

**Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**

mgr farm. Anna Woźniak

**Materiały alternatywne w ocenie zaburzeń poziomów
metali niezbędnych i toksycznych u pacjentów
z nowotworami głowy i szyi**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Pracę wykonano w Laboratorium Badań Środowiskowych
Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Promotor: prof. dr hab. Ewa Florek

Poznań 2015

Serdecznie dziękuję

Pani prof. dr hab. Jadwidze Jodynis – Liebert

*za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej w Katedrze i Zakładzie Toksykologii
UMiKM w Poznaniu*

Serdecznie dziękuję

Pani Promotor prof. dr hab. Ewie Florek

za nieocenioną pomoc, życzliwość, opiekę naukową

oraz cenne wskazówki merytoryczne przy realizacji niniejszej pracy

*Serdecznie dziękuję
Pracownikom Laboratorium Badań Środowiskowych
Katedry i Zakładu Toksykologii UMiKM w Poznaniu
za życzliwą atmosferę i pomoc podczas prowadzenia badań*

*Pracę dedykuję Mężowi i Rodzicom
w podziękowaniu za okazane zrozumienie i wsparcie
podczas pisania pracy*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	12
2. Część teoretyczna	14
2.1. Epidemiologia	14
2.2. Czynniki ryzyka	27
2.2.1. Tytoń	27
2.2.2. Alkohol	30
2.2.3. Alkohol i tytoń	32
2.2.4. Dieta	34
2.3. Pierwiastki niezbędne i metale toksyczne – wprowadzenie	36
2.3.1. Wapń	37
2.3.1.1. Ogólna charakterystyka	37
2.3.1.2. Wapń w organizmie	37
2.3.1.3. Diagnostyka zaburzeń	39
2.3.2. Magnez	40
2.3.2.1. Ogólna charakterystyka	40
2.3.2.2. Magnez w organizmie	41
2.3.2.3. Diagnostyka zaburzeń	42
2.3.3. Cynk	44
2.3.3.1. Ogólna charakterystyka	44
2.3.3.2. Cynk w organizmie	45
2.3.3.3. Diagnostyka zaburzeń	46
2.3.4. Miedź	47
2.3.4.1. Ogólna charakterystyka	47
2.3.4.2. Miedź w organizmie	48
2.3.4.3. Diagnostyka zaburzeń	49
2.3.5. Żelazo	51
2.3.5.1. Ogólna charakterystyka	51
2.3.5.2. Żelazo w organizmie	51
2.3.5.3. Diagnostyka zaburzeń	53
2.3.6. Mangan	55
2.3.6.1. Ogólna charakterystyka	55
2.3.6.2. Mangan w organizmie	55
2.3.6.3. Diagnostyka zaburzeń	56
2.3.7. Ołów	58
2.3.7.1. Ogólna charakterystyka	58
2.3.7.2. Ołów w organizmie	59
2.3.7.3. Diagnostyka zaburzeń	60
2.3.8. Kadm	62
2.3.8.1. Ogólna charakterystyka	62
2.3.8.2. Kadm w organizmie	62
2.3.8.3. Diagnostyka zaburzeń	63
2.3.9. Kobalt	65
2.3.9.1. Ogólna charakterystyka	65
2.3.9.2. Kobalt w organizmie	65
2.3.9.3. Diagnostyka zaburzeń	66
2.3.10. Chrom	69
2.3.10.1. Ogólna charakterystyka	69
2.3.10.2. Chrom w organizmie	69

2.3.10.3. Diagnostyka zaburzeń	70
2.4. Włosy	72
2.5. Paznokcie	74
2.6. Analiza włosów, paznokci i ich zastosowanie	75
3. Cel pracy	78
4. Część doświadczalna	79
4.1. Materiał i metody	79
4.1.1. Grupa badana	79
4.1.2. Informacja dla pacjenta i zgoda na udział w badaniu	79
4.1.3. Kwestionariusz ankiety	82
4.1.4. Materiał biologiczny do badań	87
4.1.5. Materiał odniesienia	87
4.1.6. Przygotowanie do badań materiału odniesienia	88
4.1.7. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	89
4.1.8. Odczynniki i roztwory	90
4.1.9. Tok postępowania	91
4.1.9.1. Mycie i suszenie próbek włosów i paznokci	91
4.1.9.2. Mineralizacja włosów i paznokci	92
4.1.9.3. Oznaczanie metali w surowicy krwi, włosach i paznokciach techniką plazmy sprzężonej indukcyjnie – ICP-OES i ICP-MS	93
4.2. Walidacja metody	98
4.2.1. Dokładność metody	98
4.2.2. Precyzja metody	99
4.2.3. Granica oznaczalności (LOQ) i wykrywalności metody (LOD)	100
4.2.4. Zakres zależności kalibracyjnej	101
4.3. Metody statystyczne i chemometryczne – zastosowane testy	102
5. Wyniki	103
5.1. Analiza wyników badań ankietowych	103
5.2. Statystyczna i chemometryczna analiza wyników	117
5.2.1. Surowica krwi	117
5.2.1.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną	117
5.2.1.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową	124
5.2.1.3. Analiza skupień	131
5.2.1.4. Analiza dyskryminacyjna	138
5.2.2. Włosy	147
5.2.2.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną	147
5.2.2.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową	155
5.2.2.3. Analiza skupień	161

5.2.2.4. Analiza dyskryminacyjna	168
5.2.3. Paznokcie	176
5.2.3.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną	176
5.2.3.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową	184
5.2.3.3. Analiza skupień	190
5.2.3.4. Analiza dyskryminacyjna	197
5.2.4. Porównanie pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych pomiędzy surowicą krwi a materiałami alternatywnymi w grupach pacjentów z nowotworem ślinianek, gardła, jamy usnej, szyi i migdałków oraz grupą kontrolną nienowotworową	205
6. Dyskusja	211
7. Wnioski	237
8. Streszczenie	238
9. Summary	241
10. Piśmiennictwo	244
11. Spis Rycin	263
12. Spis Tabel	268
13. Oświadczenia autora	271

Słowa kluczowe: nowotwory głowy i szyi, metale, tytoń, alkohol, krew, włosy, paznokcie

Key words: head and neck cancer, metals, tobacco, alcohol, blood, hair, nails

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

SCC - Rak płaskonabłonkowy (ang. *Squamous Cell Carcinoma*)

HPV - Wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papillomavirus*)

BMI - Wskaźnik masy ciała (ang. *Body Mass Index*)

IARC- Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*)

INHANCE - Międzynarodowe Konsorcjum Badające Epidemiologię Nowotworów (ang. *International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*)

OR - Iloraz szans (ang. *Odds Ratio*)

ETS - Środowiskowy dym tytoniowy (ang. *Environmental Tobacco Smoke*)

PTH – Parathormon

PTHrP - Hormon polipeptydowy (ang. *Parathyroid Hormone-related Protein*)

ATP – Adenozynotrifosforan

NK – Komórki NK – Naturalni Zabójcy (ang. *Natural Killer*)

SOD – Dysmutaza nadtlenkowa (ang. *Superoxide Dismutase*)

BSE – Gąbczasta encefalopatia bydła (ang. *Bovine Spongiform Encephalopathy*)

MnSOD - Manganowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. *Manganese Superoxide Dismutase*)

ATSDR - Agencja ds. Substancji Toksycznych i Rejestracji Chorób (ang. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)

MT – Metalotioneina (ang. *Metallothionein*)

CdMT – Kompleks kadm – metalotioneina (ang. *Cadmium Metallothionein Complex*)

SCE - Wymiana chromatyd siostrzanych (ang. *Sister Chromatid Exchange*)

ICP – AES - Spektrometria atomowa emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spektrometry*)

ICP – MS - Spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spektrometry*)

INAA - Instrumentalna neutronowa analiza aktywacyjna (ang. *Instrumental Neutron Activation Analysis*)

DRC - Dynamiczna komora reakcyjna (ang. *Dynamic Reaction Cell*)

1. WSTĘP

Nowotwory głowy i szyi to jedne z częściej występujących lokalizacji nowotworów na świecie. Większość zachorowań ma miejsce w krajach rozwijających się, jednak również w wysoko rozwiniętych państwach, zachorowania i śmiertelność z powodu tego schorzenia stanowią wyzwanie dla lekarzy klinicyków.

Niekwestionowanym czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu i spożywanie alkoholu. Stosowanie tych dwóch używek łącznie powoduje multiplikatywny wzrost zagrożenia powstania nowotworów tej części ciała - uważa się, że są one odpowiedzialne za co najmniej 75% nowotworów głowy i szyi. Nieodpowiednio dobrana, uboga w warzywa i owoce dieta, coraz częściej jest współodpowiedzialna za rozwój toczącego się procesu nowotworowego.

Aby w organizmie została zachowana równowaga, wiele czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, musi wzajemnie współdziałać. Pierwiastki niezbędne pełnią dużo ważnych funkcji życiowych, ich działanie jest wielokierunkowe. Jednak zarówno nadmiar, jak i niedobór może prowadzić do zaburzeń fizjologicznych. Niektóre badania wskazują na zaburzenie homeostazy pierwiastków niezbędnych w procesach nowotworowych. Natomiast rola metali ciężkich w kancerogenezie jest udowodnionym faktem. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) potwierdziła rakotwórcze właściwości kilku metali, między innymi chromu i kobaltu.

W dostępnej literaturze mało jest badań dotyczących kancerogennego działania metali przez przyjmowanie ich z żywnością, wodą, czy używkami. Większość doniesień dotyczy narażenia społeczeństwa w warunkach przemysłowych. Obecny stan wiedzy na temat zaburzeń w gospodarce pierwiastkami niezbędnymi i podwyższonego poziomu metali ciężkich jest fragmentaryczny, szczególnie u pacjentów z nowotworami głowy i szyi.

W pracy doktorskiej podjęto próbę oceny zaburzeń homeostazy pierwiastków niezbędnych (wapnia, magnezu, cynku, miedzi, żelaza, manganu) oraz zmian zachodzących w poziomach metali toksycznych (ołowiu, kadmu, kobaltu, chromu VI) u pacjentów z nowotworami w okolicach głowy i szyi (ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi, migdałka podniebiennego), palących tytoń i pijących alkohol. W ramach badania przeprowadzona została także autorska metoda ankietowa, która dostarczyła informacji na temat stylu życia pacjentów i nawyków żywieniowych.

Do oznaczeń wybrano trzy materiały biologiczne: surowicę krwi, włosy i paznokcie. Ze względu na możliwość maskowania przez procesy homeostatyczne zaburzeń w gospodarce niektórymi pierwiastkami w surowicy krwi, do oceny wybrano także wspomniane materiały alternatywne, w których zmiany te mogą być widoczne. We włosach i paznokciach nie zachodzą także modyfikacje związane z okresem ich przechowywania, w związku z czym można w nich zaobserwować narażenie organizmu na dany metal w przeszłości.

Przeprowadzone badania pozwolą na ocenę wpływu palenia tytoniu i picia alkoholu na zaburzenia w gospodarce ważnymi z fizjologicznego punktu widzenia pierwiastkami. Oznaczenia prowadzone w materiale alternatywnym mogą być wskazaniem do suplementacji tych pierwiastków u pacjentów z nowotworami głowy i szyi. Prowadzone doświadczenie pozwoli stwierdzić czy w schorzeniach tych dochodzi do podwyższenia poziomu metali

powszechnie uważanych za kancerogenne (chrom VI , kadm, kobalt, ołów), których źródłem może być palenie tytoniu i nadmierne spożywanie alkoholu.

Przeprowadzone badania mają na celu dostarczenie informacji dotyczących znaczenia oznaczanych metali u pacjentów chorujących na nowotwory głowy i szyi, pozwolą także na określenie ich stanu pierwiastkowego i stanowić będą doskonałą prewencję w diagnostyce powyższej jednostki chorobowej.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Epidemiologia

Nowotwory głowy i szyi należą do najczęściej występujących nowotworów na świecie. Szacuje się, że w ciągu roku liczba nowych zachorowań wynosi 600 000 osób, z czego 300 000 osób umiera z powodu tego schorzenia [Wyss et al., 2013]. Pod względem częstotliwości występowania na świecie, nowotwory głowy i szyi plasują się na szóstym miejscu. Dwie trzecie z tych przypadków ma miejsce w krajach rozwijających się. Największe ryzyko zachorowań na nowotwór jamy ustnej odnotowuje się w Malezji i południowo – środkowej Azji, zachodniej i południowej Europie oraz południowej Afryce. Na nowotwór krtani najczęściej chorują mieszkańcy południowej i wschodniej Europy, Ameryki Południowej i zachodniej Azji. Średnia wieku pacjentów z diagnozą nowotworu rejonu głowy i szyi to około 60 lat, częściej chorują mężczyźni, szczególnie jeśli chodzi o nowotwór krtani [Argiris et al., 2008]. W Stanach Zjednoczonych nowotwory głowy i szyi stanowią 3,2% (39,750) wszystkich nowych przypadków raka oraz 2,2% (12,460) wszystkich zgonów spowodowanych nowotworem. Częstotliwość pojawienia się tego schorzenia jest 3-krotnie wyższa u mężczyzn niż u kobiet i częściej występuje wśród populacji afro amerykańców niż u kaukazyjczyków [Marur, Forastiere, 2008].

Szacuje się, że do 2020 roku przez ciągły wzrost zachorowań i starzenie się ogółu populacji może dojść do podwojenia się liczby do powyżej miliona osób, natomiast śmiertelność sięgnąć może nawet do pół miliona osób rocznie. Wzrastający trend zachorowań i śmiertelności obserwuje się w obecnym czasie w Centralnej i Wschodniej Europie [Marron et al., 2010].

Okolo 90% przypadków to raki płaskonabłonkowe (ang. *squamous cell carcinoma* - SCC), które umiejscowione są najczęściej na wardze/w jamie ustnej, nosogardzieli, części ustnej gardła, części dolnej gardła i w krtani [Marur, Forastiere, 2008].

W ciągu ostatniej dekady naukowcy ze Stanów Zjednoczonych i Europy zwrócili uwagę na wzrastającą liczbę zachorowań na nowotwory podstawy języka i migdałków u ludzi poniżej 45 roku życia. Za ten stan odpowiedzialne jest zwiększone występowanie zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *human papillomavirus* – HPV), zwłaszcza w krajach rozwiniętych, u osób aktywnych seksualnie [Shiboski et al., 2005].

Do nowotworów rejonu głowy i szyi zalicza się nowotwory górnych dróg oddechowych (włączając jamę ustną, nosogardziel, część ustną gardła, gardło i krtani), zatoki przynosowe i ślinianki. Nowotwory umiejscowione w różnych częściach głowy i szyi mają odmienny przebieg i obraz histopatologiczny, jednakże rak płaskonabłonkowy występuje najczęściej. Miejsca dotknięte chorobą są ważne dla człowieka ze względu na pełnione funkcje – odpowiadają za mowę, smak, zapach, przełykanie. Dlatego decyzje dotyczące leczenia muszą być kompleksowe i obejmować skuteczność oraz prawdopodobieństwo przeżycia i późniejszą jakość życia chorych. Zarówno sami chorzy, jak i ich opiekunowie potrzebują znaczącego wsparcia w trakcie trwania i po zakończeniu leczenia [Mehanna et al., 2011].

Częstość występowania nowotworów głowy i szyi jest stosunkowo niska w krajach rozwiniętych, natomiast najwięcej osób choruje w krajach Azji Południowo-Wschodniej. Wysoka częstotliwość powstawania nowotworów głowy i szyi dotyczy szczególnie rejonów

subkontynentu indyjskiego a także Australii, Francji, Brazylii i południowej Afryki. Rak nosogardzieli najczęściej występuje w rejonie południowych Chin, natomiast częstość występowania nowotworów jamy ustnej, krtani, i innych tytoniowo-zależnych raków zmniejsza się w Ameryce Północnej i Europie Zachodniej. Spowodowane jest to prawdopodobnie zmniejszoną ekspozycją na kancerogeny, szczególnie na tytoń. Światowa Organizacja Zdrowia przewidywała, że liczba zgonów spowodowanych nowotworami ust i gardła wyniesie w 2008 roku 371 000. Liczba ta prawdopodobnie znacząco wzrośnie do 595 000 osób w 2030 roku, ze względu na przewidywany wzrost śmiertelności w Azji Południowo-Wschodniej (182 000 w 2008 roku do 324 000 w 2030 roku). Niewielki wzrost śmiertelności przewidywany jest dla obu Ameryk, Afryki i Środkowego Wschodu, podczas gdy w Europie ilość zgonów utrzyma się prawdopodobnie na stałym poziomie [Mehanna et al., 2011].

Okolo 90% nowotworów głowy i szyi to raki płaskonabłonkowe (ang. *squamous cell carcinomas* – SCC), z których za powstanie co najmniej 75% odpowiada łączne stosowanie dwóch używek - spożywanie mocnego alkoholu i palenie tytoniu. Jednakże, czynniki etiologiczne odpowiedzialne za powstawanie nowotworów głowy i szyi u osób, które nigdy nie stosowały wyrobów tytoniowych, nie są jeszcze dobrze poznane [Curado, Boyle P, 2013].

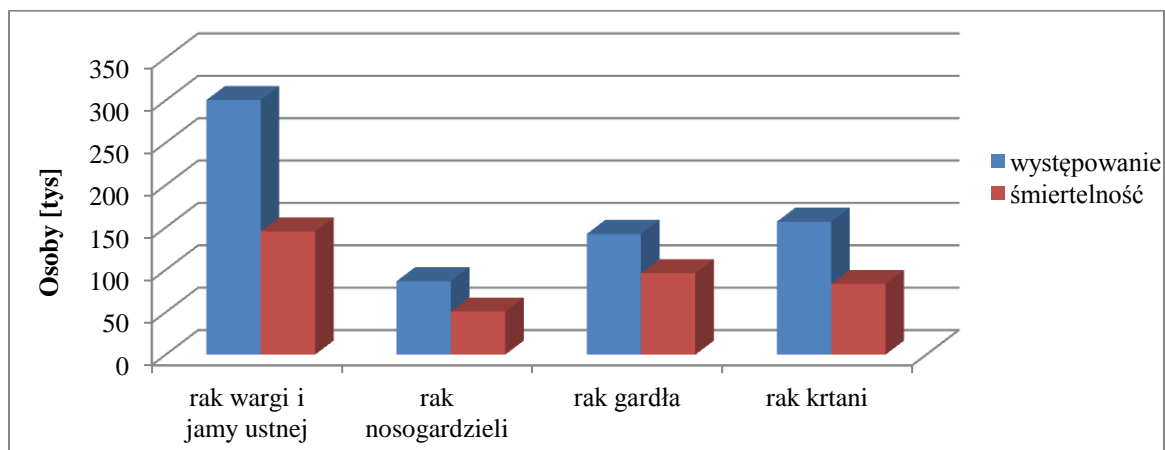
W ciągu ostatnich lat pojawiła się zauważalna zmiana w epidemiologii i patogenezie nowotworów głowy i szyi. Związane jest to z występowaniem kolejnego czynnika ryzyka – wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *human papillomavirus* – HPV), którego uważa się za odpowiedzialnego za powstawanie przede wszystkim nowotworów części ustnej gardła. Szybki wzrost HPV-zależnych nowotworów części ustnej gardła wykazano w badaniach epidemiologicznych prowadzonych w krajach rozwiniętych [Mehanna et al., 2011].

Przykładowo w Wielkiej Brytanii częstość występowania nowotworów części ustnej gardła wzrosła ponad dwukrotnie – był to największy wzrost wśród wszystkich nowotworów głowy i szyi w latach 1999 – 2006 [Oxford Cancer Intelligence Unit, 2010]. Najnowsze badania sugerują zmianę zachowań społeczno - obyczajowych, szczególnie wśród młodszej populacji [Oxford Cancer Intelligence Unit, 2010]. Badania przeprowadzone w Szwecji wykazały, że w latach 1970 – 2007, na nowotwory migdałka podniebiennego spowodowane wirusem HPV, chorowała coraz większa ilość populacji (23% w latach 70., 29% w latach 80., 57% w latach 90. i 79% w latach 2000 - 2007). Badania prowadzone w latach 2000 – 2007 wykazały, że ilość HPV - zależnych nowotworów wzrasta stale, proporcjonalnie w czasie [Näsman et al., 2009].

Nowotwory głowy i szyi zdecydowanie częściej występują u mężczyzn, niż u kobiet, najwięcej osób obu płci choruje na nowotwory jamy ustnej. Na drugim miejscu jest nowotwór krtani wśród mężczyzn i inne nowotwory gardła wśród kobiet [Curado, Boyle, 2013].

Zgodnie z doniesieniami projektu stworzonego przez Światową Organizację Zdrowia - GLOBOCAN z 2012 roku, przedstawiającego dane dotyczące częstotliwości występowania, śmiertelności oraz rozpowszechnienia danego typu nowotworu na świecie, najczęściej występującymi nowotworami są nowotwory wargi i jamy ustnej. Na ten typ nowotworu choruje ponad 300 000 osób rocznie, śmiertelność jest dwukrotnie niższa od zapadalności, a odsetek 5 - letniego przeżycia wynosi ponad 700 000 osób (Rycina 1) [<http://globocan.iarc.fr>]. Pacjenci z tym typem nowotworu należą w 75 - 80% do osób

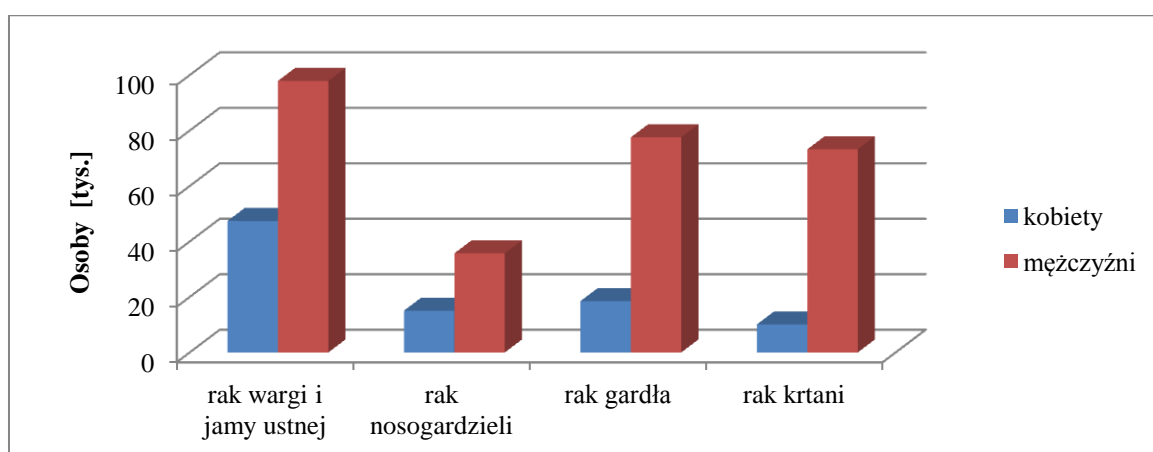
powyżej 50 roku życia, często o jasnej karnacji, ekspozowanych na wysokie dawki promieniowania ultrafioletowego (UV) [Géraud et al., 2012]. Najmniejszą rozpiętość pomiędzy występowaniem a śmiertelnością odnotowuje się w raku gardła, a rak nosogardzieli jest najrzadszy (Rycina 1) [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 1. Występowanie i śmiertelność w nowotworach głowy i szyi na świecie (wszystkie grupy wiekowe, obie płcie)

Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

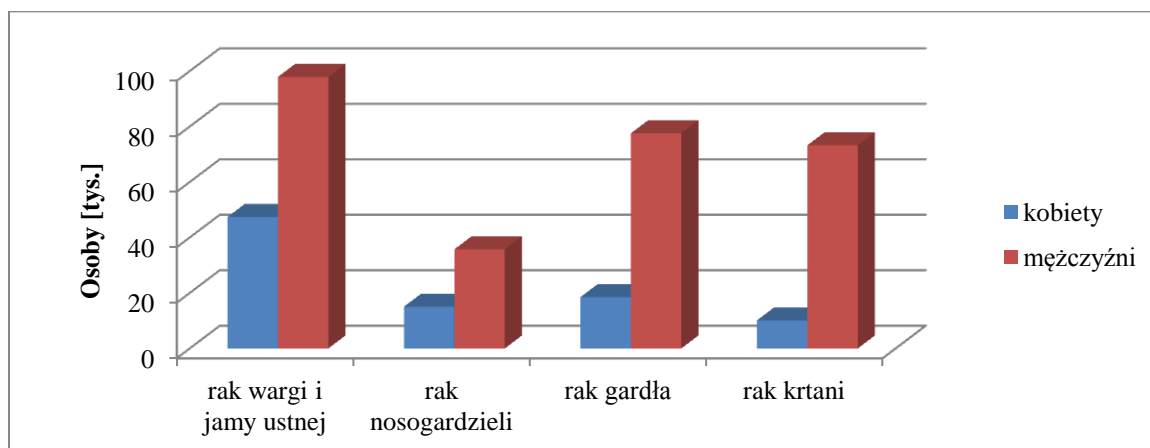
Rycina 2 przedstawia liczbę zachorowań na nowotwory wargi i jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani na świecie w zależności od płci. Zdecydowanie częściej nowotwory te występują u mężczyzn – 4 - krotnie częściej w przypadku raka gardła i 7 – krotnie częściej w przypadku raka krtani [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 2. Występowanie nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

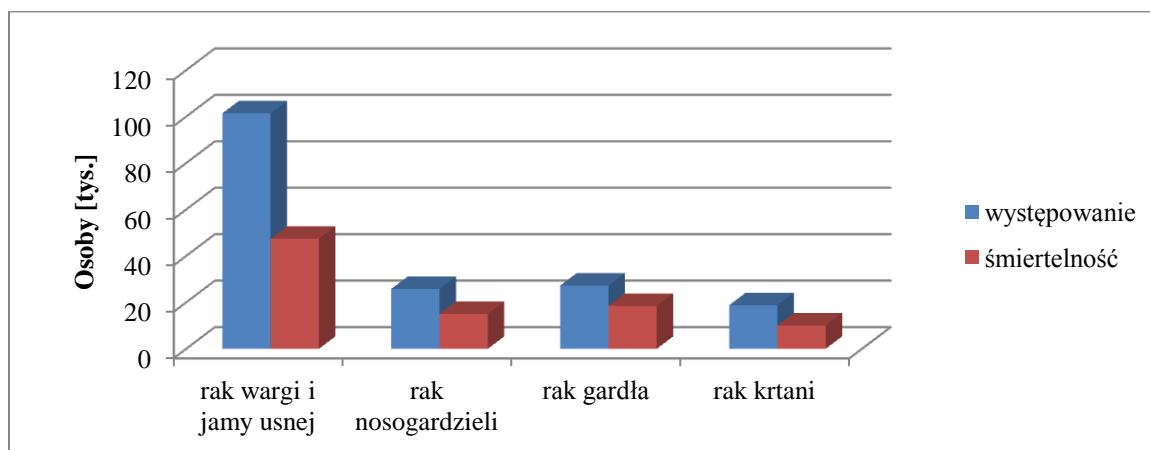
Na Rycinie 3 przedstawiono śmiertelność spowodowaną występowaniem nowotworów głowy i szyi. Mężczyźni umierają 4 – krotnie częściej na nowotwory gardła i 7 - krotnie częściej na nowotwory krtani w porównaniu do kobiet [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 3. Śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i u mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

Na świecie zdecydowana większość kobiet choruje na nowotwory wargi i jamy ustnej, największa jest również śmiertelność z tego powodu. Rak nosogardzieli i gardła występuje u podobnej liczby kobiet, natomiast rak krtani jest najrzadszy w tej grupie, najmniejsza jest również spowodowana nim śmiertelność (Rycina 4) [<http://globocan.iarc.fr>].

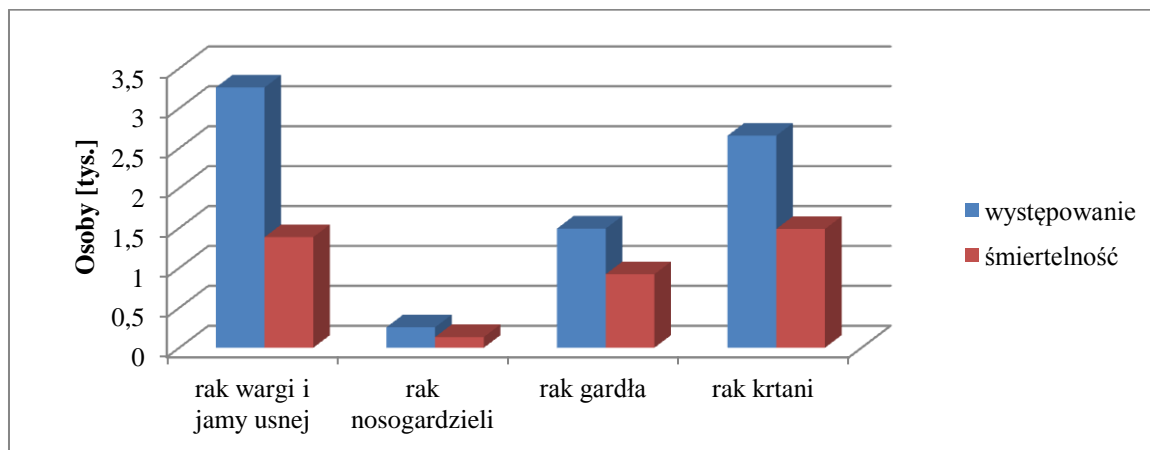


Rycina 4. Występowanie i śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

W Polsce najwięcej osób, zarówno kobiet, jak i mężczyzn choruje na nowotwory wargi i jamy ustnej, natomiast liczba chorych umierających z powodu nowotworów krtani jest największa [http://globocan.iarc.fr].

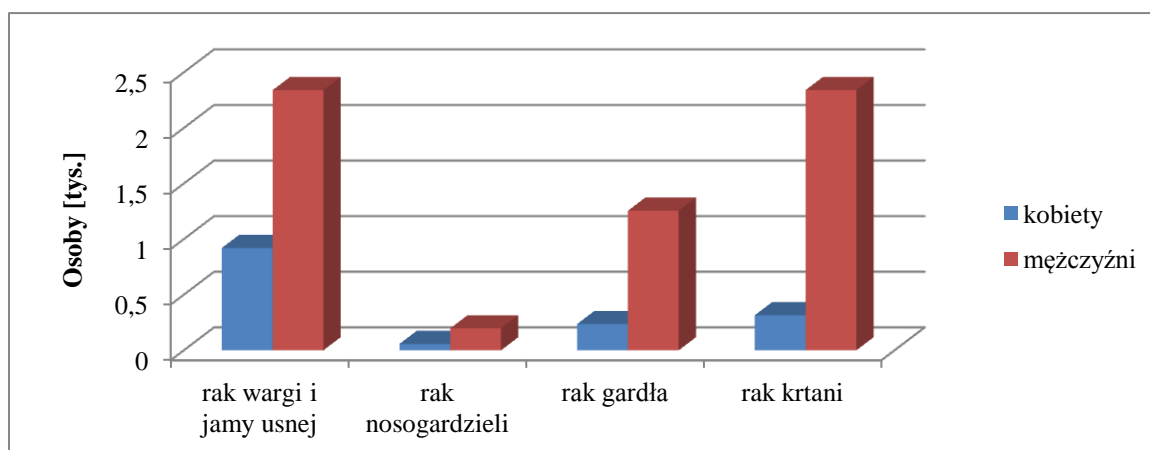
Rak nosogardzieli jest najrzadziej występującym i powodującym najmniejszą śmiertelność nowotworem w Polsce (Rycina 5) [http://globocan.iarc.fr].



Rycina 5. Występowanie i śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych w Polsce

Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

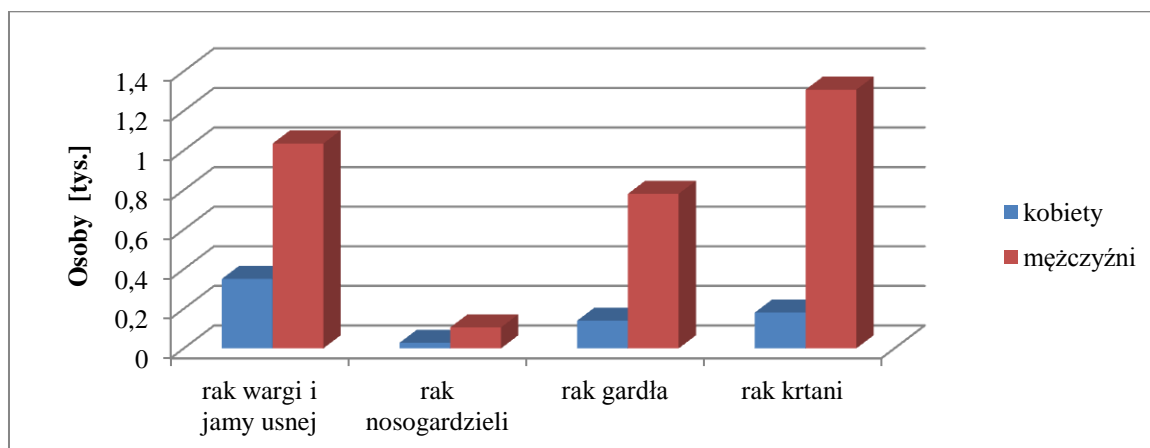
Rycina 6 przedstawia ilość zachorowań na nowotwory wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i u mężczyzn w Polsce. Zdecydowanie częściej chorują mężczyźni – najpowszechniej występującym nowotworem jest rak wargi i jamy ustnej oraz krtani. Odpowiednio 2,5 i ponad 7 razy większa ilość mężczyzn choruje na te nowotwory w porównaniu do kobiet w Polsce [http://globocan.iarc.fr].



Rycina 6. Porównanie występowania nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet i mężczyzn w Polsce

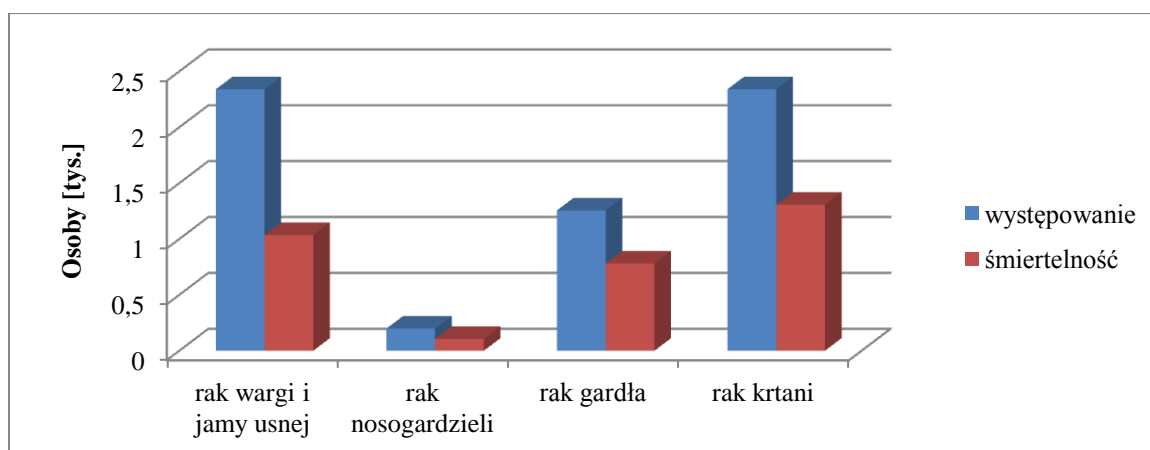
Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

Największa śmiertelność w Polsce wśród kobiet wywołana jest nowotworem wargi i jamy ustnej, mężczyźni najczęściej umierają z powodu nowotworu krtani (ponad 7 razy więcej zgonów w porównaniu do kobiet) (Rycina 7) [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 7. Porównanie śmiertelności spowodowanej nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet i mężczyzn w Polsce
Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

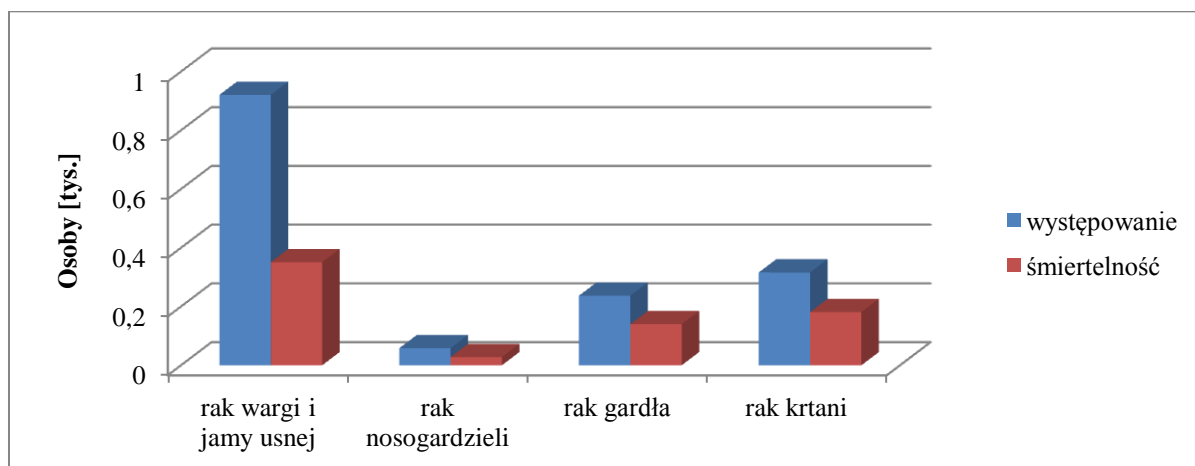
Rycina 8 obrazuje występowanie i śmiertelność spowodowaną nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród mężczyzn w Polsce [<http://globocan.iarc.fr>]. Informacje z 2012 roku wskazują, że liczba mężczyzn, która zachorowała na nowotwór krtani (2341 przypadków) jest porównywalna z występowaniem nowotworu wargi i jamy ustnej (2340 przypadków). Śmiertelność spowodowana nowotworem krtani jest jednak większa w porównaniu do nowotworu wargi i jamy ustnej [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 8. Występowanie i śmiertelność spowodowana nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród mężczyzn w Polsce
Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

U kobiet zdecydowanie najczęściej występują nowotwory wargi i jamy ustnej (921 przypadków), największa jest też śmiertelność z jego powodu (351 przypadków). Na drugim

miejsu pod względem częstotliwości zachorowania i śmiertelności jest nowotwór krtani, rak nosogardzieli jest natomiast najrzadszy (58 przypadków zachorowań; 28 zgonów) (Rycina 9) [<http://globocan.iarc.fr>].



Rycina 9. Występowanie i śmiertelność spowodowana nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet w Polsce

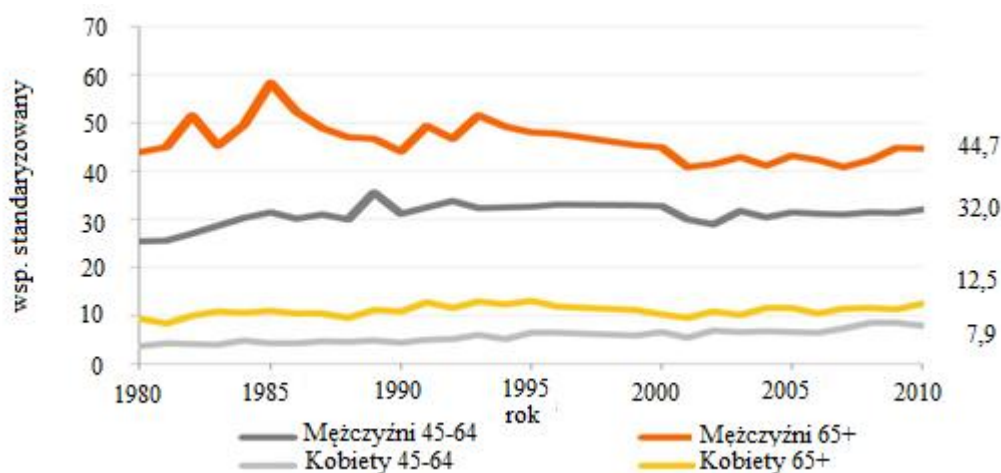
Źródło: <http://globocan.iarc.fr>

Krajowy Rejestr Nowotworów dostarcza aktualnych danych dotyczących występowania i śmiertelności spowodowanej nowotworami w Polsce [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Według danych z 2010 roku, na raka jamy ustnej i wargi oraz gardła chorowało 4% mężczyzn i 1% kobiet. W tej liczbie procentowej wyróżnić można 0,5% zachorowań wśród mężczyzn i 0,1% u kobiet na raka wargi oraz 0,9% zachorowań wśród mężczyzn i 0,2% zachorowań wśród kobiet na raka gardła [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

W roku 2010 w Polsce na raka jamy ustnej, wargi oraz gardła zachorowało 2709 mężczyzn i 960 kobiet [<http://onkologia.org.pl/raporty/>]. Ryzyko zachorowania u mężczyzn wzrasta w siódmej dekadzie życia, u kobiet utrzymuje się na wyrównanym poziomie począwszy od siódmej dekady życia. Prawie 90% osób chorujących na ten typ nowotworu to pacjenci w wieku 50 lat [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Trendy zachorowalności w latach 1980 - 2010 zmieniały się w zależności od przedziału wiekowego. U kobiet w wieku 45 - 64 lata można zauważyć stałą tendencję wzrostową zachorowalności, w późniejszym etapie życia (>65 lat) współczynniki znajdują się na stałym poziomie. U mężczyzn sytuacja wygląda inaczej – w latach 80. zarówno wiek 45 - 64 jak i >65 lat to okres wzrostu zachorowalności, po którym nastąpiła stabilizacja (Rycina 10) [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

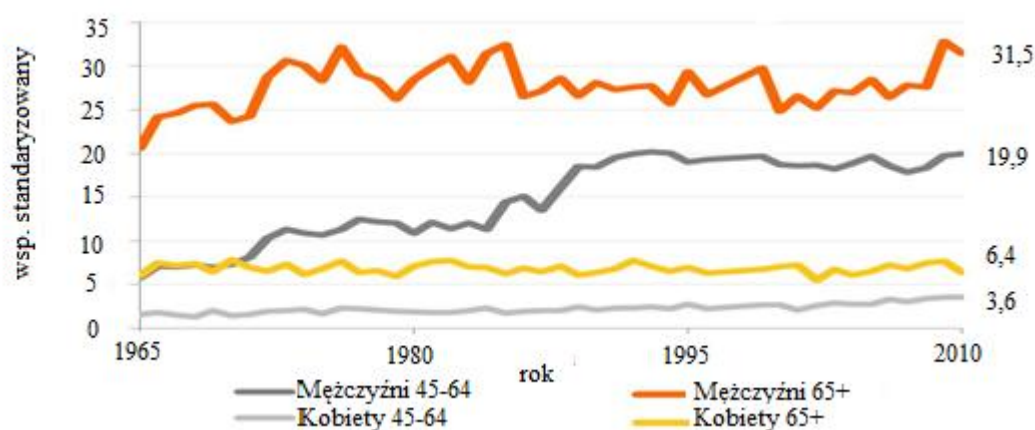


Rycina 10. Trendy zachorowalności na nowotwory jamy ustnej i gardła w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1980 - 2010)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty/>

Przeżycia 5 – letnie wśród chorych na nowotwory jamy ustnej, wargi i gardła wzrosły u mężczyzn z 43,3% do 47,6%, u kobiet z 44,1% do 49,1% (pierwsza dekada XXI wieku) [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Według danych z 2009 roku w Polsce zachorowalność wśród mężczyzn na wyżej wymienione nowotwory była 1,4 razy wyższa niż średnia w krajach Unii Europejskiej, wśród kobiet różnica wynosiła około 1,2 razy. Częstość zgonów na nowotwory jamy ustnej, wargi i gardła wynosiła w 2010 roku 3% zgonów mężczyzn i 1% zgonów nowotworowych kobiet. Trendy umieralności przedstawiono na Rycinie 11 - wykazywały różnicowanie w zależności od płci i grupy wiekowej. Wśród mężczyzn w średnim wieku po okresie wzrostu obserwowano stabilizację współczynnika umieralności, wśród kobiet w tym samym wieku zauważalna jest stała tendencja wzrostowa [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].



Rycina 11. Trendy umieralności na nowotwory jamy ustnej i gardła w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1965 - 2010)

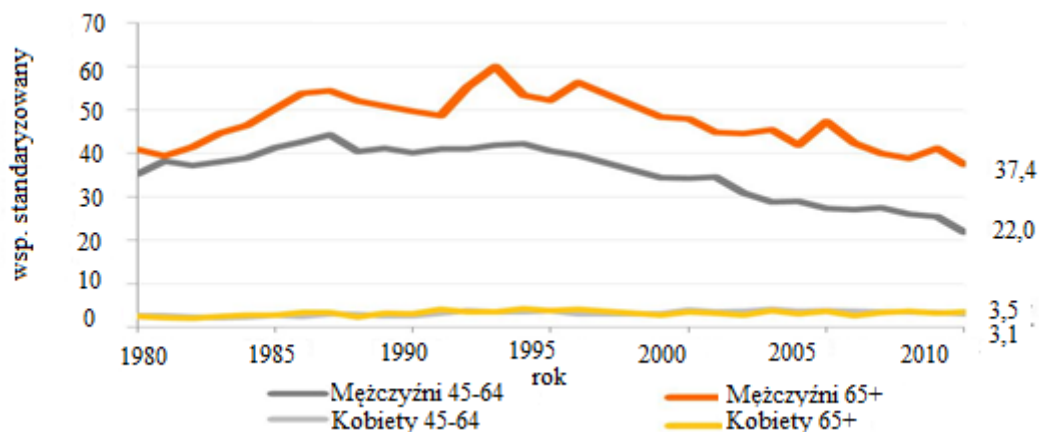
Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty/>

Na tle krajów Unii Europejskiej Polska wypada bardzo niekorzystnie, jeśli porówna się częstość zgonów. Wśród mężczyzn umieralność w 2010 r. była 2,7 razy wyższa, wśród kobiet 1,7 razy wyższa niż średnia w krajach Unii Europejskiej [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Nowotwór złośliwy języka jest nowotworem rzadko występującym w Polsce. Choruje na niego 0,5% mężczyzn i 0,1% kobiet. Ryzyko zachorowań wzrasta wraz z wiekiem u obu płci, przy czym u mężczyzn osiąga szczyt w siódmej dekadzie życia, u kobiet począwszy od siódmej dekady życia pozostaje na stałym poziomie. Zgony spowodowane tym nowotworem są około 10-krotnie częstsze wśród mężczyzn i w roku 2010 ich liczba wynosiła 432 – w tym 347 mężczyzn i 85 kobiet [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Nowotworem, którego statystyki zachorowalności i umieralności pozostają ciągle na wysokim poziomie, jest nowotwór krtani [<http://onkologia.org.pl/raporty/>]. W Polsce choruje na niego 2,7% mężczyzn i 0,4% kobiet [<http://onkologia.org.pl/raporty/>]. W przypadku tego nowotworu również liczba chorujących mężczyzn przewyższa 8-krotnie liczbę chorujących kobiet. W 2010 roku ogólna liczba zachorowań wynosiła 2200 osób, w tym 1900 mężczyzn i 300 kobiet. Ponad 90% pacjentów chorych na nowotwory krtani to osoby powyżej 50 roku życia, przy czym ponad 30% zachorowań u obu płci przypada na populację osób powyżej 65 roku życia. Największy wzrost zachorowań zaobserwowany został wśród mężczyzn w latach 90., następnie rozpoczął się spadek liczby chorych. U kobiet, w tym samym okresie, utrzymywał się stały poziom zachorowalności [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Rycina 12 przedstawia trendy zachorowalności na nowotwory głowy i szyi w Polsce dla obu płci w latach 1980 – 2010 [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].



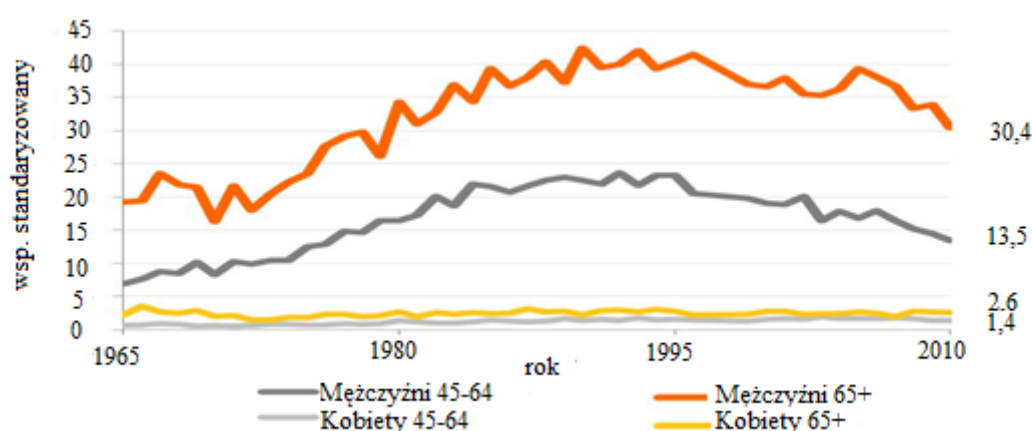
Rycina 12. Trendy zachorowalności na nowotwory krtani w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1980 - 2010)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty/>

Niepokojącym jest fakt, iż 5-letnie przeżycia na nowotwory krtani pozostają u mężczyzn na tym samym poziomie – 50,6%, u kobiet zaś zaobserwowano nieznaczny wzrost - z 60,4% do 62,7% [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Nowotwory złośliwe krtani odpowiadają za 2,6% zgonów nowotworowych w Polsce wśród mężczyzn i 0,4% wśród kobiet. Ryzyko zgonu wzrasta wraz z wiekiem u obu płci, najczęściej osób umiera po 50 roku życia, a aż 50% po 65 roku życia [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Rycina 13 przedstawia trendy umieralności na nowotwory krtani w wybranych grupach wiekowych u obu płci w Polsce (lata 1965 - 2010). Do początku lat 90. XX wieku obserwowano wzrost umieralności wśród mężczyzn w średnim i starszym wieku, następnie obserwowano jej spadek. Wśród kobiet w obu grupach wiekowych umieralność utrzymywała się na stałym poziomie [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

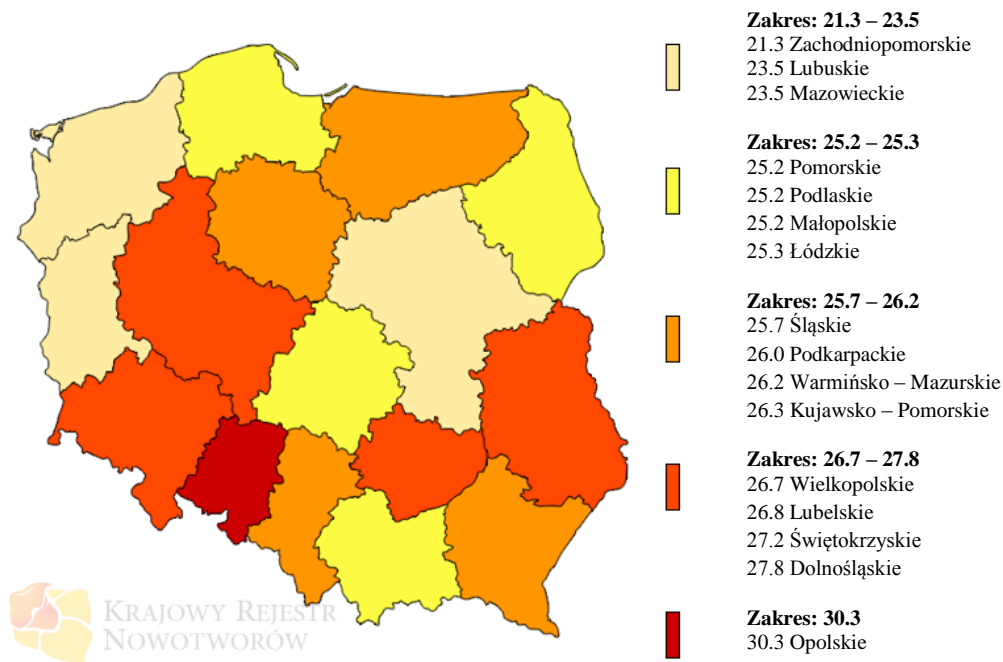


Rycina 13. Trendy umieralności na nowotwory krtani w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1965 - 2010)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty>

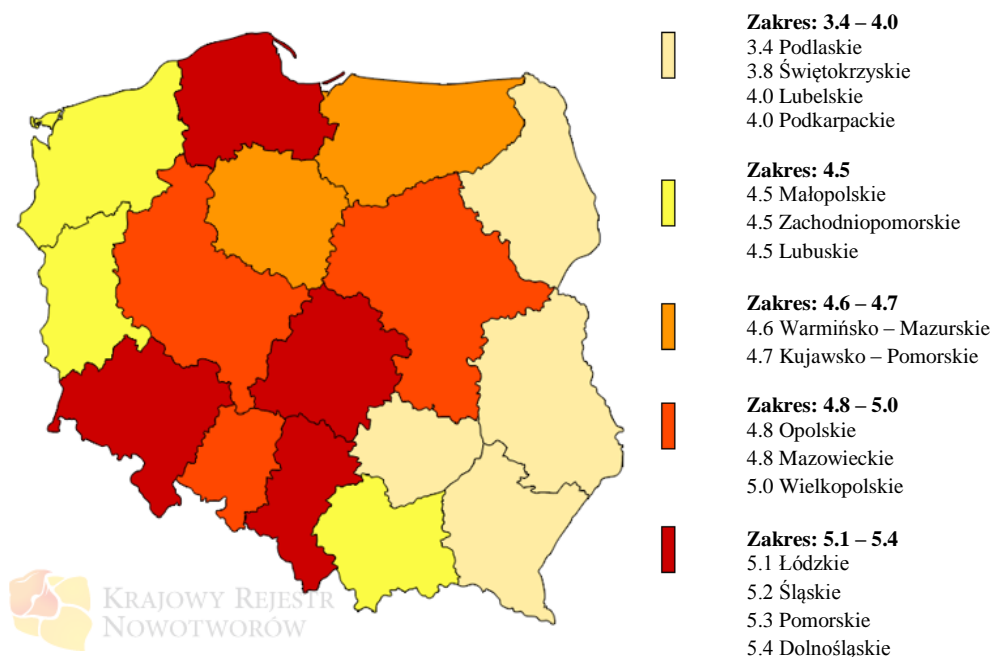
Wybierając Europę jako populację standardową uzyskano następujące mapy Polski dotyczące:

- zachorowania na nowotwory jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 (Rycina 14)
- zachorowania na nowotwory jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 (Rycina 15)
- zgony na nowotwory jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 (Rycina 16)
- zgony na nowotwory jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 (Rycina 17) [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].



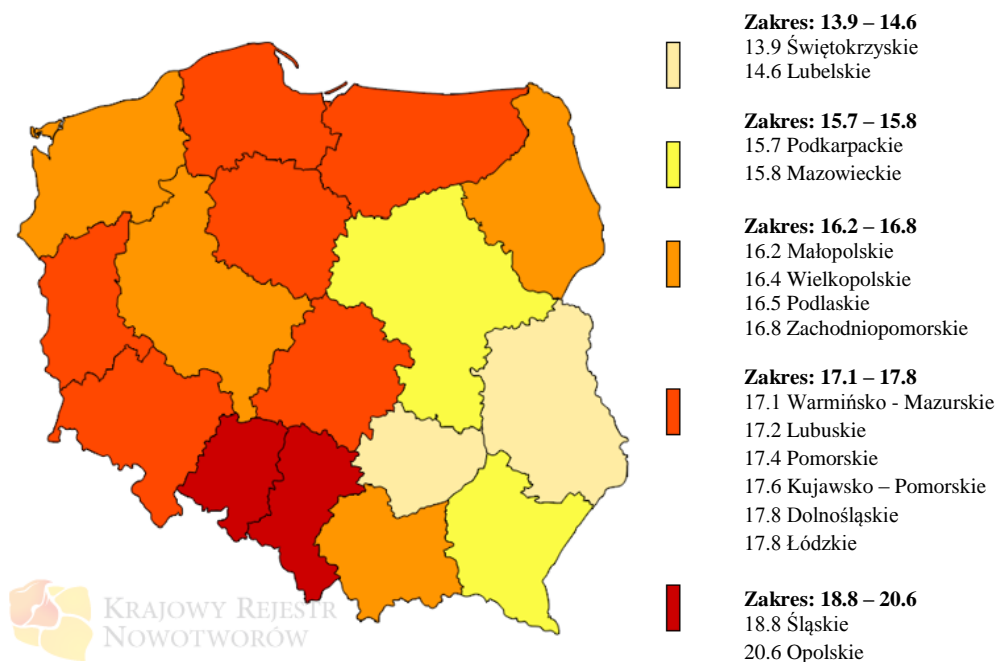
Rycina 14. Mapa Polski – liczba nowo zarejestrowanych przypadków wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty>



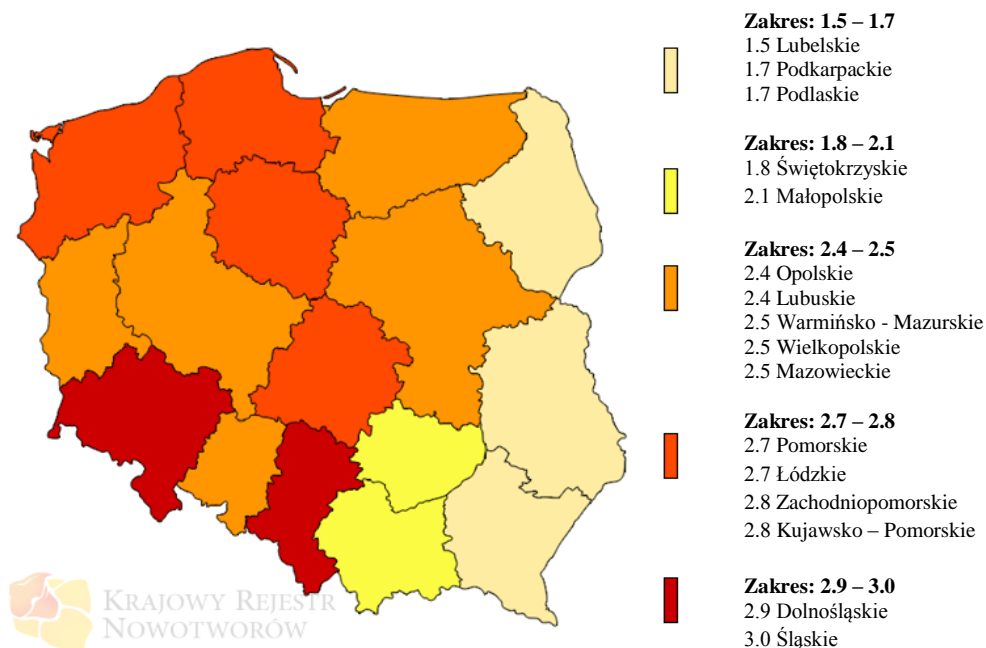
Rycina 15. Mapa Polski - liczba nowo zarejestrowanych przypadków wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty>



Rycina 16. Mapa Polski – liczba zgonów spowodowana nowotworami jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty>



Rycina 17. Mapa Polski – liczba zgonów spowodowana nowotworami jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Źródło: <http://onkologia.org.pl/raporty>

Z przedstawionych rycin wynika, że największa ilość zachorowań na nowotwory w obrębie głowy i szyi wśród mężczyzn ma miejsce w województwie opolskim, wśród kobiet

zaś w województwie łódzkim, śląskim, pomorskim i dolnośląskim. W województwie wielkopolskim zakres zachorowań u obu płci jest również bardzo wysoki [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Największa ilość zgonów spowodowana nowotworami w obrębie głowy i szyi wśród mężczyzn ma miejsce w województwie śląskim i opolskim, wśród kobiet dolnośląskim i śląskim. W województwie wielkopolskim ilość zgonów w odniesieniu do całego kraju znajduje się w środkowym zakresie [<http://onkologia.org.pl/raporty/>].

Nowotwory są jednym z najpoważniejszych problemów zdrowia publicznego w Stanach Zjednoczonych. Jeden z czterech zgonów w tym kraju spowodowany jest nowotworem. *American Cancer Society* każdego roku przygotowuje raport, w którym określa liczbę nowych zachorowań na nowotwory w Stanach Zjednoczonych i spowodowaną nimi śmiertelność w bieżącym roku. Opracowuje także najnowsze dane dotyczące występowania, śmiertelności i odsetek przeżycia dla danego nowotworu [Siegel et al., 2014].

