

JADWIGA BŁONIARZ¹, MANSUR RAHNAMA², STANISŁAW ZARĘBA¹,
WOJCIECH ŚWIĄTKOWSKI²

WPŁYW PROCESU NOWOTWOROWEGO W OBRĘBIE JAMY USTNEJ
NA POZIOM CYNKU, MIEDZI I ŻELAZA W SUROWICY KRWI

THE INFLUENCE OF CARCINOGENESIS IN THE ORAL CAVITY
ON THE LEVEL OF ZINC, COPPER AND IRON IN SERUM

¹Katedra i Zakład Bromatologii
Akademia Medyczna
20-081 Lublin, ul. Staszica 4
Kierownik: prof. dr hab. S. Zaręba

²Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej
Akademia Medyczna
20-081 Lublin, ul. Karmelicka 7
Kierownik: prof. dr hab. T. Tomaszewski

W surowicy krwi pacjentów z rozpoznaniem klinicznym i potwierdzonym badaniem histopatologicznym rakiem płaskonabłonkowym błony śluzowej jamy ustnej oznaczono poziom cynku, miedzi i żelaza. Wyniki porównano z zawartościami tych mikroelementów w surowicy osób klinicznie zdrowych. Zastosowano mineralizację próbek „na sucho”, a jako metodę analityczną – absorpcyjną spektrometrię atomową.

WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem zdrowotny na świecie, bowiem w krajach uprzemysłowionych są one drugą w kolejności, po schorzeniach układu krążenia, przyczyną zgonów w danej populacji.

Komórki nowotworowe charakteryzuje między innymi niekontrolowany wzrost, zdolność do inwazji i tworzenia przerzutów. Transformacja nowotworowa powoduje powstanie w organizmie nowej linii komórek, które wyłamują się spod kontroli mechanizmów regulujących proliferację i różnicowanie [11].

Procesy toczące się w komórkach zmienionych nowotworowo dotyczą zmian zarówno morfologicznych jak i biochemicznych. Szybko powstające komórki nowotworowe wykazują tendencję do maksymalizowania procesów anabolicznych związanych ze wzrostem (m.in. syntezy DNA i RNA), obniżenia i zmniejszenia funkcji katabolicznych (np. pirymidyn), a także nie wykazują swoistych funkcji komórek zdrowych [14].

Wiele nowotworów związanych jest z nieprawidłowym wytwarzaniem białek (onkoprotein), enzymów i hormonów, których stężenia można oznaczać w osoczu lub surowicy krwi (są to markery nowotworowe). Z badań wynika, że żaden pojedynczy marker nie może jednoznacznie ocenić typu nowotworu. Poza tym są one czasami wykrywalne dopiero w zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej [8,15].

Występujące anomalie biochemiczne w komórkach tkanek nowotworowych mogą wpływać na zmianę metabolizmu niektórych biopierwiastków np. odkładanie się miedzi w komórkach rakowych wątroby [3]. Obserwowane są również zmiany składu płynów wewnątrzustrojowych np. krwi (osocze, surowica krwi), często zależne od miejsca i typu rozwijającego się nowotworu [6, 7, 12, 20].

Szczególne uwagę zwraca się ostatnio na poziom niektórych mikroelementów w surowicy np. cynku, miedzi, żelaza, których rola w organizmie związana jest m.in. z prawidłowym funkcjonowaniem wielu enzymów czy układu odpornościowego [14], a których zawartość w procesie nowotworowym odbiega od norm.

Celem pracy było zbadanie wpływu zmian nowotworowych w jamie ustnej, zdiagnozowanego jako rak płaskonabłonkowy, na poziom Zn, Cu i Fe w surowicy krwi.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano 25 próbek krwi od pacjentów, u których na podstawie badań histopatologicznych stwierdzono raka płaskonabłonkowego błony śluzowej różnych części jamy ustnej (*carcinoma planoepitheliale spinocellulare*). Miejscem nowych komórek nowotworowych była błona śluzowa policzków, dna jamy ustnej, języka i podniebienia miękkiego (*c. mucosae buccae, c. fundi oris, c. linguae, c. palati molli*). U osób tych wykluczono inne zmiany chorobowe. Grupę kontrolną stanowiło 20 próbek surowicy krwi od osób klinicznie zdrowych.

Krew pobierano z żyły łokciowej rano na czczo do odpowiednich probówek, wirowano, a otrzymaną surowicę krwi przechowywano w lodówce do momentu użycia jej do badań.

