

**Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu**

Poslijediplomski doktorski studij: **Farmaceutsko-biokemijske znanosti**

Modul: **Medicinsko-biokemijske znanosti**

Kolegij: **Biostatistika**

Voditelj kolegija: **prof. dr. sc. Mladen Petrovečki**

Kritička raščlamba statističkih postupaka znanstvenog rada

”Correlation of oxidative status with BMI and lung function in COPD”

Arpana Vibhuti, Ehtesham Arif, Desh Deepak, Bhawani Singh, M.A. Qadar Pasha

Clinical Biochemistry, Volume 40, Issues 13–14, September 2007, Pages 958–963

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.04.020>

Anita Somborac Bačura

mag. med. biochem.

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju

Farmaceutsko – biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Domagojeva 2, 10000 Zagreb

adresa@e-poste.hr

Zagreb, studeni 2012.

UVOD

Oksidativni stres igra važnu ulogu u patogenezi kronične opstruktivske plućne bolesti (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD). Neravnoteža između oksidansa (npr. iz dima cigareta i reaktivnih kisikovih spojeva iz leukocita u dišnim putevima) i antioksidansa (reduciranog glutationa i antioksidativnih enzima poput glutation peroksidaze, katalaze,...) dovodi do oštećenja staničnih lipida, proteina i DNA, te propadanja stanica pluća.

Smanjeni indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) povezuje se s povećanom stopom smrtnosti kod oboljelih od COPD.

Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li povezanost između oksidativnog statusa i BMI kod oboljelih od COPD. Nadalje, ispitana je i povezanost oksidativnog statusa i BMI s funkcijom pluća.

Za parametre oksidativnog statusa u plazmi ispitanika u obzir su uzeti lipidna peroksidacija (LPO, mjerena kao koncentracija malondialdehida, MDA), koncentracija reduciranog glutationa (GSH), te aktivnosti katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx).

ISPITIVANE SKUPINE

U studiju su bila uključena 202 oboljela od COPD i 136 zdravih kontrola. Jasno su navedeni kriteriji za uključivanje u studiju, odnosno isključivanje iz studije.

Svi ispitanici podvrgnuti su fizičkom pregledu, rentgenu pluća i spirometriji. Dijagnoza COPD se temeljila na simptomima poput kašlja, produktivnog ispljuvka i zaduhe tijekom više godina. Spirometrija se koristila za potvrđivanje prisustva opstrukcije dišnih putova. Za dijagnozu COPD uzimaju se vrijednost omjera forsiranog izdisajnog volumena u 1 sekundi (engl. *forced expiratory volume in 1 s*, FEV₁) i forsiranog vitalnog kapaciteta (engl. *forced vital capacity*, FVC) < 70 %, te vrijednost FEV₁ < 80 % predviđenog.

Ispitanici kod kojih je utvrđena reverzibilna opstrukcija dišnih puteva isključeni su iz studije. Reverzibilnost se definira kao povećanje FEV₁ za > 200 mL i > 12 % 30 min nakon udisanja 2.5 mg salbutamola.

Kontrolni ispitanici imali su normalnu plućnu funkciju (FEV₁ / FVC > 70 %, FEV₁ > 80 % predviđenog).

Svi ispitanici su bili pušači s više od 10 "pack-years" (1 "pack-year" odgovara pušenju 20 cigareta dnevno tijekom 1 godine).

Nitko od bolesnika nije imao respiratornu infekciju najmanje 4 tjedna prije uzimanja uzoraka, dok za kontrole nisu naveli prisutnost ili odsutnost drugih bolesti.

STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su analizirani statističkim programom za društvene znanosti (SPSS 10 za Windowse) i EPIINFO6 programom. Nisu navedeni detaljni podaci o programima, kao npr. verzija programa i proizvođač.

