

Araştırma

Lipoprotein İlişkili Fosfolipaz A2'nin Mesleki Kurşun Maruziyetinde Potansiyel Bir Kardiyak Belirteç Olarak Değerlendirilmesi

The Evaluation of Lipoprotein Related Phospholipase A2 as a Target of Therapy in Occupational Lead Exposure

Hinç YILMAZ¹, Engin TUTKUN¹, Fatma Meriç YILMAZ^{2,3}, Kübranur KARATOPRAK³, Halil KARA⁴, Bekir KESKİNKILIÇ⁵

¹Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi

²Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

³Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Kliniği

⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

⁵Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Geliş Tarihi: 06.12.2012, Kabul Tarihi:19.02.2013

Özet

Amaç. Kronik kurşun maruziyeti hastalarında kardiyovasküler hastalık riskinin arttığı bilinmekte, ancak mekanizması konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Yapılan çalışmada amaç, risk faktörü olarak önerilen lipoprotein ve lipid parametreleri ile son yıllarda potansiyel yeni bir ateroskleroz belirteci olarak sunulan Lipoprotein İlişkili Fosfolipaz A2 nin (LP-PLA2) mesleki kurşun maruziyetinde kardiyak belirteç olarak değerlendirilmesidir. Materyal-Metod. Çalışmaya mesleki kurşun maruziyeti olan 24 işçi ve kurşun maruziyeti olabilecek bir işkolunda çalışmayan 24 sağlıklı birey dahil edilmiş; total, HDL, LDL, non-HDL kolesterol, trigliserit düzeyleri çalışılarak plazma aterojenik indeksleri hesaplanmıştır. Ayrıca LP-PLA 2 seviyeleri belirlenerek gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışılan ve hesaplanan lipid parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. LP-PLA2 düzeyleri ise kurşun maruziyeti olan işçilerde kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. LP-PLA2 düzeyleri ile non-HDL kolesterol düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır.

Sonuç: LP-PLA2 kurşun maruziyetinin kardiyovasküler hastalığa yol açmasının mekanizmasının açıklanması adına önemli bir belirteç olabilir. Çalışma bulgularının klinik kohort çalışmalarla desteklenmesi, LP-PLA2 nin kurşun maruziyetinde tedavi hedefi olarak değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, mesleki maruziyet, ateroskleroz, LP-PLA2, Lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2

Abstract

Purpose: Cardiovascular risk is known to be increased in lead-exposed workers, but there is no consensus about its mechanism. In this study, our aim is to evaluate the efficiency of using the lipoprotein and lipid parameters, which have been proposed as a risk factor and lipoprotein associated Phospholipase A2, which has been proposed as a potential atherosclerosis biomarker in recent years, as cardiac biomarkers in occupational lead exposure.

Materials and Methods: Twenty-four workers, who have been exposed to lead occupationally and 24 healthy subjects were included in the study. Plasma atherogenic indexes were calculated with the analysis of the total HDL, LDL, non-HDL cholesterol, triglyceride. Groups were compared with the analysis of LP-PLA2.

Findings: No statistically significant differences between the lipid parameters have been found among the two groups. LP-PLA2 levels were found to be higher in lead exposed workers, statistically. There was a meaningful correlation between LP-PLA2 and non-HDL cholesterol levels.

Results: LP-PLA2 may be an important biomarker in the underlying mechanism of cardiovascular diseases related to lead exposure. Supporting the study data with clinical cohort studies will provide the chance of using LP-PLA2 as a target of therapy in lead toxicity.

