



Ocena aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w krwinkach czerwonych jako czynnika ryzyka w nowotworach jamy ustnej

Rating superoxide dismutase in red blood cells,
and the risk factors in cancers of the oral cavity

Katarzyna Malinowska¹, Alina Morawiec-Sztandera², Ireneusz Majster-
rek¹, Dariusz Kaczmarczyk², Roman Modranka³, Małgorzata Majczyk⁴,
Jan Błaszczuk⁴

¹ Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Klinika Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³ Katedra Kosmetologii, Społeczna Akademia Nauk, filia w Warszawie

⁴ Zakład Fizjologii Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

¹ PhD; Department of Clinical Chemistry and Biochemistry, Medical University of Lodz

² Department of Head and Neck Neoplasms Surgery, Medical University of Lodz

³ Department of Cosmetology, University of Social Sciences, agency in Warsaw

⁴ Department of Physiology Medical University of Lodz

STRESZCZENIE

Wstęp

Zachorowalność na nowotwory jamy ustnej stanowi poważny problem medyczny i socjoekonomiczny w większości krajów na świecie i ma ogromny wpływ na jakość życia pacjentów. Przyczyna, dla której to schorzenie rozwija się u jednych ludzi, u innych zaś nie, nadal pozostaje nieznana. Nowotwór jamy ustnej to nowotwór złośliwy i jeden z najczęściej występujących nowotworów głowy i szyi.

Cel pracy

Celem pracy była ocena dysmutazy ponadtlenkowej CuZn-SOD u chorych z rozpoznaniem nowotworem jamy ustnej w porównaniu z osobami zdrowymi oraz zbadanie zależności czynników ryzyka w nowotworach głowy i szyi.

Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzane były za zgodą Komisji Bioetyki RNN/142/09/KB. Badania były prowadzone w grupie 40 chorych z rozpoznaniem nowotworem jamy ustnej w wieku $46 \pm 12,60$ oraz z 40 osób z grupy kontrolnej $47 \pm 17,90$.

Wyniki

W badaniach zanotowano, iż w krwinkach czerwonych chorych na nowotwór jamy ustnej następuje zwiększenie aktywności SOD w porównaniu z grupą kontrolną. Z pracy wynika, że zarówno palenie papierosów, jak i płeć mają wpływ na zwiększenie zachorowalności: tytoń ($p=0,005$) oraz płeć męska ($p=0,05$).

Wnioski

Wyniki badań jednoznacznie potwierdzają udział wolnych rodników w rozwoju choroby nowotworowej. Ryzyko zachorowania na raka jamy ustnej wśród palaczy jest zdecydowanie wyższe niż wśród niepalących.

Słowa kluczowe

katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, rak jamy ustnej, alkohol, tytoń

Abstract

The incidence of oral cancer is a serious medical problem and socioeconomic in most countries in the world and has a huge impact on the quality of life of patients. The reason why this disease develops and at some people, in others not, remains unknown. Oral cancer is a malignant tumor and is one of the most common cancers of the head and neck.

The aim of the study was to evaluate superoxide dismutase CuZn-SOD in patients diagnosed with oral cancer compared to healthy subjects. Depending investigate the risk factors of developing this type of cancer.

Material and Methods

Experiments were carried out with the approval of the Bioethics Committee RNN/142/09/KB study was conducted in a group of 40 patients diagnosed with oral cancer at the age of 46 ± 12.60 , and 40 in the control group 47 ± 17.90 .

Results

The study reported that the red blood cells of patients with oral cancer following an increase in SOD activity as compared to the control group. In operation it shows that both smoking, and gender affect morbidity, tobacco ($p=0.005$) and male ($p=0.06$).

Conclusions

The results clearly support the participation of free radicals in cancer. The risk of developing oral cancer among smokers is much higher than among non-smokers.