Najnowszy raport przewiduje, że w 2014 roku w Stanach Zjednoczonych ryzyko powstania nowych zachorowań na nowotwory wyniesie 1 665 540 przypadków i nastąpi 585 720 zgonów spowodowanych tą chorobą [Siegel et al., 2014].

Przez okres ostatnich 5 lat, z których dostępne są dane statystyczne (2006 - 2010), częstość występowania nowotworów u mężczyzn nieznacznie spadła (0,6% na rok) i była stała u kobiet, podczas gdy śmierć spowodowana nowotworem spadła u mężczyzn o 1,8% i 1,4% u kobiet na rok [Siegel et al., 2014].

Według raportu *Cancer Statistics 2014* na nowotwory jamy ustnej i gardła w Stanach Zjednoczonych zachoruje 42 440 osób, w tym 30 220 tysięcy mężczyzn i 12 220 tysięcy kobiet. W tej liczbie zawierają się zachorowania na nowotwory języka (13 590 osób obu płci), ust (11 920 osób obu płci), gardła (14 410 osób obu płci) i inne nowotwory jamy ustnej (2 520 osób obu płci). Przewidziana liczba zachorowań na nowotwory krtani w 2014 roku wyniesie 12 630 osób, w tym 10 000 mężczyzn i 2 630 kobiet. Liczba zgonów na nowotwory jamy ustnej i gardła wyniesie 8 390 osób (5 730 mężczyzn i 2 660 kobiet), natomiast na nowotwory krtani prawdopodobnie umrze w 2014 roku 3 610 osób (2 870 mężczyzn i 740 kobiet) [Siegel et al., 2014].

Nowotwory jamy ustnej i gardła znalazły się na 8 miejscu wśród nowotworów u mężczyzn, które w 2014 roku przewidywane są jako najczęściej występujące w Stanach Zjednoczonych (4% spośród 10 nowotworów) [Siegel et al., 2014].

Pięcioletnia przeżywalność dla nowotworów w obrębie głowy i szyi w Stanach Zjednoczonych jest niższa dla afro amerykańców niż dla populacji białej, praktycznie w każdym stadium choroby nowotworowej. Powodem tych różnic jest prawdopodobnie niższy status socjoekonomiczny wśród osób czarnoskórych i gorszy dostęp do specyficznych metod leczenia [Siegel et al., 2014].

Zauważono znacznie podwyższone wskaźniki przeżycia w ciągu trzech ostatnich dekad zarówno wśród osób populacji białej jak i osób czarnoskórych [Siegel et al., 2014]. Zgony spowodowane nowotworami w Stanach Zjednoczonych uległy zmniejszeniu przez okres ostatnich dwóch dekad. Pomiedzy rokiem 1991 a 2010 ryzyko zgonu spowodowanego nowotworem zmniejszyło się o 20%. Jednak pomimo znacznego progresu, niektóre z nowotworów, w tym nowotwory jamy ustnej występujące u osób czarnoskórych, mają o 21% niższe przeżycie 5 - letnie niż u osób populacji białej. Zwraca to uwagę na konieczność

zwrócenia szczególnej uwagi na osoby pozostające w najniższym statusie socjoekonomicznym i innych ludzi będących w niekorzystnym położeniu [Siegel et al., 2014].

2.2. Czynniki ryzyka

Do najważniejszych czynników ryzyka związanych z powstawaniem nowotworów głowy i szyi należą palenie tytoniu i spożywanie mocnego alkoholu. Alkohol nasila procesy kancerogenezy związane z tytoniem, ale jest również niezależnym czynnikiem ryzyka. Badania dotyczące epidemiologii potwierdzają, że również żucie tytoniu prowadzi do powstawania nowotworów jamy ustnej [Vokes et al., 1993]. Innymi czynnikami ryzyka odpowiedzialnymi za powstawanie nowotworów głowy i szyi są również zakażenia wirusowe, m.in. wirus Epsteina-Barr związany z nowotworem nosogardzieli i wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *human papillomavirus* - HPV), który może być czynnikiem sprawczym szczególnie w powstawaniu raka jamy ustnej i gardła [Mehanna et al., 2011]. Należy również wymienić niski wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index* - BMI), ryzykowne zachowania seksualne, narażenie zawodowe, nieprawidłową higienę jamy ustnej, zbyt małą podaż warzyw i owoców (nieprawidłowa dieta), długotrwałe narażenie na palenie bierne oraz obecność nowotworu w rodzinie, jako pozostałe czynniki odpowiedzialne za wywoływanie raka [Mehanna et al., 2011].

2.2.1. Tytoń

Palenie tytoniu oraz ekspozycja na dym tytoniowy wpływa negatywnie na zdrowie człowieka w czasie całego cyklu życia. Podczas rozwoju płodu, palenie tytoniu przez ciężarną matkę może zwiększyć ryzyko urodzenia martwego dziecka, wzrasta również prawdopodobieństwo wystąpienia wybranych wad wrodzonych. W okresie wczesnego dzieciństwa (do 1. roku życia) może dojść do zespołu nagłej śmierci niemowląt [Florek, Piekoszewski, 2010; WHO, 2013]. U dorosłych palenie tytoniu powoduje przede wszystkim choroby sercowo - naczyniowe, nowotwory oraz śmierć spowodowaną zaburzeniami ze strony układu oddechowego [WHO, 2013].

Palenie tytoniu jest nadal wiodącą przyczyną zgonów wśród populacji na świecie. Szacuje się, że każdego roku z powodu chorób odtytoniowych umiera 6 milionów ludzi, z czego ponad 5 milionów to osoby bezpośrednio używające tytoniu, a ponad 600 000 zgonów spowodowanych jest narażeniem na środowiskowy dym tytoniowy. Większość z tych zgonów ma miejsce w krajach o niskich i średnich dochodach, szacuje się, że ta dysproporcja ulegnie zwiększeniu w przeciągu kilku najbliższych lat [WHO, 2011b; WHO, 2013]. Jeśli stan ten będzie się utrzymywał, do 2030 roku tytoń stanie się przyczyną śmierci ponad 8 milionów ludzi rocznie. Używką ta jest odpowiedzialna za 71% wszystkich zgonów spowodowanych nowotworami płuc, 42% - przewlekłymi chorobami dróg oddechowych oraz blisko 10% wszystkich zgonów spowodowanych chorobami układu krążenia [WHO, 2010]. Palenie tytoniu jest również istotnym czynnikiem ryzyka dla chorób zakaźnych, takich jak gruźlica, czy zakażenia dolnych dróg oddechowych [WHO, 2010].

Poza papierosami, szkodliwy wpływ na zdrowie wykazują również inne formy tytoniu: cygara, fajki, tytoń do żucia, tabaka, czy palenie fajki wodnej. Lokalne formy tytoniu,

takie jak bidi, czy betel również odpowiadają za powstawanie wielu chorób, w tym za nowotwory głowy i szyi [Hashibe, 2010]. Bezdymny tytoń, poza nowotworami jamy ustnej, odpowiedzialny jest również za występowanie nadciśnienia i chorób serca [WHO, 2010].

Ryzyko powstania nowotworów głowy i szyi zwiększa się wraz z ilością wypalanych papierosów i długością trwania nałogu, z czego czas trwania nałogu ma większe znaczenie. Dodatkowo obecni palacze są bardziej narażeni niż byli palacze, a osoby, które wcześniej rozpoczęły palenie są w grupie większego ryzyka, niż osoby, które popadły w nałóg w wieku starszym. Nowotwory jamy ustnej i gardła występują częściej u osób, które paliły papierosy bez filtra, niż u palących papierosy z filtrem [Pelucchi et al., 2006]. Istotnym jest fakt, że wśród osób leczonych na nowotwór jamy ustnej, które nadal palą tytoń, ryzyko rozwoju drugiego nowotworu górnych dróg oddechowych jest 2 – 6 razy większe niż u osób, które zaprzęstały palenia [Neville, Day, 2002].

Dużym zagrożeniem może być również stosowanie innych postaci tytoniu, szczególnie popularnych w Indiach i wielu krajach Azji Południowej, np. tytoniu do żucia. Sapkota i wsp. wykazali w swoim badaniu, że żucie produktów tytoniowych może prowadzić do powstania nowotworów części gardłowo-przelykowej i jest niezależnym od alkoholu i palenia papierosów czynnikiem ryzyka [Sapkota et al., 2007]. Betel (pieprz żuwny) to czwarta pod względem popularności używka stosowana głównie w krajach Dalekiego Wschodu, a używana obecnie przez około 10 - 20% populacji na całym świecie. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer* - IARC) w swojej monografii wykazała, że betel zarówno w połączeniu z tytoniem, jak i stosowany jako osobna używka, wykazuje działanie kancerogenne dla jamy ustnej i gardła [IARC, 2004]. Używki te stanowią tym większe zagrożenie, ponieważ są łatwo dostępne dla dzieci i młodzieży, a ich różnorodność i substancje poprawiające smak sprawiają, że ich stosowanie staje się coraz popularniejsze [Curado, Hashibe, 2009].

Palenie fajki i cygara nie jest tak popularne jak palenie papierosów, jednakże część osób wybiera tę formę używki. Wiele badań potwierdza, że wymienione produkty zawierają w swoim składzie substancje kancerogenne, takie jak benzo(a)piren, często w ilościach równych lub nawet większych w porównaniu do dymu papierosowego [IARC, 2004]. Dane epidemiologiczne wskazują na związek palenia cygar i fajek z nowotworami głowy i szyi, jednak zbyt mała ilość przebadanych próbek i ograniczona wiedza na temat zmiennych towarzyszących (czasu trwania i częstotliwości palenia papierosów i spożywania alkoholu) nie pozwalała, aby w pełni to potwierdzić. Dodatkowym utrudnieniem było wybranie grupy osób, które wyłącznie paliły fajki i cygara [IARC, 2004]. Dlatego Wyss i wsp. użyli danych zebranych przez międzynarodowe konsorcjum badające epidemiologię nowotworów (ang. *International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium*), aby lepiej scharakteryzować jednostkowe i połączone działanie cygar, fajek i papierosów na powstawanie nowotworów głowy i szyi [Wyss et al., 2013]. Badanie przez nich przeprowadzone wykazało, że wśród osób nigdy niepalących papierosów, ale kiedykolwiek palących cygara i fajki, wzrosło ryzyko wystąpienia nowotworów głowy i szyi. Ryzyko to było tym większe, im częstotliwość i długość palenia tych produktów była dłuższa [Wyss et al., 2013]. Zwiększony iloraz szans (ang. *odds ratio*) związany z wyłącznym paleniem cygar lub fajek, w porównaniu do osób nigdy niepalących papierosów, cygar i fajek,

sugeruje, że oba produkty niezależnie przyczyniają się do ryzyka powstania nowotworów głowy i szyi [Wyss et al., 2013].

W krajach rozwiniętych nowotwór krtani rzadko występuje u osób niepalących i tylko niewielka ilość badań zawiera opis wystarczającej liczby przypadków, aby dostarczyć użytecznych informacji dotyczących skutków wywołanych alkoholem u osób niepalących [Altieri et al., 2005].

Czynniki etiologiczne dla nowotworów głowy i szyi wśród osób, które nigdy nie używały produktów tytoniowych nie są jeszcze w pełni zrozumiane. Prawdopodobnie 5% - 30% chorych na te nowotwory nigdy nie paliło tytoniu [Hashibe et al., 2007]. Nowotwory głowy i szyi u osób, które nigdy nie paliły, uważa się za odmienne od tych wywołanych u palaczy. Chorzy niepalący posiadają mniej mutacji genu TP53, niższą częstotliwość wystąpienia utraty heterozygotności w rejonie ramion chromosomowych 3p i 4q i na chromosomie rejonu 11q13 (obszary chromosomowe, w których utrata heterozygotności pojawia się w czasie powstawania nowotworu jamy ustnej), w porównaniu do osób palących, u których zmiany te się pojawiają [Koch, McQuone, 1997].

Celem pracy Kashigar i wsp. było określenie, jakie czynniki socjodemograficzne ułatwią pacjentom chorym na nowotwory głowy i szyi zaprzestanie nałogu palenia tytoniu i tym samym zwiększenie ich szans na przeżycie. Najważniejszymi czynnikami społecznymi, które miały wpływ na ewentualne zaprzestanie palenia, było środowisko, w jakim chorzy przebywali, to czy współmałżonka/współmałżonek pali papierosy oraz poziom narażenia na dym tytoniowy w domu rodzinnym. Dużą rolę w przewidywaniu zaprzestania palenia przez pacjentów z nowotworami głowy i szyi odgrywają lekarze pierwszego kontaktu oraz liczba prób usiłowania zaprzestania nałogu [Kashigar et al., 2013].

Ważnym problemem jest również narażenie na środowiskowy dym tytoniowy (ang. *environmental tobacco smoke* - ETS), który również może być odpowiedzialny za powstawanie nowotworów głowy i szyi [Zhang et al., 2000]. Zhang i wsp. wykazali w swoim badaniu, że narażenie na ETS jest związane z dawko - zależnym, zwiększonym ryzykiem powstawania nowotworów tego rejonu [Zhang et al., 2000]. Również Troy i wsp. wykazali, że narażenie w okresie dzieciństwa na środowiskowy dym tytoniowy jest związane z powstawaniem nowotworów głowy i szyi w okresie późniejszej dorosłości [Troy et al., 2013].

Lee i wsp. na podstawie 6 badań kliniczno - kontrolnych przeprowadzonych w Europie Środkowej, Ameryce Łacińskiej i Stanach Zjednoczonych, dokonali próby oceny wpływu palenia biernego na powstawanie nowotworów głowy i szyi. Autorzy zaobserwowali, że przy długotrwałym narażeniu na bierne palenie w domu i w pracy, ryzyko powstania nowotworów tego regionu było zwiększone [Lee et al., 2008]. Efekt długotrwałego narażenia na palenie bierne w domu był silniejszy dla nowotworów gardła i krtani w porównaniu do innych nowotworów w obrębie tych części ciała. Badacze dowiedli, że eliminacja narażenia na palenie bierne może zredukować ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi wśród osób niepalących [Lee et al., 2008].

2.2.2. Alkohol

W roku 1987 naukowcy współpracujący z Międzynarodową Agencją Badań nad Rakiem zakwalifikowali napoje alkoholowe jako „kancerogenne dla człowieka” [IARC, 1988]. W 2009 roku ponownie potwierdzono, że acetaldehyd zawarty w napojach alkoholowych jest rakotwórczy [Secretan et al., 2009]. Stanowi główny produkt metabolizmu alkoholu etylowego, wykazuje działanie genotoksyczne, mutagenne i jest kancerogenem w modelach zwierzęcych [Islami et al., 2010].

Według badań przeprowadzonych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem spożywanie alkoholu odpowiedzialne jest za powstawanie nowotworów jamy ustnej, gardła, krtani, przełyku, jelita grubego, wątroby i gruczołu sutkowego wśród kobiet [Secretan et al., 2009].

Raport przeprowadzony przez ekspertów ze Światowej Organizacji Zdrowia – „Global status report on alcohol and health” z 2011 roku wykazał, że spożycie alkoholu i związane z tym problemy różnią się w zależności od rejonu świata, ale nasilenie wystąpienia choroby czy śmierci pozostaje znaczące w większości krajów [WHO, 2011a]. Spożycie alkoholu jest trzecim czynnikiem ryzyka na świecie mogącym powodować chorobę i kalectwo, za wyjątkiem krajów o średnim dochodzie, gdzie znajduje się na miejscu pierwszym [WHO, 2011a]. Jest czynnikiem przyczynowym, odpowiedzialnym za około 60 różnych chorób i urazów oraz czynnikiem składowym 200 innych. Alkohol odpowiada za około 4% zejść śmiertelnych. Jego spożycie powoduje również wiele problemów społecznych, takich jak zaniedbania i nadużycia wobec dzieci, przemoc oraz absencja w miejscu pracy [WHO, 2011a].

Szkodliwe spożycie alkoholu jest szczególnie niebezpieczne dla mężczyzn. Stanowi wiodący czynnik ryzyka prowadzący do śmierci wśród mężczyzn w wieku 15 – 59 lat, głównie z powodu chorób sercowo - naczyniowych, urazów czy zgonów spowodowanych przemocą. Na świecie 6,2% wszystkich zgonów wśród mężczyzn spowodowanych jest przez alkohol – dla porównania czynnik ten odpowiada za 1,1% zgonów wśród kobiet [WHO, 2011a]. Największe spożycie alkoholu ma miejsce w krajach rozwiniętych, wliczając zachodnią i wschodnią Europę. Państwa o najwyższych dochodach cechuje najwyższe spożycie alkoholu, jednakże nie zawsze wysoki poziom konsumpcji i wysokie dochody przekładają się na poważne problemy zdrowotne wywołane alkoholem. Dla przykładu, w krajach Europy Wschodniej pomimo wysokiego wskaźnika spożycia alkoholu, odsetek zgonów jest stosunkowo niski, jednak obciążenie chorobą spowodowaną alkoholem może być wysokie [WHO, 2011a]. W roku 2005 spożycie alkoholu przez osobę w wieku 15 lat i więcej wynosiło 6,13 litra czystego alkoholu na osobę. Duży odsetek (28,6% na osobę) stanowił alkohol domowej lub nielegalnej produkcji [WHO, 2011a].

Zależność pomiędzy spożywaniem alkoholu a rozwojem nowotworu krtani zasugerowano po raz pierwszy na początku XX wieku, na podstawie statystyk, ukazujących śmiertelność wywołaną przez choroby zawodowe oraz raportów klinicznych, jednak związek przyczynowy pomiędzy zwiększonym spożyciem alkoholu a wystąpieniem płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku został zauważony w połowie lat 50. [Altieri et al., 2005]. Za działanie kancerogenne odpowiedzialny jest prawdopodobnie główny metabolit alkoholu etylowego – acetaldehyd. Tworzy on addukty

z DNA w komórkach ludzkich *in vitro* oraz u szczurów długotrwale narażonych na etanol [Boffetta, Hashibe, 2006].

W badaniach na zwierzętach inhalacja acetaldehydem powoduje powstawanie nowotworów dróg oddechowych, szczególnie gruczolakoraka i raka płaskonabłonkowego błony śluzowej nosa u szczurów i raka krtani u chomików [IARC, 1999].

Boffetta i Hashibe w swoim badaniu przedstawili możliwe mechanizmy kancerogennego działania napojów alkoholowych. Według zebranych przez nich danych, silnym dowodem odpowiadającym za powstawanie nowotworów głowy i szyi jest uszkodzenie DNA przez acetaldehyd. Dowodem niewystarczającym zaś uszkodzenie DNA spowodowane przez etanol, niedobory żywieniowe (dotyczące np. witaminy A) oraz rakotwórczość składników innych niż alkohol [Boffetta, Hashibe, 2006].

Maserejian i wsp. w swojej pracy przedstawili możliwe mechanizmy działania alkoholu na rozwój ustnych stanów przednowotworowych oraz powstawaniu nowotworów jamy ustnej. Według opisanych przez nich procesów, alkohol nasila przenikanie substancji rakotwórczych przez błonę śluzową jamy ustnej (wzrost przepuszczalności) zwiększając ich rozpuszczalność. Chroniczne spożywanie alkoholu prowadzi do zaniku błony śluzowej jamy ustnej; używka ta nasila genotoksyczność czynników rakotwórczych oraz hamuje zdolność naprawy DNA. Ogólnoustrojowym efektem, który alkohol powoduje, jest niedożywienie i immunosupresja [Maserejian et al., 2006].

Islami i wsp. na podstawie przeglądu literaturowego wykazali, że picie alkoholu związane jest z 2-krotnym wzrostem ryzyka powstania nowotworu krtani. Wypijanie małych ilości alkoholu (≤ 1 drinka/dzień) nie wykazało żadnego znaczącego związku z tym nowotworem (na podstawie 12 badań), umiarkowane spożywanie alkoholu (>1 do <4 drinków/dzień) związane było z 1,5-krotnym wzrostem ryzyka (na podstawie 35 badań), natomiast wypijanie dużych ilości alkoholu (≥ 4 drinków/dzień) związane było z 2,5-krotnym wzrostem ryzyka powstania nowotworu krtani (na podstawie 33 badań) [Islami et al., 2010].

Altieri i wsp. w swojej pracy dokonali przeglądu piśmiennictwa związanego ze spożywaniem alkoholu i ryzykiem wystąpienia nowotworu krtani. Na podstawie zebranych danych, autorzy określili, że najczęściej spożywany alkohol w danej populacji zdaje się być trunkiem najwyższego ryzyka [Altieri et al., 2005].

Bagnardi i wsp. dokonali przeglądu literatury epidemiologicznej dotyczącej związku pomiędzy spożywaniem alkoholu i ryzykiem wystąpienia 18 nowotworów. Praca dotyczyła 235 badań naukowych zawierających 117 000 przypadków. Wykazano wysoką tendencję w zakresie ryzyka powstawania nowotworów jamy ustnej i gardła, przełyku i krtani [Bagnardi et al., 2001]. Dodatek tytoniu znacznie zmieniał postrzeżenie dotyczące nowotworów krtani, ale nie tych związanych z jamą ustną i przełykiem [Bagnardi et al., 2001].

2.2.3. Alkohol i tytoń

Oddzielenie szkodliwych efektów powstałych na skutek spożywania alkoholu i palenia tytoniu jest bardzo trudne, ponieważ często osoby pijące duże ilości alkoholu są również palaczami i odwrotnie. Większość dostępnych badań zawiera bardzo mało opisów przypadków osób, które nie paliły ani nie piły alkoholu [Altieri et al., 2005].

Co najmniej 75% nowotworów głowy i szyi zdiagnozowanych w Europie, Stanach Zjednoczonych i innych uprzemysłowionych rejonach świata spowodowanych jest połączonym wpływem palenia tytoniu i spożywania alkoholu [Hashibe et al., 2007].

Badania naukowe potwierdziły, że używanie produktów tytoniowych (np. palenie papierosów, fajek, i/lub cygar, żucie tytoniu lub zażywanie tabaki), łącznie ze spożywaniem alkoholu odpowiadają za powstawanie nowotworów rejonu głowy i szyi. Działanie to jest nie tyle addytywne, co synergiczne [Castellsagué et al., 2004; Ragin et al., 2006].

Maserejian i wsp. zaobserwowali, że picie alkoholu i palenie tytoniu łącznie powoduje większe ryzyko w powstawaniu przednowotworowych zmian w jamie ustnej u mężczyzn, niż autorzy zakładali. Wystąpienie silniejszego efektu działania tych dwóch używek jest oczywiste: dym tytoniowy zawiera duże ilości kancerogennego acetaldehydu, który w wyniku sprzęgania z aldehydem octowym, powstałym w wyniku metabolizowania alkoholu, powoduje wzrost łącznego poziomu acetaldehydu w gruczołach ślinowych [Maserejian et al., 2006].

Rodriguez i wsp. dokonali przeglądu danych pochodzących z dwóch badań kliniczno - kontrolnych prowadzonych we Włoszech i Szwajcarii zawierających 137 przypadków chorych z nowotworami jamy ustnej i gardła poniżej 45 roku życia i 98 pacjentów grupy kontrolnej [Rodriguez et al., 2004]. Wykazali oni, że główne czynniki ryzyka, jak i czynniki pełniące rolę ochronną u chorych z tymi nowotworami, są jednakowe dla pacjentów pochodzących z różnych grup wiekowych. Palenie tytoniu odpowiedzialne było za 77% przypadków powstania nowotworów jamy ustnej i gardła, picie alkoholu za 52%, niskie spożycie warzyw wśród chorych również za 52% przypadków, natomiast efekt wywołany przez wszystkie czynniki łącznie odpowiedzialny był za 85% przypadków wystąpienia nowotworu [Rodriguez et al., 2004].

Hashibe i wsp., w swoim badaniu wykazali, że mężczyźni częściej chorują przy łącznym narażeniu na tytoń i alkohol, niż w przypadku, gdyby tylko palili tytoń lub tylko spożywali alkohol. Natomiast kobiety palące i niepijące częściej zapadają na nowotwory, niż kobiety tylko pijące i niepalące lub narażone na obie używki łącznie. Badanie to wykazało również, że osoby poniżej 45 roku życia rzadziej znajdowały się w grupie ryzyka tytonio- i alkoholozależnych nowotworów głowy i szyi, w porównaniu do grupy starszej wiekowo. Może to być związane z istnieniem innych czynników ryzyka, takich jak zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), genetycznie uwarunkowanej wrażliwości czy czynników związanych z nieprawidłowym odżywianiem. Przedstawione dane zostały zebrane na podstawie badań zrealizowanych przy współpracy naukowców z międzynarodowego konsorcjum (ang. *International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium*) [Hashibe et al., 2009].

Palenie tytoniu jest silniej związane z występowaniem nowotworów krtani, podczas gdy spożywanie alkoholu częściej odpowiedzialne jest za nowotwory gardła i jamy ustnej

[Mehanna et al., 2011]. Zostało to potwierdzone przez Lubin i wsp., którzy przeprowadzili analizę danych pochodzących z 15 badań kliniczno - kontrolnych, zawierających informacje dotyczące palenia papierosów, fajek, cygar, tabaki, a także żucia tytoniu oraz spożywania alkoholu (piwa, wina i innych napojów alkoholowych) [Lubin et al., 2009].

Altieri i wsp. wykazali w swoim badaniu, że ryzyko wystąpienia nowotworów krtani wzrasta wraz z ilością wypitego alkoholu i jest nieduże przy jego umiarkowanym spożyciu. Jednak stwierdzenie to jest prawdziwe dla osób, które nie palą papierosów. Przy stosowaniu łącznym obu używek ryzyko wystąpienia nowotworu krtani jest zwielokrotnione [Altieri et al., 2005].

Naukowcy z międzynarodowego konsorcjum (INHANCE), utworzonego w 2004 roku, zabrali dane z 15 osobnych badań kliniczno - kontrolnych, które dotyczyły 10 244 chorych na nowotwory głowy i szyi i 15 227 osób grupy kontrolnej, z których 1072 osób grupy badanej i 5775 osób z grupy kontrolnej nigdy nie paliło tytoniu oraz 1598 pacjentów z grupy badanej i 4051 badanych z grupy kontrolnej nigdy nie piło alkoholu [Hashibe et al., 2007]. Wykazano, że wśród osób nigdy niepijących, palenie papierosów związane było ze zwiększonym ryzykiem powstania nowotworów głowy i szyi, szczególnie krtani. Występowanie zależności dawka – odpowiedź miało oczywisty związek z czasem trwania nałogu, częstotliwością palenia i ilością paczkolet. U około 24% osób niepijących proces nowotworowy mógłby się nie rozwinąć, gdyby osoby te nie paliły papierosów. Wśród osób niepalących, spożywających alkohol, ryzyko powstania nowotworów głowy i szyi zwiększone było tylko w przypadku, kiedy alkohol spożywany był z dużą częstotliwością. Wykazano, że związek ten był istotny dla osób z nowotworami krtani, części ustnej gardła i części krtaniowej gardła [Hashibe et al., 2007].

Podczas gdy palenie tytoniu i spożywanie mocnego alkoholu są głównymi czynnikami ryzyka w krajach rozwiniętych, różnorodne formy tytoniu do żucia stanowią główny problem wśród krajów rozwijających się [Döbrössy, 2005].

Według badań naukowych przeprowadzonych przez wielu autorów picie alkoholu wywiera niezależny wpływ na powstawanie nowotworów jamy ustnej, gardła i przełyku, podczas gdy dodatek tytoniu tylko nieznacznie modyfikuje ryzyko względne [Bagnardi et al., 2001].

Niepokojącym jest fakt niskiej świadomości społeczeństwa związanej z ryzykiem powstawania nowotworów głowy i szyi i dwoma najważniejszymi czynnikami wywołującymi chorobę – paleniem papierosów i spożywaniem alkoholu. Większość pacjentów jest świadomych tego, że palenie papierosów może przyczynić się do powstania nowotworu, jednak zwielokrotnione ryzyko występujące w połączeniu dwóch używek zdaje się być często ignorowane. Badanie przeprowadzone przez Humphris i wsp. wykazało, że osoby, które otrzymały pisemną informację (ulotkę) dotyczącą czynników ryzyka związanych z nowotworami głowy i szyi, posiadały większą świadomość w porównaniu do osób, które takiej informacji nie otrzymały [Humphris et al., 2004].

Marron i wsp. na podstawie badań międzynarodowego konsorcjum (INHANCE) przeprowadzili analizę określającą efekt, jaki wywołuje zaprzestanie palenia tytoniu i picia alkoholu, na ryzyko związane z powstawaniem nowotworów głowy i szyi oraz ich podregionów. Autorzy wykazali, że zaprzestanie nałogu palenia tytoniu w okresie 1 – 4 lat zmniejsza ryzyko powstania nowotworów tego obszaru. Dla kontrastu, dopiero po około 20

latach od zaprzestania spożywania alkoholu, zaobserwowano korzystny efekt dla ryzyka związanego z powstawaniem nowotworów głowy i szyi. Pożądany rezultat dotyczący zaprzestania nałogu alkoholowego nie był tak znaczący, jak w przypadku zaprzestania palenia tytoniu. Natomiast dla obydwu nałogów ryzyko powstania nowotworu zrównało się z poziomem ryzyka wystąpienia choroby wśród osób nigdy niepalących i nigdy niepijących dopiero po 20 latach od zaprzestania stosowania używek [Marron et al., 2010].

2.2.4. Dieta

Palenie tytoniu i spożywanie alkoholu uważane są za główne przyczyny powstawania nowotworów głowy i szyi, jednak wpływ stosowanej diety również pozostaje nie bez znaczenia. W produktach roślinnych znajduje się wiele składników, zarówno tych, które zawierają mikroelementy potrzebne dla prawidłowego metabolizmu, jak i innych składników bioaktywnych o nieznanym znaczeniu metabolicznym, które mogą prowadzić do powstania nowotworu [Li et al., 2012]. Liczne badania *in vitro* i badania na zwierzętach wykazały pozytywny efekt działania kilku witamin i minerałów na procesy angiogenezy, różnicowania komórek, proliferacji i apoptozy [Li et al., 2012].

Przeprowadzono badania dotyczące wpływu diety na ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi [Horn – Ross et al., 1997; Boeing et al., 2006; Bradshaw et al., 2012; Chuang et al., 2012].

Chuang i wsp. użyli danych pochodzących z 22 badań prowadzonych przez międzynarodowe konsorcjum (INHANCE), obejmujących 14 520 pacjentów grupy badanej i 22 737 pacjentów grupy kontrolnej [Chuang et al., 2012]. Autorzy wykazali odwrotną zależność pomiędzy zwiększonym spożyciem warzyw (wyłączając ziemniaki) a wystąpieniem nowotworów głowy i szyi. Spożywanie zielonych sałatek, sałaty i świeżych pomidorów więcej niż 7 razy w tygodniu wykazało zmniejszone ryzyko powstawania nowotworów tego rejonu w porównaniu do spożycia tych produktów mniejszego niż raz w tygodniu. Konsumpcja ziemniaków, szczególnie smażonych, wiązała się z podwyższonym ryzykiem powstania nowotworów głowy i szyi [Chuang et al., 2012].

Niższe ryzyko wystąpienia choroby zaobserwowano przy spożyciu większej ilości owoców (szczególnie cytrusów, gruszek i jabłek). Spożycie mięsa, szczególnie czerwonego (wołowina, wieprzowina) oraz przetworzonego, związane było ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu, również zwiększone spożycie jajek nie wykazało pozytywnego wpływu na zdrowie [Chuang et al., 2012]. Wyniki tych badań były zgodne dla pacjentów, którzy nigdy nie palili tytoniu i spożywali alkohol w umiarkowanej ilości [Chuang et al., 2012].

Badania przeprowadzone przez Horn - Ross i wsp. wykazały, że zwiększone spożycie owoców i warzyw, szczególnie tych zawierających duże ilości witaminy C oraz ograniczenie jedzenia zawierającego duże ilości cholesterolu wśród pacjentów z nowotworami ślinianek, może odgrywać istotną rolę w zapobieganiu powstawaniu zmian nowotworowych. Byli to kolejni autorzy, którzy potwierdzili, jak ważne znaczenie dla występowania chorób ma prewencja [Horn - Ross et al., 1997].

Bradshaw i wsp. na podstawie badań prowadzonych w latach 2002 -2006, w których udział wzięło 1176 osób z nowotworami głowy i szyi oraz 1317 osób grupy kontrolnej

wykazali, że spożycie warzyw, owoców i chudego białka związane było ze zmniejszonym ryzykiem powstania nowotworów głowy i szyi (tym mniejsze było ryzyko, im więcej wymienionych produktów pacjenci spożywali). Spożycie smażonych potraw, mięs o wysokiej zawartości tłuszczu i słodczy wiązało się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów krtani [Bradshaw et al., 2012]. Ciekawym był fakt, że spożycie owoców, warzyw i chudego białka wykazywało wyższy efekt ochronny wśród osób czarnoskórych, u których nowotwory w obrębie rejonu głowy i szyi występują częściej, niż wśród osób populacji białej [Bradshaw et al., 2012].

Boeing i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród osób pochodzących z siedmiu krajów europejskich wykazali, że zwiększone spożycie warzyw i owoców związane było z obniżonym ryzykiem wystąpienia nowotworów dróg oddechowych i górnego odcinka przewodu pokarmowego o około 9% przy spożyciu 80 gramowej porcji owoców i warzyw (12% mężczyźni i 4% kobiety) [Boeing et al., 2006].

Badania epidemiologiczne dotyczące wpływu kawy i herbaty na nowotwory rejonu głowy i szyi są niejednoznaczne. Istnieją natomiast dowody, że spożycie maté (popularny napój ziołowy, tradycyjnie spożywany w Argentynie i w niektórych rejonach Brazylii) zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów tego rejonu. Wysokie spożycie produktów zawierających karoten (szczególnie β - karoten) oraz witaminy C i E prawdopodobnie obniża ryzyko powstania nowotworów jamy ustnej i gardła [Lucenteforte et al., 2010].

Wartość BMI (ang. *body mass index* - BMI), jako niezależny czynnik odpowiedzialny za powstawanie nowotworów głowy i szyi, jest trudny do oceny ze względu na możliwość współwystępowania dwóch innych czynników ryzyka - spożywania alkoholu i palenia papierosów przez osoby z nowotworem [Gaudet et al., 2010]. Według niektórych badań, ryzyko powstania nowotworów głowy i szyi jest zwiększone wśród ludzi szczupłych, natomiast zmniejszone wśród osób z nadwagą oraz otyłych, w porównaniu do osób posiadających prawidłowy wskaźnik masy ciała [Gaudet et al., 2010]. Nie jest jednak oczywiste, czy zależności te różnią się w stosunku do określonych podgrup, czy też wpływ mają na to inne czynniki ryzyka, takie jak alkohol czy palenie tytoniu. Na podstawie oceny 17 badań kliniczno - kontrolnych, zawierających dane pochodzące od 12 716 osób chorych i 17 438 osób z grupy kontrolnej, Gaudet i wsp. potwierdzili tę zależność, określając związek pomiędzy wartością wskaźnika masy ciała dla osób w różnym wieku, a ryzykiem powstania nowotworów głowy i szyi, z uwzględnieniem głównych czynników ryzyka – palenia papierosów i spożywania alkoholu [Gaudet et al., 2010].

2.3. Pierwiastki niezbędne i metale toksyczne – wprowadzenie

Pierwiastki pełnią w organizmie człowieka bardzo ważną rolę. Ze względu na istotne funkcje, jakie odgrywają, nazywane są pierwiastkami niezbędnymi. Elementy te spełniają jednak swoje korzystne zadanie tylko w określonych stężeniach [Seńczuk, 2006].

Dostarczane są głównie z pożywieniem i wodą [Seńczuk, 2006]. Ich rola w prawidłowym funkcjonowaniu i rozwoju organizmu polega na wchodzeniu w skład i stabilizowaniu ważnych związków chemicznych i struktur komórkowych, aktywacji systemu redoks i wpływaniu na przebieg wielu procesów fizjologicznych [Fraga.2005].

Mikro- i makroelementy to nieodzowne składniki zapewniające prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Do mikroelementów zaliczamy miedź, cynk, żelazo, fluor, jod, mangan, chrom (III), selen, molibden i kobalt. Ich zapotrzebowanie wynosi poniżej 100 mg na dzień, a w organizmie występują w ilości mniejszej niż 0,01% [Murray et al., 1995]. Zapotrzebowanie dzienne na makroelementy wynosi powyżej 100 mg na osobę, a ich zawartość u człowieka to ponad 0,01%. Zaliczamy do nich magnez, fosfor, wapń, sód, potas i chlor [Murray et al., 1995].

Bardzo ważne jest zachowanie prawidłowych proporcji pomiędzy pierwiastkami, ponieważ zarówno ich niedobór, ale także nadmiar może prowadzić do zaburzeń fizjologicznych [da Silva et al., 2005].

W organizmie występują również pierwiastki obojętne, które nie pełnią istotnej roli w przebiegu reakcji metabolicznych oraz pierwiastki toksyczne, które przyczyniają się do zmniejszenia wydolności organizmu, zaburzeń metabolicznych, osłabienia procesów enzymatycznych i immunologicznych. Prowadzą do licznych zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu i nawet ich niewielkie stężenia w ustroju mogą prowadzić do wielu chorób, a nawet do śmierci. Udowodnione zostało działanie rakotwórcze niektórych pierwiastków [Seńczuk, 2006].

Narażenie ludzi na obecność metali toksycznych, zamieszkujących i zatrudnionych na terenach przemysłowych, zwiększyło się wraz ze wzrostem rozwoju przemysłu metalurgicznego, elektrotechnicznego, wydobywczego i innych. Woda, powietrze atmosferyczne i żywność pochodząca z tych terenów są głównymi źródłami narażenia człowieka [Seńczuk, 2006].

Zawartość różnych pierwiastków w organizmie zależy między innymi od drogi wchłaniania, dawki, sposobu odżywiania i szybkości wydalania. We wchłanianiu i rozmieszczeniu istotną rolę odgrywa również stopień utlenienia i rozdrobnienia cząstek metali znajdujących się w powietrzu [Seńczuk, 2006].

W celu oznaczenia zawartości pierwiastków w organizmie wykonuje się rutynowe badania krwi, moczu. Jednak zmiany zachodzące w wyniku zaburzeń niektórych metali niezbędnych są trudne do wykazania w oparciu o wspomniane badania, ze względu na działalność ustroju w celu utrzymania homeostazy. Dlatego poszukuje się innych materiałów ukazujących wiarygodny poziom pierwiastków w organizmie. Taki alternatywny materiał stanowią włosy i paznokcie. Ich przewaga nad tradycyjnymi metodami widoczna jest na każdym etapie analizy. Ich pobór jest bezinwazyjny i prosty, nie wymaga też udziału przeszkolonego personelu. Ważną zaletą jest fakt, że oddają średnie stężenie pierwiastków w całym organizmie z okresu kilku miesięcy, pozwalając na określenie chronicznego

narażenia. Stężenie pierwiastków w materiałach alternatywnych może wykazywać wartości nawet do pięćdziesięciu razy wyższe niż we krwi i moczu [Wołowiec et al., 2013].

2.3.1. Wapń

2.3.1.1. Ogólna charakterystyka

Jednym z najważniejszych i występujących w największych ilościach pierwiastkiem w organizmie człowieka jest wapń. Należy do grupy berylowców, stanowiącej grupę 2 układu okresowego pierwiastków. Jego masa atomowa wynosi 40,08, temperatura topnienia 1118 [K], temperatura wrzenia 1756 [K]. Otrzymuje się go przez elektrolizę stopionych chlorków. Ten srebrzystobiały pierwiastek występuje w dużym rozpowszechnieniu w skorupie ziemskiej – 4,15%, głównie w postaci krzemianów i glinokrzemianów. Najbardziej popularne, dostępne źródła wapnia, to węglan i cytrynian [Bielański, 2012].

Okolo 99% zasobów wapnia zlokalizowanych jest w kościach. Główną rolę odgrywaną przez ten pierwiastek jest tworzenie struktury kości i zębów. Pozostała jego ilość znajduje się w komórkach tkanek miękkich (0,9%) oraz w krwi i płynie pozakomórkowym (0,1%). Bierze on udział w prawidłowym funkcjonowaniu układu mięśniowego, krążenia, wydzielania wewnętrznego i układu nerwowego. W kościach wapń występuje głównie w formie hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [Straub, 2007].

2.3.1.2. Wapń w organizmie

Poziom wchłaniania wapnia waha się przez całe życie i zależy od różnorodnych uwarunkowań fizjologicznych zachodzących w czasie rozwoju. Odpowiednia absorpcja pierwiastka uzależniona jest przede wszystkim od wieku, płci, aktywności fizycznej, diety, a także od zmienności genetycznych i etnicznych [Greer, Krebs, 2006]. Największy poziom absorpcji wapnia występuje w okresie dzieciństwa (około 60%) i zwiększa się ponownie w okresie dojrzewania. Wraz z wiekiem ułamkowa absorpcja wapnia stopniowo maleje [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997]. U kobiet po menopauzie spada średnio o 0,21% w ciągu roku. Wykazano, że również u mężczyzn absorpcja wapnia zmniejsza się w podobny sposób wraz z wiekiem [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Wchłanianie wapnia (Ca) jest największe, kiedy jego spożycie jest niewielkie, a zapotrzebowanie na ten pierwiastek wysokie. Na przyswajanie tego pierwiastka wpływają również takie czynniki jak poziom witaminy D, poziom estrogenów, kwaśne środowisko w jelitach a także spożycie błonnika [Straub, 2007]. Absorpcja wapnia zmniejsza się wraz z wiekiem, obecną hipochlorhydrią, niskim poziomem witaminy D i estrogenów, a także dietą bogatą w błonnik [Straub, 2007]. Wapń z pożywiania wchłaniany jest w jelicie cienkim na drodze paracelularnej i transcelularnej, które odbywają się odpowiednio w jelicie cienkim i w dwunastnicy [Bronner 2009].

Prawidłowy poziom wapnia w krwi wynosi, w zależności od wieku i stanu organizmu, od 270 – 1300 mg/dzień dla dzieci od 7. miesiąca życia do 18. roku życia, 1000 mg/dzień dla

osób dorosłych, oraz około 1200 mg/dzień dla osób starszych; kobiety w ciąży oraz karmiące od 1000 – 1300 mg/dzień [Straub, 2007].

Optymalnym źródłem wapnia dla noworodków jest mleko matki. Brak jest wystarczających dowodów, aby stwierdzić, że zwiększone spożycie wapnia w tym okresie będzie korzystne dla osiągnięcia długoterminowego zwiększenia mineralizacji kości [Greer, Krebs, 2006].

U dzieci w wieku od 1 do 3 lat zalecane spożycie wapnia wynosi 500 mg dziennie. Wartość ta wzrasta wraz z okresem dojrzewania [Greer, Krebs, 2006]. Badania wskazują, że u dzieci w wieku 4 – 8 lat, spożycie wapnia w dawce odpowiadającej 800 mg dziennie wpływa korzystnie na zapewnienie odpowiedniej gęstości mineralnej kości [Greer, Krebs, 2006]. Efektywność wchłaniania wapnia jest zwiększona w okresie dojrzewania płciowego, największa mineralizacja kości zachodzi właśnie wtedy [Bailey et al., 2000]. Optymalne spożycie wapnia w tym wieku (9 – 18 lat) wynosi 1300 mg dziennie, większa dawka będzie ulegała wydaleniu z organizmu i nie przyniesie korzyści [Greer, Krebs, 2006]. W wieku 19 – 50 lat poziom ten ulega obniżeniu do 1000 mg na dzień, by ponownie wzrosnąć do 1200 mg dziennie w okresie 50 – 70 lat [Greer, Krebs, 2006].

Wolf i wsp. wykazali, że wchłanianie wapnia u kobiet uzależnione jest między innymi od wieku, poziomu estrogenów oraz spożycia wapnia, natomiast czynniki te odpowiadają tylko stopniowo za zmienną skuteczność wchłaniania pierwiastka w populacji zdrowych kobiet [Wolf et al., 2000]. W badaniach przeprowadzonych wśród 142 kobiet będących w okresie przed i okołomenopauzalnym, średnia wartość przyswajania wapnia wynosiła 35% i wahała się między 17 – 58%. W badaniu tym wchłanianie badanego pierwiastka było proporcjonalne do całkowitego spożycia wapnia, błonnika, spożycia alkoholu i aktywności fizycznej. Absorpcja wapnia była również pozytywnie związana z indeksem masy ciała, tłuszczu przyjmowanego wraz z dietą oraz poziomu PTH. Wśród kobiet o najniższym stosunku tłuszczu do spożycia błonnika wykazano o 19% mniejsze wchłanianie wapnia w porównaniu do kobiet, które cechował najwyższy stosunek tłuszczu do spożycia błonnika [Wolf et al., 2000].

Efektywność wchłaniania wapnia z większości produktów spożywczych, w tym mleka, przetworów mlecznych i ziaren jest bardzo zbliżona. Pierwiastek ten może być również słabo wchłaniany z produktów bogatych w kwas szczawiowy (szpinak, słodkie ziemniaki, rabarbar, fasola) oraz kwas fitynowy (chleb, surowe ziarna, nasiona, orzechy) [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Wapń wydalany jest głównie z moczem i kałem. Eliminacja pierwiastka z moczem zmniejsza się wraz z wiekiem, w przypadku ekskrecji z kałem nie zaobserwowano takiej zależności [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997]. Istnieje wiele czynników przyspieszających eliminację tego pierwiastka z moczem: spożycie kofeiny, białka oraz sodu, a także niski poziom estrogenów [Straub, 2007].

Rapuri i wsp. w swoim badaniu przeprowadzonym wśród 489 kobiet w wieku 66 - 77 lat potwierdzili, że istnieje zależność pomiędzy spożyciem kofeiny, a utratą masy kostnej [Rapuri et al., 2001]. Utrata masy kostnej w kręgosłupie była znacznie większa u kobiet

spożywających > 300 mg kofeiny na dzień, w porównaniu do kobiet spożywających < 300 mg/dzień [Rapuri et al., 2001].

2.3.1.3. Diagnostyka zaburzeń

Współdziałanie parathormonu (PTH), kalcytoniny i 1,25 – dihydroksycholekalcyferolu [1,25-(OH)₂D₃] odpowiada za utrzymanie prawidłowej homeostazy wapnia. Działanie parathormonu polega na stymulacji resorpcji tkanki kostnej, zwiększeniu resorpcji zwrotnej wapnia w cewkach nerkowych oraz przemieszczaniu wapnia do płynu zewnątrzkomórkowego. Działania te antagonizowane są przez kalcytoninę. PTH pobudza również syntezę 1,25-(OH)₂D₃, który odpowiada za zwiększone wchłanianie wapnia z przewodu pokarmowego oraz nasila resorpcję tkanki kostnej [Pawlak, Wawrocka – Pawlak, 2003].

Przewlekły niedobór wapnia w organizmie, który może być związany z jego nieprawidłowym przyjmowaniem lub zmniejszonym wchłanianiem jelitowym, jest jednym z istotnych powodów zmniejszenia masy kostnej i osteoporozy. Zmniejszenie poziomu zaabsorbowanego wapnia powoduje, że stężenie zjonizowanego Ca krążącego w obiegu zaczyna spadać, co powoduje wzrost syntezy i uwalniania PTH. Parathormon działa na poziomie trzech organów docelowych, aby przywrócić stężenie wapnia do normy [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997]. W nerkach, PTH sprzyja reabsorpcji wapnia do kanalika dystalnego, wpływa pośrednio na jelito stymulując produkcję 1,25-(OH)₂D₃, powoduje także resorpcję kości, co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia wapnia do krwi. Tak więc pomimo, że PTH utrzymuje prawidłowe stężenie krążącego wapnia w czasie jego niedoboru, dzieje się to kosztem masy kostnej [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Dotychczasowe badania epidemiologiczne dowodzą, że niski poziom wapnia, poza utratą masy kostnej i związanej z tym osteoporozy, może również być powiązany z zachorowaniem na raka jelita grubego i prowadzić do powstawania nadciśnienia tętniczego [Wolf et al., 2000].

Jednym z głównych powikłań metabolicznych w przebiegu choroby nowotworowej jest hiperkalcemia. Definiuje się ją, gdy poziom wapnia w surowicy przekracza górną granicę normalnego poziomu tego pierwiastka. Dla mężczyzn wynosi on 2,58 mmol/l, u kobiet poniżej 50 roku życia - 2,50 mmol/l i 2,56 mmol/l u kobiet powyżej 50 roku życia [Bradley, Hoskin, 2006].

U około 10 - 20% dorosłych chorych oraz u 0,5 – 1,0% dzieci z rozpoznaniem nowotworem złośliwym stwierdza się ten patologiczny stan organizmu, i to właśnie nowotwór jest najczęstszą przyczyną hiperkalcemii spotykanej w praktyce klinicznej. Rozwój tej choroby u pacjentów z nowotworami złośliwymi spowodowany jest zwiększeniem resorpcji tkanki kostnej. Hormon polipeptydowy, znany wcześniej jako białko podobne do parathormonu (ang. *parathyroid hormone-related protein*, PTHrP) odgrywa kluczową rolę w indukowaniu zwiększonego stężenia wapnia. Podwyższony poziom PTHrP wykazano w tkankach i krwi obwodowej pacjentów z humoralną hiperkalcemią nowotworową [Iwase et al., 2001; Pawlak, Wawrocka – Pawlak, 2003; Nimonkar, Borle, 2009].

Bardzo ważne jest regularne mierzenie poziomu wapnia w surowicy krwi, może to bowiem być istotnym czynnikiem determinującym leczenie ewentualnej hiperkalcemii w jej wczesnym stadium [Bradley, Hoskin, 2006]. Należy rozważyć terapię podając dwufosfoniany, szczególnie gdy hiperkalcemia jest dominującym objawem choroby nowotworowej. Leczenie to może przyczynić się do zwiększenia jakości życia chorych [Iwase et al., 2001]. Nieleczona hiperkalcemia prowadzi do zgonu, niezależnie od stopnia zaawansowania nowotworu [Pawlak, Wawrocka – Pawlak, 2003]. Penel i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród 136 pacjentów z hiperkalcemią związaną z nowotworami dróg oddechowych zaobserwowali 98 przypadków zgonów z powodu tego schorzenia, a średnia długość przeżycia wyniosła 35 dni. Prowadzi to do stwierdzenia, że wystąpienie hiperkalcemii w chorobie nowotworowej związane jest z bardzo złym rokowaniem [Penel et al., 2005]. Potwierdzili to również Onizawa i Yoshida, którzy wykazali, że pacjenci z nowotworami jamy ustnej z obecną hiperkalcemią nie rokują długotrwałego przeżycia, nawet w przypadku zastosowanego leczenia w postaci dwufosfonianów [Onizawa, Yoshida, 2006].

2.3.2. Magnez

2.3.2.1. Ogólna charakterystyka

Magnez należy do berylowców, stanowiących grupę 2 układu okresowego pierwiastków. Jest srebrzystobiałym metalem, o masie atomowej 24,305, temperaturze topnienia 923 [K] i temperaturze wrzenia 1378 [K]. Należy do pierwiastków o dużym rozpowszechnieniu w skorupie ziemskiej – 2,33%. Występuje w postaci minerałów krzemianowych – oliwin, talk, serpentyn, oraz w postaci węglanów: dolomitu i magnezytu. Sole magnezu występują w niektórych rodzajach wód mineralnych, w wodzie morskiej zawartość soli magnezu wynosi około 0,5%. Pierwiastek ten odgrywa ważną rolę w przyrodzie, jest jednym ze składników chlorofilu stanowiącego zielony barwnik obecny w łodygach i liściach roślin [Bielański, 2012].

Magnez wytwarzany jest na skalę techniczną drogą bezpośredniej redukcji MgO węglem, ferrokremem lub węglikiem wapnia CaC_2 w atmosferze wodoru lub gazu ziemnego (w temperaturze 2300 K) lub drogą elektrolizy stopionej mieszaniny bezwodnego chlorku magnezu z chlorkiem sodu i chlorkiem wapnia (w temperaturze ok. 1000 K). Magnez jest najlżejszym metalem użytkowym, stanowi składnik lekkich stopów [Bielański, 2012].

Całkowita zawartość magnezu w organizmie dorosłego człowieka wynosi 22 - 26 g (1,000 mmol). Około 60% znajduje się w kościach, z czego 30% jest wymienne i stanowi rezerwar dla stabilizowania stężenia w surowicy. W mięśniach szkieletowych obecnych jest około 20% całkowitej ilości magnezu, 19% zlokalizowanych jest w innych tkankach miękkich, a 1% znajduje się w płynie zewnątrzkomórkowym [Swaminathan, 2003].

Prawidłowa wartość stężenia magnezu w surowicy wynosi 0,70 do 1,10 mmol/litr, z czego około 20% wiąże się z białkami, 65% występuje w formie zjonizowanej, a pozostała część jest skompleksowana z różnymi anionami, takim jak cytrynian i fosforan [Swaminathan, 2003].

2.3.2.2. Magnez w organizmie

Magnez jest drugim, najczęściej występującym wewnątrzkomórkowym jonem i czwartym, co do zawartości, kationem w ludzkim organizmie [Swaminathan, 2003]. Odgrywa kluczową rolę w wielu fizjologicznych funkcjach organizmu. Bierze udział w przenoszeniu, przechowywaniu i wykorzystywaniu energii w organizmie. Obecność tego pierwiastka jest wymagana do syntezy białek i kwasów nukleinowych oraz szeregu reakcji mitochondrialnych [Connolly, Worthley, 1999].

Magnez bierze udział w wielu reakcjach enzymatycznych, wliczając w to reakcje, które obejmują tworzenie i wykorzystanie adenosynotryfosforanu (ATP) w metabolizmie energetycznym [Connolly, Worthley, 1999].

Stanowi kofaktor dla ponad 300 systemów enzymatycznych. Wykazano również, że magnez wymagany jest do przeprowadzenia fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Przenoszenie pierwiastka do lub z komórki wymaga obecności systemów transportujących. Magnez niezbędny jest do działalności ATPazy sodowej i potasowej, która odpowiada za aktywny transport potasu [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Magnez formuje kompleksy z rybonukleazą, polimerazą DNA, adenylazą, fosfodiesterazą, ATPazą i GTPazą, przez co związany jest z metabolizmem białek i kwasów nukleinowych oraz transdukcją sygnałów [Castiglioni, Maier, 2011].

Wchłanianie i biodostępność magnezu zależy od wielu zmiennych, takich jak rodzaj soli magnezowej/stosowanego związku i obecności innych substancji odżywczych, które mogą wzmocnić albo zakłócić jego pobieranie lub homeostazę [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Magnez znaleźć można w wielu produktach żywnościowych, ale jego zawartość znacznie się różni. W magnez bogate są zielone warzywa liściaste, ale również wysoki poziom tego pierwiastka można znaleźć w ziarnach i orzechach. Mięso, skrobia i mleko charakteryzują się średnią jego zawartością. Całkowite spożycie magnezu zależy zazwyczaj od poziomu przyjętych kalorii, stąd wyższy jest jego poziom u młodzieży i dorosłych mężczyzn, a niższy u kobiet i osób w podeszłym wieku [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

W badaniach przeprowadzonych przez Eby i wsp. wykazano, że spożycie magnezu systematycznie spadało w ciągu ubiegłego wieku, ze względu na praktykę rozdrabniania ziarna do przetworzonej żywności, dokonywania wyborów żywieniowych stosując produkty o niskiej zawartości magnezu, silnej sekwestracji chemicznej metali podczas przetwarzania żywności i całkowitego usunięcia minerałów z wody pitnej stosując proces destylacji i odwróconej osmozy. Te okoliczności spowodowały obniżenie średniego spożycia magnezu z 450 mg w XIX wieku do 250 mg/dzień albo mniej w wieku XX i na początku XXI, co spowodowało istotny i niepokojący niedobór magnezu u większości populacji [Eby, Eby, 2010].

Sabatier i wsp. również zauważyli, że w przeciągu ostatnich lat spożycie magnezu uległo znacznemu obniżeniu w wielu krajach [Sabatier et al., 2002], co może skutkować ukrytym, przewlekłym niedoborem magnezu [Iannello, Belfiore, 2001].

2.3.2.3. Diagnostyka zaburzeń

Przewlekłe, niedostateczne przyjmowanie magnezu może wiązać się z rozwojem wielu stanów chorobowych, takich jak: choroby układu krążenia, migreny, stwardnienie rozsiane, choroby Alzheimera, nawracające infekcje bakteryjne, infekcje grzybicze spowodowane obniżoną odpornością organizmu, skurcze mięśni, naczyń wieńcowych, osteoporoza, astma oraz utrata słuchu czy nawet cukrzyca typu II [Johnson, 2001].

Oprócz tego wykazano, że przy niedoborze magnezu dochodzić może do wielu zaburzeń neurologicznych i nerwowo – mięśniowych, takich jak: nadpobudliwość, zaburzenia zachowania, depresja, bóle i zawroty głowy, ataksja, niepokój, osłabienie mięśniowe, dreszcze, ogólna drażliwość, zachowania psychotyczne, z których każdy był odwracalny przy nadmiarze magnezu w organizmie [Johnson, 2001].

Hipomagnezemia obserwowana była również u pacjentów chorych na raka, marskość wątroby, choroby naczyń mózgowych oraz będących w stanie ogólnego osłabienia. Najczęstszymi objawami klinicznymi u osób z hipomagnezemią były zmiany osobowości i depresja [Hashizume, Mori, 1990].

Deficyt magnezu w organizmie może być związany z niedostatecznym jego spożyciem, zespołem złego wchłaniania a także utratą magnezu przez nerki, co nastąpić może w niektórych stanach chorobowych (cukrzyca, alkoholizm). Coraz więcej leków powoduje zwiększenie wydalania magnezu. Są to między innymi diuretyki, powszechnie stosowane w terapii nadciśnienia czy niewydolności serca [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Jednymi z poważniejszych chorób powodowanych przez niedobór Mg w organizmie są choroby układu krążenia. Z badań klinicznych i epidemiologicznych wynika, że dieta bogata w magnez (co najmniej 500 – 100 mg/dzień) może prowadzić do obniżenia poziomu ciśnienia krwi, jednak badania te nie są do końca zgodne. Te zróżnicowane wyniki mogą wiązać się z populacją badanych, czasem trwania badania, jednoczesnego stosowania narkotyków, innych składników odżywczych i minerałów, podanej dawki i rodzaju magnezu, 24 – godzinnego wydalania magnezu moczowego, jak również braku wyjściowej oceny aktywności reniny w osoczu. W większości badań epidemiologicznych wykazano odwrotną zależność pomiędzy spożyciem magnezu i ciśnieniem krwi [Jee et al., 2002; Touyz, 2003; Houston, 2011].

W badaniu przeprowadzonym wśród 60 pacjentów z nadciśnieniem, którym podawano tlenek magnezu w ilości 20 mmol/dzień przez okres 8 tygodni zaobserwowano znaczący spadek ciśnienia krwi w warunkach ambulatoryjnych, domowych i w miejscu pracy. Wśród pacjentów z początkowym najwyższym ciśnieniem krwi zaobserwowano największy jego spadek [Kawano et al., 1998].

Magnez może obniżać jeszcze mocniej ciśnienie krwi, jeżeli równocześnie wzrośnie spożycie potasu i zmniejszy się ilość spożywanego sodu [Patki et al., 1990; Houston, 2011]. Pierwiastek ten stosowany w skojarzeniu z tauryną obniża ciśnienie krwi, zapobiega arytmii a także hamuje rozwój miażdżycy [McCarty, 1996; Yamori et al., 2010].

Magnez obniża wewnątrzkomórkowy poziom wapnia i sodu, co zwiększa możliwość obniżenia ciśnienia krwi. Istotne jest, aby dostarczyć organizmowi dostatecznej ilości magnezu, potasu i wapnia a także zmniejszyć spożycie sodu, poprzez stosowanie prawidłowej

diety (warzywa, owoce), aby zapobiec nadciśnieniu i powstaniu chorób układu krążenia oraz udaru mózgu [Houston, 2011].

Suplementy diety zawierające magnez wykazały poprawę tolerancji glukozy oraz poprawę reakcji na insulinę u osób starszych, nieinsulinozależnych z cukrzycą [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997].

Doustne przyjmowanie magnezu znalazło również pozytywne zastosowanie w leczeniu depresji. W homeopatycznych wskazaniach do leczenia magnezem zalicza się wspomnianą depresję, lęk, urojenia, trudności intelektualne, drażliwość, halucynacje, zmiany nastroju i nerwowość [Eby, Eby, 2010].

