

# Porównawcza ocena stężenia pierwiastków antyoksydacyjnych w surowicy krwi i biopatach tkankowych u chorych z brodawczakiem lub rakiem krtani

## Comparative assessment of antioxidative elements concentration in blood serum and tissue biopates from patients with papilloma or cancer of larynx

JUREK OLSZEWSKI <sup>1/</sup>, JACEK LATUSIŃSKI <sup>2/</sup>, ANDRZEJ KITA <sup>3/</sup>

<sup>1/</sup> Klinika Otolaryngologii i Rehabilitacji Fono-Audiologicznej UM, ul. Żeromskiego 113, 94-647 Łódź

<sup>2/</sup> Oddział Laryngologiczny Szpitala Miejskiego, ul. Zawidowska 4, 59-800 Lubań

<sup>3/</sup> Zakład Chemii Analitycznej Uniwersytetu Śląskiego, ul. Szkolna 9 40-006 Katowice

**Wprowadzenie.** W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowań na raka krtani. Rozwój nowotworów może się wiązać z zaburzeniami stężeń pierwiastków śladowych i niektórych metali w organizmie.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena porównawcza stężeń pierwiastków antyoksydacyjnych (żelaza, miedzi, cynku i magnezu) w surowicy krwi i biopatach tkankowych u chorych z brodawczakiem krtani lub rakiem krtani oraz osób zdrowych.

**Materiał i metody.** Badania wykonano u 30 chorych (20 mężczyzn i 10 kobiet) w wieku 20-88 lat, których podzielono na trzy grupy: I) 10 chorych z brodawczakiem krtani wieku dorosłego, II) 10 chorych z rakiem krtani, III) 10 chorych ze skrzywieniem przegrody nosa (grupa kontrolna). Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane przed leczeniem operacyjnym oraz wycinki zmienionych tkanek krtani w przypadku grupy I i II oraz wycinek chrząstki przegrody nosa w przypadku grupy III. Oznaczenia żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn) i magnezu (Mg) przeprowadzono przy użyciu spektrometru sekwencyjnego Spectroflame-M.

**Wyniki.** U chorych z rakiem krtani stwierdzono istotnie wyższe stężenie Fe i Cu w biopatach tkankowych oraz istotnie niższe stężenie Zn i Mg w biopatach tkankowych oraz Zn w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną. U chorych z brodawczakiem krtani stwierdzono istotnie niższe stężenia Fe, Zn i Mg w biopatach tkankowych oraz istotnie niższe stężenie Zn w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną.

**Wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują na istnienie znacznych zaburzeń równowagi pierwiastków śladowych i metali u badanych chorych co może mieć znaczenie w patogenezie raka krtani.

*Otorinolaryngologia, 2003, 2(2), 90-93*

**Słowa kluczowe:** czynniki antyoksydacyjne, brodawczak krtani, rak krtani, żelazo, miedź, cynk, magnez

**Introduction.** The incidence of cancer of larynx has increased over the last years. The pathophysiology of cancers might be related to microelement disequilibrium in the human body.

**Aim.** The aim of the study was to assess the concentration of the antioxidative elements (iron, copper, zinc and magnesium) in blood serum and tissue biopates collected from patients with larynx papilloma or larynx cancer as compared to healthy controls.

**Material and methods.** The study included 30 patients (20 men and 10 women), at the age from 20 to 88 years, divided into three groups: I – 10 patients with mature age larynx papilloma; II – 10 patients with larynx cancer and III – 10 healthy subjects admitted to the hospital for the surgery of nasal septum (controls). Blood samples were collected before surgery, while tissue biopates (biopsy specimens of larynx in the group I and II, and nasal septum in group III) were obtained during the surgery. The concentrations of iron (Fe) copper (Cu), zinc (Zn), and magnesium (Mg) were measured with sequential spectrometry (Spectroflame-M).

**Results.** In the group of patients with cancer, the concentrations of Fe and Cu were significantly higher in the tissue biopates, while the concentrations of the other studied elements were significantly lower in the tissue biopates (Zn and Mg) and blood serum (Zn only) as compared to controls. In patients with larynx papilloma, the concentrations of Fe, Zn and Mg in tissue biopates and Zn in blood serum were significantly lower than in the control group.

**Conclusions.** The results point to significantly disturbed concentrations of the trace elements and metals in patients with larynx papilloma and cancer that could be of consequence in the pathogenesis of those diseases.

