

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

Plazma ve saçta bulunan eser elementlerin koroner aterosklerozdaki tanısal rolü

Proje No: TSA-2013-4571

Proje Türü: Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı: **Doç. Dr. Mehmet Tuğrul İNANÇ**
Birimi/Bölümü: Tıp Fakültesi, Kardiyoloji A.D.

Araştırmacıların Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Doç. Dr. Metin AYTEKİN, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D
Doç. Dr. Nihat KALAY, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji A.D
Dr. Gökтуğ SAVAŞ, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji A.D

Eylül 2014
KAYSERİ

Teşekkür: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel ve Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından TSA-2013-4571 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Bize bu imkanı sunan Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü ve BAP birimine teşekkür ederiz.

Sunulan projeden şuan itibariyle bir yayına dönüştürülmüş ve indekse giren bir dergi olan *Biological Trace Element Research* dergisinde hakem aşamasındadır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
4. BULGULAR	14
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	19
6. KAYNAKLAR	22

ÖZET:

Giriş ve Amaç: Ağır metallerin kardiyovasküler hastalıklardaki zararlı etkisi daha önceki çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı ise plazma ve saç ağır metallerinin şiddetli koroner arter hastalıklarında (KAH) diyagnostik rolünü araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada koroner anjiyografiye giren 64 hasta kullanılmıştır. Koroner anjiyografi sonuçlarına göre, şiddetli koroner stenoz olan hastalar ($\geq 70\%$) şiddetli KAH grubunda (n= 34) yer almıştır. Bütün hastalarda plazma ve saç bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn), ve krom (Cr) seviyeleri ölçülmüştür.

Bulgular: Cr ($r=0.71$, $p<0.001$), Zn ($r=0.33$, $p=0.007$), ve Mn ($r=0.28$, $p=0.024$)'in saç ve plazma seviyeleri arasında önemli bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Saç analizleri iki grubun Cr, Mn, Cu, ve Zn seviyeleri arasında önemli bir farklılık olmadığını göstermiştir. Ancak, plazma Cr, Mn, Cu, ve Zn seviyeleri kontrol grubuna göre şiddetli KAH grubunda önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p< 0.001$ her bir ağır metal için). ROC analizi ile şiddetli KAH tanısında plazmadaki Mn ve Zn'nun %85 duyarlılık gösterilmiştir. Multivariate analizde ise, sadece plazma Mn (Exp (B): 15.233, $p<0.001$) ve Zn (Exp (B): 1.658, $p<0.013$) seviyelerinin şiddetli KAH ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Tartışma: Altta yatan mekanizma bilinmemesine rağmen, plazma ağır metal seviyeleri şiddetli KAH ile ilişkilidir. Sonuçlarımız plazma ağır metallerinin şiddetli KAH tanısında faydalı biyomarkırlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

ABSTRACT:

Background and purpose: The hazardous effects of heavy metal on cardiovascular diseases were shown in previously studies. The aim of the present study is to test the diagnostic role of plasma and hair heavy metals in severe coronary artery disease (CAD).

Methods and subjects: Sixty-four patients undergoing coronary angiography were included in this study. According to the coronary angiography results, patients with severe coronary stenosis ($\geq 70\%$) were included the significant CAD group (n= 34). Patients with non-significant stenosis ($<70\%$) or normal coronary arteries were included the control group (n= 30). Plasma and hair copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn), and chromium (Cr) levels were measured in all patients.

Results: There was a significant correlation between hair and plasma levels of Cr ($r=0.71$, $p<0.001$), Zn ($r=0.33$, $p=0.007$), and Mn ($r=0.28$, $p=0.024$). Hair analysis showed no significant difference between two groups for the levels of Cr, Mn, Cu, and Zn. However, plasma Cr, Mn, Cu, and Zn levels were significantly higher in the significant CAD group compared to the control group ($p<0.001$ for each heavy metal). ROC curve analysis showed sensitivity values of 85% for plasma Mn and Zn for diagnosis severe CAD. In multivariate analysis, plasma Mn (Exp (B): 15.233, $p<0.001$) and Zn (Exp (B): 1.658, $p<0.013$) levels were significantly associated with significant CAD.

Conclusions: Although the underlying mechanisms remain obscure, plasma heavy metal levels are associated with severe CAD. Our results suggest that plasma heavy metal levels may serve as a useful marker for diagnosing severe CAD.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Sağlıklı organizmaların metabolizmalarının düzenlenmesinde ağır metallerin eser miktarda bulunmaları önemlidir. Aynı zamanda bu Eser elementlerin miktarlarındaki artış sonucunda vücutta istenmeyen etkiler oluşmaktadır. Önceki yapılan çalışmalarda ağır metallerin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki olumsuz etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmamızda plazma ve saçta bulunan ağır metallerin şiddetli koroner arter hastalığının varlığı ile olan ilişkisi ve ağır metallerin koroner arter hastalığındaki tanısal rollerini araştırmak amaçlanmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklar üzerinde ağır metallerin olumsuz etkileri önceki çalışmalarla ortaya konmuştur. Bununla birlikte, şiddetli kardiyovasküler hastalıkların tanısında plazma ve saç ağır metalleri seviyelerinin **önemi aydınlatılmamıştır**. Bu çalışmamızda, bölgemizde yaşayan hasta popülasyonunda plazma ve saç ağır metallerinin seviyelerinin koroner arter hastalığındaki tanısal önemini araştırmayı planlıyoruz.

