

GRZEGORZ MIELCARZ, WACŁAW MAJEWSKI*, JERZY PATELSKI,
WIESŁAW URYSZEK**

WAPŃ, MAGNEZ, MIEDŹ I CYNK W SUROWICY KRWI MĘŻCZYZN Z MIAŻDŻYCĄ TĘTNIC UDOWYCH

CALCIUM, MAGNESIUM, COPPER AND ZINC IN BLOOD SERUM
IN MEN WITH FEMORAL ATHEROSCLEROSIS

Z Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. *J. Patelski*

*Z Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń Akademii Medycznej w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. *S. Zapalski*

**Z Katedry i Zakładu Fizjologii Akademii Medycznej w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. *J. Paluszak*

U mężczyzn z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych oznaczano Ca, Mg, Cu i Zn w surowicy krwi. Oceniono dwa sposoby przygotowania surowicy dla oznaczeń metodą płomieniowej spektroskopii absorpcyjnej. Poziom wszystkich oznaczanych pierwiastków w surowicy krwi chorych z miażdżycą był większy w grupie kontrolnej. Stężenie cholesterolu całkowitego było wyższe a HDL-cholesterolu niższe u chorych z miażdżycą. Wyniki LDL-cholesterolu nie różniły się od siebie.

Badania epidemiologiczne wskazują na duże znaczenie wapnia, magnezu, cynku i miedzi w patogenezie miażdżycy [4, 10, 3]. Już w 1975 *Klevay* postulował tzw. „cynk-miedź hipotezę” [7]. Zgodnie z tą hipotezą wysoki poziom spożycia cynku obniża ogólny stan miedzi w całym organizmie. Konsekwencją tak spowodowanego deficytu jest niedokrwienna choroba serca [8, 9]. Podjęte w następnych latach badania zdają się potwierdzać tę hipotezę [1]. *Spencer* [17] znalazł bezpośredni związek między współczynnikiem Cu/Zn w organizmie a przyczyną śmierci z powodu miażdżycy naczyń wieńcowych. *Albers* i *Houtman* [1] wykazali związek pomiędzy miażdżycą tętnic wieńcowych a niskim poziomem miedzi w wątrobie i sercu u ludzi w badaniach sekcyjnych. Suboptymalne poziomy miedzi i cynku mogą powodować obniżenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej, enzymu chroniącego ścianę tętniczą przed skutkami uszkodzeń błony lipidowej wywołanymi wolnymi rodnikami [13, 16]. W przebiegu miażdżycy obecne w surowicy ortofosforany wapnia mogą tworzyć w złogach miażdżycowych podwójne lub potrójne apatyty z innymi metalami np. magnezem [18]. Zwapnienie części wewnętrznych tętnic jest skorelowane z patologicznym procesem wymagającym rozrostu tkanki łącznej i osadzenia lipidów [10]. Terapeutyczną rolę magnezu jako antagonisty wapnia potwierdzono w badaniach

sekcyjnych u ludzi zmarłych z powodu zawału serca stwierdzając 10% wzrost stężenia wapnia wraz z 20% zmniejszeniem stężenia magnezu w mięśniu sercowym [4, 6]. Niedobór magnezu w organizmie związany jest ze wzrostem triglicerydów i LDL-cholesterolu oraz zmniejszeniem frakcji HDL-cholesterolu [6]. Wśród metod oznaczania metali w surowicy krwi atomowa spektrometria absorpcyjna (ASA) wyróżnia się jako metoda wymagająca niewielkiej ilości próbki oraz krótkiego czasu analizy. Jednakże, sposób wstępnego przygotowania próbki do analizy może mieć wpływ na wynik [14, 15]. W niniejszej pracy dokonano porównawczej oceny dwóch sposobów wstępnego przygotowania próbki surowicy: (I) przez rozcieńczenie wodą demineralizowaną z pominięciem wstępnego wytrącenia białka oraz (II) przez odbiałczenie 20% kwasem trójchlorooctowym (TCA).

Otrzymane wyniki poziomów wapnia, magnezu, miedzi i cynku w surowicy krwi u chorych z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych porównano z oznaczeniami cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji HDL i LDL.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniami objęto 37 mężczyzn w wieku 38–67 lat z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych. Grupę kontrolną stanowiło 20 krwiodawców, mężczyzn w wieku 38–58 lat. Krew pobrano z żyły łokciowej na czczo. Otrzymaną surowicę (I) rozcieńczano wodą demineralizowaną w proporcjach 1+1, 1+2, 1+3, 1+4 i 1+5 dla oznaczeń miedzi i cynku (roztwory standardowe zawierały 5% glicerol w celu zniwelowania różnic w lepkości roztworów standardowych i surowicy). Dla oznaczeń wapnia i magnezu surowicę rozcieńczano: 1+62, 1+93, 1+124, 1+155 i 1+186.

