

JADWIGA BŁONIAK, MANSUR RAHNAMA*, STANISŁAW ZARĘBA

WPLYW PROCESU NOWOTWOROWEGO W OBRĘBIE JAMY USTNEJ
NA POZIOM WYBRANYCH BIOPIERWIĄSKÓW W ŚLINIE

THE INFLUENCE OF CARCINOGENESIS IN THE ORAL CAVITY
ON THE LEVEL OF SOME BIOELEMENTS IN THE SALIVA

Katedra i Zakład Bromatologii
Akademia Medyczna w Lublinie
20-081 Lublin, ul. Staszica 4

Kierownik: prof. dr hab. S. Zaręba

* Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej
Akademii Medyczna w Lublinie
20-081 Lublin, ul. Karmelicka 7

Kierownik: prof. dr hab. T. Tomaszewski

W ślinie pacjentów z rozpoznany klinicznie i histopatologicznie rakiem płaskonabłonkowym w obrębie jamy ustnej oznaczono poziomych wybranych biopierwiastków: makro- i mikroelementów (Ca, Mg, K, Na, Zn, Cu, Mn i Fe) porównując je z zawartościami w ślinie osób klinicznie zdrowych.

WSTĘP

Nowotwory stanowią drugą, po chorobach układu krążenia, przyczynę zgonów w populacji polskiej, a śmiertelność z powodu raka jamy ustnej wynosi 2,5% i jest większa wśród mężczyzn niż kobiet. Czynniki patogennymi predysponującymi do rozwoju procesu nowotworowego w obrębie jamy ustnej są m. in. dym papierosowy, alkohol, substancje chemiczne, na które mogą być narażeni ludzie w miejscu pracy [7, 14].

Rozrost nowotworowy charakteryzuje przewaga proliferacji nad obumieraniem komórek z jednoczesnym zahamowaniem ich różnicowania. Tkanka nowotworowa może w minimalnym stopniu różnić się od tkanki macierzystej (a to nowotwory o minimalnym odchyleniu metabolicznym) lub nie występują w niej żadne cechy zróżnicowania (nowotwory anaplastyczne) [7, 10, 14].

W komórkach zmienionych nowotworowo ulegają uszkodzeniu kanały jonowe. Występuje zaburzenie gospodarki mineralnej, w błonach komórkowych powstają „dziury”, czego efektem jest ucieczka elektrolitów i makrocząstek. W przypadku nowotworów występujących w jamie ustnej, do śliny mogą przenikać, na zasadzie dyfuzji lub przez uszkodzone błony komórkowe, elementy rozkładu komórek rakowych, w tym biopierwiastki [10].

W badaniach medycznych coraz częściej zwraca się uwagę na ślinę, jako na łatwo dostępną i uzyskiwaną w sposób nieinwazyjny, diagnostyczny materiał biologiczny, który może być pomocny w rozpoznawaniu niektórych chorób w organizmie człowieka. W ślinie

można oznaczyć m. in. poziom hormonów, których zaburzenia stwierdza się w takich chorobach jak: dysfunkcja nadnerczy (kortyzol), bezpłodność (progesteron), dysfunkcja jajników (estriol), androgenizacja (testosteron). Ślina jest także dobrym materiałem do oceny odporności (oznaczanie *sIgA*, *IgG*), a dla wielu wirusów (*HBV*, *HIV*), i bakterii (*Helicobacter pylori*) testy diagnostyczne wykonywane w ślinie są podobnie czułe jak wykonywane w surowicy krwi [5,13,20]. Stwierdzono również, że niektórym zmianom patologicznym w jamie ustnej towarzyszy inna niż zwykle zawartość składników mineralnych w ślinie [2, 9]. Z tego powodu można przypuszczać, że zmieniona struktura morfologiczna tkanki nowotworowej, zwiększony jej metabolizm oraz występująca w zaawansowanym stadium rozwoju tej choroby (zwłaszcza w obrębie twaroczaszki) liza komórek, powodują, że ślina będzie wykazywała odmienny skład (również mineralny) niż ludzi zdrowych [3, 4, 12].