Kliničke karakteristike svih ispitanika autori su prikazali u *Tablici 1.*

Table 1. Clinical characteristics of controls and COPD patients

Characteristics	Controls (n = 136)	COPD (n = 202)
Age (year)	50.35 ± 13	59.0 ± 9.9 ^a
Sex (M/F)	107/29 (79%)	164/38 (81%)
Height (m)	1.64 ± 0.09	1.63 ± 0.08
Weight (kg)	67.1 ± 15.0	57.7 ± 14.1 ^a
BMI	25.1 ± 5.46	21.7 ± 4.70 ^a
Smokers (pack-years)	30.31 ± 16.80	36.05 ± 17.74 ^b
FEV ₁ (L)	3.15 ± 0.80	2.68 ± 0.51 ^a
FEV ₁ (% pred)	109.1 ± 20.5	59.8 ± 25.6 ^a
FVC (L)	3.78 ± 0.92	3.41 ± 0.81 ^a
FVC (% pred)	112.1 ± 20.2	82.7 ± 27.7 ^a
FEV ₁ /FVC (% pred)	80.2 ± 7.22	56.7 ± 12.7 ^a

Data are expressed as mean ± SD. BMI, body mass index; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; % pred, percentage of the predicted value. ^a*p* < 0.001, ^b*p* < 0.05 vs. control group. *p* value adjusted for age, gender and pack-years.

U tablici je navedeno jedno kvalitativno (kategoričko) obilježje (spol), dok su sva ostala obilježja kvantitativna (numerička).

Kvalitativna (kategorička) obilježja se ne mogu izmjeriti, odnosno prebrojati, nego su opisne naravi i predstavljaju neku osobinu ili svojstvo pojedinca ili sustava. Kategorička obilježja bilježe se upotrebom nominalne ili ordinalne mjerne ljestvice.

Kvantitativna (numerička) obilježja su ona koja se daju izmjeriti ili prebrojati, a rezultat mjerenja su prave brojčane vrijednosti koje nam daju informaciju o tome koliko nečega ima. Za mjerenje kvantitativnih obilježja rabimo intervalnu i omjernu mjernu ljestvicu.

Uz svaku numeričku varijablu navedene su i jedinice u kojima je vršeno mjerenje. Krivo je navedena jedinica za omjer FEV₁/FVC (% predviđenog), a u stvari se omjer izražava samo u %.

Vrijednosti numeričkih varijabli prikazane su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).

Aritmetička sredina je najčešće rabljena mjera centralne tendencije koja nam govori o prosječnoj vrijednosti ispitivanog obilježja. Računa se tako da se zbroje svi rezultati i podijele ukupnim brojem rezultata. Uz aritmetičku sredinu uvijek treba računati i prikazivati **standardnu devijaciju** koja nam govori o prosječnom odstupanju rezultata od aritmetičke sredine. Aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom

prikazujemo podatke koji su normalno raspodijeljeni. **Normalna (Gaussova) raspodjela** je kontinuirana, zvonolika, simetrična s obzirom na aritmetičku sredinu i nikada ne dodiruje os x . Podatak o normalnosti raspodjele iznimno je važan, jer uvjetuje odabir statističkog testa. Normalno raspodijeljene skupine podataka testiramo tzv. **parametrijskim testovima**, a one raspodjele koje nisu normalne testiramo **neparametrijskim testovima**. Normalnost distribucije nije jedini kriterij za izbor statističkog testa, nego treba voditi računa i o usporedivosti varijanci. Raspodjele koje nisu normalne prikazujemo medijanom i rasponom. **Medijan** predstavlja centralnu vrijednost u nekom nizu podataka, odnosno vrijednost koja se u jednom nizu rezultata nalazi točno u sredini. Medijan je položajna mjera koju ne možemo dobiti računski nego je moramo očitati iz niza podataka. Uz medijan se navodi **raspon** koji nam govori koja je najmanja, a koja najveća vrijednost nekog skupa. Matematički se definira kao razlika između maksimuma i minimuma i kao takav je najnetočnija mjera varijabilnosti. Raspon je vrlo osjetljiv na ekstremne vrijednosti i ništa nam ne govori o rezultatima koji se nalaze između najmanje i najveće vrijednosti. Korisniji pokazatelj varijabilnost podataka je **interkvartilni raspon** (raspon između prvog i trećeg kvartila). Prvi kvartil nam definira granicu ispod koje se nalazi 25 % svih podataka nekog skupa, treći kvartil obuhvaća 75 % svih podataka promatranog skupa, a drugi kvartil ima značenje medijana. Interkvartilni raspon je dobra mjera za podatke koji nemaju normalnu raspodjelu. Normalnost raspodjele može se testirati statističkim testovima kao što su Kolmogorov-Smirnovljevljev test, Shapiro-Wilksov test i neki drugi. Ovi testovi testiraju statističku značajnost razlike između teorijske i empirijske raspodjele. Nul-hipoteza takvog testa je da razlika ne postoji, odnosno da ispitivana (empirijska) raspodjela slijedi normalnu (teoretsku) raspodjelu. Pokaže li se da postoji statistički značajna razlika, tada zaključujemo da naša empirijska raspodjela nije normalna.

