



VARİKÖZ VEN HASTALARINDA DOKU ESER ELEMENT DÜZEYLERİNİN ATOMİK ABSORBSİYON SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNİ

Determination of Tissue Trace Element Levels with Atomic Absorption Spectrometry in Varicose Vein Patients

Devrim SARIBAL¹ , Eyüp Murat KANBER²

¹Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye.

Öz

Amaç: Günümüzde venöz yetmezlik hala ciddi bir klinik problemdir. Etiyolojisinin kesin nedeni ve moleküler mekanizmaları hala bilinmemekle beraber mekanik ve intrinsik faktörlerin varlığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmada, alt ekstremitte varisleri olan hastaların ven dokularında, antioksidan enzimlerin yapısında kofaktör olarak görev yaparak, organizmanın oksidan/antioksidan dengesine katkı sağlayan eser elementlerden Zn, Cu ve Fe'in düzeylerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar ile elementlerin düzeyindeki değişikliklerin venöz yetmezliğin gelişimi ve/ve ya ilerlemesinde oynadığı rolü açıklamaya çalıştık.

Materyal ve Metot: Çalışmamız alt ekstremitede primer varis tanısı nedeniyle opere edilecek 40 kişi ve koroner arter bypass greft operasyonu geçirecek 40 kişinin vena safena magna dokuları üzerinde gerçekleştirildi. Alınan ven doku örneklerinde eser elementlerden Zn, Cu ve Fe ölçümleri atomik absorpsiyon spektrometresi ile yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Zn düzeyleri çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük, Fe düzeyleri ise anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Cu düzeyleri çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek olmasına rağmen, bu fark anlamlı değildir. Çalışma grubunda, eser elementler açısından herhangi bir korelasyon gözlenmemiştir.

Sonuç: Variköz ven doku örneklerinde düşük saptanan Zn düzeylerinin azalmış antioksidan aktivite ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Artan Cu düzeyi ise, artmış kollajen ve elastin yapımı nedeni ile gerçekleşmiş olabilir. Çalışma grubunda dokularda artmış Fe birikiminin, hasarlı dokuya çökerek oksidatif stresi tetiklediğini de düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: variköz ven, eser element, demir, bakır, çinko.

Abstract

Aim: Currently, venous insufficiency is still a serious clinical problem. The exact cause and molecular mechanisms of the etiology are still unknown, but the presence of mechanical and intrinsic factors has been suggested. In this study, we examined (Zn, Cu and Fe) levels of trace elements contributing to the oxidant / antioxidant balance of the organism by acting as a cofactor in the structure of antioxidant enzymes in the veins of patients with lower extremity varices. With the results we obtained, we tried to explain the changes in the level of the elements in the development and / or progress of venous insufficiency.

Materials and Methods: Our study was carried out on 40 patients who underwent surgery for the diagnosis of primary varicose veins in the lower extremity and 40 patients who underwent coronary artery bypass graft surgery and on their vena safena magna tissues. Levels of Zn, Cu and Fe were measured with atomic absorption spectrometry in vein tissue samples.

Results: Zn levels were significantly lower in the study group whereas Fe levels were significantly higher in the study group compared to the control group. Although Cu levels were higher in the study group compared to the control group, this difference was not significant. In the study group, no correlation was observed in terms of trace element levels.

Conclusions: Low levels of Zn in tissue samples were thought to be associated with decreased antioxidant activity. Increased Cu level may be due to increased collagen and elastin production. We assume that increased Fe accumulation in tissues in the study group was triggered oxidative stress by adsorbing on the damaged tissue.

Key words: varicose vein, trace element, iron, copper, zinc.