Önceki yapılan çalışmalar ışığında eser elementlerinin koroner arter hastalığında daha yüksek seviyelerde bulunacağını ve hastalığın tanısında belirteç olabileceği hipotezini ileri sürüyoruz.

GENEL BİLGİLER

Sağlıklı organizmalarının metabolizmalarının düzenlenmesinde ağır metallerin eser miktarda bulunmaları önemlidir [1]. Ağır metallerin toksisitelerinde kardiyovasküler sistem dahil tüm sistemlerle ilgili çeşitli kronik hastalıklar ve bozukluklar ortaya çıkabilmektedir. [2, 3].

Ateroskleroz çok yönlü ve yıllar boyu süren bir süreçte gelişir. Bu gelişimde kişisel ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Kişisel faktörler birinci derece akrabalarda koroner hastalığın olması, kolesterol yüksekliği, hipertansiyon, şeker hastalığı olması, yaş, genetik ve epidemiyolojik faktörler aterosklerozun gelişmesini ilerleten faktörlerdir. [4]. Önceki yapılan çalışmalarda, ağır metal seviyelerinin

aterosklerotik süreç ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [5, 6]. Buna ilave olarak, epidemiyolojik çalışmalar ağır metal seviyeleri ve kardiyovasküler son noktaları arasında ilişki gösterilmiştir [7, 8]. Eser elementleri trombosit fonksiyonları ve kan pıhtılaşmasıyla yakından ilişkilidir [9].

Ağır metal seviyeleri ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki bilindiği halde ağır metallerin koroner arter hastalığındaki tanısal rolü hakkında literatürde bir bilgi yoktur.

Koroner Arter Hastalığı (KAH) koroner arterlerin duvarlarında oluşan plaklardan ötürü ortaya çıkan bir hastalıktır.

Ateroskleroz damar duvarında lipit parçacıklarının birikimi ile oluşan ve damarların lümenini tıkayarak normal kan akımını engelleyen patolojik bir süreçtir. Aterosklerozun koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa koroner arter hastalığı denilmektedir.

Hastalar yaşam tarzlarını değiştirerek hastalığın etkisini azaltmaya çalışabilirler. Bu değişiklikler arasında diyet, kilo kontrolü, sigara bırakımı, egzersiz yapmak gelebilir. İleri derecede olan hastalık için nitrogliserin, kalsiyum kanal blokırlar veya ACE inhibitörler verilmekle birlikte gerektiğinde anjioplasti, kalp nakli şeklinde cerrahi müdahale de yapılabilir.

Yukarıda belirttiğimiz gibi Koroner arter hastalığı olan hastalarda arterleriyel sistemdeki bozukluk gözlemlenmiş fakat bu bozukluğun sebebi tam olarak ortaya konamamıştır. Kalp vasküler sistemde meydana gelen bu değişiklikleri önleyebilmemiz ancak vasküler sistemdeki

değişikliklerin sebebini bilmemize bağlıdır. **Eser elementlerinin bu hastalıkla ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Ayrıca eser elementlerin metabolizmadaki birçok yolun düzenlenmesi, fonksiyonların devamlılığı ve dengesi için esastır.** Eser elementleri trombosit fonksiyonları ve kan pıhtılaşmasıyla yakından ilişkilidir.

Eser elementlerinin bu hastalık tanısındaki rolünü belirlemek sadece bize bu hastalığın patolojisini anlamamızda yardımcı olmayacak fakat aynı zamanda bizlere eser elementleri ve vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi tedavi ve sonuçları ile tanımlamamıza olanak sağlayacaklardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma dizaynı:

Çalışmamız prospektif, çift-kör, çapraz-kesitsel bir çalışmadır.

Çalışmamızda koroner anjiyografi yapılacak 64 hasta dahil edildi. Koroner anjiyografi için endikasyonlar pozitif stres testi ve göğüs ağrısı olan hastalar ile akut koroner sendromu tanısı konulan hastalar oldu. Koroner anjiyografi sonuçlarına göre hastalar şiddetli koroner arter hastalığı ve kontrol olarak iki gruba ayrıldı.

Angiografi sonucunda normal koroner arterler tespit edilen 30 birey kontrol olarak alınırken ciddi koroner arter hastalığı tespit edilen 30 hasta koroner arter hastalığı grubuna dahil edildi.

Ciddi koroner arter hastalığı herhangi bir koroner arterde %70'den büyük veya geniş yan dal 2.5mm'den büyük ise şiddetli koroner arter stenozu olarak tanımlandı. Tüm hastaların kan ve saç örneklerindeki bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve krom (Cr) seviyeleri ölçüldü.

Biyokimyasal ölçümleri: Hasta ve kontrollerin rutin biyokimyasal verileri kullanıldı.

Plazma ve saç ağır metal ölçümleri: Saç numuneleri analize hazırlamak için 5mm uzunluğunda parçalara bölündü. Yıkanan numuneler 50°C'de kurutuldu ve plazma ağır metal ölçümleri için kan örnekleri ön kol ven damarından 4ml olacak şekilde alındı. Kan numuneleri 1500 rpm oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -80°C'de saklandı. Dondurulan plazma numuneleri (2ml) çözöldükten sonra Teflon bomba üzerine taşındı. Saç örnekleri de (250 mg) Teflon bomba üzerine transfer edildi. Numuneler daha sonra mikrodalga fırında (Berghof Speedwave, Germany) iki kez konsantre nitrik asit (5 ml, 65%) ile sindirildi. Numunelerin dilüsyonu için Nanopure 18M Ω cm su kullanıldı. Analizyer Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) cihazı ile yine üretici firmanın önerilerine göre (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) yapıldı. Skandiyum, berilyum, rodiyum ve bismuth internal standard olarak kullanıldı. Bu yöntem her bir iz (eser) elementi mg/L seviyesinde ölçebilecek kapasitededir.

