

PRACE ORYGINALNE

Ewa Dynierowicz-Bal¹

Ryszard Andrzejak¹

Jolanta Antonowicz-Juchniewicz¹

Maciej Siewiński²

Elżbieta Sujak¹

Beata Smyk¹

WPŁYW ZAWODOWEGO NARAŻENIA NA ARSEN I METALE CIĘŻKIE NA AKTYWNOŚĆ KATEPSYN I ICH INHIBITORÓW W SUROWICY KRWI PRACOWNIKÓW HUTY MIEDZI

THE INFLUENCE OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO ARSENIC AND HEAVY METALS ON THE ACTIVITY OF CATEPSINS AND THEIR INHIBITORS IN BLOOD SERUM OF COPPER SMELTERS

¹ Z Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego

² Z Zakładu Nauk Podstawowych Wydziału Zdrowia Publicznego

Akademii Medycznej we Wrocławiu

STRESZCZENIE

Wstęp. Narażenie na arsen, ołów i kadm wiąże się z ryzykiem nowotworów. Katepsyny (CP) i ich naturalne inhibitory (CPI) w osoczu krwi są markerami nowotworzenia. Celem pracy jest weryfikacja istnienia związków między narażeniem na powyższe pierwiastki a aktywnością CP i CPI. **Materiał i metody.** U 186 pracowników produkcyjnych Huty Miedzi Legnica (grupa zasadnicza) i 56 pracowników administracji (grupa odniesienia) oznaczono i zanalizowano poziomy Pb i Cd we krwi, Mn, Cu, Zn, Ca, Mg, Fe, Se CP oraz CPI wolnych i związanych w surowicy, FEP w erytrocytach, i As w moczu. **Wyniki.** Poziomy CP są istotnie podwyższone w obu grupach, a CPI w grupie zasadniczej wobec grupy odniesienia. Nie stwierdzono silnych zależności statystycznych między poziomami CP i CPI a pozostałymi parametrami w grupie zasadniczej, ustalono natomiast takie związki dla CPI w grupie odniesienia. Całość wyników świadczy o tym, że narażenie zawodowe i środowiskowe na metale toksyczne (ołów, arsen, kadm) może prowadzić do podniesienia poziomów CP i CPI. **Wnioski.** Uzyskane wyniki potwierdzają założenia pracy. Med. Pr., 2005;56(5):347–361

Słowa kluczowe: arsen, ołów, kadm, katepsyny (CP), inhibitory katepsyn (CPI)

ABSTRACT

Background: Exposure to arsenic, lead, and cadmium poses the risk of cancer. Cathepsins (CP) and their natural inhibitors (CPI) in blood serum are markers of carcinogenesis. The aim of this work was to verify the existence of relationships between the exposure to the aforesaid elements and the activity of CP and CPI. **Materials and Methods:** The levels of Pb and Cd in blood, Mn, Cu, Zn, Ca, Mg, Fe, Se CP as well as free and bound CPI in serum, FEP in erythrocytes, and As in urine were measured in 186 production workers of Legnica Copper Smelter (study group) and 56 administrative employees (control group) and then analyzed. **Results:** CP levels were significantly elevated in both groups and CPI levels were elevated in the study group vs. the control group. There were no statistically significant relationships between CP and CPI levels and the remaining parameters in the study group, whereas they were found for CPI in the control group. The results indicate that occupational and environmental exposures to toxic metals (arsenic, lead, cadmium) may lead to the elevated levels of CP and CPI. **Conclusions:** The obtained results support the assumptions of the study. Med Pr 2005;56(5):347–361

Key words: arsenic, lead, cadmium, cathepsins (CP), inhibitors of cathepsins (CPI)

Adres 1. autora: Pasteura 4, 50-367 Wrocław, e-mail: ewa.dynierowicz@astrazeneca.com

Nadesłano: 23.03.2005

Zatwierdzono: 16.08.2005

© 2005, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

WSTĘP

Związek pomiędzy narażeniem na arsen i takie metale ciężkie, jak kadm, nikiel i chrom a zachorowalnością na choroby rozrostowe został szeroko udokumentowany (1). Uważa się, że do tej listy wkrótce dołączone zostaną dalsze metale ciężkie, przede wszystkim ołów i kobalt (2,3). W warunkach Polski narażenia tego typu występują głównie w kontekście zawodowym, m.in. w hutnictwie metali nieżelaznych i mają charakter wziewny.

Katepsyny (CP) to szeroka rodzina niespecyficznych wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych o wielu funkcjach w metabolizmie, a także apoptozie (4). Wykrywa się również aktywność pozakomórkową CP w płynach ustrojowych (5). Spośród CP najistotniejsze są tu endopeptydazy cysteinowe, zwłaszcza katepsyny B i L. Wykazano związek między aktywnością tych CP a obecnością i stopniem zaawansowania choroby rozrostowej. Wykazano między innymi, że ich wysoka aktywność w osoczu krwi wiąże się z procesem metastazy guza pierwotnego. CP pozostają w ścisłym związku funkcjonalnym ze swymi endogennymi inhibitorami (CPI). Zachwianie tego związku przyczynia się do rozwoju procesu chorobowego. W związku z tym zarówno CP, jak i CPI stanowią intensywnie badaną grupę markerów chorób rozrostowych, z zastosowaniem zarówno w wykrywaniu wczesnych stadiów tych chorób, jak i z prognozą (6–11).

Celem niniejszej pracy jest próba weryfikacji tezy o istnieniu związków między narażeniem na arsen i ołów a aktywnością endopeptydaz cysteinowych i ich naturalnych inhibitorów w surowicy krwi osób ekspozowanych, na gruncie analizy statystycznej oznaczeń odpowiednich parametrów w grupie narażonej zawodowo, wobec odpowiednio dobranej grupy odniesienia. Ewentualne ustalenie takich związków mogłoby przybliżyć opracowanie nowej metody diagnozy chorób rozrostowych we wstępnych etapach ich rozwoju. Dla uzyskania szerszego oglądu badanych zależności, z punktu widzenia fizjologii jonów metali, zbadano również stężenia metali podstawowych i selenu w tych grupach.

MATERIAŁ I METODY

Badane grupy

Badaniom poddano 242 pracowników huty miedzi, wyłącznie mężczyzn. Grupę zasadniczą badania stanowiło 186 osób, zatrudnionych na wydziale metalurgicznym (WM) i wydziale przygotowania wsadu

(WPW), narażonych zawodowo na ołów, miedź, a także na arsen. Każda z osób włączonych do grupy została poddana badaniu lekarskiemu i wypełniła ankietę na temat wieku, stażu pracy i palenia papierosów, na podstawie której oszacowano wartości wskaźnika palenia papierosów (WPP), czyli tzw. papierosolat (średnia liczba papierosów wypalanych dziennie, pomnożona przez liczbę lat czynnego palenia papierosów) (12). Wszystkie osoby włączone do grupy zasadniczej były zdrowe.

Pomiary czynników szkodliwych na obu wydziałach, przeprowadzone metodą dozymetrii indywidualnej przez służby BHP huty w trzech kolejnych dniach na wszystkich zmianach roboczych, wykazywały:

- przekroczenia NDS pyłu całkowitego na wszystkich stanowiskach: od 1,3 do 3,57 • NDS dla WM i od 1,2 do 4,4 • NDS dla WPW;
- przekroczenia NDS ołowiu na wszystkich stanowiskach: od 1,1 do 6,9 • NDS dla WM i od 1,2 do 9,9 • NDS dla WPW;
- przekroczenia NDS dla miedzi na niektórych stanowiskach WPW: 2,2 • NDS;
- obecność arsenu na większości stanowisk WM i WPW (1,85 do 2,8 • NDS dla WM i 1,1 do 9,6 • NDS dla WPW);
- przekroczenia hałasu na niektórych stanowiskach o maksymalnie 10 dB (WM) i 17dB (WPW).

Przebadano również 56 zdrowych pracowników administracyjnych huty miedzi, nieróżniących się wiekiem od grupy zasadniczej, narażonych środowiskowo na metale ciężkie, głównie ołów, w stężeniach nieprzekraczających NDS. Również wszyscy włączeni do grupy odniesienia pracownicy administracyjni zostali poddani badaniu lekarskiemu i wypełnili stosowną ankietę. Żaden z pracowników administracyjnych nie był w przeszłości zatrudniony na stanowisku produkcyjnym w hucie miedzi. Grupa pracowników administracyjnych huty (zwana grupą odniesienia) i grupa hutników (grupa zasadnicza) zamieszkiwały ten sam teren (Legnica i jej okolice) i w związku z tym nie różniły się wielkością i jakością narażenia środowiskowego.

Badania przeprowadzono w latach 1998–1999.