Keyword

superoxide dismutase, oral cancer, alcohol, tobacco

Wstęp

Nowotwory jamy ustnej stanowią ważny problem współczesnej cywilizacji, a częstość ich występowania w ostatnich latach znacząco wzrasta. Rak jamy ustnej zaliczany jest do złośliwych nowotworów, występuje w obrębie warg i tylnej ściany gardła oraz wewnętrznej części jamy ustnej. Nowotwór ten charakteryzuje się dużą dynamiką rozwoju i złośliwością kliniczną. Badania nad etiopatogenezą tej grupy nowotworów prowadzone są od wielu lat, jednak dopiero w drugiej połowie ubiegłego stulecia uwagę zwróciła zapalna teoria ich powstawania [1]. Nowotwór ten występuje głównie u mężczyzn zwykle nadużywających alkoholu i palących papierosy. W krajach europejskich liczba mężczyzn, u których wykryto nowotwór jamy ustnej, ciągle przewyższa liczbę kobiet, inaczej jest w krajach azjatyckich, w których zachorowalność kobiet i mężczyzn jest taka sama [2,3]. W epidemiologii raka jamy ustnej duże znaczenie mają następujące czynniki ryzyka: palenie papierosów, nadużywanie alkoholu, niedobór ryboflawiny oraz żelaza [4]. Do innych czynników ryzyka zaliczamy: złą higienę jamy ustnej oraz zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) [5,6,7]. Nałóg spożywania tytoniu powoduje mniej więcej pięciokrotnie częstsze występowanie raka jamy ustnej niż u osób niemających nałogu tytoniowego. Duże znaczenie ma również fakt, że wielu palaczy nadużywa jednocześnie alkoholu i tytoniu. Ta grupa osób jest bardziej narażona na zachorowanie na nowotwory [4]. Z danych literaturowych wynika, że więcej nowotworów jamy ustnej występuje u osób, które zaniedbują higienę jamy ustnej [8]. Grupa ta charakteryzuje się zachorowaniem na raka płaskonabłonkowego. Stanowi on ok. 90% wszystkich nowotworów. Rzadziej występującymi nowotworami w jamie ustnej są rak gruczołowy oraz raki charakterystyczne dla gruczołów ślinowych [8,9].

Sprawne funkcjonowanie naszego organizmu zapewnia odpowiedni poziom enzymów antyoksydacyjnych, a zaburzenia w ich aktywności mogą się przyczyniać do powstawania różnorodnych chorób, np. choroby nowotworowe czy stwardnienie zanikowe. Dysmutazy ponadtlenkowe należą do grupy enzymów, które katalizują reakcję dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych. Klasyfikujemy je pod względem miejsca ich lokalizacji oraz kofaktora. Cu/ZnSOD (SOD-1) – miedziowo-cynkowa, MnSOD (SOD-2) – manganowa, mitochondrialna, EC-Cu/ZnSOD (SOD-3) – miedziowo-cynkowa³, Fe-SOD – żelazowa, Ni-SOD – niklowa. Dru-

gim enzymem z tej grupy jest peroksydaza glutationowa, odpowiedzialna za rozkład większości powstającego nadtlenu wodoru w komórkach. Katalaza z kolei odpowiada za redukcję H_2O_2 powstającego w reakcjach katalizowanych przez dysmutazę ponadtlenkową oraz reakcje nieenzymatyczne, należy do enzymów wewnątrzkomórkowych [10–14].

Celem pracy było określenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, w krwinkach czerwonych chorych cierpiących na nowotwór jamy ustnej oraz u osób zdrowych w zależności od czynników ryzyka: palenia tytoniu i spożywania alkoholu.

Materiał i metody

Grupy badane

Do badań zakwalifikowano 40 osób z nowotworem jamy ustnej (średnia wieku wynosiła $46 \pm 12,60$) w tym 29 mężczyzn i 11 kobiet. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe ($n=40$), bez stanów zapalnych (średnia wieku wynosiła $47 \pm 17,90$) – 20 kobiet i 20 mężczyzn. Do badań wykorzystano krew obwodową w ilości 5 ml (na EDTA) z żyły odłokciowej.

Cały materiał uzyskano z Oddziału Laryngologii Onkologicznej UM w Łodzi. Wszyscy pacjenci wyrazili pisemną zgodę na przeprowadzenie doświadczeń biologicznych. Badania zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, opatrzone numerem RNN/142/09/KB.

Hemoglobina (Hb) [15]

Stężenie hemoglobiny (Hb) w hemolizatach krwi oznaczano metodą Drabkina. Odczynnik ten wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 540 nm. Intensywność zabarwienia powstającego związku jest proporcjonalna do stężenia hemoglobiny.

Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w krwinkach czerwonych [16]

Zasada metody określenia dysmutazy ponadtlenkowej oparta jest na zjawisku hamowania przez enzym reakcji samoutlenienia adrenaliny do adrenochromu w środowisku zasadowym. Do pomiaru aktywności CuZn-SOD w badanych próbkach wykorzystywano wcześniej przygotowany hemolizat rozcieńczony dwukrotnie. Do 0,1 ml hemolizatu dodawano 0,9 ml wody redestylowanej oziębionej do temperatury $+4^\circ C$, 0,5 ml

96% alkoholu etylowego i 0,25 ml chloroformu. Mieszaninę wstrząsano przez 2 minuty w zamkniętych korkiem probówkach. Probówki wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem 4200xG w temperaturze +4°C w wirówce Beckmana L7. Po odwirowaniu otrzymano dwie warstwy: górną – zawierającą supernatant z enzymem oraz dolną – zawierającą zdenaturowaną hemoglobinę oraz chloroform. W następnym etapie przygotowano właściwą mieszaninę reakcyjną. Do próby kontrolnej dodawano: 2,9 ml 0,05 M buforu węglanowego o pH 10,2 oraz 0,1 ml roztworu adrenaliny w 0,01 N HCl o pH 2,0. Próba badana zawierała: 2,8 ml 0,05 M buforu węglanowego o pH 10,2, 0,1 ml supernatantu zawierającego dysmutazę ponadtlenkową oraz 0,1 roztworu adrenaliny w 0,01 N HCl o pH 2,0. Pomiarów zmian absorbancji dokonywano przy długości fali 480 nm na spektrofotometrze Beckman DU-650, w temperaturze 37°C wobec próby ślepej, którą stanowił 0,05 M-bufor węglanowy o pH 10,2. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej określano w jednonminutowych przedziałach czasowych na podstawie zmian absorbancji w próbce zawierającej enzym, odnoszonych do analogicznych czasowych zmian pochłaniania w próbce kontrolnej, gdzie powinny one wynosić 0,025 jednostki absorbancji na minutę.

Jednostkę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w opisanych warunkach definiujemy jako tę ilość enzymu, która powoduje 50% hamowania reakcji przy maksymalnym przyroście absorbancji o 0,025 jednostki na minutę na prostoliniowym odcinku krzywej ilustrującej powstawanie adrenochromu.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w badanych próbkach wyrażano w jednostkach adrenalinowych [U/gHb/100mL].

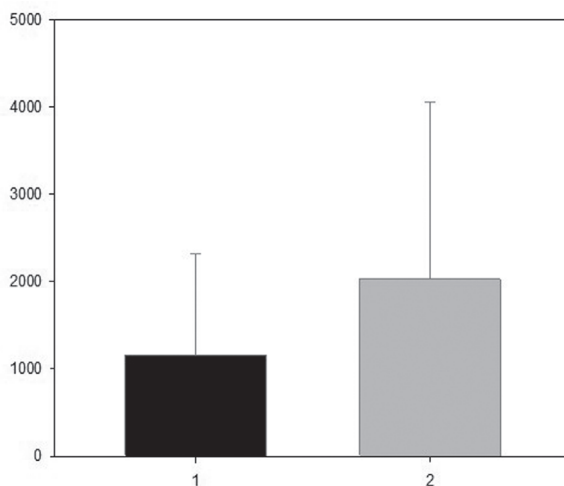
Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica 6.0.

Wyniki

U osób chorych z rozpoznaniem nowotworem jamy ustnej aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w krwinkach czerwonych wyniosła średnio $2023,87 \pm 326,37$ U/gHb/100 ml, natomiast u osób zdrowych (grupa kontrolna) aktywność CuZn-SOD wyniosła średnio $1155,25 \pm 466,90$ U/gHb/100 ml, $p < 0,05$ (Rycina 1).

Z porównania danych klinicznych dowiedliśmy między grupami, że palenie tytoniu ($p=0,005$) oraz płeć męska ($p=0,05$) były czynnikami ry-

zyka choroby. 49 (61,25%) uczestników stanowili mężczyźni (29 pacjentów oraz 20 kontroli) i 31 (38,75%) stanowiły kobiety (11 pacjentek i 20 kontroli) (Tabela 1).