Key Words: Lead, occupational exposure, atherosclerosis, LP-PLA2, lipoprotein associated phospholipase A2

Giriş

Kurşun (Pb), atom numarası 82 olan mavi-gümüş rengi karışımı bir elementtir. Kolay işlenebilen, yaygın bir metal olması, ergime derecesinin düşüklüğü ve korozyona dayanıklılığı nedeniyle endüstride yaygın olarak kullanılır.¹ Akü işçilerinde, plastik sanayi çalışanlarında, geri dönüşüm fabrikalarında, dökümhanelerde, boya fabrikalarında, madencilik faaliyetleri sırasında, atık işletmelerinde, kaynakçılık işinde çalışanlarda, kurşuna toplu maruziyetler konusunda birçok çalışma bulunmaktadır. Bu iş kollarının bazılarında kronik ve düşük seviyeli bir maruziyet söz konusu iken, özellikle akü fabrikalarında ve elektrik ark kaynaklı baca tozlarından metal dönüşümü yapan işletmelerde, iş sağlığı ve güvenliği önlemleri alınmadığı takdirde, toksik düzeylere ulaşan maruziyetlerle karşılaşmak mümkündür.² Kurşunun geri dönüşümsüz özelliği, doğada uzun süre kalmasına neden olur ve yaygın endüstriyel kullanımı, potent bir maruziyet ajanı oluşuna katkıda bulunur.

Kurşun maruziyetinin reaktif oksijen radikali (ROS) oluşumunu arttırdığı³ ve antioksidan enzim düzeylerinin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir.⁴ Kurşunun, bu iki mekanizma ile oksidan-antioksidan dengesini bozarak oksidatif stresi arttırması, toksik etkilerinden sorumlu olabilecek mekanizmalardan birini oluşturmaktadır.

Kronik kurşun maruziyeti ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik koroner kalp hastalığı, serebrovasküler olay ve periferik vasküler hastalıkla ilişkilendirilmektedir.^{5,6} Aterosklerozun patogenezinde oksidatif stresin katkısı bilinmektedir ve düşük doz kurşun maruziyetinin ROS oluşumu yolu ile oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir.³ Yapılan bir deneysel hayvan çalışmasında kurşunun düz kas hücreleri ve fibroblastların proliferasyonuna yol açtığı, hasarlanmış endotel tabakasının tamirini inhibe ettiği ve bu şekilde ateroskleroza yol açtığı bildirilmiştir.⁷ Kurşunun ateroskleroz ve hipertansiyon ile ilişkisinin doza ve maruziyet süresine bağlı olduğu kabul edilmektedir.⁸

Kardiyovasküler risk değerlendirmesinde yeni biyomarkerlar geliştirilmesi yönündeki çalışmalar, halen devam etmektedir ve lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2 (Lp-PLA2) koroner hastalıklarla ilişkisi nedeniyle potansiyel bir kardiyovasküler risk göstergesi olarak sunulmaktadır.^{9,12} Lp-PLA2, temel olarak monosit ve makrofajlardan üretilen bir enzimdir. Biyoaktif lipidleri hidrolize ettiğinde oluşan temel metaboliti lizofosfolipidlerdir. Farklı lizofosfolipid türleri olmakla

birlikte oluşan temel ürün lizofosfatidilkolindir.^{13,15} Lizofosfatidilkolin gibi proinflatuar ve proaterojenik ürünler ve LDL oksidasyonu, ateroskleroz gelişiminde önemli bir aşamadır.^{16,18}

Bu çalışmanın amacı mesleki kurşun maruziyeti bulunan hastalarda Lp-PLA2 düzeylerinin maruziyet bulunmayan bireylerle karşılaştırılması ve potansiyel bir kardiyak belirteç olarak kurşun maruziyetinde kullanımının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Dahil Edilen Bireyler