Hypermagnezemia - zaburzenie elektrolitowe, podczas którego występuje podwyższony poziom magnezu we krwi. Może pojawić się u osób z zaburzeniami czynności nerek, najczęściej, kiedy nieprawidłowa funkcja tego narządu powiązana jest z nadmiernym spożyciem magnezu, który nie pochodzi z pożywienia [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997]. Przykładem może być zwiększone spożywanie soli magnezowych lub leków zawierających magnez, takich jak niektóre środki przeczyszczające lub leki zubożniające, szczególnie kiedy stosowane są u osób starszych, u których czynność nerek uległa pogorszeniu [Jahnen –Dechent, Ketteler, 2012]. Przy nieznacznych odchyleniach stężenia magnezu w surowicy, objawy mogą pozostać niezauważalne, natomiast przy wysokich wzrostach wartości tego pierwiastka, dochodzić może do zaburzeń nerwowo – mięśniowych i nieprawidłowości ze strony układu sercowo – naczyniowego [Jahnen –Dechent, Ketteler, 2012].

Badania epidemiologiczne dostarczyły dowodów na istnienie zależności pomiędzy obecnością magnezu w diecie a różnymi rodzajami nowotworów. Wykazano, że wysoki poziom magnezu zawarty w wodzie pitnej chroni przed nowotworami wątroby i przełyku. Oprócz tego, stężenie magnezu w wodzie pitnej jest odwrotnie skorelowane ze śmiercią spowodowaną nowotworami gruczołu sutkowego, prostaty i jajnika, natomiast nie wykazano takiej korelacji w przypadku innych nowotworów [Castiglioni, Maier, 2011]. Badania przeprowadzone przez Chiu i wsp. wskazują natomiast, że ryzyko powstania nowotworów jelita grubego związane jest z niskim spożyciem magnezu [Chiu et al., 2010].

Stężenia magnezu w surowicy pacjentów ze zmianami przednowotworowymi ulegają obniżeniu, niezależnie od prowadzonej terapii, a poziom spadku koreluje ze stopniem zaawansowania nowotworu [Castiglioni, Maier, 2011]. Stężenie magnezu zauważalnie spada pod koniec pierwszego tygodnia stosowanej radioterapii oraz po zastosowaniu leczenia różnymi chemioterapeutykami, które powodują utratę magnezu, takimi jak neurotoksyczna cisplatyna [Yao et al., 2007].

Większość badań wskazuje na chemoprewencyjną rolę magnezu. Optymalizacja spożycia tego pierwiastka może stanowić skuteczne i niskonakładowe środki zapobiegawcze w zmniejszaniu ryzyka powstania nowotworu [Castiglioni, Maier, 2011].

Badanie przeprowadzone na myszach przez Nasulewicz i wsp. potwierdziło, że niskie spożycie magnezu ma wpływ na rozwój nowotworu, jednakże mechanizmy potwierdzające ten efekt pozostają niejasne [Nasulewicz et al., 2004]. Autorzy uważają, że z klinicznego punktu widzenia, ocena poziomu magnezu u pacjentów z nowotworem może mieć szczególnie ważne znaczenie praktyczne. Deficyt magnezu u chorych cierpiących na różne rodzaje nowotworu wynika z samego postępu choroby, który może ulec pogorszeniu pod

wpływem pewnych terapii nowotworowych. W takich przypadkach suplementacja magnezem stanowi powszechną praktykę kliniczną [Nasulewicz et al., 2004]. Nasulewicz i wsp. twierdzą również, że rozważając uzupełnianie magnezu u pacjentów, powinno się zachować szczególną ostrożność – może to bowiem stymulować proces wzrostu [Nasulewicz et al., 2004].

Wolf i wsp. potwierdzili w swojej pracy, że magnez powinien odgrywać istotną rolę w onkologii klinicznej. Autorzy zauważają jednak, że rozbieżności dotyczące roli tego pierwiastka nie pozwalają jednoznacznie określić, czy w chorobach nowotworowych spełnia on korzystną funkcję, czy też jego suplementacja nie przyniesie spodziewanych korzyści. Konieczne są dalsze badania, aby jednoznacznie potwierdzić znaczenie tego pierwiastka w przebiegu chorób nowotworowych [Wolf et al., 2009].

2.3.3. Cynk

2.3.3.1. Ogólna charakterystyka

Cynk należy do grupy 12 układu okresowego i stanowi 0,007% skorupy ziemskiej, co sprawia, że zajmuje 29 miejsce wśród wszystkich pierwiastków pod względem rozpowszechnienia. Posiada masę atomową 65,38, temperatura topnienia tego pierwiastka wynosi 692,7 [K], a temperatura wrzenia 1179,4 [K]. Najważniejsze minerały cynku, z których wytapia się ten metal, to m.in. smitsonit, heksagonalny wurcyt i blenda cynkowa (sfaleryt) [Bielański, 2012].

Pierwiastek ten otrzymywany jest na drodze hydrometalurgicznej oraz pirometalurgicznej. Jest to metal łatwo topliwy, dość kruchy w temperaturze pokojowej, o nieznacznie niebieskawym odcieniu [Bielański, 2012].

Cynk jest ważnym metalem użytkowym, najwięcej używa się go do ochronnego powlekania innych metali, przede wszystkim różnych wyrobów żelaznych (np. drut, blacha itp.). Ma również duże znaczenie jako składnik licznych stopów, między innymi z miedzią – mosiądzów [Bielański, 2012].

Cynk jest pierwiastkiem niezbędnym, odgrywającym istotną rolę w żywieniu i spełnia on wiele funkcji biochemicznych w metabolizmie człowieka. Jest jednym z najczęściej stosowanych mikroelementów [Scherz, Kirchhoff, 2006].

W ludzkim organizmie znajduje się 2 – 4 gramów cynku, z których około 0,1% jest uzupełnianych każdego dnia [Maret, Sandstead, 2006]. Ten niezbędny pierwiastek obecny jest we wszystkich tkankach ciała, z czego w mięśniach występuje około 60%, w kościach około 30%, skóra i włosy zawierają około 8% cynku, wątroba 5%, natomiast przewód pokarmowy i trzustka – około 3%. Po spożyciu, cynk transportowany jest do wątroby i następnie rozmieszczany w całym organizmie [WHO, 2001].

Przybliżony zakres dziennego, całkowitego spożycia cynku wynosi 5,6 – 10,0 mg/dzień dla niemowląt i dzieci w wieku 2 miesiące – 11 lat, 12,3 – 13,0 mg/dzień dla dzieci w wieku 12 – 19 lat i 8,8 – 14,4 dla osób dorosłych w wieku 20 – 50 lat. Szacuje się, że średnia wartość cynku pobieranego z wodą pitną wynosi <0,2 mg/dzień [WHO, 2001]. Wartości referencyjnego spożycia różnią się w zależności od diety stosowanej w danym kraju, przypuszczalnej biodostępności cynku pochodzącego z pożywienia, a także wieku, płci i stanu

fizjologicznego [WHO, 2001]. Wartości referencyjnego spożycia występują w zakresie od 3,3 do 5,6 mg/dzień dla niemowląt w wieku 0 – 12 miesięcy, 3,8 – 10 mg/dzień dla dzieci w wieku 1 – 10 lat, dla młodzieży w wieku 11 – 18 lat - 8,7 – 15,0 mg/dzień. U osób dorosłych wartości te wynoszą od 6,7 do 15,0 mg/dzień – wiek 19 - 50 lat, 7,3 do 15,0 mg/dzień dla kobiet w ciąży, przy założeniu, że dieta uwzględnia umiarkowaną dostępność cynku, u kobiet karmiących (w zależności od etapu) wartość referencyjnego spożycia wynosi od 11,7 do 19,0 mg/dzień [WHO, 2001].

Rośliny strączkowe i zboża są głównym źródłem cynku dla większości populacji. Jednak żadne z pokarmów roślinnych nie są w stanie pokryć dziennego zapotrzebowania na ten pierwiastek. Produkty mięsne stanowią najważniejsze źródło najłatwiej przyswajalnego cynku z pożywienia [Maret, Sandstead, 2006; Hambidge, Krebs, 2007]. Najbogatsze w cynk jest czerwone mięso, natomiast drób i ryby dostarczają znacznie mniejszych ilości tego pierwiastka. Niektóre składniki żywienia mogą wpływać na biodostępność cynku, są to między innymi fityny, niektóre rodzaje błonnika oraz niektóre produkty reakcji Maillarda. Wiążą one cynk, hamując jego wchłanianie, co może wpływać na ryzyko wystąpienia niedoboru tego pierwiastka [Maret, Sandstead, 2006].

2.3.3.2. Cynk w organizmie

Cynk odgrywa kluczową funkcję w funkcjonowaniu układu odpornościowego i jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju i czynności komórek pośredniczących w odpowiedzi odpornościowej, takich jak neutrofile czy komórki NK (ang. *Natural Killer* – naturalni zabójcy). Cynk działa także jako antyoksydant. Wpływa na aktywność wielu enzymów (np. fosfatazy alkalicznej i kilku enzymów syntezy kwasów nukleinowych), stabilizuje struktury DNA, RNA i rybosomów [Shankar, Prasad, 1998].

Zawartość cynku w trzustce ma szczególne znaczenie, ponieważ mikroelement ten odgrywa ważną rolę w produkcji insuliny, hormonu regulującego poziom cukru we krwi. Dodatek cynku do insuliny powoduje, że poziom cukru we krwi występował będzie w niskich ilościach przez dłuższy okres czasu [Hassan, 2004].

Wiele związków pochodzących z diety odgrywa ważną rolę w prewencji nowotworów. Cynk i jego właściwości chemoprewencyjne zostały potwierdzone w wielu badaniach. Fakt, że pierwiastek ten jest kluczowym składnikiem lub kofaktorem ponad 300 enzymów, może mieć szczególne znaczenie w obronie organizmu przed inicjacją i progresją nowotworu [Dhawan, Chadha, 2010]. Wykazano, że cynk odgrywa prewencyjną rolę w niektórych typach nowotworów, takich jak: rak okrężnicy, prostaty, a także w miażdżycy naczyń krwionośnych [Prasad, 2008], ponieważ przewlekły stan zapalny bierze udział w rozwoju tego rodzaju schorzeń. Badania kliniczne potwierdziły, że grupa pacjentów przyjmująca preparaty zawierające cynk, cechowała się krótszym okresem trwającego przeziębienia i występującego kaszlu [Jomovaa, Valko, 2011].

Jedną z głównych ról cynku związaną jest z funkcją antyoksydacyjną i uczestniczeniu tego pierwiastka w antyoksydacyjnej obronie organizmu. Mechanizm reakcji nie jest do końca wyjaśniony, wiadomo natomiast, że cynk wywiera to działanie w sposób pośredni, poprzez stabilizowanie struktury błony komórkowej, co przyczynia się do budowy dysmutazy ponadtlenkowej i utrzymywaniu tkankowego stężenia metalotioneiny [Salgueiro et al., 2000].

Tapiero, Tew, 2003;]. Niedobór cynku wywołuje uszkodzenia oksydacyjne, które przypominają efekty wywołane przez działanie wolnych rodników [Salgueiro et al., 2000].

2.3.3.3. Diagnostyka zaburzeń

Cynk należy do niezbędnych i wszechobecnych pierwiastków występujących w ludzkim organizmie. Nie jest on toksyczny, ale niektóre związki cynku są żrące, a niektóre wykazują toksyczność ogólnoustrojową.

Całkowity niedobór cynku jest dosyć rzadko spotykany u ludzi, natomiast łagodny do umiarkowanego występuje stosunkowo często, zarówno w mniej, jak i w bardziej rozwiniętych krajach [Kazi et al., 2010].

Niedobór cynku występuje w organizmie, kiedy jego wchłanianie jest niewystarczające, nastąpiły zwiększone straty cynku bądź też istnieje większe zapotrzebowanie na ten pierwiastek. Może prowadzić to do wielu zaburzeń, takich jak opóźnienie wzrostu, biegunka, spadek obrony immunologicznej, zakłócenia funkcji mózgowych, nieprawidłowe gojenie się ran czy zmiany skórne i oczne [Scherz, Kirchoff, 2006]. Niedobór cynku pojawia się także jako drugorzędna zmiana występująca w chorobach, w których wchłanianie tego pierwiastka jest utrudnione i/lub utrata przez jelita jest zwiększona, np. celiakia, mukowiscydoza, choroby zapalne jelit (choroba Leśniewskiego – Crohna) oraz niedokrwistości hemolityczne (np. anemia sierpowata). Przewlekłe, zwiększone straty cynku z moczem mogą pojawić się w niektórych chorobach nerek, przy marskości wątroby, stresie, alkoholizmie, czy przewlekłych stanach zapalnych, które powodują wzrost poziomu interleukiny-1 [Maret, Sandstead, 2006].

U dzieci i młodzieży, opóźniony rozwój może być widoczny na długo przed rozpoznaniem innych symptomów związanych z niedoborem cynku. Prawdopodobnie jednym z pierwszych objawów, świadczących o nieodpowiednim poziomie cynku w organizmie, jest osłabienie odporności komórkowej [Maret, Sandstead, 2006]. Zapalenie skóry pojawia się natomiast jako najpóźniejszy objaw, kiedy stopień zaawansowania symptomów związanych z niedoborem cynku ulega zwiększeniu [Maret, Sandstead, 2006].

Innymi objawami są długotrwały proces gojenia ran, zwiększone wypadanie włosów czy łysienie. Zauważalne są także objawy ze strony układu nerwowego, jego niedobór może być również związany z patogenezą anoreksji [Salgueiro et al., 2000; Maret, Sandstead, 2006]. Badania dotyczące suplementacji cynkiem wykazały, że objawy anoreksji ustąpiły po uzupełnieniu tego pierwiastka – pacjenci przestali tracić na wadze, a u niektórych zauważono nawet jej przyrost. W przypadku wielu kobiet zauważono powrót miesiączkowania po terapii cynkiem [Safai-Kuttel, 1990; Salgueiro et al., 2000].

Początkowe objawy związane z niedoborem cynku są mało specyficzne, dopiero gdy zawartość tego pierwiastka utrzymuje się przez dłuższy okres czasu na niskim poziomie, można zauważyć inne symptomy, takie jak opóźnienie dojrzewania płciowego, hypogonadyzm, niemożność zajścia w ciążę czy zaburzenia czynności mózgu [Maret, Sandstead, 2006].

Cynk, jak powszechnie wiadomo, indukuje produkcję metalotioneiny, która zawiera duże ilości cysteiny, co sprawia, że jest ona bardzo dobrym zmiataczem wolnych rodników hydroksylowych [Kazi et al., 2010]. Cynk odgrywa wiele ról jako przeciwutleniacz, powinien

zatem pełnić istotną, chemoprewencyjną funkcję w badaniach klinicznych u ludzi [Kazi et al., 2010].

Rogers i wsp. przeprowadzili badanie dotyczące wpływu diety, będącej czynnikiem ryzyka w nowotworach krtani, przełyku i jamy ustnej. Zauważyli, że najsilniejszym związkiem, jaki zaobserwowano w tym badaniu, był widoczny efekt ochronny dotyczący spożycia produktów zawierających cynk [Rogers et al., 1993]. Ryzyko powstawania zarówno nowotworów krtani, jak i przełyku, uległo zmniejszeniu wraz ze spożyciem tego pierwiastka [Rogers et al., 1993].

Wolne rodniki i peroksydacja lipidów wpływają na proces kancerogenezy. Pierwsze powodują uszkodzenie komórek i mutacje DNA, które mogą prowadzić do nowotworzenia. Cynk chroni przed procesem peroksydacji i powstawaniem wolnych rodników i wchodzi w skład enzymu - dysmutazy ponadtlenkowej, która eliminuje nadtlenki [Rogers et al., 1993].

Nadmierne spożycie cynku może prowadzić do działań niepożądanych: biegunek, wymiotów, skurczy brzucha i bólów głowy. Toksyczność cynku odzwierciedla się również w przewlekłych działaniach niepożądanych, takich jak upośledzenie funkcji odpowiedzi immunologicznej, obniżenie poziomu miedzi, zmiany funkcji żelaza i metabolizmu cholesterolu [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Przypadek 17-latka, który przyjmował dziennie 300 mg cynku z powodu trądziku i u którego rozwinęła się anemia, leukopenia i neutropenia pokazuje, że chroniczne narażenie może powodować szkody w organizmie. Początkowy poziom cynku, jaki otrzymano po upływie około miesiąca po odstawieniu cynku wynosił 195 mcg/dL (normalny poziom to 50 - 95 mcg/dL). Ponieważ objawy nie były poważne, w tym przypadku uniknięto leczenia. Po 6 miesiącach powtórzono pomiar stężenia cynku w organizmie – wartości nadal były podwyższone – 111 mcg/dL, ale niedokrwistość i neutropenia ustąpiły [Salzman et al., 2002].

2.3.4. Miedź

2.3.4.1. Ogólna charakterystyka

Miedź należy do pierwiastków niezbędnych. Jest trzecim, po cynku i żelazie, najbardziej powszechnym pierwiastkiem śladowym występującym w organizmie człowieka, który jest ważnym katalizatorem dla syntezy hemu i wchłaniania żelaza [Barceloux, 1999]. Należy do grupy 11 układu okresowego. Jest pierwiastkiem miękkim, ciągliwym, o barwie różowej, srebrno – białej i złoto – żółtej. Jego masa atomowa wynosi 63,546, temperatura topnienia 1357 [K] [Bielański, 2012].

Znajduje się na 26 miejscu wśród najliczniejszych pierwiastków w skorupie ziemskiej (0,006%). Miedź znaleźć można w różnych rudach, zaliczają się do nich m.in. chalkozyn, kowelin, chalkopiryt, azuryt, kupryt i malachit [Bielański, 2012].

Pierwiastek ten otrzymuje się głównie z rud siarczkowych zawierających chalkopiryt, piryt, siarczki niklu, cynku, ołowiu oraz chalkozyn. Oprócz procesów pirometalurgicznych (ogniowe) do otrzymywania miedzi stosuje się także procesy hydrometalurgiczne (mokre) [Bielański, 2012].

Miedź jest metalem szlachetnym, tak jak srebro i złoto [Barceloux, 1999]. Czysta miedź elektrolityczna znajduje zastosowanie do wyrobu przewodów elektrycznych i kabli, natomiast z mniej czystego metalu uzyskuje się kotły, aparaty destylacyjne i części aparatów fabrycznych. Stopy miedzi z innymi metalami odgrywają bardzo duże znaczenie, szczególnie stop z cyną, cynkiem (mosiądze) oraz brąz, z którego odlewa się pomniki i dzwony [Bielański, 2012].

W organizmach żywych miedź występuje na +II (forma utleniona) i +I (forma zredukowana) stopniu utlenienia [Tapiero et al., 2003].

W pożywieniu największe ilości miedzi znajdują się w skorupiakach, szczególnie ostrygach, w narządach wewnętrznych – wątrobie, mózgu, nerkach, oraz w orzechach, śliwkach, nasionach i rodzynekach [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001; Tapiero et al., 2003].

Normy zalecanego dziennego spożycia miedzi wynoszą od 200 $\mu\text{g}/\text{d}$ u dzieci do 1. roku życia, 440 $\mu\text{g}/\text{d}$ dla dzieci do 8. roku życia, 700 – 900 $\mu\text{g}/\text{d}$ u starszych dzieci i osób dorosłych. Zwiększone zapotrzebowanie na ten pierwiastek występuje u kobiet w ciąży i karmiących piersią (1,000 do 1,300 $\mu\text{g}/\text{d}$) [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

2.3.4.2. Miedź w organizmie

U ludzi i zwierząt, miedź pochodząca z pożywienia absorbowana jest przez błonę śluzową w komórkach, które wyściełają żołądek i jelito cienkie [Tapiero et al., 2003]. W postaci kompleksu z albuminami lub aminokwasami, transportowana jest do wątroby, następnie nerek, jelit i innych tkanek [Seńczuk, 2006].

Wydajność wchłaniania jonu metalu jest wysoka, u osób dorosłych wynosi średnio od 55 do 75% i nie spada znacząco wraz z wiekiem [Linder, Hazegh-Azam, 1996].

Miedź związana jest z ceruloplazminą, która zawiera około 90% miedzi obecnej w surowicy krwi, a jej rola polega na przetransportowaniu pierwiastka do tkanek, które go potrzebują [Osredkar, Sustar, 2011].

Około 1 mg miedzi wydalanych jest dziennie przez osobę dorosłą, głównie z żółcią. Bardzo małe ilości wydalają się innymi drogami [Tapiero et al., 2003].

Pierwiastek ten występuje we krwi w postaci kompleksu z treoniną, histydyną, kwasem glutaminowym [Seńczuk, 2006].

Fizjologiczna rola miedzi polega przede wszystkim na spełnianiu następującej funkcji: jest niezbędnym składnikiem metaloenzymów, w których miedź uczestniczy w reakcjach redoks, zmieniając stopień utleniania pomiędzy Cu (I) i Cu (II) [Stern et al., 2007].

Miedź jest niezbędnym pierwiastkiem, działającym jako kofaktor szeregu istotnych w metabolizmie enzymów [Tapiero et al., 2003].

U ssaków głównymi białkami, do których miedź jest przyłączana, są ceruloplazmina i trzy inne, wszechobecnie występujące w naturze białka: oksydaza cytochromowa (ostatnie białko łańcucha oddechowego), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD – związana z obroną przed

wolnymi rodnikami) oraz metalotioneina (przechowuje nadmiar miedzi oraz posiada właściwości przeciwutleniające) [Linder, Hazegh-Azam, 1996].

Ten niezbędny pierwiastek odgrywa również rolę w embriogenezie. Podczas przebiegu procesu, kiedy namnażanie się komórek jest bardzo dynamiczne, aktywność oksydazy cytochromowej i aktywność oddechowa ma bardzo duże znaczenie. W ostatnim okresie ciąży, znaczna ilość miedzi jest przenoszona do płodu z krążenia matki przez łożysko lub przez spożycie płynu owodniowego [Tapiero et al., 2003]. Zostaje związana z metalotioneiną, gromadzi się i jest przechowywana w wątrobie wraz z innymi zapasami cynku i żelaza, które zostaną wykorzystane w okresie karmienia. Po urodzeniu, duża ilość miedzi dostarczana jest noworodkowi przez mleko karmiącej matki [Tapiero et al., 2003].

2.3.4.3. Diagnostyka zaburzeń

Zarówno nadmiar, jak i niewystarczające spożycie miedzi może prowadzić do wystąpienia objawów niepożądanych [Stern et al., 2007].

Pierwszym, zauważalnym objawem świadczącym o niedoborze miedzi w organizmie człowieka i innych ssaków jest anemia [Brewer et al., 2000]. Jeśli poziom ceruloplazminy w surowicy krwi będzie bardzo niski, niedobór miedzi stanie się zauważalny. Początkowym stadium jest zahamowanie czynności szpiku kostnego objawiające się niedokrwistością, z lub bez leukopenii [Goodman et al., 2004]. Jeśli niedobór miedzi się utrzymuje, może dojść do zmniejszenia gęstości kości. Późniejszy etap niedoboru miedzi, który został zdiagnozowany u niewielkiej liczby pacjentów, wiąże się z ciężką neuropatią [Goodman et al., 2004].

Nadmierne spożycie miedzi może wiązać się z wystąpieniem działań niepożądanych. Ostra toksyczność tego pierwiastka pojawia się zazwyczaj w wyniku przypadkowego jej spożycia, jednak u niektórych osób może być wywołana chorobą lub wadami genetycznymi, które zaburzają homeostazę miedzi [Stern et al., 2007]. Poziom miedzi w organizmie związany jest także pośrednio z dużą ilością zaburzeń neurologicznych, takich jak choroby prionowe, wliczając encefalopatię gąbczastą bydła („choroba szalonych krów” – BSE) czy chorobę Alzheimera [Stern et al., 2007].

Miedź pośrednio lub bezpośrednio oddziałuje na składniki systemu obrony oksydacyjnej i w rezultacie zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu i uszkodzenia oksydacyjne lipidów, DNA i białek mogą być zauważone [Uriu-Adams, Keen, 2005].

Przewlekła toksyczność miedzi jest prawie zawsze związana z genetycznym defektem wydalania tego pierwiastka, u człowieka znana jako choroba Wilsona [Brewer, Yuzbasiyan-Gurkan, 1992]. Jest dziedziczną autosomalnie recesywnie mutacją genu ATP7B. Pacjenci z tą chorobą cierpią na uszkodzenia mózgu i choroby wątroby. Charakterystycznym objawem jest pierścień Kaysera-Fleischera, widoczny w rogówce oka [Tapiero et al., 2003]. U około połowy pacjentów z chorobą Wilsona rozwinęła się toksyczność centralnego układu nerwowego, zmiany w rogówce pojawiają się właśnie wtedy, kiedy miedź zaczyna gromadzić się i wpływać na układ nerwowy. Nierozpoznana i nieleczonego choroba postępuje nieubłaganie i ostatecznie prowadzi do zgonu [Stern et al., 2007].

Inną chorobą uwarunkowaną genetycznie jest choroba Menkesa. Jest to choroba neurodegeneracyjna, charakteryzuje ją brak możliwości metabolizowania miedzi dostarczanej w pożywieniu. U niemowląt prowadzi do śmierci [Tapiero et al., 2003].

Poziom miedzi może ulec zmianie w przebiegu choroby, którą jest cukrzyca. Badania wykazały, że stężenia miedzi w osoczu były wyższe u pacjentów diabetologicznych w porównaniu do pacjentów nie chorujących na cukrzycę [Uriu-Adams, Keen, 2005]. Podobnie, w wielu badaniach wykazano wyższe stężenie ceruloplazminy w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2, w porównaniu do osób zdrowych [Uriu-Adams, Keen, 2005].

Poziom ceruloplazminy w surowicy odgrywa również ważną rolę w chorobach układu krążenia. Badania epidemiologiczne wykazały, że podwyższony poziom enzymu jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia chorób sercowo - naczyniowych [Jomova, Valko, 2011]. Zaobserwowano także, że podwyższony poziom stężenia miedzi w surowicy krwi związany jest z umieralnością spowodowaną chorobami wieńcowymi [Jomova, Valko, 2011]. Choroba miażdżycowa może również być związana z poziomem miedzi. Prawdopodobny powód wystąpienia tej zależności związany jest z interakcją zachodzącą pomiędzy miedzią a homocysteiną. Prowadzi to bowiem do wytworzenia wolnych rodników i utlenienia LDL („zły” cholesterol), który został znaleziony w blaszkach miażdżycowych [Jomova, Valko, 2011].

Najbardziej podwyższony poziom miedzi wykazano u pacjentów chorych na raka gruczołu sutkowego, szyjki macicy, jajnika, prostaty, płuc, raka żołądka oraz cierpiących na białaczkę. Ponadto wykazano, że poziomy miedzi w porównaniu do poziomów żelaza, cynku i selenu są bardzo często wyższe w porównaniu do osób zdrowych. Podwyższone poziomy miedzi okazały się być bezpośrednio związane z progresją raka [Gupte, Mumper, 2009]. Miedź jest istotna w procesie angiogenezy, procesu wzrostu każdego guza o wielkości powyżej kilku milimetrów. Aby zatrzymać proces wzrostu guza we wczesnym stadium, koncepcja terapii antyangiogennej zyskuje coraz większe zainteresowanie [Jomova, Valko, 2011]. W związku z tym zostało zaprojektowanych i przetestowanych kilka antyangiogennych środków, w oparciu o środki chelatujące miedź [Brem et al., 1990].

Cox i wsp. w swojej pracy próbowali określić, czy tetratiomolibdenian, silny chelator miedzi, jest zdolny do obniżenia zasobów pierwiastka w organizmie i zahamowania wzrostu płaskonabłonkowego nowotworu głowy i szyi w ortotopowym modelu mysim [Cox et al., 2001]. W modelu tym, zawieszinę komórek nowotworowych lub fragment guza umieszcza się w narządzie, z którego pierwotnie wywodzi się nowotwór [Wietrzyk et al., 2000]. Po 7 – 10 dniach od wzrostu guza, grupie badanej podawano codziennie do picia wodę, do której dodawano tetratiomolibdenian, aby osiągnąć doustną dawkę 50 mg na mysz [Cox et al., 2001]. Grupie kontrolnej podawano codziennie tylko czystą wodę. Do dziesiątego dnia zaobserwowano wyraźny wzrost guza u wszystkich myszy. Całkowita zawartość miedzi w organizmie spadła o 28% w porównaniu do wyjściowego stężenia u myszy w grupie leczonej. Po zakończeniu leczenia różnica średniej objętości guza w grupie kontrolnej była 4,7 razy większa w porównaniu do grupy leczonej tetratiomolibdenianem [Cox et al., 2001]. Ogólna szybkość hamowania wyniosła 78%. Dodatkowo, gęstość mikronaczyń została zmniejszona o 50% w grupie, której podawano tetratiomolibdenian [Cox et al., 2001]. W badaniu wykazano zdolność tetratiomolibdenianu do znaczącego hamowania zarówno wzrostu płaskonabłonkowego nowotworu głowy i szyi, jak i unaczynienia guza w ortotopowym modelu mysim, sugerując potencjalną skuteczność w leczeniu choroby u człowieka [Cox et al., 2001].

2.3.5. Żelazo

2.3.5.1. Ogólna charakterystyka

Żelazo należy do czwartego okresu grupy 8 układu okresowego. Jego masa molowa wynosi 55,845 a temperatura topnienia 1808 [K]. Wykazuje dobrą ciągliwość i kowalność. Występuje na kilku stopniach utleniania (od – II do + VI) [Bielański, 2012].

Wśród pierwiastków uszeregowanych w kolejności zmniejszającego się rozpowszechnienia w skorupie ziemskiej, żelazo jest czwartym pierwiastkiem. Jest najbardziej rozpowszechnionym metalem ciężkim. W przyrodzie występuje w stanie związanym. Znaczenie jako rudy tego metalu mają między innymi hematyt (żelaziak czerwony), magnetyt, limonit (żelaziak brunatny) oraz syderyt [Bielański, 2012].

Na skalę techniczną żelazo otrzymuje się przez redukcję rud tlenkowych koksem. Powstaje tzw. surówka (żelazo surowe), która daje się formować przez odlewanie lub skrawanie [Bielański, 2012]. Chemicznie czyste żelazo ma barwę srebrzystobiałą i wykazuje większą miękkość od żelaza z domieszkami węgla. Jest ciągliwe i kowalne [Bielański, 2012].

Żelazo w postaci stali stopowych i węglowych (stopy z węglem zawierające ok. 2% węgla) oraz żeliwa (stopy o większej zawartości węgla) znajdują zastosowanie we wszystkich rodzajach przemysłu [Seńczuk, 2006].

Proszek żelazowy wykorzystywany jest jako podgrzewacz do rąk dostępny na całym świecie, zwłaszcza w Japonii, Kanadzie i Stanach Zjednoczonych. Pod wpływem powietrza i wilgoci dochodzi do egzotermicznej reakcji w której oprócz proszku żelazowego udział biorą węgiel aktywowany, sól i wermikulit [Tam et al., 2008].

Żelazo w diecie występuje w dwóch formach: hemowej i niehemowej. Żelazo hemowe można znaleźć w produktach pochodzenia zwierzęcego, jest ono lepiej przyswajalne. Forma niehemowa występuje w produktach spożywczych pochodzenia roślinnego i jego przyswajalność jest niewielka. Wyjątek stanowi dodanie kwas askorbinowego lub białka zwierzęcego – wtedy przyswajalność żelaza niehemowego może być zwiększona nawet pięciokrotnie [Iron and Health, 2010].

2.3.5.2. Żelazo w organizmie

Żelazo to jeden z dziesięciu pierwiastków śladowych, niezbędny w diecie ludzi i zwierząt i najczęściej występujący w organizmie człowieka. Rekomendowana wartość spożycia dla wszystkich grup wiekowych mężczyzn i kobiet w okresie pomenopauzalnym wynosi 8 mg/dzień, w okresie przedmenopauzalnym zaś 18 mg/dzień. Średnie dzienne spożycie wynosi około 16 – 18 mg/dzień dla mężczyzn i 12 mg/dzień dla kobiet [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Okolo 65% żelaza związanych jest z hemoglobina, 10% wchodzi w skład mioglobiny, cytochromów i enzymów zawierających żelazo, a 25% związanych jest z białkami zawierającym żelazo zapasowe, ferrytyną i homosyderyną. Okolo 0,1% żelaza znajdującego się w organizmie krąży w osoczu jako pula wymienna, przede wszystkim całkowicie związana z transferyną [Jomova, Valko, 2011].

Dorosły, 75 kg mężczyzna, zawiera około 4 g żelaza (50 mg/kg), podczas gdy kobieta w trakcie menstruacji posiada około 40 mg/kg tego pierwiastka, co spowodowane jest mniejszą masą erytrocytów i przechowywaniem żelaza [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Zawartość żelaza w organizmie jest zazwyczaj utrzymywana na stałym poziomie. Wynika to z bilansu pierwiastka, który występuje w równowadze. Niewielkie straty żelaza mają miejsce z moczem, potem i śliną. W przypadku braku krwawienia (w tym również miesięczkowego u kobiet), czy ciąży, straty pierwiastka w ciągu dnia są niewielkie. Ubytki równoważone są przyjmowaniem żelaza z pożywieniem [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001; Seńczuk, 2006].

Ludzie spożywają około 12 – 18 mg/dzień zawartego w spożywanych pokarmach, z których tylko 1 – 2 mg jest przyswajalnych [Nadadur et al., 2008].

Dorosły mężczyzna potrzebuje przyswoić około 1 mg/dzień Fe, aby utrzymać równowagę w bilansie żelaza. U kobiety w okresie menstruacji ilość ta jest zwiększona i wynosi około 1,5 mg/dzień. Niewielki odsetek kobiet musi przyswoić około 3,4 mg/dzień. Pod koniec ciąży ilość absorbowanego żelaza powinna wzrosnąć do 4 – 5 mg/dzień, aby zachować równowagę żelaza w organizmie. Zapotrzebowania na ten pierwiastek są również większe w okresie wzmożonego wzrostu we wczesnym dzieciństwie (6 – 24 miesiące) oraz u nastolatków [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Żelazo pochodzące z diety jest zazwyczaj absorbowane w proksymalnym jelicie cienkim, w pobliżu połączenia żołądka z dwunastnicą [Nadadur et al., 2008].

Za rozprowadzanie żelaza do szpiku kostnego, wątroby, mięśni i innych tkanek odpowiedzialna jest transferyna [Seńczuk, 2006]. Pierwiastek ten przechowywany jest w formie ferrytyny lub hemosyderyny (produkt degradacji ferrytyny). Zazwyczaj wszystkie komórki są zdolne do przechowywania żelaza, ale podstawowym miejscem, gdzie jest ono magazynowane są komórki wątroby, śledziony i szpik kostny [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Żelazo wydalane jest z organizmu w małych ilościach (poza okresem krwawienia i ciąży). Dzielne, podstawowe utraty żelaza ograniczają się do wartości pomiędzy 0,90 i 1,02 mg/dzień u kobiet niemiesiączkujących. Większość wchłoniętego żelaza wydalana jest z kałem. Dzielne utraty żelaza z moczem, skórą i z przewodu pokarmowego wynoszą odpowiednio około 0,08, 0,2 – 0,3 i 0,6 mg/dzień [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Żelazo jest niezbędnym składnikiem odżywczym. Stanowi składnik hemoglobiny i mioglobiny, których celem jest transportowanie i magazynowanie tlenu w mięśniach i tkankach. Żelazo jest również składnikiem enzymów niezbędnych do przemiany energii

w organizmie, metabolizmu białek i nukleotydów oraz syntezy białek, tkanek niektórych hormonów i neurotransmiterów [Iron and Health, 2010].

2.3.5.3. Diagnostyka zaburzeń

Stężenie żelaza w tkankach ciała powinno być ściśle regulowane, ponieważ nadmiar tego pierwiastka prowadzi do uszkodzenia tkanek na skutek powstawania wolnych rodników. Zaburzenia metabolizmu żelaza są jednymi z najczęstszych chorób występujących u ludzi, obejmują szerokie spektrum chorób objawiających się różnymi objawami klinicznymi – od niedokrwistości do nadmiaru żelaza i być może schorzeń neurodegeneracyjnych [Gurzau et al., 2003]. Przewlekły stres oksydacyjny może regulować wchłanianie i magazynowanie żelaza, co prowadzi do samopodtrzymującej się i wciąż wzrastającej spirali cytotoksycznych i mutagennych zdarzeń [Gurzau et al., 2003].

Zawartość żelaza w organizmie regulowana jest przede wszystkim przez poziom jego absorpcji, ponieważ ludzie nie posiadają mechanizmów zdolnych do eliminacji nadmiaru tego pierwiastka z organizmu. Wiele zmiennych ma wpływ na wchłanianie tego pierwiastka, m.in. zawartość diety, dawki żelaza czy styl życia [Gurzau et al., 2003]. Nadmiar żelaza może wywoływać efekty bardzo toksyczne. Toksyczność ta dotyczy dużej ilości narządów, prowadzi do wielu poważnych schorzeń, takich jak schorzenia wątroby, płuc, serca, ale także do cukrzycy, zaburzeń hormonalnych i zaburzonej pracy systemu odpornościowego [Gurzau et al., 2003].

Ostra toksyczność spowodowana nadmiarem żelaza występuje w wyniku przypadkowego spożycia leków zawierających pierwiastek i najczęściej występuje u dzieci. Przewlekła toksyczność lub przeładowanie żelazem to powszechne problemy występujące u osób dorosłych [Gurzau et al., 2003].

Istnieją trzy podstawowe sytuacje, w czasie których duże ilości żelaza mogą kumulować się w organizmie. Pierwsza z nich dotyczy występowania idiopatycznej hemochromatozy, druga przeładowania żelazem przyjmowanym z dietą, a trzecia może pojawić się z powodu transfuzji krwi spowodowanej pewnymi formami niedokrwistości, zwana syderozą wtórną [Gurzau et al., 2003].

Zbyt duże nagromadzenie żelaza może być związane z wrodzonymi wadami metabolizmu tego pierwiastka (np. hemochromatoza) lub innymi czynnikami (wtórne lub nabyte przeciążanie żelazem). Stan ten prowadzi do postępującego przeładowania żelazem i niewydolności wielonarządowej [Cairo et al., 2006].

Wyróżnić możemy hemochromatozę pierwotną, która jest dziedziczną chorobą metaboliczną, oraz hemochromatozę wtórną (syderozę), która jest stanem patologicznym, charakteryzującym się inną niż mutacja genetyczna przyczyną nadmiaru żelaza w organizmie [Cairo et al., 2006].

Obciążenie żelazem komórek parenchymalnych wątroby, trzustki, serca i innych organów w hemochromatozie upośledza funkcję i uszkadza strukturę tych organów, co prowadzi do marskości i nowotworów wątroby, chorób serca i cukrzycy. Hemochromatoza pierwotna spowodowana jest mutacjami w genach kodujących białka, które regulują lub przeprowadzają jelitowe wchłanianie żelaza z diety [Cairo et al., 2006].

Podwyższone poziomy żelaza mogą wiązać się z podatnością wystąpienia choroby wieńcowej i zawału serca [Jomova, Valko, 2011]. Nadciśnienie jest głównym czynnikiem ryzyka chorób układu krążenia, związanym z zespołem metabolicznym i otyłością, przede wszystkim spowodowanym podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu, w których żelazo odgrywa kluczową rolę [Jomova, Valko, 2011].

Po ostrym zatruciu żelazem może dojść do prowadzącej do śmierci hepatotoksyczności. Rozwija się ona u pacjentów w ciągu 24 - 48 godzin i jej efekty są prawdopodobnie zależne od dawki. Badania potwierdzające, czy uszkodzenia wątroby związkami żelaza były zależne od jego dawki, przeprowadzili Robertson i Tenenbein [Robertson, Tenenbein, 2005]. Wśród 73 pacjentów zatrutych związkami żelaza, 60 osób nie wykazało objawów hepatotoksyczności, u czterech wystąpiła łagodna hepatotoksyczność, natomiast u dziewięciu chorych pojawiła się ostra hepatotoksyczność. Autorzy doszli do wniosku, że klinicznie istotne uszkodzenie wątroby występuje przy wartości powyżej 1000 mcg/dl [Robertson, Tenenbein, 2005].

Prawidłowy stan gospodarki żelazowej jest istotny dla prawidłowej produkcji krwinek czerwonych i ogólnego stanu zdrowia. Niedobór żelaza może powodować zaprzestanie syntezy hemoglobiny w komórkach erytroidalnych i indukcję apoptozy zarówno w komórkach erytroidalnych jak i nieerytroidalnych [Cairo et al., 2006].

Niedobór żelaza spowodowany jest zazwyczaj jego nieodpowiednią podażą z diety (lub wadliwego wychwytu) lub istniejącej utraty krwi, co objawia się niedokrwistością. Poważniejszym problemem od samej anemii są niedobory żelaza w tkankach prowadzące do zaburzeń rozwoju psychomotorycznego i funkcji poznawczych w okresie dzieciństwa, zaburzenia zdolności pracy u osób dorosłych i zwiększona możliwość przedwczesnego porodu [Cairo et al., 2006].

W przypadku wystąpienia ciężkiej niedokrwistości, zauważona została zwiększona śmiertelność okołoporodowa matek. Niezrozumiałe są mechanizmy, które prowadzą do śmierci kobiet spowodowanej anemią w tym okresie. Możliwe przyczyny to niewydolność serca, krwotoki i infekcje [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Żelazo może wpływać na powstawanie wolnych rodników, które powodują przerwanie podwójnej nici DNA i aktywację onkogenu [Gurzau et al., 2003]. Żelazo może również sprzyjać powstawaniu komórek nowotworowych i wzrostowi patogenów. Komórki nowotworowe gruczołu sutkowego wykazują na przykład 5 – 15 razy więcej receptorów transferryny niż prawidłowa tkanka. Przenosząca żelazo transferryna jest w rzeczywistości czynnikiem wzrostu [Gurzau et al., 2003].

Nadmiar żelaza w różnych tkankach organizmu jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu w miejscu osadzania się metali. Tym samym osoby wdychające nadmiar żelaza i których makrofagi pęcherzykowe są przeciążone tym metalem, są narażone na zwiększone ryzyko rozwinięcia się nowotworów oskrzeli, płuc, krtani i śródpiersia [Gurzau et al., 2003].

Zaobserwowano istnienie zależności pomiędzy zwiększeniem ryzyka powstania nowotworu jelita grubego przy wyższych ilościach spożywanego żelaza [Iron and Health, 2010].

Zwiększone ryzyko powstania nowotworu wątrobowokomórkowego u osób z dziedziczną hemochromatozą i marskością wątroby zostało wielokrotnie udowodnione [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

2.3.6. Mangan

2.3.6.1. Ogólna charakterystyka

Mangan należy do grupy 7 układu okresowego. Pod względem rozpowszechnienia zajmuje 12 miejsce, stanowi 0,095% skorupy ziemskiej. Po żelazie jest najbardziej rozpowszechnionym metalem ciężkim. Jego masa atomowa wynosi 54,9380, temperatura topnienia 1517 [K] [Bielański, 2012]. Występuje na różnych stopniach utlenienia – od –I do +VII.

Tworzy liczne minerały, ale tylko część z nich ma znaczenie praktyczne. Najważniejszymi jego rudami są braunit, manganit, piroluzyt, hausmanit i rodochrozyt. Związki manganu stanowią zazwyczaj zanieczyszczenie rud żelaza [Bielański, 2012]. Główne ilości rud manganu przerabia się bezpośrednio na żelazomangan (stop z żelazem), który zawiera 30 – 90% Mn i stosuje się go w hutnictwie żelaza [Bielański, 2012]. Mangan jest pierwiastkiem szarobiałym, bardzo kruchym i twardszym od żelaza. Przeważnie służy do wytwarzania stopów oraz jest używany jako utleniacz w procesach metalurgicznych. Stosuje się go także w przemyśle ceramicznym, chemicznym, włókienniczym, do wyrobów barwników, produkcji preparatów ochrony roślin, nawozów sztucznych oraz do wyrobu elektrod spawalniczych [Seńczuk, 2006].

Czysty mangan otrzymuje się za pomocą elektrolizy wodnych roztworów soli manganu lub przeprowadzając redukcję tlenków metodą aluminotermiczną [Bielański, 2012]. Źródłem manganu w pożywieniu są produkty zbożowe, które stanowią 37% zapotrzebowania na ten pierwiastek z diety, napoje (herbata) oraz warzywa, stanowiące odpowiednio 20% i 18% w diecie osób dorosłych [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

2.3.6.2. Mangan w organizmie

Odpowiednie spożycie manganu wynosi 2,3 mg/dzień dla mężczyzn i 1,8 mg/dzień dla kobiet. Górny, tolerowany poziom manganu w organizmie wynosi 11 mg/dzień [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Tylko niewielki procent manganu pochodzącego z pożywienia zostaje wchłonięty do organizmu. Prawdopodobnie około 3 – 5% zostaje zaabsorbowanych z przewodu pokarmowego. Badania dotyczące bilansu manganu w organizmie i dane związane z jego wydalaniem wskazują, że niska absorpcja z przewodu pokarmowego i szybka eliminacja

pierwiastka ogranicza jego toksyczność po spożyciu go w dużych dawkach [Santamaria, 2008].

Metabolizm manganu ma miejsce w wątrobie. W procesie tym początkowo uczestniczy transferyna. Jest absorbowany przez hepatocyty, w plazmie jest wiązany przez α_2 – makroglobulinę. Mangan na +II stopniu utlenienia, znajdujący się w wątrobie, zostaje wydany z żółcią, częściowo utleniany przez ceruloplazminę. Mangan na +III stopniu utlenienia, tworzący kompleks wiązany przez transferynę, krąży we krwi, następnie przekracza barierę krew-mózg i dysocjuje do wewnątrzkomórkowego manganu na +III stopniu utlenienia, który jest transportowany w organizmie [Seńczuk, 2006].

Mangan wydalany jest głównie z kałem. Z moczem wydalą się niewielka ilość tego pierwiastka [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001].

Mangan jest niezbędnym pierwiastkiem koniecznym dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu w ciągu całego życia. Wiąże się on z i/lub reguluje działanie wielu enzymów w organizmie. Na przykład stanowi on konieczny kofaktor dla arginazy, która jest odpowiedzialna za produkcję mocznika w wątrobie, dysmutazy ponadtlenkowej – enzymu odpowiedzialnego za ochronę przed wystąpieniem komórkowego stresu oksydacyjnego oraz karboksylazy pirogronianowej, niezbędnego enzymu w glukoneogenezie [Crossgrove, Zheng, 2004].

Ten niezbędny dla organizmu pierwiastek odgrywa kluczową rolę w pełnieniu różnych funkcji metabolicznych, bierze udział w rozwoju układu kostnego, metabolizmie energetycznym i aktywacji enzymów, odpowiada za funkcjonowanie układu nerwowego, immunologicznego, odgrywa też rolę w procesach rozrodczych. Jest przeciwutleniaczem chroniącym komórki przed uszkodzeniem przez wolne rodniki [Santamaria, 2008].

Mangan odgrywa również rolę w regulacji procesów oddychania komórkowego, uczestniczy we wroście kości i tkanki łącznej i krzepnięciu krwi [Santamaria, 2008].

2.3.6.3. Diagnostyka zaburzeń

Niedobór manganu został zaobserwowany przede wszystkim w badaniach prowadzonych na zwierzętach. Wiele biochemicznych i strukturalnych uszkodzeń odnotowano m.in. u świń, szczurów, myszy, kurczaków i u bydła. Brak manganu w tych organizmach spowodował zaburzenia funkcji rozrodczych, zaburzenia rozwoju, upośledzenie tolerancji glukozy, a także zmiany w metabolizmie lipidów i węglowodanów. Niedobór manganu u zwierząt miał znaczący wpływ na produkcję kwasu hialuronowego, heparyny i siarczanu chondroityny oraz innych form mukopolisacharydów istotnych dla wzrostu i utrzymania chrząstek, kości i tkanki łącznej [DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001; Santamaria, 2008].

U szczurów długotrwały, niski poziom manganu w diecie, koreluje ze zwiększonym poziomem wapnia i fosforu w surowicy i zmniejszonym poziomem wapnia w kościach, co sugerować może zakłócenia w metabolizmie kostnym [Crossgrove, Zheng, 2004].

Zakłócenie w homeostazie manganu związane jest również z wystąpieniem różnych stanów chorobowych u ludzi. Odnotowano kilka przypadków związanych z niedoborem tego pierwiastka, z objawami dotyczącymi zapalenia skóry, spowolniony wzrost włosów i paznokci, obniżony poziom białek związanych z krzepnięciem krwi i zmniejszenie poziomu cholesterolu w surowicy [Santamaria, 2008].

U ludzi z niskim poziomem manganu we krwi zaobserwowano wystąpienie chorób takich jak osteoporoza, wtórna choroba zwyrodnieniowa stawów – choroba Mseleni, zespół Downa, padaczka oraz choroba Perthesa [Santamaria, 2008]. Niedobór manganu może stanowić również czynnik etiologiczny niektórych wad wrodzonych. Nieprawidłowy poziom tego pierwiastka zaobserwowano również u osób z chorobami związanymi z nieprawidłowym metabolizmem – fenyloketonurią czy chorobą syropu klonowego. Niski poziom manganu w krwi pacjentów cierpiących na tę chorobę ma istotne znaczenie, ponieważ często poziom ten odzwierciedla jego stężenie w tkankach miękkich. Jednak rola pierwiastka w przebiegu tych schorzeń jest niejasna [Santamaria, 2008].

Wyższe poziomy manganu w krwi i we włosach dzieci związane były z trudnościami w uczeniu się i zmianami nerwowo – mięśniowymi. U niektórych dzieci istnieje większa możliwość nadmiernej ekspozycji na mangan w diecie, szczególnie kiedy czynność wątroby jest zmniejszona i karmienie odbywa się pozajelitowo [<http://www.epa.gov/teach/>].

W badaniach na zwierzętach, bardzo wysokie dawki manganu powodowały wystąpienie niepłodności u samców i były toksyczne dla płodu. Niektóre badania wykazały teratogenne działanie manganu – zwierzęta rodziły się z krótkim ogonem, nadmiarem palców, wodogłowiem, rozszczepem podniebienia i zmniejszoną masą urodzeniową. Badania prowadzone wśród noworodków dotyczące wczesnej ekspozycji na mangan wykazały zmiany neurochemiczne i neurobehawioralne u szczurów – np. zwiększoną, spontaniczną aktywność ruchową i podwyższony poziom dopaminy w mózgu [<http://www.epa.gov/teach/>].

Narażenie na toksyczne dawki manganu obserwowane jest u osób, które są nadmiernie ekspozowane na działanie tego pierwiastka. Wdychanie niektórych związków prowadzi do wystąpienia reakcji zapalnych w płucach ludzi i zwierząt. Objawy związane z układem oddechowym obejmują kaszel, zapalenie płuc i oskrzeli. Efekty te odzwierciedlają pośrednią odpowiedź [Soldin, Aschner, 2007].

Neurodegeneracyjna choroba mózgu, zwana manganizmem, spowodowana jest zatruciem manganem i jego nadmierną akumulacją w tej tkance. Występuje zazwyczaj u pracowników chronicznie narażonych na pyły i aerozole, które zawierają bardzo wysokie poziomy manganu ($>1-5 \text{ mg/m}^3$) [Soldin, Aschner, 2007]. Neurotoksyczność może być również spowodowana spożywaniem zanieczyszczonej wody (1.8 to 14 mg/L) [Soldin, Aschner, 2007]. Obserwacje kliniczne związane z wystąpieniem tej choroby dotyczą m.in. zmniejszenia zdolności motorycznych, zaburzeń psychicznych, objawów podobnych do choroby Parkinsona [Soldin, Aschner, 2007]. Podwyższony poziom manganu w mózgu obserwuje się przede wszystkim w obszarach zawierających wysokie stężenia niehemowego żelaza. W wyniku uszkodzenia komórek, manganizm początkowo charakteryzuje się zaburzeniami psychicznymi, agresywnym zachowaniem, halucynacjami i niestabilnością emocjonalną [Soldin, Aschner, 2007]. Inne objawy wczesnej choroby związanej z neurotoksycznością obejmują bóle głowy, zmęczenie, skurcze mięśni, apatię, utratę apetytu, zmniejszone libido i bezsenność. Jeżeli narażenie na toksyczne dawki manganu jest

długotrwałe i choroba postępuje, mogą wystąpić objawy takie jak dystonia, sztywność i drżenie mięśniowe. Objawy te związane są z uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych w strukturach mózgu, które kontrolują ruch mięśni [Soldin, Aschner, 2007].

Wykazano, że nadmierne narażenie na mangan powoduje spadek płodności oraz wystąpienie zwiększonych wad wrodzonych płodu. Pracownicy płci męskiej eksponowani na szkodliwe dawki, posiadali mniej potomstwa niż osoby nienarażone [Soldin, Aschner, 2007].

Dysmutazy ponadtlenkowe (ang. *superoxide dismutase* - SOD) występują powszechnie w komórkach ludzkich i stanowią obronę przed toksycznym działaniem wolnych rodników tlenowych. Znane są trzy formy SOD. Składnikiem manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), zlokalizowanej przede wszystkim w mitochondriach, jest mangan [Spangler, Reid, 2009]. Zauważono, że poziom MnSOD jest zmniejszony w przypadku obecności większości chorób nowotworowych, w porównaniu do odpowiadających, zdrowych tkanek [Weydert et al., 2006]. Przeprowadzono eksperymenty, których celem było przywrócenie aktywności enzymatycznej SOD do poziomów podobnych do odnotowanych w zdrowych tkankach, co w konsekwencji skutkowało obniżonym wzrostem komórek nowotworowych w kilku badaniach modelowych. W badaniu *in vitro*, komórki nowotworowe worków policzkowych chomika (HCPC-1) i ludzkie komórki płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej (SCC-25) zostały zainfekowane różnymi kombinacjami adenowirusa zawierającego MnSOD cDNA (AdMnSOD). Zaobserwowano, że wzrost nowotworu głowy i szyi został znacznie zahamowany. Podawanie wielokrotnych dawek AdMnSOD prawdopodobnie spowodowałoby dalsze powstrzymanie zwiększenia objętości guza [Weydert et al., 2003; Weydert et al., 2006].

Aktualny przegląd literatury sporządzony przez Agencję ds. Substancji Toksycznych i Rejestracji Chorób (ang. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* – ATSDR) nie znalazł dowodów świadczących o kancerogennym wpływie manganu na człowieka narażonego na działanie tego pierwiastka przez drogi oddechowe, doustnie, czy przez kontakt ze skórą [ATSDR, 2012]. Niemniej jednak możliwe, kancerogenne efekty nie zostały w pełni ocenione w populacji dużych grup badawczych, przy narażeniu istniejącym przez dłuższy okres czasu [Spangler, Reid, 2009].

2.3.7. Ołów

2.3.7.1. Ogólna charakterystyka

Ołów należy do grupy 14 układu okresowego. Jest miękkim, ciągliwym metalem o barwie niebieskawej lub srebrnoszarej. Jego masa atomowa wynosi 207,19, temperatura topnienia 327,5°C, a temperatura wrzenia w warunkach ciśnienia atmosferycznego wynosi 1740 °C [Seńczuk, 2006; Bielański, 2012].

Ołów jest naturalnie występującym pierwiastkiem metalicznym znajdującym się w skorupie ziemskiej ($1,4 \cdot 10^{-3}$ %). Na ogół nie występuje w postaci elementarnej, natomiast dostępny jest pod postacią rud mineralnych, w tym np. jako węglan (cerusyt), siarczek (galena) lub siarczan ołowiu (anglezyt) [Bielański, 2012]. W przyrodzie najczęściej występuje jako galena, otrzymuje się go z tego minerału dwoma sposobami. Pierwszy z nich polega na częściowym utlenieniu siarczku do tlenku, następnie prażeniu mieszaniny PbO i PbS bez

dostępu powietrza. Tak uzyskany metal poddawany jest dalszej rafinacji. Drugi sposób, będący metodą prażenia i redukcji, polega na przeprowadzaniu siarczku w tlenek przez prażenie go przy obfitym dostępie powietrza, a następnie na redukcji tlenkiem węgla powstającym podczas spalania koksu [Bielański, 2012].

Pierwiastek ten jest dostępny w szerokiej gamie form stałych, takich jak pręty, rury, kłamy oraz taśmy, siatki, druty, kable [Seńczuk, 2006].

2.3.7.2. Ołów w organizmie

Źródłem narażenia na ołów jest przede wszystkim wdychanie zanieczyszczonego powietrza oraz pyłów różnego typu, a także spożycie żywności i wody zawierającej ołów. Niektóre produkty żywnościowe mogą być źródłem ołowiu, zaliczamy do nich między innymi buraki, sałatę, marchewki, miód, produkty wędzone, piwo, wino, mleko, musztardę, pszenicę, kakao w proszku, jajka, ryż czy małe [da Silva et al., 2005].

Ilość ołowiu wchłanianego do organizmu ze środowiska zewnętrznego zależy od wielu czynników, między innymi od postaci, w jakiej występuje ten metal, okresu narażenia, drogi wchłaniania, wieku i od płci [Seńczuk, 2006]. Narażenie na ołów ma miejsce przede wszystkim drogą oddechową i przez przewód pokarmowy. Około 30 – 40% wdychanego ołowiu jest wchłaniane do krwioobiegu. Wchłanianie z przewodu pokarmowego uzależnione jest od stanu odżywienia i od wieku [Patrick, 2006]. Uważa się, że żelazo pogarsza wchłanianie ołowiu w jelitach, natomiast niedobór żelaza prowadzić może do zwiększonego stężenia ołowiu we krwi dzieci [Patrick, 2006]. Badania wskazują, że zwiększony poziom wapnia w diecie zwierząt, niemowląt i dzieci prowadzić może do zmniejszenia się ilości wchłanianego ołowiu [Patrick, 2006]. Wchłanianie z przewodu pokarmowego jest wyższe u dzieci (40 – 50%) niż u osób dorosłych (3 – 10%) [Jomovaa, Valko, 2011]. Po wchłonięciu, 99% krążącego ołowiu wiąże się z erytrocytami przez okres około 30 – 35 dni (tylko 1% zaabsorbowanego ołowiu znajduje się w osoczu i surowicy) i następnie przedostaje się do wątroby, kory nerek, mózgu, aorty, płuc, śledziony, kości i zębów – gdzie przebywa w ciągu następnych 4 – 6 tygodni [Patrick, 2006]. W kościach ołów przechowywany jest przez dłuższy okres czasu, szacunkowy okres półtrwania wynosi 20 - 30 lat [Patrick, 2006].

Do narażenia na drodze inhalacyjnej może dojść w przypadku emisji przemysłowych i spalania paliw zawierających ołów, a także wdychania farb zawierających ten pierwiastek. Ta droga narażenia jest szczególnie niebezpieczna dla dzieci [Patrick, 2006]. Inne, istotne źródło narażenia dzieci na ołów stanowią gleba i kurz, ponieważ pierwiastek ten nie ulega rozpadowi ani biodegradacji [Seńczuk, 2006].

Osoby pracujące w pewnych zawodach są szczególnie narażone na szkodliwe działanie ołowiu. Zalicza się do nich pracowników zatrudnionych m.in. przy produkcji amunicji, baterii, sprzętu militarnego i chirurgicznego oraz pracowników budowlanych [Patrick, 2006].

Ołów jest pierwiastkiem toksycznym i nie można określić poziomu stężenia, poniżej którego nie występują szkodliwe zmiany w organizmie. Określono, że stężenie we krwi $\geq 10 \mu\text{g/dL}$ jest nadmiernym stężeniem dla niemowląt, dzieci i kobiet w wieku rozrodczym. Narażenie zawodowe jest niebezpieczne dla pracowników, kiedy poziom stężenia w ich krwi przekracza $30 \mu\text{g/dL}$ [Patrick, 2006].

Dostarczony z pożywieniem ołów prawie w 90% wydalany jest z kałem. Po podaniu pozajelitowym w postaci związków nieorganicznych wydalany jest przez nerki. Z moczem wydalana się 76%, z kałem 16%, a innymi drogami 8% ołowiu [Seńczuk, 2006].

2.3.7.3. Diagnostyka zaburzeń

Ołów wykazuje działanie toksyczne w stosunku do centralnego i obwodowego układu nerwowego, czynności nerek i układu obwodowego [Patrick, 2006]. Toksyczne działanie ołowiu na organizm ujawnia się również w zaburzeniach syntezy hemu i erytropoezy [da Silva et al., 2005; Patrick, 2006]. Ołów zakłóca działanie trzech enzymów: pośrednio pobudza mitochondrialny enzym – syntazę kwasu delta-aminolewulinowego, bezpośrednio hamuje aktywność enzymu cytoplazmatycznego – dehydratazę kwasu delta-aminolewulinowego i zakłóca prawidłowe funkcjonowanie ferrochelatazy, która jest odpowiedzialna za wprowadzenie żelaza (II) do pierścienia protoporfirynowego [da Silva et al., 2005]. Anemia jest częstym wynikiem przewlekłego zatrucia ołowiem [da Silva et al., 2005]. U małych dzieci, narażenie na ołów związane jest ze spadkiem biosyntezy 1,25-dihydroksywiaminy D [da Silva et al., 2005].