Metody laboratoryjne

U osób badanych przeprowadzono oznaczenia: stężenia ołowiu i kadmu w krwi pełnej (Pb-B, Cd-B), manganu, selenu, miedzi, cynku, wapnia, magnezu i żelaza w surowicy (Mn-S, Se-S, Cu-S, Zn-S, Ca-S, Mg-S, Fe-S),

arsenu w moczu (As-U), zawartość wolnych protoporfiryn erytrocytarnych (FEP), aktywność proteinaz cysteinowych (CP) w surowicy, poziomy inhibitorów proteinaz cysteinowych (CPI) – wolnych (CPI³⁷) i całkowitych (CPI⁸⁰) w surowicy oraz poziomy kompleksów enzymu z inhibitorem w surowicy (Δ CPI, obliczane z różnicy CPI⁸⁰–CPI³⁷).

Oznaczenia stężeń metali i metaloidów wykonano w sposób następujący: stężenie ołowiu i kadmu w krwi pełnej (Pb-B i Cd-B), oraz manganu i selenu w surowicy krwi (Mn-S i Se-S) oznaczano metodą bezpłomieniową w kuwecie Massmana na Spektrofotometrze Absorpcji Atomowej PU-9100 (firmy Philips), stosując metodę dodatków, wg instrukcji opublikowanej przez producenta. Stężenie miedzi, cynku, wapnia i magnezu w surowicy krwi (Cu-S, Zn-S, Ca-S i Mg-S) przeprowadzano metodą spektrofotometrii płomieniowej w płomieniu powietrzno-acetylenowym na tym samym spektrofotometrze absorpcji atomowej, wg instrukcji producenta. Stężenie arsenu w moczu (As-U) oznaczano metodą bromowodorków na tym samym spektrofotometrze absorpcji atomowej, wg instrukcji producenta.

Laboratorium Spektrofotometrii Absorpcji Atomowej (aparatus PU-9100 firmy Philips) pozostaje w międzylaboratoryjnym programie oznaczania metali IMPET, prowadzonym przez Instytut Medycyny Pracy w Łodzi.

Stężenie żelaza w surowicy (Fe-S) oznaczano testem odczynnikowym firmy Analco-GBG według instrukcji producenta.

Należy zaznaczyć, że nie u wszystkich pracowników administracyjnych – ze względu na brak narażenia zawodowego na arsen – oznaczono stężenie selenu i żelaza w surowicy oraz arsenu w moczu. Oznaczenia te wykonano u 11 losowo wybranych osób, co stanowi 19,6% badanej grupy i jest podgrupą satysfakcjonującą ze względów statystycznych.

Stężenie wolnych protoporfiryn erytrocytarnych (FEP) wyznaczono za pomocą fluorymetru firmy Perkin-Elmer według metody Piomellego (13).

Aktywność proteinaz cysteinowych w surowicy krwi (CP) wyznaczono za pomocą metody Barretta z niewielkimi modyfikacjami (14). Jednostka aktywności peptydaz cysteinowych definiowana jest jako ilość enzymów, która hydrolizuje 1 μ mol substratu w ciągu jednej godziny.

Aktywność inhibitorów peptydaz cysteinowych w osoczu krwi wyznaczono za pomocą zmodyfikowanego testu hamowania papainy, w oparciu o przed-

stawioną powyżej metodę Barretta (15). Jednostka aktywności enzymu odpowiada, jak powyżej, 1 μ mol substratu rozłożonego w ciągu 1 godziny w temperaturze 37 °C w pH 6,0.

W pierwszym etapie procedury przeprowadzono dezaktywację α -makroglobuliny w próbkach surowicy przez ich inkubację z metyloaminą. Następnie wyznaczono wartości CPI³⁷, CPI⁸⁰ i Δ CPI, będące odpowiednio miarą poziomu CPI aktywnych, całkowitych i latentnych w surowicy krwi osób badanych. Poziom kompleksów (Δ CPI) obliczano z różnicy CPI⁸⁰–CPI³⁷. BANA i papainę zakupiono w firmie Serva, pozostałe odczynniki w firmie Sigma-Aldrich i POCH Gliwice.

W dalszej części pracy, zamiast pełnych nazw oznaczanych parametrów, będziemy stosować ich międzynarodowo akceptowane skróty (jak podano wyżej).

Metody statystyczne

Wykonano trzy rodzaje obliczeń, wyliczając statystyki opisowe, korelacje liniowe par parametrów oraz modele regresji wielokrotnej.

Średnie arytmetyczne i mediany wyznaczono dla wszystkich badanych parametrów w grupach zasadniczej i odniesienia. Kontrolę normalności rozkładu poszczególnych parametrów wykonano za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa (KSL) i testu Shapiro-Wilka. Zamienności różnic wartości średnich (na poziomie istotności $p = 0,05$) ustalano za pomocą testu t dla zmiennych o rozkładzie normalnym oraz testów nieparametrycznych Wald-Wolfowitza (WW), U Manna-Whitneya (UMW) i Kołmogorowa-Smirnowa (KS). W przypadkach wątpliwych decydujące znaczenia miał test U. Korelacje liniowe zbadano dla wszystkich par parametrów w obrębie grup zasadniczej i odniesienia.

Modele ogólne, optymalne i końcowe wyliczono dla zależności między wartościami parametrów, związanych z hipotezą badawczą (CP, CPI³⁷, CPI⁸⁰ i Δ CPI) a wartościami pozostałych parametrów (w pracy zamieszczono tylko modele optymalne i końcowe). Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą pakietu Statistica wersja 5.0 (Stat-Soft).

WYNIKI

W tabeli 1 i tabeli 2 przedstawiono średnie wartości badanych parametrów w grupie zasadniczej i w grupie odniesienia oraz istotność różnic między nimi. Podano również wartości referencyjne dla parametrów fizjologicznych i DSB (dopuszczalne stężenie biologiczne)

Tabela 1. Charakterystyka grupy zasadniczej i grupy odniesienia
Table 1. Characteristics of study and control groups

Badany parametr Parameter	Grupa zasadnicza Study group n = 186		Grupa odniesienia Control group n = 56		p
	$\bar{x} \pm SD$	Mediana Median value	$\bar{x} \pm SD$	Mediana Median value	
Wiek Age	42,17 ± 8,54	42,00	44,62 ± 7,47	45,00	–
Staż pracy Duration of employment	15,65 ± 9,39	15,00	21,16 ± 8,17	21,00	p < 0,0001
WPP	334,39 ± 328,42	300,00	189,82 ± 276,37	0,00a	p < 0,0001

n – liczba badanych;
 number of examined persons;
 WPP – wskaźnik palenia papierosów;
 smoking index;
 p – poziom ufności;
 statistical significance;
 $\bar{x} \pm SD$ – średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe;
 arithmetical average, standard deviation;
 a – wartość mediany WPP = 0 oznacza, że większość w grupie stanowią niepalący.
 the median value WPP = 0 which means that non-smokers predominate in the group.

dla toksycznych – Pb-B i Cd-B (16) oraz As-U (17). Dane z literatury na temat wartości prawidłowych poziomów katepsyn i ich inhibitorów w surowicy oparte są na badaniach zdrowych mieszkańców Wrocławia (18). Jak widać w tabeli 2, grupa zasadnicza wykazuje znamienne podwyższenie Pb-B, Cd-B, As-U, FEP, CPI⁸⁰ i CPI³⁷ w stosunku do grupy odniesienia.

W grupie odniesienia stwierdzono powszechność przekroczenia normy narażenia środowiskowego na arsen; poziom arsenu w moczu był przeciętnie dwukrotnie mniejszy, niż w grupie zasadniczej, ale stanowił ponadtrzykrotne przekroczenie normy. Zbadano pod tym kątem 11 osób, spośród których tylko jedna nie wykazała przekroczenia normy.

Istotne różnice wartości średnich między grupą zasadniczą i odniesienia stwierdzono dla dwóch spośród czterech parametrów, związanych z hipotezą badawczą, a mianowicie dla poziomu inhibitorów katepsyn całkowitych (CPI⁸⁰), 1,65-krotnie i wolnych (CPI³⁷), 1,8-krotnie. Zaobserwowano również wzrost poziomu kompleksów inhibitorów (Δ CPI) o 24%, nie był on jednak istotny statystycznie na poziomie ufności 0,05. Aktywność katepsyn w obydwu grupach jest taka sama, aż trzykrotnie odbiegając od wartości uznanych za prawidłowe. Należy zauważyć, że również poziomy CPI⁸⁰ i CPI³⁷ są wyraźnie podwyższone, w stosunku do normy, dla obydwu grup, w tym w grupie zasadniczej CPI³⁷ prawie trzykrotnie, a CPI⁸⁰ dwukrotnie.