Autori u ovom radu ne navode kojim testom su ispitali normalnost raspodjele.

Podaci za dob prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija i to korištenjem decimalnih brojeva s različitim brojem decimala, umjesto da su prikazani cijelim brojem kao medijan i raspon (minimum – maksimum).

Za testiranje razlika između dvije skupine navedeno je da je korišten **dvosmjerni neparni t-test**.

Dvosmjerni test se primjenjuje kada se unaprijed ne može sa sigurnošću odrediti smjer neke razlike ukoliko ona postoji.

Neparni testovi se koriste za nezavisna mjerenja, a to su ona u kojima nije bitno je li za svaki pojedini uzorak izmjeren prvo jedan pa onda drugi parametar koje naknadno uspoređujemo, nego se dvije skupine rezultata uspoređuju općenito i skupno, a parovi podataka nisu od značaja za istraživanje.

Neparni t-test se koristi kada želimo ispitati razlikuju li se značajno aritmetičke sredine dviju skupina uz uvjet da podaci slijede normalnu raspodjelu i da imaju sličnu varijancu. Ovim testom testira se razlika između aritmetičkih sredina dviju skupina podataka koja je veća od razlike aritmetičkih sredina koja se može pripisati slučajnoj varijaciji uzoraka. Nulta hipoteza je da se aritmetičke sredine populacija iz koje su uzeti uzorci ne razlikuju. Ako odbacujemo ovu nultu hipotezu zaključujemo da se aritmetičke sredine dviju skupina razlikuju.

Kvalitativno obilježje (spol) prikazano je kao omjer broja muškaraca i žena u pojedinoj skupini, te kao postotak iz kojeg nije odmah jasno što predstavlja, ali jednostavnim računanjem proizlazi da se radi o postotku muškaraca u svakoj skupini. Nije navedeno je li i kojim testom ispitano da nema statistički značajne razlike u udjelu muškaraca i žena u skupinama.

Kategorički podaci mogu se prikazati udjelom (proporcijom) ili postotkom, a za testiranje razlika u dvije ili više skupina moguće je upotrijebiti χ^2 test. Osnovni uvjeti za primjenu ovog testa su:

- *podaci moraju biti dobiveni slučajnim izborom,*
- *podaci moraju činiti kontingencijsku tablicu (**kontingencijska tablica** je tablica u kojoj se kategorije u redovima i stupcima međusobno isključuju, tj. jedinka iz uzorka može biti pribrojana u samo jednu od ćelija tablice, a ukupni zbroj redaka i stupaca mora biti jednak broju jedinki u uzorku),*
- *frekvencije ne smiju biti malene (preporuka $N > 20$),*
- *uzorci iz kojih se uspoređuju podaci moraju biti nezavisni.*

χ^2 testom testira se razlika opaženih i očekivanih frekvencija u kontingencijskoj tablici.

Kao statistički značajna razlika u ovom radu koristila se vrijednost $P < 0.05$.

***Vrijednost P** je točno izračunana vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze kad je ona točna. Ova vrijednost odgovara razini značajnosti α od 0.05, odnosno ukoliko smo pogrešno odbacili nultu hipotezu, šansa da smo pogriješili je 5 %.*

U cijelom radu autori koriste malo slovo p umjesto velikog P i u legendi uz *Tablicu 1* navode da ^a označava $P < 0.001$, dok ^b označava $P < 0.05$, ali ne navode točnu P vrijednost za ^b.

Autori su naveli da je P vrijednost za "relevantne" faktore (ne navode koji su to) prilagođena dobi, spolu i "pack-years" koristeći metodu **analize kovarijance (ANCOVA)**.