Mineralizację próbek surowicy przeprowadzono metodą „na sucho” w temp. 450°C w tyglach kwarcowych. Proces spoielania przyspieszano 15% roztworem kwasu azotowego (roztwór wodny przygotowany z 65% HNO₃, Suprapur, firmy Merck). Popioły bez śladów węgla rozpuszczano w 10% roztworze kwasu solnego (roztwór wodny wykonany z 30% HCl, Suprapur, firmy Merck).

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

| Parametry oznaczania | Oznaczany pierwiastek | | |
|--|-----------------------|-------|-------|
| | Zn | Cu | Fe |
| Analityczna długość fali (nm) | 213,9 | 324,8 | 248,3 |
| Prąd lampy (mA) | 10 | 5 | 15 |
| Szczelina (nm) | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| Wysokość palników (cm) | 10 | 10 | 10 |
| Przepływ powietrza (dm ³ /min.) | 5 | 5 | 5 |
| Przepływ acetylenu (dm ³ /min.) | 0,8 | 0,8 | 0,8 |

T a b e l a II. Zawartość cynku, miedzi i żelaza w surowicy krwi, $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$
Zinc, copper and iron content in the serum, $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$

| Oznaczenia pierwiastek | Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej | | | | Grupa kontrolna | | | | Test U Mann-Whitney'a | Poziom prawdopodobieństwa p | |
|------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|--------------------------|---------------------------------|--------------|----------------|----------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | Ilość próbek | Zawartość Min. | Zawartość Max. | Średnia arytmetyczna (x) | Odchylenie standardowe (+/- SD) | Ilość próbek | Zawartość Min. | Zawartość Max. | | | Średnia arytmetyczna (x) |
| Cynk | 25 | 62,61 | 110,00 | 97,09 | 11,27 | 20 | 66,76 | 112,20 | 90,17 | 15,22 | 0,20772 |
| Miedź | 25 | 84,91 | 160,77 | 120,29 | 20,41 | 20 | 76,49 | 102,20 | 89,52 | 7,39 | 0,00053* |
| Żelazo | 25 | 156,52 | 363,94 | 227,92 | 64,94 | 20 | 98,76 | 167,57 | 135,13 | 24,66 | 0,00012* |

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

Oznaczenia zawartości cynku, miedzi i żelaza wykonano bezpośrednio z fazy wodnej metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w aparacie SOLAAR M 5 firmy Thermo Elemental USA. Parametry zastosowane do analizy wymienionych pierwiastków przedstawiono w tabeli I, wg [16].

Wyniki badań opracowano statystycznie i umieszczono je w tabeli II.

Podano: zawartość minimalną, maksymalną, średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. 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 (próbami kontrolnymi surowicy od osób klinicznie zdrowych a surowicą od chorych z rakiem jamy ustnej), użyto nieparametrycznego testu *U-Manna-Whitney'a*. Przyjęto 5% błąd wnioskowania na istnienie istotnych statystycznie różnic.

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

WYNIKI

Zawartość cynku w surowicy pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej mieściła się w przedziale od 62,61 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ do 110,00 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, a u osób klinicznie zdrowych od 66,76 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ do 112,20 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$. Średnia zawartość tego mikroelementu u chorych z nowotworem była jednak wyższa (97,09) niż w próbach kontrolnych (90,17 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$), a różnica statystycznie nieistotna.

Poziom miedzi w surowicy osób z rakiem wahał się od 84,91 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ do 160,77 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, a średnia zawartość wynosiła 120,29 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$. W porównaniu z grupą kontrolną, w której średnia zawartość tego pierwiastka wynosiła 89,52 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, występująca różnica była statystycznie istotna.

Zawartość żelaza w surowicy osób chorych z nowotworem jamy ustnej mieściły się w zakresie od 156,52 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ do 363,94 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, średnio 227,92 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$. Natomiast w surowicy grupy kontrolnej osób zdrowych średni poziom tego pierwiastka wynosił 135,13 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$, a wartości wahały się od 98,76 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ do 167,57 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ (różnica była statystycznie istotna).

DYSKUSJA

Pierwiastki śladowe niezbędne w organizmie w odpowiednich ilościach m.in. cynk, miedź i żelazo, wykazują wielokierunkową aktywność biochemiczną jako stabilizatory, katalizatory lub elementy struktury enzymów [14].

