

**ЛИНЕЕН РЕГРЕСИОНЕН МОДЕЛ ЗА ОЦЕНКА НА ЕФЕКТА НА ПОЛА ВЪРХУ
ОБЩОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА СУЛФХИДРИЛНИ ГРУПИ В КРЪВТА**

Маргарита Александрова

*Сектор „Физика и биофизика”, Медицински университет - Плевен,
ул. "Св. Климент Охридски" № 1, 5800 Плевен, България
e-mail: margalexandrova@hotmail.com*

**A LINEAR REGRESSION MODEL FOR EVALUATING THE EFFECT OF GENDER ON
WHOLE BLOOD SULFHYDRYL GROUPS**

Margarita Alexandrova

*Department of Biophysics, Medical University, Pleven 5800, Bulgaria
1 Kliment Ohridsky str., 5800 Pleven, Bulgaria
e-mail: margalexandrova@hotmail.com*

ABSTRACT

Recent data have shown that oxidative stress is a major factor contributing to increased vascular risk in women after menopause. The aim of the present study was to build a linear regression model for evaluating the effect of gender on the whole blood reducing capacity determined by measuring total sulfhydryl (SH) group content. The model was based on data obtained from 38 healthy individuals (17 males and 21 females) aged 50 and over. The validity of the model was checked against the following criteria: no outliers, independence of data points and normal distribution of residuals. Gender was found to be a significant predicting factor for whole blood SH-group levels. The SH-group content was significantly lower in elderly women than in elderly men. Furthermore, the multiple linear regression analysis showed that gender was significantly related with SH-group content even after adjustment for age. The results obtained suggest the necessity of taking into account sex-based differences in blood reducing capacity when increased vascular risk in elderly persons is assessed.

Key words: whole blood thiols, oxidative stress, healthy elderly, prediction

УВОД

Предполага се, че оксидативният стрес играе ключова роля в процесите на стареене [1]. Има натрупани данни, сочещи участие на оксидативни механизми, в частност оксидативна модификация на макромолекули, промени в генната експресия и оксидативно увреждане на съдовия ендотел, в инициирането и задълбочаването на атеросклеротичния процес – основна причина за леталитет при възрастните [2]. Изследвания през последните години показват, че нивото на тиолите в кръвта може да служи като показател за нивото на оксидативен стрес *in vivo*. Лечение с тиолови съединения увеличава продължителността на живот или смекчава възрастово-обусловените изменения при експериментални модели [5]. Освен това данни от клинични проучвания сочат, че по-високото съдържание на тиоли в кръвта значимо корелира с по-малък брой заболявания, по-ниско ниво на холестерол и по-ниско ниво на кръвно налягане [5, 8].

Макар съдовите заболявания винаги да са били разглеждани като патология, касаеща главно лицата от мъжки пол, все повече данни напоследък показват, че заболяемостта и смъртността от тях драстично се увеличава при жени след менопауза [12, 14]. Нарастващи доказателства определят оксидативния стрес като водеща причина за увеличаване на съдов риск при възрастните жени [13]. Затова цел на настоящето проучване бе да се оцени ролята на пола като статистически независим фактор по отношение редуциращия капацитет на кръвта посредством линеен регресионен анализ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 38 клинично здрави лица (17 мъже и 21 жени) на средна възраст 60 ± 6 години. Използваният критерий за подбор на лицата е липса на симптоми за артериална хипертония, захарен диабет, злокачествено или ендокринно заболяване. По време на изследването лицата не са приемали медикаменти или хранителни добавки с антиоксидантни свойства.

Кръвни показатели

Периферна венозна кръв, антикоагулирана с хепарин (10 U/ml) е вземана на гладно от изследваните лица. Експериментите са провеждани в рамките на 30 min след вземането на кръвта. Определяни са следните лабораторни показатели: общ брой левкоцити, диференциална кръвна картина, концентрация на хемоглобин, брой тромбоцити и еритроцити.

Обща концентрация на сулфхидрилни (SH) групи в кръвта

Общата концентрация на SH-групи в кръвта е определяна спектрофотометрично [6]. Методът се основава на факта, че 5,5'-дитиобис(2-нитробензоена киселина) реагира с алифатичните тиолови съединения в кръвната проба и образува цветен продукт, който е индикатор за тяхната концентрация. Резултатите са изразени в $\mu\text{mol SH/ml}$ кръв.

