janina Stopa

³Laboratorium Badań Środowiskowych,
 Katedra i Zakład Toksykologii,
 Uniwersytet Medyczny
 m. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik Laboratorium:
 Prof. dr hab. Ewa Florek

⁴Pracownia Wysokorozdzielczej Spektrometrii
 Mas, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
 Kraków
 Kierownik Pracowni:
 Prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski

Dodatkowe słowa kluczowe:
 ślina;
 ICP
 choroby przyzębia
 PCA

Additional key words:
 saliva
 ICP
 periodontal diseases
 PCA

Badania były realizowane w ramach projektu
 badawczego NCN, Nr N N404 202139.

Adres do korespondencji:
 Prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski
 Zakład Chemii Analitycznej
 Uniwersytet Jagielloński
 30-060 Kraków, ul. Ingardena 3
 Tel.: 12 663 56 00; Faks: 12 663 56 01
 e-mail: wojciech.piekoszewski@uj.edu.pl

Analiza materiałów biologicznych pod kątem zawartości pierwiastków (głównie metali) stanowi wyzwanie dla analityków. Wynika to ze złożonego charakteru matrycy tego rodzaju próbek oraz konieczności zachowania czystości na wszystkich etapach procesu analitycznego. Na przestrzeni lat opracowano wiele skutecznych metod oznaczania metali w płynach ustrojowych, które wiążą się z poszukiwaniem zależności pomiędzy zawartością pierwiastków w organizmie i występowaniem różnych stanów chorobowych.

Celem niniejszej pracy było zastosowanie opracowanej metodyki do oznaczenia wybranych metali dwoma technikami: ICP-MS i ICP-OES, w ślinie i we krwi pacjentów z chorobami przyzębia oraz w grupie kontrolnej (osoby zdrowe). Następnie przeprowadzono statystyczną analizę otrzymanych danych. Zbadano wpływ chorób przyzębia na stężenie wybranych metali (Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Cd, Co, Cr, Pb) w ślinie, a także podjęto próby klasyfikacji próbek odpowiednio dla grup osób: zdrowych i z chorobami przyzębia. Dodatkowo określono wzajemne zależności między analitykami w badanych materiałach biologicznych na podstawie współczynnika korelacji liniowej Pearsona oraz analizy głównych składowych (PCA).

Wstęp

Wszystkie pierwiastki mają wpływ na procesy, jakie zachodzą w ludzkim organizmie. Niedobory składników mineralnych nie są zbyt często spotykane, ale wywołują nieprawidłowości w funkcjonowaniu ustroju. Znacznie większą uwagę poświęca się ich ewentualnej toksyczności. Wzmószona akumulacja lub nadmierna ekspozycja na metale zarówno toksyczne, jak i obojętne oraz niezbędne dla człowieka, może prowadzić do poważnych zaburzeń zdrowotnych, a w skrajnych przypadkach do śmierci. Określanie ilościowej zawartości makro- i mikroelementów w organizmie pozwala na zdiagnozowanie i kontrolowanie przebiegu wielu chorób, stanu odżywienia oraz identyfikację i monitoring ekspozycji zawodowej i środowiskowej [2].

Składniki mineralne niejednokrotnie odgrywają również istotną rolę w etiologii

Analysis of elements (mainly metals) in biological materials provides a challenge for analytics. It results from complex matrix of this kind of samples and strict requirements for purity at all stages of the analytical process. Over the years many effective methods for determination of metals in body fluids have been developed, which link with searching for the association between elemental composition of human body and various diseases.

The aim of the investigation was to study the usefulness of available methodology to determination of selected metals in saliva and blood of patients with periodontitis and healthy controls by two techniques" ICP-MS and ICP-OES. Next statistical analysis of the data statistical was carried out. The influence of periodontal disease upon the concentrations of selected metals (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb and Zn) in saliva was examined, as well the attempt to classify samples of patients with periodontitis and healthy individuals correctly was made. Additionally mutual relations between analytes in examined materials were determined by computing the Pearson's correlation coefficient and principal component analysis (PCA).

różnych chorób. Badanie związku między schorzeniami a zawartością metali oraz skomplikowanymi interakcjami pomiędzy nimi stało się w ostatnich latach przedmiotem zainteresowania wielu badaczy [9-14, 18-20]. Odkrywanie oraz opracowywanie modeli wspomnianych zależności odbywa się na podstawie analizy dużej ilości danych z zastosowaniem metod chemometrycznych. Opublikowano dotychczas wiele prac, których autorzy podjęli się tego zadania, wykorzystując takie metody, jak analiza korelacyjna [9, 11, 12, 14, 18], sieci neuronowe [19, 20], analiza dyskryminacyjna [10, 13], modelowanie na podstawie różnych algorytmów [9], drzewa decyzyjne [12, 14], analiza głównych składowych [10-14, 18, 20], analiza skupień [11, 10] oraz tworzenie zespołów klasyfikatorów [10, 12-14, 19, 20]. Najwięcej publikacji z tego zakresu jest poświęconych poszukiwaniu korelacji pomiędzy

zawartością pierwiastków w organizmie i występowaniem różnych rodzajów nowotworów: prostaty, gruczołu sutkowego, płuc, wątroby i żołądka [10,12, 13,18-20]. Oprócz tego, podejmowano również próby wykazania wpływu takich schorzeń, jak choroba Parkinsona, zapalenie wątroby typu C czy choroby układu krążenia na zaburzenia składu pierwiastkowego organizmu [9,11,14].