***Kovarijanca** je mjera koliko se dvije varijable mijenjaju zajedno i koliko je jaka veza između njih. ANCOVA je opći linearni model koji spaja analizu varijance (ANOVA) i regresiju. ANCOVA ocjenjuje da li su zavisne varijable populacije jednake unutar kategoričke nezavisne varijable, dok statistički kontroliramo učinke drugih kontinuiranih varijabli koje nisu od primarnog interesa, poznate kao kovarijante. Stoga, kada se radi ANCOVA, podešava se zavisna varijabla onom što će biti ako bi sve skupine imale jednake kovarijante. Jedna od mogućnosti korištenja ANCOVA je prilagođavanje prvobitnih razlika u nejednakim skupinama. Ova kontroverzna primjena ima za cilj ispraviti početne razlike koje postoje na zavisnim varijablama u nejednakim skupinama. U ovoj situaciji, ispitanici nisu izjednačeni slučajnim odabirom, pa se kovarijante koriste za podešavanje rezultata i čine ispitanike više sličnima. Međutim, čak i uz korištenje kovarijanti, ne postoje statističke tehnike koje bi mogle izjednačiti nejednake skupine. Nadalje, kovarijante mogu biti tako usko povezane s nezavisnim varijablama da bi uklanjanje varijance zavisne varijable povezane s kovarijantom moglo ukloniti veliku varijancu zavisne varijable, čineći rezultate besmislenima.*

Dakle, metodom analize kovarijance autori su željeli ukloniti početne razlike u skupinama s obzirom na dob, spol i pušački status. S obzirom da nisu naveli da je postojala razlika u udjelu muškaraca i žena u skupinama, prilagodba prema spolu je potpuno nepotrebna. Ostaje pitanje kako je prilagodba prema dobi i pušačkom statusu, tj. varijablama koje su se razlikovale između skupina, utjecala na ishod svih analiza.

Za višestruke usporedbe između skupina autori navode da je korištena **jednosmjerna analiza varijance** (ANOVA) uz Bonferronijeve korekcije. S obzirom da je cijela studija napravljena na dvije skupine ispitanika koji nisu bili dijeljeni u podskupine, ne vidim gdje je točno korištena ova analiza koja se inače koristi ako imamo više od 2 skupine ispitanika.

Na *Slici 1* autori su prikazali rezultate ispitivanja biljega oksidativnog stresa.

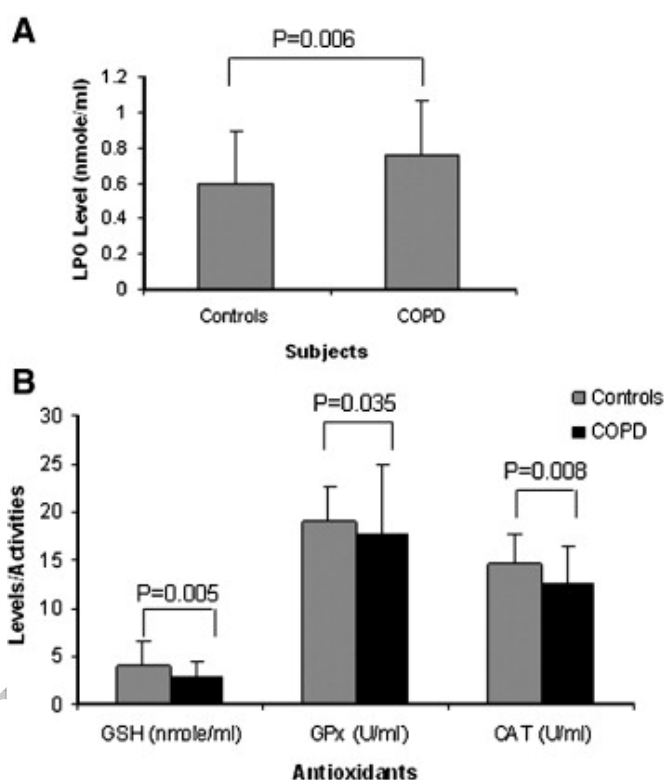


Fig. 1. Oxidative stress markers in controls and COPD patients. The patients had significantly higher LPO level whereas, lower GSH levels, GPx activity and CAT activity.

Autori navode da su biokemijski parametri koji nisu bili normalno raspodijeljeni analizirani **neparametrijskim Wilcoxonovim testom**, a to je pogrešan izbor testa jer se radilo o nezavisnim, a ne zavisnim podacima.