U pacjentów z podwyższonym poziomem ołowiu we krwi może wystąpić ciężka, trudna w leczeniu kolka ołowicza (*colica saturnina*). Obecnie występuje bardzo rzadko. Objawia się silnymi, kurczowymi bólami, które poprzedzone są brakiem łaknienia i zaparciami. Pojawić się mogą wymioty, nudności i bezmocz [Dobrakowski et al., 2013]. Zatruciu towarzyszy również niezdolność ruchowa, zaburzona świadomość, osłabienie, a nawet paraliż [Needleman, 2004].

Zaobserwowano niekorzystny wpływ na męską i kobiecą rozrodczość przy narażeniu na toksyczne dawki ołowiu. Fetotoksyczne właściwości były już znane pod koniec XIX wieku, kiedy brytyjscy inspektorzy wykryli zwiększoną ilość urodzeń martwych dzieci (60%) i zmniejszoną płodność u kobiet pracujących w przemyśle ceramicznym. U mężczyzn zaobserwowano zmniejszoną liczbę plemników i teratospermię [Needleman, 2004].

Wczesne objawy neurotoksyczności ołowiu u osób dorosłych i u dzieci charakteryzują się bólami głowy, drażliwością, utratą pamięci, zmniejszeniem koncentracji i niskim poziomem zaburzeń poznawczych [Patrick, 2006]. U dorosłych najbardziej udokumentowanym objawem, związanym z toksycznością ołowiu, jest wystąpienie neuropatii obwodowej [Patrick, 2006].

Dzieci są bardziej podatne na zatrucia ołowiem w porównaniu do osób dorosłych, ze względu na większe przyswajanie biologicznie dostępnego ołowiu, rozwijający się system różnicowania komórek i wzrostu, który jest przez to bardziej podatny na uszkodzenia [Needleman, 2004]. Wynika to również ze skłonności dzieci do lizania, żucia, czy zjadania ciał obcych (*pica*, *pika*), które mogą być źródłem ołowiu pochodzącego ze środowiska [Seńczuk, 2006]. Kiedy zwiększa się narażenie dzieci na szkodliwe dawki ołowiu, dochodzi do zmniejszenia ilorazu IQ, obniżenia aktywności, niezdolności do reagowania na polecenia i skupienia uwagi [Patrick, 2006]. Kliniczne objawy zauważa się u dzieci w przypadku wysokiego stężenia ołowiu (>60 µg/dl). Początkowo występują bóle brzucha i stawów, niezgrabność, oszołomienie, następnie bóle głowy i zaburzenia behawioralne, które mogą być

objawem wczesnej encefalopatii [Needleman, 2004]. W kolejnym stadium może dojść do odrętwienia, drgawek i zmian świadomości [Needleman, 2004].

Ołów wykazuje działanie hepatotoksyczne. Badania na ludziach i zwierzętach wykazały, że hamuje on funkcję enzymów I fazy biotransformacji (układ cytochromów P450). Wpływ tego metalu na aktywność enzymów II fazy jest bardziej złożony i niejednoznaczny [Dobrakowski et al., 2013].

U osób narażonych zawodowo na działanie ołowiu wykazano nefropatię. Cechuje się ona stwardnieniem kłębuszków nerkowych, śródmiąższowym włóknieniem i uszkodzeniem kanalików proksymalnych [Patrick, 2006]. Białkomocz, upośledzony transport glukozy i obniżony wskaźnik przesączania kłębuszkowego są objawami postępującej choroby nerek [Patrick, 2006].

Podwyższony, całkowity poziom ołowiu we krwi (20-29 $\mu\text{g/dL}$) związany jest ze zwiększeniem się śmiertelności spowodowanej chorobami sercowo – naczyniowymi. Narażenie na ołów związane jest z wystąpieniem nadciśnienia, chorób sercowych i naczyniowo - mózgowych u eksponowanych grup populacji [Patrick, 2006]. Badania prowadzone na ludziach i zwierzętach wykazały istotny związek pomiędzy ekspozycją na niskie dawki ołowiu a nadciśnieniem [Jomovaa, Valko, 2011]. Trudno jest jednoznacznie określić czy ołów, poza innymi czynnikami ryzyka (nieodpowiednia dieta, spożywanie alkoholu), jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za wystąpienie hipertensji, jednakże ten stan chorobowy jest wyraźnie związany z wystąpieniem podwyższonego poziomu stresu oksydacyjnego. Udowodniono, że narażenie na niskie dawki ołowiu zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu [Jomovaa, Valko, 2011].

W badaniu nadciśnienia tętniczego u kobiet w okresie około i pomenopauzalnym wykazano, że ołów powoduje wzrost ciśnienia krwi (skurczowego i rozkurczowego). Związek ten był najbardziej widoczny u kobiet po menopauzie [Nash et al., 2003].

Moss i wsp. zaobserwowali zwiększoną częstotliwość występowania próchnicy zębów u dzieci narażonych na działanie ołowiu, przy uwzględnieniu czynników demograficznych, diety i poziomu opieki stomatologicznej [Moss et al., 1999].

W kilku badaniach stwierdzono związek pomiędzy niskim poziomem prenatalnej i noworodkowej ekspozycji na ołów a pojawieniem się deficytów we wczesnym rozwoju i zachowaniach neurobehawioralnych [Emory et al., 1999].

Ołów jest pierwiastkiem, który przenika przez łożysko [Estrine, 2013]. Ekspozycja w życiu płodowym wiąże się z zaburzeniem funkcji poznawczych a także z występowaniem drobnych wad wrodzonych. Baranowska w swoich badaniach dotyczących poziomu ołowiu i kadmu w ludzkim łożysku oraz w krwi matki i noworodka na terenach zanieczyszczonych stwierdziła, że przejście ołowiu przez łożysko może być główną przyczyną zatrucia płodu [Baranowska, 1995]. Llanos i Ronco wykazali w swoich badaniach istnienie zależności pomiędzy stężeniem ołowiu w łożysku a niską masą urodzeniową [Llanos, Ronco, 2009].

Ekspozycja na metale toksyczne poprzez tytoń zależna jest przede wszystkim od zawartości tego metalu w używce, ilości jaka zostanie przeniesiona do dymu tytoniowego i następnie wchłonięta do organizmu [Lazarević et al., 2012].

Ołów jako jeden z toksycznych metali, będących składnikami dymu tytoniowego, może być odpowiedzialny za wystąpienie nowotworów, m.in. płuc. Metale toksyczne po wchłonięciu do tego narządu mogą się w nich odkładać i pozostawać przez dłuższy okres

czasu, co z kolei prowadzi do zmian w funkcjonowaniu komórek [de Sousa Viana et al., 2011]. Badania wykazały, że ołów zawarty w papierosach związany jest przede wszystkim ze zdolnością tytoniu jako rośliny (*Nicotiana tabacum L.*) do kumulowania wysokich ilości minerałów z zanieczyszczonej gleby [de Sousa Viana et al., 2011].

2.3.8. Kadm

2.3.8.1. Ogólna charakterystyka

Kadm należy do grupy 12 układu okresowego pierwiastków. Jego względna masa atomowa wynosi 112,411, temperatura topnienia 594,1 [K] a temperatura wrzenia 1040 [K] [Bielański, 2012]. Jest białym, łatwo topliwym metalem, o niebieskawym odcieniu [Seńczuk, 2006]. Powstaje jako produkt uboczny metalurgii cynku [Bielański, 2012]. W związkach, które tworzy, występuje wyłącznie na +II stopniu utlenienia. W temperaturze 300°C przechodzi w stan gazowy [Seńczuk, 2006].

Pierwiastek ten znalazł wiele zastosowań w przemyśle – między innymi w produkcji stopów, lutów, akumulatorów, powlekanii powierzchni metali, pigmentach i stabilizatorach tworzyw sztucznych, a także w produkcji fungicydów, lamp fluorescencyjnych. Stosowany jest także w dentystryce jako amalgamat [Seńczuk, 2006; Bielański, 2012].

Kadm obecny jest w rudach zawierających cynk i ołów (grenokit i otawit) [Bielański, 2012].

2.3.8.2. Kadm w organizmie

Kadm dostaje się do organizmu człowieka dwoma drogami: inhalacyjną i pokarmową. U ogółu niepalącej populacji podstawowym źródłem narażenia na ten pierwiastek jest żywność. Poza wiekiem, na wchłanianie jelitowe kadmu wpływ mają różnorodne czynniki, takie jak forma chemiczna, dawka i droga narażenia, rodzaj stosowanej diety, stan odżywienia i interakcje kadmu z innymi pierwiastkami [Asagba 2009]. Z przewodu pokarmowego człowieka wchłania się około 5% spożytego kadmu. W badaniach prowadzonych na populacji niemieckiej wykazano, że codzienne spożycie kadmu wynosi 30 – 35 µg tego pierwiastka, z czego 95% pochodzi z diety. Przeciętny palacz dodatkowo przyjmuje 30 µg kadmu dziennie [Godt et al., 2006]. Niektóre czynniki mogą wpłynąć na zwiększenia wchłaniania tego toksycznego pierwiastka, m. in. niskie spożycie wapnia, witaminy D, miedzi czy cynku [Godt et al., 2006].

Badania wykazały, że u niepalących kobiet populacji szwedzkiej, które spożywały pokarmy bogate w zboża i warzywa korzeniowe (bogate w błonnik) oraz skorupiaki (przynajmniej raz w tygodniu), poziom kadmu był zwiększony w porównaniu do kobiet, które stosowały różnorodną dietę [Järup et al., 1998].

Istotnym źródłem narażenia na kadm jest wdychanie dymu tytoniowego. Szacuje się, że jeden papieros zawiera 1 – 2 µg kadmu, z czego około 10% zostaje wchłoniętych drogą wziewną. Przy założeniu, że około 50% wdychanego kadmu przedostaje się do organizmu, to osoba, która dziennie wypala 20 papierosów, absorbować będzie mniej więcej 1µg kadmu [Järup et al., 1998].

Kadm występuje w osoczu w postaci kompleksów z wielkocząsteczkowymi białkami, natomiast we krwi wiązany jest przez krwinki czerwone w ponad 70%. Jego kompleksy z białkami niskocząsteczkowymi ulegają resorpcji zwrotnej w kanalikach nerkowych, natomiast z wielkocząsteczkowymi odkładają się w wątrobie, aby kadm po uwolnieniu się z nich mógł związać się z metalotioneiną (MT) [Seńczuk, 2006].

Narządem, w którym kadm kumuluje się przez długi okres czasu, są nerki. Okres półtrwania w tym organie wynosi około 10 lat [Godt et al., 2006].

Pomiar stężenia kadmu w surowicy krwi stanowi wiarygodny wskaźnik niedawnej ekspozycji na ten toksyczny metal, natomiast stężenie w moczu odzwierciedla narażenie w przeszłości i stopień kumulacji w nerkach [Godt et al., 2006].

Kadm wydalana się m. in. z kałem, co stanowi wskaźnik stosowany do oceny dziennego spożycia. Stosuje się go przede wszystkim u osób zamieszkałych na terenach zanieczyszczonych tym metalem, gdzie wydalanie kadmu wynosi około 300 µg [Seńczuk, 2006]. Ekskrecja z moczem następuje w trzech fazach. W pierwszej kadm kumuluje się w korze nerki i ulega wiązaniu z metalotioneiną. W fazie drugiej wydalanie z moczem stanowi informację o narażeniu na ten metal w przeszłości, jak i w chwili obecnej. Trzeci etap związany jest z uszkodzeniem kanalików nerkowych – obserwowany jest znaczny wzrost wydalania kadmu [Seńczuk, 2006].

2.3.8.3. Diagnostyka zaburzeń

Kadm wykazuje działanie toksyczne na wiele narządów. Uszkadza nerki, płuca, wątrobę, kości, system odpornościowy i sercowo - naczyniowy [Templeton, Liu, 2010].

Ostre zatrucie kadmem należy w dzisiejszych czasach do rzadkich w Europie i Ameryce Północnej, a jego objawy zależą od drogi wchłaniania. Zatrucie drogą doustną prowadzi do bólów brzucha, ślinotoków, zadławienia, wymiotów, zawrotów głowy i utraty przytomności [Johri et al., 2010]. Przy zatruciu spowodowanym wchłanianiem kadmu drogami oddechowymi obserwuje się suchość w gardle, kaszel, bóle w klatce piersiowej, bóle głowy z objawami grypopodobnymi (gorączka), ostry obrzęk płuc (często śmiertelny), zapalenie płuc, osłabienie mięśniowe czy ból nóg [Johri et al., 2010]. Ostre zatrucia, spowodowane wdychaniem zanieczyszczonego kadmem powietrza, powodują także uszkodzenia układu oddechowego. Dochodzić może do obrzęku, duszności i zapalenia płuc [Godt et al., 2006]. Spożycie zanieczyszczonego kadmem jedzenia może prowadzić do wymiotów i biegunki [Godt et al., 2006].

Do zatrucia kadmem częściej dochodzi na skutek długotrwałego oddziaływania tego pierwiastka na organizm. Przewlekłe zatrucie następuje po długo trwającym pochłanianiu małych ilości kadmu, a objawy z tym związane mogą przez okres nawet roku pozostać niezauważalne [Czeczot, Skrzycki, 2010].

Organami najbardziej narażonymi na przewlekłą toksyczność kadmu są nerki, wątroba i szkielet [Johri et al., 2010].

Ze względu na swoją zdolność do wchłaniania i kumulowania metali dwuwartościowych, nerki są głównym organem narażonym na działanie metali toksycznych. Stopień uszkodzenia nerek zależy od dawki, rodzaju, drogi i czasu trwania narażenia. Zarówno ostre, jak i przewlekłe zatrucie może spowodować nefropatie, charakteryzujące się

różnymi objawami, od umiarkowanych do ciężkich. Może dojść do wystąpienia nabytego zespołu Fanconiego, powodującego dysfunkcję kanalików nerkowych czy ostrej niewydolności nerek, która może zakończyć się śmiercią [Barbier et al., 2005].

Kadm indukuje syntezę niskocząsteczkowych białek metalotionein (MT), które wiążą jony Cd (II) w kompleksy kadm - metalotioneina (CdMT). Kompleksy te są łatwo filtrowane w nerkach i resorbowane w kanalikach proksymalnych. Po ich degradacji dochodzi do uwolnienia jonów kadmu, co prowadzi do uszkodzenia tych struktur, zaburzeń resorpcji i ogólnego działania toksycznego na nerki [Czeczot, Skrzycki, 2010].

Kadm może wpływać na prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego. Dobrym markerem narażenia na ekspozycję na kadm są jądra [Jomovaa, Valko, 2011]. W wielu badaniach dowiedziono bowiem, że ten toksyczny pierwiastek może wpływać na uszkodzenie lub martwicę jąder. Wykazano ostrą martwicę jąder u zwierząt doświadczalnych, którym podano kadm w dawce 1 mg/kg masy ciała lub wyższej [Järup et al., 1998]. Przy długotrwałym narażeniu, objawy charakterystyczne dla ostrego zatrucia mogą nie wystąpić, możliwe jest jednak pojawienie się innych zaburzeń układu rozrodczego męskiego, takich jak zmiany w męskich hormonach płciowych czy związanych z nimi nieprawidłowościami w tzw. strukturach pomocniczych [Järup et al., 1998].

Niskie dawki kadmu stymulują biosyntezę progesteronu w jajnikach, podczas gdy wysokie dawki prowadzą do jej hamowania. Ekspozycja matek w ciąży na kadm prowadzić może do wystąpienia niskiej masy urodzeniowej dzieci i ryzyka samoistnych poronień [Godt et al., 2006]. Niektóre badania dowodzą, że kadm działa podobnie jak silny, niesteroidowy estrogen *in vivo* i *in vitro* [Johnson et al., 2003].

Badania Nishijo i wsp. dowodzą, że ekspozycja na kadm może wywołać przedwczesny poród. Pierwiastek ten kumuluje się w łożysku, co prowadzi do zakłócenia rozwoju płodu. Autorzy wykazali również istotną zależność pomiędzy stężeniem w mleku matki karmiącej a kadmem obecnym w jej moczu, co świadczy o przeniesieniu tego toksycznego pierwiastka do mleka matki [Nishijo et al., 2002].

Badania dowodzą o związku istniejącym pomiędzy zatruciem kadmem a uszkodzeniem kości [Godt et al., 2006]. Pierwiastek ten związany jest z wystąpieniem choroby itai – itai, charakteryzującej się dużym zakresem objawów. U chorych obserwuje się niedostateczną mineralizację kości, zwiększoną częstość wystąpienia osteoporozy, podwyższony wskaźnik złamań, ból kości i stawów [Godt et al., 2006]. Wystąpienie epidemii tej choroby odnotowano w pobliżu kopalni Kamioka, przy rozlewisku rzeki Jinzu w Japonii. Związki kadmu przedostawały się wraz ze spływającą wodą na plantacje ryżu. Kadm konkurencyjnie wypierał jony wapnia w kościach, dlatego u pracowników ekspozowanych na ten metal dochodziło do patologicznych złamań kości, bólów stawów oraz nefropatii [Mlynek, Skoczyńska, 2005].

Palenie papierosów w okresie ciąży jest wysoce niebezpieczne ze względu na możliwość kumulacji kadmu u płodu i obniżenie masy urodzeniowej noworodka [Seńczuk, 2006; Florek et al., 2012].

W jednym z badań dotyczących ciąży wśród kobiet zamieszkujących region Suwałk, gdzie istnieje wysoki poziom kadmu i ołowiu w glebie, wykazano mniej donoszonych oraz mnogich ciąż, a także wystąpienie przedterminowych urodzeń dzieci z niską masą

urodzeniową w porównaniu do kobiet zamieszkujących tereny niezanieczyszczone. Wykazano także wyższy poziom kadmu we krwi kobiet narażonych [Laudanski et al., 1991].

2.3.9. Kobalt

2.3.9.1. Ogólna charakterystyka

Kobalt jest naturalnym mikroelementem obecnym w skorupie ziemskiej, występuje również w śladowych ilościach w glebie, roślinach i diecie. Należy do niezbędnych minerałów w organizmie ludzkim, jednak dla prawidłowego funkcjonowania potrzebna jest niewielka jego ilość [Rojas et al., 2013]. Naturalnymi źródłami kobaltu w środowisku są gleby, pył, wybuchy wulkanów, pożary lasów i woda morska [Rojas et al., 2013].

Kobalt jest białym, ciągliwym i kowalnym metalem, należącym do grupy 9 układu okresowego pierwiastków. Jego względna masa atomowa wynosi 58,9331 a temperatura topnienia 1768 [K]. Stanowi on 0,0025% skorupy ziemskiej, występuje w licznych minerałach arsenkowych, siarczkowych i tlenkowych żelaza, niklu i miedzi. Kobalt jest głównym składnikiem następujących minerałów: kobaltynu CoAsS i smaltynu CoAs_2 [Bielański, 2012]. Pierwiastek ten, otrzymywany na skalę przemysłową, w przeważającej części wydzielany jest z kobaltonosnych rud żelaza i miedzi. Drugim sposobem otrzymywania jest elektrolityczne wydzielanie kobaltu z roztworów jego soli [Bielański, 2012].

Kobalt metaliczny znajduje zastosowanie do wyrobu tzw. twardych spieków zawierających węgiel wolframu. Jest też składnikiem bardzo twardych stopów, stelitów, zawierających także dodatki żelaza, węgla, chromu i wolframu. Do wyrobu trwałych magnesów używa się stali zawierającej 35% kobaltu [Bielański, 2012]. Stosuje się go także do wyrobu barwników, środków suszących i katalizatorów [De Boeck et al., 2003].

2.3.9.2. Kobalt w organizmie

Głównymi drogami narażenia zawodowego na kobalt jest kontakt przez skórę i droga inhalacyjna. Na skutek ekspozycji może dojść do wystąpienia objawów niepożądanych w różnorodnych narządach i tkankach, między innymi w układzie oddechowym, skórze, tkankach krwiotwórczych, mięśniu sercowym czy tarczycy [De Boeck et al., 2003].

Dla większości społeczeństwa główną drogą narażenia na kobalt jest spożywanie jedzenia. Ilość kobaltu zaabsorbowanego do organizmu drogą pokarmową (żywność, woda), zależy od wielu czynników, m.in. od ilości spożywanego pokarmu i wody, stanu zdrowia, ilości dni, tygodni, a nawet lat w czasie których spożywa się zanieczyszczone jedzenie i pije skażoną wodę [ATSDR, 2004].

Człowiek dziennie spożywa około 11 μg kobaltu ze swojej diety. Zawarta jest w niej witamina B_{12} , której zalecane dzienne spożycie wynosi 6 μg . Kobalt będący źródłem tej witaminy znaleźć można przede wszystkim w mięsie, zielonych warzywach, świeżych zbożach, natomiast w produktach mlecznych, zbożach rafinowanych i cukrze znajdują się mniejsze ilości tego pierwiastka [ATSDR, 2004; WHO, 2006].

Kobalamina, będąca niezbędną witaminą w organizmie człowieka, pełni rolę w zwalczaniu anemii (0,16 – 1,0 mg kobaltu/kg masy ciała), ponieważ uczestniczy w wytwarzaniu czerwonych krwinek. Zwiększa również ich produkcję u zdrowych ludzi, ale tylko przy bardzo wysokich poziomach ekspozycji. Kobalt jest również niezbędny dla zdrowia niektórych zwierząt, takich jak bydło i owce. Narażenie na poziomy kobaltu normalnie występującego w środowisku nie jest szkodliwe dla zdrowia [ATSDR, 2004].

Wdychanie cząstek kobaltu prowadzi do ich osadzania się w obszarze górnych i dolnych dróg oddechowych. Rozmiar cząsteczek jest bardzo istotny, ponieważ duże cząstki osadzają się w górnych drogach oddechowych, mniejsze natomiast w dolnych, gdzie następnie może dochodzić do ich rozprzestrzenienia [WHO, 2006]. Duże znaczenie ma również wiek osoby narażonej oraz sposób oddychania [WHO, 2006].

Ilość kobaltu, która dostanie się do krwi zależy od tego, jak dobrze jego cząsteczki się rozpuszczają. Jeżeli proces ten zachodzi dobrze – wtedy kobalt łatwiej przechodzi z płuc do krwi, jeżeli trudniej, wtedy cząsteczki dłużej pozostaną w wyżej wspomnianym narządzie [ATSDR, 2004].

Niektóre cząsteczki kobaltu po rozpuszczeniu w płucach zostają wchłonięte do krwi, inne mechanicznie przetransportowane do przewodu pokarmowego (np. na skutek połknięcia). Około 50% kobaltu, który dostanie się do układu trawiennego, zostaje wchłonięte [ATSDR, 2004].

Niedostateczne ilości żelaza w organizmie mogą skutkować zwiększonych wchłanianiem kobaltu, a jednoczesne wchłanianie żelaza i kobaltu powoduje zmniejszenie absorpcji toksycznego pierwiastka [WHO, 2006].

Kobalt jest pierwiastkiem niezbędnym (w małych ilościach) i stanowi składnik witaminy B₁₂. U osób nienarażonych zawodowo znaleźć go można w wielu tkankach, między innymi w sercu, płucach, mięśniach, skórze, kościach, żołądku, mózgu, nerkach. Najwyższe jego ilości znajdują się w wątrobie [WHO, 2006].

Sekcje pracowników narażonych zawodowo na wdychanie dużych ilości kobaltu wykazały podwyższone jego stężenie w tkankach. Pracownicy hut miedzi, górnicy i ślusarze, mieli wyższe poziomy kobaltu w płucach w porównaniu do osób nienarażonych [WHO, 2006].

Kobalt wydalany jest z organizmu z moczem i kałem. Niezależnie od drogi narażenia, większość kobaltu eliminowana jest szybko, niewielkie jego ilości eliminowane są przez dłuższy okres czasu [Gál et al., 2008]. Wydalanie z moczem wzrasta wraz z upływem czasu od ekspozycji [WHO, 2006].

2.3.9.3. Diagnostyka zaburzeń

Kobalt jest zaliczany do pierwiastków niezbędnych w organizmie człowieka, jednak tylko kiedy występuje w niewielkich ilościach. W wyższych stężeniach kobalt wykazuje działanie toksyczne w stosunku do ludzi, zwierząt lądowych, wodnych i roślin [Gál et al., 2008].

Mechanizm działania toksycznego kobaltu nie jest do końca wyjaśniony, jednak niektóre z objawów wywołanych przez ten pierwiastek mogą być związane z jego dużym powinowactwem do grup sulfhydrylowych, które mogą hamować kluczowe enzymy, np.

enzymy oddychania mitochondrialnego [Simonsen et al., 2012]. Toksyczność kobaltu może również być spowodowana wytwarzaniem reaktywnych form tlenu w komórkach, co powoduje zwiększenie wskaźników stresu oksydacyjnego, wliczając obniżony poziom zredukowanego glutationu, zwiększony poziom jego utlenionej postaci, a także uszkodzenia DNA spowodowane działaniem wolnych rodników [ATSDR, 2004]. Kobalt działa również jako bloker nieorganicznych kanałów wapniowych [WHO, 2006].

Zatrucia związkami kobaltu mogą prowadzić do poważnych chorób, jego toksyczne działanie obejmuje wiele narządów. Jednym z objawów zatrucia kobaltem jest wystąpienie polycytemii (zwiększonej ilości krwinek czerwonych we krwi), kardiomiopatii oraz zaburzeń związanych z prawidłowym funkcjonowaniem układu rozrodczego u mężczyzn [Gál et al., 2008].

Skutki przewlekłego, zawodowego narażenia na kobalt i jego związki na układ oddechowy są dobrze udokumentowane. Wiele badań wykazało u ludzi zmniejszenie czynności płuc, podrażnienie dróg oddechowych, świszczący oddech, astmę, zwłóknienie i zapalenie płuc. Objawy te obserwowane były przy poziomach stężeń kobaltu w zakresie od 0,007 do 0,893 mg Co/m³ (okres trwania ekspozycji od 2 do 17 lat) [ATSDR, 2004].

Inhalowanie samego kobaltu może prowadzić do wystąpienia astmy, natomiast jednoczesne wchłanianie tego metalu i cząsteczek węgliku wolframu powoduje powstawanie choroby zwanej „*hard metal lung disease*”, która jest śródmiąższową chorobą płuc wywołującą zwłóknienie pęcherzyków płucnych [Jomovaa, Valko, 2011]. Międzynarodowa Agencja Badań Nad Rakiem zaklasyfikowała mieszaninę Co/węglík wolframu jako „prawdopodobnie kancerogenną dla człowieka”, natomiast sam kobalt jako „możliwie kancerogenny dla człowieka” [Jomovaa, Valko, 2011].

Przy narażeniu na związki kobaltu może dojść do poważnego podrażnienia oczu. U 48 – letniego mężczyzny, palącego 10 papierosów dziennie i pijącego dwa kufle piwa tygodniowo, po 20 miesiącach zawodowego narażenia na proszkowany kobalt doszło do zaniku nerwu wzrokowego. Obustronna głuchota została opisana jako skutek przewlekłego narażenia na ten pierwiastek. Po ustaniu narażenia, głuchota prawie całkowicie ustąpiła [Meecham, Humphrey, 1991].

Objawy utraty wzroku i słuchu zaobserwowano również u chorych po operacji całkowitej wymiany stawu biodrowego. Po wstawieniu metalowej endoprotezy zaobserwowano narastające uszkodzenie słuchu a przeprowadzone badania wykazały podwyższony poziom kobaltu we włosach pacjenta. W późniejszych badaniach zauważono także zwiększone stężenie kobaltu w surowicy krwi i płynie mózgowo – rdzeniowym [Steens et al., 2006]. Również u kobiety, która straciła wzrok i słuch, analiza toksykologiczna wykazała podwyższony poziom kobaltu i chromu we krwi i w osoczu, co świadczy o tym, że do zatrucia kobaltem i chromem doszło z powodu zużycia metalu pochodzącego z protezy biodrowej [Rizzetti et al., 2009].

Kobalt powoduje powstawanie poważnej, często prowadzącej do śmierci kardiomiopatii. W badaniach, w których narażenie na kobalt spowodowało zgon, sekcje zwłok wykazały znaczne nagromadzenie kobaltu w mięśniu sercowym [Simonsen et al., 2012]. Wystąpienie kardiomiopatii zauważono również w przypadku ekspozycji przemysłowej na kobalt [Simonsen et al., 2012].

Przy narażeniu skórny na kobalt może dojść do rozwoju reakcji alergicznych [Lison et al., 2001].

U osób narażonych zawodowo na kobalt, jego sole i tlenki, wykazano wystąpienie duszności, świszczący oddech a także zmiany skórne (egzema, rumień), zwiększoną częstotliwość występowania podrażnienia oka, nosa i gardła [ATSDR, 2004].

Jony Co^{2+} wykazują działanie genotoksyczne *in vitro* i *in vivo*, prawdopodobnie wywołując stres oksydacyjny i powodując hamowanie naprawy DNA [De Boeck et al., 2003]. Wykazano, że narażenie na kobalt i jego związki (metal, sole) powoduje działanie klastogenne (zmiany w strukturze chromosomów) w komórkach ssaków, w tym w ludzkich limfocytach [ATSDR, 2004].

U pracowników narażonych na działanie pyłów kobaltu, chromu i niklu zauważono istotne zwiększenie częstości wymiany chromatyd siostrzanych (ang. *sister chromatid exchange*, SCE), co mogło być powiązane z ekspozycją na pyły metali oraz paleniem papierosów [De Boeck et al., 2003]. Obserwowano także podwyższony poziom antygenu karcynoembrionalnego i surowicznych markerów nowotworowych we krwi narażonych pracowników [De Boeck et al., 2003]. Wykryta genotoksyczność mogła jednakże nie być przypisana działaniu kobaltu, ze względu na ekspozycję na mieszane pyły metali [De Boeck et al., 2003]. Inne badania wykazały jednak podwyższoną częstość wymiany SCE w limfocytach pacjentów z endoprotezą stawu w porównaniu do grupy kontrolnej [Stea et al., 2000].

Potencjalne, kancerogenne działanie kobaltu i jego związków po raz pierwszy w 1991 roku wykazała Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem. Założono, że nie istnieją wystarczające dowody na kancerogenność kobaltu (nowotwór płuca), ale potwierdzono taką zależność u zwierząt eksperymentalnych. Badania wykazały, że różne formy kobaltu w odmienny sposób wpływają na toksyczność, mutagenność i kancerogenność [Lison et al., 2001; De Boeck et al., 2003].

W kilkunastu badaniach dotyczących ryzyka wystąpienia nowotworu wśród pracowników narażonych na działanie metali we Francji, potwierdzono obecność raka płuc przy ekspozycji na pyły kobaltu i węgliku wolframu [IARC, 2006]. Istnieją dowody na rosnące ryzyko wystąpienia nowotworów płuc wraz ze wzrostem trwania narażenia, biorąc pod uwagę istnienie dodatkowych czynników, mogących także mieć potencjalny wpływ, takich jak palenie papierosów czy obecność innych substancji rakotwórczych w miejscu pracy [IARC, 2006]. W badaniu przeprowadzonym w Szwecji, z udziałem mniejszej liczby osób, także wykazano zwiększoną częstotliwość występowania nowotworu płuc u osób narażonych na działanie kobaltu i węgliku wolframu. Jednak ze względu na małą liczbę przypadków i brak rozdzielenia innych czynników ryzyka, takich jak palenie papierosów, badania tego nie można uznać za wiążące [IARC, 2006].

2.3.10. Chrom

2.3.10.1. Ogólna charakterystyka

Chrom jest metalem o srebrzystoszarym zabarwieniu, zawierającym błękitny odcień. Cechuje go bardzo duża twardość [Seńczuk, 2006]. Jego masa atomowa wynosi 51,9961, temperatura topnienia 2176 [K]. Dobrze przewodzi ciepło i elektryczność [Bielański, 2012].

W środowisku chrom występuje w różnych formach (od $-II$ do $+VI$), ale najczęściej spotykanym jest chrom sześciowartościowy (chromiany) i chrom trójwartościowy. Cr III trudno dostaje się do organizmu i raczej nie wykazuje działanie toksycznego, w przeciwieństwie do Cr VI, którego toksyczność jest wysoka i wywołuje wiele szkód w organizmie [Seńczuk, 2006].

Pod względem rozpowszechnienia stanowi 20 miejsce pomiędzy wszystkim pierwiastkami i spośród chromowców występuje najliczniej w skorupie ziemskiej – 0,02% [Bielański, 2012].

Chromit - $FeCr_2O_4$, stanowiący główny surowiec, z którego uzyskuje się chrom oraz kroit, $PbCrO_4$, to najbardziej znane rudy chromu [Bielański, 2012]. Otrzymywanie chromu polega na przerobieniu rudy na tlenek – Cr_2O_3 .

Stop żelaza i chromu – żelazochrom, jest szeroko stosowany w przemyśle. Związki chromu służą do produkcji cementów, barwników garbików, znajdują także zastosowanie w galwanizacji [Seńczuk, 2006]. Chrom sześciowartościowy jest obecny w środowisku głównie z powodu działalności człowieka [Dayan, Paine, 2001]. Powstaje on ze spalania drewna, paliw, papieru oraz w przemysłowym procesie utleniania rud chromu [Seńczuk, 2006]. Ze względu na wysoką temperaturę topnienia i dobre przewodnictwo elektryczne chromowce stosowane są do wyrobu elementów grzewczych w różnego rodzaju piecach elektrycznych. Używa się go również do wytwarzania powłok ochronnych na innych metalach [Bielański, 2012].

2.3.10.2. Chrom w organizmie

Chrom dostaje się do organizmu przez płuca, układ żołądkowo - jelitowy i w mniejszym stopniu przez skórę. Najważniejszą drogą narażenia zawodowego jest droga inhalacyjna, podczas gdy w normalnych warunkach narażenie występuje poprzez spożycie żywności i wody zawierających chrom [Shrivastava et al., 2002]. Niezależnie od drogi narażenia Cr III jest słabo, a Cr VI jest lepiej wchłaniany. Wchłanianie Cr III drogą doustną zachodzi w niewielkim stopniu. Absorpcja doustna Cr VI jest również gorsza, jednak ekspozycja na metal nie jest wówczas związana z tak dużą toksycznością [Shrivastava et al., 2002]. Narażenie drogą inhalacyjną i skórą prowadzi do wystąpienia wielu chorób, takich jak podrażnienie i owrzodzenie nosa, reakcje nadwrażliwości, kontaktowe zapalenie skóry, czy nawet nowotwór płuc [Shrivastava et al., 2002].

W przeciwieństwie do Cr III, który jest związany z białkami osocza, takimi jak transferyna, Cr VI wchodzący do krwioobiegu zostaje selektywnie wychwytywany przez erytrocyty, zredukowany i związany z hemoglobiną. Redukcja Cr VI przebiegająca podczas

transportu z krwią jest zgodna ze stwierdzeniem, że tylko Cr III występuje w moczu [Dayan, Paine, 2001].

U ludzi chrom kumuluje się w wątrobie, śledzionie, tkankach miękkich i kościach [Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001]. Wydala się przede wszystkim z moczem i z kałem [Shrivastava et al., 2002].

Chrom jest naturalnie występującym pierwiastkiem w środowisku. Występuje na dwóch stopniach utleniania i zarówno chrom na +III, jak i na +VI stopniu może wywołać wystąpienie toksyczności. Większość przeprowadzonych badań wykazała toksyczność i kancerogenność Cr VI [Raja et al., 2011].

Sole chromu trójwartościowego, do których zaliczamy m.in. chlorek chromu, chrom związany z niacyną i polinikotynian chromu, to mikroelementy używane jako składniki suplementów diet [Bagchi et al., 2002].

W ostatnich latach obserwowany jest wzrost zainteresowania tym pierwiastkiem, stanowiącym składnik preparatów odchudzających i wpływających na przyrost masy mięśniowej [Vincent, 2004].

Zawartość chromu w żywności może ulegać zwiększeniu lub zmniejszeniu, w zależności od procesów przetwarzania. Mięso, drób i ryby zawierają ok. 1-2 μg na porcję, przy czym przetworzone mięso zawiera większe ilości tego pierwiastka, które nabyć może ze źródeł zewnętrznych [Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001]. Pierwiastek ten występuje także w świeżej żywności - pieczywie, warzywach, także w płatkach i wodzie pitnej [Jomova, Valko, 2011].

Badania na ludziach i zwierzętach wykazały istotną rolę, jaką odgrywają śladowe ilości (50 - 200 $\mu\text{g}/\text{dzień}$) chromu trójwartościowego w organizmie człowieka. Chrom wzmacnia działanie insuliny wpływając na prawidłowy przebieg metabolizmu glukozy. Spożycie chromu w takich ilościach nie wpływa na wystąpienie efektu toksyczności w organizmie [Dayan, Paine, 2001].

Komisja Żywności i Żywienia Narodowej Akademii Nauk USA obniżyła wytyczne dotyczące spożycia chromu z 50 - 200 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ dla osoby dorosłej do 36 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ dla dorosłego mężczyzny i 25 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ dla dorosłej kobiety [Trumbo et al., 2001].

2.3.10.3. Diagnostyka zaburzeń

Niedobór chromu związany jest z zaburzoną tolerancją glukozy, cukromoczem, hiperglikemią na czczo, dyslipidemią i upośledzeniem płodności [Jomovaa, Valko, 2011].

U ludzi z chorobami sercowo – naczyniowymi metabolizm chromu może być zaburzony. Pikolinian w dawce 200 μg na dzień zmniejsza insulinooporność i pomaga zredukować ryzyko wystąpienia chorób sercowo – naczyniowych i cukrzycy typu 2. Dalsze badania naukowe są konieczne, aby wykazać korzystny wpływ suplementacji preparatami zawierającymi chrom na zapobieganie chorobom układu sercowo – naczyniowego [Jomovaa, Valko, 2011].

Działanie toksyczne jest związane z utleniającymi właściwościami chromu sześciowartościowego. W redukcji Cr VI do Cr III uczestniczą cytochromy P-450 i Cyt-b oraz krwinkowy glutation. Ze względu na powinowactwo chromu do wielu enzymów, powoduje

on pobudzenie lub hamowanie katalizowanych przez nie reakcji. Przy udziale enzymów NADPH - zależnych następuje redukcja Cr VI do Cr III, która zachodzi wewnątrz komórek [Seńczuk, 2006].

Związki Cr VI są najbardziej toksyczne, ponieważ mogą być łatwo absorbowane i transportowane przez błony za pomocą niespecyficznych nośników anionowych. Gdy Cr VI dotrze do wnętrza komórki zostaje zredukowany do Cr III [Soudani et al., 2010]. Proces redukcji prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu i powoduje uszkodzenie tkanek miękkich, takich jak wątroba, nerki, trzustka i mózdzek [Soudani et al., 2010].

Narażenie na doustne zatrucie związkami chromu VI prowadzi do wystąpienia wielu niekorzystnych dla człowieka skutków. Dotyczy to zaburzeń żołądkowo – jelitowych, niedociśnienia a także niewydolności wątroby i nerek [Jomovaa, Valko, 2011].

U dorosłych doustna dawka śmiertelna wynosi 50 - 70 mg rozpuszczalnych chromianów na kilogram masy ciała. Ostre zatrucie charakteryzuje się następującymi cechami klinicznymi: wymioty, biegunka, krwawienie oraz utratą krwi w przewodzie pokarmowym, co może prowadzić do wstrząsu sercowo - naczyniowego. Głównym skutkiem wynikającym z przyjmowania doustnych, toksycznych dawek chromu, jest martwica wątroby i nerek. Pozajelitowe podawanie chromu zwierzętom eksperymentalnym może prowadzić do wystąpienia działania teratogennego, jednak wykazano, że wystąpienie u człowieka wad wrodzonych nie jest związane z jego narażeniem na chrom [Dayan, Paine, 2001].

Wysokie dawki chromu i długotrwałe narażenie na ten metal może prowadzić do wystąpienia reakcji cytotoksycznych i genotoksycznych, które wpływają na układ odpornościowy organizmu [Shrivastava et al., 2002].

Ekspozycja na Cr VI wywołuje wiele toksycznych efektów, takich jak neurotoksyczność, toksyczność skórą, genotoksyczność, kancerogenność i immunotoksyczność [Kawanishi et al., 2002; Stohs et al., 2000; O'Brien et al., 2003].

Narażenie na związki chromu może prowadzić do kontaktowego zapalenia skóry. Choroba ta może być wywołana przez bezpośredni kontakt z wyrobami ze skóry, podczas procesu jej garbowania (utlenianie związków Cr III powoduje, że niewielkie ilości Cr VI można znaleźć w końcowym produkcie) [Hansen et al., 2003]. Kontakt skóry z pewnymi związkami chromu VI może prowadzić do wystąpienia wrzodów skórnych. Reakcje alergiczne, takie jak zaczerwienienie i obrzęk skóry występowały po narażeniu na związki chromu [Jomovaa, Valko, 2011].

Chrom sześciowartościowy jest metalem wchodzącym w skład dymu tytoniowego [Khlifi et al., 2013].

Badania dotyczące toksyczności chromu wykazały, że ekspozycja na ten pierwiastek prowadzi do ostrej niewydolności nerek u ludzi i zwierząt [Soudani et al., 2010].

Układ oddechowy jest układem najbardziej narażonym na toksyczne działanie Cr VI, zarówno w przypadku toksyczności związanej z ostrym (krótkoterminowym), jak i przewlekłym (długotrwałym) narażeniem. Dotyczy to przede wszystkim pracowników ekspozowanych na ten metal [ATSDR, 2000; De Flora, 2000].

Przewlekła ekspozycja prowadzi do owrzodzeń i perforacji przegrody nosowej, obniżenia funkcji płuc, przewlekłego zapalenia oskrzeli i zapalenia płuc [ATSDR, 2000].

W badaniach prowadzonych u zwierząt i ludzi eksponowanych na Cr VI poprzez spożywanie wody pitnej zauważono zwiększoną częstotliwość powstawania nowotworów żołądka. Zaobserwowano także uszkodzenie plemników i nieprawidłowe funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego u zwierząt laboratoryjnych narażonych na związki chromu VI [Jomovaa, Valko, 2011].

2.4. Włosy

Włosy (*pili*) powstają z komórek naskórka i są giętkimi, zrogowaciałymi włóknami. Mieszek włosowy, gruczoł apokrynowy, gruczoł łojowy oraz mięsień przywłosowy wchodzi w skład tzw. narządu włosowego. Ektoderma i mezoderma biorą udział w rozwoju tego narządu [Bochenek, Reicher, 2008].

Włos składa się z części niezawierającej żywych komórek, wystającej ponad powierzchnię skóry – łodygi włosa (*scapus pili*) oraz części sięgającej w głąb skóry do tkanki podskórnej – korzenia włosa (*radix pili*). Objęty jest on pochewką – mieszkem włosowym (*folliculus pili*). Opuszka, zwana cebulką włosa (*bulbus pili*), jest zgrubiałym zakończeniem korzenia, a komórki cebulki tworzą silnie zabarwione skupienie, tzw. macierz (*matrix*), z której następnie powstaje włos. Do mieszka włosa przyczepiony jest mięsień przywłosowy, do którego uchodzi gruczoł łojowy. Powyżej jego ujścia położona jest część mieszka, nazywana lejkiem (*infundibulum*) – stanowi on górną część kanału włosa (*canalis pili*) [Bochenek, Reicher, 2008].

Pod względem morfologicznym, włos składa się z trzech głównych części: powłoczki (*cuticula*), kory (*cortex*) i rdzenia (*medulla*). Powłoczka stanowi zewnętrzną otoczkę, kora jest głównym składnikiem włosa i nadaje mu wytrzymałość [Lai-Cheong, McGrath, 2009]. W komórkach kory i między nimi znajdują się ziarenka barwnika i czasami pęcherzyki gazu. Komórki korowe w wewnętrznej strukturze pasma włosowego zawierają szereg związków chemicznych, do których należy także melanina – główny barwnik włosa [Cooper, 2011]. Kolor włosów różni się w zależności od rozmieszczenia, ilości i rodzaju obecnego pigmentu [Cooper, 2011].

Rdzeń jest centralną częścią włosa, która nie zawsze występuje [Lai-Cheong, McGrath, 2009]. Tworzy strukturę gąbczastej keratyny oraz przestrzeni powietrznych [Cooper, 2011].

Mieszki włosowe, które osadzone są w nabłonku naskórka, na samej głowie znajdują się w ilościach 80,000 – 100,000 [Cooper, 2011].

Włos składa się z keratyny, białka bogatego w aminokwasy siarkowe [Harkey, 1993]. W zależności od stopnia nawilżenia włos zawiera on około 65 - 95% białka, 15 - 35% wody i 1 - 9% lipidów. Zawartość składników mineralnych wynosi od 0,25 do 0,95% (na podstawie suchej masy). Zarówno pierwiastki niezbędne dla organizmu, jak i metale ciężkie można znaleźć jako składniki wbudowane w strukturę włosa [Harkey, 1993].

Włos ludzki zawiera stosunkowo duże ilości glicyny, treoniny, kwasu asparaginowego i glutaminowego, cysteiny, lizyny i tyrozyny [Harkey, 1993].

Człowiek rodzi się z owłosieniem pokrywającym całe ciało, za wyjątkiem dłoni, podeszw, grzbietowych powierzchni dalszych paliczków palców, łechtaczki, prącia, żołądździ oraz wewnętrznej powierzchni napletka [Bochenek, Reicher, 2008].

Włosy, których człowiek posiada do 5 milionów [Lai-Cheong, McGrath, 2009], zaczynają zawiązywać się w 3 miesiącu życia zarodka. Łuki brwiowe i górna oraz dolna warga to pierwsze miejsca, w których pojawiają się ich zawiązki. Następnie zaczynają pojawiać się liczniej na głowie i dalszych okolicach skóry (koniec 3 - 4 miesiąca). Pod koniec 7 miesiąca prawie cała skóra pokryta jest gęstym, krótkim owłosieniem (*lanugo*) [Bochenek, Reicher, 2008].

Wyróżnić można trzy rodzaje włosów występujących u człowieka:

- meszek włosowy - *lanugo*, który wypada tuż przed porodem lub bezpośrednio po nim
- meszek stały - *vellus*, będący krótkim, jasnym, niewybarwionym włosem, który znajduje się na powiekach, czole i ciele dzieci i dorosłych
- włosy ostateczne - to długie, grube, wybarwione włosy o dużej powierzchni przekroju poprzecznego, znajdujące się na skórze głowy, brwiach, rzęsach, brodzie, okolicach łonowych i pod pachami [Lai-Cheong, McGrath, 2009; Cooper, 2011].

U człowieka można wyróżnić także tzw. włosy przejściowe, które znajdują się na górnych i dolnych kończynach osób dorosłych. Zawierają one cechy zarówno włosów pierwotnych, jak i ostatecznych. Są one zależne od hormonów płciowych i ulegają zmianie podczas okresu dojrzewania, podobnie jak włosy ostateczne. Przeciwnieństwem są włosy pierwotne, które nie zmieniają się po okresie dojrzewania i nie są zależne od hormonów płciowych [Cooper, 2011].

Przez pojęcie cyklu włosowego określa się czas od początku wzrostu włosa do jego samoistnego wypadnięcia i zakończenia fazy spoczynkowej [Bochenek, Reicher, 2008]. W mieszkach włosowych wyróżnić można trzy, występujące po sobie fazy: faza wzrostu – anagen, faza involucji – katagen oraz faza spoczynkowa – telogen. Czas trwania każdej z faz uzależniony jest od rodzaju i umiejscowienia mieszka włosowego. W warunkach fizjologicznych, około 85% mieszków włosowych na głowie jest w fazie anagenu, natomiast 15% w fazie katagenu [McElwee, Sinclair 2008]. Warunki normalne mogą zostać zaburzone przez stany chorobowe, brak odpowiedniej ilości składników odżywczych w organizmie oraz niektóre leki [Harkey, 1993]. Szczególnie w okresie ciąży może dojść do zahamowania fazy anagenu i przedwczesnego wypadnięcia włosów. Może to prowadzić do przejściowego wyłysienia (*alopecia*), zjawisko to ma jednak najczęściej charakter przejściowy [Bochenek, Reicher, 2008].

Okres anagenu przebiegający w zdrowych mieszkach włosowych na głowie trwa zazwyczaj od 2 do 6 lat i jest głównym czynnikiem warunkującym długość włosów [McElwee, Sinclair 2008]. Katagen jest krótkim okresem przejściowym, w czasie którego następuje zahamowanie podziału komórek, pasmo włosa zostaje w pełni skeratynizowane, cebulka ulega degeneracji, a mieszki włosowe ulegają znacznemu skróceniu [Harkey, 1993]. W fazie telogenu nie występuje wzrost włosa, meszek włosowy jest krótki i może zostać łatwo usunięty przez wyrwanie. Długość okresu, podczas którego włos pozostaje w tej fazie zależy od rodzaju włosa i wzrasta wraz z wiekiem [Cooper, 2011].

Innymi czynnikami, które mają wpływ na wzrost włosa, to między innymi okres ciąży, zaburzenia metaboliczne i genetyczne, stan odżywienia organizmu oraz zmiany sezonowe [Cooper, 2011].

2.5. Paznokcie

Paznokciec (*unguis*) stanowi przydatek naskórka i składa się z macierza, blaszki, łoża paznokcia i tkanki okołopaznokciowej. Jest on giętą, zrogowaciałą blaszką, która jest odporna na czynniki mechaniczne [Bochenek, Reicher, 2008].

Ludzkie paznokcie zbudowane są z wysokosiarkowych, twardych keratyn [Slotnick, Nriagu, 2006].

Macierz paznokcia (*matrix unguis*) to podłoże z którym połączony jest paznokciec, na którym znajduje się trzon paznokcia razem z korzeniem [Bochenek, Reicher, 2008].

Blaszka paznokcia to prostokątna, wypukła płytką, złożona ze zrogowaciałych komórek, która rozwija się na zewnątrz macierzy paznokci [Lai-Cheong, McGrath, 2009]. W przedniej części blaszki wystaje wolna część paznokcia, nie spoczywa ona na podłożu. Jest odcinana w miarę wzrastania paznokcia [Bochenek, Reicher, 2008]. Blaszka jest przejrzystą strukturą, a na jej kolor wpływa zabarwienie podłoża [Bochenek, Reicher, 2008]. Obłaczek (*lunula*) wytwarza warstwowo komórki paznokcia. Ustawiony jest skośnie do powierzchni paznokcia. Stanowi część korzenia (*radix unguis*), ma białawe zabarwienie [Bochenek, Reicher, 2008].

Od miękkich tkanek przypaznokciowych paznokciec odgraniczają bruzdy paznokcia. Wyróżnić można 4 bruzdy – bliższą, dalszą i dwie boczne, które wystają ponad paznokciec i tworzą wały paznokcia (*vallum unguis*). W obie bruzdy boczne wsuwa się blaszka paznokcia [Bochenek, Reicher, 2008].

Na powierzchni paznokcia znajdują się podłużne, delikatne prążki. Pojawiające się rowki są objawem chorobowym, świadczyć mogą o zaburzeniach troficznych lub rozwojowych paznokcia [Bochenek, Reicher, 2008]. Choroby ogólnoustrojowe, zwłaszcza zakaźne, mogą prowadzić do okresowego zahamowania wzrostu blaszki paznokciowej, czego następstwem jest wytworzenie poprzecznej bruzdy. Na podstawie odległości bruzd poprzecznej od obłaczka można ustalić, w przeciągu jakiego czasu doszło do zahamowania tworzenia się paznokcia [Bochenek, Reicher, 2008].

Wzrost paznokcia ma miejsce z obłaczka i częściowo z łoża paznokcia (*lectus unguis*) [Bochenek, Reicher, 2008]. Proces ten jest ciągły, trwa od 5 miesiąca życia płodowego do śmierci. Paznokcie u rąk rosną około 3 mm/miesiąc, wzrost paznokci u stóp jest wolniejszy [Lai-Cheong, McGrath, 2009]. Inne źródła podają, że paznokcie u rąk rosną średnio 0,1 mm/dzień a okres czasu potrzebny do całkowitego wzrostu paznokcia wynosi około 6 miesięcy. Paznokcie u stóp rosną natomiast 0,03 - 0,05 mm/dzień, a ich wzrost zajmuje 12 – 18 miesięcy. Różnice w szybkości wzrostu paznokcia wynikają ze zmienności osobniczych, zależą od wieku i płci. Szybszy wzrost paznokci obserwowany jest u mężczyzn, niż u kobiet, w okresie pomiędzy 10 – 14 rokiem życia przypada moment ich największego wzrostu, który obniża się wraz z wiekiem [Slotnick, Nriagu, 2006]. Palmeri i wsp. dowodzą jednak w swojej pracy, że nie wykazuje się różnic we wzroście paznokcia w zależności od płci, także bez znaczenia jest, u której ręki jest to paznokciec (prawa/lewa) [Palmeri et al., 2000]. Czynniki mechaniczne, zakaźne, dziedziczne, hormonalne czy zaburzenia wywołane

przyswajaniem witamin mogą mieć wpływ na ten proces [Slotnick, Nriagu, 2006; Bochenek, Reicher, 2008]. Wzrost paznokcia uzależniony jest także od długości palców i jest szybszy u ręki dominującej, w czasie ciąży i w cieplejszym klimacie [Slotnick, Nriagu, 2006].

W zależności od szybkości wzrostu i długości pobranej próbki paznokcia, wycinki paznokci u stóp odzwierciedlają ekspozycję, która miała miejsce 12 – 18 miesięcy przed pobraniem próbki [Slotnick, Nriagu, 2006].

2.6. Analiza włosów, paznokci i ich zastosowanie

Monitorowanie stanu odżywienia organizmu pod względem zawartości pierwiastków niezbędnych oraz ocena narażenia na działanie pierwiastków toksycznych jest szczególnie ważna dla ludzkiego zdrowia. Większość metod klinicznych, stosowanych do diagnozowania niedoborów pierwiastków niezbędnych i oceny środowiskowego lub zawodowego narażenia na metale toksyczne, jest oparta na analizie próbek krwi, surowicy/osocza i/lub moczu [Rodrigues et al., 2008]. Jednakże wybór odpowiedniego rodzaju próby badanej zależy od kilku czynników, takich jak toksykokinetyka, wygoda i stopień inwazyjności procedury pobierania próbek oraz możliwość ewentualnego zanieczyszczenia próbki [Rodrigues et al., 2008].

Stężenie metali we włosach i paznokciach odzwierciedla ich średni poziom w organizmie ludzkim, biorąc pod uwagę dłuższy okres narażenia na pierwiastki, w porównaniu do innych płynów ustrojowych [Mehra, Juneja, 2005].

Analiza pierwiastkowa związków toksycznych i elementów niezbędnych we włosach, paznokciach i innych tkankach biologicznych znajduje coraz większe zastosowanie w badaniach związanych z medycyną (także sądową), archeologią i żywieniem [Kumtabtim et al., 2011]. Odkryta 40 lat temu analiza jest wykorzystywana także w toksykologii klinicznej i medycynie pracy. We włosach określa się przede wszystkim zawartość pierwiastków i leków (substancji organicznych, narkotyków, metabolitów nikotyny) [Chojnacka et al., 2010]. Na podstawie ich analizy można ocenić stan zdrowia i odżywienia organizmu [Qayyum, Shah, 2014]. Stanowią także cenne źródło informacji dotyczących narażenia na metale toksyczne, takie jak kadm, ołów, czy arsen. Wiele badań potwierdza występowanie statystycznie istotnych różnic w porównaniu poziomów pierwiastków we włosach grup eksponowanych i nieeksponowanych [Chojnacka et al., 2010].

Niedobór lub nadmiar pierwiastków niezbędnych, takich jak miedź, żelazo, cynk i toksycznych - ołów, rtęć, może świadczyć o rozwoju wielu stanów chorobowych w organizmie. Próbki włosów mogą być używane do retrospektywnego badania zawartości pierwiastków, ze względu na trwałe wbudowanie w stale wzrastającą część włosa [Kumtabtim et al., 2011]. W związku z powyższym badania prowadzone z użyciem włosów mogą dostarczyć cennych informacji na temat stanu zdrowia organizmu, stosowania niektórych leków i obecności wybranych chorób [Szykowska et al., 2009]. Zmiany w składzie chemicznym włosów zależą od wewnętrznych i zewnętrznych zmian zachodzących w ludzkim organizmie. Naukowcy udowodnili niezaprzeczalną zależność pomiędzy korelacjami zachodzącymi z udziałem pierwiastków niezbędnych a stanami chorobowymi (niedokrwistość, drżenie mięśniowe, drgawki) i zaburzeniami metabolicznymi [Koranteng-Addo et al., 2010]. Zawartość pierwiastków we włosach i paznokciach może

różnić się w zależności od regionu geograficznego i panujących w nim warunków naturalnych, wliczając skład gleby, zawartość pierwiastków w wodzie i pożywieniu oraz nawyków żywieniowych [Oyoo-Okoth et al., 2010].

Ze względu na wiele zalet, próbki włosów znajdują szerokie zastosowanie do oceny narażenia człowieka na różne zanieczyszczenia [Rodrigues et al., 2008]. Wybór alternatywnych matryc pozwala na nieinwazyjne procedury poboru materiału [Rodrigues et al., 2008].

Są one pobierane w prosty, niedrogi i nieinwazyjny sposób, mogą być łatwo przechowywane i transportowane do laboratorium w celu przeprowadzenia ich analizy [Rodrigues et al., 2008]. Włosy powinny być pobierane za pomocą ceramicznych nożyczek, najlepiej z okolic tylnego wierzchołka głowy. Konieczne jest pobranie odpowiedniej ilości materiału do badania [Cooper et al., 2012]. Najbardziej odpowiednią próbką są włosy z głowy, natomiast w przypadku ich braku, mogą zostać pobrane również z okolic pachy, brody, czy włosów łonowych [Cooper et al., 2012].

W ludzkich włosach nie zachodzą zmiany związane z okresem ich przechowywania, od czasu pobrania próbki do jej analizy, co stanowi ich dodatkową zaletę [Gil et al., 2011]. Włos rośnie średnio 10 mm na miesiąc i pozwala na długoterminowe monitorowanie aktualnego i występującego w przeszłości narażenia. Zazwyczaj odzwierciedla średnie stężenie będące wynikiem narażenia z okresu ostatnich kilku miesięcy [Gil et al., 2011]. Jednakże zastosowanie włosów jako materiału badawczego ma pewne ograniczenia, takie jak występowanie trudnych do usunięcia, egzogennych zanieczyszczeń [Rodrigues et al., 2008]. Głównym ich źródłem są złogi sebum, pot, pozostałości zanieczyszczonego powietrza czy kosmetyków, produktów farmaceutycznych [Rodrigues et al., 2008]. Wpływ na zawartość metali we włosach może mieć wiek, płeć, kolor i stan włosów, palenie papierosów, czynniki rasowe i etniczne [González-Muñoz et al., 2008; Gil et al., 2011]. Trudności z interpretacją wyników i opracowanie wartości referencyjnych to opisane w literaturze problemy związane z użyciem włosów do oceny zanieczyszczenia środowiskowego [Chojnacka et al., 2010].

Ludzkie włosy i paznokcie analizowane są tymi samymi technikami analitycznymi, co próbki biologiczne stosowane do biomonitorowania zawartości pierwiastków w organizmie i zawodowego narażenia na zanieczyszczenie metalami [Sukumar, Subramanian, 2007].

Do wykrywania pierwiastków śladowych we włosach stosuje się różne techniki analityczne, takie jak atomowa spektrometria fluorescencyjna, atomowa spektrometria absorpcyjna, spektrometria atomowa emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry* – ICP - AES), spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP - MS) [Abdulrahman et al., 2012].