Статистически анализ

Статистическият анализ е осъществен със Статистическата програма за социални науки 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Нормалността на разпределението на данните е проверена с теста на Shapiro-Wilk. За праг на статистическа значимост е разглеждана стойността $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Регресионните анализи се използват широко в медицинските научни изследвания и разработката на емпирични модели. След като се установи, че конструираният модел добре описва експерименталните данни, следваща стъпка е използването на модела за предикция или изясняване на механизмите на изследваните процеси. Преди обаче един модел да може да се използва на практика, той следва да бъде валидиран, т.е да има добри екстраполационни качества.

Таблица 1. Оценка на значимостта на регресионния модел

ANOVA ^b						
Модел		Сума от квадратите	df	Среден квадрат	F	p
1	Регресия	1,862	1	1,862	7,732	0,008 ^a
	Остатък	8,909	37	0,241		
	Общо	10,771	38			
а. Предиктори: (Константа), пол						
б. Зависима променлива: Общо съдържание на SH-групи в кръвта						

Първоначално конструираният в настоящето проучване модел целеше да оцени значимостта на пола като фактор, предсказващ нивото на SH-групи в кръвта. Тъй като полът е категорийна променлива, в работата мъжкия пол бе представен с код 1, а женският – с код 2, което означава, че при провеждането на анализа, регресионната оценка на общото ниво на SH-групи в кръвта в зависимост от пола ще се отнася за лицата от женски пол, сравнени с тези от мъжки пол. Получените резултати за нивата на SH-групите в кръвта при подгрупите на мъжете и жените бяха проверени за нормалност на разпределението – задължително условие при прилагането на линеен регресионен анализ (тест на Shapiro-Wilk – мъже, $p=0,683$; жени, $p=0,371$).

Значимостта на регресионния модел бе потвърдена с помощта на анализа на варианса (ANOVA) ($p=0,008$) (Таблица 1).

Регресионният модел бе валидиран въз основа на следните критерии:

1. Проверка за наличие на силно отличаващи се стойности (outliers).

За целта минималната и максималната стойност на стандартизираните остатъци не трябва да надвишава ± 3 . В нашия случай не се наблюдават такива отклонения (Таблица 2).

Таблица 2. Тест за оценка наличието на силно отличаващи се стойности

Статистика на остатъците ^a					
	Минимална	Максимална	Средна	Станд. отклонение	N
Предсказана стойност	4,1749	4,6604	4,3118	0,22135	38
Остатък	-0,89970	1,16110	0,00000	0,48420	38
Стандартизирана предсказана стойност	-0,619	1,575	0,000	1,000	38
Стандартизиран остатък	-1,833	2,366	0,000	0,987	38

a. Зависима променлива: Общо съдържание на SH-групи в кръвта

2. Проверка за независимост на данните

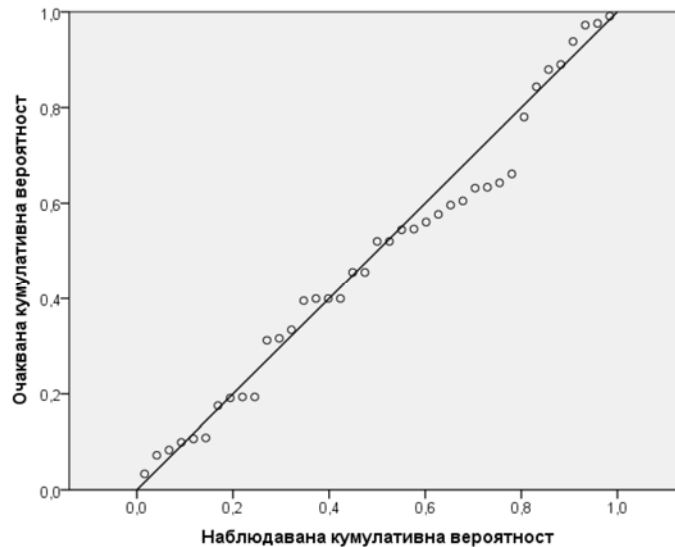
Проверката бе осъществена въз основа на статистиката на Durbin-Watson. Стойности на d, близки до 2, сочат наличие на независимост (Таблица 3).