Rycina 1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (aktywność enzymu [U/g Hb/100ml]) w grupie kontrolnej 1 i grupie badanej 2, $p < 0,005$

Figure 1. The activity of superoxide dismutase (enzyme activity [U/g Hb/100 ml]) in the control group 1 and the test group 2, $p < 0,005$

Tabela 1. Wpływ wieku, alkoholu oraz tytoniu na choroby jamy ustnej

Table 1. Effects of age, alcohol and tobacco diseases of the oral cavity

Zmienne	Pacjenci (%)	Kontrola (%)	OR (95%CI)	p
Palenie tytoniu				
Nie	23 (57,50)	35 (87,50)	Ref. 5.1734 (1.676-15.975)	0.005
Tak	17 (42,50)	5 (12,50)		
Konsumpcja alkoholu				
Nie	7 (17,50)	11 (27,50)	Ref. 1.788 (0.6128-5.218)	0.42
Tak	33 (82,50)	29 (72,50)		
Płeć				
Kobiety	11 (27,50)	20 (50)	Ref. 2.636 (1.037-6.685)	0.05
Mężczyźni	29 (72,50)	20 (50)		

Omówienie

Prawie 85% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem jamy ustnej to osoby uzależnione od alkoholu i tytoniu lub obu tych czynników równocześnie [1,8,9]. W ostatnich latach podnoszona jest rola zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego w etiopatogenezie nowotworów złośliwych jamy ustnej. Profilaktyka nowotworów jamy ustnej jest niewystarczająca. Programy Europejskie, które w ostatnich latach pomagają propagować zachowania prozdrowotne oraz badania profilaktyczne w znacznym stopniu mogą poprawić statystyki wykrywalności nowotworów jamy ustnej we wczesnym stadium zaawansowania choroby, ale także stanów przedrakowych. Leczenie stanów przedrakowych takich jak: liszaj czy leukoplakia w jamie ustnej może się przyczynić do zmniejszenia liczby chorych na raka jamy ustnej [17]. Uświadomienie czynników ryzyka, takich jak tytoń i alkohol wysokoprocentowy, ale także czynników dietetycznych może mieć znaczenie w profilaktyce tych nowotworów. Predyspozycje genetyczne mogą mieć także znaczenie w powstawaniu nowotworów jamy ustnej, gdyż nie wszyscy palacze czy alkoholicy zapadają na nowotwory i nie wszyscy pacjenci z chorobą nowotworową mają takie nałogi [18-21]. Celem omawianej pracy było zbadanie, czy choroba nowotworowa jamy ustnej ma wpływ na zmiany statusu antyoksydacyjnego oraz czy wybrane czynniki ryzyka mają związek z zachorowaniem na nowotwór. Interpretując wyniki uzyskane w toku pracy, stwierdzono, że u osób z rozpoznaniem nowotworem jamy ustnej aktywność dysmutazy ponadtlenkowej jest znacznie wyższa niż u osób zdrowych. Ponadto dowiedziono, że niektóre z wymienionych czynników ryzyka mają wpływ na zachorowanie na ten rodzaj nowotworu. Z badań autorów wynika również, iż płęć męska jest bardziej narażona na zachorowalność na ten typ raka. Aktualny stan wiedzy pozwala stwierdzić, iż rozwój i funkcjonowanie różnych komórek mogą być regulowane zarówno przez formy enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne. Do takich form zaliczamy witaminy oraz makro- i mikroelementy. W przyszłości może to okazać się skuteczną metodą zmniejszania ryzyka zachorowania na nowotwory [14].

Dane literaturowe ostatnich lat dowodzą istnienia zależności pomiędzy oddziaływaniem reaktywnych form tlenu (RFT), a powstawaniem niektórych chorób. Zielińska i wsp. w swojej pracy pokazali, iż aktywność SOD (U/gHb/100 ml) nie była statystycznie znacząca (2671.1 ± 470.8 vs 2747.2 ± 387.9 ; $P > 0,05$) u osób z polipami nosa [22]. Karlidag i wsp. po-

informowali, że aktywność SOD osób z nowotworami głowy i szyi była niższa u chorych niż w grupie kontrolnej. Inni autorzy udokumentowali związek izoenzymów SOD, SOD1(CuZnSOD) i SOD3 (zewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej) w tkankach polipów w stosunku do tkanek kontrolnych osób bez polipów [23].