Detaylı anlatım:

Cihazın Adı: Agilent 7500 a ICP-MS cihazı

Teknik Özellikleri: ICP-MS katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, hassas ve doğru biçimde ölçülmesine olanak sağlayan bir analiz tekniğidir. ICP-MS teknolojisi sayesinde katı veya sıvı örneklerde 76 element aynı anda ve çok düşük derişimlerde (nanogram-pikogram/l) hassas ve hızlı bir şekilde analiz edilebilmektedir. ICP-MS ile tek bir örnek içindeki 35 kadar elementin analizi üç dakika kadar az bir sürede ölçülebilir.

ICP-MS Çalışma Prensibi: İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometrisi, örneklerin yüksek sıcaklıktaki bir plazmaya, genellikle argon, gönderilerek moleküler bağların kırıldığı ve atomların iyonlaştırıldığı bir analitik tekniktir. Örnek, genel olarak bir solüsyon halinde örnek giriş sistemi aracılığıyla nebulizöre ve sprej odacığına sunulur. Burada yüksek hızlı argon akışı sayesinde örnek solüsyonu sisleştirilir. Sadece çok küçük damlacıklar argon plazmasına taşınır, diğerleri doğrudan atığa gider. 6000 K sıcaklıklardaki plazma örneği buharlaştırır ve iyonize eder. İyon akışı atmosferik basınçtan örnekleyici (sampler) ve süzücü (skimmer) konlar aracılığıyla yüksek vakumlu bir ortama gider. Sonra iyon akımı iyon lensleri aracılığıyla quadrupola odaklanarak kütle filtresine yönlendirilir. İyonlar kütle spektrometrede kütle yük oranına göre ayrılırlar ve detektör tarafından ölçülürler.

ICP-MS cihazı aşağıdaki temel bileşenlerden oluşmaktadır.

Örnek giriş sistemi (Sample Introduction) peristaltik pompa, nebulizör, sprej odacığı içerir ve örneklerin cihaz içerisine girme yolunu sağlar. Peristaltik pompa, sürekli olarak örnek çekişini sağlayarak numuneyi sprej odacığına ulaştırır. Ayrıca, sprej odacığında oluşan büyük damlacıkların atığa gönderilmesini sağlar. Nebulizör yardımıyla sıvı örnek argon gazı sayesinde aerosol haline gelir. Sprej odacığında aerosol haline gelen örnek enjektör vasıtasıyla torch'a ulaştırılır. ICP-MS cihazı üzerindeki örnek giriş sistemi HF'e dayanıklı Rytan™ Scott spray chamber ve cross-flow nebulizer den oluşmaktadır.

ICP torch, analit atomları iyonlara dönüştürerek ICP-MS'in iyon kaynağı olarak hizmet veren plazmayı oluşturur. Argon gazı plazma haline gelerek 10,000 Kelvinlere ulaşır. Yüksek sıcaklık etkisiyle numune içinde bulunan elementler iyonize olur ve pozitif yüklü iyonlar meydana gelir.

Ara birim (Interface), atmosferik basınç altındaki ICP iyon kaynağı ve yüksek vakum kütle spektrometrisi arasında bağlantıyı kurar. Ara birim kısmında bulunan sampler ve skimmer konlar süzme görevi yaparak pozitif yüklü iyonları geçirirler. İyonize olmamış materyaller ve fotonlar shadow stop sayesinde tutulurlar.

Vakum Sistemi (Vacuum System), iyon optikleri, quadropol ve detektör için yüksek vakum sağlar.

Lensler (Ion Lenses), iyonlara odaklanarak matriks kısmının quadrapula ulaşmasını engeller. Lense uygulanan gerilim sayesinde pozitif yüklü iyonlar birbirleri ile çarpışmadan quadropol'a ulaşırlar.

DRC (Dynamic Reaction Cell), Perkin Elmer ICP-MS cihazı DRC (Dinamik Reaksiyon Hücresi) vasıtasıyla plazma kaynaklı poliatomik parçaları kimyasal rezolüsyon kullanarak elimine eder ve bu parçaların quadropole 'a ulaşmasını engeller. İnterferansları azaltmak amacıyla az miktarda reaksiyon gazı (metan, oksijen, amonyak,v.b) kullanılır.

Quadropul (Quadropole), iyonları kütle/yük oranına göre ayırmada kütle filtresi olarak görev yapar. Yüksek iletkenlik için altın kaplamalı seramik rodler aynı zamanda sıcaklığın stabil kalmasını sağlar. Quadropol ayırma işlemini, uygun olarak ayarlanmış voltaj ve radyo dalgaları frekansına göre yapar.

Detektör (Detector), Quadropuldan geçen iyonlar dedektörün aktif yüzeyine çarpar ve ölçülebilir bir sinyal oluştururlar. Dedektörün aktif yüzeyi dynode olarak bilinir ve yüzeye çarpan iyonlara karşılık elektron yayar.