Çalışmaya, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine periyodik muayene için başvuran ve mesleki kurşun maruziyeti hikayesi bulunan 24 işçi maruziyet grubu olarak dahil edildi. Maruziyet grubundan 14 işçi akü fabrikasında ortalama 7.3 yıldır çalışırken 10 işçi döküm atölyesinde ortalama 5.5 yıldır çalışmakta idi. Yaş ortalaması 39±9 yıl; ortalama kan kurşun düzeyleri ise 37.1±15.5 µg/dl düzeyindeydi. Meslek grubu olarak kurşun maruziyeti ile ilişkili bir işkolunda çalışmayan, herhangi bir kronik hastalık hikayesi bulunmayan yaş ve cinsiyet dağılımı benzer 24 birey çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edildi (yaş ortalaması 38±8 yıl). Çalışmaya katılan hastalardan onam formu ve çalışma için Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan onay alındı. Kan örnekleri pıhtı aktivatörlü jelli biyokimya tüplerine alındıktan ve pıhtılaşma tamamlandıktan sonra 10 dakika 1300 g'de santrifüj edildi ve serumları ayrılarak çalışma gününe kadar -80 CO de muhafaza edildi. Tüm parametreler aynı gün analiz edildi.

Metodlar

Örnekler en az 12 saatlik açlığı takiben toplandı. Lp-PLA2, total kolesterol, HDL kolesterol ve trigliserit analizleri Roche Moduler PP analizöründe orijinal kitler kullanılarak gerçekleştirildi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). LDL kolesterol düzeyleri Friedewald formülü kullanılarak hesaplandı.¹⁹ Plazma aterojenik indeksi log (TG/HDL-C) formülü ile elde edildi. Trigliserit düzeyi 400 mg/dL'nin üzerinde olan bireylerde direk LDL kiti kullanılarak ölçüm yapıldı. Non HDL değeri total Kolesterol ile trigliserit arasındaki fark alınarak hesaplandı.

İstatistik

Verilerin parametrik dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov analizi ile test edildikten sonra gruplar arasındaki farkın araştırılması için parametrik dağılılan testlerde

Student t, nonparametrik dağılan testlerde Mann-Whitney U analizi gerçekleştirildi. Parametreler arasındaki korelasyon Spearman analizi ile araştırıldı. Anlamlılık düzeyi P<0.05 olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler "The Statistical Package for Social Sciences for Windows" (SPSS v18) programında gerçekleştirildi.

Sonuçlar

Çalışılan parametrelerin gruplara göre karşılaştırılması ve istatistiksel önemi Tablo 1'de verilmektedir. Yapılan istatistiksel analizlerde, total kolesterol, trigliserit, LDL-HDL Kolesterol, non-HDL ve API indeksi açısından iki grup arasında anlamlı farka rastlanmazken LP-PLA2 değerleri işçi grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 1). LP-PLA2 gruplardaki dağılımı Şekil 1 'de gösterilmiştir. Yapılan korelasyon analizinin sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir. LP-PLA2 ile non-HDL değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunurken diğer parametrelerle LP-PLA2 düzeyleri arasında korelasyon bulunamamıştır.

Tartışma

Kardiyovasküler hastalıklar dünyada mortalitenin en önde gelen nedenidir.²⁰ Çevresel maruziyet düzeylerine karşılık gelen düşük konsantrasyonlarda dahi kurşuna maruziyetin kardiyovasküler istenmeyen etkileri bilinmektedir. Yapılan birçok epidemiyolojik çalışmada kronik düşük doz kurşun maruziyeti ile hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık ilişkisi gösterilmiştir.^{21,22} Ancak 100 yılı aşkındır süren çalışmalara rağmen kurşun maruziyetinin kardiyovasküler sonuçlarının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

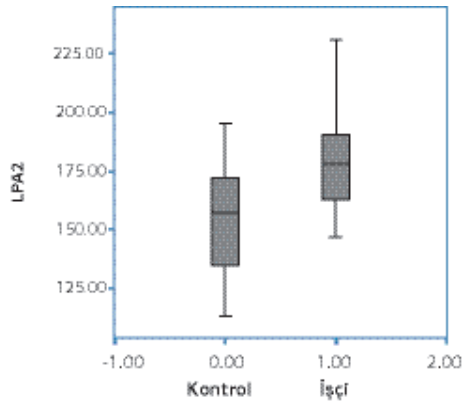
Olası mekanizmalardan biri, kurşunun kalbin otonomik kontrolü üzerindeki etkileridir. Deneysel çalışmalar; kurşunun, glutasyon ve protein bağlayıcı sülfidril gruplarında azalmaya yol açarak serbest oksijen radikallerinde artışa, dolayısıyla oksidatif strese yol açtığını; oksidatif stresin de proinflatuar mediatörler, nitrik oksitin baskılanması, lipid peroksidasyon artışı gibi etkilerle santral sempatik sinir aktivitesinde artış,