Ludzkie paznokcie, podobnie jak włosy, stanowią wartościowy, alternatywny materiał badawczy, służący do oceny narażenia środowiskowego na metale toksyczne i określenia niedoborów pierwiastków niezbędnych. Zarówno paznokcie dłoni, jak i stóp są coraz częściej wykorzystywanym markerem w badaniach klinicznych. Jest to materiał pobierany w prosty, bezinwazyjny sposób i nie wymaga specjalnych warunków przechowywania, co dodatkowo zwiększa ilość jego zalet [Barbosa et al., 2005; Carneiro et al., 2011; He, 2011]. Paznokcie u stóp, pomimo ograniczonej szybkości wzrostu, mogą odzwierciedlać długotrwałe narażenie na pierwiastki. Wykazano, że średni wzrost paznokcia wśród młodzieży amerykańskiej

wynosił 3,47 mm/miesiąc dla paznokci u rąk oraz 1,62 mm/miesiąc u paznokci stóp [Yaemsiri et al., 2009]. Szybkość wzrostu paznokcia może być także uzależniona od wieku, płci, kondycji zdrowotnej, tempa przemiany materii i innych czynników, takich jak obgryzanie paznokci (onychofagia) [He, 2011].

Poza oceną zawartości pierwiastków w ludzkim organizmie, paznokcie są także użytecznym narzędziem do oceny niektórych stanów chorobowych, takich jak nowotwory, czy choroby sercowo – naczyniowe [He, 2011].

Paznokcie u rąk i stóp mają zdolność kumulowania ksenobiotyków przez dłuższy okres czasu. Ten alternatywny materiał wykorzystywano do celów sądowych, takich jak stwierdzenie zatrucia arsenem, narażenie zawodowe na metale, takie jak ołów u pracowników hut, oraz do oceny narażenia środowiskowego, monitorowania narażenia dzieci na kadm, ołów, cynk, miedź, żelazo i magnez [Palmeri et al., 2000].

Paznokcie jako materiał alternatywny zbudowany z białka bogato-keratynowego, zawierają w swoim składzie minerały i pierwiastki śladowe, które odzwierciedlają ich spożycie i stopień narażenia. Za zalety wykorzystania pierwiastków jako biomarkerów można uznać bezbolesny sposób ich poboru, który może zwiększyć ilość osób biorących udział w badaniach klinicznych prowadzonych z wykorzystaniem tego materiału oraz związane ze sposobem przewożenia i przechowywania, zmniejszenie kosztów analizy [He, 2011].

Ograniczenia w zastosowaniu paznokci jako materiału badawczego w ocenie narażenia na metale dotyczą ich niewielkiej ekspozycji środowiskowej i częstego mycia, związanego z podstawowymi zasadami higieny [He, 2011]. Próbkki paznokci mogą cechować się małą masą, co utrudnia analizę, oraz mogą być zanieczyszczone niektórymi lekami i lakierami [Qayyum, Shah, 2014]. Do zanieczyszczeń pierwiastkowych może dojść także w trakcie obcinania paznokci metalowymi przyrządami [Qayyum, Shah, 2014], dlatego tak ważne jest prawidłowe pobranie próbek. Pacjenci powinni zostać poinformowani o nie obcinaniu paznokci przed użyciem ich do analizy przez okres co najmniej kilku tygodni [He, 2011]. Ważne jest obcinanie paznokci w jak największej ilości, najlepiej zarówno u obu stóp i/lub obu rąk. Wycinki pochodzące od paluchów i kciuków oraz od reszty palców rąk i nóg powinny być przechowywane oddzielnie, ponieważ ramy czasowe ich wzrostu różnią się od siebie [He, 2011]. Paznokcie powinny być umieszczone w kopercie, w temperaturze pokojowej i suchym miejscu [He, 2011].

Do wykrywania metali w paznokciach stosuje się między innymi instrumentalną neutronową analizę aktywacyjną (ang. *instrumental neutron activation analysis* - INAA) oraz spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP - MS) [He, 2011].

3. CEL PRACY

Nowotwory głowy i szyi stanowią bardzo poważny problem zdrowotny nie tylko w Polsce, ale i na świecie. Plasują się na szóstym miejscu pod względem częstotliwości występowania, szacuje się, że do 2020 roku przez ciągły wzrost zachorowań i starzenie się ogółu populacji może dojść do podwojenia się liczby do powyżej miliona osób, natomiast śmiertelność sięgnąć może nawet do pół miliona osób rocznie.

W Polsce liczba nowych zachorowań ciągle rośnie, także śmiertelność z tego powodu jest bardzo wysoka. Na tle krajów europejskich wypada ona bardzo niekorzystnie pod względem statystyk.

Niekwestionowanym czynnikiem ryzyka jest palenie tytoniu i spożywanie alkoholu. Niepokojącym jest fakt, że zdecydowana większość pacjentów stosuje obie używki łącznie, co prowadzi do zwielokrotnienia możliwości wystąpienia nowotworu tej części ciała.

Celem pracy była ocena zaburzeń poziomów pierwiastków niezbędnych (cynk, miedź, magnez, wapń, żelazo, mangan) i metali kancerogennych (kadm, kobalt, chrom VI, ołów) u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, jak również u osób, u których nie zdiagnozowano choroby nowotworowej.

Do badania wykorzystano materiał alternatywny - włosy i paznokcie i podjęto próbę jego porównania z klasycznym materiałem biologicznym - surowicą krwi.

Włosy i paznokcie stanowią bowiem ciągle niedoceniony materiał badawczy, pomimo ich niekwestionowanych zalet. Są ważnym źródłem w ocenie narażenia na pierwiastki niezbędne oraz metale toksyczne.

W pracy założono, że oznaczenie we włosach i paznokciach pierwiastków niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu i metali toksycznych, mogących wywołać poważne szkody w organizmie, pozwoli stwierdzić, czy u pacjentów palących tytoń i spożywających alkohol dochodzi do zaburzenia gospodarki tymi metalami i czy przyczyną jest stosowanie powyższych używek, czy też spowodowane jest to rozwijającym się procesem nowotworowym.

Zastosowana autorska metoda ankietowa miała na celu potwierdzenie częstotliwości i długoletności palenia papierosów i spożywania alkoholu a także miała dostarczyć dodatkowych informacji dotyczących rodzaju stosowanej przez pacjentów diety, stanowiącej istotny czynnik ryzyka u pacjentów z nowotworami głowy i szyi.

W celu realizacji powyższych celów podjęto próbę opracowania odpowiedniej techniki analitycznej, umożliwiającej prawidłowe i rzetelne przeprowadzenie powyższych badań. Objęła ona zarówno etap przygotowania próbek do analizy, jak i późniejszego oznaczania zawartych w nich analitów.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Uchwałą nr 670/08 z dnia 12. czerwca 2008 r. i Uchwałą nr 129/11 z dnia 3. marca 2011 r.

4.1. Materiał i metody

4.1.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i pacjenci Kliniki Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Pacjentami było 63 mężczyzn i 31 kobiet chorych na nowotwory ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego.

Grupę kontrolną stanowili pacjenci Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pacjenci Kliniki Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pacjenci Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz pacjenci Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Pacjentami było 17 mężczyzn i 46 kobiet ze zmianami nienowotworowymi, takimi jak wole guzkowe toksyczne, choroba Graves-Basedowa, przewlekłe zapalenie zatok przynosowych, ucha, migdałków, odczynowe węzły zapalne, uchyłek przetyku, skrzywienie przegrody nosa, polipy nosa i zatok przynosowych, porażenie fałdów głosowych, torbiel zatoki szczękowej oraz pacjenci z chorobami przyzębia i próchnicą zębów.

4.1.2. Informacja dla pacjenta i zgoda na udział w badaniu

Udział pacjentów w badaniach był dobrowolny. Zostali oni poinformowani o istocie i celowości prowadzenia badań. Pacjenci podpisywali zgodę na udział w badaniach, której wyrażenie zostało potwierdzone i datowane w obecności świadka.

Zgodę na udział w badaniu oraz informację dla pacjenta dla grupy nowotworowej i kontrolnej przedstawiono poniżej.

ZGODA NA BADANIA

- Grupa pacjentów z nowotworami:

Tytuł badania: Zmiany poziomu pierwiastków niezbędnych i toksycznych w nowotworach rejonu głowy i szyi

Miejsce badania: Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (SPSK nr 2) / Klinika Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

- Grupa pacjentów kontrolna:

Tytuł badania: Zmiany poziomu pierwiastków niezbędnych i toksycznych – grupa kontrolna

Miejsce badania: Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (SPSK nr 2) / Klinika Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu / Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu / Katedra Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Ja (imię i nazwisko - drukowanymi literami)

.....

Przeczytałam/przeczytałem załączoną informację dla ochotnika i w obecności świadka:

.....

(imię i nazwisko)

wyrażam dobrowolną zgodę na udział w badaniach.

.....

podpis ochotnika

.....

podpis świadka

.....

data

Informacja dla pacjenta

- Grupa pacjentów z nowotworami

Badania są realizowane w ramach projektu badawczego dotyczącego zmian poziomów pierwiastków niezbędnych oraz obecności metali rakotwórczych w materiale biologicznym (surowica, włosy i paznokcie) pobranym od pacjentów z nowotworami rejonu głowy i szyi.

Celem niniejszych badań jest oznaczenie takich pierwiastków jak: cynk, magnez, miedź, żelazo, chrom, kadm i kobalt w materiale biologicznym.

Badaniem zostaną objęci pacjenci leczeni w Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (SPSK nr 2) / Klinice Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

W pierwszym etapie, wśród pacjentów zostaną przeprowadzone badania ankietowe na podstawie wystandaryzowanego arkusza dotyczącego palenia tytoniu, picia alkoholu i zwyczajów żywieniowych. Drugi etap badań obejmować będzie pobranie krwi do badań toksykologicznych i biochemicznych oraz włosów i paznokci do badań toksykologicznych.

Wyniki badań zostaną poddane analizie statystycznej.

Planowane badania dostarczą rzetelnych informacji na temat: ewentualnych zaburzeń gospodarki metalami niezbędnymi w ustroju i obecności metali uznanych za rakotwórcze i ich znaczenia w nowotworach rejonu głowy i szyi.

- Grupa pacjentów kontrolna

Badania są realizowane w ramach projektu badawczego dotyczącego zmian poziomów pierwiastków niezbędnych oraz obecności metali w materiale biologicznym (surowica, włosy i paznokcie) pobranym od pacjentów grupy kontrolnej.

Celem niniejszych badań jest oznaczenie takich pierwiastków jak: cynk, magnez, miedź, żelazo, chrom, kadm i kobalt w materiale biologicznym.

Badaniem zostaną objęci pacjenci leczeni w Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (SPSK nr 2) / Klinice Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu / Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu / Katedrze Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

W pierwszym etapie, wśród pacjentów zostaną przeprowadzone badania ankietowe na podstawie wystandaryzowanego arkusza dotyczącego palenia tytoniu, picia alkoholu i zwyczajów żywieniowych. Drugi etap badań obejmować będzie pobranie krwi do badań toksykologicznych i biochemicznych oraz włosów i paznokci do badań toksykologicznych.

Wyniki badań zostaną poddane analizie statystycznej.

Planowane badania dostarczą rzetelnych informacji na temat: ewentualnych zaburzeń gospodarki metalami niezbędnymi w ustroju i obecności metali toksycznych.

4.1.3. Kwestionariusz ankiety

W badaniu zastosowano metodę ankietową, w której wykorzystano kwestionariusz ankietowy opracowany w Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Przygotowano dwa kwestionariusze – dla grupy badanej, nowotworowej i grupy kontrolnej.

Osoby uczestniczące w badaniu zostały poproszone o odpowiedź na pytania zawarte w kwestionariuszu ankiety, który zamieszczono poniżej.

Część medyczną – dwa pytania, wypełniał lekarz prowadzący.

KWESTIONARIUSZ ANKIETY

Grupa pacjentów z nowotworami:

Uprzejmie proszę o dokładne wypełnienie ankiety, która posłuży badaniom dotyczącym zaburzeń poziomu metali niezbędnych i toksycznych u osób z nowotworami w obrębie głowy i szyi.

KWESTIONARIUSZ ANKIETY – GRUPA KONTROLNA

Grupa pacjentów kontrolna:

Uprzejmie proszę o dokładne wypełnienie ankiety, która posłuży badaniom dotyczącym zaburzeń poziomu metali niezbędnych i toksycznych u pacjentów:

- Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Świącickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Kliniki Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

- Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Właściwą odpowiedź proszę zaznaczyć krzyżykiem "X".

1. Proszę podać swój wiek w latach:

- 20-39
- 40-59
- 60 lub więcej

2. Proszę podać swoją płeć:

- kobieta
- mężczyzna

3. Proszę podać miejsce zamieszkania

- wieś
- miasto poniżej 100 000 mieszkańców
- miasto powyżej 100 000 mieszkańców

4. Proszę podać swoje wykształcenie

- podstawowe
- zasadnicze
- średnie
- wyższe

5. Jeżeli kiedykolwiek paliła/palił Pani/Pan papierosy i zaprzestała/zaprzestał palić, to proszę podać ile papierosów dziennie?

- nigdy nie paliłam/paliłem
- 1-5
- 6-10
- 11-20
- powyżej 20

6. Jeżeli Pani/Pan paliła/palił papierosy i zaprzestała/zaprzestał palić, to proszę podać kiedy Pani/Pan zaprzestała/zaprzestał palić?

- w ostatnim miesiącu
- w ciągu ostatniego roku
- ponad rok temu

7. Czy Pani/Pan obecnie pali papierosy?

- tak
- nie

8. Ile papierosów dziennie Pani/Pan pali?

- nie palę
- 1-5
- 6-10
- 11-20
- powyżej 20

9. Jeżeli kiedykolwiek piła/pił Pani/Pan alkohol i zaprzestała/zaprzestał, to proszę podać jego ilość ^a?

- nigdy nie piłam/piłem
- 1 drink tygodniowo
- jeden drink codziennie
- 2-5 drinków tygodniowo
- powyżej 5 drinków tygodniowo

a – jeden drink = 0,5 l piwa, lampka (100 ml) wina lub mały kieliszek (25 ml) mocnego alkoholu (np. wódka)

10. Jeżeli Pani/Pan piła/pił alkohol ^b i zaprzestała/zaprzestał pić, to proszę podać kiedy?

- w ostatnim miesiącu
- w ciągu ostatniego roku
- ponad rok temu

b – dotyczy osób pijących przynajmniej 1 drink dziennie

11. Czy Pani/Pan obecnie pije alkohol?

- tak
- nie

12. Ile alkoholu pije Pani/Pan dziennie?

- nie piję
- 1 drink tygodniowo
- jeden drink codziennie
- 2-5 drinków tygodniowo
- powyżej 5 drinków tygodniowo

13. Jeżeli pije Pani/Pan alkohol, to jest to

- piwo
- wino
- alkohole wysokoprocentowe (wódka, brandy itp.)

14. Jeżeli pije Pani/Pan alkohol, to jest on

- ciepły
- zimny

15. Czy spożywa Pani/Pan przynajmniej raz w tygodniu?

- tak nie drób
- tak nie wieprzowinę z wyłączeniem boczku i szynki
- tak nie szynkę
- tak nie wątrobę
- tak nie wołowinę
- tak nie płatki kukurydziane
- tak nie kielki pszenicy
- tak nie „owoce morza”

16. Czy przyjmuje Pani/Pan preparaty farmaceutyczne (suplementy diety) zawierające cynk:

- tak
- nie

17. Czy przyjmuje Pani/Pan preparaty wielowitaminowe?

- tak
- nie

18. Czy spożywa Pani/Pan przynajmniej raz w tygodniu?

- tak nie wątrobę wieprzową lub cielęcą
- tak nie jajka
- tak nie kaszę gryczaną lub płatki owsiane
- tak nie sery białe (twarogi)
- tak nie chleb razowy
- tak nie szpinak

19. Czy zażywa Pani/Pan jakiegokolwiek leki stale (pacjenci grupa nowotworowa - niezwiązane z leczeniem choroby nowotworowej)?

- tak
- nie

20. Jeżeli tak, to proszę podać jakie

.....
.....
.....
.....

Ostatnie dwa pytania umieszczono w kwestionariuszu ankiety grupy pacjentów nowotworowych:

21. Czy zażywa Pani jakiegokolwiek leki związane z leczeniem choroby nowotworowej)?

- tak
- nie

22. Jeżeli tak, to proszę podać jakie

.....
.....
.....
.....

DZIĘKUJEMY ZA WYPEŁNIENIE KWESTIONARIUSZA

WYPEŁNIA LEKARZ

1. Proszę podać jednostkę chorobową pacjenta

.....

2. Proszę podać jakie leki przyjmuje pacjent związane z leczeniem?

.....

4.1.4. Materiał biologiczny do badań

Materiałem biologicznym, który użyty został do badań była surowica krwi, włosy i paznokcie pacjentów.

Procedurę przygotowania próbek do analizy prowadzono w następujący sposób:

a) surowica krwi

1. pobrano około 8 ml krwi od pacjentów do probówek z aktywatorem wykrzepiania przez wykwalifikowany personel medyczny
2. w celu uzyskania surowicy, próbki krwi zostały odwirowane przy 4000 obrotów na minutę, w czasie 20 minut
3. po odwirowywaniu, surowicę przyniesiono do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml i przechowywano w temperaturze -80°C
4. próbki surowicy krwi rozmrażano bezpośrednio przed prowadzonym procesem mineralizacji

b) włosy

1. próbki włosów o długości kilku centymetrów pobierano z okolicy potylicy za pomocą ceramicznych nożyczek
2. zwracano uwagę na fakt, aby włosy nie były farbowane - jeżeli taka sytuacja miała miejsce, pobierano kilka porcji z tyłu głowy i odcinano fragmenty włosów z odrostów
3. optymalna naważka próbki wynosiła 0,2 g – włosy pobierano w ilości nieco większej niż wymagana, w celu uwzględnienia ewentualnych strat materiału powstałych w czasie przygotowania próbki do analizy
4. po pobraniu włosy przechowywano w suchym miejscu (w kopercie), w temperaturze pokojowej
5. po procedurze mycia, włosy cięto na krótsze odcinki (0,5 – 1,0 cm), suszono i poddawano procesowi mineralizacji

c) paznokcie

1. próbki paznokci pobierano za pomocą nożyczek ceramicznych od osób niemalujących paznokci, z obu rąk i nóg
2. w zależności od płci, pobierano różne ilości materiału – paznokcie męskie, które są grubsze i większe pobierano w ilości około 2-3 sztuk, paznokcie u kobiet pobierano w większej ilości w taki sposób, by optymalna naważka próbki wynosiła około 0,07 – 0,1g
3. paznokcie przechowywano w suchym miejscu (w kopercie), w temperaturze pokojowej
4. po procedurze mycia paznokcie rozdrabniano, suszono i poddawano mineralizacji

4.1.5. Materiał odniesienia

Wykorzystanymi w celu weryfikacji opracowanych procedur materiałami odniesienia, z certyfikowanymi wartościami oznaczanych analitów, były dla włosów - GBW 07601 (GSH-1) NRCG (Chiny) oraz dla krwi - Seronorm, Trace Elements Whole Blood L-2, SERO

(Norwegia). Materiał odniesienia paznokci był niedostępny na rynku, dlatego w badaniach wykorzystano próbkę paznokci o łącznej masie ok. 3,0 g. Pochodziła ona od kilkunastu, zdrowych ochotników. Próbka została przygotowana przez zmielenie w młynku kulkowym w czasie 10 minut, liczba oscylacji równa 50/s.

W celu wyznaczenia wartości stężeń dla poszczególnych pierwiastków (na podstawie analizy pięciu, niezależnych odważek próbki laboratoryjnej paznokci) zastosowano metodykę ich oznaczenia, za pomocą technik plazmy sprzężonej indukcyjnie. W celu sprawdzenia powtarzalności tych wartości, próbka paznokci analizowana była każdorazowo w trakcie prowadzenia pomiarów.

Zestawienie stosowanych materiałów odniesienia zostało przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie stosowanych materiałów odniesienia z certyfikowanymi wartościami oznaczanych pierwiastków oraz wyznaczone wartości stężeń dla próbki laboratoryjnej paznokci

Nazwa	Materiał odniesienia krwi	Materiał odniesienia włosów	Próbka laboratoryjna paznokci
	Seronorm, Trace Elements Whole Blood L-2	GBW 07601 (GSH-1)	Brak
Producent	SERO (Norwegia)	NRCG (Chiny)	Brak
Analit	Stężenie [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Stężenie [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Stężenie [$\mu\text{g g}^{-1}$]
Ca	14 (8-20)**	2,9 (2,7-3,1)*	754,7 (750,2-759,2)
Mg	15,85 (15,25-16,45) **	360 (330-390)	65,5 (64,7-66,2)
Cu	1201 (1123-1279)	10,6 (9,9-11,3)	3,86 (3,55-4,16)
Fe	343 (339-347) **	54 (48-60)	23,9 (22,8-25,1)
Zn	7680 (7150-8210)	190 (185-195)	53,6 (50,3-57,0)
Mn	32,7 (29,7-35,7)	6,3 (5,8-6,8)	0,258 (0,247-0,269)
Pb	336 (300-372)	8,8 (7,9-9,7)	0,825 (0,743-0,907)
Cd	6,5 (6,1-6,9)	0,11 (0,09-0,13)	0,0235 (0,021-0,026)
Cr	12,4 (9,8-15)	0,37 (0,32-0,42)	0,578 (0,510-0,646)
Co	6 (5,3-6,7)	0,071 (0,063-0,079)	0,0347 (0,032-0,037)

Objaśnienia:

*[mg g^{-1}]; **[mg L^{-1}]

4.1.6. Przygotowanie do badań materiału odniesienia

Zgodnie z instrukcją załączoną do materiału odniesienia krwi, do liofilizowanej krwi ludzkiej Seronorm dodano 3 ml wody i delikatnie mieszano do czasu całkowitego rozpuszczenia. Czynność tą wykonywano za pomocą wytrząsarki, ruchem wahadłowym. Po rozpuszczeniu, materiał odniesienia przechowywano do czasu mineralizacji w szczelnie zamkniętej fiolce w temperaturze -4°C . Przed pobraniem próbki do mineralizacji, krew mieszano.

Liofilizowany materiał odniesienia włosów (około 5,0 g) i próbkę laboratoryjną paznokci (około 0,05 g) suszono w temperaturze 60°C , przez okres minimum 6 godzin. Po doprowadzeniu próbek do stałej masy, do czasu mineralizacji, przechowywano je w eksykatorze.

4.1.7. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

1) mycie i przygotowywanie próbek

- Rotator – mikser Multi Bio RS - 24, firma Biosan, Polska
- Myjka ultradźwiękowa Sonic 33, firma Polsonic, Polska
- Elektroniczna waga analityczna AGN200C, firma Axis, Polska
- Blok grzejny Thermoblock TB - 951, firma JWElectronic, Polska
- Wirówka Centrifuge 5804 R, firma Eppendorf, Niemcy
- System oczyszczania wody Direct Q3 UV, firma Merck Sp. z o.o., Niemcy
- Młynek kulowy z korundową misą mielącą, Pulverisette 23, firma Fritsch GmbH, Niemcy
- Wytrząsarka o ruchu w trzech wymiarach, PS-M3D, Witko, Polska
- Eksykator wypełniony bezwodnym, granulowanym chlorkiem wapnia

2) mineralizacja

- Wysokociśnieniowy mineralizator mikrofalowy – Mars 6, CEM, Matthews, USA, wyposażony w wysokociśnieniowe naczynia XP – 1500 (Rycina 18)



Rycina 18. Wysokociśnieniowy mineralizator mikrofalowy – Mars 6, CEM, Matthews, USA

Źródło: <http://www.cem.com/acid-digestion.html>

3) spektrometr mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie, ICP-MS

- Spektrometr mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie, ICP-MS Mass Spectrometer ELAN DRC-e Axial Field Technology, Perkin Elmer, Niemcy (Rycina 19)



Rycina 19. Spektrometr mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (Spectrometer ELAN DRC-e Axial Field Technology, Perkin Elmer)

Źródło: <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/>

- Spektrometr optyczny ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES) Optical Emission Spectrometer Optima 2100DV, Perkin Elmer, Niemcy (Rycina 20)



Rycina 20. Spektrometr optyczny ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (Optical Emission Spectrometer Optima 2100DV, Perkin Elmer)

Źródło: <http://www.speciation.net/Database/Instruments/PerkinElmer-Inc/Optima-2100-DV-;i185>

4.1.8. Odczynniki i roztwory

- 1% Triton X-100®, stopień czystości >99%, Merck, Niemcy
- Metanol, cz. d. a., Sigma - Aldrich
- Kwas azotowy (V), 65%, Suprapur, Merck, Niemcy
- Woda o specjalnej czystości z procesu odwróconej osmozy
- Kwas azotowy 1%, sporządzony przez odpowiednie rozcieńczenie wodą ze stężonego kwasu azotowego (V)

Wszystkie odczynniki cechowała czystość analityczna.

Roztwory wzorcowe zawierające oznaczane anality:

- Multi-element ICP-MS Calibration Std 3 (10 µg/ml Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ca, Cs, Cr, Co, Cu, Ga, In, Fe, Pb, Li, Mg, Hg, Ni, K, Rb, Se, Ag, Na, Sr, Tl, U, V i Zn w 5% HNO₃), Perkin Elmer, USA
- ICP Multi-element Standard Solution VI, 1000 mg mL⁻¹, Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn, Merck, Niemcy
- Atomic Spectroscopy Solution, Smart Tune Solution Std ELAN & DRC-e, 10 ppb, Ba, Be, Ce, Co, In, Mg, Pb, Rh, U w 1% HNO₃, Perkin Elmer, USA.

Roztwór kontrolny oraz roztwory kalibracyjne zawierające oznaczane anality przygotowano przez rozcieńczenie substancji wzorcowych 1% kwasem azotowym (V).

4.1.9. Tok postępowania

W celu uzyskania wiarygodnych wyników dotyczących zawartości pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach pacjentów z nowotworami głowy i szyi i pacjentów kontrolnych, przeprowadzono odpowiednie procedury analityczne:

- Pobranie materiału biologicznego (podpunkt 4.1.4)
- Przygotowanie surowicy krwi do analizy (podpunkt 4.1.4)
- Przygotowanie włosów i paznokci do analizy – mycie i suszenie (podpunkt 4.1.9.1)
- Mineralizacja włosów i paznokci (podpunkt 4.1.9.2)
- Oznaczanie metali w surowicy krwi, włosach i paznokciach za pomocą technik plazmy sprzężonej indukcyjnie – ICP-OES i ICP-MS (podpunkt 4.1.9.3).

4.1.9.1. Mycie i suszenie próbek włosów i paznokci

Próbki materiałów alternatywnych poddane zostały odpowiedniej procedurze przygotowania do analizy – myciu i suszeniu. Konieczne było usunięcie zewnętrznych zanieczyszczeń, które mogły prowadzić do zafałszowania wyniku analitycznego.

Na podstawie dostępnych danych literaturowych [Sukumar, 2006; Afridi et al., 2011], dokonano opracowania i optymalizacji procedury mycia i suszenia materiału alternatywnego (włosów, paznokci).

Schemat mycia włosów i paznokci przedstawiony został w Tabeli 2.

Tabela 2. Proces mycia próbek włosów i paznokci przed mineralizacją

Etap	Powtórzenie	Ilość [ml]	Roztwór myjący	Stosowane urządzenie	Czas mycia [min.]
I	1	2	1% Triton	Rotator-mixer	20
II	N	2	Woda	Rotator-mixer	3
III	1	2,5	Metanol	Rotator-mixer	5
IV	1	2,5	Metanol	Myjka ultradźwiękowa	15
V	2	2,5	Woda	Rotator-mixer	3

Objaśnienia:

N - krotność powtórzeń przemywania próbek wodą z odwróconej osmozy, do momentu uzyskania klarownego roztworu

Próbki myto w polietylenowych probówkach z korkiem. Umyte próbki przenoszono do naczynek wagowych i odpowiednio suszono.

Na podstawie danych literaturowych przyjęto, że suszenie trwało minimum 6 h w temperaturze 80°C.

Do czasu przeprowadzenia procesu mineralizacji, próbki przechowywano w eksykatorku wypełnionym bezwodnym, granulowanym chlorkiem wapnia.

Przed mineralizacją wyznaczone zostały masy analizowanych próbek metodą „na wysyp”. Polegała ona na zważeniu naczynka wagowego z badaną próbką, a następnie pustego naczynka po wysypaniu jego zawartości do teflonowego naczynia mineralizacyjnego. Na podstawie różnicy między masą pełnego i pustego naczynka wyznaczono masę analizowanej próbki.

4.1.9.2. Mineralizacja włosów i paznokci

Po procesie mycia i suszenia (włosy i paznokcie) oraz po rozmrożeniu próbek surowicy krwi, materiał badany został poddany procesowi mineralizacji.

Etap ten przeprowadzono przy użyciu mineralizatora MARS 6 (CEM-USA). W systemie MARS 6 zastosowano technologię One Touch, która na podstawie typu użytej próbki pozwala na określenie typu i liczby naczyń, temperatury roztwarzania, czasu wzrostu temperatury i wygrzewania oraz mocy wyjściowej promieniowania mikrofalowego. Pełna moc urządzenia generuje promieniowanie mikrofalowe o mocy ok. 1800 W. System kontroli temperatury odbywa się za pomocą dwóch czujników IR, co pozwala na kontrolę i odczyt temperatury w każdym naczyniu. Mineralizacja prowadzona była w teflonowych, wysokociśnieniowych naczyniach typu Xpress.

Na podstawie danych literaturowych [Guo et al., 2007; Szykowska et al., 2009; Unkiewicz - Winiarczyk et al., 2009] opracowano i zoptymalizowano procedurę mineralizacji surowicy krwi, włosów i paznokci.

Do mineralizacji surowicy krwi użyto 0,5 ml materiału, natomiast średnia masa próbki włosów wynosiła 0,2 g, a paznokci 0,1 g.

Jako roztworu mineralizacyjnego użyto stężonego kwasu azotowego (V) – HNO₃ supra pure w ilości 6 ml dla surowicy krwi i 5 ml dla włosów i paznokci.
W Tabeli 3 przedstawiono programy mineralizacyjne dla mineralizatora MARS 6.

Tabela 3. Programy mineralizacyjne dla mineralizatora MARS 6

Program	Krok	I etap		II etap		
		Czas [min.]	Zmienna moc	Czas [min.]	Wykorzystanie stałej, zadeklarowanej mocy 100 [%]	
Surowica Włosy Paznokcie	Mineralizacja	15	Proces narastania temp. do 180°C	10	Utrzymywanie temp. 180°C	Max 1800 W
	Chłodzenie	30	Spadek temp. do 40°C	-	-	-

Po procesie mineralizacji próbki zostały ochłodzone do temperatury pokojowej, a następnie odpędzono z naczyń nagromadzone tlenki azotu.

Uzyskane mineralizaty przenoszono ilościowo do kolbek miarowych o pojemności 25 ml i dopełniano do kreski wodą pochodzącą z procesu odwróconej osmozy. Próbki przechowywano w lodówce, w polietylenowych probówkach o pojemności 50 ml.

4.1.9.3. Oznaczanie metali w surowicy krwi, włosach i paznokciach technikami plazmy sprzężonej indukcyjnie – ICP-OES i ICP-MS

Ze względu na różne poziomy stężenie pierwiastków występujących w próbce, zastosowano dwie techniki oznaczania pierwiastków niezbędnych i toksycznych:

- Oznaczanie metali za pomocą spektrometru optycznego ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES)

Metodę tę wykorzystano do oznaczenia wapnia (Ca) i magnezu (Mg) przy długościach fali odpowiednio $\lambda_{Ca} = 317,933 \text{ nm}$ i $\lambda_{Mg} = 285,213 \text{ nm}$.

Aparat automatycznie sprawdzał ustawienia plazmy dla stosowanych długości fal, do jej generacji użyto argonu o czystości 99,999%.

W Tabeli 4 przedstawiono warunki analizy próbek biologicznych za pomocą ICP-OES.

Tabela 4. Warunki analizy próbek biologicznych – ICP-OES

Parametry pracy spektrometru	Charakterystyka
Rodzaj plazmy	Argonowa
Typ nebulizera	Meinharda
Komora mgielna	Cyklonowa
Moc generatora plazmy (ICP RF Power)	1300 W
Sposób obserwacji plazmy	Aksjalny
Przepływ gazu plazmowego (Plasma Gas Flow)	15 L min. ⁻¹
Przepływ gazu rozpylającego (Nebulizer Gas Flow)	0,8 L min. ⁻¹
Przepływ gazu pomocniczego (Auxiliary Gas Flow)	0,2 L min. ⁻¹
Objętość dozowanej próbki (Sample Uptake Rate)	0,5 mL
Czas dozowania próbki (Flush Delay)	8 s
Ilość powtórzeń	3

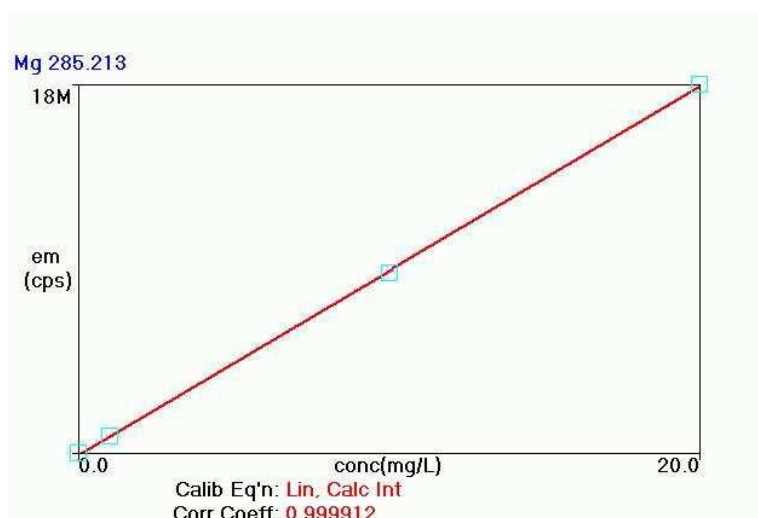
Wykonanie krzywych kalibracyjnych:

- wykreślono w oparciu o roztwory kalibracyjne o stężeniach:

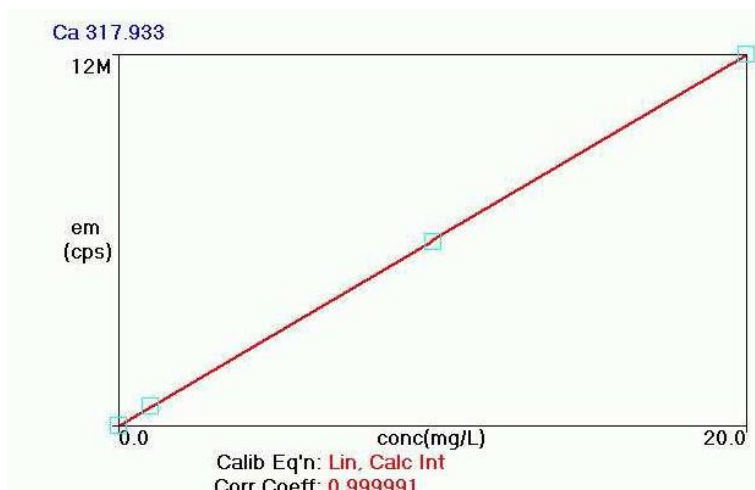
- 1 mg L⁻¹
- 10 mg L⁻¹
- 20 mg L⁻¹.

Otrzymano je rozcieńczając odpowiednio standardowy roztwór ICP Multi-element Standard Solution VI, Merck o stężeniu 1000 mg mL⁻¹ za pomocą 1% kwasu azotowego(V).

Na Rycinach 21 i 22 przedstawiono przykładowe krzywe kalibracyjne dla magnezu i wapnia podawane przez program.



Rycina 21. Przykładowa krzywa kalibracyjna dla magnezu



Rycina 22. Przykładowa krzywa kalibracyjna dla wapnia

Roztwór kontrolny o stężeniu 5 mg L^{-1} , który otrzymano rozcieńczając roztwór standardowy Atomic Spectroscopy Standard, Multi-element ICP-MS Calibration Std 3, Perkin Elmer o stężeniu 10 mg mL^{-1} za pomocą 1% kwasu azotowego (V), służył do kontroli pracy aparatu.

W celu zapobiegnięcia procesowi kontaminacji próbek oraz wyeliminowania efektu pamięci, przez 30 sekund przemywano przewody dozujące próbkę po każdej analizie. Używano do tego 1% roztworu kwasu azotowego (V).

- Oznaczanie metali za pomocą spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS)

Analizę przeprowadzono dla pozostałych pierwiastków fizjologicznych oraz wybranych pierwiastków toksycznych. Wykonano pomiary dla następujących izotopów pierwiastków: manganu (^{55}Mn), żelaza (^{57}Fe), miedzi (^{65}Cu), cynku (^{66}Zn), chromu (^{52}Cr), kobaltu (^{59}Co), kadmu (^{111}Cd) i ołowiu (^{208}Pb).

Plazma argonowa o temperaturze ok. 7000 K stanowiła źródło wzbudzenia w aparacie. Wytworzona została w generatorze typu „free running” 40 MHz z systemem PlasmaLok. Warunki analizy próbek przedstawione zostały w Tabeli 5.

Tabela 5. Warunki pomiarowe próbek biologicznych – ICP-MS

Parametry pracy spektrometru	Charakterystyka
Rodzaj plazmy	Argonowa
Moc generatora plazmy	1270 W
Analizator mas	Kwadrupolowy
Przepływ gazu plazmowego (<i>Plasma Gas Flow</i>)	15 L min. ⁻¹
Przepływ gazu rozpylającego (<i>Nebulizer Gas Flow</i>)	0,99 L min. ⁻¹
Przepływ gazu pomocniczego (<i>Auxiliary Gas Flow</i>)	1,20 L min. ⁻¹
Czas odczytu sygnału	20 s
Czas dozowania próbki (<i>Flush Delay</i>)	10 s
Ilość powtórzeń	3
Ilość odczytów	3
Tryb skanowania (<i>Scan mode</i>)	Dyskretne skanowanie dla wybranych mas (<i>Peak hopping</i>)
Liczba skanów	30
Detektor	Dual (Pulsacyjny, analogowy)

Dynamiczna komora reakcyjna (DRC) została zastosowana jako dodatkowy moduł do oznaczania chromu, w celu wyeliminowania jonów przeszkadzających. W Tabeli 6 przedstawiono warunki pracy spektrometru.

Tabela 6. Warunki analizy próbek biologicznych – ICP DRC MS

Parametry pracy spektrometru	Charakterystyka
Rodzaj plazmy	Argonowa
Moc generatora plazmy	1310 W
Analizator mas	Kwadrupolowy
Przepływ gazu plazmowego (<i>Plasma Gas Flow</i>)	15 L min. ⁻¹
Przepływ gazu rozpylającego (<i>Nebulizer Gas Flow</i>)	0,99 L min. ⁻¹
Przepływ gazu pomocniczego (<i>Auxiliary Gas Flow</i>)	1,20 L min. ⁻¹
Czas odczytu sygnału	20 s
Czas dozowania próbki (<i>Flush Delay</i>)	10 s
Ilość powtórzeń	5
Ilość odczytów	3
Tryb skanowania (<i>Scan mode</i>)	Dyskretne skanowanie dla wybranych mas (<i>Peak hopping</i>)
Liczba skanów	20
Gaz reakcyjny	Metan
Detektor	Dual (Pulsacyjny, analogowy)

W celu sprawdzenia poprawności działania urządzenia i czułości metody, za każdym razem, przed rozpoczęciem pomiarów, przeprowadzono test aparatury. Posłużyła do tego analiza roztworu Smart Tune Solution Std ELAN & DRC-e, Niemcy, zawierającego w swoim składzie pierwiastki bar (Ba), beryl (Be), cer (Ce), kobalt (Co), ind (In), magnez (Mg), ołów (Pb), rod (Rh) i uran (U) o stężeniu 10 ppb każdy, w 1% kwasie azotowym (V).

Liczba zliczeń dla trzech pierwiastków: magnezu (Mg), indu (In) oraz uranu (U) oraz stosunek zliczeń dla podwójnie naładowanych jonów baru Ba^{2+} i tlenku ceru CeO stanowiły podstawę oceny czułości metody.

Normę stanowiły stosunki Ba^{2+}/Ba i CeO/Ce, które nie powinny przekraczać 3%. Prawidłowe wartości dla pierwiastków powinny wynosić: dla Mg > 50000; In > 250000, U > 200000 zliczeń/10 ppb. Jeżeli wartości te nie zostały osiągnięte, przeprowadzano optymalizację układu. W pierwszej kolejności sprawdzano przepływ gazu pomocniczego i gazu w nebulizerze oraz moc generatora plazmy. Wyniki zapisywano za pomocą raportu dziennego z walidacji przyrządu pomiarowego (ang. *Daily Performance Report*).

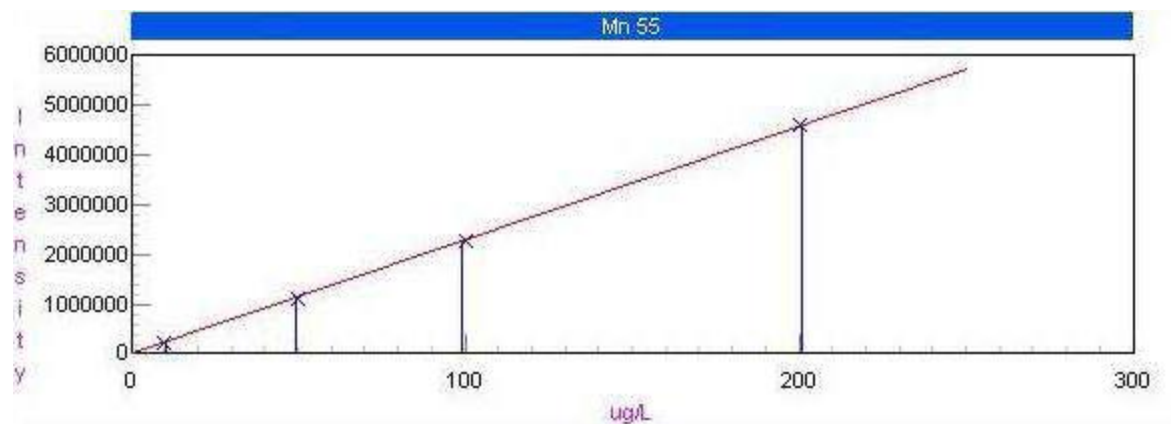
W oparciu o roztwory kalibracyjne o stężeniach:

- $10 \mu\text{g L}^{-1}$
- $50 \mu\text{g L}^{-1}$
- $100 \mu\text{g L}^{-1}$
- $200 \mu\text{g L}^{-1}$

wykreślono krzywą kalibracyjną dla oznaczanych pierwiastków.

W tym celu dokonano rozcieńczenia roztworu standardowego Atomic Spectroscopy Standard, Multi-element ICP-MS Calibration Std 3, Perkin Elmer o stężeniu 10 mg mL^{-1} za pomocą 1% kwasu azotowego (V).

Na Rycinie 23 przedstawiono przykładową krzywą kalibracyjną dla manganu podawaną przez program.



Rycina 23. Krzywa kalibracyjna – przykładowy wykres dla manganu

Wzorzec o stężeniu $50 \mu\text{g L}^{-1}$ otrzymany poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu standardowego ICP Multielement Standard Solution VI, Merck o stężeniu 1000 mg mL^{-1} za pomocą 1% kwasu azotowego (V), wykorzystano do kontroli pomiarów.

Krzywa kalibracyjna, wykonana w przypadku oznaczeń chromu (użycie komory reakcyjnej DRC), wykreślona została na podstawie roztworów kalibracyjnych o stężeniach:

- $1 \mu\text{g L}^{-1}$
- $10 \mu\text{g L}^{-1}$

- $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Otrzymano je poprzez rozcieńczenie roztworu standardowego Atomic Spectroscopy Standard, Multi-Element ICP-MS Calibration Std 3, Perkin Elmer o stężeniu 10 mg mL^{-1} za pomocą 1% kwasu azotowego (V).

Roztwór o stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$, sporządzony poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu standardowego ICP Multi-element Standard Solution VI, Merck o stężeniu 1000 mg mL^{-1} za pomocą 1% kwasu azotowego (V), został zastosowany jako roztwór kontrolny.

Przewody dozujące były przez kilkadziesiąt sekund przemywane za pomocą 1% roztworu kwasu azotowego (V) przed analizą każdej próbki.

4.2. Walidacja metody

Proces walidacji metody posłużył do wyznaczenia wartości następujących parametrów walidacyjnych:

- dokładność metody
- precyzja metody
- granica oznaczalności metody
- granica wykrywalności metody
- zakres liniowości

Proces ten pozwolił na weryfikację opracowanych metod oznaczania wybranych pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych w wykorzystanych materiałach biologicznych (surowica krwi, włosy, paznokcie).

Parametry walidacyjne zostały wyznaczone przy wykorzystaniu najwyższej jakości materiałów certyfikowanych krwi Seronorm, Trace Elements Whole Blood L-2 oraz włosów GBW 07601 (GSH-1).

4.2.1. Dokładność metody

Stopień zgodności pomiędzy średnią wartością z serii pomiarowej, a wartością rzeczywistą określono jako dokładność (ang. *Accuracy*).

Obliczono błąd względny (RE), który oszacowano porównując dokładność wyników uzyskanych za pomocą analizy materiału odniesienia krwi i włosów zawierających certyfikowane wartości oznaczanych analitów oraz wyników uzyskanych z wykorzystaniem opracowanej metody oznaczania pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych.

Wykonano trzy, równoległe oznaczenia analitów dla próbek materiału odniesienia w jednej serii pomiarowej.

W Tabelach 7 i 8 przedstawiono wartości błędu względnego dla krwi i włosów.

Tabela 7. Wyznaczone wartości błędu względnego (RE) dla materiału odniesienia krwi

Analit	Certyfikowane wartości stężeń [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Wyznaczone wartości stężeń [$\mu\text{g L}^{-1}$] (n=3)	RE [%]
Ca*	14 (8-20)	16,7 (16,5-17,0)	19,82
Mg*	15,85 (15,25-16,45)	17,61 (16,02-19,37)	11,64
Fe*	343 (339-347)	344 (324-364)	0,42
Cu	1201 (1123-1279)	1235 (1178-1292)	2,89
Zn	7680 (7150-8210)	7138 (7063-7213)	-7,05
Mn	32,7 (29,7-35,7)	29,7 (26,8-32,7)	-8,88
Co	6 (5,3-6,7)	5,7 (5,3-6,1)	-4,02
Cr	12,4 (9,8-15)	12,7 (12,6-12,8)	3,09
Cd	6,5 (6,1-6,9)	6,3 (5,3-7,2)	-2,78
Pb	336 (300-372)	378 (259-496)	12,53

Objaśnienia:

*[mg L^{-1}]

Tabela 8. Wyznaczone wartości błędu względnego (RE) dla materiału odniesienia włosów

Analit	Certyfikowane wartości stężeń [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Wyznaczone wartości stężeń [$\mu\text{g g}^{-1}$] (n=3)	RE [%]
Ca	2900 (2700-3100)	2840 (2746-2934)	-2,05
Mg	360 (330-390)	364 (355-374)	1,27
Fe	54 (48-60)	53 (52-54)	-0,82
Cu	10,6 (9,9-11,3)	10,7 (10,6-10,9)	1,59
Zn	190 (185-195)	191 (187-195)	0,66
Mn	6,3 (5,8-6,8)	6,4 (6,3-6,5)	2,60
Co	0,071 (0,063-0,079)	0,072 (0,07-0,074)	1,83
Cr	0,37 (0,32-0,42)	0,39 (0,33-0,45)	5,69
Cd	0,11 (0,09-0,13)	0,11 (0,10-0,11)	3,71
Pb	8,8 (7,9-9,7)	8,57 (8,53-8,62)	-2,56

W przypadku krwi najmniejszą wartość błędu względnego wykazano dla żelaza (RE = 0,42%), natomiast największy błąd względny uzyskano dla wapnia (RE = 19,82%).

Dla włosów, błąd względny miał najwyższą wartość w przypadku chromu (RE = 5,69%), natomiast najniższy błąd względny charakteryzował pomiary dla cynku (RE = 0,66%).

Zastosowane metody pozwoliły na oznaczenie z dobrą lub zadowalającą dokładnością pierwiastki niezbędne i metale toksyczne w surowicy krwi i we włosach.

4.2.2. Precyzja metody

Wyznaczono powtarzalność wyników uzyskanych w poszczególnych seriach pomiarowych danej próbki w tych samych warunkach doświadczalnych określaną jako precyzja (ang. *Precision*). Została ona wyrażona za pomocą odchylenia standardowego pojedynczego wyniku (SD) oraz współczynnika zmienności (CV).

Wyznaczono zawartość poszczególnych metali dla próbek certyfikowanych materiałów włosów oraz krwi w oparciu o oznaczenie analitów dla danej próbki w trzech seriach pomiarowych. Wyznaczone wartości parametrów walidacyjnych – odchylenia

standardowego pojedynczego wyniku i współczynnika zmienności zostały przedstawione w Tabeli 9 dla krwi, włosów oraz próbki laboratoryjnej paznokci.

Tabela 9. Wartości odchylenia standardowego oraz współczynniki zmienności dla poszczególnych analitów zawartych w materiale odniesienia krwi, włosów oraz w próbce laboratoryjnej paznokci

Analit	Materiał odniesienia krwi		Materiał odniesienia włosów		Próbka laboratoryjna paznokci	
	±SD [µg L ⁻¹]	CV [%]	±SD [µg g ⁻¹]	CV [%]	±SD [µg g ⁻¹]	CV [%]
Ca	0,177*	1,03	6,82	0,28	4,505	0,59
Mg	0,138*	0,71	8,20	2,16	0,749	1,14
Fe	3,186*	0,89	2,57	5,02	1,153	4,81
Cu	0,301	0,02	0,095	0,88	0,305	7,88
Zn	0,082*	1,18	3,22	1,66	3,357	6,25
Mn	11,621	2,60	0,082	1,44	0,011	7,14
Co	0,764	4,22	0,0005	0,68	0,002	6,71
Cr	0,089	0,69	0,015	6,29	0,068	8,82
Cd	0,351	6,23	0,003	2,58	0,002	10,00
Pb	1,375	0,67	0,063	0,75	0,082	9,92

Objaśnienia:

*[mg L⁻¹]

4.2.3. Granica oznaczalności (LOQ) i wykrywalności metody (LOD)

Granice oznaczalności (LOQ) i wykrywalności (LOD) metody dla poszczególnych pierwiastków wyznaczono analizując roztwór 1% kwasu azotowego (V). Obliczono wartość odchylenia standardowego dla poszczególnych pierwiastków, którego wartość uzyskano po przeprowadzeniu dziesięciu niezależnych pomiarów dla dziesięciu niezależnie przygotowanych próbek. Odpowiednio 3-krotna i 10-krotna wartość odchylenia standardowego odpowiadała wartościom granic wykrywalności i oznaczalności. W Tabeli 10 przedstawiono wyznaczone wartości LOQ i LOD.

Tabela 10. Wartości granicy oznaczalności i wykrywalności dla poszczególnych analitów

Parametr walidacyjny (n = 10)	Wartość parametru [µg L ⁻¹]									
	Ca	Mg	Cu	Fe	Zn	Mn	Co	Cr	Cd	Pb
LOQ	0,054*	0,009*	0,041	0,687	0,218	0,025	0,012	0,023	0,015	0,021
LOD	0,016*	0,003*	0,012	0,206	0,065	0,007	0,004	0,007	0,004	0,006

Objaśnienia:

*[mg L⁻¹]

Uzyskane wartości są wystarczające do wykorzystania opracowanych procedur do oznaczania wybranych pierwiastków niezbędnych i toksycznych.

4.2.4. Zakres zależności kalibracyjnej

W oparciu o wykresy kalibracyjne wyznaczono zakres zależności kalibracyjnej (ang. *Range of calibration*). Uzyskano wymaganą dokładność, powtarzalność i liniowość oznaczenia wybranych pierwiastków.

Technika ICP-MS:

- wykonano pomiary dla próbek roztworów wzorcowych na czterech poziomach stężeń
- jako roztwory kalibracyjne użyto roztwory standardowe o stężeniach:

- 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 50 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Dla chromu krzywa kalibracyjna składała się z roztworów o stężeniach:

- 1 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Technika ICP-OES:

- krzywa kalibracyjna składała się z trzech punktów
- użyto roztwory wzorcowe o stężeniach:

- 1 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
- 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Za górną granicę zakresu liniowości przyjęto najwyższe stężenie wzorca z zachowaniem współczynnika determinacji $R^2 > 0,999$, za dolną wyznaczoną wcześniej granicę oznaczalności.

W Tabeli 11 przedstawiono wyznaczone liniowe zakresy pomiarowe.

Tabela 11. Zakres zależności kalibracyjnej dla poszczególnych analitów

Zakres liniowości [$\mu\text{g L}^{-1}$]									
Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	Co	Cr	Cd	Pb
0,054-	0,009-	0,687-	0,041-	0,218-	0,025-	0,012-	0,023-	0,015-	0,021-
20,000*	20,000*	200,000	200,000	200,000	200,000	200,000	20,000	200,000	200,000

Objaśnienia:

*[mg L^{-1}]

Uzyskano wymaganą dokładność i precyzję oznaczania w wyznaczonym zakresie zależności kalibracyjnej.

4.3. Metody statystyczne i chemometryczne – zastosowane testy

Pierwszym etapem analizy danych przeprowadzonych na podstawie wyników uzyskanych dla grupy pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz grupy kontrolnej było przeprowadzenie badań ankietowych. Pytania dotyczyły podstawowych danych personalnych pacjentów, sposobu prowadzonego stylu życia – palenia tytoniu, spożywania alkoholu oraz rodzaju stosowanej diety. Wyniki badań ankietowych poprzedziły statystyczną i chemometryczną ocenę wyników.

W celu wykrycia różnic pomiędzy omawianymi grupami, przeprowadzono analizę porównawczą pomiędzy stężeniami pierwiastków zawartymi w poszczególnych materiałach. Pierwiastkowa analiza ilościowa została przeprowadzona dla próbek surowicy krwi, włosów i paznokci. Na podstawie otrzymanych wyników analiz wyznaczono podstawowe parametry analityczne dla każdej badanej grupy osobno – średnie stężenia poszczególnych metali w surowicy krwi, włosach i paznokciach, ich zakres oraz odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach oraz zaprezentowano na rycinach, porównując kolejno średnie stężenia pierwiastków w poszczególnych materiałach pomiędzy pacjentami z danym rodzajem nowotworu a grupą kontrolną.

Statystyczną ocenę różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w surowicy krwi, we włosach oraz w paznokciach, w poszczególnych grupach pacjentów z chorobą nowotworową oraz w grupie kontrolnej, przeprowadzono w pierwszej kolejności za pomocą testów normalności rozkładu zmiennej - test W Shapiro - Wilka oraz Kołmogorowa - Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Założenie normalności nie zostało spełnione w przypadku wszystkich pierwiastków w badanych grupach, więc do porównania średnich stężeń pomiędzy dwoma grupami zastosowano nieparametryczny test U Manna - Whitney'a. We wszystkich analizach za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p \leq 0,05$. Poniżej tej wartości rezultat oceniano jako statystycznie istotny.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w surowicy krwi, we włosach i paznokciach, pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów. W tym celu przeprowadzono nieparametryczną analizę wariancji – test ANOVA rang Kruskala – Wallisa (dla wszystkich badanych materiałów) oraz test Dunna (dla surowicy krwi).

Następnym krokiem było przeprowadzenie analizy skupień. Miało to na celu sprawdzenie, czy uzyskane dane otrzymane w wyniku analizy surowicy krwi, włosów i paznokci, pobranych od osób z różnymi nowotworami głowy i szyi oraz osób zdrowych, umożliwiają jednoznaczne rozróżnienie obydwu tych grup. Przed analizą dane zostały poddane autoskalowaniu, a ich grupowanie przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda. Za miarę odległości między skupieniami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa.

Wykonano także analizę dyskryminacyjną we wszystkich badanych materiałach, której przeprowadzenie miało na celu zróżnicowanie pacjentów chorujących na pięć rodzajów nowotworu i grupy osób zdrowych. Analiza ta miała także doprowadzić do wskazania metali mających największy wkład w opracowany model.

5. WYNIKI

5.1. Analiza wyników badań ankietowych

Palenie tytoniu i spożywanie alkoholu to dwa główne czynniki determinujące powstawanie nowotworów głowy i szyi. Badania naukowe potwierdziły, że u osób stosujących obie używki równocześnie ryzyko choroby jest z wielokrotnie. Innym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie nowotworów tych części ciała jest nieodpowiednia dieta – zbyt mała podaż warzyw i owoców.

Badania ankietowe, przeprowadzone wśród pacjentów grupy kontrolnej oraz pacjentów z nowotworami głowy i szyi miały na celu zweryfikowanie indywidualnych preferencji respondentów oraz predyspozycji do stosowania używek. Podjęto próbę sprawdzenia, w jaki sposób powiązane są poziomy pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych z prowadzonym trybem życia. Analizując wyniki ankietowe zauważono, że nie wszyscy pacjenci odpowiedzieli na cały zestaw pytań zawartych w kwestionariuszu ankiety. Przy obliczaniu wartości odsetka osób, wzięto pod uwagę tylko tę grupę, która udzieliła odpowiedzi na zadane pytanie.

Pacjenci odpowiadali na pytania dotyczące danych personalnych, takich jak wiek, miejsce zamieszkania, wykształcenie a także rodzaj i częstotliwość stosowanych używek oraz sposób odżywiania. Bardzo istotnymi w ocenie narażenia na powstawanie nowotworów głowy i szyi były pytania dotyczące spożywania alkoholu oraz palenia tytoniu. Wyniki przedstawione zostały w tabelach poniżej.

W Tabeli 12 przedstawiono dane dotyczące płci, wieku, miejsca zamieszkania i rodzaju wykształcenia u pacjentów grupy kontrolnej.

Tabela 12. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów grupy kontrolnej

GRUPA KONTROLNA	
n (%)	
WIEK n = 63	20 – 39 lat: 12 (19)
	40 – 59 lat: 18 (29)
	powyżej 60 lat 33 (52)
PŁEĆ n = 63	Kobieta 46 (73)
	Mężczyzna 17 (27)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA n = 62	Wieś 18 (29)
	Miasto < 100 000 mieszkańców 24 (39)
	Miasto > 100 000 mieszkańców 20 (32)
WYKSZTAŁCENIE n = 62	Podstawowe 12 (19)
	Zasadnicze 11 (18)
	Średnie 20 (32)
	Wyższe 19 (31)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Ponad połowa pacjentów grupy kontrolnej deklarowała, że nigdy nie paliła papierosów (31 osób – 53%). Siedem (12%) osób przyznało, że ilość papierosów wypalana w przeszłości wynosiła od 1 – 5 papierosów dziennie, dziewięć osób (15%) wypalało 6 – 10 papierosów dziennie, sześć osób (10%) przyznało się do wypalania 11 – 20 papierosów dziennie i taka sama ilość pacjentów grupy kontrolnej wypalała powyżej 20 papierosów dziennie.

Pacjenci, którzy w przeszłości wypalali papierosy przyznali, że zaprzestali palenia w czasie ostatniego miesiąca – dwie osoby (8%), w ciągu ostatniego roku – pięć osób (21%), ponad rok temu – siedemnaście osób (71%).

Zdecydowana większość pacjentów – 52 osoby (84%) przyznała, że obecnie nie pali tytoniu. Do nałogu przyznało się 10 osób (16%). Osoby palące w chwili obecnej przyznały, że wypalają dziennie: od 6 – 10 papierosów (3 osoby – 5%), 11 – 20 papierosów (5 osób – 8%), powyżej 20 papierosów (2 osoby – 3%).

Na pytania dotyczące ilości spożywanego alkoholu w przeszłości, pacjenci odpowiedzieli w następujący sposób:

- 26 (53%) osób nigdy nie piło alkoholu
- jeden drink tygodniowo spożywało 15 osób (31%)
- jeden drink codziennie wypijała tylko jedna osoba (2%)
- 2 – 5 drinków tygodniowo – cztery osoby (8%)
- powyżej 5 drinków tygodniowo – trzy osoby (6%).

Na pytanie dotyczące okresu zaprzestania spożywania alkoholu odpowiedzieli zaledwie 8 osób badanych. Do zaprzestania spożywania alkoholu w ostatnim miesiącu przyznało się dwóch (25%) respondentów, w ciągu ostatniego roku alkohol przestało spożywać trzech (37,5%) respondentów i taka sama ilość pacjentów nie spożywa alkoholu od ponad roku.

Zdecydowana większość pacjentów – 43 (77%) osoby nie piją obecnie alkoholu, natomiast 13 (23%) osób przyznało się do spożywania alkoholu w chwili obecnej. Na pytanie dotyczące ilości spożywanego alkoholu respondenci odpowiedzieli w następujący sposób:

- 39 (72%) pacjentów nie pije alkoholu
- jeden drink tygodniowo spożywa 10 (18%) osób
- jeden drink codziennie wypijają dwie (4%) osoby
- dwie (4%) osoby przyznały się do spożywania 2 – 5 drinków tygodniowo
- powyżej 5 drinków tygodniowo wypija jedna osoba (2%).