Rozcieńczone roztwory podawano bezpośrednio do płomienia palnika aparatu.

Drugi sposób (II) polegał na odbiałczeniu surowicy 20% roztworem kwasu trójchlorooctowego (TCA) przy zachowaniu tych samych rozcieńczeń jak w sposobie pierwszym.

Jako wzorca materiałowego dla oznaczeń Ca, Mg, Zn, i Cu w surowicy krwi stosowano Seronom Trace Elements (Nycomed Pharma As). Cholesterol całkowity, cholesterol frakcji HDL i LDL oznaczano z użyciem konwencjonalnych zestawów firmy *Boehringer*.

Oznaczenie pierwiastków przeprowadzono metodą płomieniowej spektroskopii atomowej z użyciem spektrofotometru *C. Zeiss* Jena dla oznaczeń wapnia i magnezu oraz *Perkin-Elmer 460* dla oznaczeń cynku i miedzi.

Dla oceny wyników stosowano testy porównania wariancji oraz średnich *t-Studenta* i *Cochrana-Coxa*. Przyjęto istotność różnic na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Tabela I przedstawia wyniki oznaczeń wapnia i magnezu uzyskane przy różnych rozcieńczeniach surowicy (I). W przypadku wapnia nie stwierdzono różnic stężeń w zakresie stosowanych rozcieńczeń, natomiast średnie stężenie magnezu było obniżone przy niższych rozcieńczeniach. Najniższe współczynniki zmienności charakteryzujące rozrzut wyników wynosiły 1,1% dla wapnia przy rozcieńczeniu 1+93 oraz 2,8% dla magnezu przy rozcieńczeniu 1+62. Przyjęto rozcieńczenie 1+62 jako optymalne dla oznaczeń wapnia i magnezu w metodzie (I).

Tabela II przedstawia porównawcze wyniki oznaczania wapnia i magnezu w zależności od (I) rozcieńczenia wodą i (II) odbiałczenia surowicy. Przy braku różnic

Tabela I. Stężenia wapnia i magnezu w zależności od rozcieńczenia surowicy (I).
Concentration of calcium and magnesium dependent od serum dilution (I).

Grupa	Rozcień- czenie	Ca			Mg		
		Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-4}$)	Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-4}$)
1	1+62	2,59±0,07	2,8	49	0,82±0,02	2,8	5
2	1+93	2,63±0,03	1,1	9*	0,88±0,01	5,5	1*
3	1+124	2,46±0,08	3,1	59	0,94±0,05*	5,0	22*
4	1+155	2,65±0,31	11,9	961*	0,94±0,09*	9,7	81*
5	1+186	2,62±0,26	9,9	673*	0,89±0,05*	5,5	23*

Średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

* Średnie i wariancje zostały porównane statystycznie w grupach rozcieńczeń 2-5 z odpowiednimi rozcieńczeniami grupy 1. Wartości różniące się znamienne zaznaczone są przez * $p < 0,05$.

Tabela II. Porównanie wyników oznaczeń wapnia i magnezu w zależności od rozcieńczenia wodą demineralizowaną (I) i odbiałczenia 20% TCA (II).
Comparison of calcium and magnesium results dependent on water dilution (I) or deproteinization 20% TCA (II).

Grupa	Rozcień- czenie	Ca			Mg		
		Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-4}$)	Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-4}$)
I	1+62	2,59±0,07	2,8	49	0,82±0,02	2,8	5
II	1+62	2,55±0,19	7,5	361*	0,85±0,07	7,9	45*

Objaśnienia jak pod tabelą I.

w średnich stężeniach każdego z pierwiastków współczynniki zmienności były znamienne niższe w metodzie I.

Dla oznaczeń miedzi i cynku (I) najniższe współczynniki zmienności 1,0% i 4,3% uzyskano dla rozcieńczenia 1+3 i rozcieńczenie to przyjęto jako optymalne (tabela III).

Porównawcze oznaczenia miedzi i cynku w zależności od (I) i (II) sposobu postępowania, wskazują na zawyżenie średnich i duży rozrzut wyników w sposobie (II) Chorzy z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych posiadali znamienne podwyższony poziom cholesterolu całkowitego oraz obniżony cholesterol frakcji HDL. Nie stwierdzono różnic we frakcji LDL-cholesterolu.

Tabela V przedstawia stężenia Ca, Mg, Cu i Zn w surowicy krwi dla grupy kontrolnej i mężczyzn z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych. Stwierdzono podwyższenie poziomów wszystkich badanych mikro- i makroelementów w surowicy chorych w porównaniu z grupą kontrolną.