Tablo 1. Çalışılan parametrelerin gruplara göre karşılaştırılması

	Kontrol Grubu	İşçi Grubu	p
LP-PLA2 (nmol/min/ml)	155±23.4	178±35.5	0.01*
Total Kolesterol (mg/dL)	175±25.1	161±43.6	0.167
LDL Kolesterol (mg/dL)	93.0±30.8	87.9±34.6	0.597
Trigliserit (mg/dL)	159±66.4	129±62.2	0.11
HDL Kolesterol (mg/dL)	50.4±9.73	46.9±10.0	0.227
Non-HDL Kolesterol (mg/dL)	125±31.3	114±42.6	0.312
API	0.48±0.19	0.40±0.22	0.206

Tablo 2. Parametreler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik dereceleri

		LDL	TG	HDL	LPA2	NONHDL	API
TKOL	r	0.906	0.532	0.030	0.224	0.953	0.466
	p	0.000	0.000	0.839	0.127	0.000	0.001
LDL	r		0.288	-0.178	0.274	0.929	0.374
	p		0.047	0.225	0.060	0.000	0.009
TG	r			0.057	0.124	0.511	0.826
	p			0.702	0.400	0.000	0.000
HDL	r				-0.221	-0.237	-0.436
	p				0.131	0.104	0.002
LP-PLA2	r					0.287	0.261
	p					0.048	0.073
NONHDL	r						0.586
	p						0.000



Şekil 1. Kontrol ve İşçi grubunda LP-PLA2 dağılımları

baroreseptör duyarlılığı ve vagal sempatik tonusta azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur.^{23,24}

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda kurşun maruziyetinde, noradrenalin ve anjiotensin II'nin damar kasıcı etkilerine karşı damar yanıtının arttığı gösterilmiştir.²⁵ Bunun yanısıra, yine ratlarda, kurşunun, fosfolipaz A2 aracılığıyla, vasküler düz kas hücreleri tarafından araşidonik asidin in vitro salınımını arttırdığı gösterilmiştir.²⁶

Lp-PLA2, T lenfositler ve monosit-derive makrofajlardan aktif halde salınan bir enzimdir.²⁷ Biyoaktif lipidleri hidrolize eden Lp-PLA2 nin açığa çıkarttığı temel ürünler lizofosfolipidler ve okside olmuş non esterifiye serbest yağ asitleridir.^{28,29} Okside LDL nin ateroskleroz gelişimindeki rolü bilinen bir konudur ve bu mekanizma, Lp-PLA2 düzeyinin yüksekliği ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki korelasyonu açıklamaktadır.

Yüksek Lp-PLA2 düzeyi bulunan tavşanlarda koroner arter plak yükünün arttığı bildirilmiştir. Hiperlipidemik tavşanlarda Lp-PLA2 nin inhibisyonu ile aterosklerotik lezyonların gerilediğinin gösterilmesi de Lp-PLA2 nin ateroskleroz ile ilişkisini destekleyen bir bulgu olarak sunulmuştur.³⁰ Dolaşımdaki Lp-PLA2 konsantrasyonunun, koroner arter hastalığı varlığını öngördüğü ve endotel disfonksiyonu ve erken ateroskleroz ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir.³¹

Yaptığımız çalışmada, NCEP ATP III tarafından ateroskleroz tedavisinde hedef alınan LDL Kolesterol, Total Kolesterol ve non-HDL Kolesterol düzeyleri iki grup arasında anlamlı farklılık göstermezken, Lp-PLA2 düzeyleri kurşun maruziyeti olan işçilerde anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, kurşun maruziyeti bulunan hastalardaki artmış kardiyovasküler hastalık riskinin mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olabilir.