Veri işleme ve sistem kontrolörü (Data Handling and System Control), cihazın kontrolünün ve ölçüm ve değerlendirme işlemlerinin her aşamasını kontrol eder.

Örnek Hazırlama:

ICP-MS analiz tekniğinin en önemli aşamalarından biri örnek hazırlama aşamasıdır. Laboratuvarımızda çözelti ICP-MS analiz tekniği uygulandığından, katı örneklerin analiz aşaması öncesi çözelti haline getirilmesi gerekmektedir. Katı örneğin türüne (jeolojik,

çevresel, biyolojik vb.) ve analiz edilmesi istenilen elementlere göre farklı örnek hazırlama metotları uygulanmaktadır.

Katı örneklerin çözelti haline getirilmesi Bergoff mikrodalgada sisteminde yüksek basınca dayanıklı teflon kaplar içerisinde yapılmaktadır. Eritiş işleminde yüksek saflıktaki asitlerden (HNO_3 , HCl , HF , HClO_4 vb.) hazırlanmış asit kokteylleri kullanılmaktadır. Hazırlanan asit kokteylleri analite ve metoda göre değişmektedir.

Analize tabii tutulacak sıvı örnekteki bazı maddeler cihaza zarar vermemesi açısından belirli sınır değerlerin altında olması tercih edilir. Sıvı örneklerdeki toplam çözünmüş katı madde miktarı (TDS) % 0,1 in, organik madde içeriğinde %2'nin altında olmalıdır. Örnekler ayrıca askıda katı partiküller içermemelidir. Analiz edilecek bu tür örneklerin bir kısmı mutlaka 0.45 mikronluk filtreden geçirilmelidir.

Matris etkisini ortadan kaldırmak için örnekler ile standartların aynı asit çözeltisi (tipik olarak %2 HNO_3) içerisinde hazırlanması önemlidir. Nitrik asit çözeltisi, supra pur % 65'lik nitrik asitten 18,3 M ohm ultra saf su içerisinde günlük olarak hazırlanmaktadır. ICP-MS ölçüm aralığı ppb-ppt aralığında olduğundan, daha konsantre analitlerin bu ölçüm aralığına getirilmesi için seyreltme yapmak gerekmektedir.

İstatistik:

Gruplar t test veya Mann-Whitney U test kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arası Kategoriksel değişkenler chi-square testi ile karşılaştırıldı. Önemli koroner stenozun bağımsız prediktörlerini belirlemek için univariate ve multivariate lojistik regresyon analizleri kullanıldı. Sonuçlar %95 confidence interval (CI)'lı odds ratio (OR) oranı ile gösterildi. Cu, Zn, Mn ve Cr'un sensitivitesi, spesifitesi, pozitif ve negatif prediktivite değerleri receiver-operator-characteristic curve (ROC) analiziyle belirlendi. Tüm istatistik analizleri *JMP versiyon: 5.0.1.2* programı ile gerçekleştirildi. Devamlı değişkenler bağımsız iki-tailed t test ile karşılaştırıldı. $P \leq 0.05$ anlamlı farklılık olarak göz önünde bulunduruldu. ROC eğrisi MedCalc software version 9.0.1.0 (MedCalc Inc., Mariakerke, Belgium) programı ile elde edildi.

BULGULAR

Hasta bilgileri Tablo 1’de gösterilmiştir. Yaş ve cinsiyet oranları kontrol grubuna kıyasla KAH grubunda önemli ölçüde yüksek bulunmamıştır. Ancak, diyabet frekansının KAH hastalarında kontrol grubundan daha yüksek olduğu bulunmuştur (26.5% ile 6.7%, $p=0.036$). Ayrıca, sol ventrikülün EF’nin KAH hastalarında daha düşük olduğu bulunmuştur.

Table 1: Demographics properties of patients in groups.

	Control group (n:30)	Significant CAD group (n:34)	p value
Age (years)	59.3 ± 10.0	64.2 ± 12.7	0.072
Female n (%)	15 (50)	10 (29.4)	0.071
Blood urea nitrogen (mg/dl)	19.3 ± 5.1	21.6 ± 6.5	0.118
Creatinine (mg/dl)	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.351
Diabetes mellitus n (%)	2 (6.7)	9 (26.5)	0.036
Hypertension n (%)	11 (36.7)	15 (44.1)	0.363
Smoking n (%)	7 (23.3)	12 (35.3)	0.221
Cholesterol (mg/dl)			
Total	198.1 ± 45.2	202.6 ± 53.2	0.718
LDL	132.1 ± 41.9	135.5 ± 46.4	0.765
HDL	38.9 ± 7.1	38.5 ± 7.1	0.857
Triglyceride (mg/dl)	157.6 ± 49.4	146.2 ± 63.7	0.433
LVSD (mm)	34.1 ± 6.2	35.0 ± 7.4	0.662
LVDd (mm)	51.3 ± 5.2	49.7 ± 6.5	0.369
LVEF (mm)	60.8 ± 10.6	50.6 ± 13.9	0.005