GİRİŞ

Kronik venöz yetmezlik (KVY) ve buna bağlı olarak gelişen alt ekstremitte varisleri toplumda

oldukça sık rastlanan, yaşam kalitesini bozan ve tromboz, cilt değişiklikleri, bacak ülseri gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilen önemli bir sağlık

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Devrim Saribal
Adres: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yerleşkesi Kocamustafapaşa Caddesi No:53 Cerrahpaşa PK:34098 Fatih, İstanbul, Türkiye
E-posta: devrimsaribal@gmail.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 28.02.2019
Date Accepted / Kabul Tarihi: 21.03.2019

problemidir¹. Birçok çalışmada, venöz yetmezliğin toplumdaki prevalansı %20-40 arasında bulunmuştur^{2,3}. Alt ekstremitte primer varis patogenezi halen tartışılmakla beraber, oluşum mekanizması tam olarak tespit edilememiştir. Variköz venlerin gelişimini etkileyen birçok genetik, hormonal ve çevresel faktör vardır. Ana yıkıcı faktör, ven duvarlarının ve damar kapaklarının yapısında bozulmalara yol açabilecek venöz hipertansiyondur⁴. Damarlardaki uzun süreli yüksek basıncın matriks metalloproteinazlarını (MMP'ler) aktive edebileceği, pıhtılaşmayı başlatabileceği ve trombositleri, lökositleri ve makrofajları aktive edebileceği de düşünülmektedir. Matriks MMP'leri, hücre dışı matriksi tahrip ederek, düz kas hücrelerini etkiler ve endotel tabakasının özelliklerini değiştirir. Bu süreç sonunda, damar duvarı esnekliği azalma eğilimi gösterir⁵.

Aktive edilmiş lökositler, kılcal damarların dışındaki hasarlanmış endotel nedeniyle damar dışına çıkarak enflamasyon sürecini başlatırlar. Daha sonraki süreçte, fibrinojen gibi proteinler, kapiller damarların etrafında bir bariyer oluşturarak kan ile hücre dışı ortam arasındaki gaz değişimini engeller ve damar duvarının daha fazla hasar görmesine neden olur⁶.

Damar patolojisinde eser elementlerin rolü henüz tam olarak anlaşılmamakla beraber, bu elementlerin doku metabolizmasında önemli bir oynadıkları bilinmektedir. Birçok çalışma, demirin (Fe) venöz hastalıkların gelişiminde önemli olabileceğini düşündürmektedir, ancak venöz hastalıkları olan hastaların variköz venlerinde Fe birikiminin nedeni henüz belli değildir⁷. Bu birikim sürecinin aktif MMP'ler veya serbest radikallerle bağlantılı olduğu öne sürülmüştür^{8,9}.

Fe'in direkt olarak venöz anormalliklerin bir nedeni olmadığı, sadece otoimmün cevabı arttıran bir faktör olduğu hipotezi de öne sürülmektedir¹⁰.

Çinko (Zn) ve bakırın (Cu) aşırı miktarlarda birikimi toksik etki gösterir, eksikliğinin ise demir emilimi bozuklukları, bağışıklık sistemi bozuklukları ve damar duvarı zayıflığı gibi birçok anomaliye neden olduğu bilinmektedir¹¹. Cu, birçok proteinin bileşeni veya katalizörü olarak görev alır; bunlardan biri de lizil oksidaz enzimidir. Bu enzim damarlarda kollajen ve elastin arasında bağların yapımına izin verdiğinden dolayı damar duvarının sertlik ve elastikiyetinden sorumludur¹². Zn ve Cu iyonlarının, serbest radikalleri nötralize eden antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutazın (SOD) da yapısında bulunduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) variköz venlerin ve venöz ülserlerin oluşumu ile bağlantılı endotel disfonksiyonlarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir¹³.

Bunlarla beraber, Zn, Cu ve Fe iyonları da ROS oluşumuna katılarak kronik venöz yetmezliğe yol açan damar duvarı hasarlarına neden olabilirler^{8,14}.

Çalışmamızda alt ekstremitte variköz venleri olan hastaların ven doku örneklerinde eser elementler Zn, Cu ve Fe içeriğini belirleyerek, bu verileri - koroner bypass yapılacak hastaların greft olarak kullanılacak- variköz yapı göstermeyen damar dokuları ile karşılaştırdık. Böylelikle, fazlalığıyla ya da eksikliğiyle damar duvar yapısının bozulmasına ve/veya oluşmuş bozulmanın ilerlemesine sebep olabileceğini düşündüğümüz eser element düzeylerini belirleyerek, hasarın moleküler nedenlerini açıklamayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Çalışma grubu kalp ve damar cerrahisi kliniğine primer alt ekstremitte varisleri nedeni ile opere edilecek variköz ven (VV) hastaları arasından seçilerek oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilen her birey çalışma hakkında bilgilendirilip onamları alındı. Çalışma etik kurul izni alınarak, Helsinki Deklerasyonu prensiplerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Hasta seçimi:

Kontrol Grubu: Koroner arter bypass greft operasyonu geçirecek hastalar arasından, klinik olarak venöz hastalık hikayesi/şikayeti olmayan, alt ekstremitte venöz dupleks ultrasonda reflü, venöz dilatasyon saptanmayan derin venleri açık, daha önce varisleri nedeni ile opere olmamış, periferik arter hastalığı olmayan ve koroner greft için vena saphena magna (VSM) dokusu kullanılacak 40 erkek kontrol grubuna alındı. Bu hastaların greft yapılmak için çıkarılan ve klinisyen tarafından sağlıklı olduğu görülen ven dokularının, operasyon sonrası kullanılmayacak kısmı çalışma için alınarak uygun şartlarda saklandı. Hastaların yaş ortalamaları 54.32 (± 13.2) idi.

Çalışma Grubu: Alt ekstremitte VSM trasesi boyunca primer varisleri olan ve klinik yakınmaları nedeniyle operasyon endikasyonu almış hastalardan (CEAP sınıflamasına göre C2-(s) kriterlerine uyan), daha önce varisleri nedeni ile opere olmamış, periferik arter hastalığı olmayan ve venöz yetmezlik nedeniyle bacak/ayak ülserleri olmayan 40 erkek çalışma grubuna alındı. Seçilen hastaların tümünde venöz dupleks ultrasonografide VSM'de reflü gösterildi. Hastaların yaş ortalamaları 50.1 (± 10.7) idi.

Dışlanma kriterleri:

İki grupta da çalışmaya alınmama kriterleri diyabet hastası olmak, mineral takviyesi kullanmak, daha önce varisleri nedeni ile opere edilmiş olmak, periferik arter hastalığı olmak ve ileri yaş hasta olmak şeklinde aynıydı.

Damar Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması:

Kontrol grubunda koroner bypass için VSM çıkarılırken ve variköz ven grubunda pake eksizyonu yapılırken dizaltı baldır bölgesi VSM'sından yaklaşık 2 cm örnek alındı. Alınan doku örnekleri %0.9 soğuk NaCl ile yıkandı, nazikçe kurutuldu, tartıldı ve analiz gününe kadar metal içermeyen tüplerin içinde -20 °C'de saklandı.

Eser Element Ölçümü:

Ölçüm için alınan dokuların (ortalama 1 gr) hassas terazide ağırlıkları belirlendi. Dokunun üzerine 1 mL nitrik asit (%69) konularak, total hacmin yarısı kalana kadar 100 °C' deki etüvde yaklaşık 2 saat bırakıldı. Etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında soğumaları beklenen tüplerin üzerlerine 1 mL perklorik asit (%60) ilave edildi. Örnekler tekrar total hacmin yarısı kalana kadar (yaklaşık 2 saat) etüvde bırakıldı. Bu sürenin sonunda soğutulan tüplerdeki örneğin total hacmi distile su ile 5 mL'ye tamamlandı. Karıştırma işleminin ardından dokulardaki element düzeyleri, atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (AAS) (Shimadzu-AA680) daha önce literatürde tanımlanmış yöntem kullanılarak ölçüldü (15). AAS'de ölçümü yapılacak her bir element için özel dalga boyunda ışık veren lambalar (Hallow Cathod Lamp) ile yine her elemente uygun slit aralığı ve arka plan modları seçildi. AAS bu şekilde ölçüme hazır hale getirildikten sonra, blank ve ölçümü yapılacak element için standart