Таблица 3. Статистика на Durbin-Watson за проверка на независимостта на данните

Описание на модела ^b					
Модел	R	R ²	Изравнен R ²	Станд. грешака	Durbin-Watson d
1	0,416 ^a	0,173	0,150	0,49070	1,381

a. Предиктори: (константа), пол
b. Зависима променлива: Общо съдържание на SH-групи в кръвта

3. Проверка за нормалност на разпределението на остатъците



Фиг. 1. Нормална P-P графика на регресионните стандартизирани остатъци. Зависима променлива – общо съдържание на SH-групи в кръвта

Остатъците се използват като мярка за експериментална грешка и се дефинират като разликата между предсказаната от модела стойност и реално регистрираната (наблюдавана) такава. Графиката следва да е права линия, когато стойностите отговарят на изискването за нормалност, както е в случая (Фиг.1).

Цел на проучването също така бе да установи дали полът остава статистически значим предиктор на нивото на сулфхидрилни групи в кръвта при отчитане ефекта на възрастта на изследваната група лица. За целта в модела, освен пола, като независима променлива бе въведена и възрастта, ползвайки метода „Enter“, което означава, че двете променливи се включват в модела независимо от тяхното ниво на значимост (Таблица 4).

Таблица 4. Оценка на значимостта на множествения регресионния модел

Коефициенти ^а					
Модел	Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	p
	B	Стандартна грешка	Бета		
(Константа)	5,405	0,909		5,945	0,000
Пол	-0,498	0,181	-0,426	-2,746	0,009
Възраст	-0,004	0,013	-0,047	-0,303	0,763

а. Зависима променлива: Общо съдържание на SH-групи в кръвта

Анализът на данните показва, че полът остава значима променлива и след отчитането на възрастта на лицата ($p=0,009$). Нещо повече, жените имат средно с $0.50 \mu\text{mol/ml}$ по-малко SH-групи в кръвта в сравнение с мъжете. От друга страна, възрастта на изследваната група не е значим прогностичен фактор за нивата на SH-групите в кръвта ($p=0,763$).

ДИСКУСИЯ

Настоящото изследване, за разлика от повечето публикувани в литературата проучвания, оценява относително здрави, с нисък съдов риск лица на възраст по-голяма от 50 години. Известно е, че съдовите инциденти са основна причина за заболяемост и смъртност при мъже и жени на такава възраст [14]. Нещо повече, заболяемостта и смъртността от съдови инциденти е по-висока при възрастни жени спрямо възрастни мъже. Намалените нива на естроген при жени на пострепродуктивна възраст се разглеждат като важен рисков фактор за възникване на съдов инцидент [11]. Обединяващ съдовите рискови фактори механизъм на увреждане е завишеното ниво на оксидативен стрес в циркулацията [7].

Тиоловите съединения основно определят редуциращия капацитет на кръвта. Намалени нива на глутатион съпровождат патологични състояния като диабет, алкохолизъм, спин, катаракта, неврологични заболявания, недохранване, както и процесите на биологично стареене. Има публикувани данни, показващи по-високи нива на маркери на възпаление и оксидативен стрес при възрастни жени в сравнение с възрастни мъже [2, 10].

Затова цел на настоящето проучване бе да се разработи линеен регресионен модел, който да оцени доколко полът е независим прогностичен фактор по отношение общото съдържание на SH-групи в кръвта независимо от възрастта. Ние установяваме достоверно по-ниско общо съдържание на SH-групи при клинично здрави жени в сравнение с мъже на възраст по-голяма от 50 години. Значимостта на разликата се запазва и след корекция на данните за възраст. От друга страна, при лица с невродегенеративни заболявания и коронарна артериална болест, възрастните жени също имат по-високи нива на оксидативен стрес в сравнение с мъже на подобна възраст, което сочи наличие при тях на по-голяма податливост към оксидативно увреждане в условията на патологично-обусловен оксидативен стрес [3, 4, 14]. Молекулните механизми, лежащи в основата на полово-специфичните различия в нивата на оксидативен стрес при възрастни лица засега са неизвестни, но една от причините може да е намаленият редокс потенциал на кръвта, обусловен от редуцираните нива на естроген [9]. Данните от настоящето проучване показват, че при оценка на нивото на оксидативен стрес на възрастни лица, което е важно при отчитането на риска от възникване

на съдов инцидент, трябва да се вземат предвид полово-обусловените различия в редуциращия потенциал на кръвта.