*Otorinolaryngologia, 2003, 2(2), 90-93*

**Key words:** antioxidative elements, papilloma of larynx, cancer of larynx, iron, copper, zinc, magnesium

Wpływ pierwiastków śladowych i niektórych metali na proces karcinogenezy został stwierdzony stosunkowo niedawno. Jednakże pierwsze doniesienia na ten temat pojawiły się już pod koniec lat 50, ubiegłego stulecia,

po tym jak Schroeder [wg 1] spostrzegł statystycznie znamiennej korelację pomiędzy twardością wody pitnej a częstością występowania chorób nowotworowych układu oddechowego.

Pierwiastki śladowe mogą wpływając na karcinogenezę chemiczną i indukowaną innymi metalami na drodze interakcji metal-metal (zaburzając m.in. procesy redukcyjno-oksydacyjne), co w konsekwencji może prowadzić do inicjacji procesu nowotworowego [2,3,4,5,6,7].

W ostatnich latach obserwuje się ciągły wzrost zachorowań na raka krtani. Uważa się, że jedną z głównych przyczyn powstawania nowotworów krtani są czynniki karcynogenne, w tym 3,4-benzopiren zawarty w dymie tytoniowym. Inną przyczynę zwiększającą się liczbę zachorowań stanowi nieustanny wzrost chemicznych karcynogenów, wytwarzanych przez człowieka w procesie produkcji przemysłowej. Przyjmuje się obecnie, że co czwarta losowo wybrana do badań substancja chemiczna może indukować powstawanie nowotworów.

We wcześniejszych badaniach analizowano stężenie pierwiastków antyoksydacyjnych w stanach przedrakowych krtani [8,9]. Celem tej pracy była porównawcza ocena stężenia pierwiastków antyoksydacyjnych (żelaza, miedzi, cynku i magnezu) w surowicy krwi i biopłatach tkankowych u chorych z brodawczakiem krtani lub rakiem krtani oraz osób zdrowych.

## BADANI I METODY

### Badani

Badania wykonano u 30 chorych (20 mężczyzn i 10 kobiet) w wieku 20-88 lat (średnia  $59 \pm 0,5$ ), leczonych w Oddziale Laryngologicznym Szpitala Miejskiego w Lubaniu, których podzielono na trzy grupy:

- I – 10 chorych (7 mężczyzn i 3 kobiety) w wieku 43-73 lat (średnia  $59 \pm 0,5$ ) z brodawczakiem krtani wieku dorosłego,
- II – 10 chorych (8 mężczyzn i 2 kobiety) w wieku 42-88 lat (średnia  $66 \pm 0,5$ ) z rakiem krtani.
- III – 10 chorych (5 mężczyzn i 5 kobiet) w wieku 20-41 lat (średnia  $33 \pm 0,5$ ) ze skrzywieniem przegrody nosa, bez innych schorzeń ogólnych i w zakresie nosa, gardła, krtani i uszu (grupa kontrolna).

U chorych grupy I i II histopatologicznie rozpoznano, odpowiednio brodawczaka wieku dorosłego i raka krtani, po uprzednim usunięciu brodawczaka w mikrolaryngoskopii bezpośredniej metodą Kleinsassera oraz raka metodą Retiego. U chorych grupy kontrolnej wykonano operację plastyczną przegrody nosa.

### Metody

Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane od badanych grup chorych przed leczeniem operacyjnym oraz wycinki zmienionych tkanek krtani w przypadku grupy I i grupy II oraz wycinek chrząstki przegrody nosa, w przypadku grupy III (kontrolnej).

Oznaczenia pierwiastków śladowych wykonano w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Do ilościowej analizy składu chemicznego roztworów zastosowano metodę spektrometrii emisyjnej [10] ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-AES). Oznaczenia żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn) i magnezu (Mg) przeprowadzono przy użyciu spektrometru sekwencyjnego Spectroflame-M (prod. Spectro Analytical Instruments - Niemcy) o następujących warunkach pomiarowych: moc – 1,1 kW, częstotliwość – 27,12 MHz, palnik – rozbieralny kwarcowy, gaz zewnętrzny – 14,0 l/min, gaz pośredni – 0,5 l/min, gaz nośny – 1,0 l/min, nebulizer – pneumatyczny typu Meinhard, komora mgielna – typu Scott, zużycie próbki – 1,0 ml/min, siatka dyfrakcyjna – holograficzna 2400 rys/mm, dyspersja odwrotna w pierwszym rzędzie – 0,55 nm/mm, zakres monochromatora – 165-460 nm.