Neparametrijski Wilcoxonov test koristi se kada se želi usporediti postoji li razlika u srednjim vrijednostima između dvije serije parova međusobno zavisnih podataka, uz uvjet da raspodjela nije normalna i da se podaci ne mogu transformirati u normalnu raspodjelu (npr. logaritmiranjem).

U slučaju nezavisnih podataka koji nemaju normalnu distribuciju koristi se neparametrijski analog neparnog t-testa, **Mann-Whitneyjev test sume rangova**. Ovim testom testiramo postoji li statistički značajna razlika između medijana dviju ispitivanih skupina. Koristi se u slučaju kada imamo podatke koji nemaju normalnu

distribuciju ili u slučaju podataka kod kojih postoji razlika u varijanci. Testira se razlika između dviju grupa koja je veća od razlike koja nastaje zbog slučajne varijacije uzorka. Nulta hipoteza je da su dva uzorka uzeta iz populacija s istim medijanom. Svi rezultati se rangiraju od najmanjih prema najvećim bez obzira kojoj grupi pripadaju. Zatim se izračuna suma rangova za svaku grupu i uspoređuje se. Ako se dvije grupe ne razlikuju, suma rangova je približno ista. Ako postoji razlika, jedna grupa će imati manji, a druga veći rang i možemo zaključiti da uzorci pripadaju različitim populacijama, tj. postoji statistički značajna razlika.

Autori navode da su rezultati pokazali značajno višu razinu LPO kod oboljelih od COPD, za 21.1 % ($P = 0.006$), te niži antioksidativni status: sniženje od 27.7 % u razini GSH ($P = 0.005$), 7.1 % u aktivnosti GPx ($P = 0.035$) i 14.7 % u aktivnosti CAT ($P = 0.008$) u odnosu na kontrole. P vrijednosti su i u ovom slučaju prilagođene dobi, spolu i "pack-years". Ovakav način prikazivanja rezultata u tekstu nije prikladan, već bi rezultate trebalo za svaku skupinu ispitanika prikazati prikladnim mjerama centralne tendencije i mjerama varijabilnosti uz navođenje P vrijednosti.

Korelacije između dvije kontinuirane varijable napravljene su pomoću jednostavne regresijske analize. **Spearmanov koeficijent korelacije** je korišten za određivanje povezanosti između oksidansa i antioksidansa ili između oksidativnog statusa i BMI s FEV₁. S obzirom da raspodjela podataka za navedene parametre nije bila normalna, izabran je prikladan koeficijent korelacije.

Korelacija predstavlja sukladnost vrijednosti dviju (ili više) varijabli i govori o njihovoj međusobnoj povezanosti. Stupanj povezanosti dvaju brojčanih pokazatelja naziva se koeficijent varijacije (r). Predznak ispred koeficijenta korelacije govori nam jesu li varijable međusobno proporcionalne (r je pozitivan) ili obrnuto proporcionalne (r je negativan). Prema Coltonu (1974.) koeficijent korelacije za biološke sustave se može tumačiti na sljedeći način:

$r = 0$ do 0.25 ili 0 do -0.25 nema povezanosti,

$r = 0.26$ do 0.50 ili -0.26 do -0.50 slaba povezanost,

$r = 0.51$ do 0.75 ili -0.51 do -0.75 umjerena do dobra povezanost,

$r = 0.76$ do 1 ili -0.76 do -1 vrlo dobra do izvrsna povezanost.

Pearsonov koeficijent korelacije može se izračunati ukoliko barem jedna od promatranih varijabli ima normalnu raspodjelu, ispitivanje je provedeno na većem broju uzoraka, povezanost je linearna, vrijednosti varijabli slijede intervalnu ili omjernu ljestvicu. **Spearmanov koeficijent korelacije** predstavlja neparametrijsku inačicu koeficijenta korelacije i izračunava se ukoliko barem jedna od varijabli proizlazi iz ordinalne ljestvice, niti jedna od promatranih varijabli nema normalnu raspodjelu, ispitivanje je provedeno na manjem broju uzoraka ili su prisutni podaci koji značajno odskakuju od ostalih rezultata.