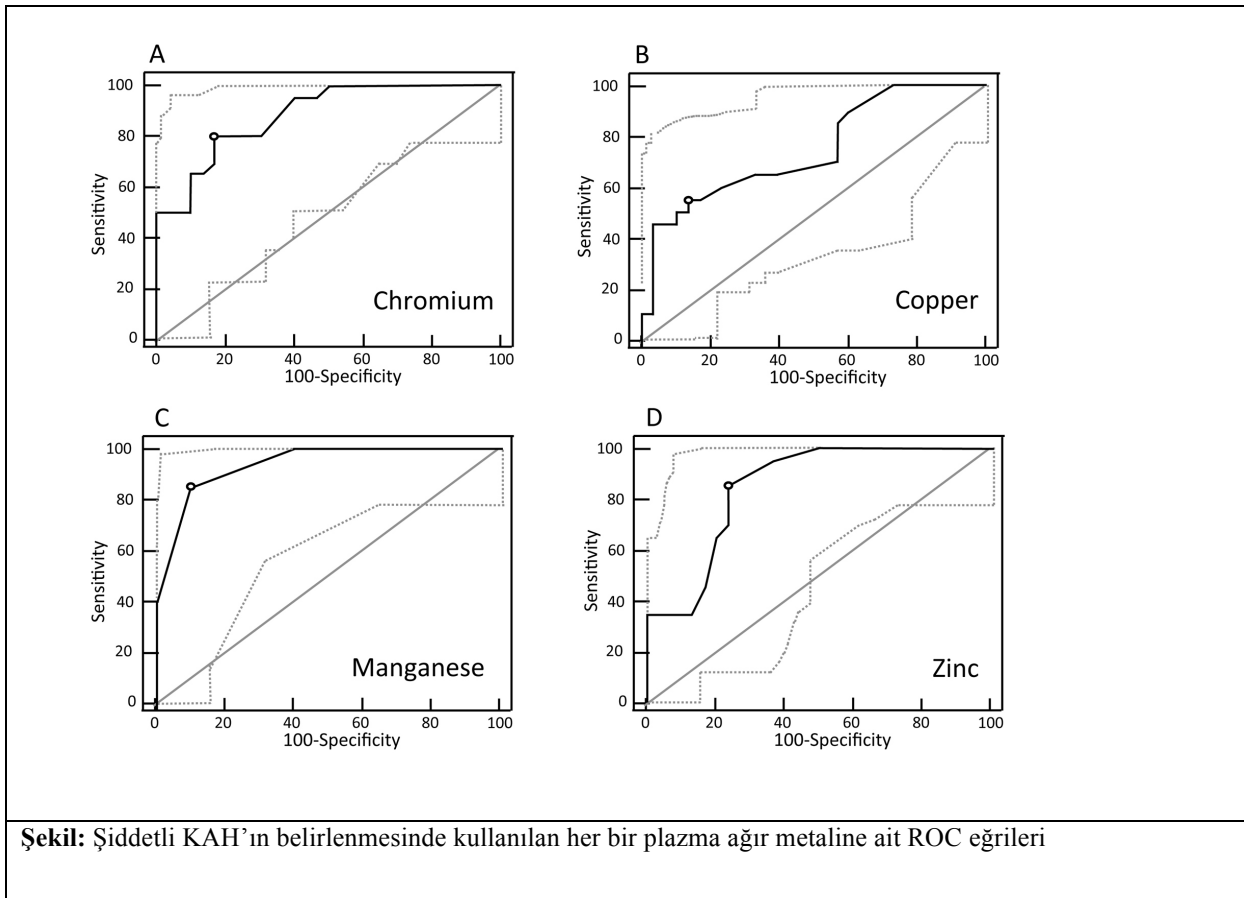
Data are expressed as mean±standard deviation or percentage. LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, LVSD: Left ventricular end-diastolic dimension, LVDd: Left ventricular end-diastolic dimension, LVEF: Left ventricular ejection fraction, $p<0.05$ is accepted as statistically significant

Saç ile plazmadaki Cr ($r=0.71$, $p<0.001$), Zn ($r=0.33$, $p=0.007$) ve Mn ($r=0.28$, $p=0.024$) seviyeleri arasında önemli bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Ancak, Cu saç ve plazma seviyeleri arasında böyle bir ilişki bulunmamıştır ($r=0.115$, $p=0.366$). Saç analizleri sonucunda, iki grubun Cr, Mn, Cu, veya Zn seviyeleri arasında önemli farklılıklar olmadığı tespit edilmiştir. Fakat, bu elementlerin plazma seviyelerinin KAH hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. ($p<0.001$ her bir ağır metal için; Tablo 2).

Tablo 2: Saç ve plazmadaki Cr, Mn, Cu ve Zn seviyeleri.

	Kontrol grubu	KAH grubu	p değeri
	(n:30)	(n:34)	
Saç			
Krom	0.33 (0.08-0.69)	0.30 (0.18-0.61)	0.590
Bakır	0.002 (0.002-0.390)	0.002 (0.002-0.09)	0.233
Manganez	0.39 (0.12-0.62)	0.31 (0.19-0.74)	0.701
Çinko	107.3 ± 38.6	94.5 ± 34.8	0.168
Plazma			
Krom	0.870 (0.7-1.3)	2.1 (1.2-4.9)	<0.001
Bakır	84.3 ± 9.9	111.8 ± 27.7	<0.001
Manganez	8.5 ± 0.6	10.7 ± 1.5	<0.001
Çinko	66.9 ± 5.2	78.2 ± 15.9	<0.001

KAH'ın önem derecesini belirlemede plazma ağır metallerinin diyagnostik rolünü değerlendirmek için alıcı işletim karakteristik eğri analizi (ROC) yapılmıştır. Her bir plazma ağır metalinin ROC eğrisi şekil X'de gösterilmiştir. En yüksek AUC değeri Manganez için belirlenmiştir (AUC = 0.940, 95% CI: 0.885 – 0.995, $p < 0.001$). Dahası, Cr, Cu ve Zn için AUC verileri ile ilişkili p değerlerinin istatistiksel olarak önemli olduğu gösterilmiştir (Şekil). ROC eğrilerinin çift yönlü karşılaştırılması Mn'nin Cr ($p=0.04$) ve Cu ($p=0.05$)'dan daha üstün olduğunu göstermiştir. Mn ve Zn ROC eğrilerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı belirtilmiştir ($p=0.2$).