Celem pracy była ocena zawartości wybranych biopierwiastków w ślinie pochodzącej od chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej.

MATERIAŁ I METODYKA

Przedmiotem badań były próbki śliny pochodzące od osób z rozpoznaniem klinicznym i ze stwierdzonym na podstawie badań histopatologicznych, rakiem płaskonabłonkowym błony śluzowej jamy ustnej (*carcinoma planoepitheliale spinocellulare*) nierogowaciejącym (*akeratodes*) lub rogowaciejącym (*keratodes*) (grupa badana – $n_1 = 20$). Miejscem rozwoju tych nowotworów była błona śluzowa policzków, dna jamy ustnej, języka i podniebienia miękkiego (*c. mucosae buccae*, *c. fundi oris*, *c. linguae*, *c. palati molli*). Grupę kontrolną ($n_2 = 15$) stanowiła ślina pobrana od osób klinicznie zdrowych.

Ślinę mieszaną niestymulowaną pobierano od pacjentów rano na czczo do odpowiednich próbek. Następnie próbki przenoszono do tygli kwarcowych, ważono na wadze analitycznej, suszono w suszarce i mineralizowano „na sucho” w temperaturze 450°C. Do rozpuszczania popiołów używano wodnego 15% roztworu kwasu chlorowodorowego.

Zawartości wapnia, magnezu, potasu, sodu, cynku, miedzi, manganu i żelaza oznaczono bezpośrednio z fazy wodnej z zastosowaniem absorpcyjnej spektrometrii atomowej w aparacie SP 192, firmy Pye Unicam. Parametry stosowane podczas oznaczania dla poszczególnych pierwiastków przedstawiono w tabeli I [16].

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Zakres zmienności, średnią arytmetyczną (\bar{x}) oraz odchylenie standardowe (SD) przedstawiono w tabelach II i III.

Normalność rozkładu badanych parametrów oceniono przy pomocy testu *W – Shapiro-Wilka*, natomiast jednorodność wariancji przy pomocy testu *F – Fishera*. Ze względu na niejednorodne wariancje bądź brak rozkładu normalnego do wykrycia istotności różnic między analizowanymi grupami:

Tabela I. Parametry oznaczania pierwiastków
The parameters of determination the elements

Parametry oznaczania	Oznaczany pierwiastek							
	Ca	Mg	K	Na	Zn	Cu	Mn	Fe
Analityczna długość fali [nm]	422,7	285,2	766,5	589,0	213,9	324,8	279,5	248,3
Prąd lampy [mA]	8	8	8	8	10	5	12	15
Szczelina [nm]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
Wysokość palnika [cm]	10	10	10	10	10	10	10	10
Przepływ powietrza [dm ³ /min]	5	5	5	5	5	5	5	5
Przepływ acetylenu [dm ³ /min]	1	1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

kontrolną i badaną (ślina od chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej), użyto nieparametrycznego testu $U - \text{Manna-Whitney}2a$. Przyjęto 5% błąd wnioskowania na istnienie istotnych statystycznie różnic.

Badanie statystyczne przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe STATISTICA w. 6.1 (StatSoft, Polska).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W ślinie pacjentów z rozwiniętym procesem nowotworowym – rakiem płaskonabłonkowym błony śluzowej jamy ustnej zawartości wszystkich oznaczonych makroelementów (wapnia, magnezu, potasu i sodu) były wyższe od ilości stwierdzonych w ślinie osób klinicznie zdrowych (grupa kontrolna) – (tab. II), jednakże różnice istotne statystycznie wystąpiły w przypadku wapnia, magnezu i sodu.