Choroby przyzębia można zdefiniować, jako przewlekłe stany zapalne tkanek, które otaczają, podtrzymują i chronią ząb. Rozwijają się one na skutek działalności bakterii, znajdujących się w płytce nazębnej na powierzchni zębów, a także na innych twardych elementach w jamie ustnej (aparatach nazębnych i wypełnieniach protetycznych) [8,6]. Początkowe stadium choroby przyzębia to zapalenie dziąseł (łac. gingivitis), które nieleczone może przekształcić się w zapalenie przyzębia (łac. periodontitis) [3,17]. Osłabienie mechanizmów obronnych organizmu, a tym samym zwiększenie podatności na bakteryjną infekcję tkanek przyzębia, jest uzależnione od wielu czynników, które można podzielić na dwie grupy - determinanty, na które człowiek nie ma wpływu oraz właściwe czynniki ryzyka, które zwiększają prawdopodobieństwo powstania stanu zapalnego przyzębia. Do tej pierwszej należą uwarunkowania genetyczne, płeć, rasa, wiek, stan socjoekonomiczny, a do drugiej zalicza się m.in. palenie tytoniu, złą higienę jamy ustnej, nieprawidłowe odżywianie, przyjmowanie określonych leków, stres, a także liczne choroby, takie jak cukrzyca, osteoporoza oraz AIDS [6,17].

Materiał i metody

Zgodę na przeprowadzenie badań wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 670/08 w dniu 12.06.2008 r.

Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 35 pacjentów Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupą kontrolną było 34 ochotników, których zakwalifikowano jako osoby zdrowe, niepalące i nieeksponowane zawodowo na metale ciężkie.

Wszyscy pacjenci oraz ochotnicy, od których pobierano materiały biologiczne, wyrazili zgodę na przeprowadzenie badań. Poinformowano ich również o celowości tych badań.

Jako materiał biologiczny wykorzystano ślinę i krew.

Od osób chorych otrzymano 31 próbek śliny, z czego 17 pochodziło od kobiet, a 14 od mężczyzn, natomiast od zdrowych ochotników uzyskano 19 próbek śliny od kobiet, natomiast 10 od mężczyzn. Grupa 15 zdrowych ochotników oddawała rano płyn z jamy ustnej do polietylenowej próbówki, po wcześniejszym przepłukaniu ust wodą dejonizowaną. Uzyskiwano w ten sposób po ok. 5 mL próbki. Od reszty osób z grupy kontrolnej oraz pacjentów pobrano ślinę z wykorzystaniem saliwetek otrzymując w ten sposób próbki o objętości ok. 1 mL.

Krew była pobierana przez personel medyczny w ilości ok. 1 mL. Od pacjentów uzyskano 13 próbek krwi, z czego 8 pochodziło od kobiet, a 5 od mężczyzn. W przypadku grupy kontrolnej pobrano 10 próbek krwi od kobiet oraz 5 od mężczyzn. Próbkę materiałów biologicznych były przechowywane w temperaturze -20°C.

Odczynniki i roztwory

Roztwory wzorcowe do kalibracji przygotowywano przez rozcieńczenie dwóch standardowych roztworów: Atomic Spectroscopy Standard, Multi-element ICP-MS Calibration Std 3 o stężeniu analizów 10 mg·L⁻¹ (Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K,

Tabela I

Porównanie wyznaczonych stężeń dziesięciu metall w certyfikowanym materiale krwi, pipetowanym dwoma technikami – normalną i odwrotną.

Comparison of determined concentration of ten metals in blood certified reference materials in case of normal and reverse pipetting.

Analit	Zakres stężeń analitu w certyfikowanym materiale krwi [µg·L ⁻¹]	Pipetowanie normalne		Pipetowanie odwrotne	
		Wyznaczone stężenie metalu [µg·L ⁻¹]	RE [%]	Wyznaczone stężenie metalu [µg·L ⁻¹]	RE [%]
Ca	13,4-14,6*	9,69*	-30,81	12,52*	-10,56
Cd	6,1-6,9	5,27	-18,87	6,61	1,53
Co	5,3-6,7	1,97	-67,16	6,03	0,55
Cr	9,8-15,0	15,26	23,03	12,72	2,59
Cu	1123-1279	2730,94	127,20	1195,47	0,46
Fe	339-347*	351,81*	2,57	335,97*	-2,09
Mg	15,25-16,45*	16,51*	4,17	16,77*	5,82
Mn	29,7-35,7	84,00	156,89	31,91	-2,44
Pb	300-372	195,96	-41,68	351,71	4,67
Zn	7150-8210	7210,75	6,11	7143,37	-6,99

*mg·L⁻¹

Tabela II

Program mineralizacji próbek śliny oraz krwi.

Mineralization program for saliva and blood samples.

Mineralizacja				Chłodzenie		Max. ciśnienie [bar]	Max. temp. [°C]
Krok 1	Czas [min]	Krok 2	Czas [min]	Krok 3	Czas [min]		
Stopniowy przyrost mocy do 1200 W	15	Utrzymywanie stałej mocy 1200 W	20	Spadek temperatury do ok. 40°C	~15	60	242

Tabela III

Dokładność zastosowanej metody oznaczania metall w materiale certyfikowanym krwi.