Rezultati korelacija oksidansa i antioksidansa prikazani su samo u tekstu. Autori navode da je razina LPO negativno, ali signifikantno korelirala antioksidansima GSH ($r = 0.251$, $P < 0.001$) i CAT ($r = 0.262$, $P < 0.001$), a da je korelacija s GPx bila granična ($r = 0.12$, $P = 0.051$) kod oboljelih od COPD. Sličan trend navode i za kontrole: korelacija LPO i GSH ($r = 0.258$, $P < 0.001$), CAT ($r = 0.381$, $P < 0.001$) i GPx ($r = 0.156$, $P = 0.071$). Na ovom primjeru vidi se da autori krivo interpretiraju rezultate korelacija. Naime, kao značajne rezultate uzimaju sve rezultate kod kojih je $P < 0.05$, međutim ne uzimaju u obzir vrijednost r . U ovom slučaju može se reći da

LPO korelira s GSH i CAT, ali ne i s GPx kod oboljelih od COPD i kod kontrola. Također, ukoliko je obrnuta korelacija, uz vrijednost r se mora pisati predznak minus.

Na *Slici 2* prikazane su korelacije između biljega oksidativnog statusa i BMI, a na *Slici 3* prikazane korelacije između biljega oksidativnog statusa i FEV₁.

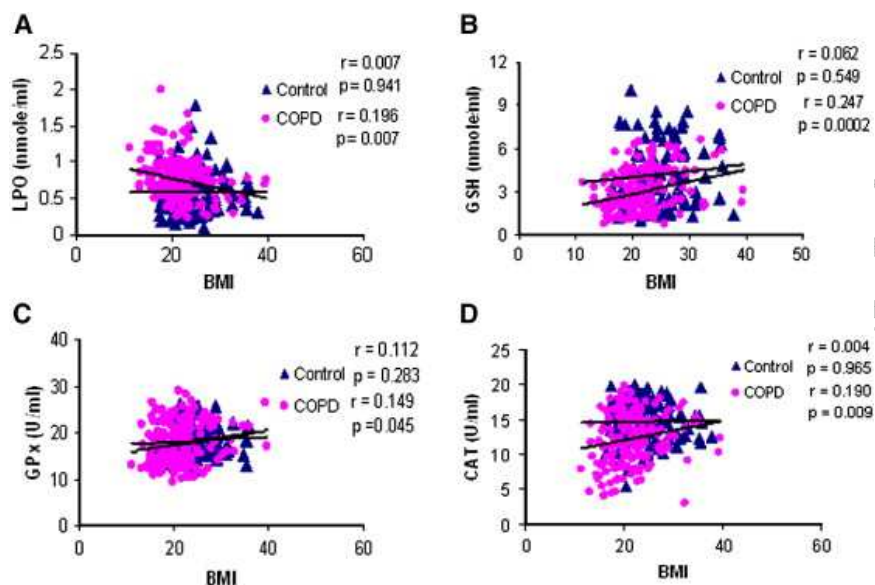


Fig. 2. Correlation analyses between oxidative status and BMI. Interaction of LPO (A), GSH (B), GPx (C) and CAT (D) with BMI in controls and COPD patients. LPO significantly negatively and GSH, GPx, CAT positively correlated with BMI in COPD patients.