Plazma ağır metallerinin duyarlılık ve özgüllükleri ile PPV ve NPV değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir. En yüksek duyarlılık Mn ve Zn elementleri için belirlenmiştir. Mn için 9 $\mu\text{mol/L}$ referans değeri %85 duyarlılık ve %90 özgüllük oranı ile şiddetli KAH için prediktiftir. Cr, Cu ve Zn için ise referans değerleri sırasıyla 1.3, 95, ve 68'tir. Bütün modeller cinsiyet, yaş ve diyabete göre ayarlanmıştır.

Uyarlanmış univariate analizinde, plazma Cr (Exp (B) = 5.514, p = 0.004), Mn (Exp (B)= 7.519, p <0.001), Cu (Exp (B) = 1.078, p = 0.003), ve Zn (Exp (B)= 1.271, p = 0.005) ‘nun önemli derecede şiddetli KAH ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Multivariate analizde ise, sadece plazma Mn ve Zn seviyelerinin şiddetli KAH ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 4).

Table 3: Sensitivity, specificity, PPV and NPV of plasma heavy metals for significant CAD.

	AUC	%95CI	p value	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Chromium	0.884	0.795 - 0.973	<0.001	80	83.3	76.2	86.2
Copper	0.747	0.606 - 0.889	0.006	55	86.6	73.3	74.3
Manganese	0.940	0.885 - 0.995	<0.001	85	90	85	90
Zinc	0.851	0.747 - 0.955	<0.001	85	76.6	70.8	88.5

Cut of levels were 1.3 mg/l for Chromium, 95 mg/l for Copper, 9 mg/l for Manganese and 68 mg/l for Zinc. All models were adjusted for gender, age and diabetes. AUC: *Area under curve*, PPV: *positive predictive value*, NPV: *Negative predictive value*, p<0.05 is accepted as statistically significant

Table 4: Univariate and multivariate analysis for diagnosis of severe CAD.

Univariate analyze							Multivariate analyze		
Hair	Unadjusted			Adjusted			Exp (B)	%95CI	p
	Exp(B)	%95CI	p	Exp (B)	%95CI	p			
Cr	0.674	0.271-1.679	0.397	0.581	0.210-1.611	0.297			
Cu	0.288	0.060-1.384	0.120	0.319	0.065-1.562	0.158			
Mn	0.864	0.485-1.540	0.621	0.913	0.483-1.724	0.778			
Zn	0.990	0.977-1.004	0.169	0.988	0.973-1.004	0.151			
Plasma									
Cr	3.467	1.1446-8.313	0.005	5.514	1.718-17.696	0.004	15.233	2.888-80.348	0.001
Cu	1.059	1.025-1.094	0.001	1.078	1.026-1.132	0.003			
Mn	7.060	2.761-18.065	<0.001	7.519	2.691-21.010	<0.001			
Zn	1.354	1.150-1595	<0.001	1.271	1.076-1.502	0.005			
							1.658	1.114-2.468	0.013

p<0.05 is accepted as statistically significant. Cr: Chromium, Cu: Copper, Mn: Manganese, Zn: Zinc.

All models were adjusted for gender, age and diabetes.

TARTIşMA VE SONUÇ

Kardiyovasküler hastalıklarda ağır metallerin zararlı etkileri önceki çalışmalarda tanımlanmıştır. (7, 10) Ancak ciddi KAH hastalarının saç ve kan plazmasındaki ağır metal seviyelerinin önemi aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada biz KAH hastalarında saç ve kan plazmalarındaki ağır metal seviyelerini, yardımcı tanı yöntemleriyle araştırdık.

Geçmiş çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, başlangıçta eser elementlerin KAH olan hastalarda daha yüksek olacağını ve ağır metal seviyelerinin sınırlı diyagnostik role hizmet ettiği hipotezini varsaydık. Fakat beklenmedik şekilde sonuçlarımızın önemli klinik etkileri olduğuyla karşılaştık. Çalışmamız, plazmadaki ağır metal seviyelerinin, koroner darlık tanısında anlamlı bir öneme sahip olduğunu gösterdi. Plazmadaki Mn seviyesinin, KAH için potansiyel olarak önemli bir tanı aracı olarak hizmet verebileceği sonucuna ulaştık.

Düşük miktarda ağır metal seviyelerinin organizmanın sağığının devamlılığı için gerekli olmasına rağmen, yüksek metal seviyelerinin damar hastalıkları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7, 10, 11). Çok sayıda çalışma yukarıda belirtilen damar sistemi ve arterosklerozisde ağır metallerin rolü üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bazı çalışmalar arterosklerozis ve ağır metal seviyeleri arasında hiçbir ilişki bulamamasına rağmen (12, 13), bazı çalışmalar ağır metallerin, arterosklerotik süreç içinde olumsuz etkilere sahip olduğu sonucunu ileri sürmektedir (14, 15). Bununla beraber ağır metal ve koroner arterosklerozis arasındaki ilişki nispeten düşük ve sonuçlar tutarsız olmuştur. Ayrıca ciddi KAH hastalarında bir tanı aracı olarak ağır metal seviyelerinin incelenmesi üzerine literatürde hiçbir veri yoktur.