Очаква се бъдещите изследвания да доведат до разработването на специфични стратегии за възстановяване на редуциращия капацитет на кръвта на възрастни жени след менопауза с цел редуциране на риска от възникване на съдови инциденти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexandrova, M., P. Bochev, 2009. Reduced Extracellular Phagocyte Oxidative Activity, Antioxidant Level Changes and Increased Oxidative Damage in Healthy Human Blood as a Function of Age, *AGE*, 31(2), 99-107
2. Agrawal, A., E. V. Lourenço, S. Gupta, A. La Cava, 2008. Gender-based Differences in Leptinemia in Healthy Aging, Non-obese Individuals Associate with Increased Marker of Oxidative Stress, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 1(4), 305-309
3. Ashfaq, S., J. L. Abramson, D. P. Jones, S. D. Rhodes, W. S. Weintraub, W. C. Hooper, V. Vaccarino, D. G. Harrison, A. A. Quyyumi, 2006. The Relationship Between Plasma Levels of Oxidized and Reduced Thiols and Early Atherosclerosis in Healthy Adults, *Journal of the American College of Cardiology*, 47(5), 1005-1011
4. Blankenberg, S., H. J. Rupprecht, C. Bickel, M. Torzewski, G. Hafner, L. Tiret, M. Smieja, F. Cambien, J. Meyer, K. Lackner, 2003. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 349, 1605-1613
5. Dröge, W., 2002. Aging-related Changes in the Thiol/Disulfide Redox State: Implications for the Use of Thiol Antioxidants, *Experimental Gerontology*, 37(12), 1333-1345
6. Ellman, G., 1959. Tissue Sulfhydryl Groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77
7. Fearon, I. M., S. P. Faux, 2009. Oxidative Stress and Cardiovascular Disease: Novel Tools Give (Free) Radical Insight, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47, 372-381
8. Julius, M., C. A. Lang, L. Gleiberman, E. Harburg, W. DiFranceisco, A. Schork, 1994. Glutathione and Morbidity in a Community-based Sample of Elderly, *Journal of Clinical Epidemiology*, 47(9), 1021-1026
9. Massafra, C., D. Gioia, C. De Felice, M. Muscettola, M. Longini, G. Buonocore, 2002. Gender-related Differences in Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity in Healthy Subjects, *Clinical Endocrinology*, 57(5), 663-667
10. Miquel, J., A. Ramirez-Boscá, A. Soler, A. Díez, M. A. Carrión-Gutiérrez, J. Díaz-Alperi, E. Quintanilla-Ripoll, A. Bernd, E. Quintanilla-Almagro, 1998. Increase with Age of Serum Lipid Peroxides: Implications for the Prevention of Atherosclerosis, *Mechanisms of Ageing and Development*, 100(1), 17-24
11. Mosca, L., C. L. Banka, E. J. Benjamin, K. Berra, C. Bushnell, R. J. Dolor, T. G. Ganiats, A. S. Gomes, H. L. Gornik, C. Gracia, 2007. Evidence-based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women, *Circulation*, 115, 1481-1501
12. Stramba-Badiale, M., K. M. Fox, S. G. Priori, P. Collins, C. Daly, I. Graham, B. Jonsson, K. Schenck-Gustafsson, M. Tendera, 2006. Cardiovascular Diseases in Women: a Statement from the Policy Conference of the European Society of Cardiology, *European Heart Journal*, 27, 994-1005
13. Trevisan, M., R. Browne, M. Ram, P. Muti, J. Freudenheim, A. M. Carosella, D. Armstrong, 2001. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population, *American Journal of Epidemiology*, 154(4), 348-356
14. Vassalle, C., A. Mercuri, S. Maffei, 2009. Oxidative Status and Cardiovascular Risk in Women: Keeping Pink at Heart, *World Journal of Cardiology*, 1(1), 26-30