Grupy badane nie różniły się statystycznie istotnie wiekiem, natomiast różniły się stażem pracy – znamienne dłuższym w grupie odniesienia – i wskaźnikiem palenia papierosów (WPP), znamienne wyższym w grupie zasadniczej (tab. 1). Średnie wartości

stężeń metali podstawowych i selenu nie wykazały ani istotnych odchyżeń od normy, ani różnic między grupami.

Następnym etapem analizy danych było wyznaczenie istotnych korelacji liniowych między wartościami poszczególnych parametrów. W grupie zasadniczej znaleziono 39 korelacji istotnych statystycznie na poziomie 0,05 (tab. 3). W tabeli 4 zebrano analogiczne korelacje dla grupy odniesienia. Jest ich dużo mniej – 17 dla parametrów mierzonych u wszystkich przedstawicieli tej grupy i dodatkowo 2 z udziałem Fe-S, Se-S i As-U. W tabeli 3 i 4 przedstawiono tylko korelacje istotne z punktu widzenia hipotezy badawczej (z tabeli 3 wykluczono stężenie magnezu i cynku w surowicy, a z tabeli 4 stężenie cynku i miedzi w surowicy, ponieważ w obydwu przypadkach parametry te korelowały tylko między sobą). Różnice między grupą zasadniczą i grupą odniesienia są uderzające. Tylko dwie korelacje powtórzyły się w obydwu grupach, w dodatku obydwie są oczywiste – dodatnia korelacja wieku ze stażem pracy oraz dodatnia korelacja poziomu CPI⁸⁰ z CPI³⁷ w surowicy.

Kolejne ryciny przedstawiają wykresy przykładowych korelacji istotnych statystycznie: pomiędzy wiekiem hutników i Pb-B – korelacja ujemna (ryc. 1) oraz pomiędzy Se-S i CPI⁸⁰-S losowo wybranych pracowników administracji – korelacja dodatnia (ryc. 2).

Końcowym etapem statystycznej obróbki wyników było wyliczenie modeli zależności wieloparametrycznych dla zależności między wartościami parametrów, związanych z hipotezą badawczą (CP, CPI³⁷, CPI⁸⁰ i Δ CPI) a wartościami pozostałych parametrów. Rozpatrywano:

Tabela 2. Średnie wartości badanych parametrów w grupie zasadniczej i grupie odniesienia oraz istotność różnic między nimi
Table 2. The mean values of the parameters in the study control groups and the significance of differences between them

Badany parametr Parameter	Wartości referencyjne Reference value	Grupa zasadnicza Study group n=186		Grupa odniesienia Control group n=56		p
		$\bar{x} \pm SD$	Mediana Median value	$\bar{x} \pm SD$	Mediana Median value	
Pb-B	grupa narażona Exposed group <500 µg/l grupa nienarażona Non-exposed group <100 µg/l	304,58 ± 129,39	304,00	100,33 ± 71,86	90,0	p < 0,0001
Cd-B	grupa narażona Exposed group <5 µg/l grupa nienarażona Non-exposed group <0,5 µg/l	2,81 ± 2,46	2,10	1,36 ± 2,13	0,67	p < 0,0001
Mn-S	<10 µg/l	2,49 ± 1,94	2,0	3,01 ± 2,62	1,95	–
Cu-S	80–150 µg/dl	121,95 ± 16,22	123,00	124,67 ± 16,82	125,00	–
Zn-S	80–160 µg/dl	111,73 ± 19,52	109,50	108,62 ± 17,49	106,50	–
Ca-S	80–110 µg/ml	96,62 ± 5,47	95,90	97,03 ± 6,21	96,95	–
Mg-S	18–31 µg/ml	19,59 ± 1,54	19,35	19,91 ± 1,61	19,80	–
Fe-S	59–158 µg/dl	117,17 ± 33,68	111,54	120,25 ± 45,89 (n = 11)	117,20	–
Se-S	46–125 µg/l	70,85 ± 15,90	74,30	66,09 ± 19,11 (n = 11)	59,50	–
FEP	<70 µg/100 ml E	59,98 ± 60,80	41,46	36,05 ± 12,49	34,48	p < 0,004
As-U	grupa narażona <35 µg/g kreatyniny Exposed group <35 µg/g creatinine grupa nienarażona <10 µg/g kreatyniny Non-exposed group <10 µg/g creatinine	66,30 ± 43,69	54,70	32,94 ± 22,51 (n = 11)	32,80	p < 0,02
CP-S	0,25 ± 0,077 U/ml	0,72 ± 0,29	0,66	0,67 ± 0,31	0,62	–
CPI ⁸⁰ -S	52,0 ± 7,21 U/ml	99,18 ± 22,89	98,61	59,96 ± 29,39	55,12	p < 0,0001
CPI ³⁷ -S	31,2 ± 9,1 U/ml	80,36 ± 28,86	83,59	44,70 ± 30,12	38,09	p < 0,0001
ΔCPI-S	20,54 ± 9,72 U/ml	18,91 ± 14,03	15,92	15,25 ± 10,83	12,87	–

Pb-B – stężenie ołowiu we krwi;
blood lead level;

Cd-B – stężenie kadmu we krwi;
blood cadmium level

Mn-S – stężenie manganu w surowicy;
serum manganese level;

Cu-S – stężenie miedzi w surowicy;
serum copper level;

Zn-S – stężenie cynku w surowicy;
serum zinc level;

Ca-S – stężenie wapnia w surowicy;
serum calcium level;

Mg-S – stężenie magnezu w surowicy;
serum magnesium level;

Fe-S – stężenie żelaza w surowicy;
serum ferrum level;

Se-S – stężenie selenu w surowicy;
serum selenium level;

FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta;
free erythrocyte protoporphyrins;

As-U – stężenie arsenu w moczu;
urine arsenic level;

CP-S – aktywność katepsyn w surowicy;
serum cathepsins activity;

CPI⁸⁰-S – stężenie całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum total inhibitors of cathepsins level;

CPI³⁷-S – stężenie wolnych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum free inhibitors of cathepsins level;

ΔCPI-S – stężenie kompleksów (katepsyn+ inhibitor) w surowicy;
serum complexes (cathepsin + inhibitor) level;

n – liczba badanych;
numbers of examined persons;

p – poziom ufności;
statistical significance;

$\bar{x} \pm SD$ – średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe
arithmetic average, standard deviation.

- modele optymalne, o najniższym błędzie standardowym;
- modele końcowe, zawierające tylko wkłady indywidualnie znamienne statystycznie.

Obliczenia wykonano dla grup zasadniczej i odniesienia. Wyniki obliczeń dla całości grup zasadniczej i odniesienia zawarto w tabeli 5 (modele optymalne) i tabeli 6 (modele końcowe). W tabelach tych przedstawiono wartości parametrów β oraz parametry całościowego dopasowania modelu. W analizie dla grupy odniesienia parametry Fe-S, As-U i Se-S, które zmierzono tylko dla 1/5 tej grupy, zastąpiono je wartościami średnimi. Dla

porównania wykonano również obliczenia z pominięciem tych parametrów. Te obliczenia dały znacznie gorszy stopień dopasowania modeli, w związku z czym nie uwzględniono ich w niniejszej analizie. W zasadniczej części tabel 5–6 przedstawiono standaryzowane współczynniki korelacji β . W dolnych wierszach tych tabel przedstawiono współczynniki R^2 i R^2 popr. (z poprawką na liczebność próby), opisujące ułamek zmienności parametru badanego, który można opisać za pomocą danego modelu oraz poziom istotności p dla całego modelu.

Należy zaznaczyć, że pomimo wykazanej powyżej silnej korelacji pomiędzy Pb-B i FEP oraz zbliżonych

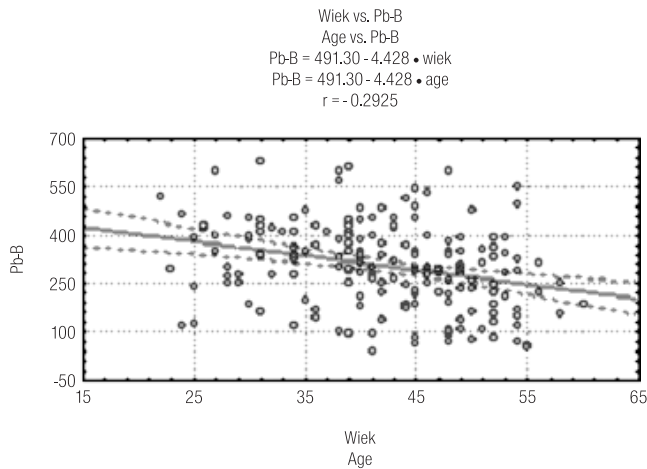
Tabela 4. Wszystkie znamienne statystycznie korelacje w grupie odniesienia. Powyżej przekątnej podano poziomy istotności korelacji liniowej, a poniżej ich współczynniki. Pochyłą czcionką zaznaczono korelacje, otrzymane dla $n = 11$