W kwestionariuszu ankiety znalazły się również pytania dotyczące rodzaju spożywanego alkoholu – na to pytanie odpowiedzi udzieliły 33 osoby. Największe spożycie odnotowano dla wina – 17 (52%) osób, następnie piwa – 14 osób (42%), natomiast najmniej pacjentów przyznało się do spożywania wódki – 8 osób (24%). W tej grupie pacjentów znalazły się trzy osoby, które przyznały się do spożywania wszystkich rodzajów wymienionego alkoholu. Chętniej spożywany był alkohol zimny – 26 (81%) osób, niż ciepły – 6 (19%) osób.

W kwestionariuszu ankiety umieszczono pytania dotyczące rodzaju spożywanej diety. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13.

Zdecydowana większość pacjentów z grupy kontrolnej spożywa przynajmniej raz w tygodniu drób (57 osób – 93%), szynkę (55 osób – 93%) oraz jajka (57 osób – 93%). Bardzo mała liczba osób spożywa natomiast kielki (2 osoby – 5%) oraz owoce morza

(9 osób - 20%). Pacjenci spożywają również w małych ilościach wątrobę (10 osób – 23%), wołowinę (14 osób – 31%) oraz szpinak (12 osób – 24%).

Tabela 13. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów grupy kontrolnej

GRUPA KONTROLNA – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 61	Tak 57 (93) Nie 4 (7)
WIEPRZOWINA n = 53	Tak 36 (68) Nie 17 (32)
SZYNKA n = 59	Tak 55 (93) Nie 4 (7)
WĄTROBA n = 43	Tak 10 (23) Nie 33 (77)
WOŁOWINA n = 45	Tak 14 (31) Nie 31 (69)
PŁATKI KUKURYDZIANE n = 47	Tak 20 (43) Nie 27 (57)
KIEŁKI PSZENICY n = 41	Tak 2 (5) Nie 39 (95)
OWOCE MORZA n = 45	Tak 9 (20) Nie 36 (80)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIEŁĘCA n = 44	Tak 6 (14) Nie 38 (86)
JAJKA n = 61	Tak 57 (93) Nie 4 (7)
KASZA GRYCZANA LUB PŁATKI OWSIANE n = 49	Tak 24 (49) Nie 25 (51)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 62	Tak 60 (97) Nie 2 (3)
CHLEB RAZOWY n = 59	Tak 43 (73) Nie 16 (27)
SZPINAK n = 51	Tak 12 (24) Nie 39 (76)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Pacjentów grupy kontrolnej poproszono również o odpowiedź na pytanie dotyczące przyjmowania suplementów diety zawierających cynk oraz preparatów wielowitaminowych. Tylko sześć osób (10%) przyjmowało preparaty z cynkiem, do przyjmowania substancji witaminowych przyznało się 20 osób (34%).

W Tabeli 14 przedstawiono dane dotyczące płci, wieku, miejsca zamieszkania i rodzaju wykształcenia pacjentów z nowotworami ślinianek.

Tabela 14. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami ślinianek

NOWOTWÓR ŚLINIANEK (n = 34)	
n (%)	
WIEK	20 – 39 lat: 6 (18)
	40 – 59 lat: 17 (50)
	powyżej 60 lat 11 (32)
PŁEĆ	Kobieta 17 (50)
	Mężczyzna 17 (50)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA	Wieś 20 (59)
	Miasto < 100 000 mieszkańców 9 (26)
	Miasto > 100 000 mieszkańców 5 (15)
WYKSZTAŁCENIE	Podstawowe 4 (12)
	Zasadnicze 9 (26)
	Średnie 17 (50)
	Wyższe 4 (12)

Objaśnienia:

n- liczba osób

Na pytania dotyczące palenia papierosów w przeszłości, sześć (19%) osób odpowiedziało, że wypalało 1 – 5 papierosów dziennie, u trzech (9%) osób ilość ta wynosiła od 6 – 10 papierosów dziennie. Większą ilość papierosów (11 – 20 sztuk) wypalało osiem (25%) osób, natomiast powyżej 20 sztuk papierosów – cztery (13%) osoby. Nigdy nie paliło jedenaście (34%) osób.

W ostatnim miesiącu z nałogu zrezygnowały dwie (12%) osoby, w ciągu ostatniego roku trzy (19%) osoby, a ponad rok temu palić przestało jedenaście (69%) osób.

Obecnie papierosy pali osiem (25%) osób, 24 (75%) osoby, które odpowiedziały na to pytanie, nie są palaczami tytoniu. Największa ilość osób (19%) palących, chorujących na nowotwór ślinianek, wypala od 11 – 20 papierosów dziennie.

Na pytania dotyczące ilości spożywanego alkoholu w przeszłości osiem (35%) osób odpowiedziało, że nigdy nie piło, taka sama ilość przyznała się do spożywania jednego drinka tygodniowo. Tylko dwie (9%) osoby spożywały jeden drink codziennie, natomiast pięć (22%) osób wypijało 2 – 5 drinków tygodniowo. Tylko siedem osób odpowiedziało na pytanie dotyczące czasu zaprzestania spożywania napojów alkoholowych – trzy osoby przestały spożywać alkohol w ostatnim miesiącu, cztery osoby ponad rok temu.

Obecnie alkohol pije 11 (35%) osób, 20 (65%) osób nie spożywa alkoholu. Osoby pijące przyznały się do spożywania:

- jednego drinka tygodniowo – trzy (10%) osoby
- jednego drinka codziennie – dwie (7%) osoby
- 2 – 5 drinków tygodniowo – sześć (20%) osób.

Na pytanie dotyczące rodzaju spożywanego alkoholu odpowiedziało 17 osób – najbardziej popularnym było piwo, wino i wódka, preferowane przez podobną liczbę osób (siedem – 41%). Zdecydowana większość respondentów preferowała ciepły alkohol, w porównaniu do zimnego.

Ważną część kwestionariusza ankiety stanowiły pytania dotyczące rodzaju spożywanej diety. Największa ilość osób w grupie pacjentów w nowotworem ślinianek stosuje w swojej codziennej diecie drób (31 osób – 97%), szynkę (29 osób – 94%), jajka (31 osób – 94%) oraz białe sery (34 osoby – 100%). Najrzadziej respondenci spożywali kielki (3 osoby – 15%) oraz wątrobę wieprzową lub cielęcą (3 osoby - 12%).

W Tabeli 15 przedstawiono szczegółowe dane dotyczące diety stosowanej przez pacjentów z nowotworem ślinianek.

Tabela 15. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworami ślinianek

NOWOTWÓR ŚLINIANEK – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 32	Tak 31 (97) Nie 1 (3)
WIEPRZOWINA n = 29	Tak 24 (83) Nie 5 (17)
SZYNKA n = 31	Tak 29 (94) Nie 2 (6)
WĄTROBA n = 21	Tak 6 (29) Nie 15 (71)
WOŁOWINA n = 22	Tak 7 (32) Nie 15 (68)
PŁATKI KUKURYDZIANE n = 26	Tak 14 (54) Nie 12 (46)
KIELKI PSZENICY n = 20	Tak 3 (15) Nie 17 (85)
OWOCE MORZA n = 22	Tak 8 (36) Nie 14 (64)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIELEĆCA n = 24	Tak 3 (12) Nie 21 (88)
JAJKA n = 33	Tak 31 (94) Nie 2 (6)
KASZA GRYCZANA LUB PŁATKI OWSIANE n = 28	Tak 21 (75) Nie 7 (25)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 34	Tak 34 (100) Nie 0 (0)
CHLEB RAZOWY n = 30	Tak 25 (83) Nie 5 (17)
SZPINAK	Tak 5 (21) Nie 19 (79)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Zdecydowana większość – 30 (94%) osób nie stosuje suplementów diety zawierających cynk, natomiast 11 osób (34%) osób stosuje preparaty wielowitaminowe. Składników takich w swojej diecie nie używa 21 (66%) osób.

Kolejną grupą, wśród której przeprowadzone zostało badanie ankietowe, byli pacjenci z nowotworem gardła. Dane personalne dotyczące wieku, płci, miejsca zamieszkania i rodzaju wykształcenia przedstawione zostały w Tabeli 16.

Tabela 16. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami gardła

NOWOTWÓR GARDŁA (n = 13)	
n (%)	
WIEK	20 – 39 lat: 0 (0)
	40 – 59 lat: 6 (46)
	powyżej 60 lat 7 (54)
PŁEĆ	Kobieta 2 (15)
	Mężczyzna 11 (85)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA	Wieś 7 (54)
	Miasto < 100 000 mieszkańców 5 (38)
	Miasto > 100 000 mieszkańców 1 (8)
WYKSZTAŁCENIE	Podstawowe 0 (0)
	Zasadnicze 8 (62)
	Średnie 5 (38)
	Wyższe 0 (0)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Wśród pacjentów chorujących na nowotwór gardła, którzy odpowiedzieli na pytanie dotyczące palenia tytoniu w przeszłości, nie znalazła się żadna osoba, która byłaby wolna od nałogu. Najwięcej pacjentów – siedmioro (64%) paliło w przeszłości od 11 – 20 papierosów dziennie, dwie (18%) osoby wypalały 6 – 10 papierosów dziennie, a odpowiednio jedna (9%) osoba paliła od 1 – 5 papierosów oraz powyżej 20 papierosów dziennie.

Wszystkie osoby potwierdziły fakt zerwania z nałogiem – dwie (15%) osoby zaprzestały palenia papierosów w ostatnim miesiącu, taka sama ilość pacjentów w ciągu ostatniego roku, natomiast dziewięciu (69%) pacjentów papierosów nie pali od ponad roku. Pomimo faktu, że wszyscy pacjenci z nowotworem gardła przyznali, że obecnie nie palą tytoniu, trzy (23%) osoby twierdziły, że wypalają 11 – 20 papierosów dziennie. Prawdopodobnie było to związane ze złym zrozumieniem pytania.

Na pytanie dotyczące ilości spożywanego alkoholu w przeszłości, pacjenci odpowiedzieli w następujący sposób:

- dwie (18%) osoby nigdy nie spożywały alkoholu
- jedna (9%) osoba spożywała jednego drinka tygodniowo
- jedna (9%) osoba spożywała jednego drinka codziennie
- trzy (27%) osoby wypijały od 2 – 5 drinków tygodniowo
- cztery (36%) osoby przyznały, że spożywają powyżej 5 drinków tygodniowo.

Tylko sześć osób odpowiedziało na pytanie dotyczące zaprzestania spożywania alkoholu – trzy (50%) osoby uczyniły to w ostatnim miesiącu, jedna (17%) w ciągu ostatniego roku, natomiast dwie (33%) od ponad roku nie piją alkoholu.

Obecnie alkohol piją cztery (31%) osoby, dziewięć (69%) osób twierdzi, że jest niepijącą. Ciekawym był jednak fakt, że w kolejnym pytaniu już sześć osób przyznało się do picia alkoholu – 2 – 5 drinków tygodniowo wypijały trzy (23%) osoby i taka sama ilość respondentów potwierdziła spożywanie powyżej 5 drinków tygodniowo. Najchętniej spożywanym trunkiem była wódka, preferencje co do temperatury wypijanego alkoholu były porównywalne.

W kolejnym etapie ankiety respondenci odpowiedzieli na pytania dotyczące diety. Najchętniej spożywanymi były drób i jajka (wszyscy pacjenci), szynka oraz białe sery (12 osób – 92%). Pacjenci najrzadziej spożywali kiełki - żadna osoba nie odpowiedziała pozytywnie, oraz wątrobę wieprzową lub cielęcą - jedna osoba (9%) przyznała się do jej spożywania przynajmniej raz w tygodniu.

W Tabeli 17 przedstawiono szczegółowe dane dotyczące diety stosowanej przez pacjentów z nowotworem gardła.

Tabela 17. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem gardła

NOWOTWÓR GARDŁA – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 13	Tak 13 (100) Nie 0 (0)
WIEPRZOWINA n = 13	Tak 10 (77) Nie 3 (23)
SZYNKA n = 13	Tak 12 (92) Nie 1 (8)
WĄTROBA n = 13	Tak 4 (31) Nie 9 (69)
WOŁOWINA n = 11	Tak 6 (55) Nie 5 (45)
PLĄTKI KUKURYDZIANE n = 11	Tak 2 (18) Nie 9 (82)
KIELKI PSZENICY n = 11	Tak 0 (0) Nie 11 (100)
OWOCE MORZA n = 11	Tak 4 (36) Nie 7 (64)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIEŁĘCA n = 11	Tak 1 (9) Nie 10 (91)
JAJKA n = 13	Tak 13 (100) Nie 0 (0)
KASZA GRYCZANA LUB PLĄTKI OWSIANE n = 11	Tak 5 (45) Nie 6 (55)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 13	Tak 12 (92) Nie 1 (8)
CHLEB RAZOWY n = 13	Tak 11 (85) Nie 2 (15)
SZPINAK n = 10	Tak 6 (60) Nie 4 (40)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Zdecydowana większość pacjentów z nowotworem gardła nie przyjmuje suplementów diety zawierających cynk (12 osób – 92%), natomiast do spożywania preparatów witaminowych przyznało się sześć (46%) osób.

Dane personalne dotyczące pacjentów z nowotworami jamy ustnej przedstawione zostały w Tabeli 18.

Tabela 18. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami jamy ustnej

NOWOTWÓR JAMY USTNEJ (n = 27)		
n (%)		
WIEK	20 – 39 lat:	2 (7)
	40 – 59 lat:	14 (52)
	powyżej 60 lat	11 (41)
PŁEĆ	Kobieta	5 (19)
	Mężczyzna	22 (81)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA	Wieś	7 (26)
	Miasto < 100 000 mieszkańców	12 (44)
	Miasto > 100 000 mieszkańców	8 (30)
WYKSZTAŁCENIE	Podstawowe	1 (4)
	Zasadnicze	14 (52)
	Średnie	7 (26)
	Wyższe	5 (19)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Pacjenci z nowotworem jamy ustnej w większości byli palaczami tytoniu, który jest głównym czynnikiem ryzyka powstawania raka tej części ciała. Bardzo duża ilość respondentów – dwanaście osób (48%) wypalała w przeszłości od 11 – 20 papierosów dziennie, natomiast osiem (32%) osób wypalało powyżej 20 papierosów dziennie. Zadawalającym był fakt, że jedenaście (58%) osób zaprzestało nałogu w ostatnim miesiącu, trzy (16%) osoby w ciągu ostatniego roku, natomiast pięć (32%) osób przestało palić papierosy ponad rok temu.

Wśród pacjentów z nowotworem jamy ustnej obecnie pali sześcioro (22%) respondentów, dwie (7%) osoby wypalają od 1 – 5 papierosów dziennie, taka sama ilość pacjentów przyznała się do palenia od 11 – 20 papierosów dziennie.

Na pytania dotyczące ilości alkoholu spożywanego w przeszłości odpowiedziały 22 osoby. Najwięcej osób – dziewięć (41%) wypijało jeden drink tygodniowo, następnie sześć (27%) osób przyznało, że spożywało 2 – 5 drinków tygodniowo, a pięć (23%) osób wypijało powyżej 5 drinków tygodniowo. W ostatnim miesiącu dwanaście (67%) osób zaprzestało spożywania alkoholu, w ciągu ostatniego roku ilość ta wyniosła trzy (17%) osoby i taka sama liczba respondentów przestała pić alkohol ponad rok od czasu wypełnienia kwestionariusza.

Zdecydowana większość chorych na nowotwór jamy ustnej nie spożywa obecnie alkoholu – 17 (81%) osób. Pacjenci, którzy przyznali się do stosowania tej używki, wypijają odpowiednio jeden drink tygodniowo (trzy osoby), 2 – 5 drinków tygodniowo (trzy osoby) i powyżej 5 drinków tygodniowo (trzy osoby). Najchętniej spożywanym był alkohol zimny w postaci piwa (15 osób – 71%).

Pacjenci z nowotworem jamy ustnej przynajmniej raz w tygodniu spożywali drób (wszyscy respondenci), szynkę (24 osoby – 92%), jajka i białe sery (23 osoby – 88%). Najrzadszym pożywieniem w diecie chorych były kielki (jedna osoba – 5%), owoce morza (3 osoby – 13%) oraz szpinak (4 osoby – 19%).

W Tabeli 19 przedstawione zostały preferencje żywieniowe pacjentów z nowotworem jamy ustnej.

Tabela 19. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem jamy ustnej

NOWOTWÓR JAMY USTNEJ – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 27	Tak 27 (100) Nie 0 (0)
WIEPRZOWINA n = 25	Tak 22 (88) Nie 3 (12)
SZYNKA n = 26	Tak 24 (92) Nie 2 (8)
WĄTROBA n = 21	Tak 10 (48) Nie 11 (52)
WOŁOWINA n = 20	Tak 5 (25) Nie 15 (75)
PLATKI KUKURYDZIANE n = 23	Tak 6 (26) Nie 17 (74)
KIELKI PSZENICY n = 22	Tak 1 (5) Nie 21 (95)
OWOCE MORZA n = 23	Tak 3 (13) Nie 20 (87)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIEŁĘCA n = 16	Tak 5 (31) Nie 11 (69)
JAJKA n = 26	Tak 23 (88) Nie 3 (12)
KASZA GRZYCZANA LUB PLATKI OWSIANE n = 19	Tak 10 (53) Nie 9 (47)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 26	Tak 23 (88) Nie 3 (12)
CHLEB RAZOWY n = 24	Tak 13 (54) Nie 11 (46)
SZPINAK n = 21	Tak 4 (19) Nie 17 (81)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Na pytanie dotyczące spożywania suplementów diety zawierających cynk 27 (100%) osób odpowiedziało, że nie stosuje go w swoim codziennym życiu, natomiast preparaty wielowitaminowe przyjmuje tylko dziewięć (35%) spośród 26 osób, które udzieliły odpowiedzi na to pytanie.

Dane personalne pacjentów chorujących na nowotwór szyi przedstawione zostały w Tabeli 20.

Tabela 20. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami szyi

NOWOTWÓR SZYI (n = 10)		
n (%)		
WIEK	20 – 39 lat:	1 (10)
	40 – 59 lat:	6 (60)
	powyżej 60 lat	3 (30)
PŁEĆ	Kobieta	4 (40)
	Mężczyzna	6 (60)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA	Wieś	3 (30)
	Miasto < 100 000 mieszkańców	3 (30)
	Miasto > 100 000 mieszkańców	4 (40)
WYKSZTAŁCENIE	Podstawowe	1 (10)
	Zasadnicze	5 (50)
	Średnie	2 (20)
	Wyższe	2 (20)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Zdecydowana większość pacjentów z nowotworem szyi paliła w przeszłości tytoń oraz spożywała alkohol. Tylko trzy (30%) osoby nie paliły nigdy papierosów, trzy (30%) osoby paliły od 6 – 10 papierosów, jedna (10%) osoba wypalała 11 – 20 sztuk, a trzy (30%) osoby przyznały się do wypalania ponad 20 sztuk papierosów dziennie. W ostatnim miesiącu palić przestały dwie (40%) osoby, natomiast ponad rok temu trzech (60%) pacjentów zaprzestało stosowania tej używki – tylko pięciu respondentów odpowiedziało na to pytanie. Obecnie pali dwóch (20%) pacjentów z nowotworami szyi, jeden z nich wypala od 11 – 20 papierosów dziennie, jeden powyżej 20 papierosów dziennie.

Ilość alkoholu wypijanego przez chorych kształtowała się w następujący sposób:

- jedna (12,5%) osoba nigdy nie spożywała alkoholu w przeszłości
- pięć (62,5%) osób wypijało jeden drink tygodniowo
- jedna (12,5%) osoba wypijała 2 – 5 drinków tygodniowo
- jedna (12,5%) osoba wypijała powyżej 5 drinków tygodniowo.

Tylko dwie osoby odpowiedziały na pytanie, kiedy zaprzestały picia alkoholu – w tym przypadku było to ponad rok temu. Z ośmiu osób, które odpowiedziały na pytanie dotyczące spożywania obecnie alkoholu, tylko trzy (37,5%) odpowiedziały twierdząco. Pytanie to nie było zgodne z kolejnym dotyczącym ilości spożywanego alkoholu, ponieważ cztery (44%) osoby przyznały się do wypijania jednego drinka tygodniowo, natomiast jeden (11%) respondent odpowiedział, że spożywa 2 – 5 drinków tygodniowo. Najchętniej spożywanym trunkiem było piwo, najrzadziej wódka.

Najczęściej spożywanym pokarmem w grupie pacjentów z nowotworem szyi była szynka i jajka (wszystkie osoby) oraz drób i białe sery (9 osób – 90%).

W diecie pacjentów najrzadziej znajdowały się owoce morza – żadna osoba nie odpowiedziała twierdząco oraz kielki (jedna osoba - 17%).

W Tabeli 21 przedstawione zostały preferencje żywieniowe pacjentów z nowotworem szyi.

Tabela 21. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem szyi

NOWOTWÓR SZYI – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 10	Tak 9 (90) Nie 1 (10)
WIEPRZOWINA n = 7	Tak 5 (71) Nie 2 (29)
SZYNKA n = 10	Tak 10 (100) Nie 0 (0)
WĄTROBA n = 8	Tak 4 (50) Nie 4 (50)
WOŁOWINA n = 7	Tak 5 (71) Nie 2 (29)
PŁATKI KUKURYDZIANE n = 8	Tak 4 (50) Nie 4 (50)
KIELKI PSZENICY n = 6	Tak 1 (17) Nie 5 (83)
OWOCE MORZA n = 7	Tak 0 (0) Nie 7 (100)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIEŁĘCA n = 7	Tak 2 (29) Nie 5 (71)
JAJKA n = 10	Tak 10 (100) Nie 0 (0)
KASZA GRYCZANA LUB PŁATKI OWSIANE n = 8	Tak 3 (37,5) Nie 5 (62,5)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 10	Tak 9 (90) Nie 1 (10)
CHLEB RAZOWY n = 9	Tak 7 (78) Nie 2 (22)
SZPINAK n = 8	Tak 3 (37,5) Nie 5 (62,5)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Pacjenci z nowotworami szyi w większości przypadków nie spożywali suplementów diety zawierających cynk (8 osób – 89%), natomiast ilość osób przyjmujących preparaty wielowitaminowe była taka sama, jak tych respondentów, którzy nie stosowali ich w codziennej diecie.

Dane demograficzne ostatniej z badanych grup pacjentów – z nowotworami migdałka podniebiennego, zostały przedstawione w Tabeli 22.

Tabela 22. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami migdałka podniebiennego

NOWOTWÓR MIGDAŁKA PODNIEBIENNEGO (n = 10)	
n (%)	
WIEK	20 – 39 lat: 0 (0)
	40 – 59 lat: 6 (60)
	powyżej 60 lat 4 (40)
PŁEĆ	Kobieta 3 (30)
	Mężczyzna 7 (70)
MIEJSCE ZAMIESZKANIA	Wieś 2 (20)
	Miasto < 100 000 mieszkańców 6 (60)
	Miasto > 100 000 mieszkańców 2 (20)
WYKSZTAŁCENIE	Podstawowe 0 (0)
	Zasadnicze 4 (40)
	Średnie 4 (40)
	Wyższe 2 (20)

Objaśnienia:

n – liczba osób

Odpowiadając na pytania dotyczące czynników ryzyka powstawania nowotworów głowy i szyi – palenia papierosów oraz spożywania alkoholu w przeszłości, zdecydowana większość przyznała się do stosowania tych dwóch używek. Aż siedmioro (78%) pacjentów paliło w przeszłości ponad 20 papierosów dziennie, jedna (11%) osoba wypalała od 6 – 10 papierosów, i jedna (11%) od 11 – 20 papierosów dziennie. Do zaprzestania nałogu ponad rok temu przyznało się pięć (72%) osób, w ostatnim miesiącu - jedna (14%) osoba oraz jedna (14%) osoba uczyniła to w ciągu ostatniego roku. Obecnie żadna z osób chorujących na nowotwór migdałka podniebiennego nie pali papierosów.

Do picia alkoholu w przeszłości przyznali się wszyscy pacjenci – większość (sześć osób – 60%) wypijała powyżej 5 drinków tygodniowo, natomiast cztery (40%) osoby wypijały jednego drinka tygodniowo. W ciągu ostatniego miesiąca jedna (12,5%) osoba zaprzestała spożywania alkoholu, a ponad rok temu uczyniło to siedem (87,5%) osób.

Wszyscy pacjenci, którzy odpowiedzieli na pytanie dotyczące spożywania obecnie alkoholu, odpowiedzieli zaprzeczająco (9 osób – 90%). Nie było to zgodne z kolejnym pytaniem, które dotyczyło ilości spożywanego alkoholu, ponieważ jedna (10%) osoba twierdziła, że wypija jednego drinka tygodniowo i jedna (10%) osoba potwierdziła spożywanie powyżej 5 drinków tygodniowo. Najchętniej pacjenci spożywali piwo, najrzadziej wino i wódkę.

Na pytania dotyczące spożywania przynajmniej raz w tygodniu poszczególnych pokarmów, pacjenci odpowiedzieli, że najchętniej wybieranym przez nich produktem są drób i jajka (9 osób – 90%). Najrzadszym pożywieniem w jadłospisie pacjentów była wątroba wieprzowa lub cielęca (żadna z osób nie odpowiedziała twierdząco) oraz szpinak (jedna osoba – 11%).

W Tabeli 23 przedstawione zostały preferencje żywieniowe pacjentów z nowotworem migdałka podniebiennego.

Tabela 23. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem migdałka podniebiennego

NOWOTWÓR MIGDAŁKA PODNIEBIENNEGO – DIETA	
n (%)	
DRÓB n = 10	Tak 9 (90) Nie 1 (10)
WIEPRZOWINA n = 10	Tak 8 (80) Nie 2 (20)
SZYNKA n = 9	Tak 7 (78) Nie 2 (22)
WĄTROBA n = 8	Tak 1 (12,5) Nie 7 (87,5)
WOŁOWINA n = 9	Tak 4 (44) Nie 5 (56)
PLATKI KUKURYDZIANE n = 8	Tak 1 (12,5) Nie 7 (87,5)
KIELKI PSZENICY n = 8	Tak 0 (0) Nie 8 (100)
OWOCE MORZA n = 8	Tak 1 (12,5) Nie 7 (87,5)
WĄTROBA WIEPRZOWA LUB CIEŁĘCA n = 9	Tak 0 (0) Nie 9 (90)
JAJKA n = 10	Tak 9 (90) Nie 1 (10)
KASZA GRYZANA LUB PLATKI OWSIANE n = 8	Tak 3 (37,5) Nie 5 (62,5)
SERY BIAŁE (TWAROGI) n = 9	Tak 8 (89) Nie 1 (11)
CHLEB RAZOWY n = 10	Tak 8 (80) Nie 2 (20)
SZPINAK n = 9	Tak 1 (11) Nie 8 (89)

Objaśnienia:
n – liczba pacjentów

Żaden z pacjentów chorujących na nowotwór migdałka podniebiennego nie spożywał suplementów diety zawierających cynk, zdecydowana większość – dziewięć (90%) osób nie przyjmowało również preparatów wielowitaminowych.

5.2. Statystyczna i chemometryczna analiza wyników

5.2.1. Surowica krwi

5.2.1.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną

Przeprowadzono pierwiastkową analizę ilościową próbek surowicy krwi od 72 osób ze zdiagnozowanym nowotworem: 26 z rakiem ślinianek, 13 z rakiem gardła, 13 z rakiem jamy ustnej, 10 z rakiem szyi oraz 10 z rakiem migdałków.

Zanalizowano 55 próbek surowicy krwi od zdrowych osób, spośród których dla każdej grupy chorych wybierano losowo grupę kontrolną o identycznej liczności.

Na podstawie otrzymanych wyników analiz wyznaczono podstawowe parametry analityczne dla każdej badanej grupy osobno - średnie stężenia poszczególnych metali w surowicy krwi, ich zakres oraz odchylenie standardowe. Wyniki zestawiono w Tabeli 24.

W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w surowicy krwi w poszczególnych grupach pacjentów oraz w grupie kontrolnej przeprowadzono w pierwszej kolejności testy normalności rozkładu zmiennej - test W Shapiro - Wilka oraz Kołmogorowa - Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Założenie normalności nie zostało spełnione w przypadku wszystkich pierwiastków w badanych grupach, więc do porównania średnich stężeń pomiędzy dwoma grupami stosowano nieparametryczny test U Manna - Whitney'a.

We wszystkich analizach za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p \leq 0,05$. Poniżej tej wartości rezultat oceniano jako statystycznie istotny.

Tabela 24. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna w surowicy krwi w badanych grupach [$\mu\text{g L}^{-1}$]

		Ca*	Mg*	Cu*	Fe*	Zn*	Mn	Co	Cr	Cd	Pb
Rak ślinianek (n=26)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	52.14±45.21	15.78±6.61	1.12±0.32 ^a	4.17±1.35 ^a	0.58±0.23 ^a	40.70±18.72 ^a	1.55±1.53 ^a	18.27±8.12 ^a	7.62±7.05	111.20±61.19 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	4.57-114.10	0.10-23.13	0.52-1.87	2.34-6.70	0.10-1.02	9.31-91.23	0.23-5.77	10.24-40.02	0.68-28.39	10.76-279.13
Rak gardła (n=13)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	47.95±32.42 ^a	13.36±6.00 ^a	1.00±0.38	3.70±1.38	0.83±0.56	19.09±7.84	0.64±0.47 ^a	19.95±10.01	1.77±1.78	149.06±105.38
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	4.88-90.61	2.06-20.15	0.40-1.59	1.25-6.54	0.31-1.97	5.64-31.39	0.19-1.47	9.00-37.61	0.12-5.62	39.84-429.99
Rak jamy ustnej (n=13)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	56.73±36.61	14.34±7.12	1.05±0.28	2.98±1.26	0.62±0.40	23.14±9.74	1.65±2.53	18.93±11.55	2.23±1.85	121.71±80.11
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	5.64-98.86	1.83-20.84	0.61-1.53	1.82-6.00	0.16-1.25	12.15-44.26	LOD-8.86	1.48-42.60	LOD-7.32	44.49-304.55
Rak szyi (n=10)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	83.33±16.14	17.48±3.62	1.00±0.32	3.08±0.94	0.44±0.19	19.76±8.75	0.51±0.63	20.05±7.35	0.78±0.53 ^a	184.50±66.80 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	57.89-110.23	10.43-21.67	0.67-1.64	1.68-4.73	0.20-0.76	10.00-30.91	LOD-1.64	10.56-30.31	LOD-1.46	121.67-294.62
Rak migdałków (n=10)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	7.44±2.64 ^a	2.25±0.86 ^a	1.35±0.60 ^a	2.86±0.99	0.99±0.73 ^a	31.03±20.39	0.54±0.64	32.32±12.40	1.12±0.92 ^a	256.32±142.81 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	3.77-11.09	1.54-4.57	0.62-2.31	1.46-4.80	0.35-2.76	14.20-79.94	LOD-1.83	14.90-51.67	LOD-2.97	123.45-614.76
Grupa kontrolna (n=55)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	81.96±8.54	18.51±1.83	0.86±0.22	2.96±1.30	0.39±0.24	24.90±9.84	1.11±2.42	23.73±13.90	3.68±2.73	86.04±50.50
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	57.94-100.45	13.76-23.29	0.34-1.38	1.18-6.34	0.15-1.30	9.33-52.86	LOD-10.79	6.87-70.94	LOD-11.24	25.85-257.36

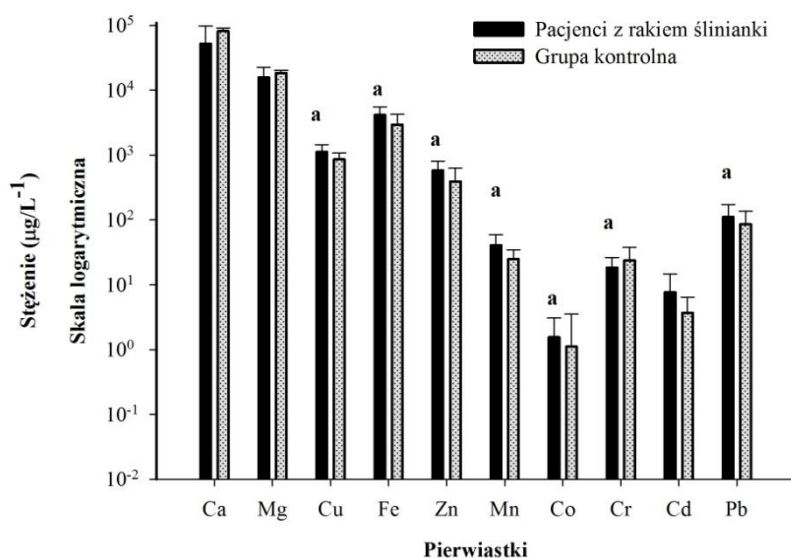
*stężenia w [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]; ^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p\leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Wyniki przeprowadzonego testu U Manna - Whitneya wskazują na statystycznie istotne różnice w średnich zawartościach następujących metali w grupach osób z rakiem:

- ślinianek: miedź (Cu), żelazo (Fe), cynk (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co), chrom (Cr), ołów (Pb) – Rycina 24
- gardła: wapń (Ca), magnez (Mg), kobalt (Co) – Rycina 25
- szyi: kadm (Cd), ołów (Pb) – Rycina 26
- migdałków: wapń (Ca), magnez (Mg), miedź (Cu), cynk (Zn), kadm (Cd), ołów (Pb) – Rycina 27.

W przypadku raka jamy ustnej nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu żadnego z analizowanych pierwiastków w porównaniu z grupą zdrowych osób (Rycina 28).

Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 24.

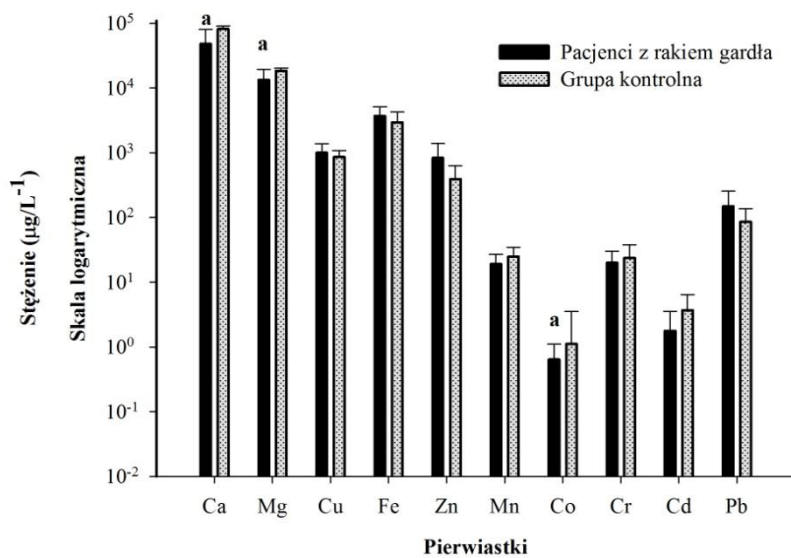


Rycina 24. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Na Rycinie 25 przedstawiono porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pacjentów z nowotworem gardła z grupą kontrolną pacjentów.

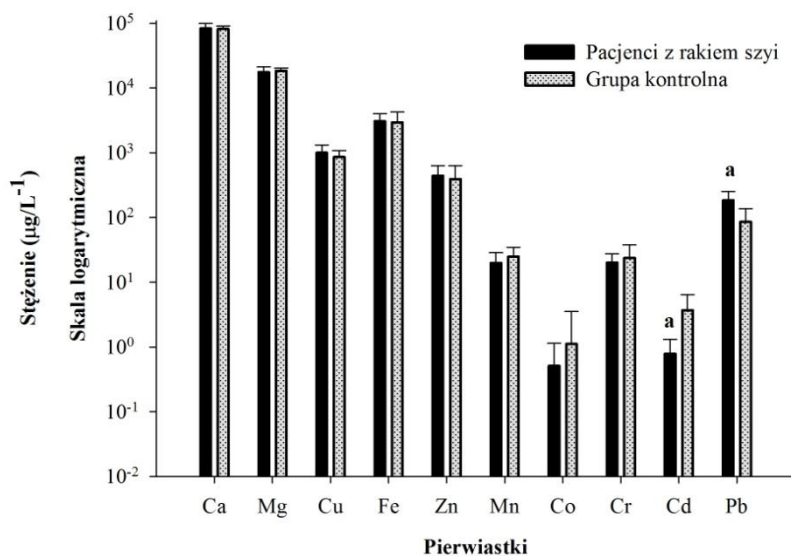


Rycina 25. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Rycina 26 przedstawia porównanie średnich poziomów stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną.

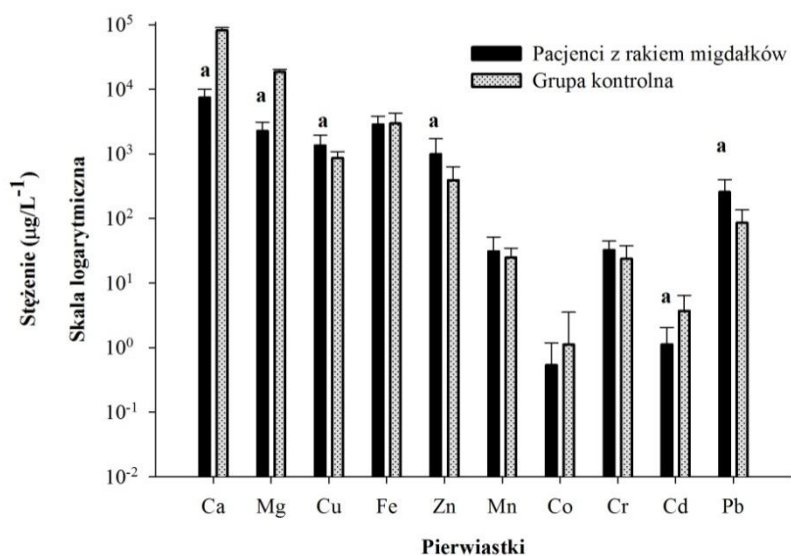


Rycina 26. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Porównanie średnich poziomów pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 27.

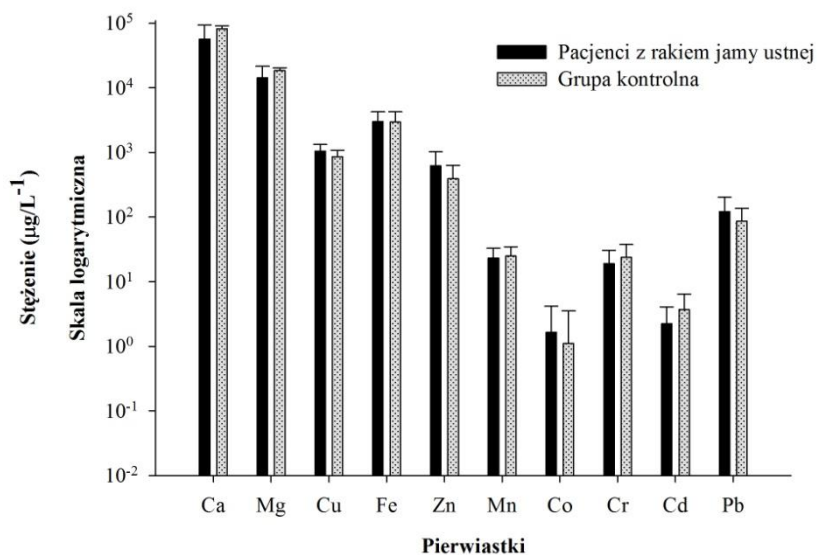


Rycina 27. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

W surowicy krwi pacjentów z nowotworem jamy ustnej nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomach stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej. Wizualizacja graficzna tego porównania przedstawiona została na Rycinie 28.



Rycina 28. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną

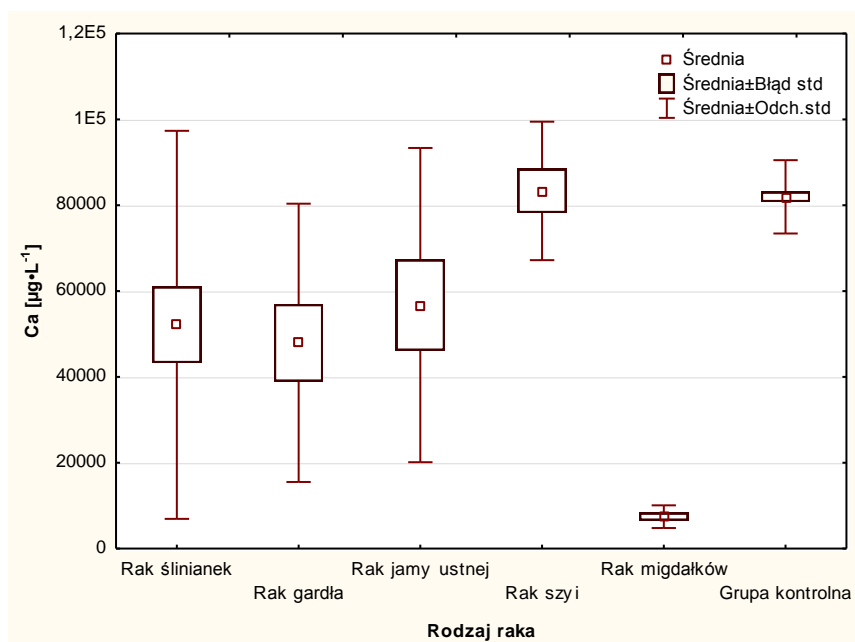
5.2.1.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową

W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w surowicy krwi, pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów, przeprowadzono nieparametryczną analizę wariancji - test ANOVA rang Kruskala - Wallisa oraz test Dunna. Wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 25 (zestawiono tylko grupy, których stężenia danego pierwiastka różniły się w sposób statystycznie istotny z $p < 0,05$) oraz graficznie na Rycinach 29 - 38.

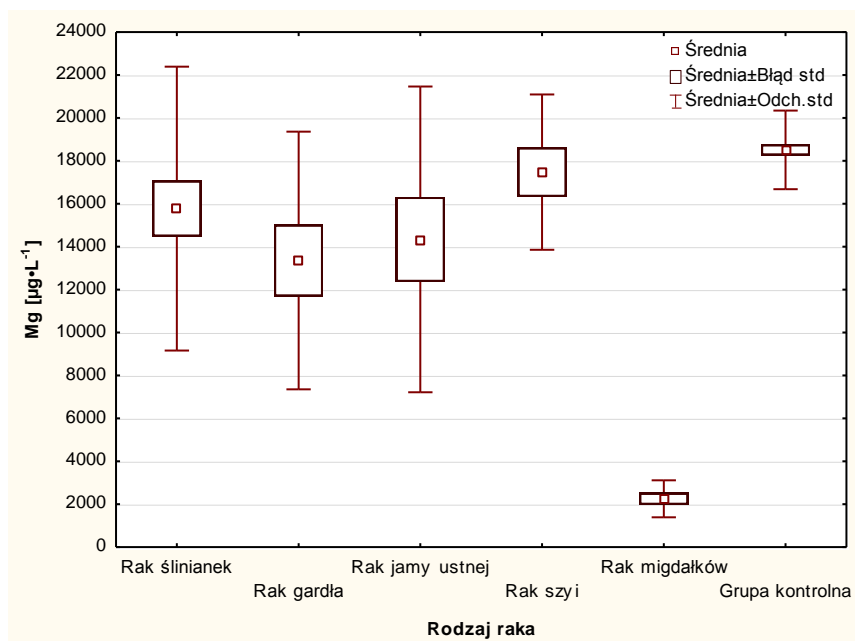
Stężenia magnezu (Mg) oraz kadmu (Cd) w surowicy krwi pozwalają na zróżnicowanie trzech grup chorych, zaś wapnia (Ca), chromu (Cr) i ołowiu (Pb) – dwóch. Najbardziej z wszystkich grup wyróżniają się pacjenci z rakiem ślinianek.

Tabela 25. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala - Wallisa

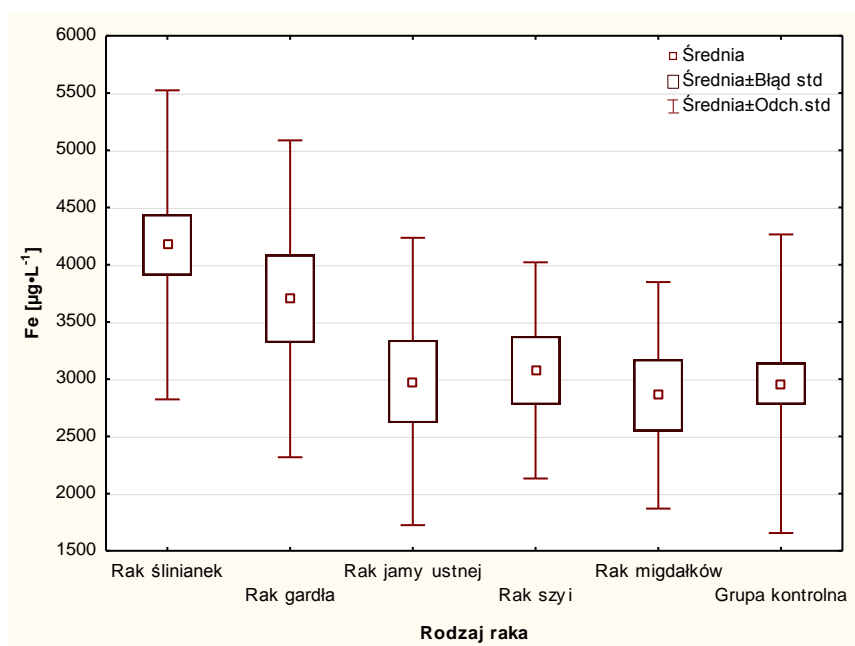
Pierwiastek	Zmienna grupująca: grupy Grupa A: Rak ślinianek (n=26) Grupa B: Rak gardła (n=13) Grupa C: Rak jamy ustnej (n=13) Grupa D: Rak szyi (n=10) Grupa E: Rak migdałków (n=10)	
	Test Kruskala-Wallisa	p
Ca	A vs E	0,011
	D vs E	0,002
Mg	A vs E	0,0002
	D vs E	0,004
Mn	A vs B	0,001
	A vs C	0,04
	A vs D	0,01
Cr	A vs E	0,04
Cd	A vs B	0,006
	A vs D	0,0000
	A vs E	0,0005
Pb	A vs E	0,01



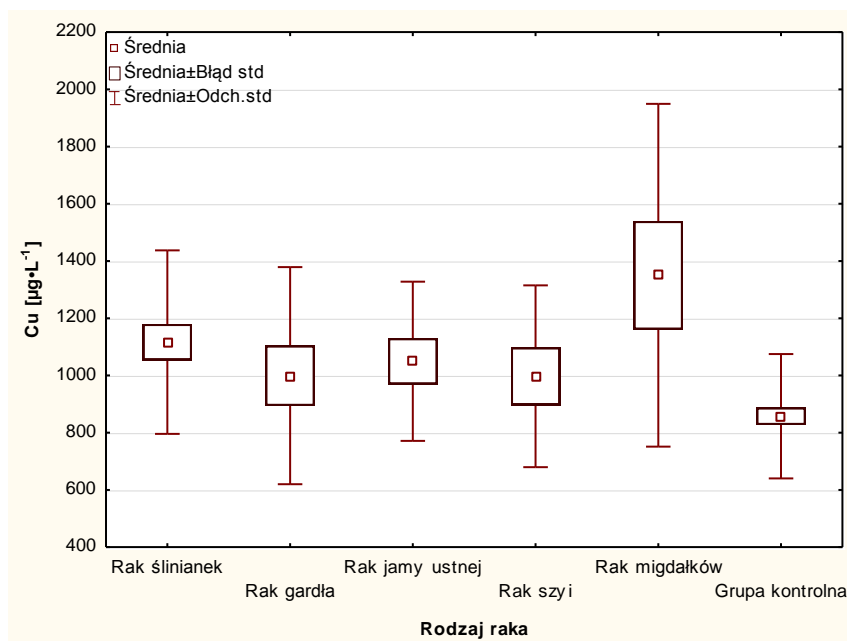
Rycina 29. Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



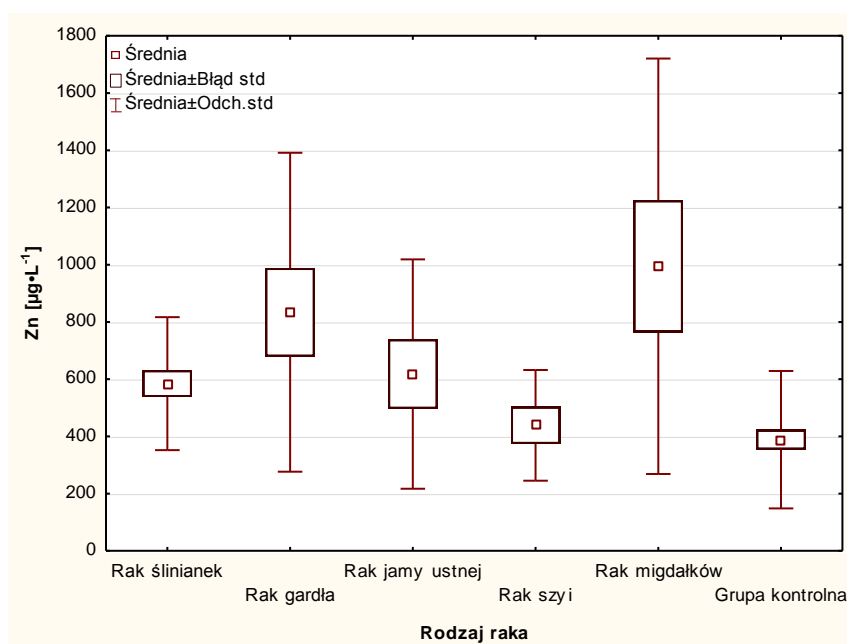
Rycina 30. Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



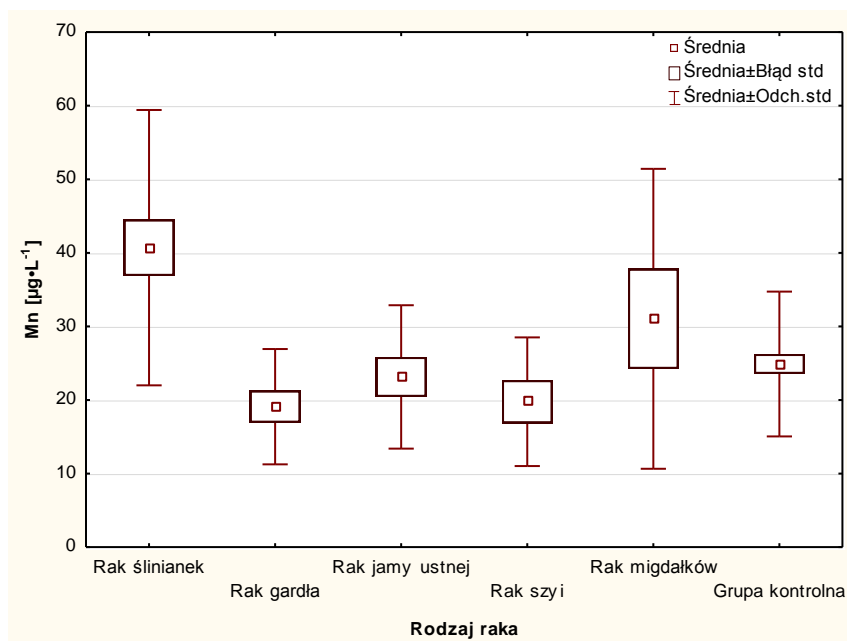
Rycina 31. Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



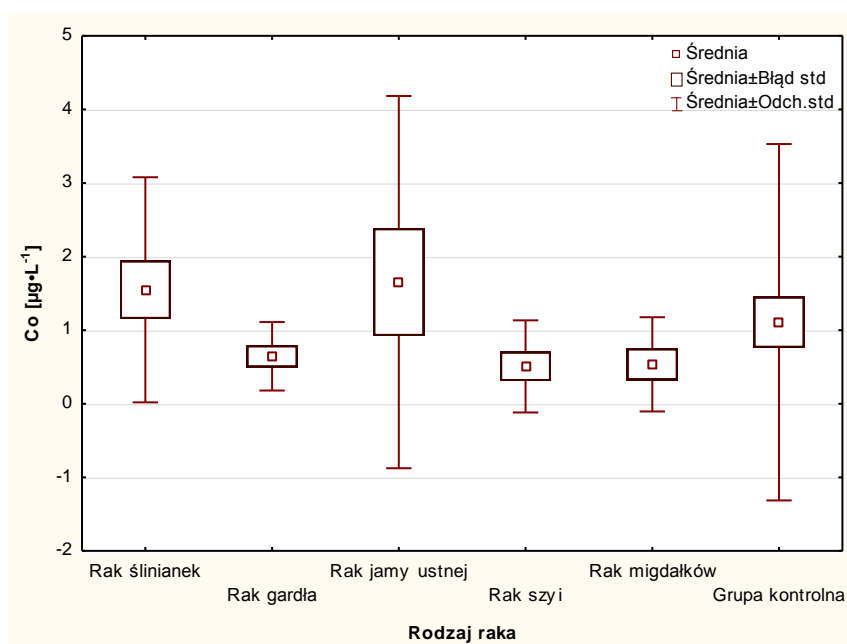
Rycina 32. Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



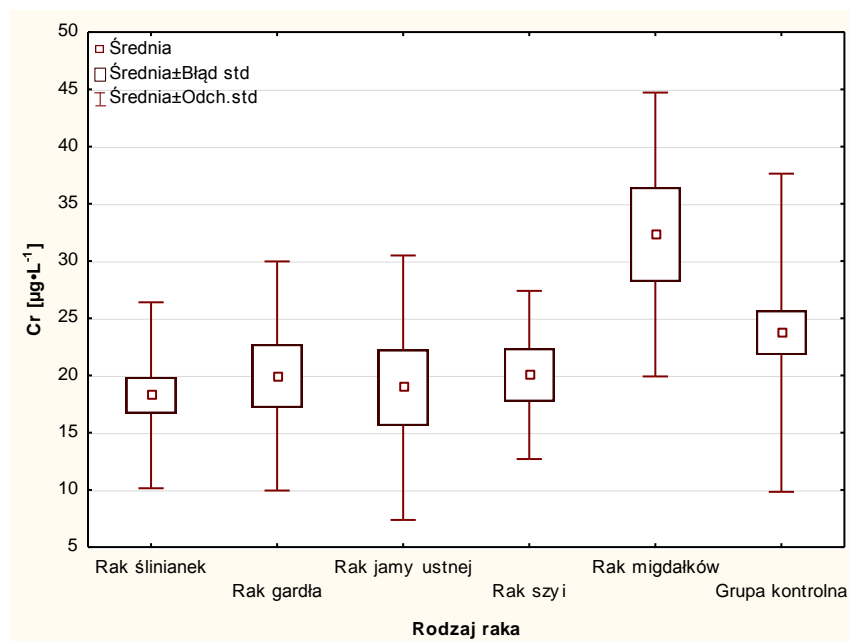
Rycina 33. Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



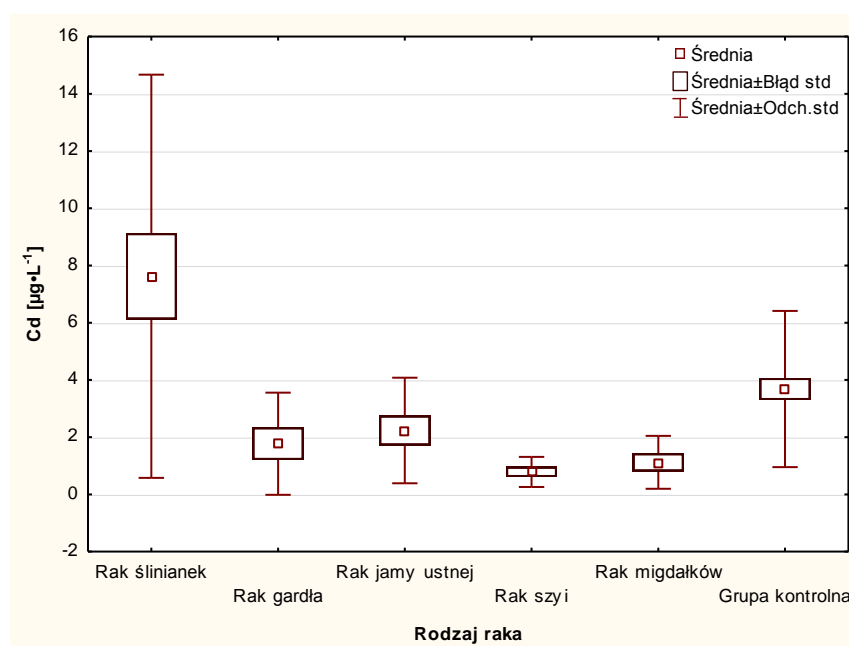
Rycina 34. Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



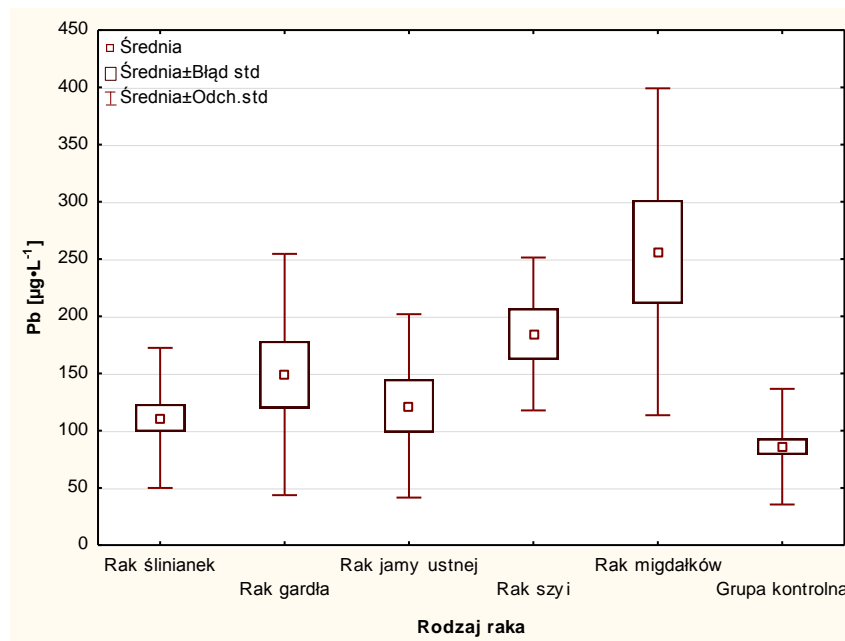
Rycina 35. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



Rycina 36. Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa



Rycina 37. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa



Rycina 38. Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) w surowicy krwi testem Kruskala - Wallisa

5.2.1.3. Analiza skupień

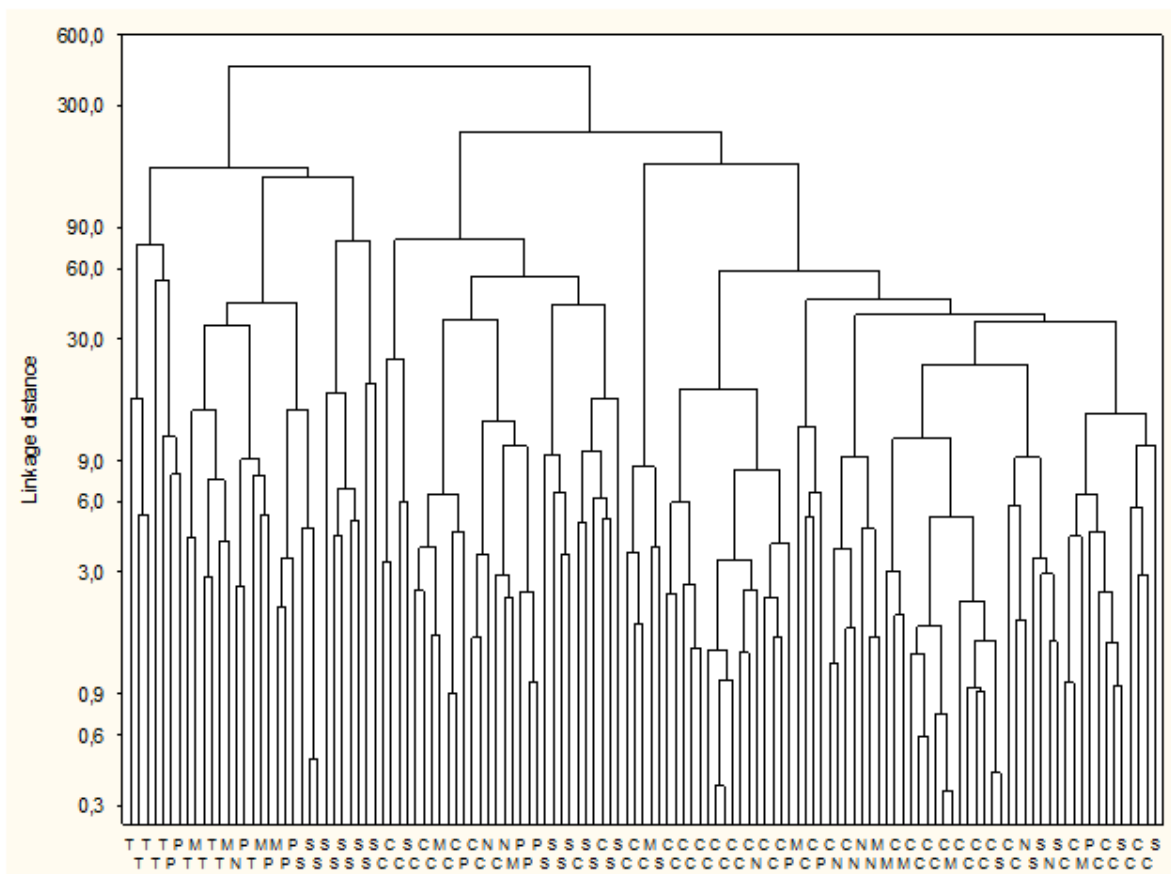
W celu sprawdzenia, czy uzyskane dane otrzymane w wyniku analizy surowicy krwi, pobranych od osób z różnymi nowotworami głowy i szyi oraz osób zdrowych umożliwiają jednoznaczne rozróżnienie obydwu tych grup wykonano analizę skupień.