Zmiany metaboliczne w komórkach rakowych powodują pojawienie się w krwi, w ponadnormatywnych ilościach, bądź to substancji wytwarzanych w warunkach fizjologicznych lub też takich, które nie powstawały wcześniej w organizmie. Zawartości w surowicy krwi mikroelementów o ustalonych normach biochemicznych (np. Zn, Cu i Fe) oraz wzajemne ich proporcje zmieniają się także często w sposób charakterystyczny, zależny od typu nowotworu [2, 3, 7, 9, 12, 13].

Zauważono, że poziom cynku w surowicy krwi osób z nowotworem może różnić się od prawidłowej wartości fizjologicznej, która powinna mieścić się w granicach 50-150 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^3$ [14]. W przypadku zmian nowotworowych w przewodzie pokarmowym (indukowanych u szczurów) [5] oraz w raku krtani u ludzi [19] poziom cynku w surowicy był

niższy w porównaniu z ilością tego mikropierwiastka w surowicy grupy kontrolnej. Obniżoną zawartość cynku w surowicy krwi stwierdzono również u chorych z nowotworem głowy i szyi [2] oraz ze zmianami nowotworowymi w postaci guzów [7].

Jayadeep i wsp. [6] stwierdzili niższy (w porównaniu z próbami kontrolnymi) poziom cynku w surowicy osób, u których występował rak komórek nabłonka wielowarstwowego jamy ustnej. Natomiast w przeprowadzonych badaniach, surowica zawierała większe ilości tego mikropierwiastka niż próby kontrolne, ale różnica była statystycznie nieistotna.

Ważnym dla organizmu mikroelementem jest miedź, która wchodzi w skład wielu enzymów, w tym dysmutazy ponadtlenkowej. Enzym ten bierze udział w metabolizmie wolnych rodników odgrywających podstawową rolę w procesach degradacji komórek. Zawartość miedzi w surowicy krwi osób z rozwiniętym procesem nowotworowym często odbiegała od normy biochemicznej. Podwyższoną zawartość, w porównaniu z kontrolą, stwierdzono w surowicy chorych z nowotworem przewodu pokarmowego [5] oraz w raku jajnika, średnio 147,072 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$ [12]. W eksperymentalnym raku wątroby [3] oraz raku nabłonka wielowarstwowego jamy ustnej [6] poziom miedzi również był wyższy niż w próbach kontrolnych. Podobnie, surowica, pochodząca od osób z rakiem płaskonabłonkowym różnych części jamy ustnej, zawierała wyższe od prób kontrolnych ilości miedzi.

Milde i wsp. [13] wykazali natomiast, że u chorych z rakiem odbytu nie występują istotne różnice zawartości tego pierwiastka.

Stwierdzono, że proces nowotworowy rozwijający się w organizmie może zmieniać stosunek ilościowy miedzi i cynku w surowicy krwi, zwykle stosunek $\text{Cu}/\text{Zn} > 1,0$. W przypadku raka nabłonka wielowarstwowego jamy ustnej, raka jelita, macicy, odbytu czy innych zmian nowotworowych w organizmie, stosunek ten był większy w porównaniu z próbami kontrolnymi [6, 7, 9, 10, 12, 20], podobnie jak obliczony na podstawie otrzymanych wyników badań ($\text{Cu}/\text{Zn} = 1,24$).

Rola żelaza w procesach fizjologicznych i biochemicznych organizmu człowieka jest wieloraka. Przeważająca część ogólnej puli tego pierwiastka w ustroju występuje w metabolicznie aktywnych związkach w formie związanej w postaci kompleksu z białkami, a tylko mniej niż 1% wchodzi w skład enzymów tkankowych.

W surowicy pacjentów ze zmianami nowotworowymi w organizmie występowały różne zawartości żelaza w stosunku do normy biochemicznej (wg [14] od 60-175 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$). Podwyższone zawartości tego pierwiastka, średnio 289,0 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$, stwierdził *Milde* i wsp. [13] u pacjentów z nowotworem odbytu. Surowica pochodząca od osób z nowotworem jamy ustnej zawierała ilości żelaza nie odbiegające od poziomu fizjologicznego [1, 4, 17]. Niższe zawartości w porównaniu z próbami kontrolnymi stwierdzono w surowicy chorych z rakiem krtani i w zwłóknieniu podśluzówkowym jamy ustnej [18, 19].

Surowica badana, od chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej, zawierała istotnie wyższe od prób kontrolnych poziomy żelaza.

WNIOSKI

1. Oznaczone ilości cynku, miedzi i żelaza w surowicy osób z rakiem płaskonabłonkowym różnych części jamy ustnej były wyższe w porównaniu z próbami kontrolnymi, ale różnice statystycznie istotne stwierdzono tylko dla zawartości miedzi i żelaza.