Table 4. All statistically significant correlations in the reference group. The levels of significance of linear correlations are shown above the diagonal and the coefficients are shown below. The correlations obtained for $n = 11$ are shown in italics

	Wiek Age	Staż Duration of employment	WPP	Pb-B	Cd-B	Mn-S	Ca-S	Mg-S	Fe-S	FEP	As-U	Se-S	CP-S	CPI ⁸⁰ -S	CPI ³⁷ -S	Δ CPI-S
Wiek Age		$p = 0,000$				$p = 0,000$				$p = 0,020$				$p = 0,020$	$p = 0,015$	
Staż Duration of employment	0,874					$p = 0,000$			$p = 0,036$					$p = 0,027$	$p = 0,024$	
WPP			X													
Pb-B				X										$p = 0,009$	$p = 0,015$	
Cd-B					X											
Mn-S	-0,553	-0,545				X								$p = 0,025$	$p = 0,005$	
Ca-S							X							$p = 0,020$	$p = 0,020$	
Mg-S								X						$p = 0,049$		
Fe-S									X					$p = 0,038$		
FEP	0,311									X				$p = 0,017$	$p = 0,026$	
As-U								0,698			X					
Se-S												X		$p = 0,000$	$p = 0,002$	
CP-S													X			
CPI ⁸⁰ -S	0,313	0,299	0,351	-0,302	-0,314	-0,267	0,038	0,321				0,898		X	$p = 0,000$	
CPI ³⁷ -S	0,327	0,305	0,326	-0,373	-0,312					0,300		0,814	0,934		X	
Δ CPI-S																X

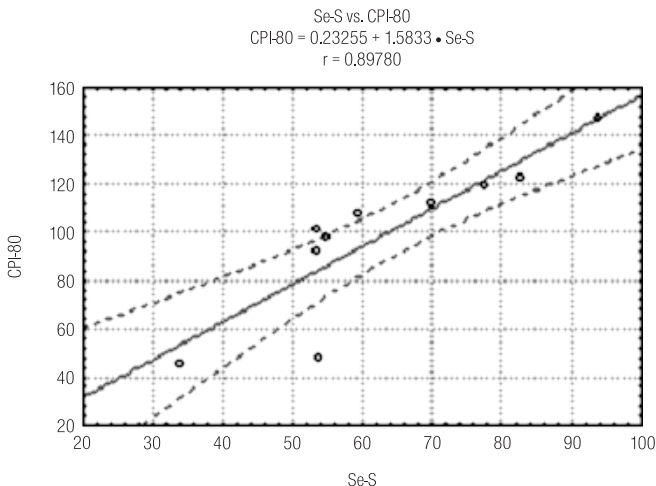
WPP – wskaźnik palenia papierosów;
smoking index;
Pb-B – stężenie ołowiu we krwi;
blood lead level
Cd-B – stężenie kadmu we krwi;
blood cadmium level;
Mn-S – stężenie manganu w surowicy;
serum manganese level;
Ca-S – stężenie wapnia w surowicy;
serum calcium level;
Mg-S – stężenie magnezu w surowicy;
serum magnesium level;
Fe-S – stężenie żelaza w surowicy;
serum ferrum level;
FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta;
free erythrocyte protoporphyrins;

As-U – stężenie arsenu w moczu;
urine arsenic leve;
Se-S – stężenie seleniu w surowicy;
serum selenium level;
CP-S – aktywność katepsyn w surowicy;
serum cathepsins activity;
CPI⁸⁰-S – stężenie całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum total inhibitors of cathepsins level;
CPI³⁷-S – stężenie wolnych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum free inhibitors of cathepsins level;
 Δ CPI – stężenie kompleksów (katepsyna + inhibitor) w surowicy;
serum complexes (cathepsin +inhibitor) level;
 p – poziom ufności.
statistical significance.



Ryc. 1. Korelacja wieku osób badanych z poziomem ołowiu w krwi (Pb-B) w grupie zasadniczej.

Fig. 1. Correlation between age and blood lead levels (Pb-B) in the study group.



Ryc. 2. Korelacja poziomu selenu w surowicy (Se-S) z poziomem całkowitych inhibitorów katapsyn w surowicy (CPI⁸⁰) osób badanych w grupie odniesienia.

Fig. 2. Correlation between blood serum selenium levels (Se-S) and blood serum levels of total cathepsin inhibitors (CPI⁸⁰) in the control group.

współczynników regresji dla tych dwóch parametrów, w wyliczonych modelach próba usunięcia zmiennej FEP doprowadziła do znacznego pogorszenia dopasowania modelu i osłabienia istotności parametru Pb-B.

Modele zależności dla CP w grupie zasadniczej wykazują dodatnią zależność od stężenia kadmu we krwi, manganu i żelaza w surowicy oraz ujemną zależność od stężenia arsenu w moczu. Wynik ten jest w dużej mierze zgodny z wynikami badań prostych korelacji (tab. 3, 5, 6). Nie udało się jednak ustalić istotnego statystycznie modelu dla poziomu CP w grupie odniesienia.

Modele zależności dla CPI⁸⁰ w grupie zasadniczej oddają zmienność tego parametru w małym stopniu (tab. 5, ryc. 3), wskazując na niewielką, choć statystycznie istotną zależność od WPP (korelacja ujemna) oraz Cd-B i Cu-S (korelacje dodatnie). W grupie odniesienia natomiast sytuacja jest zasadniczo odmienna. Modele końcowy i optymalny pokrywają zmienność parametru CPI⁸⁰ w ponad 50% (tab. 5 i 6, ryc. 4). Model optymalny, wyrażony syntetycznie przez równanie 1 (poniżej, wyraz wolny, oznaczony czcionką pochyłą, nie jest istotny statystycznie.), zawiera dodatnią korelację poziomu inhibitorów całkowitych z poziomem ołowiu i FEP, a także arsenu i żelaza i ujemną korelację z poziomami wapnia i magnezu. Należy jeszcze uwzględnić efekt selenu. Ze względu na małą liczbę prób efekt ten można było ująć w modelu tylko po zastąpieniu faktycznych danych wartością średnią z tych prób, w związku z czym model nie może wykazywać korelacji dla Se-S. Korelacja w parze CPI⁸⁰-Se-S dla n = 11 jest na poziomie r = 0,9; jest to najwyższa korelacja, spośród obserwowanych w niniejszej pracy, chociaż ze względu na małą liczebność próby mniej wiarygodna. (ryc. 2). Można więc przyjąć, że uwzględnienie dodatniej korelacji z selenem jeszcze wydatniej zbliżyłoby model dla CPI⁸⁰ do rzeczywistości. Model ten nie przewiduje natomiast wpływu kadmu i miedzi na CPI⁸⁰, jest więc niemalże dokładnym przeciwieństwem modelu dla grupy zasadniczej.

$$\text{CPI}^{80} = 96,17 + 1,48 \cdot \text{wiek} + 0,11 \cdot \text{Pb-B} - 1,23 \cdot \text{Ca-S} - 5,00 \cdot \text{Mg-S} + 0,50 \cdot \text{Fe-S} + 0,51 \cdot \text{FEP} + 0,82 \cdot \text{As-U} \cdot 20,14$$

gdzie:

Pb-B – stężenie ołowiu we krwi.

Ca-S – stężenie wapnia w surowicy.

Mg-S – stężenie magnezu w surowicy.

Fe-S – stężenie żelaza w surowicy.

FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta.

As-U – stężenie arsenu w moczu

Model zależności dla CPI³⁷ w grupie zasadniczej zachowuje się tak samo, jak dla CPI⁸⁰. Jediną różnicę stanowi dodatkowa, słaba, lecz konsekwentnie istotna statystycznie, korelacja ujemna z poziomem selenu w surowicy.