Accuracy of the evaluated method in case of determination of metals in certified reference material of blood.

Analit	Certyfikowane stężenie C _{CRM} ± SD [µg·L ⁻¹]	Wyznaczone stężenie [µg·L ⁻¹]	Błąd względny RE [%] (n=3)
Ca	14 ± 0,6*	12,16	-13,12
Cd	6,5 ± 0,4	6,53	0,43
Co	6 ± 0,7	5,11	6,03
Cr	12,4 ± 2,6	12,78	3,10
Cu	1201 ± 78	1131,03	5,83
Fe	343 ± 4*	343,34	0,10
Mg	15,85 ± 0,6*	14,44*	-8,89
Mn	32,7 ± 3,0	29,79	-8,89
Pb	336 ± 36	351,71	4,67
Zn	7680 ± 530	7054,55	-8,14

*mg·L⁻¹

Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, Se, Na, Ag, Sr, Ti, V, U, Zn) (Perkin Elmer, Niemcy) oraz ICP Multi-element Standard Solution VI o stężeniu pierwiastków 1000 mg·mL⁻¹ (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Ti, Zn) (Merck, Niemcy). Do oceny czułości aparatury do ICP-MS wykorzystywano roztwór Atomic Spectroscopy Solution, Smart Tune Solution Std ELAN & DRC-e o stężeniu pierwiastków 10 ppb (Ba, Be, Ce, Co, In, Mg, Pb, Rh, U) (Perkin Elmer, Niemcy). Próbkę rozcieńczano z wykorzystaniem wody o specjalnej czystości z procesu odwróconej osmozy o przewodnictwie 0,05 µS. Dokładność metody oceniono na podstawie analizy certyfikowanego materiału krwi Seronorm Whole Blood L-2 (SERO, Norwegia). Próbkę materiałów biologicznych mineralizowano z wykorzystaniem 65%

kwasu azotowego(V) o specjalnej czystości (Suprapur (Merck, Niemcy).

Aparatura

W badaniach wykorzystano wielostanowiskowy mineralizator mikrofalowy z nacyniami teflonowymi w osłonie ceramicznej, Multiwave 3000, (Anton Paar Austria), spektrometr mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie ICP-MS Mass Spectrometer ELAN DRC-e Axial Field Technology (Perkin Elmer, Niemcy) spektrometr optyczny ze wzbudzeniem w plazmie sprężonej indukcyjnie Optical Emission Spectrometer Optima 2100DV (Perkin Elmer, Niemcy), demineralizator wody WG-HLP (Wigo, Polska), wyrzaskarkę o ruchu w trzech wymiarach PS-M3D (Wilko, Polska) oraz Vortex Mixer VX-200 (Labnet, USA).

Tabela IV
Wartości wyznaczonych parametrów walidacyjnych dla metod oznaczania wybranych metall w ślinie i we krwi.
Validation parameters designated for the methods of determination of the chosen metals in saliva and blood.

Parametr walidacyjny			Wielkość parametru									
			Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Pb	Zn
Granica wykrywalności LOD (n=10) [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]			0,02*	0,004	0,004	0,007	0,01	0,21	0,003*	0,007	0,006	0,07
Granica oznaczalności LOQ (n=10) [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]			0,05*	0,02	0,01	0,02	0,04	0,69	0,009*	0,03	0,02	0,22
Roboczy zakres pomiarowy [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]			0,05-20*	0,02-200	0,01-200	0,02-200	0,04-200	0,69-200	0,009-20*	0,03-200	0,02-200	0,22-200
Precyzja	Ślina (n=3)	SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,14*	0,02	0,04	0,11	0,34	0,17*	0,08*	4,44	0,58	2,74
		CV [%]	0,34	5,18	2,46	0,55	7,00	1,15	0,75	2,75	5,38	1,44
	Krew (n=3)	SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,18*	0,35	0,76	0,09	0,30	3,19*	0,14*	11,62	1,38	0,08*
		CV [%]	1,03	6,24	4,22	0,70	0,02	0,90	0,71	2,60	0,68	1,18

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Tabela V
Zestawienie wartości parametru t-Studenta dla dwóch średnich stężeń danego metalu dla próbek śliny od grupy kontrolnej i pacjentów oraz wartości parametru krytycznego $t_{0,05}$ dla $p=0,05$.
A list of values of t-Student parameter for two mean values of a given metal concentration obtained for saliva samples of control group and patients along with the value of critical parameter $t_{0,05}$ for $p=0,05$.