Pierwiastki śladowe związane są w surowicy z fazą aktywną białka jako formą transportową, a zatem poziom ich ulegać może znacznym wahaniom. Możliwe jest, że wyższe stężenie miedzi w surowicy odzwierciedla przejście miedzi z tkanek do

Tabela III. Stężenia miedzi i cynku w zależności od rozcieńczenia surowicy.
Concentration of copper and zinc dependent on serum dilution.

Grupa	Rozcień- czenie	Cu			Zn		
		Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-2}$)	Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-2}$)
1	1+1	14,79±0,96	6,0	92	13,46±1,07	7,6	114
2	1+2	15,11±0,31	1,7	9*	15,29±0,76*	4,7	58
3	1+3	16,37±0,16*	1,0	2*	14,38±0,61*	4,3	37
4	1+4	16,68±0,63*	4,1	40	14,53±1,22*	8,1	149
5	1+5	16,52±1,10*	6,6	121	13,00±0,76	5,9	58

Objaśnienia jak pod tabelą I.

Tabela IV. Porównanie wyników oznaczeń miedzi i cynku w zależności od rozcieńczenia wodą demineralizowaną (I) i odbiałczenia 20% TCA (II).
Comparison of copper and zinc results dependent on water dilution (I) or deproteinization 20% TCA (II).

Grupa	Rozcień- czenie	Cu			Zn		
		Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-2}$)	Stężenie (mmol/l)	Współczynnik wariancji (%)	Wariancja ($\times 10^{-2}$)
I	1+3	16,37±0,16	1,0	2	14,38±0,61	4,3	37
II	1+3	27,86±4,88*	17,4	2380*	37,32±16,52	31,4	27285*

Objaśnienia jak pod tabelą I.

ceruloplazminy jako reakcja fazy ostrej białka. Nie można zatem w sposób jednoznaczny wykluczyć ich ewentualnego deficytu w całym organizmie na podstawie poziomu ich stężenia w surowicy [5, 12]. Z drugiej jednak strony różnice w stężeniach magnezu, wapnia, miedzi i cynku w surowicy krwi mogą wskazywać na możliwy wpływ tych pierwiastków na zaburzenia cholesterolu całkowitego i frakcji HDL w przebiegu miażdżycy tętnic udowych.

WNIOSKI

1. Stosowanie sposobu (I) bezpośredniego rozcieńczenia surowicy wodą nie tylko zwiększa dokładność i poprawność oznaczeń, ale również skraca i upraszcza tok wstępnego przygotowania próbek surowicy.

2. U chorych z zaawansowaną miażdżycą tętnic udowych stwierdzono statystycznie znamienne podwyższone poziomy wszystkich badanych mikro- i makroelementów w porównaniu z grupą kontrolną.

3. Stężenia cholesterolu całkowitego były wyższe a cholesterolu frakcji HDL niższe u chorych z miażdżycą w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki frakcji LDL cholesterolu nie różniły się od siebie znamienne.

Tabela V. Stężenia Ca, Mg, Zn, Cu i cholesterolu w surowicy krwi mężczyzn z miażdżycą tętnic udowych i w grupie kontrolnej.
Concentration of Ca, Mg, Zn, Cu and cholesterol in blood serum men with femoral atherosclerosis and control group.

Grupa	Liczba	Wiek	Ca mmol/l	Mg mmol/l	Zn mmol/l	Cu mmol/l	T-chol mmol/l	HDL-chol mmol/l	LDL-chol mmol/l
Kontrolna	20	38–58	2,56 ± 0,17	0,86 ± 0,13	16,67 ± 3,98	16,84 ± 2,52	4,86 ± 1,03	1,08 ± 0,34	3,05 ± 1,11
Miażdżycza	37	38–67	2,97 ± 0,51*	0,96 ± 0,09*	22,79 ± 6,42*	19,51 ± 3,15*	5,95 ± 1,11*	0,85 ± 0,21*	3,23 ± 1,16