Natomiast model optymalny dla CPI³⁷ w grupie odniesienia wykazuje bardzo dobre dopasowanie, niewiele gorsze od modelu dla CPI⁸⁰ w tej grupie (tab. 5). Przejście do modelu końcowego dla CPI³⁷ wiąże się ze znaczącą utratą wartości R² (tab. 6), co świadczy o jego mniejszej wiarygodności w porównaniu do modelu dla CPI⁸⁰. Model ten, wyrażony syntetycznie

Tabela 5. Wartości parametrów β i parametrów dopasowania całościowego dla modeli optymalnych w obydwu grupach. Wyłuszczone parametry o poziomie istotności $p < 0,05$ **Table 5.** The values of β and overall fit parameters for optimal models in both groups. The parameters characterized by p value < 0.05 are shown in boldface

	Grupa zasadnicza Study group				Grupa odniesienia Control group			
	CP-S	CPI ⁸⁰ -S	CPI ³⁷ -S	Δ CPI-S	CP-S	CPI ⁸⁰ -S	CPI ³⁷ -S	Δ CPI-S
Wiek Age				0,079554		0,321771		
Staż Duration of employment								
WPP	-0,131123	-0,167792	-0,162826			-0,157552		-0,310816
Pb-B					-0,196629	0,246363	0,261811	
Cd-B	0,191986	0,124015	0,146782			0,178442	0,219753	
Mn-S	0,130992			-0,086755	0,137280	-0,140120	-0,340414	
Cu _s -S		0,140027	0,187642	-0,161748			-0,153104	
Zn _s -S	-0,089647							0,257919
Ca-S		0,101437	0,110219			-0,251440	-0,335792	
Mg-S					-0,205877	-0,233093		
Fe-S	0,286601					0,363781		
FEP						0,150465	0,230929	
As-U	-0,213978				-0,150874	0,276785		
Se-S		-0,092903	-0,147111	0,153193		0,017245	0,233889	
R ²	0,18	0,09	0,13	0,08	0,11	0,62	0,54	0,13
R ² popr.	0,15	0,06	0,11	0,06	0,04	0,53	0,47	0,09
p dla modelu p for the model	0,00000	0,00609	0,0001	0,00539	0,21422	0,00000	0,00000	0,02695

WPP – wskaźnik palenia papierosów;
smoking index;Pb-B – stężenie ołowiu we krwi;
blood lead level;Cd-B – stężenie kadmu we krwi;
blood cadmium level;Mn-S – stężenie manganu w surowicy;
serum manganese level;Cu-S – stężenie miedzi w surowicy;
serum copper level;Zn-S – stężenie cynku w surowicy;
serum zinc level;Ca-S – stężenie wapnia w surowicy;
serum calcium level;Mg-S – stężenie magnezu w surowicy;
serum magnesium level;Fe-S – stężenie żelaza w surowicy;
serum ferrum level;FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta;
free erythrocyte protoporphyrins;As-U – stężenie arsenu w moczu;
urine arsenic level;Se-S – stężenie seleniu w surowicy;
serum selenium level;CP-S – aktywność katepsyn w surowicy;
serum cathepsins activity;CPI⁸⁰-S – stężenie całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum total inhibitors of cathepsins level;CPI³⁷-S – stężenie wolnych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum free inhibitors of cathepsins level; Δ CPI-S – stężenie kompleksów (katepsyna + inhibitor) w surowicy;
serum complexes (cathepsin inhibitor) level;R² – współczynnik regresji;
regression coefficient;R² popr. – poprawiony współczynnik regresji.
corrective regression coefficient.

przez równanie 2, zawiera dodatnią korelację poziomu CPI³⁷ ze stężeniem ołowiu we krwi i FEP oraz ujemną korelację z poziomami wapnia i manganu w surowicy. Różni się od modelu dla CPI⁸⁰ nieobecnością magnezu, arsenu i żelaza. Należy też w analizie uwzględnić jeszcze, podobnie jak dla CPI⁸⁰, efekt seleniu, gdyż korelacja w parze CPI³⁷ Se-S dla $n = 11$ jest również na bardzo wysokim poziomie, $r = 0,8$. Można więc stwierdzić,

tak jak dla CPI⁸⁰, że uwzględnienie dodatniej korelacji z selenem wydatnie zbliżyłoby model dla CPI³⁷ do rzeczywistości i że model ten jest również przeciwieństwem modelu dla grupy zasadniczej. Należy również wspomnieć, że podobieństwo modeli dla CPI⁸⁰ i CPI³⁷ jest uwarunkowane wysokim stopniem skorelowania tych parametrów: $r = 0,876$ w grupie zasadniczej (tab. 3) oraz $r = 0,934$ w grupie odniesienia (tab. 4).

Tabela 6. Wartości parametrów β i parametrów dopasowania całościowego dla modeli końcowych w obydwu grupach. Wyłuszczone parametry o poziomie istotności $p < 0,05$

Table 6. The values of β and overall fit parameters for final models in both groups. The parameters characterized by p value < 0.05 are shown in boldface

	Grupa zasadnicza Study group				Grupa odniesienia Control group			
	CP-S	CPI ⁸⁰ -S	CPI ³⁷ -S	Δ CPI-S	CP-S	CPI ⁸⁰ -S	CPI ³⁷ -S	Δ CPI-S
Wiek Age						0,378662		
Staż Duration of employment								
WPP		-0,164679	-0,159275					-0,310816
Pb-B					-0,196629	0,276158	0,332341	
Cd-B	0,142765	0,162925	0,164163					
Mn-S	0,142260				0,137280		-0,303189	
Cu _s -S		0,150634	0,191390	-0,169813				
Zn-S								0,257919
Ca-S						-0,261865	-0,361331	
Mg-S					-0,205877	-0,275339		
Fe-S	0,272380					0,352116		
FEP						0,219259	0,321176	
As-U	-0,216806				-0,150874	0,269326		
Se-S			-0,146259	0,169864				
R ²	0,16	0,07	0,12	0,06	0,11	0,58	0,43	0,13
R ² popr.	0,14	0,05	0,10	0,05	0,04	0,52	0,38	0,09
p dla modelu	0,00000	0,004810	0,00011	0,00253	0,21422	0,00000	0,00001	0,02695

WPP – wskaźnik palenia papierosów;
smoking index;

Pb-B – stężenie ołowiu we krwi;
blood lead level;

Cd-B – stężenie kadmu we krwi;
blood cadmium level;

Mn-S – stężenie manganu w surowicy;
serum manganese level;

Cu-S – stężenie miedzi w surowicy;
serum copper level;

Zn-S – stężenie cynku w surowicy;
serum zinc level;

Ca-S – stężenie wapnia w surowicy;
serum calcium level;

Mg-S – stężenie magnezu w surowicy;
serum magnesium level;

Fe-S – stężenie żelaza w surowicy;
serum ferrum level;

FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta;
free erythrocyte protoporphyrins;

As-U – stężenie arsenu w moczu;
urine arsenic level;

Se-S – stężenie seleniu w surowicy;
serum selenium level;

CP-S – aktywność katepsyn w surowicy;
serum cathepsins activity;

CPI⁸⁰-S – stężenie całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum total inhibitors of cathepsins level;

CPI³⁷-S – stężenie wolnych inhibitorów katepsyn w surowicy;
serum free inhibitors of cathepsins level;

Δ CPI – stężenie kompleksów (katepsyna + inhibitor) w surowicy;
serum complexes cathepsin +inhibitor)level;

R² – współczynnik regresji;
regression coefficient;

R² popr. – poprawiony współczynnik regresji.
corrective regression coefficient.

$$CPI^{37} = 182,22 + 0,14 \cdot Pb-B - 1,74 \cdot Ca-S - 3,46 \cdot Mn-S + 0,77 \cdot FEP \pm 23,45$$

gdzie:

Pb-K – stężenie ołowiu we krwi.

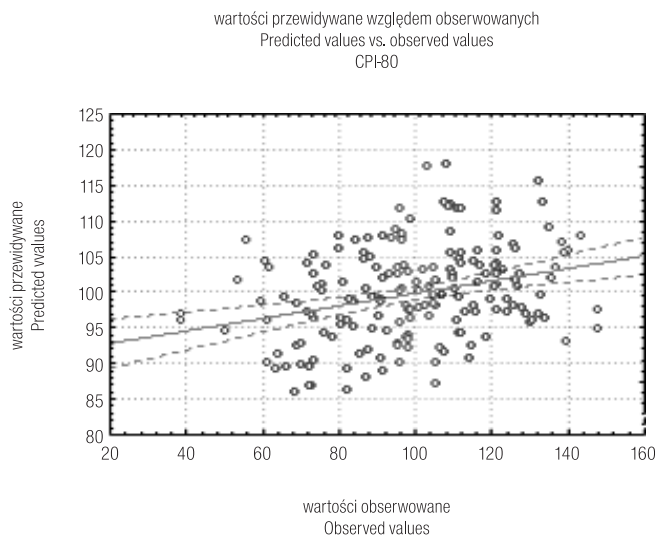
Ca-S – stężenie wapnia w surowicy.

Mn-S – stężenie manganu w surowicy.

FEP – wolne protoporfiryny erytrocyta.