2. Określenie – stosunku poziomu miedzi do zawartości cynku w surowicy krwi – może służyć do potwierdzenia rozwoju procesu nowotworowego w organizmie ($Cu/Zn > 1,0$).

3. Oznaczanie zawartości niektórych mikroelementów w surowicy krwi, m.in. Zn, Cu i Zn, pierwiastków o ustalonych normach biochemicznych, może być pomocne i może zostać wykorzystane, obok innych markerów nowotworowych, do bardziej precyzyjnego określenia diagnozy choroby nowotworowej.

J. Błoniarz, M. Rahnama, S. Zaręba, W. Świątkowski

THE INFLUENCE OF CARCINOGENESIS IN THE ORAL CAVITY ON THE LEVEL OF ZINC, COPPER AND IRON IN SERUM

Summary

The samples of serum blood originating from the persons with squamous cell carcinoma of various parts of oral cavity (*carcinoma planoepitheliale spinocellulare: mucosae buccae, fundi oris, linguae, palati molli*) were analyzed for presence of some microelements (zinc, copper and iron) using the AAS method.

The findings were compared to amounts of these elements in serum of healthy persons (control samples).

Significant differences among groups (with cancer and control) were qualified using unparameter U-Mann Whitney test. The mean contents the all of analysed microelements in serum of persons with cancer were higher as compared with controls but statistically significant differences were only in case of copper and iron.

PIŚMIENNICTWO

1. Bhattathiri V.N.: Relation of erythrocyte and iron indices to oral cancer growth. *Radiother. Oncol.* 2001, 59, 221-226.
2. Doerr T.D., Prasad A.S., Marks S.C. et al.: Zinc deficiency in head and neck cancer patients. *J. Am. Coll. Nutr.* 1997, 16, 395-396.
3. 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.
4. Forrer R., Gautschi K., Lutz H.: Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* 2001, 80, 77-93.
5. Iodice P., Federico A., Federico P. et al.: Does polychemotherapy with 5-fluorouracil, methotrexate, and L-folinic acid influence the selenium, zinc, and copper serum levels in cancer of digestive tract? *J. Trace Elem. Exp. Med.* 2001, 14, 73-79.
6. Jayadeep A., Raveendran P.K., Kannan S. et al.: Serum levels of copper, zinc, iron, and ceruplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1997, 16, 295-300.
7. Jia Z.G.: Analysis of serum levels of selenium, zinc, and copper in 132 patients with malignant tumors. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1991, 25, 205-207.
8. Krajewska B., Lutz W., Pilacik B.: Determination of blood serum oncoprotein NEU and antioncoprotein p-53-molecular biomarkers in various types of occupational exposure. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 1998, 11, 343-348.
9. Kuo H.W., Chen S.F., Wu C.C. et al.: Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002, 89, 1-11.

10. *Liu X.G.*: Serum and tissue copper, zinc and selenium levels in patients with gastric carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za, Zhi.* 1991, 13, 93-96.
11. *Madej J.*: Etiologia i patogenez nowotworów. Wydawnictwo α -medica press, Bielsko Biała 1996.
12. *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.
13. *Milde D., Novak O., Stuzka V. et al.*: Serum levels of selenium, manganese, copper, and iron in colorectal cancer patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2001, 79, 107-114.
14. *Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Radwell V.W.*: *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa 1994, 824-841.
15. *Oyama T., Kawamoto T., Matsuno K. et al.*: A case-case study comparing the usefulness of serum trace elements (Cu, Zn and Se) and tumor markers (CEA, SCC and SLX) in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2003, 23(1B), 605-612.
16. *Pinta M.*: *Absorpcyjna spektrometria atomowa, zastosowanie w analizie chemicznej*. PWN, Warszawa 1997.
17. *Rahil-Khazen R., Bolann B.J., Ulvik R.J.*: Trace element reference values in serum determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000, 38, 765-772.
18. *Rajendran R., Vasudevan D.M., Vijayakumar T.*: Serum levels of iron and proteins in oral submucous fibrosis (OSMF). *Ann. Dent.* 1990, 49, 23-25, 45.
19. *Rostkowska-Nadolaska B., Pospiech L., Bochnia M.*: Content of trace elements in serum of patients with carcinoma of the larynx. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 1999, 47, 321-325.
20. *Zhao W.X., Shi T.X., Gao X.P. et al.*: Association of p53, PCNA expression and trace element content in esophageal mucosa. *Ai Zheng* 2002, 21, 757-760.

Otrzymano: 2003.09.30