Wnioski

1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w grupie badanej jest znacznie wyższa niż w grupie kontrolnej.
2. Ryzyko zachorowania na raka jamy ustnej wśród palaczy jest zdecydowanie wyższe niż wśród niepalących.
3. Stwierdzono większe ryzyko zachorowalności na ten rodzaj nowotworu wśród mężczyzn.

Literatura

1. Niu YM, Deng MH, Chen W, Zeng XT, Luo J. MTHFR C677T gene polymorphism and head and neck cancer risk a meta-analysis based on 23 publications. *Dis Markers* 2015; 2015: 681313. doi: 10.1155/2015/681313.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2005; 55(2):74–108.
3. Ferlay J, Shin RH, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2008; 127: 2893–2917.
4. Wang Y, Guo W, He Y et al. Association of MTHFR C677T and SHMT1 C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer Causes Control* 2007; 18: 143–152.
5. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *Journal of Dental Research* 2007; 86(2): 104–114.

6. Argiris A, Karamouzis VM, Raben D, Ferris LN. Head and neck cancer. *The Lancet* 2008; 371: 1695–1709.
7. Blount BC, Mack MM, Wehr CM. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94(7): 3290–3295.
8. Serefoglou Z, Yapijakis C, Nkenke E, Vairaktaris E: Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008; 44: 1093–1099.
9. Canova C, Hashibe M, Simonato L et al. Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 european countries: the arcage project. *Cancer Res* 2009; 69: 2956–2965.
10. Kubiak K, Malinowska K, Langner E et al. Wpływ związków koordynacyjnych Cu(II) na aktywność enzymów antyoksydacyjnych katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej u chorych na raka jelita grubego. *Pol Prz Chir* 2011; 83: 282–292.
11. Malinowska K, Modranka R. Wpływ związków chromonu na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych u chorych ograniczonych ruchowo. *PML* 2010; 163: 26–28.
12. Kubiak K, Klimczak A, Dziki Ł. Synthesis and pro-antioxidant properties of Cu(II) complexes with pyrazole ligands. *PML* 2010;163: 22–25.
13. Malinowska K, Misiak P, Modranka R et al. Właściwości biologiczne kompleksu benzopirany z Pt (II). *Pol Prz Chir* 2014; 86(4): 299-311.
- 14 Misiak P, Wcislo S, Rzepkowska-Misiak B, Dziwińska K, Malinowska K, Majsterek I. Evaluation of the impact of radical resection of the tumor in patients with lung cancer at the level of activity of selected antioxidant enzymes. *Kardiochir Torakochir Pol* 2014; 11(4): 414-420.

15. Van Kampen E, Zijlstra G. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. *Clin Chim Acta* 1961; 6: 538–544.
16. Misra P, Fridovich J. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for the superoxide dismutases. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–3175.
17. Marcu LG, Yeoh E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1303–1314.
18. Galbiatti ALS, Ruiz MT, Pinto DR et al. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Mol Biol Rep* 2010; 38:1071–1078.
19. Ishiguro S, Sasazuki S, Inoue M, Kurahashia N, Iwasakia M, Tsugane S. Effect of alcohol consumption, cigarette smoking and flushing response on esophageal cancer risk: A populationbased cohort study (JPHC study). *Cancer Lett* 2009; 275: 240–246.
20. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–1709.
21. Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. *Mutat Res* 2008; 656:74–81.
22. Zielińska-Bliźniewska H, Mrowicka M, Olszewski J, Majsterek I. Evaluation of selected indicators of antioxidant status in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Pol* 2015; 69(5): 44–50.
23. Karlidag R, Unal S, Sezer OH et al. The role of oxidative stress in postoperative delirium. *Gen Hosp Psychiatry* 2006; 28(5): 418–423.

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Katarzyna Malinowska

PhD; Department of Clinical Chemistry and Biochemistry

Medical University of Lodz; pl. Hallera 1, 90-647, Lodz, Poland

tel.: +48 42 6393306, fax: +4842 6331113

e-mail: katarzyna.malinowska@umed.lodz.pl

CC-BY-SA 3.0 PL