### Statystyka

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, wyliczając wartości minimum, maximum, średnią arytmetyczną  $\bar{x}$  oraz odchylenie standardowe (SD). Do weryfikacji hipotezy statystycznej orzekającej o różnicy wartości oczekiwanych rozkładów prawdopodobieństwa badanych cech w dwóch grupach chorych, zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitney'a [11] na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## WYNIKI

Średnie stężenia żelaza (Fe) w surowicy krwi u pacjentów zawierały się w zakresie od 2,03  $\mu\text{g/ml}$  w grupie I z brodawczakiem krtani do 2,18  $\mu\text{g/ml}$  w grupie II z rakiem krtani i nie różniły się istotnie. Natomiast średnie wartości żelaza w biopłatach tkankowych wynosiły odpowiednio 40,62  $\mu\text{g/g}$  w grupie I, 80,59  $\mu\text{g/g}$  w grupie II oraz 62,07  $\mu\text{g/g}$  w grupie III. Różnice między grupami były znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Szczegółowe wyniki oceny stężenia żelaza w surowicy krwi i biopłatach tkankowych podano w tab. I.

Tabela I. Stężenie żelaza (Fe) w surowicy krwi i biopłatach tkankowych u badanych chorych

Grupa	Wartości Fe w surowicy krwi w $\mu\text{g/ml}$				Wartości Fe w biopłatach w $\mu\text{g/g}$				Liczba chorych
	min.	max.	$\bar{x}$	SD	min.	max.	$\bar{x}$	SD	
I brodawczak krtani	0,66	3,89	2,03	0,54	20,73	72,58	40,62	0,58	10
II rak krtani	0,99	5,56	2,18	0,84	19,02	172,03	80,59	21,01	10
III kontrolna	1,01	3,41	2,13	0,39	12,46	280,20	62,07	1,19	10

\* Średnie stężenia żelaza różnią się istotnie statystycznie między grupą I a III, I a II oraz II a III ( $p < 0,05$ )

Tabela II przedstawia stężenia miedzi (Cu) w surowicy krwi i w biopsjach tkankowych u badanych chorych.

Średnie stężenia miedzi w surowicy krwi były zbliżone i wynosiły 0,92  $\mu\text{g/ml}$  w grupie kontrolnej, 0,83  $\mu\text{g/ml}$  u dorosłych z brodawczakiem krtani oraz 1,13  $\mu\text{g/ml}$  u chorych z rakiem krtani. Różnice między grupami nie były istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ). Natomiast średnie wartości miedzi w biopsjach tkankowych chorych z rakiem krtani (4,08  $\mu\text{g/g}$ ) była istotnie wyższa zarówno w porównaniu z grupą chorych z brodawczakiem krtani (1,89  $\mu\text{g/g}$ ), jak i z grupą kontrolną (1,61  $\mu\text{g/g}$ ).

Tabela II. Stężenie miedzi (Cu) w surowicy krwi i biopsjach tkankowych u badanych chorych

Grupa	Wartości Cu w surowicy krwi w $\mu\text{g/ml}$				Wartości Cu w biopsjach w $\mu\text{g/g}$				Liczba chorych
	min.	max.	x	SD	min.	max.	x'	SD	
I brodawczak krtani	0,47	1,38	0,83	0,30	0,16	4,63	1,89	0,98	10
II rak krtani	0,79	1,44	1,13	0,19	0,16	4,63	1,89	0,98	10
III kontrolna	0,74	1,14	0,92	0,12	0,01	10,49	1,61	2,21	10

\* średnie stężenia miedzi w biopsjach osób grupy II jest istotnie wyższe w porównaniu z grupą I oraz grupą III ( $p < 0,05$ )

Stężenia cynku (Zn) w surowicy krwi i w biopsjach tkankowych u badanych chorych przedstawiono w tab. III.

Średnie wartości Zn w surowicy krwi wynosiły 0,40  $\mu\text{g/ml}$ , 0,31  $\mu\text{g/ml}$  i 0,69  $\mu\text{g/ml}$  odpowiednio w grupie I, II i III. Natomiast zawartość Zn w biopsjach tkankowych wynosiła średnio 4,24  $\mu\text{g/g}$ , 3,18  $\mu\text{g/g}$  i 15,71  $\mu\text{g/g}$  odpowiednio w grupie I, II i III.

Zarówno w surowicy krwi, jak i w biopsjach tkankowych średnie wartości stężenia cynku w grupie I z brodawczakiem krtani i w grupie II z rakiem krtani były znacznie niższe niż w grupie kontrolnej i statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ).