Przed analizą dane poddano autoskalowaniu. Grupowanie danych przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda. Za miarę odległości między skupieniami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa. Wyniki analizy skupień dla próbek surowicy krwi od wszystkich badanych grup przedstawiono w formie dendrogramu na Rycinie 39, natomiast Ryciny 40 - 44 prezentują dendrogramy otrzymane dla każdej z grup pacjentów osobno oraz grupy kontrolnej.

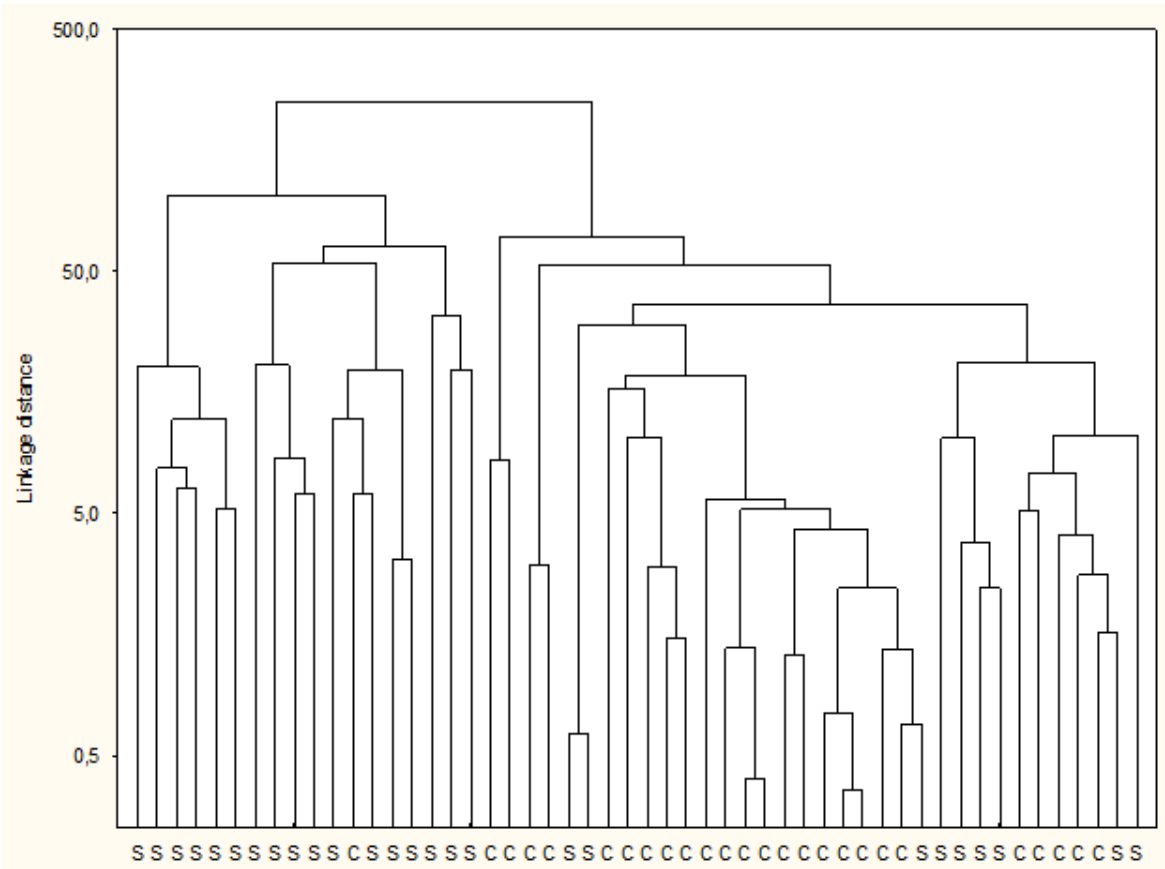
Analiza dendrogramu (Rycina 39) sporządzonego na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy wszystkich próbek surowicy krwi nie pozwala na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup.

Analiza dendrogramu (Rycina 40) sporządzonego na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem ślinianek pozwala na wyróżnienie dwóch skupisk obiektów. Pierwszy klaster po lewej stronie tworzy grupa osób z nowotworem składająca się z 17 osób należących do tej grupy i jednej osoby z grupy kontrolnej, zaś w drugim klastrze znajduje się 25 osób z grupy kontrolnej oraz 11 z grupy osób chorych.

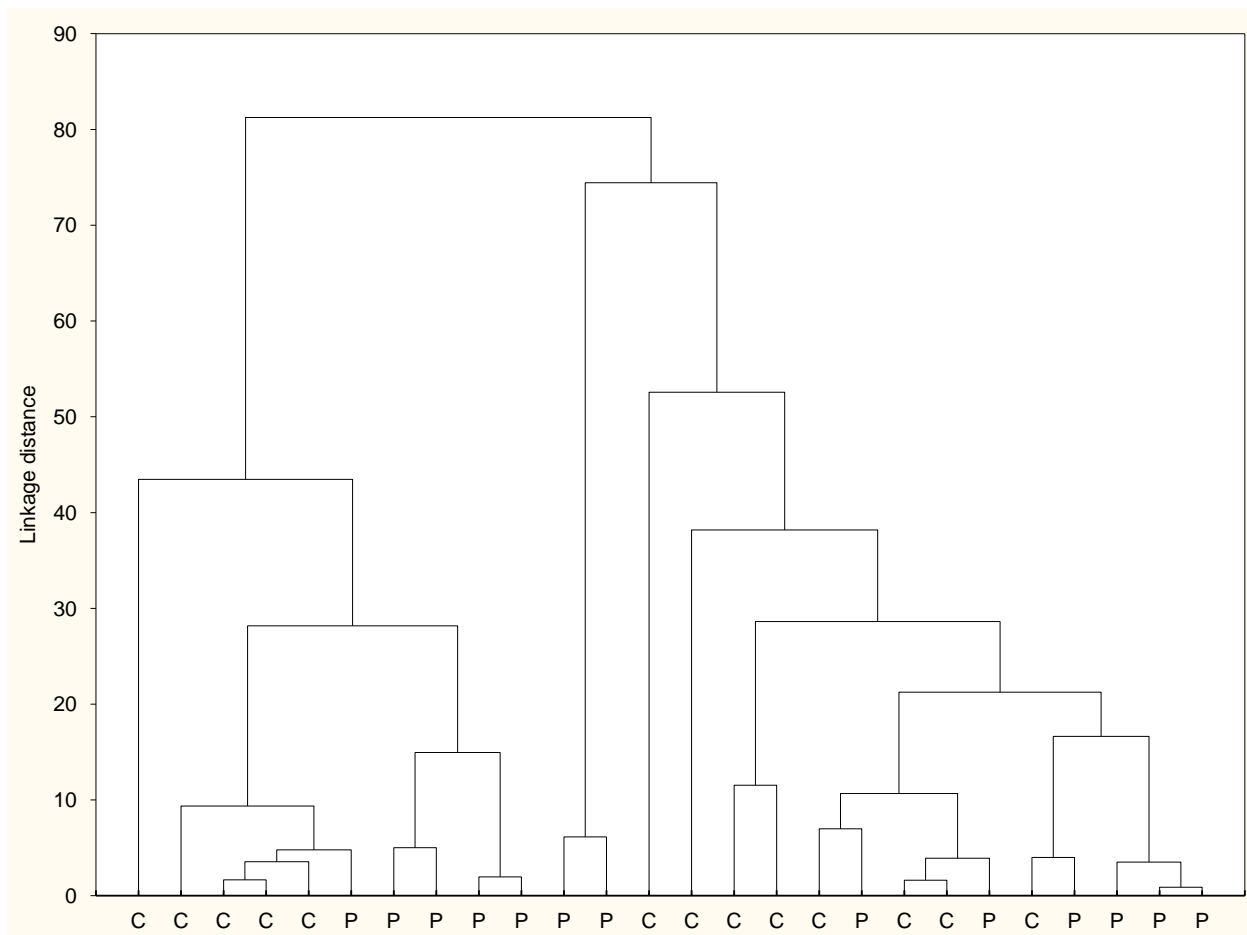
Dendrogramy (Ryciny 41 i 42) sporządzone na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem gardła oraz rakiem jamy ustnej nie wskazują na istnienie odrębnych skupisk poszczególnych grup. W przypadku dendrogramu (Rycina 43) sporządzonego na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem szyi rozróżnienie jest wyraźniejsze. Można zaobserwować tutaj trzy klastry – pierwszy z lewej obejmuje 5 osób z grupy kontrolnej i jednego pacjenta, środkowy – 5 zdrowych i 2 chore osoby, natomiast klaster z prawej strony obejmuje wyłącznie 7 osób z rakiem szyi. Najlepsze odróżnienie grup uzyskano na dendrogramie (Rycina 44) dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem migdałków. Lewy klaster składa się wyłącznie ze zdrowych osób, zaś prawy – z chorych.



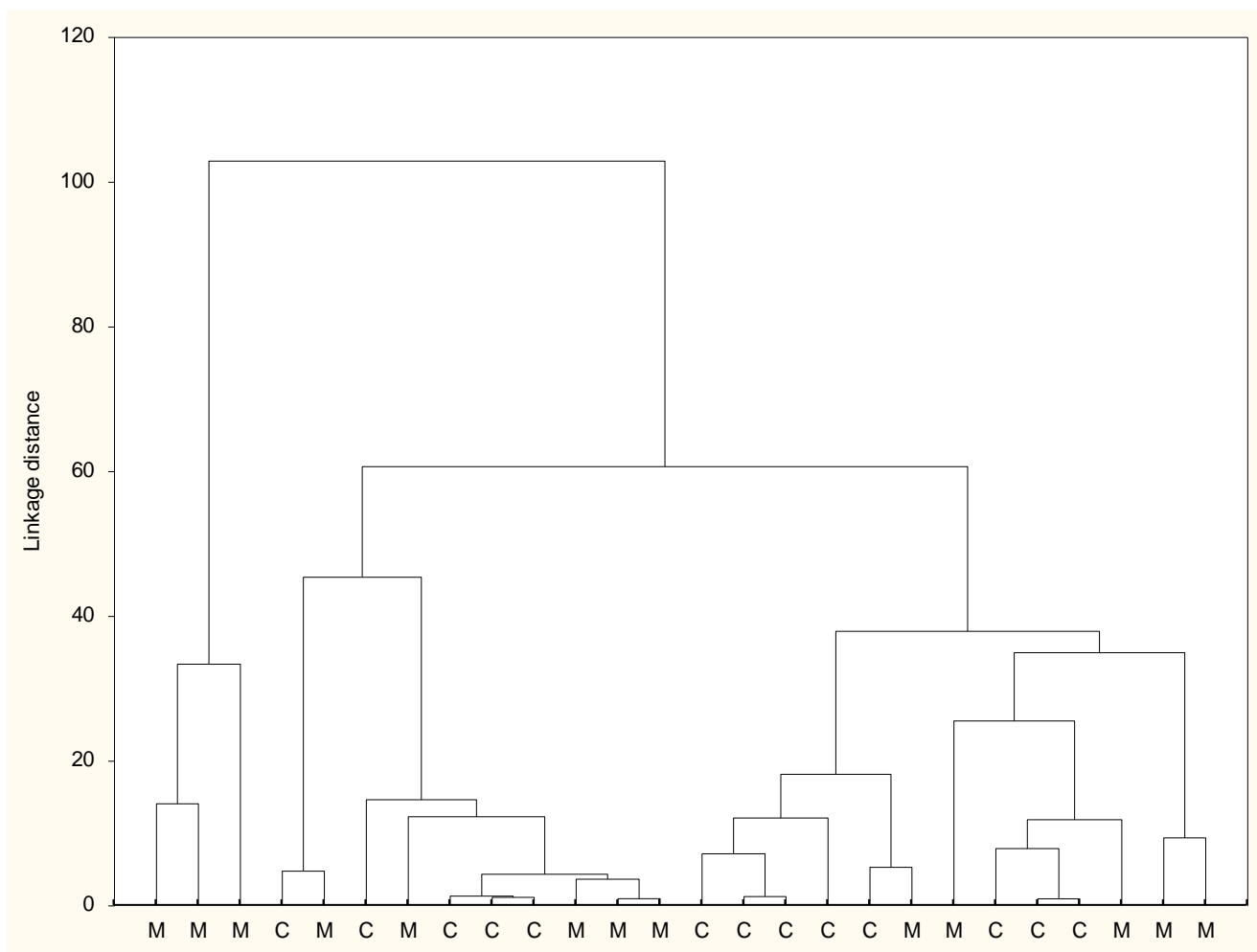
Rycina 39. Dendrogram dla wszystkich próbek surowicy krwi (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak szyi; S – rak ślinianek



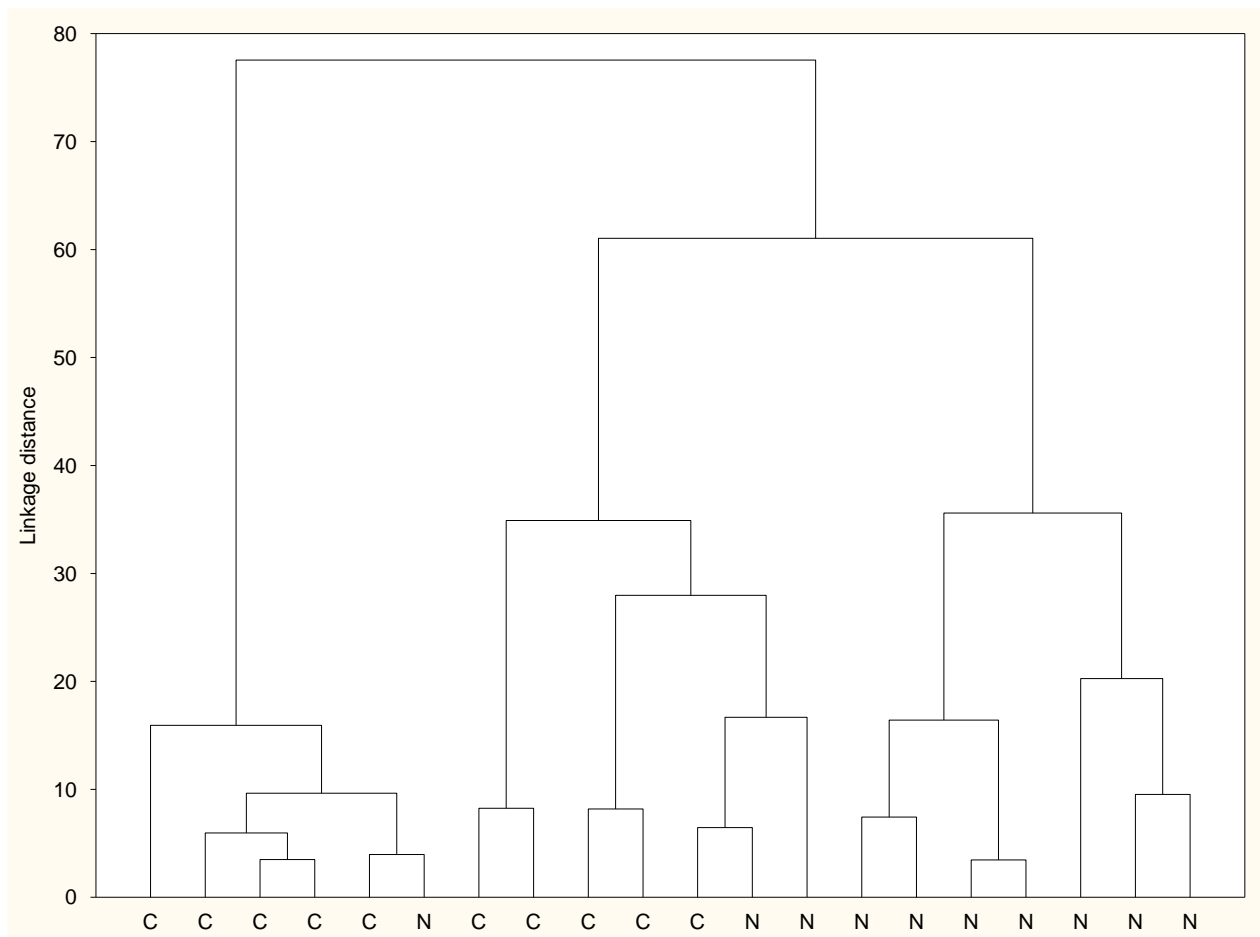
Rycina 40. Dendrogram dla próbek surowicy krwi (skala logarytmiczna);
 C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek



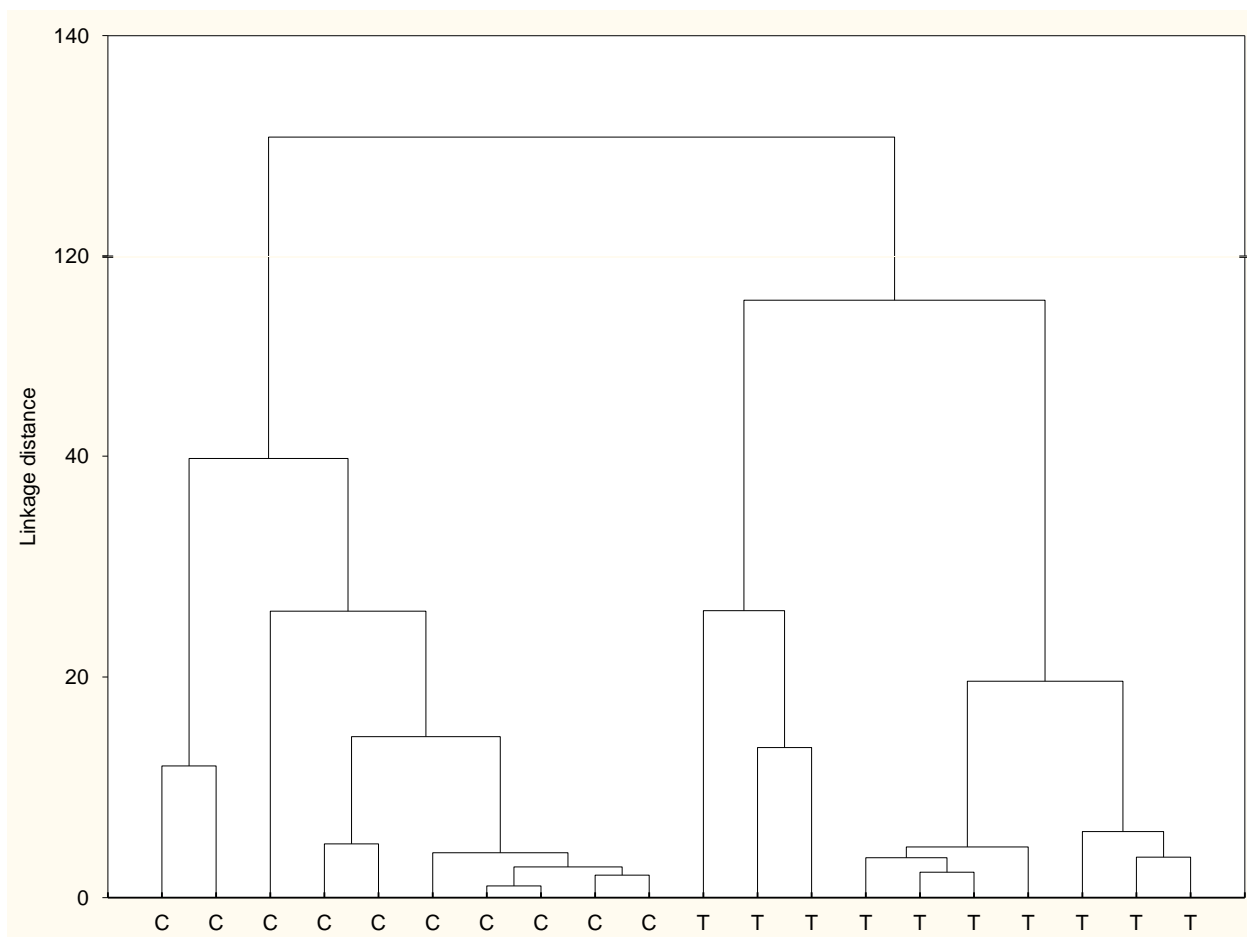
Rycina 41. Dendrogram dla wszystkich próbek surowicy krwi;
 C - grupa kontrolna; P – rak gardła



Rycina 42. Dendrogram dla próbek surowicy krwi;
 C - grupa kontrolna; M – rak jamy ustnej



Rycina 43. Dendrogram dla próbek surowicy krwi;
 C - grupa kontrolna; N – rak szyi



Rycina 44. Dendrogram dla próbek surowicy krwi;
 C - grupa kontrolna; T – rak migdałków

5.2.1.4. Analiza dyskryminacyjna

W celu stworzenia modelu różnicującego pacjentów z pięcioma rodzajami raka oraz zdrowych ludzi przeprowadzono analizę dyskryminacyjną. Zbudowano go opierając się na grupie 55 osób, u których nie zdiagnozowano nowotworu oraz 72 osób z pięcioma rodzajami nowotworów.

Ze względu na brak rozkładu normalnego stężeń analizowanych pierwiastków w badanych grupach dane zostały poddane logarytmowaniu. Równanie funkcji dyskryminacyjnej zbudowano stosując metodę krokową postępującą. Wartości parametrów, które miały wpływ na konstrukcję modelu, były następujące: tolerancja - 0,01, F wprowadzania - 1, F usunięcia - zero oraz liczba kroków - 10.

Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy wszystkich dostępnych próbek umieszczono w Tabeli 26. Obliczono wartość wielowymiarowej statystyki lambda Wilksa, przybliżoną wartość statystyki F oraz odpowiadający jej poziom istotności.

Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (lambda Wilksa = 0,134; F = 5,691; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup pięciu z dziesięciu pierwiastków: wapnia (Ca), kadmu (Cd), ołowiu (Pb), manganu (Mn) i żelaza (Fe). Im mniejsza wartość cząstkowej lambdy Wilksa, tym większa moc dyskryminacyjna danej zmiennej. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma wapń (Ca), następnie ołów (Pb) i mangan (Mn), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to kadm (Cd) i żelazo (Fe).

Tabela 26. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy krwi dla wszystkich grup

N=127	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Ca	0.176	0.763	6.947	0.000
Cd	0.156	0.858	3.713	0.004
Pb	0.169	0.793	5.855	0.000
Mn	0.164	0.817	5.012	0.000
Fe	0.151	0.888	2.825	0.019
Zn	0.147	0.912	2.149	0.065
Cr	0.145	0.923	1.863	0.106
Cu	0.147	0.915	2.089	0.072
Co	0.144	0.934	1.586	0.170
Mg	0.143	0.937	1.507	0.193

Ze względu na dyskryminację sześciu grup skonstruowano pięć funkcji dyskryminacyjnych. Ich interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej.

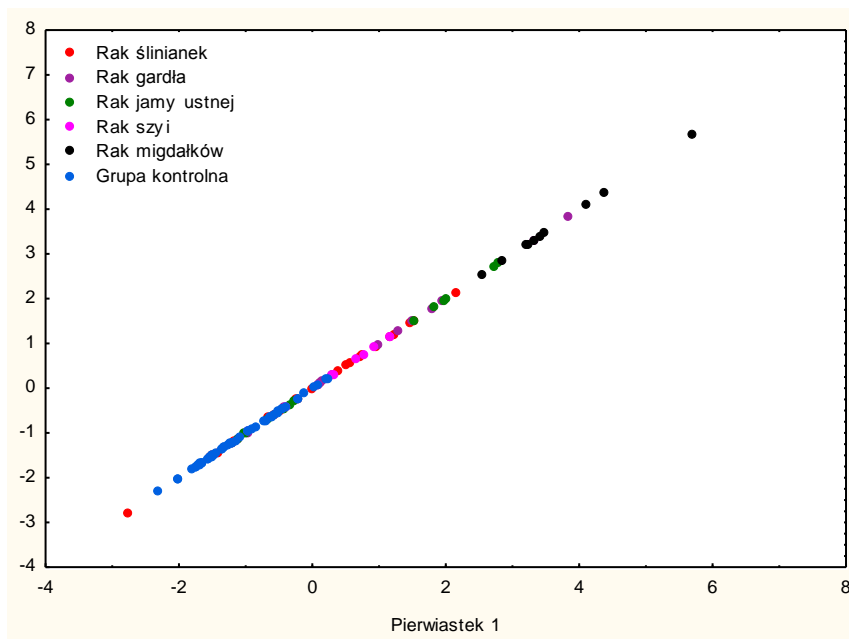
W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które przedstawiono w Tabeli 27.

Na pierwszą funkcję dyskryminacyjną największy wpływ mają wapń (Ca) i ołów (Pb), na drugą – wapń (Ca) i kadm (Cd), na trzecią – mangan (Mn) i żelazo (Fe), zaś czwartą i piątą – chrom (Cr) i mangan (Mn). Istotność poszczególnych funkcji dyskryminacyjnych zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że trzy pierwsze funkcje są statystycznie istotne.

Tabela 27. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

	Pierw1	Pierw2	Pierw3	Pierw4	Pierw5
Ca	-0.606	-0.415	0.081	-0.055	0.023
Cd	-0.369	0.386	0.126	0.228	0.291
Pb	0.504	-0.378	-0.132	-0.415	0.439
Mn	-0.288	0.393	0.634	-0.541	-0.080
Fe	-0.233	0.288	-0.591	-0.019	0.561
Zn	0.255	0.116	-0.481	0.282	-0.132
Cr	0.034	-0.160	0.337	0.544	0.585
Cu	0.267	0.225	0.404	-0.354	-0.250
Co	0.137	0.321	-0.281	0.172	-0.074
Mg	-0.218	0.139	-0.391	-0.310	0.093
Wart.wł.	1.770	0.785	0.291	0.114	0.048
Skum.pro	0.588	0.849	0.946	0.984	1.000

Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 45.



Rycina 45. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna nie rozróżnia wyraźnie wszystkich grup, jednak pozwala odróżnić głównie grupę chorych na nowotwór migdałków (prawa strona wykresu) oraz grupę kontrolną (lewa strona wykresu).

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 28.

Tabela 28. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,205	Rak gardła p=,102	Rak jamy ustnej p=,102	Rak szyi p=,079	Rak migdałków p=,079	Grupa kontrolna p=,433
Ca	28,288	28,024	29,106	31,570	23,924	32,459
Cd	8,116	6,731	6,553	5,955	5,600	7,829
Pb	17,331	21,521	20,116	24,843	26,467	16,943
Mn	14,099	3,235	9,233	7,451	7,004	11,727
Fe	70,606	70,869	64,988	65,923	58,838	67,589
Zn	21,599	25,591	22,360	20,213	23,444	19,400
Cr	27,419	28,690	26,821	28,491	31,910	29,845
Cu	137,950	131,363	136,949	133,561	144,083	132,524
Co	6,855	6,972	6,454	5,668	6,572	5,998
Mg	35,469	34,938	34,308	34,718	30,820	34,652
Stała	-550,322	-534,379	-526,672	-538,455	-513,669	-532,052

Wyższa wartość bezwzględna współczynnika stojącego przy danej zmiennej wejściowej wskazuje na większy jej wpływ na tworzenie danej funkcji klasyfikacyjnej i samą klasyfikację do danej grupy.

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 29.

Ponad 73% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację, w 100% poprawną, uzyskano w przypadku grupy z rakiem migdałków, drugą w kolejności dla grupy osób zdrowych (96,4%). Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem jamy ustnej – jedynie 15,4% poprawnych klasyfikacji.

Tabela 29. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak ślinianek p=,205	Rak gardła p=,102	Rak jamy ustnej p=,102	Rak szyi p=,079	Rak migdałków p=,079	Grupa kontrolna p=,433
Rak ślinianek	61,5	16	1	0	0	1	8
Rak gardła	46,2	0	6	1	0	2	4
Rak jamy ustnej	15,4	1	1	2	2	2	5
Rak szyi	60,0	0	2	0	6	0	2
Rak migdałków	100,0	0	0	0	0	10	0
Grupa kontrolna	96,4	1	0	0	1	0	53
Razem	73,2	18	10	3	9	15	72

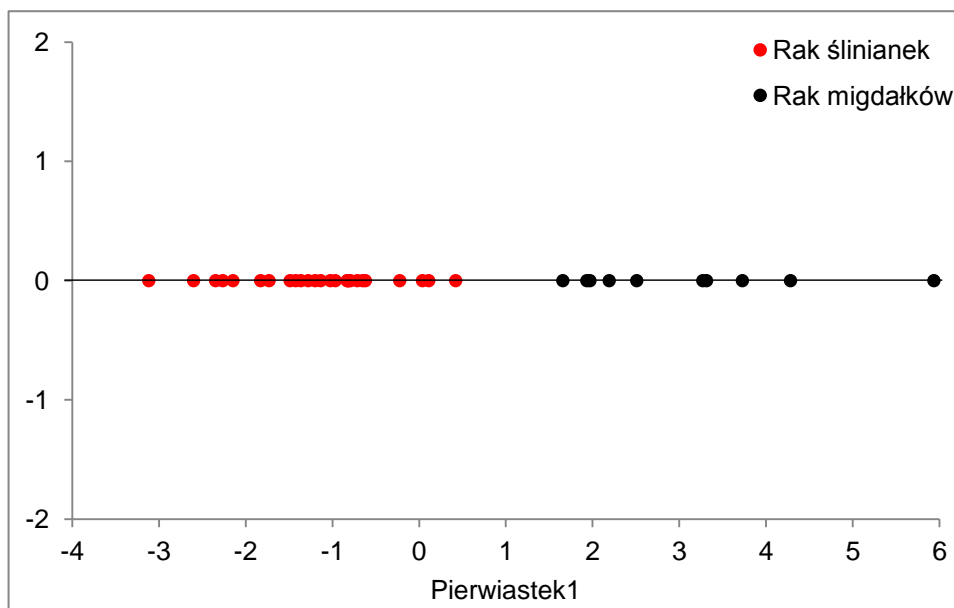
Na podstawie analizy wyników przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej postanowiono stworzyć model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz migdałków. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek surowicy krwi od tych dwóch grup umieszczono w Tabeli 30.

Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (λ Wilksa = 0,206; $F = 13,033$; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup jedynie dwóch z dziesięciu pierwiastków: kadm (Cd) oraz chrom (Cr), zaś dwa pierwiastki – miedź (Cu) oraz kobalt (Co), znalazły się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma kadm (Cd).

Tabela 30. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz migdałków

N=36	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	P
Cd	0,267	0,770	8,086	0,008
Cr	0,240	0,859	4,445	0,044
Ca	0,231	0,891	3,309	0,080
Fe	0,230	0,894	3,200	0,085
Pb	0,228	0,904	2,863	0,102
Zn	0,224	0,919	2,375	0,135
Mn	0,228	0,901	2,965	0,097
Mg	0,218	0,943	1,638	0,211

Ze względu na dyskryminację dwóch grup skonstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą - 0,570 dla kadmu (Cd) i 0,481 dla chromu (Cr). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna. Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 46.



Rycina 46. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna rozróżnia wyraźnie obydwie grupy – na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem migdałków są po prawej stronie wykresu, a z nowotworem ślinianek - po lewej stronie wykresu.

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych, jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości zaprezentowano w Tabeli 31.

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 32.

Prawie 92% pacjentów zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację uzyskano dla osób z rakiem ślinianek (96,2%), natomiast mniej trafnych klasyfikacji uzyskano dla osób z rakiem migdałków (80%).

Tabela 31. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,722	Rak migdałków p=,278
Cd	-2,366	-5,856
Cr	-11,981	0,551
Ca	17,205	13,252
Fe	147,690	135,514
Pb	18,671	24,547
Zn	25,875	34,708
Mn	19,308	10,830
Mg	12,642	10,326
Stała	-390,851	-365,637

Tabela 32. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak ślinianek p=,722	Rak migdałków p=,278
Rak ślinianek	96,2	25	1
Rak migdałków	80,0	2	8
Razem	91,7	27	9

Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem szyi oraz migdałków. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek surowicy od tych dwóch grup przedstawiono w Tabeli 33.

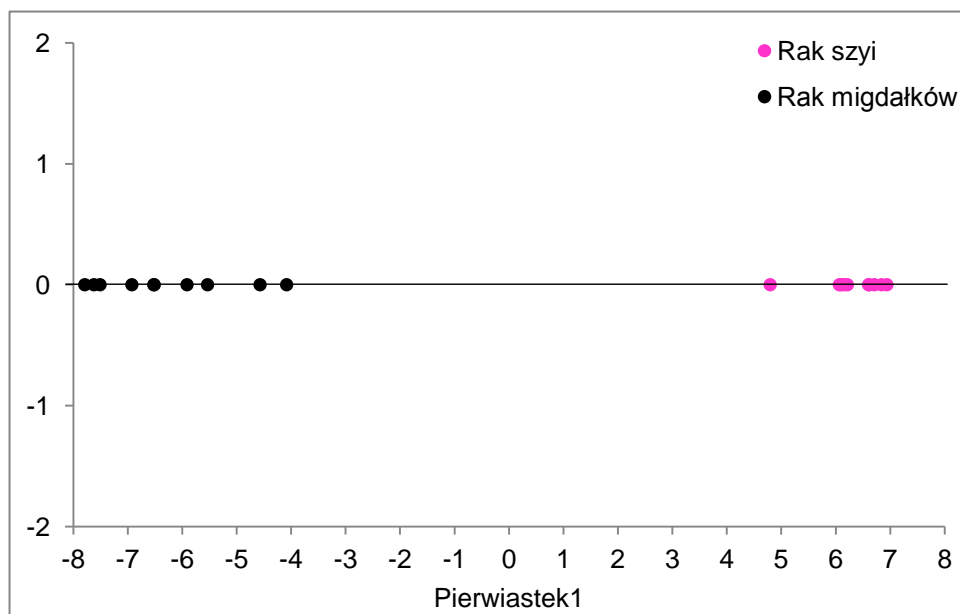
Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (λ Wilksa = 0,022; $F = 165,38$; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup jedynie trzech z dziesięciu pierwiastków: wapnia (Ca), magnezu (Mg) oraz chromu (Cr), zaś aż sześć pierwiastków znalazło się poza modelem.

W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma magnez (Mg).

Tabela 33. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy dla dwóch grup: pacjentów z rakiem szyi oraz migdałków

N=20	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Ca	0,036	0,621	9,146	0,009
Mg	0,038	0,582	10,772	0,005
Cr	0,031	0,713	6,051	0,027
Cu	0,027	0,821	3,277	0,090

Ze względu na dyskryminację dwóch grup skonstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą kolejno 0,765 dla magnezu (Mg), 0,665 dla wapnia (Ca), - 0,625 dla chromu (Cr) oraz - 0,470 dla miedzi (Cu). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna. Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 47.



Rycina 47. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna rozróżnia wyraźnie obydwie grupy – na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem migdałków są po lewej stronie wykresu, a z nowotworem szyi - po prawej stronie wykresu.

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne

obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 34.

Tabela 34. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak szyi p=,500	Rak migdałków p=,500
Ca	252,414	185,956
Mg	251,934	169,742
Cr	-60,444	-12,755
Cu	22,236	58,345
Stała	-1148,569	-721,961

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 35.

Klasyfikacja jest w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

Tabela 35. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak szyi p=,500	Rak migdałków p=,500
Rak szyi	100	10	0
Rak migdałków	100	0	10
Razem	100	10	10

5.2.2. Włosy

5.2.2.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną

Przeprowadzono pierwiastkową analizę ilościową próbek włosów od 87 osób ze zdiagnozowanym nowotworem: 26 z rakiem ślinianek, 13 z rakiem gardła, 26 z rakiem jamy ustnej, 12 z rakiem szyi oraz 10 z rakiem migdałków.

Zanalizowano 64 próbki włosów od zdrowych osób, spośród których dla każdej grupy chorych wybierano losowo grupę kontrolną o identycznej liczności.

Na podstawie otrzymanych wyników analiz wyznaczono podstawowe parametry analityczne dla każdej badanej grupy osobno - średnie stężenia poszczególnych metali we włosach, ich zakres oraz odchylenie standardowe. Wyniki zestawiono w Tabeli 36.

W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków we włosach w poszczególnych grupach pacjentów oraz kontrolnej przeprowadzono w pierwszej kolejności testy normalności rozkładu zmiennej - test W Shapiro - Wilka oraz Kołmogorowa - Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Założenie normalności nie zostało spełnione w przypadku wszystkich pierwiastków w badanych grupach, więc do porównania średnich stężeń pomiędzy dwoma grupami stosowano nieparametryczny test U Manna - Whitney'a.

We wszystkich analizach za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p \leq 0,05$. Poniżej tej wartości rezultat oceniano jako statystycznie istotny.

Tabela 36. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna we włosach w badanych grupach [$\mu\text{g g}^{-1}$]

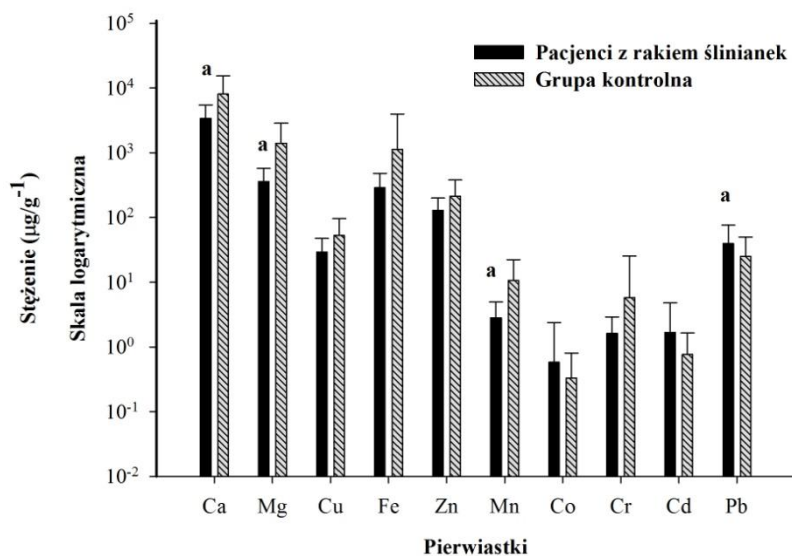
		Ca*	Mg*	Cu	Fe*	Zn	Mn	Co	Cr	Cd	Pb
Rak ślinianek (n=26)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	3,38±2,09 ^a	0,36±0,21 ^a	29,34±18,11	0,29±0,19	129,35±69,74	2,83±2,11 ^a	0,58±1,81	1,61±1,30	1,67±3,12	39,38±36,64 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,30-7,53	0,11-0,94	9,90-74,21	0,04-0,73	22,11-333,68	0,52-8,77	0,03-8,06	0,03-4,21	0,05-14,00	2,45-140,16
Rak gardła (n=13)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	4,51±5,33	0,26±0,25 ^a	66,74±57,80	0,27±0,28	264,29±183,13	2,63±2,44	0,20±0,28	8,83±27,80	0,28±0,29	3,23±1,74 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,71-19,39	0,04-0,90	13,30-210,11	0,01-0,89	60,52-631,92	0,31-8,30	LOD-0,87	0,08-101,00	0,02-1,05	0,87-6,82
Rak jamy ustnej (n=26)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	1,49±1,11 ^a	0,12±0,08 ^a	30,73±20,61	0,14±0,11 ^a	177,35±80,17	1,95±1,79 ^a	0,11±0,15 ^a	0,82±0,68	0,57±0,52	8,52±7,30 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,29-3,84	0,02-0,27	10,71-77,61	0,02-0,50	92,24-368,75	0,26-7,55	LOD-0,51	0,12-2,39	LOD-1,76	0,89-25,22
Rak szyi (n=12)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	3,06±2,02 ^a	0,60±0,36	13,23±5,56 ^a	4,46±3,54 ^a	140,89±107,22	1,84±2,22 ^a	8,54±29,12	0,74±0,69	0,38±0,33	4,61±3,98 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,47-8,38	0,10-1,26	5,53-25,67	1,24-14,96	11,12-412,44	0,40-8,58	0,01-101,00	0,02-2,82	0,05-1,26	1,37-15,86
Rak migdałków (n=10)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	4,18±2,68 ^a	0,35±0,25 ^a	28,31±23,02	0,06±0,04 ^a	184,37±124,00	2,88±2,83	0,40±0,77	0,27±0,29 ^a	0,48±0,31	6,34±4,13 ^a
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,66-8,06	0,07-0,78	12,15-84,18	LOD-0,12	0,59-369,24	0,18-8,07	LOD-2,44	0,04-0,91	0,08-0,93	0,68-11,70
Grupa kontrolna (n=64)	Średnie stężenie±SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	8,05±7,32	1,41±1,44	52,58±43,19	1,13±2,85	214,31±163,35	10,72±11,54	0,33±0,47	5,79±19,58	0,77±0,88	25,22±24,52
	Zakres [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	0,75-0,28	0,21-7,73	7,89-189,71	0,07-0,05	14,69-852,60	0,25-4,13	LOD-2,71	0,09-101,00	LOD-3,46	2,47-96,21

*stężenia w [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]; ^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p\leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Wyniki przeprowadzonego testu U Manna - Whitneya wskazują na statystycznie istotne różnice w średnich zawartościach następujących metali w grupach osób z rakiem:

- ślinianek: wapń (Ca), magnez (Mg), mangan (Mn), ołów (Pb) – Rycina 48
- gardła: magnez (Mg), ołów (Pb) – Rycina 49
- jamy ustnej: wapń (Ca), magnez (Mg), żelazo (Fe), mangan (Mn), kobalt (Co), ołów (Pb) – Rycina 50
- szyi: wapń (Ca), miedź (Cu), żelazo (Fe), mangan (Mn), ołów (Pb) – Rycina 51
- migdałków: wapń (Ca), magnez (Mg), żelazo (Fe), chrom (Cr), ołów (Pb) – Rycina 52.

Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek i grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 48.

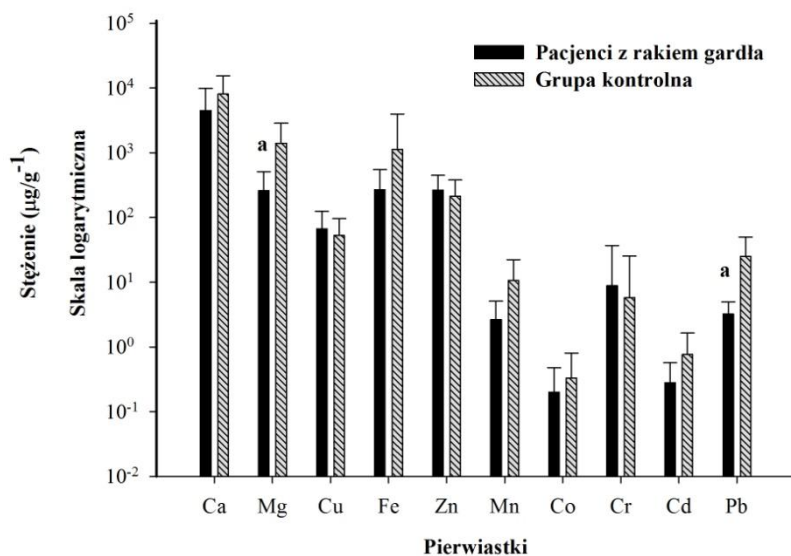


Rycina 48. Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Na Rycinie 49 przedstawiono porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pacjentów z nowotworem gardła z grupą kontrolną pacjentów.

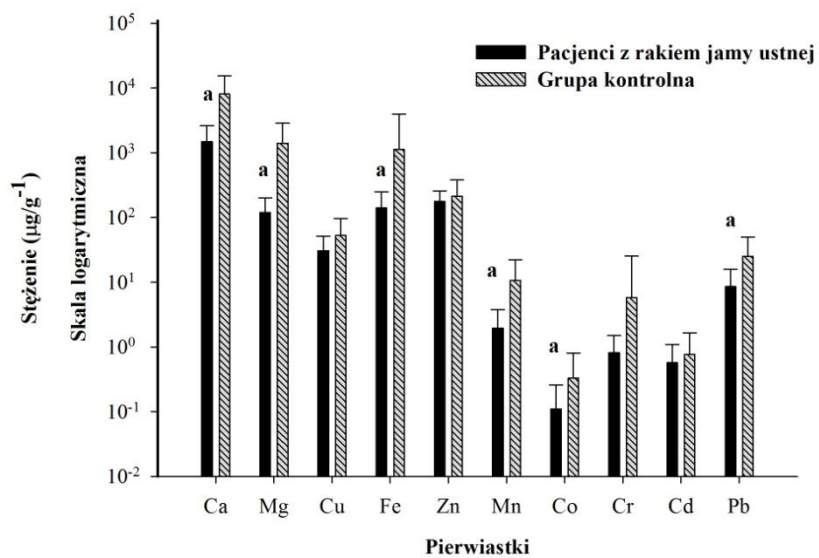


Rycina 49. Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Na Rycinie 50 przedstawiono porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pacjentów z nowotworem jamy ustnej z grupą kontrolną pacjentów.

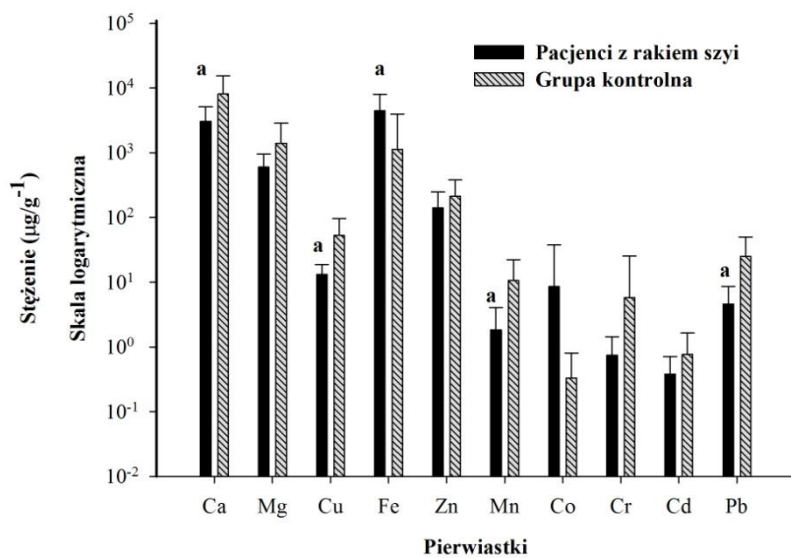


Rycina 50. Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Rycina 51 przedstawia porównanie średnich poziomów stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną.

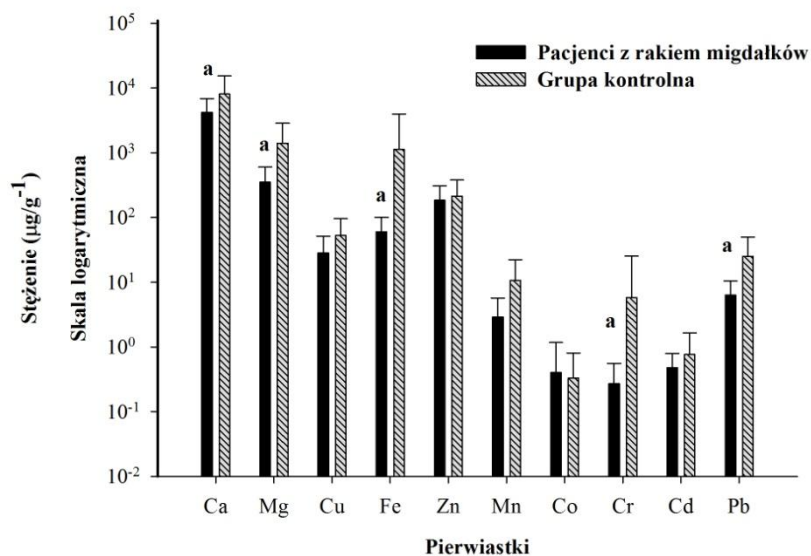


Rycina 51. Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Porównanie średnich poziomów pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 52.



Rycina 52. Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

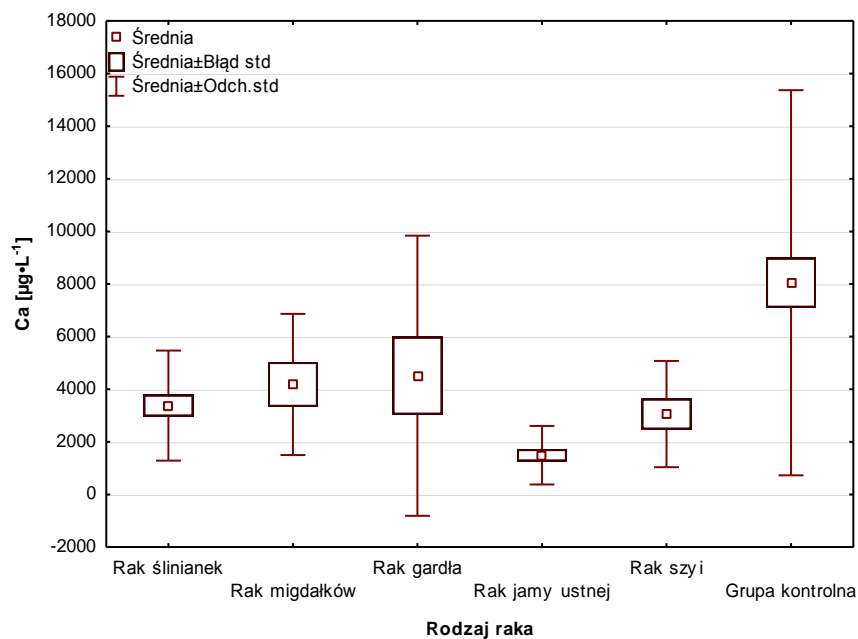
5.2.2.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową

W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów przeprowadzono nieparametryczną analizę wariancji - test ANOVA rang Kruskala - Wallisa. Wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 37 (zestawiono tam tylko grupy, których stężenia danego pierwiastka różniły się w sposób statystycznie istotny z $p < 0,05$) oraz graficznie na Rycinach 53 - 62.

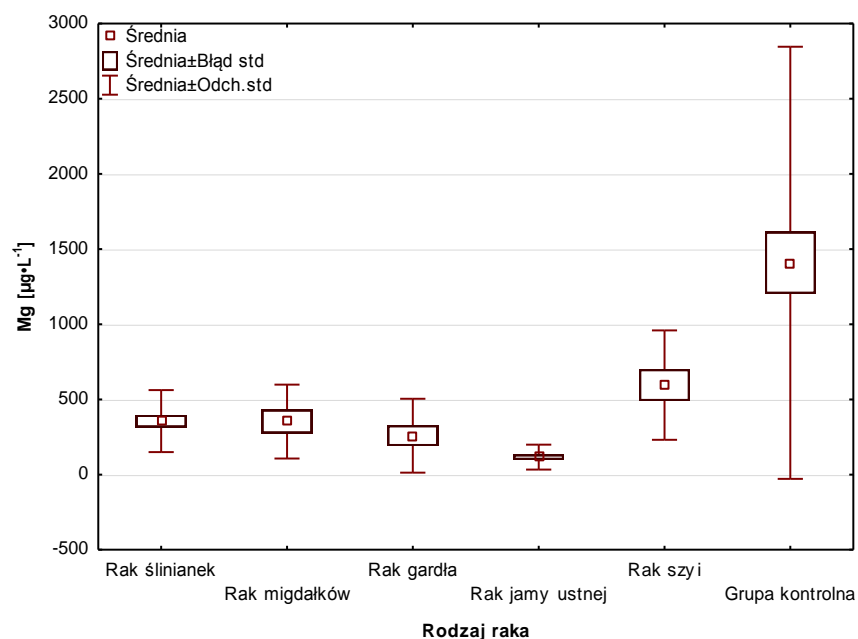
Stężenia żelaza (Fe) oraz ołowiu (Pb) we włosach pozwalają na zróżnicowanie czterech par grup chorych, miedzi (Cu) – trzech, magnezu (Mg) – dwóch, zaś chromu (Cr) tylko jednej pary grup. Najbardziej ze wszystkich grup wyróżniają się pacjenci z rakiem ślinianek.