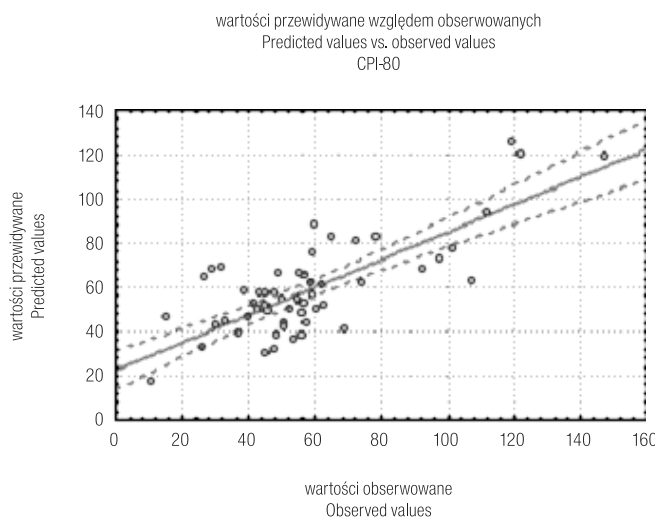
W modelach optymalnych stopień odzwierciedlenia zmienności poziomu kompleksów inhibitorów (Δ CPI) dla grupy zasadniczej nie przekracza 4%, a dla

grupy odniesienia 10%. Dla grupy zasadniczej jedyne istotne parametry, to Cu-S i Se-S, z tym, że ze znakami korelacji odwróconymi w stosunku do CPI³⁷. Wynika z tego brak niezależności parametru Δ CPI od CPI³⁷. W istocie, te parametry są bardzo silnie skorelowane ujemnie – ich współczynnik wynosi – 0,621 (tab. 3). Dla grupy odniesienia żaden z parametrów dopasowania nie wykazuje istotności w żadnym z modeli. Wydaje się, że brak tu jakichkolwiek realnych zależności, co



Ryc. 3. Rozrzut indywidualnych wartości dla modelu optymalnego zależności całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy (CPI⁸⁰) w grupie zasadniczej.

Fig. 3. The plot of the spread of individual values for the optimal model of the dependencies of total cathepsin inhibitors (CPI⁸⁰) in the study group.



Ryc. 4. Rozrzut indywidualnych wartości dla modelu optymalnego zależności całkowitych inhibitorów katepsyn w surowicy (CPI⁸⁰) w grupie odniesienia.

Fig. 4. The plot of the spread of individual values for the optimal model of the dependencies of total cathepsin inhibitors (CPI⁸⁰) in the control group.

sugerował już zupełny brak korelacji parami dla tego parametru, nawet z poziomami CPI⁸⁰ i CPI³⁷ (tab. 4).

Rozpatrywane powyżej modele wyliczono bez uwzględnienia wzajemnych efektów między CP i ich inhibitorami. W grupie zasadniczej CPI⁸⁰ i CPI³⁷ różnią się stopniem korelacji z Δ CPI (ten pierwszy słabo ujemnie, a drugi mocno ujemnie). Pomiędzy sobą są silnie związane. Te zależności jasno przekładają się

na zależności między modelami dla poszczególnych zmiennych, przedstawionymi powyżej.

W grupie odniesienia brak korelacji z udziałem CP, a także Δ CPI; jedyny efekt w tym podzbiorze to wzmiankowana powyżej bardzo silna korelacja poziomu inhibitorów całkowitych i aktywnych.

OMÓWIENIE

Sposób oznaczania poziomów ołowiu, kadmu i arsenu w materiale biologicznym, zastosowany w niniejszej pracy, został dobrany tak, by odzwierciedlać narażenie bieżące. Dla ołowiu i kadmu okres półtrwania w całej krwi wynosi kilka miesięcy (19), choć powolne procesy wymiany między kompartmentami w ustroju sprawiają, że podwyższony poziom tych metali we krwi, związany z narażeniem, może utrzymywać się długo po jego ustaniu. Podobnie całkowite stężenie arsenu w moczu stanowi bardzo dobry wskaźnik narażenia bieżącego – od jednego do kilku dni (20). Można zatem stwierdzić, że obraz, zarysowany przez opisywane tu wyniki, dotyczy najwyżej kilkumiesięcznej skali czasowej, która jest odpowiednia dla monitorowania potencjalnych markerów chorób rozrostowych.

Analiza różnic wartości średnich parametrów, pomiędzy grupą zasadniczą i grupą odniesienia, zdaje się potwierdzać tezę badawczą, gdyż podwyższonym stężeniom ołowiu, kadmu i arsenu w grupie zasadniczej towarzyszą istotne statystycznie podwyższenia stężeń inhibitorów katepsyn.

Dane, przedstawione w tabeli 1 wskazują, że przedstawiciele grupy zasadniczej mają, zgodnie z oczekiwaniami, znacznie podwyższone stężenie ołowiu we krwi w stosunku do grupy odniesienia – średnia i mediana około 300 μ g/l. Podobne wartości uzyskano w równoległym badaniu analogicznej grupy hutników miedzi z Legnicy, narażonych zawodowo na ołów, wykonanym na mniejszą skalę (21). Również stężenie kadmu we krwi hutników było istotnie wyższe niż w grupie odniesienia. Na uwagę zwraca fakt, że o ile w grupie narażonej przekroczeń DSB ołowiu (500 μ g/l) i kadmu (5 μ g/l) było stosunkowo niewiele, to wystąpiły one powszechnie dla grupy nienarażonej (DSB odpowiednio 100 μ g/l i 0,5 μ g/l). Przekroczenia DSB dla FEP można uznać za niewielkie.

Wykryto również dość powszechne przekroczenia DSB arsenu w grupie zasadniczej. Zaskakujące natomiast są bardzo znaczne i powszechne przekroczenia DSB narażenia środowiskowego na arsen.

Istotne różnice wartości średnich stwierdzono dla dwóch spośród czterech parametrów, związanych z hipotezą badawczą, a mianowicie dla poziomu inhibitorów katepsyn całkowitych (CPI⁸⁰) i wolnych (CPI³⁷). Zastanawiająca jest również wysoka aktywność katepsyn w obydwu grupach.

Widoczna w tabeli 1 różnica średniej stażu pracy pomiędzy grupami badania nie powinna mieć znaczenia dla omawianych wyników, z uwagi na brak związanego z nim narażenia na którykolwiek z badanych czynników toksycznych dla grupy odniesienia.

Parametr WPP, znamienne wyższy dla grupy zasadniczej, może być istotny ze względu na karcynogenne właściwości dymu papierosowego.

Wartości średnie i rozrzuty stężeń metali podstawowych – wapnia, magnezu, manganu, miedzi, cynku i żelaza, a także selenu w obydwu grupach badania nie wykazały ani odstępstw od norm, ani też istotnych różnic między grupą zasadniczą i grupą odniesienia (tab. 1). Poniżej umiejscowiono w kontekście literatury przedmiotu dane o poziomach ołowiu, kadmu i arseniu. Szczególnie ciekawe jest porównanie wartości poziomów ołowiu i kadmu oraz ich korelacji z wynikami, uzyskanymi według podobnej metodologii dla pracowników tego samego przedsiębiorstwa kilka lat wcześniej, w latach 1992–1995 (12). Dane te poniżej oznaczono skrótowo HML95.

Ołów uważany jest za potencjalnie najgroźniejszy spośród czynników toksycznych w narażeniu zawodowym pracowników produkcyjnych huty metali nieżelaznych. Przedstawione powyżej wyniki oznaczeń wskazują, że narażenie to występowało u tych osób w latach 1998–1999, ale przekroczenia DSB dla ołowiu we krwi (500 µg/l) zdarzały się dość rzadko. Narażenie średnie na poziomie 300 µg/l (tab. 1) jest wyraźnie mniejsze od obserwowanego u innych grup zawodowych, takich jak osoby zatrudnione w Polsce przy wytwarzaniu akumulatorów ołowiowych – średnio 500 µg/l (22), czy też na przykład w przemyśle metalurgicznym w Korei – około 450 µg/l (23). Porównanie z danymi HML95 wskazuje też na znaczny spadek narażenia, w ciągu kilku lat, odzwierciedlający się w dwukrotnym obniżeniu średniego poziomu Pb-B. Zapewne w związku z tym nie zaobserwowano istotnych korelacji między poziomem ołowiu a poziomami innych czynników, mierzonych w grupie zasadniczej. Zaobserwowano natomiast istotną korelację ujemną między wiekiem i stażem pracy hutników a stężeniem ołowiu w ich krwi. Podobną tendencję zaobserwowano również w HML95, choć nie była ona znamienna statystycznie. Co ciekawe,

analogiczny efekt zaobserwowano w badaniach stanu zdrowotnego osób narażonych zawodowo na ołów, w których oceniano symptomy toksyczności ołowiu (23). Efekt ten przypisywano rosnącej z wiekiem i stażem świadomości narażeń i związanej z nią poprawie przestrzegania zasad BHP.