Tabela III. Stężenie cynku (Zn) w surowicy krwi i biopsjach tkankowych u badanych chorych

Grupa	Wartości Zn w surowicy krwi w $\mu\text{g/ml}$				Wartości Zn w biopsjach w $\mu\text{g/g}$				Liczba chorych
	min.	max.	x'	SD	min.	max.	x'	SD	
I brodawczak krtani	0,21	0,64	0,40	0,37	1,71	7,65	4,24	0,61	10
II rak krtani	0,24	0,37	0,31	0,15	0,94	6,59	3,18	0,78	10
III kontrolna	0,36	1,05	0,69	0,33x	0,05	42,70	15,71	0,81	10

\* zarówno w surowicy krwi, jak i w biopsjach stężenie cynku jest istotnie niższe w grupach I i II w porównaniu z grupą III ( $p < 0,05$ )

Średnie wartości stężenia magnezu (Mg) w surowicy krwi u badanych chorych były zbliżone (wahały się od 11,41  $\mu\text{g/ml}$  w grupie II do 14,79  $\mu\text{g/ml}$  w grupie III) i nie różniły się statystycznie (tab. IV). Natomiast średnie stężenia Mg w biopsjach tkankowych w grupie I (33,53  $\mu\text{g/ml}$ ), a zwłaszcza II (3,46  $\mu\text{g/ml}$ ) były znacznie niższe niż w grupie III (242,09  $\mu\text{g/ml}$ ), a różnice między nimi znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Tabela IV. Stężenie magnezu (Mg) w surowicy krwi i biopsjach tkankowych u badanych chorych

Grupa	Wartości Mg w surowicy krwi w $\mu\text{g/ml}$				Wartości Mg w biopsjach w $\mu\text{g/g}$				Liczba chorych
	min.	max.	x	SD	min.	max.	x'	SD	
I brodawczak krtani	10,62	16,24	11,41	0,13	5,30	55,17	33,53	0,56	10
II rak krtani	10,49	15,04	12,86	0,14	1,13	6,89	3,46	0,98	10
III kontrolna	13,35	16,72	14,79	0,06	68,92	962,00	242,09	1,07	10

\* różne stężenia w biopsjach tkankowych grupy I i grupy II jest istotnie niższe niż w grupie III ( $p < 0,05$ )

## OMÓWIENIE

Pierwiastkami odpowiedzialnymi za utrzymanie bariery antyoksydacyjnej u człowieka są: żelazo, cynk, miedź i magnez. Uzyskane wyniki wykazały niższe (o 34,6%) stężenie żelaza w biopsjach tkankowych u chorych grupy I z brodawczakiem krtani wieku dorosłego w porównaniu z kontrolną, natomiast wyższe (o 29,8%) w grupie II z rakiem krtani w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wielu autorów zalicza żelazo do czynników sprzyjających powstawaniu raka u ludzi i zwierząt [1]. W badaniach prowadzonych na chomikach syryjskich stwierdzono powstawanie nowotworów górnych dróg oddechowych po inhalacji  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Badania nad jego rozdziałem przed lub podczas podziału komórkowego wskazują na możliwość niekontrolowanej proliferacji [5]. Mechanizm tego procesu łączy się z błędnym rozdziałem indukowanym przez żelazo.

Oznaczenia stężenia cynku w surowicy krwi i w biopsjach tkankowych wykazały istotnie niższe wartości tego pierwiastka zarówno u chorych grupy I (o 42,0% i 55,1% odpowiednio w surowicy krwi i biopsjach), jak i w grupie II z rakiem krtani (o 270,5% i 394,0%) w odniesieniu do grupy kontrolnej. Niedobór cynku hamuje powstawanie witaminy A, co może wzmacniać procesy nowotworzenia [4]. Przy niedoborze tego pierwiastka zostaje również upośledzona synteza przeciwciał humoralnych, co koreluje z funkcją limfocytów T „helper” i zmniejsza aktywność komórek „killer”. Ponadto cynk obniża poziom ceruloplazminy i miedzi w surowicy. Jego obecność jest istotna dla rozwoju grasicy, która pełni ważną

rolę regulacyjną w syntezie przeciwciał, szczególnie IgG [5]. Obniżone stężenie cynku w surowicy krwi u badanych chorych wpływać może na zmniejszenie enzymatycznej aktywności antyoksydacyjnej, co potwierdzają badania Zalewskiego i wsp. [12].