Mn ‘ in insan vücudu için gerekli bir eser element olduğu bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda, Manthey J ve ark. plazma Mn seviyelerinin orta dereceli KAH ve kontrol gruplarında benzer, ancak şiddetli KAH hastalarında kontrol ve orta dereceli KAH hastalarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (16) Bununla beraber KAH hastalarındaki Mn seviyeleri hakkında mevcut literatürde yeterli veri yoktur. Bizim çalışmamızda şiddetli KAH hastalarında plazma Mn seviyeleri kontrollere göre önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubumuzu normal koroner arter veya anlamsız koroner darlığı olan hastalar oluşturmuştur. Sonuç olarak elde edilen veriler Manthey J. ve ark. tarafından yapılan çalışmayla tutarlı bulunmuştur. Şiddetli KAH ve Mn seviyeleri arasındaki ilişkinin kuvvetli olması KAH için bir tanı yöntemi olabileceğini düşündürmektedir. ROC eğrisi analizinde, serum Mn seviyelerinin KAH tanısı için % 85 duyarlı ve % 90 özgül olduğunu göstermiştir.

Ayrıca plazma Mn seviyelerinin şiddetli KAH hastaları için bağımsız ve güçlü bir belirleyicisi olduğu bulunmuştur. Ancak şiddetli KAH ve yüksek seviyedeki Mn arasındaki ilişkinin ardında yatan mekanizmalar hala belirsizdir. Bu mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Manganez; glutamine sentetaz, arginaz ve Mn superoksit dismutaz gibi çok sayıda ve belirgin enzimatik reaksiyonlarda, enzimler için önemli katalitik kofaktördür. Mn, arjinaz reaksiyonlarında arjinin inhibisyonunu katalizlemek için arjinazın NOS sentazla ikame edilmesiyle nitrik oksit düzeylerinde artışa sebep olduğu bilinmektedir. (17, 20) Arjinaz inhibisyonuna neden olan NO konsantrasyonunun artışı, miyokardial infarktüs boyutunu azaltmaktadır (18). NO konsantrasyonunun azalıp arjinazın artışı şiddetli KAH hastalarında Mn seviyelerinin artması spekülasyonuna yol açabilir. Nitrik oksitin anti-arterosklerotik etkilere sahip olduğu bilindiğinden (21), KAH hastalarında NO ve Mn arasındaki ilişkinin önemlidir ve araştırılması gerekmektedir.

Cu ve Cr seviyeleri ile kardiyovasküler hastalık arasında ki ilişkide veriler çelişkili yada yetersizdir. Salonen JT ve arkadaşları şiddetli risk grubundaki miyokart enfarktüs 1,666 erkek arasından rastgele seçilenlerin serum Cu konsantrasyonları ile ilişkili olup olmadığını araştırdılar (7). Yazarlar tarafından bakır serum konsantrasyonlarında ki yükselmenin iskemik kalp hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu bulundu (4.0-fold, $p < 0.01$). Buna ek olarak yüksek serum Cu konsantrasyonlarına sahip hastalarda aşırı oranda karotis ateroskleroz ilerlemesi belirlendi (22). Bilgilerimize göre literatürde Cr ve koroner ateroskleroz ile ilişkili herhangi bir veri yoktur. Çalışmamızda KAH olan hastalarda serum Cu ve Cr seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulundu. Ancak Cu ve Cr'nin plazmaya tanımsal faydası sınırlıdır. Çok değişkenli analizde serum Cu seviyeleri anlamlı KAH tahmin edememiştir. Verilerimiz bu plazmanın Cu ve Cr seviyelerinin anlamlı bir KAH tespiti için sınırlı bir katkısı olabileceğini gösterdi. Yine de, daha büyük ölçekli çalışmaların ciddi KAH tanısında Cu ve Cr'nin katkısının değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Serum Zn düzeyleri ile KAH arasındaki ilişkiyi ilgilendiren sonuçlar tutarsız olmuştur. Bazı yazarlar hiçbir ilişkisi tespit edemezken, diğerleri negatif bir ilişki bildirilmiştir (23,24). Giannoglou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada serum Zn düzeyleri ve koroner ateroskleroz yaygınlığı ve şiddeti arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (23). Ancak, idrar Zn kaybı KAH şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. Otopsi çalışmasında (5), Mendes ve arkadaşlarının tarafından 35 ve 65 yaş arası hastalarda aort fibröz plak Zn düzeyleri ölçüldü. Onlar, fibröz plaklarının normal