Średnie stężenie ołowiu we krwi w grupie odniesienia wynosi około 100 µg/l. Jest to poziom zdecydowanie nadmierny, który może działać niekorzystnie na organizm ludzki. Poziom ten jest znacząco wyższy od wartości typowych dla mieszkańców innych regionów Polski, w których nie występuje obciążenie środowiska naturalnego przez TNEM (Toxic Non-Essential Metals), do 60 µg/l (22,23). Stężenie ołowiu w grupie odniesienia jest podobne do stwierdzonego na przełomie lat 80. i 90. dla mieszkańców Szopienic, znanego obszaru skażenia środowiska naturalnego ołowiem, natomiast aż trzykrotnie niższe od wyznaczonego dla grupy nienarażonej zawodowo w HML95. Zjawisko to w pewnej mierze można wytłumaczyć obniżeniem emisji z HML i innych źródeł przemysłowych w okresie dzielącym te dwa badania, a także odejściem w tym okresie od stosowania benzyny ołowiowej.

Podobnie, jak w przypadku ołowiu, stężenie kadmu we krwi w grupie hutników, średnio poniżej 3 µg/l, można uznać za umiarkowane, w porównaniu na przykład z grupą narażoną na ten metal przy produkcji baterii i z HML95 – gdzie obserwowano poziomy 3–5 razy wyższe (12,22). W tej grupie widoczny jest silny związek między paleniem papierosów, a poziomem kadmu we krwi – średnio 3,4 µg/l u palaczy wobec 1,4 µg/l u osób niepalących.

Stężenie kadmu we krwi u pracowników produkcyjnych huty miedzi wykazywało także istotną ujemną korelację ze stężeniem selenu w surowicy krwi. Efekt ten znajduje potwierdzenie w danych literaturowych (22). Obserwowana tam wyższa wartość współczynnika korelacji ($r = -0,45$ wobec $-0,26$) wiąże się najprawdopodobniej z wyższymi stężeniami kadmu we krwi osób narażonych. Podobny efekt zaobserwowano w badaniu przesiewowym w Norwegii, gdzie korelacja między stężeniami kadmu i selenu we krwi była jeszcze silniejsza ($r = -0,8$). Korelacja ta nie wykazała związku z paleniem papierosów jako źródłem kadmu (24).

Stężenie kadmu we krwi w grupie odniesienia, średnio 1,4 µg/l, jest typowe w populacjach polskich (22). Jest to poziom wyższy od zalecanego przez normę, ale aż siedmiokrotnie niższy od stwierdzonego dla tej samej populacji (HML95) kilka lat wcześniej. Co ciekawe, w grupie odniesienia nie uwidocznił się

związek stężenia kadmu we krwi z nałogiem palenia papierosów, uważanym za zasadnicze źródło tego metalu w populacji nienarażonej zawodowo. Ten wynik jest zgodny z obrazem, uzyskanym dla tej populacji uprzednio. W innych badaniach osób, zamieszkujących środowiska miejskie, stwierdzano istotne podwyższenie stężenia kadmu we krwi palaczy. W grupie odniesienia niniejszego badania stężenie kadmu we krwi nie wykazywało też korelacji z wartością żadnego innego badanego parametru.

Porównując stężenie arsenu w moczu u przedstawicieli obydwu grup badania z danymi z literatury należy stwierdzić, że środowiskowe ekspozycje na arsen, znane dla takich krajów, jak Chile, Tajlandia lub Tajwan bywają dużo wyższe niż narażenia zawodowe w badanej przez nas hucie (25). Niemniej obciążenie arsenem w obu badanych grupach, wobec dopuszczalnych, obowiązujących w Polsce wartości, było znacznie przekroczone.

Przyczyną mniej więcej trzykrotnego podwyższenia, w stosunku do normy, poziomu aktywności katepsyn w surowicy w obydwu grupach może być zwiększona nekroza komórek w badanej populacji, lub też stany przednowotworowe. Analiza modeli regresji pozwala natomiast na stwierdzenie, że badane w tej pracy parametry nie mają istotnego wpływu na wzrost aktywności katepsyn w surowicy, pomimo sporych narażeń środowiskowych na TNEM. Przyczyny należy więc poszukiwać w innych rodzajach emisji do środowiska, związanych z metalurgią, zwłaszcza węglowodorów policyklicznych i innych toksyn organicznych, które mogą aktywować procesy, prowadzące do uwalniania katepsyn (26).

Średni poziom CP w grupie narażonej zawodowo na TNEM jest wyższy o około 10% od wartości dla grupy odniesienia i w takiej mniej więcej mierze jest on zależny od poziomów kadmu, manganu, żelaza i arsenu, z tym, że korelacja dla arsenu jest ujemna. Mangan i żelazo bezpośrednio, a kadm pośrednio (gdyż nie jest jonem aktywnym redokso) mogą się przyczyniać do wzrostu uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach krwi. W innych badaniach tej samej populacji wykazano, że narażeniu zawodowemu towarzyszy istotny wzrost poziomu swoistego endogennego utleniacza, tlenku azotu, w surowicy, związany z zaburzeniami procesu tworzenia hemu wskutek narażenia na ołów (21). Nasilenie zjawisk oksydacyjnych we krwi może prowadzić do procesu nowotworzenia w sposób podobny do przewlekłego stanu zapalnego, ponadto jednym ze skutków zjawisk oksydacyjnych jest akty-

wacja katepsyn (27). Alternatywnym źródłem CP we krwi może być nekroza tkanek, również w wyniku aktywacji procesów oksydacyjnych i działania kadmu.

Wzrost poziomu CPI w surowicy w grupie zasadniczej, w stosunku do i tak wysokiego poziomu w grupie odniesienia, świadczy o rosnącej reakcji obronnej, polegającej na wzmożeniu kontroli aktywności katepsyn w grupie narażonej. Kwestia związków aktywności inhibitorów proteaz we krwi z poziomami bądź narażeniami na TNEM, czy też metale podstawowe, nie była dotychczas badana. Porównanie wartości średnich podpowiada, że narażenie na TNEM jest czynnikiem bardzo istotnym dla wzrostu poziomu inhibitorów. Nie obserwuje się natomiast charakterystycznego dla zaawansowanych chorób nowotworowych zwiększenia poziomu kompleksów inhibitorów z katepsynami. U osób narażonych na metale ciężkie w środowisku pracy (grupa zasadnicza) stwierdza się przede wszystkim istotne zwiększenie poziomu całkowitych i wolnych inhibitorów katepsyn w surowicy. Brak różnic pomiędzy poziomami kompleksów inhibitorów a aktywnością katepsyn między grupami badania nie wynika jednak z podobnej aktywności katepsyn w tych grupach, gdyż te dwa parametry nie wykazują korelacji. Badanie modeli zależności wskazuje natomiast, że poziomy inhibitorów proteaz całkowitych i wolnych w grupie narażonej zawodowo zależą od parametrów badanych w niniejszej pracy w stopniu statystycznie istotnym, ale niewielkim. Zależności te dla inhibitorów całkowitych i wolnych są bardzo podobne, zarówno pod względem skali, jak i charakteru, wykazując dodatnią korelację z poziomem kadmu i miedzi, a ujemną z WPP. Ta sytuacja jest prawdopodobnie odpowiedzialna za niewielką skalę znamienności modelu, gdyż dodatnia zależność od poziomu kadmu jest znoszona przez ujemną zależność od czynnika, który jest jednocześnie istotnym źródłem kadmu, czyli WPP. Zależność od poziomu miedzi może wiązać się również z bezpośrednim oddziaływaniem tego metalu z cząsteczkami kininogenów, które posiadają miejsca wiązania metali (28).

Przeprowadzona powyżej szczegółowa analiza zależności sugeruje też istnienie efektów wtórnych, takich jak zależność poziomu inhibitorów całkowitych od poziomu wapnia i magnezu, wywołana zapewne przez zaburzenia gospodarki tych metali w wyniku obciążenia kadmem. Dla inhibitorów wolnych widoczna jest jeszcze ujemna korelacja z selenem, która też może być wtórnym efektem korelacji selen – kadm.

Modele, opisujące poziomy inhibitorów w grupie nienarażonej, są o wiele skuteczniejsze niż dla grupy

narażonej, pomimo znacznie niższych wartości tych parametrów. Co więcej, zawierają one istotne wkłady dodatnie TNEM i FEP, a także istotne wkłady ujemne metali podstawowych, zwłaszcza wapnia, ale też manganu i magnezu. W dodatku dla ograniczonej podgrupy w grupie odniesienia stwierdzono bardzo istotną korelację dodatnią między stężeniem CPI⁸⁰, a poziomem selenu w surowicy. Ten efekt świadczy o bardzo istotnej roli ochronnej selenu w kontroli aktywności katepsyn, nie odnotowanej w dotychczasowym piśmiennictwie przedmiotu. Można przypuszczać, że odpowiedzialne za ten efekt są selenozależne enzymy, kontrolujące tworzenie mostków disiarczkowych, niezbędnych dla prawidłowej aktywności CPI (28).