W ślinie osób chorych w największych stężeniach występował sód, potas i wapń, w mniejszych magnez. Średnie zawartości badanych pierwiastków w mg/100 g śliny wynosiły odpowiednio: 109,32, 91,60, 11,91 i 1,93. Natomiast w grupie kontrolnej stwierdzono następujące poziomy: sodu – 19,20, potasu – 72,40, wapnia – 4,13 i magnezu – 0,51 mg/100g śliny.

Z przytoczonych danych wynika, że ślina osób, u których występował rak płaskonabłonkowy w jamie ustnej zawierała około 6 razy więcej jonów sodowych, 3 razy więcej jonów wapniowych oraz około 4 razy więcej magnezowych, chociaż poziom tego pierwiastka był najniższy z oznaczanych.

W przypadku analizowanych mikroelementów – cynku, miedzi, manganu i żelaza – w ślinie pacjentów z rozwiniętym nowotworem jamy ustnej, poziom wszystkich badanych pierwiastków był również wyższy od wartości obserwowanych w ślinie osób zdrowych (tab. III). Dla wszystkich ww. pierwiastków różnice między grupą badaną i kontrolną były statystycznie istotne. Najwyższy poziom stwierdzono dla żelaza: średnia zawartość wynosząca 128,19 $\mu\text{g}/100\text{g}$ śliny przekraczała 3-krotnie wartość uzyskaną w grupie kontrolnej. Niższe zawartości stwierdzono dla cynku, średnio 71,09 $\mu\text{g}/100\text{g}$ i miedzi – 17,64 $\mu\text{g}/100\text{g}$, a zwłaszcza dla manganu – 7,81 $\mu\text{g}/100\text{g}$. W grupie kontrolnej wykazano około 4 razy niższe stężenie miedzi i manganu oraz ponad 3-krotnie mniej cynku.

DYSKUSJA

Biopierwiastki, zarówno makro- jak i mikroelementy, w odpowiednich ilościach są niezbędne w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka. Mają wpływ na przebieg różnych procesów fizjologicznych i biochemicznych. Jony Mg^{2+} i Mn^{2+} tworzą m. in. kompleksy z kwasami nukleinowymi. Stwierdzono, że jony cynkowe stabilizują strukturę II-rzędową DNA, a jony miedziowe ją destabilizują [10].

W złożonym procesie onkogenezy występuje zaburzenie homeostazy mineralnej organizmu. Prowadzone są badania na zwierzętach laboratoryjnych mające na celu wyjaśnienie tych procesów [6, 17, 19] Stwierdzono, że zmianom nowotworowym w wątrobie towarzyszy wzrost stężenia ceruloplazminy w surowicy krwi, co wiąże się z podwyższeniem poziomu miedzi. Zmienia się również zawartość cynku i żelaza [8, 11, 15]. Zwrócono uwagę, że często wysoka wartość współczynnika stężeń Cu/Zn w surowicy krwi towarzyszy rozwojowi procesu nowotworowego w organizmie i może być wskaźnikiem guza złośliwego [8, 11].

Chen i wsp. [4] potwierdzili wcześniejsze badania, że zmiany nowotworowe w jamie ustnej powodują wzrost zawartości wielkocząsteczkowych białek w ślinie osób chorych. W po-

Tabela II. Stężenie wapnia, magnezu, potasu i sodu w ślinie [mg/100 g śliny]
Levels of calcium, magnesium, potassium and sodium in the saliva [mg/100 g of the saliva]

Oznaczone pierwiastki	Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (n = 20)				Grupa kontrolna (n = 15)				Test U <i>Manna-Whitney2a</i>	Poziomopodobieństwa P
	Zawartość Min.	Zawartość Max.	Średnia arytmetyczna (x)	Odchylenie standardowe (SD)	Zawartość Min.	Zawartość Max.	Średnia arytmetyczna (x)	Odchylenie standardowe (SD)		
Wapń	5,60	20,99	11,91	4,68	1,65	5,75	4,13	1,28	2,0	0,00009*
Magnez	0,89	3,90	1,93	1,42	0,28	1,05	0,51	0,22	3,0	0,00341*
Potas	42,29	182,67	91,60	40,78	57,35	94,48	72,40	12,09	54,0	0,34884
Sód	21,90	312,50	109,32	90,08	10,19	37,10	19,20	7,48	3,0	0,00007*