aortik dokular ile karşılaştırıldığında Zn elementinin seviyesinin daha yüksek olduğunu buldular ($p < 0.001$). Çalışmamızda Zn plazma seviyesinin, fakat saçta değil, kontrol grubuna göre anlamlı KAH olan hastalara göre önemli derecede yüksek bulduk. Ayrıca, çok değişkenli analizler plazma Zn düzeyleri anlamlı KAH için bağımsız belirleyiciler olduğunu gösterdi (risk oranı: 1.658, $p=0.013$). Literatürde çelişkili sonuçlar olmasına rağmen, bizim sonuçlarımız plazma Zn düzeyleri şiddetli koroner arter hastalığını tespiti için yararlı ve verimli bir belirteci olarak hizmet edebilir olduğunu göstermektedir. Saç analizi vücuttaki ağır metal konsantrasyonlarının tespit edilmesinde kolay ve basit bir yöntemidir. Ağır metal seviyelerinin saç analizi daha önceki çalışmalarda yapıldı (25-27) ki bu saçın ağır metal seviyeleri farklı kronik düzensizlik ve hastalıklarla ilişkili olabileceğini gösterdi. Şimdiki çalışmamızda saç analizinin anlamlı KAH için etkili tanısal bir araç olup olmadığını da test ettik. Ancak saçın Cu, Cr, Mn, ve Zn seviyeleri belirgin ve belirgin olmayan koroner stenoz hastalarında aynı olduğunu tespit ettik. Dolayısıyla sonuçlarımız ağır metal seviyelerinin ciddi KAH için destekleyici belirteç olmayacağını gösterdi.

Sonuç:

Mn, Cu, Zn ve Cr seviyeleri ciddi CAD hastalarıyla belirsiz koroner lezyon hastaları arasında plazmadaki belirgin farklılıklar olarak gözlemlendi. Temel mekanizmalar belirsiz olmakla birlikte, plazma ağır metal seviyesi ciddi koroner ateroskleroz ile ilişkilidir. Ayrıca sonuçlarımızda gösterdi ki plazma ağır metal seviyeleri KAH'ın tanımlanmasında ileride potansiyel kullanışlı belirteçler olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Xiu, Y.M., Trace elements in health and diseases. Biomed Environ Sci, 1996. 9(2-3): p. 130-6.
2. Alissa, E.M. and G.A. Ferns, Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. J Toxicol, 2011. 2011: p. 870125.
3. Brewer, G.J., Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. Chem Res Toxicol, 2010. 23(2): p. 319-26.
4. Falk, E., Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(8 Suppl): p. C7-12.
5. Mendis, S., Magnesium, zinc, and manganese in atherosclerosis of the aorta. Biol Trace Elem Res, 1989. 22(3): p. 251-6.
6. Alissa, E.M., et al., Trace element status in Saudi patients with established atherosclerosis. J Trace Elem Med Biol, 2006. 20(2): p. 105-14.
7. Salonen, J.T., et al., Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: a prospective population study in men in eastern Finland. Am J Epidemiol, 1991. 134(3): p. 268-76.
8. Agarwal, S., et al., Heavy metals and cardiovascular disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2006. Angiology, 2011. 62(5): p. 422-9.
9. Abou-Shady, E.A., et al., In vitro effects of trace elements on blood clotting and platelet function. A--Iron, copper, and gold. J Egypt Public Health Assoc, 1991. 66(1-2): p. 21-48.
10. Scanlon, P.J., et al., ACC/AHA guidelines for coronary angiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on Coronary Angiography). Developed in collaboration with the

Society for Cardiac Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 33(6): p. 1756-824.

11. Navas-Acien, A., et al., Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation*, 2004. 109(25): p. 3196-201.

12. Kosmala, W., et al., Relation between heavy metals and left ventricular diastolic function in patients with coronary artery disease. *Toxicol Mech Methods*, 2004. 14(3): p. 177-82.

13. Heinecke, J.W., H. Rosen, and A. Chait, Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest*, 1984. 74(5): p. 1890-4.

14. Thong, P.S., M. Selley, and F. Watt, Elemental changes in atherosclerotic lesions using nuclear microscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1996. 42(1): p. 103-10.

15. Ari, E., et al., The correlation of serum trace elements and heavy metals with carotid artery atherosclerosis in maintenance hemodialysis patients. *Biol Trace Elem Res*, 2011. 144(1-3): p. 351-9.

16. Mantney, J., et al., Magnesium and trace metals: risk factors for coronary heart disease? Association between blood levels and angiographic findings. *Circulation*, 1981. 64(4): p. 722-9.

17. Michalke, B., S. Halbach, and V. Nischwitz, Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. *J Environ Monit*, 2007. 9(7): p. 650-6.

18. Jung, C., et al., Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2010. 85(1): p. 147-54.

19. Chicoine, L.G., et al., Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(1): p. L60-8.

20. Klaassen, C.D., Biliary excretion of manganese in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1974. 29(3): p. 458-68.

21. Thakur, N.K., et al., Anti-atherosclerotic effect of beta-blocker with nitric oxide-releasing action on the severe atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002. 39(2): p. 298-309.
22. Salonen, J.T., et al., Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *BMJ*, 1991. 302(6779): p. 756-60.
23. Giannoglou, G.D., et al., Association of reduced zinc status with angiographically severe coronary atherosclerosis: a pilot study. *Angiology*, 2010. 61(5): p. 449-55.
24. Cebi, A., et al., Trace elements, heavy metals and vitamin levels in patients with coronary artery disease. *Int J Med Sci*, 2011. 8(6): p. 456-60.
25. Soininen, L., H. Mussalo-Rauhamaa, and J. Lehto, Hair chromium concentration of northern Finns. *Int J Circumpolar Health*, 2003. 62(3): p. 276-83.
26. Yoshinaga, J., et al., Lack of significantly positive correlations between elemental concentrations in hair and in organs. *Sci Total Environ*, 1990. 99(1-2): p. 125-35.
27. Leung, P.L., et al., Hair concentrations of calcium, iron, and zinc in pregnant women and effects of supplementation. *Biol Trace Elem Res*, 1999. 69(3): p. 269-82.