Metal	Średnie stężenie metalu u zdrowych osób $Cx \pm SD$ [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Średnie stężenie metalu u pacjentów $Cx \pm SD$ [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	teksp	$t_{0,05}$
Ca	34,97 \pm 18,44*	39,22 \pm 19,37*	0,78	2,01
Cd	0,29 \pm 0,26	0,23 \pm 0,14	1,51	
Co	0,61 \pm 0,44	0,64 \pm 0,77	0,21	
Cr	6,38 \pm 5,62	18,05 \pm 10,31	5,09	
Cu	8,15 \pm 5,17	45,09 \pm 4,97	4,65	
Fe	933,24 \pm 461,95	984,91 \pm 622,68	1,26	
Mg	6,04 \pm 3,36*	9,92 \pm 5,39*	3,09	
Mn	14,97 \pm 8,16	41,09 \pm 15,63	7,01	
Pb	12,36 \pm 7,88	15,81 \pm 8,18	1,61	
Zn	75,25 \pm 74,45	79,11 \pm 103,24	0,15	

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Mineralizacja

Próbki materiałów biologicznych przed mineralizacją były rozmrażane w temperaturze pokojowej przez około godzinę. Ślinę odwirowywano w warunkach 5000 obr. $\cdot\text{min}^{-1}$ przez 10 minut, w celu oddzielenia białek oraz innych stałych elementów, natomiast krew odwirowywano przy 14 000 obr. $\cdot\text{min}^{-1}$ przez 10 minut w celu uzyskania surowicy krwi. Dzień próbek krwi zawierało antykoagulant, w związku z czym oddzielenie surowicy nie było możliwe. Do naczynia mineralizacyjnego dodawano 0,5 mL danego materiału biologicznego i 6 mL kwasu azotowego(V) o stężeniu 65%. Stwierdzono, że pipetowanie technika odwrótną pozwala na uzyskanie dokładniejszych wyników oznaczeń większości metalli. W Tabeli I porównano wartości błędów względnych dla obu technik pipetowania. Proces mineralizacji był przeprowadzany według optymalnego programu, który przedstawiono w Tabeli II. Po mineralizacji i odpędzeniu lenków azotu mineralizaty przenoszono ilościowo do kolby o pojemności 10 mL oraz dopełniano do kreski wodą o specjalnej czystości z procesu odwróconej osmozy. Tak przygotowane mineralizaty były przechowywane w szczelnie zamkniętych, polietylenowych probówkach w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Oznaczanie metalli technikami ICP

Techniką ICP-OES wykonano oznaczenia Ca i Mg przy długościach fali odpowiednio: λ_{Ca} = 317,933 nm i λ_{Mg} = 422,673 nm, za pomocą spektrometru ICP-OES Optima 2100DV firmy Perkin Elmer. Za pomocą techniki ICP-MS przeprowadzono analizę ilościową dla następujących izotopów: ^{66}Zn , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{55}Mn , ^{111}Cd , ^{58}Co , ^{52}Cr i ^{208}Pb , przy zastosowaniu spektrometru ICP-MS ELAN DRC-e Axial Field Technology firmy Perkin Elmer. Kalibrację instrumentów wykonywano metodą

serii wzorców przed każdą serią pomiarów. Krzywe kalibracyjne obejmowały zakres stężeń poszczególnych pierwiastków w próbkach oraz w certyfikowanym materiale krwi. W celu kontroli zmienności krzywej kalibracyjnej co ok. 10 próbek analizowano roztwór kontrolny o znanym stężeniu, sporządzony z roztworów wzorcowych firmy Perkin Elmer.

Parametry walidacyjne stosowanych technik

W celu weryfikacji metod oznaczania wybranych metalli w materiałach biologicznych przeprowadzono walidację. Podstawowe parametry analityczne zostały wyznaczone z wykorzystaniem certyfikowanego materiału krwi oraz próbki śliny od zdrowej osoby. Otrzymane wartości zestawiono w Tabelach III i IV.

Metody statystyczne

Na początku sprawdzono, czy w wynikach analiz nie występują błędy grube. Jeśli stężenie jakiegoś metalu w próbce znacząco odbiegało od pozostałych w danej grupie osób, przeprowadzono test Grubbsa dla $p < 0,05$ i odrzucano wynik, jeśli obliczona dla niego wartość parametru G_p była większa od wartości krytycznej, odczytanej z tabeli.

Zbadano normalność rozkładu wszystkich badanych zmiennych. W tym celu przeprowadzono test Kolmogorowa-Smirnowa na poziomie istotności $p=0,05$.

W celu oceny wpływu różnych czynników na średnie stężenia metalli w płynach biologicznych przeprowadzono test t-Studenta do porównania istotności różnic pomiędzy dwoma grupami (przykładowo zdrowych osób oraz pacjentów). Wcześniej sprawdzano, czy wariancje są jednorodne, wykonując test F-Snedecora dla poziomu istotności $p=0,05$.

Oceny współzależności pomiędzy pierwiastkami w ślinie, krwi i surowicy dokonano na podstawie wyzna-

czenia współczynników korelacji liniowej Pearsona oraz analizy głównych składowych.

Na końcu sprawdzono możliwość rozróżnienia osób z chorobami przyzębia od zdrowych na podstawie zawartości metalli w ślinie oraz surowicy. W tym celu wykonano analizę skupień. Grupowanie danych przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda. Za miarę podobieństwa między obiektami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa.

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem programu STATISTICA wersja 10 firmy StatSoft, Inc.