* – różnice statystycznie istotne przy poziomie istotności $p < 0,05$

Tabela III. Stężenie cynku, miedzi, manganu i żelaza w ślinie [mg/100 g śliny]
Levels of zinc, copper, manganese and iron in the saliva [mg/100 g of the saliva]

Oznaczone pierwiastki	Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (n = 20)				Grupa kontrolna (n = 15)				Test U <i>Manna-Whitney2a</i>	Poziomopodobieństwa P
	Zawartość Min.	Zawartość Max.	Średnia arytmetyczna (x)	Odchylenie standardowe (SD)	Zawartość Min.	Zawartość Max.	Średnia arytmetyczna (x)	Odchylenie standardowe (SD)		
Cynk	35,20	148,52	71,09	31,91	12,50	25,00	19,26	4,04	0,0	0,00004*
Miedź	6,40	31,83	17,64	9,10	2,35	6,85	3,99	1,56	1,0	0,00005*
Mangan	3,36	12,19	7,81	2,95	0,88	3,05	2,15	0,83	0,0	0,00004*
Żelazo	51,20	310,50	128,19	79,58	24,00	60,35	41,71	13,19	5,0	0,00014*

* – różnice statystycznie istotne przy poziomie istotności $p < 0,05$

równaniu z osobami klinicznie zdrowymi, występowało znacząco wyższe stężenie albumin i α -amylazy w ślinie. Może to być wykorzystane do szybkiego zdiagnozowania raka jamy ustnej.

Stwierdzono, że ślina nie jest „biernym ultrafiltratem” surowicy. W przeważającej części składa się z wody (99%), resztę stanowią związki organiczne i nieorganiczne – głównie jony sodowe, potasowe i wapniowe, chlorki, węglany i fosforany, nie wytracające się jednak w postaci nierozpuszczalnych soli dzięki obecności w niej fosfoprotein – staterynie i sialinie [1, 13, 18].

Przedstawione wyniki sugerują, że zmianom nowotworowym w nabłonku różnych części jamy ustnej (*carcinoma planoepitheliale keratodes i akeratodes – linguae, fundi oris, mucosae buccae, palati molli*) towarzyszą zmiany w składzie mineralnym śliny. Duży rozrzut otrzymywanych wyników wydaje się być związany ze stadium rozwoju choroby i prawdopodobnie zależy od rodzaju raka.

Prace podobnego typu, dotyczące badania zmian homeostazy mineralnej śliny w przypadku rozwoju choroby nowotworowej w organizmie, powinny być kontynuowane z uwagi m. in. na nieinwazyjny sposób uzyskiwania materiału diagnostycznego – śliny, której zmieniony skład może potwierdzać obecność zmian rakowych.

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania mogą sugerować, że proces nowotworowy w obrębie jamy ustnej (rak płaskonabłonkowy rogowaciejący i nierogowaciejący) wpływa na wzrost poziomu niektórych biopierwiastków w ślinie (Ca, Mg, Na, Zn, Cu, Mn i Fe).

2. Ze względu na istotność problemu badania w tym zakresie powinny być kontynuowane, zwłaszcza że ślina jest łatwo dostępnym i nieinwazyjnym materiałem diagnostycznym

J. Błoniarz, M. Rahnama, S. Zaręba

THE INFLUENCE OF CARCINOGENESIS IN THE ORAL CAVITY ON THE LEVEL OF SOME BIOELEMENTS IN THE SALIVA

Summary

The aim of this study was the examination of influence the oncogenesis process of oral cavity on the level of some bioelements (Ca, Mg, K, Na, Zn, Cu, Mn, Fe) in the saliva. The saliva was sourced from patients with oral cancer (*carcinoma planoepitheliale spinocellulare keratodes and akeratodes: mucosae buccae, fundi oris, linguae, palati molli*). The determination of the analyzed elements were made by atomic absorption spectrophotometry method.