çözeltiler yardımıyla kalibrasyon grafiği çizdirildi ve hazırlanan örneklerin element konsantrasyonlarının ölçümleri yapıldı. Bu işlemler her bir element için tekrarlandı.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizimi GraphPad Prism 8 istatistiksel analiz programı kullanılarak yapıldı. Çalışma ve kontrol grupları arası eser element düzeylerinin karşılaştırmasında Student's t test kullanıldı. Çalışma grubunda eser element düzeylerinin korelasyon değerlendirmesi Person corelasyon testi ile gerçekleştirildi. Veriler, ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi. 0.05'ten küçük saptanan p değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Eser element düzeylerinin gruplara göre dağılımı Tablo 1'de sunulmaktadır. Zn düzeyleri, çalışma grubu için 32.73±10.99 mg/dL iken, kontrol grubunda 43.45±16.50 mg/dL bulunmuştur. Cu düzeyleri, çalışma grubu için 8.97±5.57 mg/dL, kontrol grubu için 6.75±4.51 mg/dL şeklinde saptanmıştır. Fe düzeyleri ise, çalışma grubunda 39.33±13.07 mg/dL iken, kontrol grubunda 32.38±8.45 mg/dL'dir.

Çalışma grubu ve kontrol grubu eser element düzeyleri arasındaki farklar, Zn ve Fe için istatistiksel açıdan anlamlıdır (sırasıyla p= 0.001 ve 0.006).

Eser elementlerin çalışma grubu içerisinde ölçülen değerlerinin birbirleri ile korelasyonu anlamlı bulunmamıştır. Zn-Cu arası Pearson korelasyon değeri (r) 0.026 (p=0.87), Zn-Fe arası 0.23 (p=0.13) ve Fe-Cu arasında-0.11'dir (p=0.49).

Tablo 1. Çalışma ve kontrol grubuna ait ven dokusu eser element düzeyleri

Eser Element	Çalışma Grubu	Kontrol Grubu	p değeri
Zn (mg/dL)	32.73±10.99	43.45±16.50	0.001*
Cu (mg/dL)	8.97±5.57	6.75±4.51	0.0533
Fe (mg/dL)	39.33±13.07	32.38±8.45	0.006*

P<0.05 istatistiksel olarak anlamlılık ifade eder

TARTIŞMA

Dokudaki eser elementlerin seviyesi, bireyin genel metabolik durumunun bir yansımasıdır. Metal iyonlarının seviyesi, ölçülmekte olan dokunun türüne ve yerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ek olarak, dolaşımda bulunan eser elementlerin, hasarlı dokuda birikerek lokal olarak hem çeşitli oksidatif reaksiyonları tetiklediği, hem de doku üzerinde var olan mekanik hasarı şiddetlendirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur¹⁶⁻¹⁸.

Kronik venöz yetmezlikte yer alan mekanizmalardan biri serbest oksijen ve azot radikallerinin yıkıcı etkisidir. Krzyciak ve arkadaşları hasarlı damarlardaki yüksek Fe içeriğini göstermiş ve Fe iyonlarının, Fenton reaksiyonu yoluyla dokuların yapısının farklılaşmasına neden olan oksidatif hasar mekanizmasına dahil olduğunu söylemişlerdir⁹. Poredos ve arkadaşları da proton kaynaklı X-ışını emisyonu analizi yöntemini kullanarak variköz venlerin duvarlarında kontrollere kıyasla artmış Fe ve Cu konsantrasyonları göstermişlerdir¹⁹. Dokuda artan Fe, bir kimyasal çekici olarak görev yaparak, daha fazla makrofajın hasarlı bölgede birikmesine ve fagositik aktivitenin bir sonucu olarak demirin makrofajlar içerisinde artışını tetikler (20). VV olan ve kronik venöz yetmezlikli hastalarda dokuda artmış oranda bulunan Fe düzeyi, çalışmamızdaki bulgular ile uyumludur. Bu nedenle, çalışmamızdaki bulgular, dolaşımdaki demirin hasarlı ven dokusu üzerine çökmesi, çöken demirin makrofajları stimüle etmesi ve Fenton reaksiyonu üzerinden lokal

oksidan etkiyle venöz duvarda hasarı artırması şeklinde birbirini takip eden ve her seferinde daha da kuvvetlenen bir patolojik döngünün varlığı ile de uyumludur.

SOD serbest radikal temizleyici işlev gören antioksidan bir enzimdir. Oksidatif stres koşullarında artan antioksidan aktivite, bu enzimlerin yapılarında kofaktör olarak görev yapan Zn ve Cu iyonların seviyeleri ile de ilişkilendirilir ²¹. Ayrıca Zn-bağımlı MMP türlerinin variköz ven dokularında aktive olduğu çalışmalarla gösterilmiştir ²².