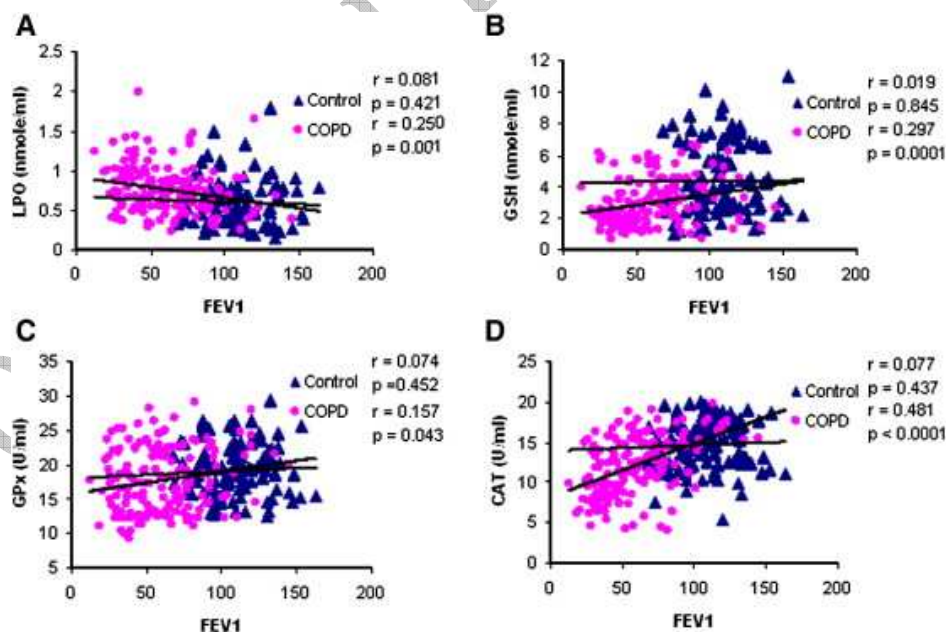


Fig. 3. Correlation analyses between oxidative status and FEV₁% predicted. Interaction of LPO (A), GSH (B), GPx (C) and CAT (D) with FEV₁ in controls and COPD patients. LPO significantly negatively and GSH, GPx, CAT positively correlated with FEV₁ in COPD patients.

Slično kao što sam i gore navela, autori za značajne rezultate uzimaju sve rezultate kod kojih je $P < 0.05$, međutim ne uzimaju u obzir vrijednost r , te uz obrnute

korelacije ne pišu predznak minus. Tako na *Slici 2* uopće ne postoje korelacije između ispitivanih parametara, a na *Slici 3* postoje samo korelacije u skupini oboljelih od COPD i to postoji povezanost LPO, GSH i CAT s FEV₁. Autori navode da je povezanost LPO s FEV₁ negativna, ali opet je vrijednost *r* napisana bez predznaka minus.

Na *Slici 4* prikazana je korelacija BMI i FEV₁.

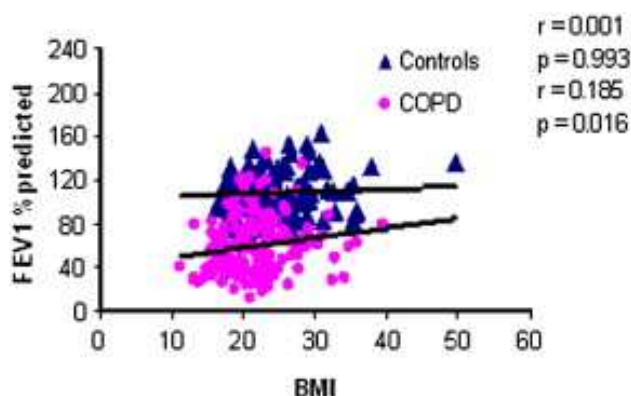


Fig. 4. Correlation analysis between FEV₁% predicted and BMI. In controls and COPD patients, FEV₁% predicted significantly positively correlated with BMI in COPD patients.

Kao i na prethodnim slikama, autori zaključuju da u skupini kontrola nema korelacije, dok kod oboljelih od COPD opet krivo zaključuju da postoji pozitivna korelacija i to samo na temelju *P* vrijednosti, a *r* je i ovdje manji od 0.25, te korelacija ne postoji.

ZAKLJUČAK

U zaključku autori navode da je ovo prva studija koja je pokazala povezanost između oksidativnog stresa i BMI, a kao što je prikazano na *Slici 2*, povezanosti uopće nema.

Nadalje, autori zaključuju da postoji povezanost oksidativnog statusa i funkcije pluća kod oboljelih od COPD, što je u skladu s rezultatima prikazanim na *Slici 3*.

Na temelju rezultata prikazanih na *Slici 4* pogrešno zaključuju da postoji povezanost BMI i funkcije pluća.

Autori smatraju da bi ovi rezultati mogli naći primjenu u dijagnozi i prognozi bolesti, što nije potkrijepljeno rezultatima. Kao nedostatak studije navode da bi studiju trebalo provesti na većem broju ispitanika koristeći veći broj biljega oksidativnog stresa.

S obzirom na sve navedene statističke pogreške, ne razumijem kako je ovaj rad prihvaćen u CC časopisu *Clinical Biochemistry* (5-godišnji *Impact Factor*: 2.079).