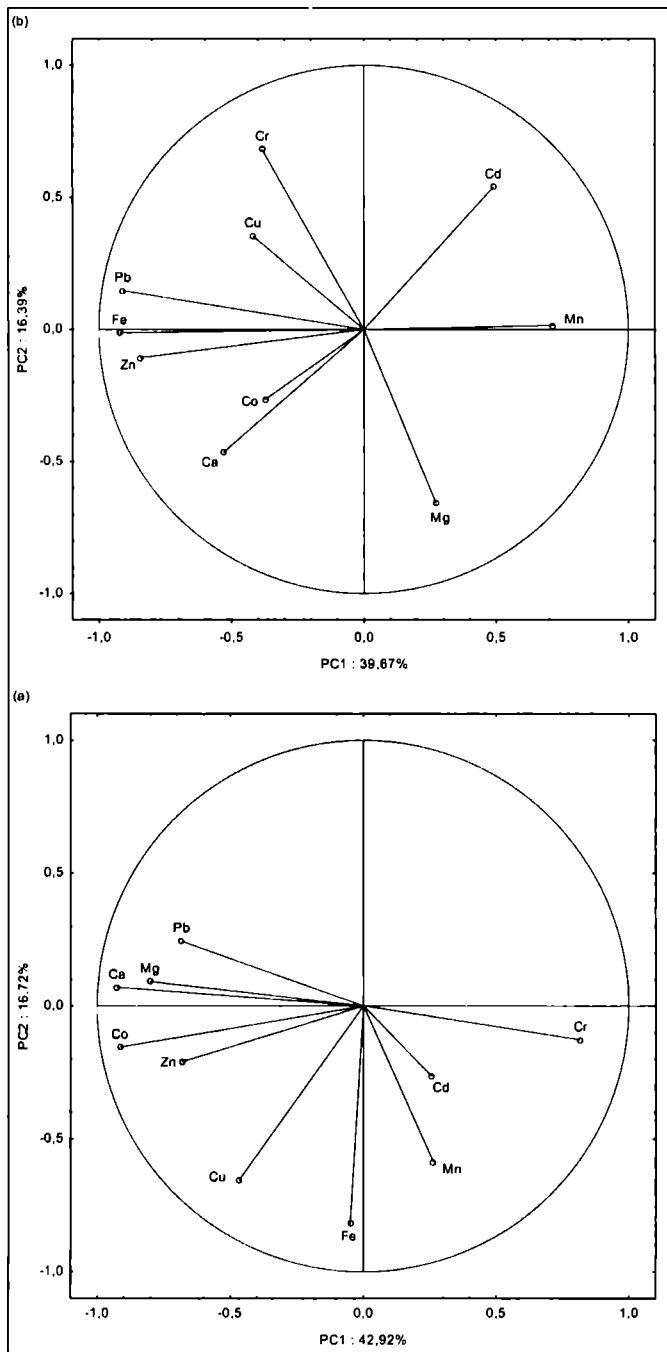
Wyniki

Na podstawie analizy wyników oznaczeń stwierdzono, że średnie stężenia większości analitów w ślinie były wyższe w grupie chorych osób w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela V). Istotnie statystycznie różnice w średnich stężeniach metalli w dwóch badanych grupach stwierdzono dla Cu, Mg, Mn i Cr. Przeprowadzone badania wskazują na to, że choroby przyzębia są m. in. związane z podwyższeniem poziomu tych czterech metalli fizjologicznych w ślinie. Jednakże tę interesującą obserwację należałoby potwierdzić, wzięwszy pod uwagę większą grupę osób podlegających obserwacji i leczeniu klinicznemu, jak również osób zdrowych.

Przenalizowano również wpływ płci na zawartość metalli w ślinie osób grupy kontrolnej i pacjentów chorych, a także we krwi. W żadnej z badanych grup nie wykryto statystycznie istotnych różnic w stężeniach rozpatrywanych analitów. Wnioskuje się, że w tym przypadku płeć nie wywiera znaczącego wpływu na zawartość metalu w organizmie.

Wzajemne powiązania między analitami w ślinie rozważano w obrębie dwóch grup – osób z chorobami przyzębia oraz zdrowych. W grupie osób zdrowych zaobserwowano silne korelacje między Ca i Co ($r=0,872$), oraz Ca i Mg ($r=0,782$). Co był dodatkowo skorelowany jeszcze z czterema metalami – Cu, Mg, Pb oraz Zn. Inne znaczące zależności zaobserwowano pomiędzy Cu i Zn, Ca i Zn oraz Ca i Pb. Odmienne korelacje występowały w ślinie osób z chorobami przyzębia. Zn był najsilniej skorelowany z Fe ($r=0,762$), oprócz tego wykazywał korelacje z Ca, Co i Pb. Z kolei Pb, podobnie jak Zn, był silnie skorelowany z Fe ($r=0,870$). Oprócz tego zaobserwowano trochę słabsze dodatnie korelacje Pb z Cr i Cu.