Bu hastalarda, hücre dışı matriksin bozulan yapısına bir yanıt olarak, MMP'ler nötrofillerden salgılanarak damarın media dokusunda aktive olurlar. Bu şekilde damarın yeniden şekillenmesinde görev alırlar ²³.

VV oluşumunun ve damar elastikiyetindeki bozulmanın, venöz kapaklar, biyokimyasal süreçler ve dolaşımdaki immün sistem hücrelerinin ortak çalışması ile meydana geldiği bilinen mekanizmalar arasındadır ^{24,25}. Bu nedenle, çalışma grubumuzdaki hastalarda doku düzeyinde azalmış Zn düzeyi, azalmış antioksidan enzim aktivitesi ile ilişkili olabileceği gibi, artan MMP aktivitesine de bağlı olabilir. Zn düzeyleri, MMP'ler tarafından damar yeniden yapılandırılması süreçlerinde kullanımına bağlı olarak azalmış olabilir. Farklı bir çalışmada doku SOD ve MMP enzim düzeyinin de ek olarak birlikte ölçülmesi, bu süreçlerin daha yakın bir mertebeden anlaşılmasını sağlayacaktır.

Kollajen ve elastinler arası bağların oluşumu, dolayısıyla damar elastikiyeti üzerinde doğrudan etkili bir diğer enzim lizil oksidazın kofaktörü olan Cu eksikliğinin, venöz duvar zayıflığı ile ilişkisi gösterilmiştir²⁶.

Çalışma grubumuzda anlamlı değilse bile kontrol grubuna kıyasla yüksek saptanan Cu düzeyleri, artmış doku lizil oksidaz aktivitesi ile ilişkili olabilir. Bu durum da lokal faktörler tarafından ortaya çıkmış bir kompensasyon sürecinin göstergesi olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, Zn ile birlikte SOD işlevi için gerekli bir element olan Cu düzeyinin, Zn'nin dokuda azalmış düzeyine zıt olarak artmış olması ve bu iki element arasında herhangi bir korelasyon saptanmaması, VV hastalarında dokuda bulunan Cu konsantrasyonunun SOD enzim aktivitesi dışındaki farklı nedenlerden etkilenebileceği önerebilir. Öte yandan, Cu düzeyinin, immün sistem hücreleri olan nötrofil ve makrofaj aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu, uzun yıllardır kabul görmektedir ²⁷. Variköz dokuda da endotel yüzeyinde devam etmekte olan ve bu hücrelerin de dahil olduğu değişiklikler, dokuda artmış Cu düzeyi ile ilişkili olabilir.

Alt ekstremite varisleri olan grupta, hastalar kendi içinde CEAP sınıflandırılmasına göre yetmezliğin şiddetine göre sınıflandırılmadı. Kontrol grubu olarak kabul edilen grubun koroner bypass operasyonu yapılan hasta grubu olması nedeniyle, bu grupta oksidan/antioksidan dengesinin oksidanlardan yana bozulacağı öngörülebilir. Sağlıklı kabul edilen ven dokusunu alabileceğimiz ancak bizim ulaşamadığımız yöntem post-mortem doku alma şeklinde olabilirdi. Hasta sayısının artırıldığı ve sınıflamanın çeşitlendirildiği daha geniş bir hasta grubuyla yapılacak çalışmalarla venöz patoloji açısından daha aydınlatıcı sonuçlar elde edileceği düşüncesindeyiz.