Całość powyższych rezultatów można zinterpretować w następujący sposób. Cechą charakterystyczną narażenia zawodowego na ołów i kadm, czy arsen, jak i szereg innych metali toksycznych jest współwystępowanie narażenia na różne metale, takie jak na przykład kobalt i nikiel, platynowce, czy też czynniki organiczne. Niewiele wiadomo o efektach takich narażeń mieszanych, natomiast ich cechą wspólną jest występowanie silnych synergii, prowadzących do tego, że bardzo niskie poziomy czynniki, uważanych za niezbyt szkodliwe, w bardzo znacznym stopniu (nieliniowo) modulują działanie zasadniczych czynników toksycznych. Tego typu efekt stwierdzono niedawno dla kobaltu w narażeniu mieszanym z ołowiem i kadmem (29). W tej samej pracy zbadano wówczas grupę narażoną zawodowo na TNEM, stwierdzając, że średnie stężenia kadmu i ołowiu we krwi osób narażonych są na poziomie niższym od obserwowanych dla grupy odniesienia niniejszego opracowania. Narażenia na kobalt we wdychanym powietrzu u dużej części osób badanych były niewykrywalnie niskie. Pomimo to wykryto u tych osób znaczący stopień promutagenych uszkodzeń DNA, spowodowanych najprawdopodobniej synergicznym hamowaniem naprawy DNA przez ołów, kadm i kobalt. Podobne zjawiska obserwuje się dla pyłów metali karcynogennych lub ich związków w obecności węglowodorów policyklicznych (30). W świetle przedyskutowanych powyżej faktów wydaje się prawdopodobne, że tego typu synergii z nieuwzględnionymi czynnikami śladowymi mogą też odpowiadać za reakcje ochronne w grupie hutników, takie jak indukcja inhibitorów katepsyn w surowicy krwi, zniesienie bezpośrednich zależności poziomów inhibitorów od TNEM, w stosunku do grupy odniesienia i hamowanie aktywności CPI, odzwierciedlające się w braku wzrostu poziomu kompleksów CP-CPI i zniesieniu pozytywnego wpływu

selenu na poziom inhibitorów. Uderzającą, choć trudno uchwytną wskazówką, że tak jest, stanowi całkowita odmienność zależności między parametrami pomiędzy grupami badania przedstawiono w tabeli 3 i 4.

Mało prawdopodobne, żeby za całość efektu odpowiadała ekspozycja na miedź, ze względu na prawidłowe jej średnie poziomy we krwi i bardzo duże zdolności buforujące surowicy krwi człowieka w tym względzie. Czynniki odpowiedzialnych za synergię w stymulacji produkcji inhibitorów katepsyn w całej grupie narażonej należy raczej poszukiwać w grupie pierwiastków śladowych, a zarazem toksycznych przy niefizjologicznych sposobach wchłaniania, takich jak kobalt chrom lub platynowce, które mogą być obecne w powietrzu na wydziałach produkcyjnych hut metali nieżelaznych.

WNIOSKI

1. Mieszane narażenie na niektóre metale, jak ołów, arsen i kadm (zawodowe lub środowiskowe) może prowadzić do wzrostu aktywności endopeptydaz cyternowych, potencjalnych markerów procesów rozrostowych.

2. Procesy obronne organizmu, wyrażające się stężeniem inhibitorów katepsyn w surowicy, zależą od stopnia narażenia i są znacząco większe w grupie hutników eksponowanych zawodowo na metale ciężkie. Prawdopodobnie wraz z dalszym wzrostem narażenia mogłoby dojść do zahamowania produkcji inhibitorów i obniżenia możliwości obronnych organizmu.

3. Brak równoczesnego wzrostu stężenia kompleksów katepsyn z inhibitorami może jednak świadczyć, że reakcje obronne organizmu ulegają zaburzeniu i nie są skuteczne już przy narażeniach średniego stopnia.

PIŚMIENNICTWO

1. Desoize B.: Cancer and metals and metal compounds. *Carcinogenesis*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2002;42:1-3
2. Steenland K., Boffetta P.: Lead and cancer in humans: where are we now? *Am. J. Ind. Med.*, 2000;38:295-299
3. Lison, D., De boeck, M., Verougstraete, V., Kirsch-Wolders, M.: Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.*, 2001;58:619-625
4. Brömme D., Kaleta J.: Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr. Pharm. Design*, 2002;8:1639-1658
5. Haczyńska H., Warwas M.: Katepsyna B. Udział w inwazji procesu nowotworowego i jego diagnostyce. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1994;48:729-743
6. Lah T.T., Kokalj-Kunovar M., Turk V.: Cysteine proteinase inhibitors in human cancerous tissues and fluids. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1990;371:199-203

7. Farinati F, Herszenyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Cardin R. i wsp.: Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1996;17:2581–2587
8. Henskens Y.M.C., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V.: Cystatins in health and disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1996;377:71–86
9. Křepela E., Procházka J., Kárová B., Čermák J., Roubková H.: Cysteine proteases and cysteine protease inhibitors in non-small cell lung cancer. *Neoplasma*, 1998;45:318–331
10. Kos J., Nielsen H.J., Krašovec M., Christensen I.J., Cimerman N., Stephens R.W. i wsp.: Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1998;4:1511–1516
11. Kos J., Werle B., Lah T., Brunner N.: Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2000;15:84–89
12. Antonowicz-Juchniewicz J.: Środowiskowy i zawodowy wpływ metali ciężkich na rozwój zmian patologicznych w naczyniach krwionośnych [praca na stopień naukowy doktora habilitowanego]. Akademia Medyczna, Wrocław 2001
13. Piomelli S.: A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973;81:932–940
14. Barrett A. J.: An improved color reagent for use in Barrett's assay of cathepsin B. *Anal. Biochem.*, 1976;76:374–376
15. Minakata K., Assano M., Sato T., Harada N.: Assay of alpha-cysteine proteinase inhibitor in serum or plasma. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1982;369:493–498
16. Międzyresortowa Komisja ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy: Czynniki szkodliwe w środowisku pracy. Biuletyn Informacji Publicznej. Centralny Instytut Ochrony Pracy, Warszawa 2003, ss.122–123
17. Deutsche Forschungsgemeinschaft – Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area: List of MAK and BAT Values. Wiley-VCH, Weinheim 2003, s. 204
18. Siewiński M., Kręcicki T., Jarmułowicz J., Berdowska I.: Cysteine proteinase inhibitors in serum of patients with head and neck tumors. *Diagn. Oncol.*, 1992;2:323–326
19. Jakubowski M., Trzcinka-Ochocka M., Hałatek T., Raźniewska G., Szymczak W.: Integrated indexes of occupational exposure as predictors of kidney dysfunction. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2002;15:393–399
20. Biggs M.L., Kalman, D.A., Moore L.E., Hopenhayn-Rich C., Smith M.T., Smith, A.H.: Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat Res.*, 1997;386:185–195
21. Dzynerowicz-Bal E., Antonowicz-Juchniewicz J., Skoczyńska A., Andrzejak R.: Influence of heavy metals (especially lead) on lipid metabolism and the oxidation-reduction status of the organism. W: Centeno J.A., Collery P., Vernet G., Finkelman R.B., Gibb H., Etienne J.C. [red.]. *Metal Ions in Biology and Medicine*. T. 6. J. Libbey Eurotext, Paris 2000, ss. 475–477
22. Wąsowicz W., Gromadzińska J., Rydzynski K.: Blood concentration of essential trace elements and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2001;14:223–229
23. Lee B.K., Ahn K.D., Lee S.S., Lee G.S., Kim Y.B., Schwartz B.S.: A comparison of different lead biomarkers in their associations with lead-related symptoms. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2000;73:298–304
24. Ellingsen D. G., Thomassen Y., Aaseth J., Alexander J.: Cadmium and selenium in blood and urine related to smoking habits and previous exposure to mercury vapor. *J. Appl. Toxicol.*, 1997;17:337–343
25. Concha G. Vogler G., Nermell B., Vahter M.: Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2002;75:576–580
26. Heijne W.H., Stierum R.H., Slijper M., van Bladeren P.J., van Ommen B.: Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach. *Biochem. Pharmacol.*, 2003;65:857–875
27. Lockwood T.D.: Cathepsin B responsiveness to glutathione and lipoic acid redox. *Antioxid. Redox Signal.*, 2002;4:681–691
28. Herwald H., Morgelin M., Svensson H. G., Sjöbring U.: Zinc-dependent conformational changes in domain D5 of high molecular mass kininogen modulate contact activation. *Eur. J. Biochem.*, 2001;268:396–404
29. Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifensath M., Götte W. i wsp.: Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 2003;24:63–73
30. Schwerdtle T., Seidel A., Hartwig A.: Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells. *Carcinogenesis*, 2002;23:47–53