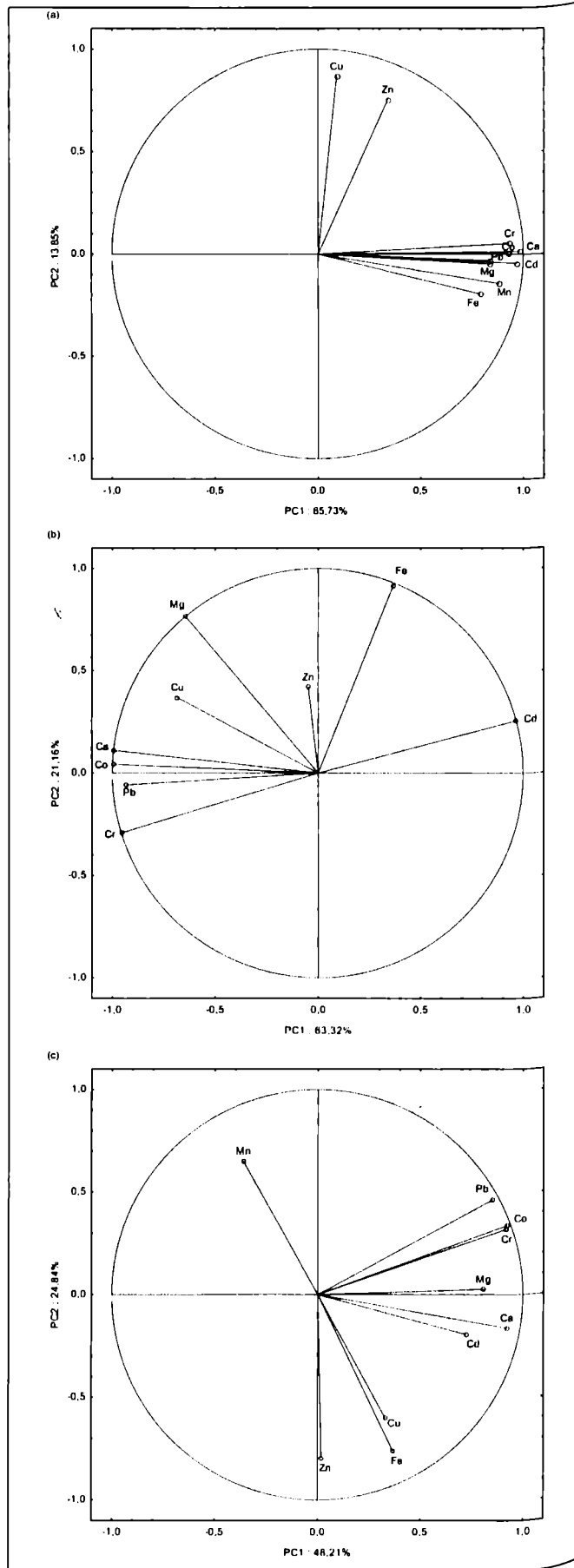
Na podstawie analizy PCA (Rycina 1 stwierdzono, że w ślinie zdrowych osób



Rycina 1
Projekcja zmiennych (stężenia metali) na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 i PC2): (a) zdrowych osób; (b) osób z chorobami przyzębia, w ślinie.

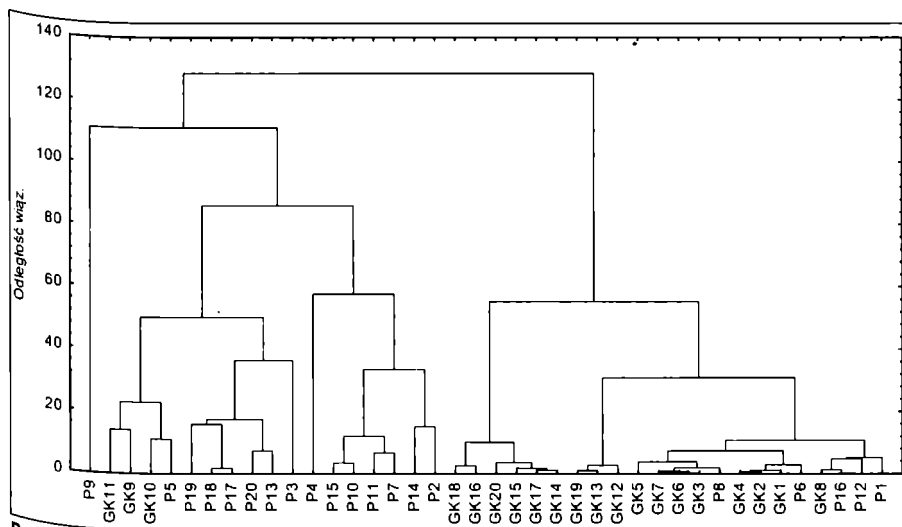
Projection of variables (the concentration of metals) on the plane of two first principal components (PC1 and PC2): (a) healthy individuals (b) patients with periodontitis, in saliva

pojawiają się następujące dodatnie korelacje – Ca-Mg, Zn-Co, Ca-Co, Ca-Zn i Pb-Mg, natomiast Cr jest silnie ujemnie skorelowany z większością pierwiastków. W przypadku śliny osób z chorobami przyzębia najważniejsze, dodatnie korelacje to Zn-Fe, Fe-Pb, Co-Ca, Co-Zn oraz Pb-Cr. Trzy metale – Cd, Mn oraz Mg, są skorelowane ujemnie z pozostałymi. Na podstawie wizualnego porównania obu wykresów stwierdzono, że w ślinie pacjentów i ochotników (grupa kontrolna) występują odmienne modele wzajemnych



Rycina 2
Projekcja zmiennych (stężenia metali) na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 i PC2): (a) surowicy od grupy kontrolnej; (b) surowicy od pacjentów; (c) krwi od pacjentów.

Projection of variables (the concentration of metals) on the plane of two first principal components (PC1 and PC2): (a) serum from healthy individuals; (b) serum from patients; (c) blood from patients.