Stężenia miedzi w surowicy krwi nie różniły się statystycznie między grupami, natomiast w biopłatach tkankowych stwierdzono istotny wzrost tego pierwiastka o 153,4% u chorych z rakiem krtani. Wiele prac sugeruje, że karcynogenne właściwości miedzi związane są z zaburzeniami syntezy DNA, przy czym mechanizm ten polega na wypieraniu cynku, który jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu biosyntezy DNA [14] Magalova i wsp. [15] wyjaśniają wzrost poziomu miedzi w surowicy krwi w przebiegu chorób nowotworowych związkiem z uszkodzeniem metabolizmu ceruloplazminy.

Przeciwnie do stężenia Cu, średnie stężenie magnezu w biopłatach tkankowych było istotnie niższe w grupie I (622,0%), a zwłaszcza w grupie II (6896,8%) w odniesieniu do grupy kontrolnej. Magnez wykazuje regulacyjną rolę w stosunku do procesów pro- i antyoksydacyjnych. Prawdopodobnie pierwiastek ten jest niezbędnym katalizatorem syntezy zredukowanej postaci glutationu (GSH). Spadek stężenia magnezu w biopłatach tkankowych chorych ze stanami przedrakowymi krtani powoduje spadek enzymatycznej aktywności antyoksydacyjnej, na co wskazują również inni autorzy [16].

Uzyskane w pracy wyniki zgodne z wcześniejszymi doniesieniami sugerowałyby zatem istnienie wskazań do stosowania farmakoterapii w postaci preparatów cynku i magnezu, jako dodatkowego czynnika, w profilaktyce stanów przedrakowych krtani [13, 14].

## Piśmiennictwo

1. Rostkowska B. Badania nad zawartością pierwiastków śladowych u chorych na raka krtani. Praca doktorska. AM Wrocław 1989.
2. Adamska-Dyniewska M. Stężenie metali śladowych (Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb) we krwi zdrowych mieszkańców miasta. Biul WAM 1983; 26: 281-286.
3. Abdel-Mageed AB, Oehme FW. A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron. J Toxicol 1990; 32: 34-39.
4. Aleksandrowicz J. Biopierwiastki w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Folia Med Cracov 1983; 24: 265-271.
5. Andrijewski M. Stężenie wybranych pierwiastków śladowych oraz niektóre elementy bariery antyoksydacyjnej we krwi i tkankach u kobiet z rakiem sutka. Praca doktorska. WAM Łódź 1997.
6. Chmielnicka J, Sowa B. Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein and ceruloplasmin in pregnant rats and fetuses. Ecotoxicol Environ Saf. 1996; 35: 277-282.
7. Jayadeep A, Pillai KR, Kannan S. i wsp. Serum levels of copper, zinc, iron and ceruloplasmin in leukoplakia and squamous cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 1997; 16: 295-302.
8. Latusiński J, Olszewski J, Buhl F., Kita A. Ocena stężenia pierwiastków antyoksydacyjnych w surowicy krwi i w biopłatach tkankowych u chorych ze stanami przedrakowymi krtani. Przegl Wojskowo-Medyczny 2001; 43, 1:19-27.
9. Latusiński J. Badania nad zawartością pierwiastków śladowych u chorych w stanach przedrakowych krtani. Praca doktorska. WAM Łódź 2001
10. Nowak R, Mordalski J, Halbersztadt D. Opracowanie metody spektrometrii plazmowej do oznaczania zawartości pierwiastków w rudach, półproduktach i materiałach odpadowych. Kombinat Górniczo-Hutniczy Miedzi Lubin 1982.
11. Sawicki F. Elementy statystyki dla lekarzy. PZWL Warszawa 1982.
12. Zalewski P, Olszewski J, Błaszczak J, Kędziora J. Antyoksydacyjna aktywność enzymatyczna we krwi obwodowej chorych z przewlekłym przerostowym zapaleniem zatok szczękowych i krtani oraz rakiem krtani. Otolaryng Pol 2000; 54:141-147.
13. Kręcicki T, Zaleska-Kręcicka M. Stany przedrakowe krtani w aspekcie klinicznym i histopatologicznym. Otolaryng Pol 1994; 48, Supl 16: 194-199.
14. Sonnenberg Z, Olszewska A. Stany przedrakowe krtani. Servier Polska Warszawa 1999.
15. Magalova T, Beno I, Brtkova A. i wsp. Levels of Cu, Zn, Se and their relation to levels ceruloplasmin and the activity of antioxidative enzymes. Bratisl Lek Listy 1997; 98: 8 -14.
16. Hennekens CH. Antioxidant vitamins and cancer. Am J Med 1994; 97: 2-10.