Średnia ± odchylenie standardowe

Mean ± SD

* = p < 0.05

G. Mielcarz, W. Majewski, J. Patelski, W. Uryszek

CALCIUM, MAGNESIUM, COPPER AND ZINC IN BLOOD SERUM IN MEN WITH FEMORAL ATHEROSCLEROSIS

Summary

Calcium, magnesium, copper and zinc were determined in serum in men with femoral atherosclerosis. Also total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol were estimated. Subjects in control group were in the same range of age. The present study compares two methods of preparing serum for the flame atomic absorption spectrometry. In the first method (I), serum was diluted by the demineralized water. In the second method (II), serum protein was precipitated by trichloroacetic acid (TCA). We found that the first method (I) was simpler and more precise than the other. The optimal proportions of serum and water amounted to 1+62 for calcium and magnesium and the coefficient of variation (C.V.) was 2.8%. For copper and zinc, the optimal dilution was 1+3 (C.V. = 1%). Total cholesterol was significantly higher ($p < 0.05$) and HDL-cholesterol was lower ($p < 0.05$) in subjects with femoral atherosclerosis as compared with controls. There was no difference in LDL-cholesterol. Subjects with femoral atherosclerosis had significantly higher level of all micro- and macroelements determined, then those of the control group ($p < 0.05$).

However, higher serum copper does not necessary mean higher copper body status. It is possible that higher serum copper in femoral atherosclerosis reflects the transfer of copper from the tissue to the ceruloplasmin, as an acute phase reaction. On the other hand, the differences in serum magnesium, calcium, copper and zinc concentrations, may indicate the possible involvement of these elements in the disorder of total and HDL-cholesterol in femoral atherosclerosis.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aalbers Th.G., Houtman J.P.W.*: Relationships between trace elements and atherosclerosis. *Sci. Tot. Envir.*, 1985, 43, 255. – 2. *Blake D.R., Allen R.E., Lunec J.*: Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.*, 1987, 43, 371. – 3. *Butsamante J.B., Martin Mateo M.C., Fernandez J., de Quiros B., Ortiz M.O.*: Zinc, copper and ceruloplasmin in atherosclerosis. *Biomedicine*, 1976, 25, 244. – 4. *Ito M., Sekine I., Kummerow F.A.*: Dietary magnesium effect on swine coronary atherosclerosis induced by hypervitaminosis D. *Acta Pathol. Jpn.*, 1987, 37(6), 955. – 5. *Howard A.N., Mielcarz G., Mielcarz B., Williams N.R., Kinsman G.D., Moriguchi Y., Mizushima S., Nara Y., Yamori Y.*: Optional CARDIAC study on trace elements – Low copper status as a risk factor in atherosclerosis and ischemic heart disease mortality. *Can. J. Cardiol.*, 1993, 9 (suppl. D), 38D. – 6. *Kittel M.*: Rola magnezu w organizmie. *P.T.L.*, 1988, 25, 822. – 7. *Klevay L.M.*: Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis. *Am. J. Nutr.*, 1975, 28, 764. – 8. *Klevay L.M.*: Ischemic heart disease versus copper deficiency. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1989, 258, 764. – 9. *Klevay L.M.*: Ischemic heart disease: nutrition or pharmacotherapy. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1993, 7, 63. 10. *Mc Grath L.T., Elliott R.J.*: Calcium accumulation in the human aorta: age and disease patterns. *Biochem. Soc. transactions*, 1987, 15, 284. –

11. *Mielcarz G.W., Howard A.N., Williams N.R., Kinsman G.D., Mielcarz B., Moriguchi E., Moriguchi Y., Mizushima S., Nara Y., Yamori Y.*: Copper and zinc status in three countries with different cardiovascular disease mortality. *Trace Elements in Man and Animals – TEMA 8*, Verlag Media Touristic, Jena, Aberdeen, 1993, 1026. – 12. *Mielcarz G., Howard A.N., Williams N.R., Mielcarz B., Mizushima S., Yamori Y., Moriguchi E.*: Zinc and copper in cardiovascular Disease. *Smith and Gordon Company Ltd.*, London, 1993, chapter 12. – 13. *Morin C.L., Allem K.G., Mathias M.M.*: Thromboxane production in copper deficient and marginal platelets: influence of superoxide dis-

mutase and lipid hydroperoxides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1993, 202 (2), 167. – 14. *Narayanan S., Lin F.C., Walder H.J.*: Sampling consideration in trace element analyses. *Acta Pharm. et Toxicologica*, 1986, 59 (suppl. 7), 598. – 15. *Pinta M.*: Absorpcyjna spektrometria atomowa. PWN, Warszawa, 1977. – 16. *Rayssingier Y., Gueux E., Bussiere L., Mazur A.*: Copper deficiency increases the susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *J. Nutr.*, 1993, 123 (8), 1343. – 17. *Spencer J.C.*: Direct relationship between the body's copper/zinc ratio, ventricular premature beats and sudden coronary death. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1979, 57, 1184. – 18. *Tomazic B.B., Etz E.S., Brown W.E.*: Nature and properties of cardiovascular deposits. *Scanning Microsc.*, 1987, 1(1), 95.

Dn. 1994.06.08

61-052 Poznań, ul. Mogileńska 7.