Rycina 3
Dendrogram dla próbek śliny.
The dendrogram for samples of saliva.

zależności między pierwiastkami. Ponadto w ślinie pacjentów liczba dodatnich korelacji jest znacznie mniejsza.

Metale w surowicy zdrowych osób wykazują bardzo wiele silnych korelacji. Najsilniejsze zależności występują między Ca i Cd ($r=0,951$), Ca i Co ($r=0,929$), Co i Cr ($r=0,890$) oraz Co i Mn ($r=0,906$). Oprócz tego zauważono, że Ca jest trochę słabiej skorelowany z wieloma pierwiastkami – Cr, Fe, Mg, Mn i Pb. Inne istotne współzależności występują między Cd i Cr, Fe, Mg, Mn i Pb. Z tymi pięcioma metalami jest skorelowany również Co. Z kolei Cr jest dodatnio powiązany z Fe, Mg, Mn i Pb. Kolejny metal, Fe, wykazuje współzależności z Mg, Mn i Pb. Całkiem odmienny model wzajemnych zależności zaobserwowano w surowicy osób z chorobami przyzębia. Można zauważyć tutaj jedynie dwie silne korelacje – między Ca i Co ($r=0,994$) oraz Pb i Co ($r=0,964$), które pojawiają się także w przypadku surowicy pobranej od zdrowych osób. We krwi osób z chorobami przyzębia zaobserwowano znacznie więcej powiązań pomiędzy metalami niż w surowicy od tej grupy. Najsilniejsze dodatnie korelacje występują między Co i Pb ($r=0,976$), Co i Cr ($r=0,950$), a także Cr i Pb ($r=0,898$). Ponownie, jak w przypadku surowicy zdrowych osób, zauważono istotne współzależności Ca z wieloma pierwiastkami – Co, Cr i Mg. Trochę słabszą korelację wykazują Fe i Cd, Mg i Co oraz Mg i Cr. Na podstawie analizy PCA stwierdzono, że modele interakcji między metalami są różne we wszystkich analizowanych przypadkach, co jest dobrze widoczne na wykresach wektorów ładunków czynnikowych (Rycina 2). Podobnie, jak w przypadku śliny, grupa zdrowych osób charakteryzuje się większą liczbą współzależności między badanymi pierwiastkami.

Wyniki analizy skupień dla próbek śliny przedstawiono w formie dendrogramu na rysunku (patrz Rycina 3). Przy odległości skupiania równej 120 widać wyraźnie wyodrębnione dwa skupienia próbek. Skupienie po prawej stronie obejmuje grupę zdrowych osób, zaś po lewej stronie znajduje się grupa chorych osób. W lewym skupieniu znalazły się trzy próbki z grupy kontrolnej, zaś w

prawym pięć z grupy osób z chorobami przyzębia. Biorąc pod uwagę liczbę próbek (40), można stwierdzić, że przeprowadzona klasyfikacja jest zadowalająca.

Na podstawie stężenia dziesięciu metali (Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Cr, Cd, i Pb) w ślinie można rozróżnić próbki od zdrowych osób oraz chorych wykorzystując do tego celu analizę skupień.

Podsumowanie

Oznaczanie metali w materiałach biologicznych jest trudnym zadaniem, wymagającym szczególnej skrupulatności oraz ostrożności na wszystkich etapach procesu analitycznego ze względu na ich wszechobecność w środowisku i możliwość kontaminacji próbek. Należy liczyć się również z różnicami w zawartości pierwiastków w organizmach między jednostkami w związku z wieloma czynnikami, które mają na nie wpływ.

Zastosowane w badaniach techniki oznaczania wybranych metali charakteryzowały się dobrymi parametrami analitycznymi. Uzyskane wartości błędów względnych były satysfakcjonujące dla większości analitów, a ich stężenia mieściły się w zakresie podanym przez producenta certyfikowanego materiału odniesienia. Wykorzystywane techniki charakteryzowały się niskimi granicami wykrywalności (przykładowo $0,004 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dla Cd i Co). Precyzja dla pojedynczego pomiaru, wyrażona przez SD, wahała się w granicach od $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do $0,14 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dla śliny oraz od $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do $0,18 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dla krwi. Wartości precyzji stosowanych technik, wyrażonej jako CV, wyniosły w przypadku krwi od 0,02% do 6,24% oraz od 0,34% do 7,00% dla śliny. Zastosowane techniki cechowała wysoka precyzja, porównywalna z uzyskiwaną przez innych autorów [5,7,15].

Przeprowadzona analiza wybranych metali w ślinie od osób dwóch badanych grup wykazała, że u pacjentów z chorobami przyzębia można zaobserwować podwyższony poziom prawie wszystkich pierwiastków, zaś różnice w średnim stężeniu Cr, Cu, Mg i Mn w ślinie są statystycznie istotne. Stan zapalny przyzębia może być związany z zaobser-

wowanymi zależnościami, lecz należałoby to zweryfikować przeprowadzając badania na dużej grupie ludzi, żeby uśrednić różnice w stężeniach pierwiastków wynikające m.in. z rodzaju diety oraz miejsca zamieszkania (mieszkańcy miast są bardziej narażeni na ekspozycję na metale) [1,4,16]. Dodatkowo stwierdzono, że między płaciami nie występują znaczące różnice w zawartości metali w ślinie oraz we krwi.