Verilerimiz, Zn, Cu Fe'in kimi zaman ortak, kimi zaman da farklı yollar ve enzimler üzerinden VV patogeneze katkısı olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır. Ancak, VV'nin sınıflandırılma

ölçütlerine göre ayrılarak farklı evrelerinde, bu eser elementlerin farklı düzeylerde saptanabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. O nedenle, evrelerine göre ayrılmış hasta serilerinde analiz edilen eser element düzeyleri, VV oluşumunun ve ilerleyişinin daha verimli bir şekilde anlaşılabilmesine katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

- O'Flynn N, Vaughan M, Kelley K. Diagnosis and management of varicose veins in the legs: NICE guideline. *Br J Gen Pract.* 2014;64(623):314-5.
- Hamdan A. Management of varicose veins and venous insufficiency. *JAMA.* 2012;308:2612–2621.
- Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg.* 1994;81(2):167-73.
- Jacobs BN, Andraska EA, Obi AT, Wakefield TW. Pathophysiology of varicose veins. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2017;5(3):460-67.
- Chen Y, Peng W, Raffetto JD, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Remodeling of Lower Extremity Veins and Chronic Venous Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:267-99.
- Raffetto JD, Khalil RA. Mechanisms of varicose vein formation: Valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology.* 2008;23:85–98.
- Zamboni P, Izzo M, Tognazzo S, et al. The overlapping of local iron overload and HFE mutation in venous leg ulcer pathogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:1869–1873.
- Arredondo M, Núñez MT. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med.* 2005;26:313–327.
- Krzyściak W, Kowalska J, Kózka M, Papież MA, Kwiatek WM. Iron content (PIXE) in competent and incompetent veins is related to the vein wall morphology and tissue antioxidant enzymes. *Bioelectrochemistry.* 2012;87:114-23.
- Singh AV, Subhashree L, Milani P, Gemmati D, Zamboni P. Interplay of iron metallobiology, metalloproteinases, and FXIII, and role of their gene variants in venous leg ulcer. *Int J Low Extrem Wounds.* 2010;9(4):166-79.
- Rusak A, Karuga-Kuźniewska E, Wiatrak B, Szymonowicz M, Stolarski M, Radwan-Oczko M, and at al. Venous insufficiency: Differences in the content of trace elements. A preliminary report. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(5):695-701.
- Szauter KM, Cao T, Boyd CD, Csiszar KI. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 448–56.
- Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 2011; 91:327–87.
- Krzyściak W, Kozka M, Kowalska J, Kwiatek WM. Role of Zn, Cu-trace elements and superoxide dismutase (SOD) in oxidative stress progression in chronic venous insufficiency (CVI). *Przegląd Lek.* 2010;67:446–49.
- Kubaszewski Ł, Ziola-Frankowska A, Frankowski M, et al. Atomic absorption spectrometry analysis of trace elements in degenerated intervertebral disc tissue. *Med Sci Monit.* 2014;20:2157-64.
- Zamboni P, Scapoli G, Lanzara V, Izzo M, Fortini P, Legnaro R, and at al. Serum Iron and Matrix Metalloproteinase-9 Variations in Limbs Affected by Chronic Venous Disease and Venous Leg Ulcers. *Dermatol Surg.* 2005;31(6):644-49.
- Nanami M, Ookawara T, Otaki Y, Ito K, Moriguchi R, Miyagawa K, and at al. Tumor necrosis factor-alpha-induced iron sequestration and oxidative stress in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2495-501.
- Zamboni P, Lanzara S, Mascoli F, Caggiati A, Liboni A. Inflammation in venous disease. *Int Angiol.* 2008;27(5):361-9.
- Poredos P, Spirkoska A, Rucigaj T, Fareed J, Jezovnik MK. Do Blood Constituents in Varicose Veins Differ From the Systemic Blood Constituents? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50(2):250-6.
- Zamboni P. The big idea: iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. *J R Soc Med.* 2006;99(11):589-93.
- Osredkar J, Sustar N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol.* 2011;3(11):001-5.
- Elisabeth MacColl and Raouf A. Khalil. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015; 355(3): 410–28.
- Arda Kucukguven and Raouf A. Khalil. Matrix Metalloproteinases as Potential Targets in the Venous Dilatation Associated with Varicose Veins. *Curr Drug Targets.* 2013; 14(3): 287–324.
- Takase S, Pascarella L, Lerond L, Bergan JJ, Schmid-Shönbein GW. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur J Endovasc Surg.* 2004;28:484-93.
- MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in

- Chronic Venous Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;355(3):410-28.
26. Cromwell GL. Copper as a nutrient for animals. In: Richardson HW, ed. *Handbook of Copper Compounds and Applications*. Boca Raton, FL:CRC Press, 1997.
27. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002;87(5):393-403.