The levels of most of the analyzed elements (Ca, Mg, Na, Zn, Cu, Mn and Fe) were significantly higher in the case group comparing to controls.

PIŚMIENNICTWO

1. Bales C. W., Freeland-Graves J. H., Askey S. et al.: Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age- and sex-related differences. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990, 51, 462–469.
2. Borella P., Fantuzzi G., Aggazzotti G.: Trace elements in saliva and dental caries in young adults. *Sci. Total Environ.* 1994, 153, 219–224.
3. Cieślak M., Jędrzejewska T., Zgirski A.: Badanie zawartości magnezu, żelaza i miedzi w ślinie ludzi zdrowych. *Czas. Stomatol.* 1990, 43, 202–206.

4. *Chen Y. C., Li T. Y., Tsai M. F.*: Analysis of the saliva from patients with oral cancer by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 364–369.
5. *Cyprysiak G., Tadeusiak W.*: Zastosowanie śliny w diagnostyce medycznej. *Nowa Stomatologia* 2001, 2, 33–36.
6. *Eagon P. K., Teepe A. G., Elm M. S. et al.*: Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis* 1999, 20, 1091–1096
7. *Hattowska H.*: Nowotwory jamy ustnej. Wydawnictwo SanMedia, Warszawa 1994.
8. *Jayadeep A., Raveendran P. K., Kannan S. et al.*: Serum levels of copper, zinc, iron and ceruloplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1997, 16, 295–300.
9. *Kuraner T., Beksac M. S., Kayakirilmaz K. et al.*: Serum and parotid saliva testosterone, calcium, magnesium, and zinc levels in males, with and without periodontitis. *Biol. Trace Elem. Res.* 1991, 31, 43–49.
10. *Madej J.*: Etiologia i patogeneza nowotworów. Wydawnictwo α -medica press. Bielsko-Biała 1996.
11. *Marinov B., Tsachev K., Doganov N. et al.*: The copper concentration in the blood serum of women with ovarian tumors (a preliminary report). *Akush. Ginekol. (Sofia)* 2000, 39, 36–37. wg MEDLINE Abstract 10948620.
12. *Menegario A. A., Packer A. P., Gine M. F.*: Determination of Ba, Cd, Cu, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injectively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 2001, 126, 1363–1366.
13. *Moss S. J.*: Wgląd do jamy ustnej – opracowane przez Komitet Edukacyjny Międzynarodowego Towarzystwa Dentystyki Pediatricznej. *Nowa Stomatologia* 1999, 4, 3–11.
14. *Neville B. W., Day T. A.*: Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J. Clin.* 2002, 52, 195–215.
15. *Paul. R. R., Chatterjee J., Das A. K. et al.*: Zinc and iron as bioindicators of precancerous nature of oral submucous fibrosis. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996, 54, 213–230.
16. *Pinta M.*: Absorpcyjna spektrometria atomowa. PWN, Warszawa 1977.
17. *Pousset D., Piller V., Bureaud N., Piller F.*: High levels of ceruloplasmin in the serum of transgenic mice developing hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 1491–1499.
18. *Rehak N. N., Cecco S. A., Csako G.*: Biochemical composition and electrolyte balance of „unstimulated” whole human saliva. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000, 38, 335–343.
19. *Satoh M., Sawada N., Mori M.*: Roles of copper accumulation in hepatocarcinogenesis of LEC rats. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1997, 10, 73–79.
20. *Ślotwińska S. M., Ślotwiński R., Pierzynowska E.*: Czy ślina może być porównywalnym z krwią materiałem w wykrywaniu przeciwciał przeciwko *Helicobacter pylori*? *Nowa Stomatologia* 2001, 1, 50–52.

Otrzymano: 2002.12.02