Analizę wzajemnych zależności między metalami w trzech rodzajach materiałów biologicznych przeprowadzono na podstawie współczynnika korelacji liniowej Pearsona oraz analizy głównych składowych. Porównując korelacje we wszystkich materiałach biologicznych dla pacjentów z chorobami przyzębia oraz zdrowych osób, stwierdzono, że w tej pierwszej grupie występuje znacznie mniej wzajemnych zależności między pierwiastkami. Choroby przyzębia mogą być czynnikiem, który wpływa na wzajemną równowagę między metalami w ustroju.

Na końcu przeprowadzono analizę skupień dla próbek śliny, pobranych od zdrowych osób oraz od pacjentów z chorobami przyzębia. Stwierdzono, że badane grupy tworzą wyraźne, odrębne podzbiory. Można przypuszczać, że na podstawie stężenia dziesięciu metali (Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Cr, Cd, i Pb) w ślinie oraz z wykorzystaniem analizy skupień jest możliwe rozróżnienie próbek od chorych i od zdrowych osób.

Poszukiwanie korelacji między schorzeniami a zawartością metali w organizmie z pewnością będzie w przyszłości cieszyło się coraz większym zainteresowaniem badaczy. Powiązanie chorób przyzębia ze zmianą stężeń metali jednocześnie w ślinie i we krwi oraz możliwość ewentualnej diagnostyki na tej podstawie może w przyszłości służyć zapobieganiu rozwojowi chorób, jak i również wspomóc leczenie istniejących.

Piśmiennictwo

1. Aellon C.M, Davis H.T., McDermott S., Lawson A.B.: Soil metal concentrations and toxicity: associations with distances to industrial facilities and implications for human health. *Sc. Total Environ.* 2009, 407, 2216.
2. Bornhorst J.A., McMillin G.A.: Trace and toxic elemental testing in the clinical laboratory. *Lab. Med.* 2006, 37, 690.
3. Chomyszyn-Gajewska M.: Ślina jako czynnik diagnostyczny w chorobach przyzębia- ocena wybranych markerów. *Przegl. Lek.* 2010, 67, 213.
4. Davis H.T., Aellon C.M., McDermott S., Lawson A.B.: Identifying Natural and Anthropogenic Sources of Metals in Urban and Rural Soils Using GIS-Based Data, PCA, and Spatial Interpolation. *Environ. Pollut.* 2009, 157, 2378.
5. Heitland P., Koster H.D.: Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2006, 20, 253.
6. Jańczuk Z.: Praktyczna periodontologia kliniczna, Wyd. Kwintessencja, 2004.
7. Monaci F., Bargagli E., Bravi F., et al.: Concentrations of major elements and mercury in unstimulated human saliva. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002, 89, 193.
8. Newman M.G., Takei H.H., Carranza F.A.: Carranza's clinical periodontology, 9th edition. Saunders W.B. 2002 Philadelphia.
9. Pande M.B., Nagabhushan P., Hegde M.L., et al.: An algorithmic approach to understand trace elemental homeostasis in serum samples of Parkinson disease. *Comput. Biol. Med.* 2005, 35, 475.
10. Ren Y., Zhang Z., Ren Y.Q., et al.: Diagnosis of

- lung cancer based on metal contents in serum and hair using multivariate statistical methods. *Talanta* 1997, 44, 1823.
11. **Saghir M., Shaheen N., Shah M.H.:** Comparative evaluation of trace metals in the blood of hepatitis C patients and healthy donors. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 143, 751.
 12. **Tan C., Chen H.:** Screening of prostate cancer by analyzing trace elements in hair and chemometrics. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 144, 97.
 13. **Tan C., Chen H., Wu T.:** Classification models for detection of lung cancer based on nine element distribution of urine samples. *Biol. Trace Elem. Res.* 2010, 142, 18.
 14. **Tan C., Chen H., Xia C.:** The prediction of cardiovascular disease based on trace element contents in hair and a classifier of boosting decision stumps. *Biol. Trace Elem. Res.* 2009, 129, 9.
 15. **Wang D., Du X., Zheng W.:** Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicol. Lett.* 2008, 176, 40.
 16. **Watanabe T., Zhang Z., Qu J.B. et al.:** Background lead and cadmium exposure of adult women in Xian City and two farming villages in Shaanxi Province, China. *Sc. Total Environ.* 2000, 247, 1.
 17. **Wolf H.F., Ratelschak E.M., Ratelschak K.H.:** *Periodontologia, Wyd. Czelej. Lublin* 2006.
 18. **Wu H.D.I., Chou S.Y., Chen D.R. et al.:** Differentiation of serum levels of trace elements in normal and malignant breast patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2006, 113, 9.
 18. **Zhang Z.Y., Zhou H.L., Liu S.D. et al.:** An application of Takagi-Sugeno fuzzy system to the classification of cancer patients based on elemental contents in serum samples. *Chemometr. Intell. Lab.* 2006, 82, 294.
 20. **Zhang Z.Y., Zhou H.L., Liu S.D. et al.:** Classification of cancer patients based on elemental contents of serum using bidirectional associative memory networks. *Anal. Chim. Acta* 2001, 436, 281.