Çalışma verilerinin hastaların prospektif mortalite ve morbidite takiplerinin yapıldığı kohort çalışmaları desteklenmesi, Lp-PLA2 nin risk tahminindeki rolü ve tedavi hedefi olarak önemi konusunda önemli veriler sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Brannvall ML, Bindler R, Renberg I, Emteryd O, Bartnicki J, Billstrom K. The Medieval metal industry was the cradle of modern large scale atmospheric lead pollution in northern Europe. *Environ. Sci. Technol.* 1999; 33: 4391–5.
2. Were FH, Kamau GN, Shiundu PM, Wafula GA, Moturi CM. Air and blood lead levels in lead acid battery recycling and manufacturing plants in Kenya. *J Occup Environ Hyg* 2012; 9: 340-4.
3. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 529–39.
4. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol Med* 2000; 29: 927–45.
5. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 472–82.
6. Abadin H. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Toxicological Profile for Lead, Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 2007: 43–59.
7. Kaji T. Cell biology of heavy metal toxicity in vascular tissue. *Yakugaku Zasshi* 2004;124:113–20.
8. Goch A, Goch JH. Lead-induced pathomechanisms of hypertension. *Pol. Merkur. Lekarski.* 2005; 18: 351–3.
9. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Lipoprotein-associated phospholipase a2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the prove it-timi 22 (pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction) trial. *Circulation* 2006; 113:1745-52.
10. Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonksi KA, Rice MM, Solomon S, Rosenberg Y, Domanski MJ, Hsia J. Prognostic Utility of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 for Cardiovascular Outcomes in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc* 2007; 27: 2463-69.
11. Tsimikas S, Willeit J, Knoflach M, Mayr M, Egger G, Notdurfter M, Witztum JL, Wiedermann CJ, Xu Q, Kiechl S. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J* 2009; 30: 107-15.
12. Li N, Li S, Yu C, Gu S. Plasma Lp-PLA2 in acute coronary syndrome: association with major adverse cardiac events in a community-based cohort. *Postgrad Med* 2010; 122: 200-205.

13. Itabe H: Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998, 37: 181-207.
14. Steinbrecher UP, Pritchard PH: Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989; 30: 305-15.
15. Schmitz G, Ruebsaamen K: Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2010; 208: 10-8.
16. Caslake MJ, Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14: 347-352.
17. Tselepis AD, Chapman JM. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002; 3: 57-68.
18. Dada N, Kim NW, Wolfert RL. Lp-PLA2: an emerging biomarker of coronary heart disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002; 2: 17-22.
19. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge, *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
20. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747-57.
21. Nash D, Magder L, Lustberg M, Sherwin RW, Rubin RJ, Kaufmann RB, et al. Blood lead, blood pressure, and hypertension in perimenopausal and postmenopausal women. *JAMA* 2003; 289: 1523-32.
22. Cheng Y, Schwartz J, Vokonas PS, Weiss ST, Aro A, Hu H. Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (the Normative Aging Study). *Am J Cardiol* 1998; 82: 594-599.
23. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 927-45.
24. Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens* 2000; 13: 552-5.
25. Iannaccone A, Carmignani M, Boscolo P. Neurogenic and humoral mechanisms in arterial hypertension of chronically lead exposed rats. *Med. Lav.* 1: 13-21 (1981)
26. Dorman RV, Freeman EJ. Lead-dependent effects on arachidonic acid accumulation and the proliferation of vascular smooth muscle. *J Biochem Mol Toxicol* 2002; 16 : 245-53.
27. McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res* 2009; 50:255-259
28. Telis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791;327-338.
29. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:923-931.
30. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2909-17.
31. Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, Prasad. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2007; 115: 2715-21.