Tabela 37. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala-Wallisa

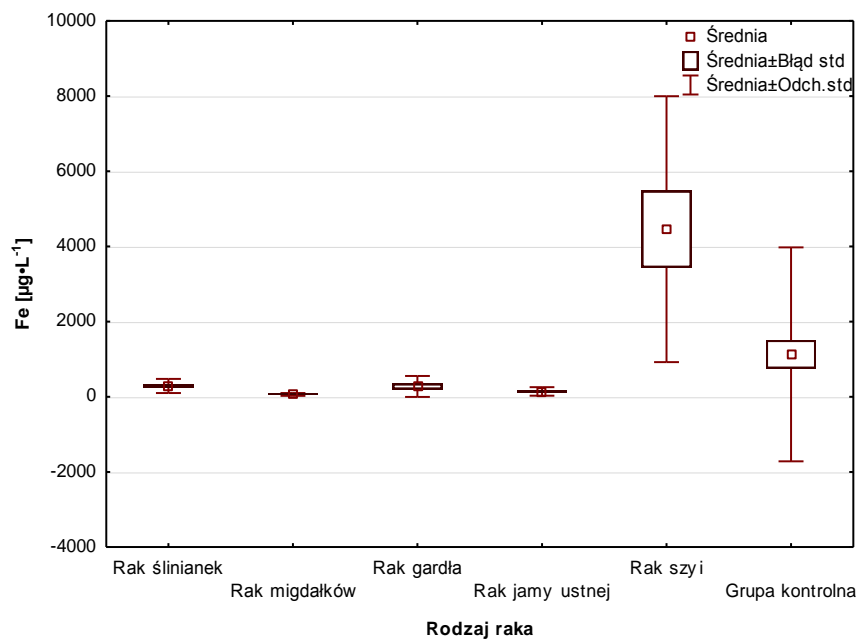
Pierwiastek	Zmienna grupująca: grupy Grupa A: Rak ślinianek (n=26) Grupa B: Rak migdałków (n=10) Grupa C: Rak gardła (n=13) Grupa D: Rak jamy ustnej (n=26) Grupa E: Rak szyi (n=12)	
	Test Kruskala-Wallisa	p
Mg	A vs D	0,006
	D vs E	0,0004
Cu	A vs E	0,04
	D vs C	0,0004
	D vs E	0,03
Fe	A vs E	0,0000
	B vs E	0,0000
	C vs E	0,0000
	D vs E	0,0000
Cr	A vs B	0,01
Pb	A vs B	0,006
	A vs C	0,0000
	A vs D	0,002
	A vs E	0,000



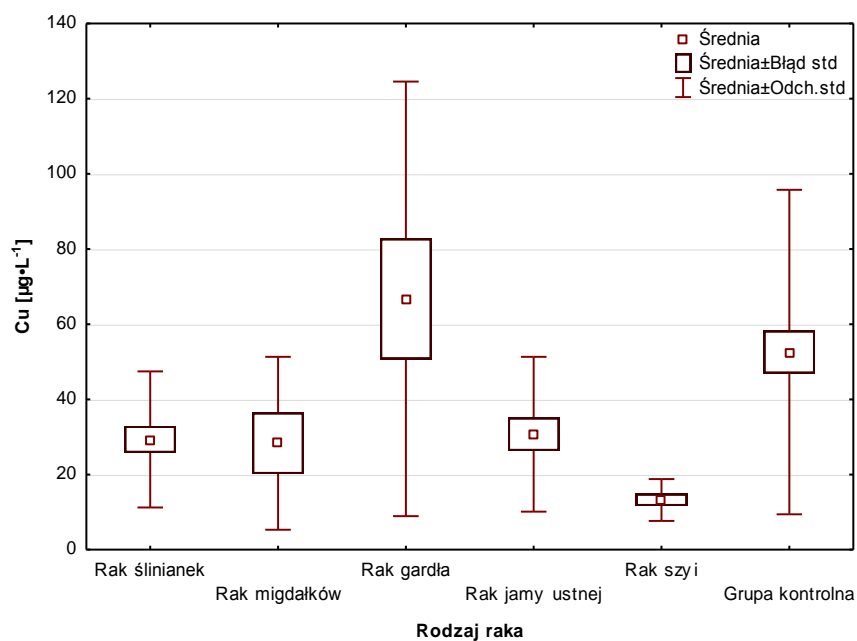
Rycina 53. Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) we włosach testem Kruskala – Wallisa



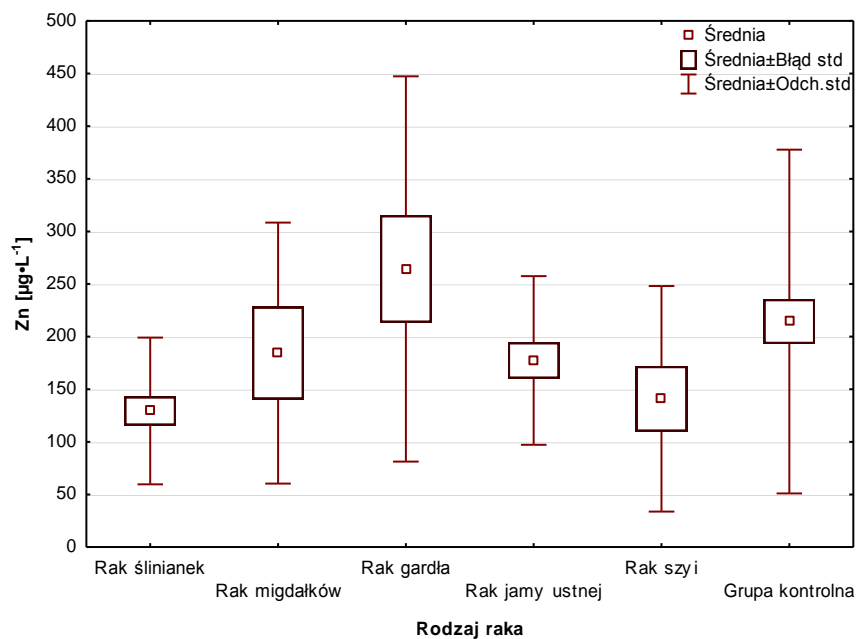
Rycina 54. Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) we włosach testem Kruskala - Wallisa



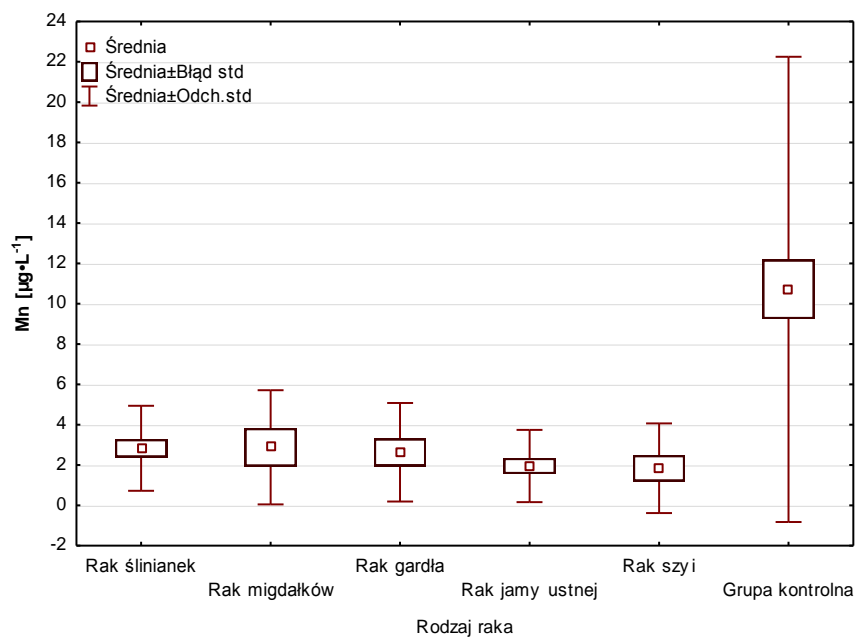
Rycina 55. Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) we włosach testem Kruskala - Wallisa



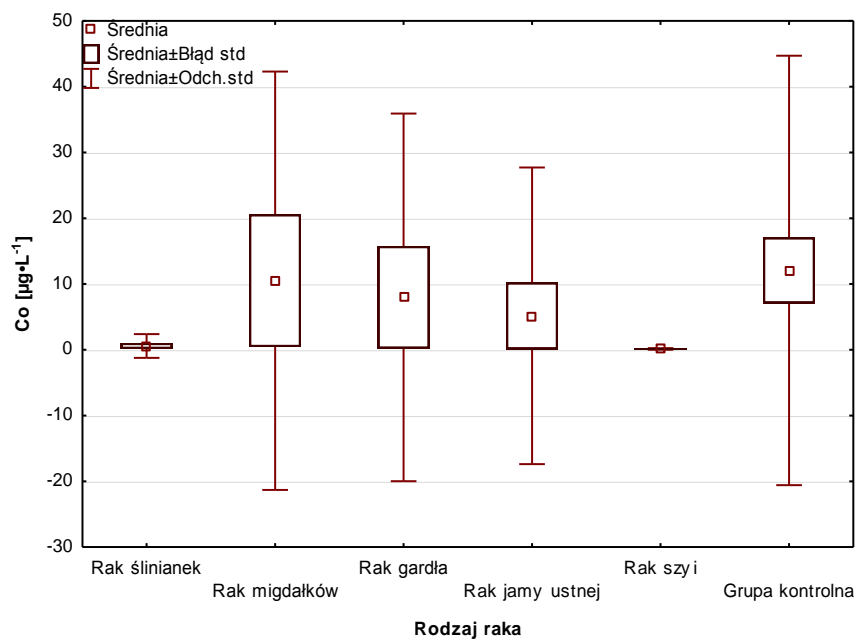
Rycina 56. Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) we włosach testem Kruskala - Wallisa



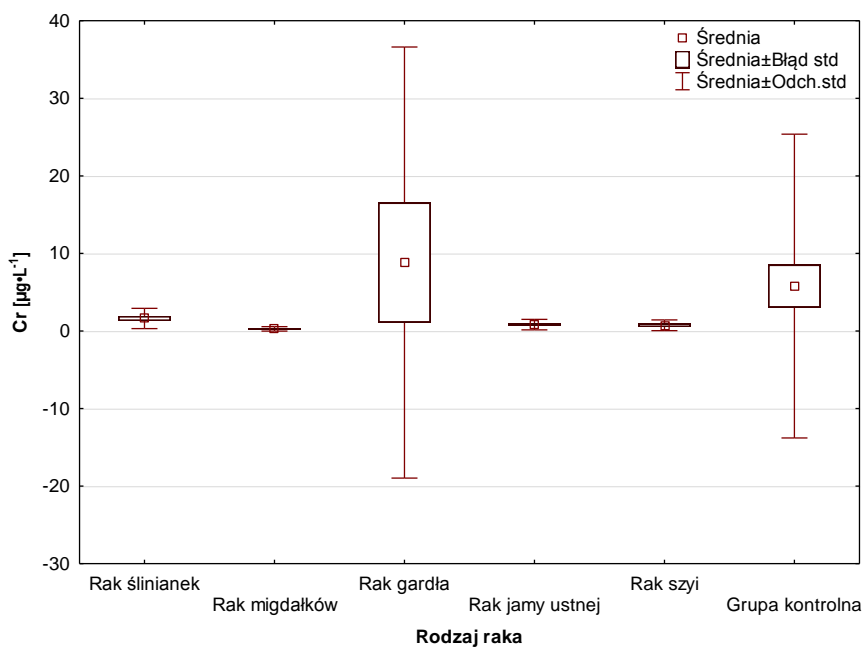
Rycina 57. Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) we włosach testem Kruskala – Wallisa



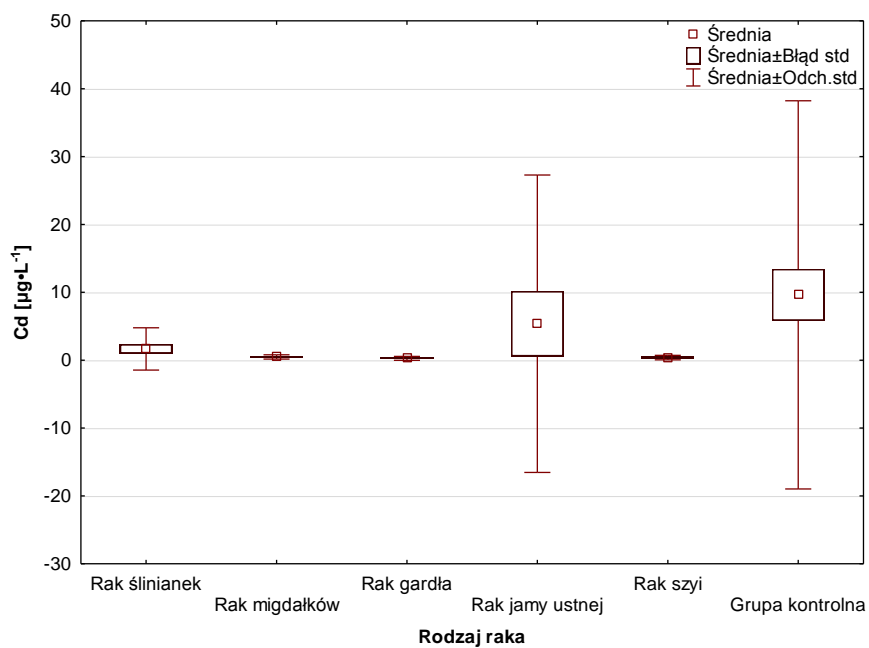
Rycina 58. Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) we włosach testem Kruskala - Wallisa



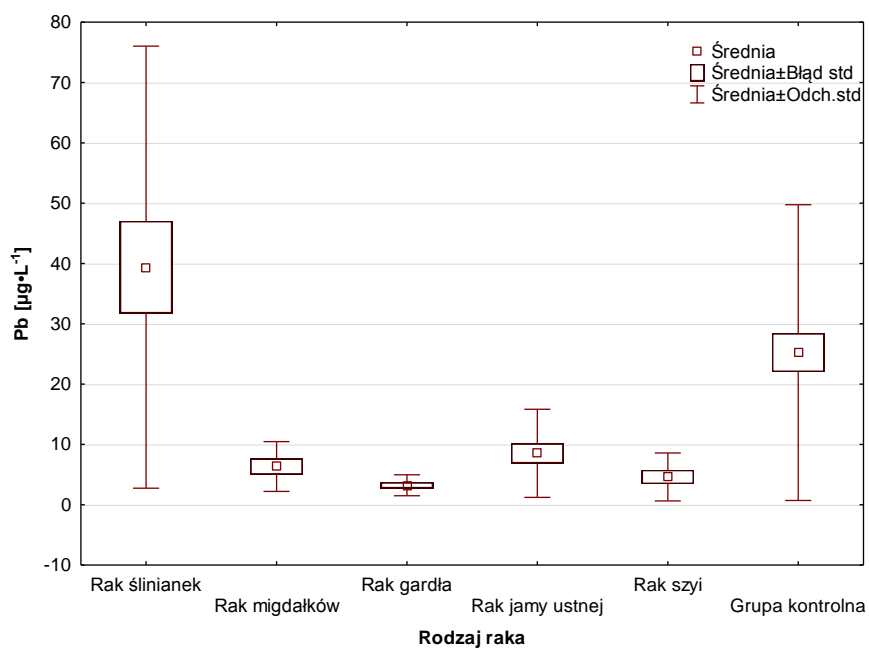
Rycina 59. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) we włosach testem Kruskala – Wallisa



Rycina 60. Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) we włosach testem Kruskala - Wallisa



Rycina 61. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) we włosach testem Kruskala – Wallisa



Rycina 62. Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) we włosach testem Kruskala - Wallisa

5.2.2.3. Analiza skupień

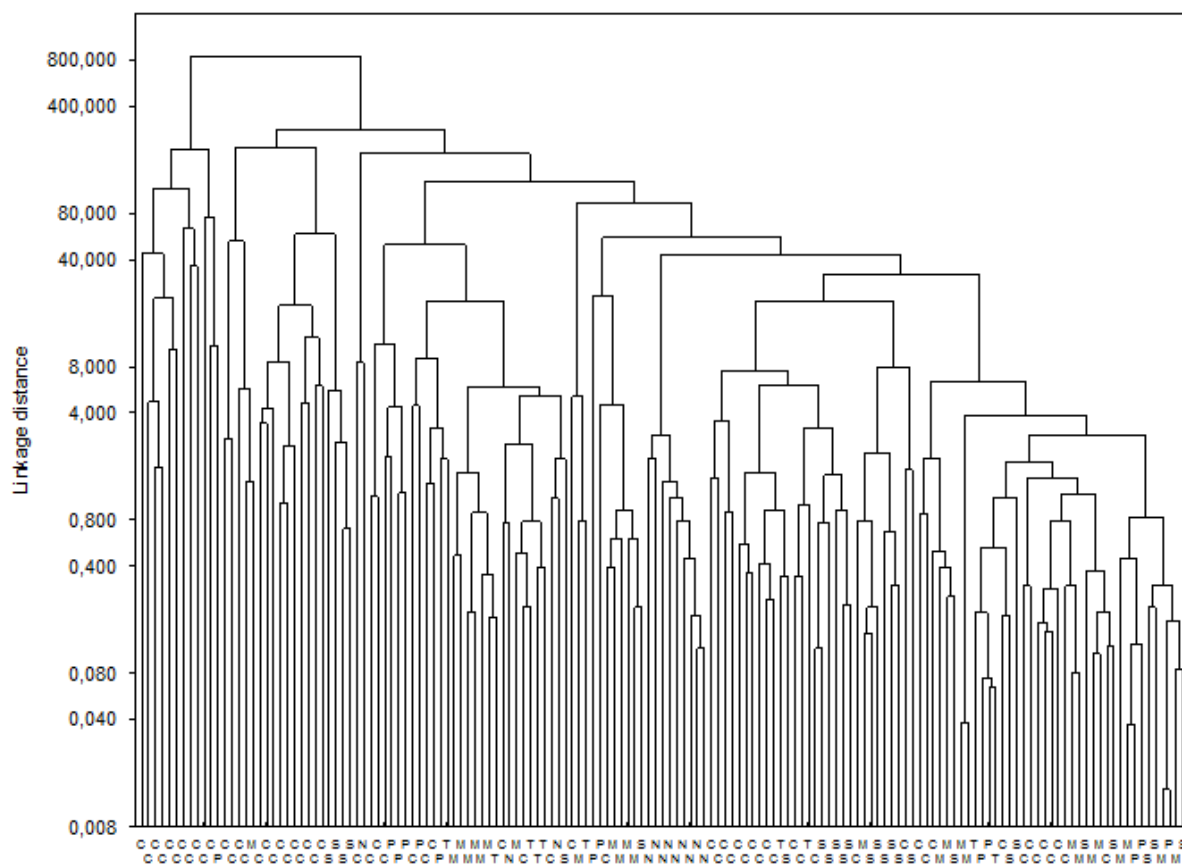
W celu sprawdzenia czy uzyskane dane otrzymane w wyniku analizy włosów, pobranych od osób z różnymi nowotworami głowy i szyi oraz zdrowych umożliwiają jednoznaczne rozróżnienie obydwu tych grup wykonano analizę skupień.

Przed analizą dane poddano autoskalowaniu. Grupowanie danych przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda. Za miarę odległości między skupieniami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa. Wyniki analizy skupień dla próbek włosów od wszystkich badanych grup przedstawiono w formie dendrogramu na Rycinie 63, natomiast Ryciny 64 - 68 przedstawiają dendrogramy otrzymane dla każdej z grup pacjentów osobno oraz grupy kontrolnej.

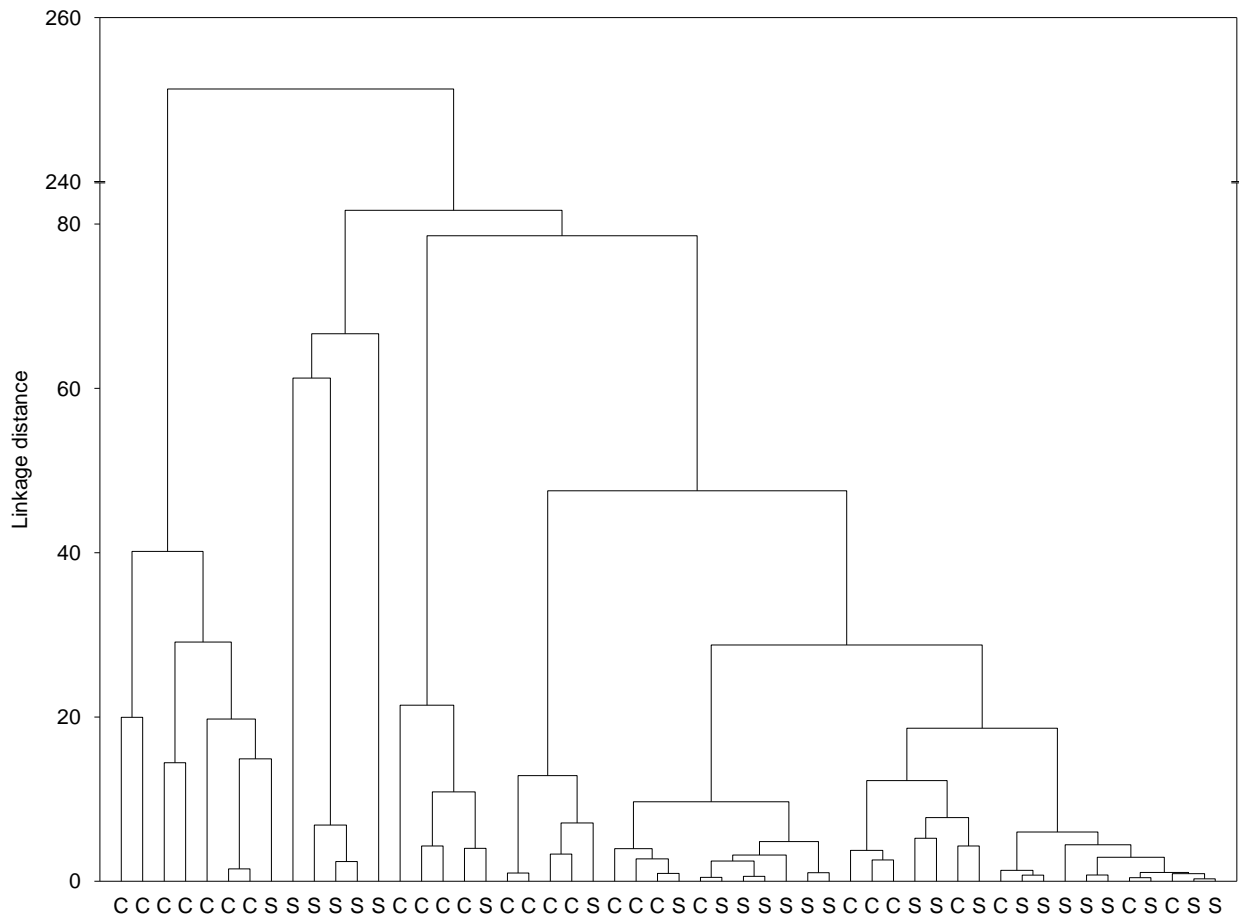
Analiza dendrogramu (Rycina 63) sporządzonego na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy wszystkich próbek włosów nie pozwala na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup.

Analiza dendrogramów (Ryciny 64 i 65) sporządzonych na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem ślinianek oraz gardła pozwala na wyróżnienie dwóch skupisk obiektów, jednak żaden z klastrów nie obejmuje wyłącznie osób z jednej grupy.

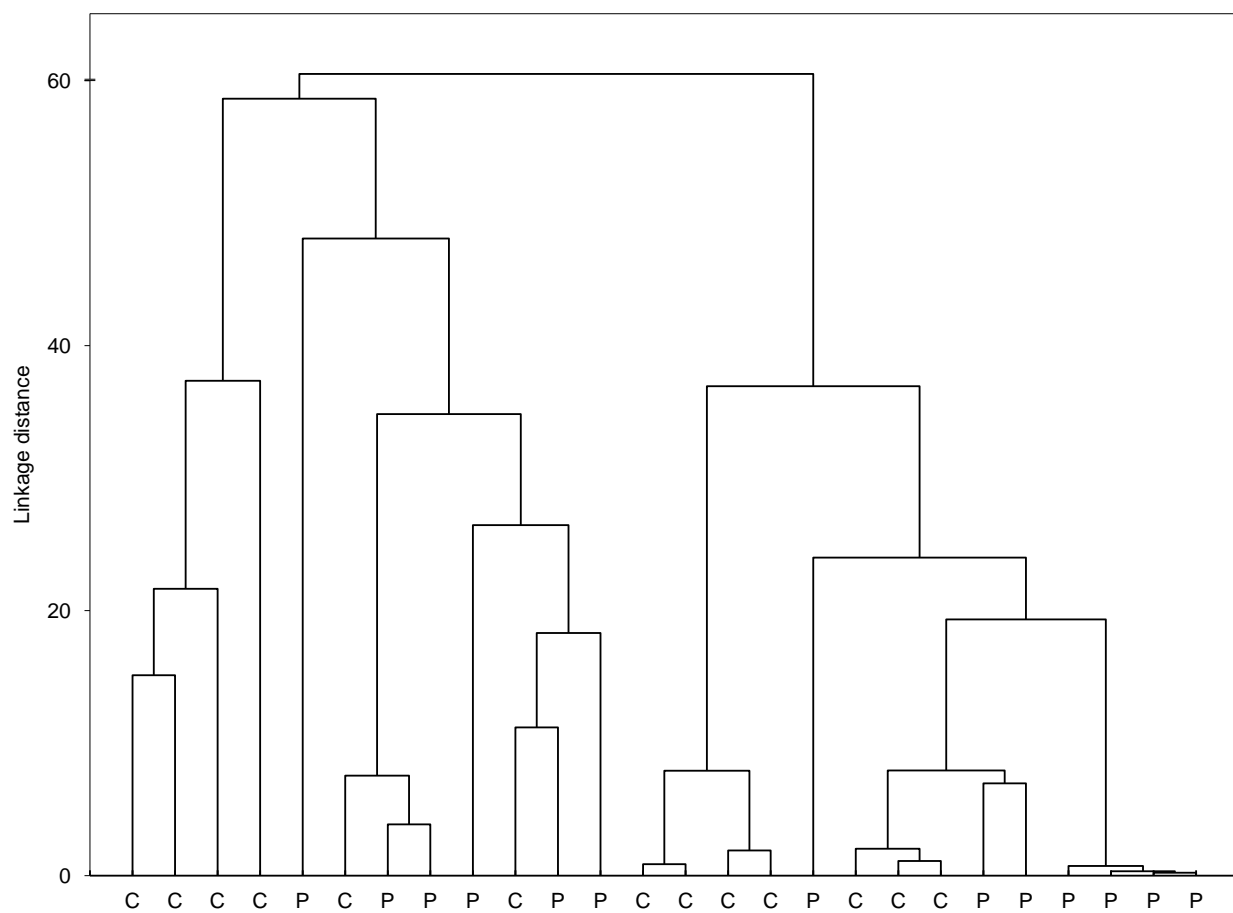
Na dendrogramie (Rycina 66) sporządzonym na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem jamy ustnej można zaobserwować dwa klaster – lewy obejmuje 12 osób z grupy kontrolnej, natomiast klaster z prawej strony obejmuje 13 osób z grupy kontrolnej oraz wszystkie osoby z rakiem jamy ustnej. W przypadku dendrogramu (Rycina 67) sporządzonego na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem szyi można zauważyć trzy klaster. Po lewej stronie znajduje się skupienie 4 zdrowych osób, środkowe obejmuje 5 osób z grupy kontrolnej i 1 osobę z rakiem szyi, zaś prawy klaster skupia 11 pacjentów i 3 zdrowe osoby. W przypadku dendrogramu (Rycina 68) dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem migdałków również nie da się wyróżnić klastrów dla obu grup.



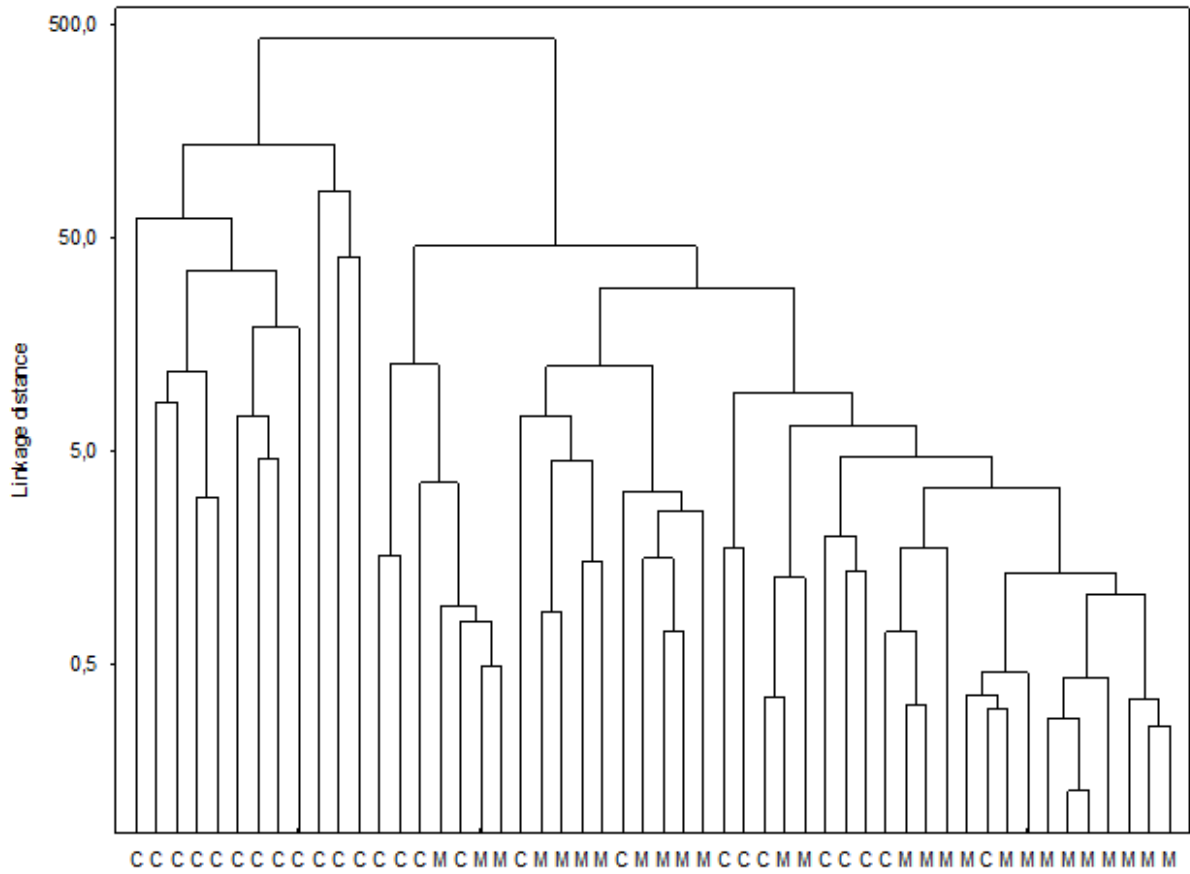
Rycina 63. Dendrogram dla wszystkich próbek włosów (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak szyi; S – rak ślinianek



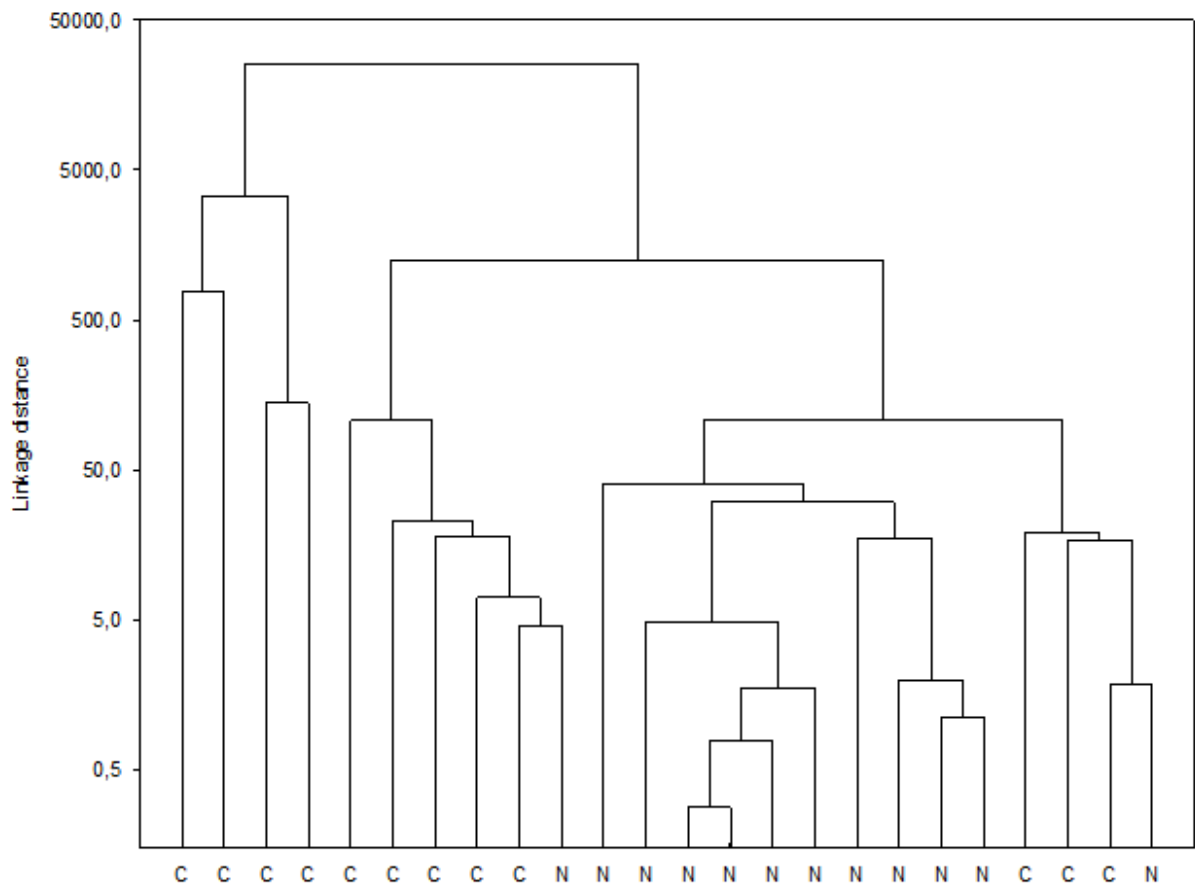
Rycina 64. Dendrogram dla próbek włosów;
 C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek



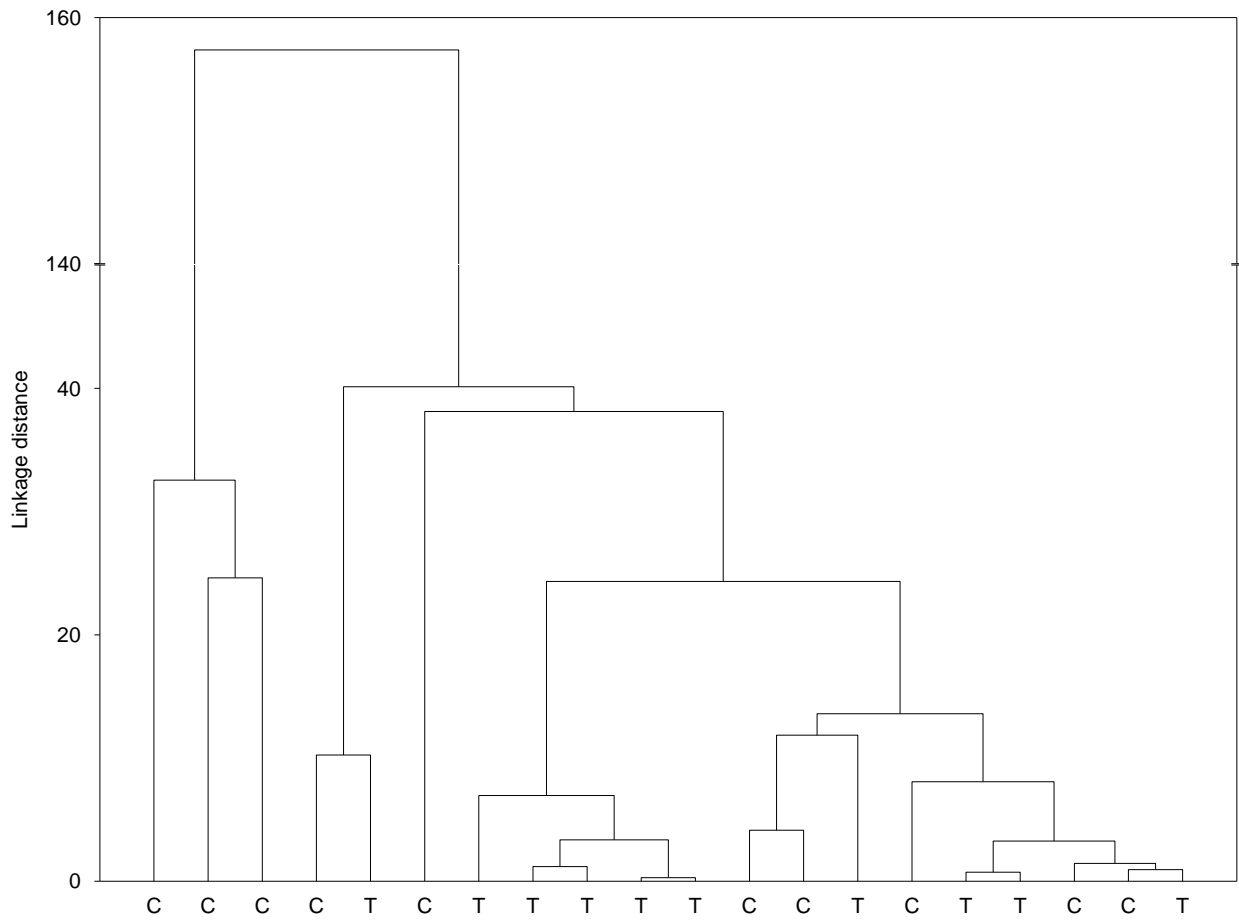
Rycina 65. Dendrogram dla wszystkich próbek włosów;
 C - grupa kontrolna; P – rak gardła



Rycina 66. Dendrogram dla próbek włosów (skala logarytmiczna);
 C - grupa kontrolna; M – rak jamy ustnej



Rycina 67. Dendrogram dla próbek włosów (skala logarytmiczna);
 C - grupa kontrolna; N – rak szyi



Rycina 68. Dendrogram dla próbek włosów;
 C - grupa kontrolna; T – rak migdałków

5.2.2.4. Analiza dyskryminacyjna

W celu stworzenia modelu różnicującego pacjentów z pięcioma rodzajami raka oraz zdrowych ludzi przeprowadzono analizę dyskryminacyjną. Zbudowano go opierając się na grupie 64 osób, u których nie zdiagnozowano nowotworu oraz 87 osób z pięcioma rodzajami nowotworów.

Ze względu na brak rozkładu normalnego stężeń analizowanych pierwiastków w badanych grupach dane zostały poddane logarytmowaniu. Równanie funkcji dyskryminacyjnej zbudowano stosując metodę krokową postępującą. Wartości parametrów, które miały wpływ na konstrukcję modelu były następujące: tolerancja - 0,01, F wprowadzania - 1, F usunięcia - zero oraz liczba kroków - 10.

Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy wszystkich dostępnych próbek umieszczono w Tabeli 38. Obliczono wartość wielowymiarowej statystyki lambda Wilksa, przybliżoną wartość statystyki F oraz odpowiadający jej poziom istotności.

Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (lambda Wilksa = 0,105; F = 7,992; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup pięciu pierwiastków, zaś wszystkie badane metale znalazły się w modelu. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma żelazo (Fe), następnie ołów (Pb) i magnez (Mg), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to miedź (Cu) i cynk (Zn).

Tabela 38. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla wszystkich grup

N=151	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Mg	0,132	0,792	7,143	0,000
Fe	0,168	0,624	16,415	0,000
Pb	0,144	0,725	10,314	0,000
Cu	0,124	0,842	5,107	0,000
Zn	0,120	0,871	4,018	0,002
Cd	0,110	0,947	1,510	0,191
Cr	0,110	0,947	1,509	0,191
Mn	0,110	0,954	1,319	0,260
Ca	0,109	0,956	1,265	0,283
Co	0,109	0,956	1,258	0,286

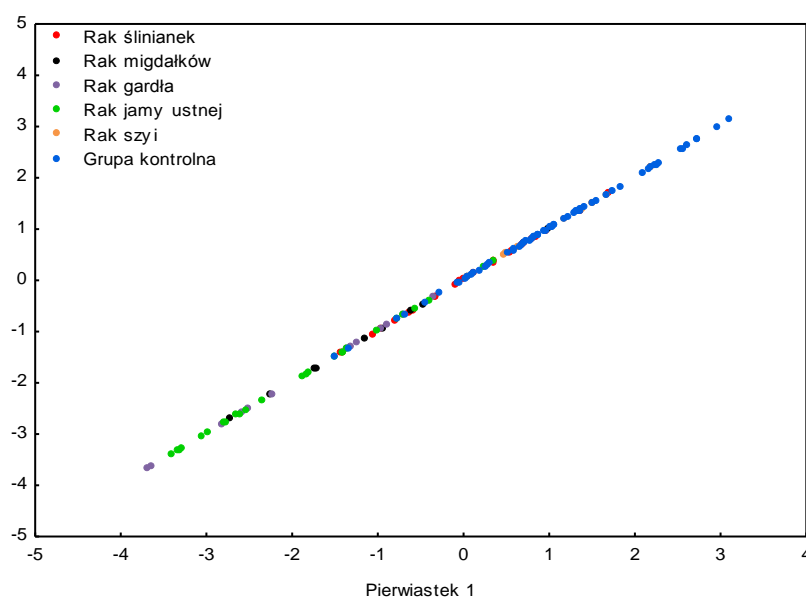
Ze względu na dyskryminację sześciu grup skonstruowano pięć funkcji dyskryminacyjnych. Ich interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które przedstawiono w Tabeli 39.

Na pierwszą funkcję dyskryminacyjną największy wpływ mają magnez (Mg) i cynk (Zn), na drugą – żelazo (Fe) i miedź (Cu), na trzecią – ołów (Pb) i magnez (Mg), na czwartą – chrom (Cr) i cynk (Zn), a na piątą – mangan (Mn) i miedź (Cu). Istotność poszczególnych funkcji dyskryminacyjnych zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że cztery pierwsze funkcje są statystycznie istotne.

Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 69.

Tabela 39. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

	Pierw1	Pierw2	Pierw3	Pierw4	Pierw5
Mg	0,665	-0,271	-0,310	-0,292	0,124
Fe	0,455	0,888	0,044	0,379	-0,275
Pb	0,235	-0,305	0,921	0,084	-0,376
Cu	-0,400	-0,306	-0,333	0,401	-0,593
Zn	-0,467	-0,198	-0,081	0,443	-0,158
Cd	-0,046	0,174	0,240	-0,426	0,101
Cr	-0,081	0,145	0,098	0,498	0,432
Mn	0,059	-0,250	-0,228	0,057	1,016
Ca	0,243	-0,132	-0,157	-0,116	-0,309
Co	0,172	-0,242	0,115	0,094	-0,377
Wart.wł.	1,633	0,875	0,563	0,185	0,047
Skum.pro	0,495	0,759	0,930	0,986	1,000



Rycina 69. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna nie rozróżnia wyraźnie wszystkich grup, jednak pozwala odróżnić głównie grupę chorych na nowotwór jamy ustnej (lewa strona wykresu) oraz grupę kontrolną (prawa strona wykresu).

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 40.

Tabela 40. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,172	Rak migdałków p=,066	Rak gardła p=,086	Rak jamy ustnej p=,172	Rak szyi p=,080	Grupa kontrolna p=,423
Mg	12,335	13,571	10,497	8,886	13,975	15,546
Fe	2,357	-1,088	1,126	1,461	7,787	2,391
Pb	9,207	4,177	2,240	5,279	3,561	6,319
Cu	11,327	13,294	17,763	14,261	7,890	12,164
Zn	15,160	15,845	18,875	18,169	12,058	14,854
Cd	-1,560	-1,530	-2,627	-1,895	-1,382	-2,488
Cr	-0,406	-1,362	-0,369	0,546	-0,045	-0,373
Mn	-19,847	-17,740	-19,268	-18,671	-19,848	-17,947
Ca	17,112	17,447	16,957	15,469	17,372	18,169
Co	-0,895	-1,656	-1,734	-1,940	-2,117	-0,888
Stała	-75,624	-74,651	-81,778	-68,114	-82,610	-85,711

Wyższa wartość bezwzględna współczynnika stojącego przy danej zmiennej wejściowej wskazuje na większy jej wpływ na tworzenie danej funkcji klasyfikacyjnej i samą klasyfikację do danej grupy.

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 41.

Prawie 73% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację, w 83,3% poprawną, uzyskano w przypadku grupy z rakiem szyi, drugą w kolejności dla grupy osób zdrowych (81,3%).

Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem migdałków – 40% poprawnych klasyfikacji.

Tabela 41. Macierz klasyfikacji

Grupa	Rak ślinianek p=,172	Rak migdałków p=,066	Rak gardła p=,086	Rak jamy ustnej p=,172	Rak szyi p=,080	Grupa kontrolna p=,423	Rak ślinianek p=,172
Rak ślinianek	65,4	17	0	0	5	0	4
Rak migdałków	40,0	0	4	1	2	0	3
Rak gardła	61,5	0	0	8	4	0	1
Rak jamy ustnej	73,1	1	0	3	19	0	3
Rak szyi	83,3	0	0	0	0	10	2
Grupa kontrolna	81,3	8	0	2	1	1	52
Razem	72,8	26	4	14	31	11	65

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej postanowiono stworzyć model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek włosów od tych dwóch grup zaprezentowano w Tabeli 42.

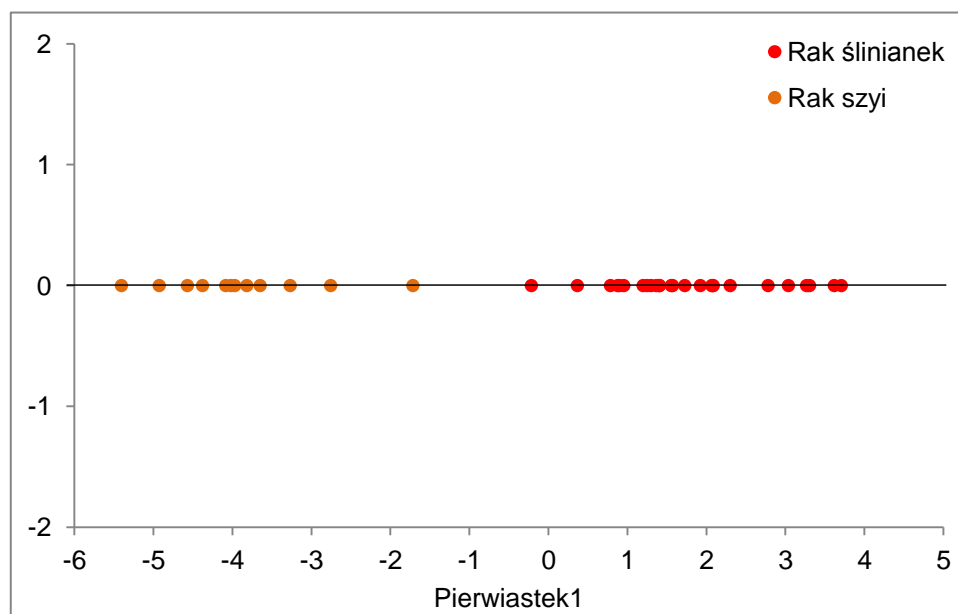
Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (λ Wilksa = 0,120; $F = 46,968$; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup jedynie trzech z pięciu pierwiastków, które znalazły się w modelu. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma żelazo (Fe).

Tabela 42. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi

N=38	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Częstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Fe	0,302	0,397	48,585	0,000
Pb	0,164	0,731	11,759	0,002
Mg	0,151	0,796	8,194	0,007
Cu	0,132	0,907	3,288	0,079
Cd	0,130	0,919	2,822	0,103

Ze względu na dyskryminację dwóch grup skonstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanonicznej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą - 0,862 dla żelaza (Fe), 0,645 dla ołowiu (Pb) i - 0,570 dla magnezu (Mg). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna. Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 70.

Funkcja dyskryminacyjna rozróżnia wyraźnie obydwie grupy – na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem szyi są po lewej stronie wykresu, a z nowotworem ślinianek - po prawej stronie wykresu.



Rycina 70. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 43.

Tabela 43. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,684	Rak szyi p=,318
Fe	25,344	40,785
Pb	-7,772	-17,194
Mg	42,100	54,157
Cu	14,315	5,998
Cd	-8,296	-11,833
Stała	-88,344	-147,970

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 44.

Klasyfikacja jest w 100% poprawna w przypadku obu grup.

Tabela 44. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak ślinianek p=,684	Rak szyi p=,318
Rak ślinianek	100	26	0
Rak szyi	100	0	12
Razem	100	26	12

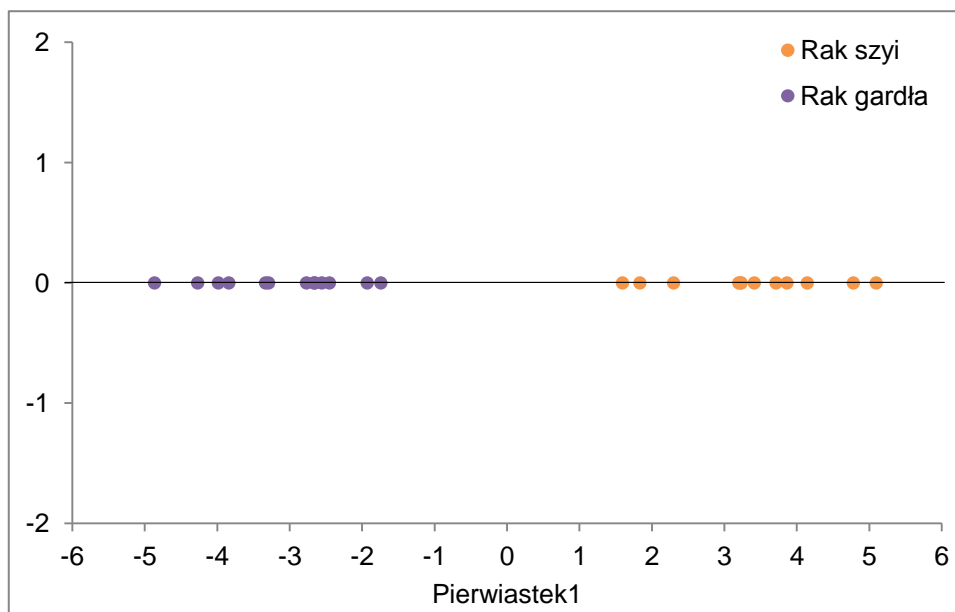
Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem szyi oraz gardła. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek włosów od tych dwóch grup przedstawiono w Tabeli 45.

Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (lambda Wilksa = 0,081; $F = 124,94$; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup jedynie dwóch z dziesięciu pierwiastków: żelaza (Fe) oraz miedzi (Cu), zaś aż osiem pierwiastków znalazło się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma żelazo (Fe).

Tabela 45. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem szyi oraz gardła

N=25	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Fe	0,535	0,151	123,335	0,000
Cu	0,277	0,292	53,389	0,000

Ze względu na dyskryminację dwóch grup konstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą kolejno 1,366 dla żelaza (Fe) oraz -1,248 dla miedzi (Cu). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna. Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 71.



Rycina 71. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna rozróżnia wyraźnie obydwie grupy – na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem gardła są po lewej stronie wykresu, a z nowotworem szyi - po prawej stronie wykresu.

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 46.

Tabela 46. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak gardła p=,520	Rak szyi p=,480
Fe	4,952	24,497
Cu	11,111	-13,992
Stała	-15,240	-36,790

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 47.

Klasyfikacja jest w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

Tabela 47. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak gardła p=,520	Rak szyi p=,480
Rak szyi	100	13	0
Rak migdałków	100	0	12
Razem	100	13	12

5.2.3. Paznokcie

5.2.3.1. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową a grupą kontrolną

Przeprowadzono pierwiastkową analizę ilościową próbek paznokci od 80 osób ze zdiagnozowanym nowotworem: 23 z rakiem ślinianek, 13 z rakiem gardła, 22 z rakiem jamy ustnej, 12 z rakiem szyi oraz 10 z rakiem migdałków.

Zanalizowano 61 próbek paznokci od zdrowych osób, spośród których dla każdej grupy chorych wybierano losowo grupę kontrolną o identycznej liczności.

Na podstawie otrzymanych wyników analiz wyznaczono podstawowe parametry analityczne dla każdej badanej grupy osobno - średnie stężenia poszczególnych metali w paznokciach, ich zakres oraz odchylenie standardowe. Wyniki zestawiono w Tabeli 48.

W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w paznokciach w poszczególnych grupach pacjentów oraz kontrolnej przeprowadzono w pierwszej kolejności testy normalności rozkładu zmiennej - test W Shapiro - Wilka oraz Kołmogorowa - Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Założenie normalności nie zostało spełnione w przypadku wszystkich pierwiastków w badanych grupach, więc do porównania średnich stężeń pomiędzy dwoma grupami stosowano nieparametryczny test U Manna - Whitney'a.

We wszystkich analizach za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p \leq 0,05$. Poniżej tej wartości rezultat oceniano jako statystycznie istotny.

Tabela 48. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna w paznokciach w badanych grupach [$\mu\text{g g}^{-1}$]

		Ca*	Mg*	Cu	Fe	Zn	Mn	Co	Cr	Cd	Pb
Rak ślinianek (n=23)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	2,17 \pm 0,95	0,94 \pm 0,75	23,87 \pm 18,01	0,27 \pm 0,15*	109,42 \pm 48,96	3,24 \pm 1,64	0,17 \pm 0,15	2,07 \pm 1,20	1,40 \pm 1,38 ^a	18,45 \pm 18,05 ^a
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	1,02-4,50	0,26-3,80	5,19-79,26	0,07-0,61*	63,25-293,52	0,58-5,95	LOD-0,71	0,80-4,97	LOD-5,46	2,40-83,05
Rak gardła (n=13)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	1,34 \pm 0,44 ^a	0,23 \pm 0,11 ^a	12,68 \pm 9,45	82,34 \pm 37,75 ^a	134,217 \pm 8,69	1,29 \pm 0,86 ^a	0,02 \pm 0,03	1,93 \pm 1,88	0,09 \pm 0,11	4,27 \pm 3,22
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	0,87-2,14	0,13-0,43	5,41-41,20	3,73-127,63	48,02-287,76	0,12-2,89	LOD-0,09	0,23-6,01	LOD-0,41	0,57-11,59
Rak jamy ustnej (n=22)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	1,27 \pm 0,30 ^a	0,25 \pm 0,11 ^a	10,22 \pm 7,95 ^a	127,86 \pm 108,05 ^a	116,05 \pm 66,32	1,39 \pm 0,98 ^a	0,04 \pm 0,04 ^a	1,00 \pm 0,89 ^a	0,46 \pm 0,65	5,54 \pm 6,23 ^a
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	0,75-1,82	0,14-0,55	2,24-39,53	23,18-400,35	31,84-278,26	0,34-3,90	LOD-0,15	0,16-3,53	LOD-2,43	1,16-20,50
Rak szyi (n=12)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	2,26 \pm 1,18	0,94 \pm 0,45	10,95 \pm 5,28	169,70 \pm 112,57	131,98 \pm 82,98	1,79 \pm 0,79	0,07 \pm 0,06	3,01 \pm 1,93	0,29 \pm 0,19	11,46 \pm 8,63
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	1,19-5,16	0,18-1,79	4,78-18,94	56,32-413,09	58,07-361,92	0,72-3,07	LOD-0,24	0,72-7,27	0,05-0,69	2,75-34,22
Rak migdałków (n=10)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	1,45 \pm 0,60 ^a	0,32 \pm 0,13 ^a	14,38 \pm 7,20	179,62 \pm 99,53 ^a	228,87 \pm 153,19	2,25 \pm 1,49 ^a	0,09 \pm 0,08	12,51 \pm 31,28	0,32 \pm 0,38	3,64 \pm 2,85 ^a
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	0,51-2,18	0,19-0,54	5,06-24,78	67,13-363,79	89,83-591,27	0,76-5,19	LOD-0,21	0,42-101,00	LOD-0,98	1,31-10,65
Grupa kontrolna (n=61)	Średnie stężenie \pm SD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	2,74 \pm 1,60	0,78 \pm 0,450	19,22 \pm 15,53	0,31 \pm 0,24*	124,03 \pm 64,14	3,70 \pm 2,65	0,15 \pm 0,16	2,02 \pm 1,72	0,61 \pm 1,14	9,54 \pm 8,52
	Zakres [$\mu\text{g g}^{-1}$]	0,80-8,80	0,11-1,91	5,52-101,00	0,03-1,09*	4,59-327,99	0,34-12,85	LOD-0,70	0,12-7,44	LOD-5,37	1,15-42,36

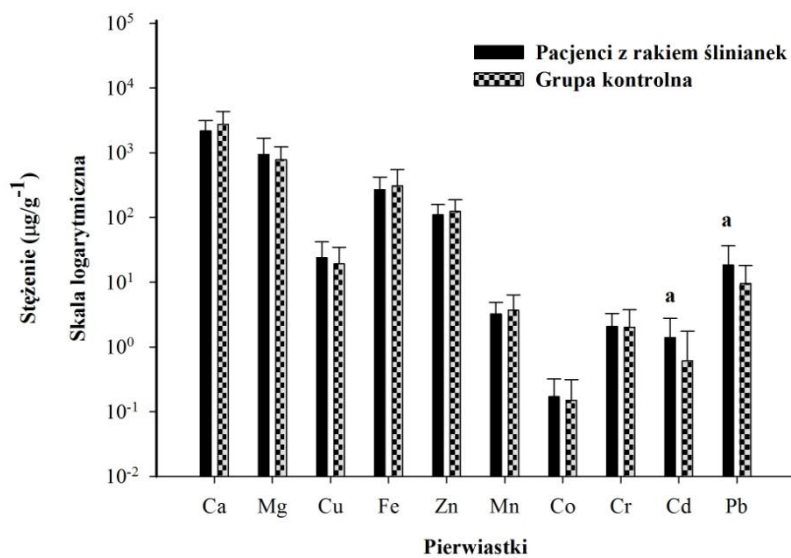
*stężenia w [mg g^{-1}]; ^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna-Whitney'a)

Wyniki przeprowadzonego testu U Manna - Whitneya wskazują na statystycznie istotne różnice w średnich zawartościach następujących metaliw grupach osób z rakiem:

- ślinianek: kadmu (Cd), ołowiu (Pb) – Rycina 72
- gardła: wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe), manganu (Mn) – Rycina 73
- jamy ustnej: wapnia (Ca), magnezu (Mg), miedzi (Cu), żelaza (Fe), manganu (Mn), kobaltu (Co), chromu (Cr), ołowiu (Pb) – Rycina 74
- migdałków: wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe), manganu (Mn), ołowiu (Pb) – Rycina 75.

Stężenia metali dla grupy osób z rakiem szyi nie różnią się w sposób statystycznie istotny od grupy kontrolnej – Rycina 76.

Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek i grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 72.

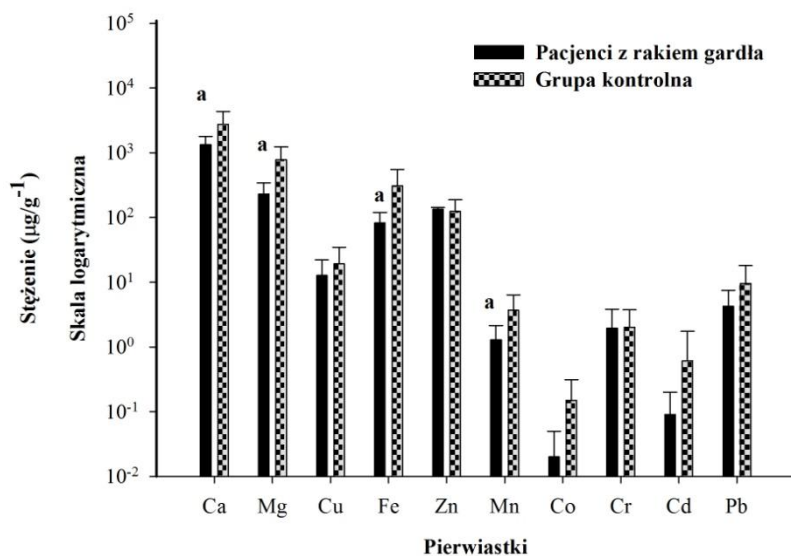


Rycina 72. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Na Rycinie 73 przedstawiono porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pacjentów z nowotworem gardła z grupą kontrolną pacjentów.

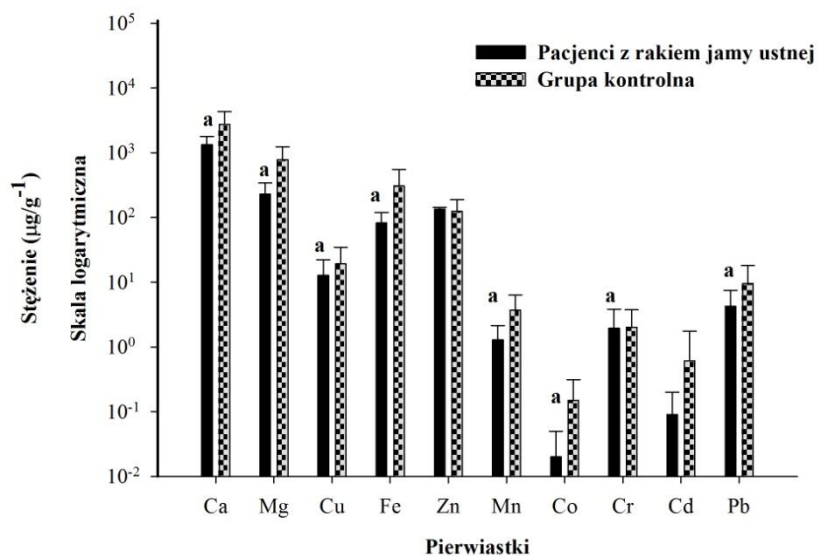


Rycina 73. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Na Rycinie 74 przedstawiono porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pacjentów z nowotworem jamy ustnej z grupą kontrolną pacjentów.

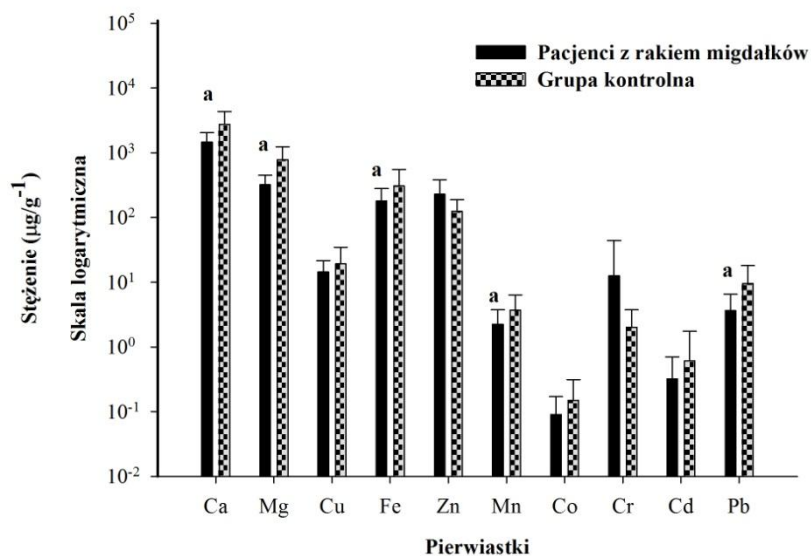


Rycina 74. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Porównanie średnich poziomów pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną przedstawiono na Rycinie 75.

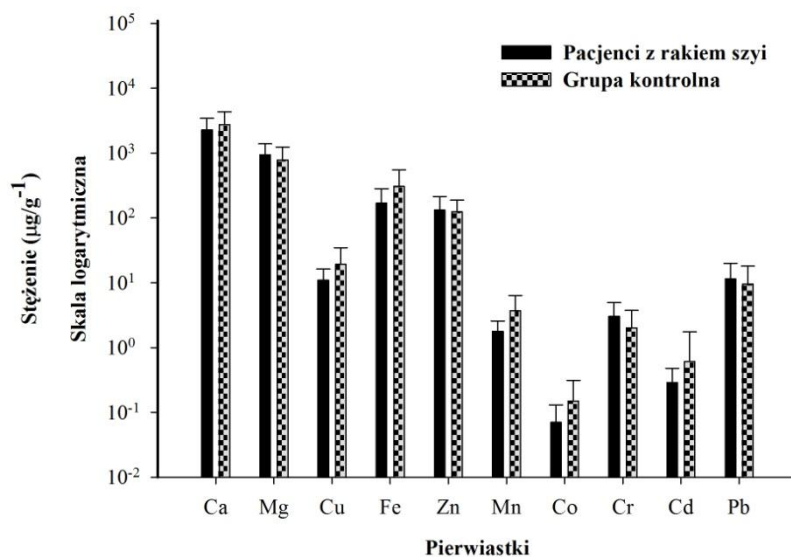


Rycina 75. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

W paznokciach pacjentów z nowotworem szyi nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomach stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej. Wizualizacja graficzna tego porównania przedstawiona została na Rycinie 76.



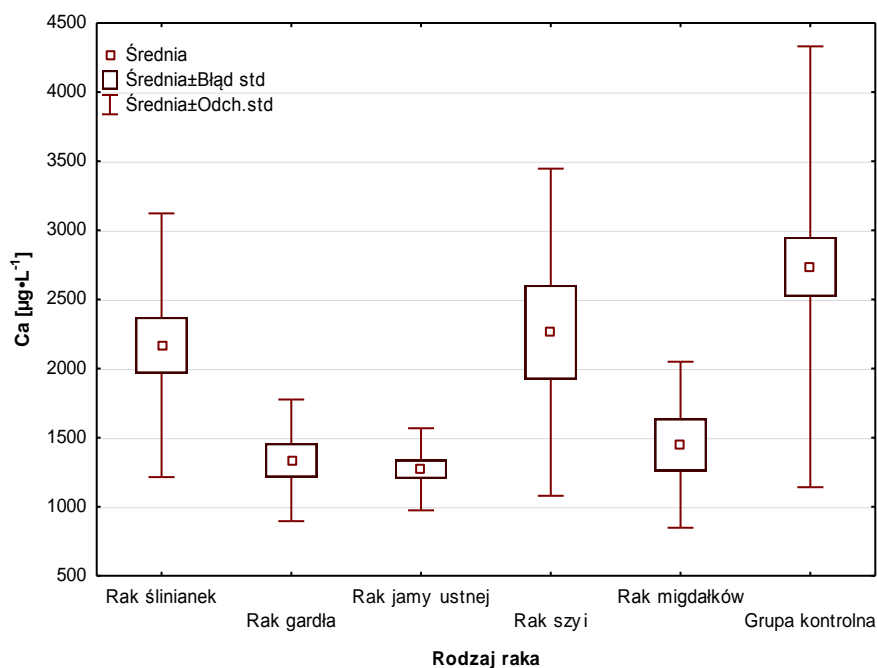
Rycina 76. Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną

5.2.3.2. Analiza porównawcza stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z chorobą nowotworową

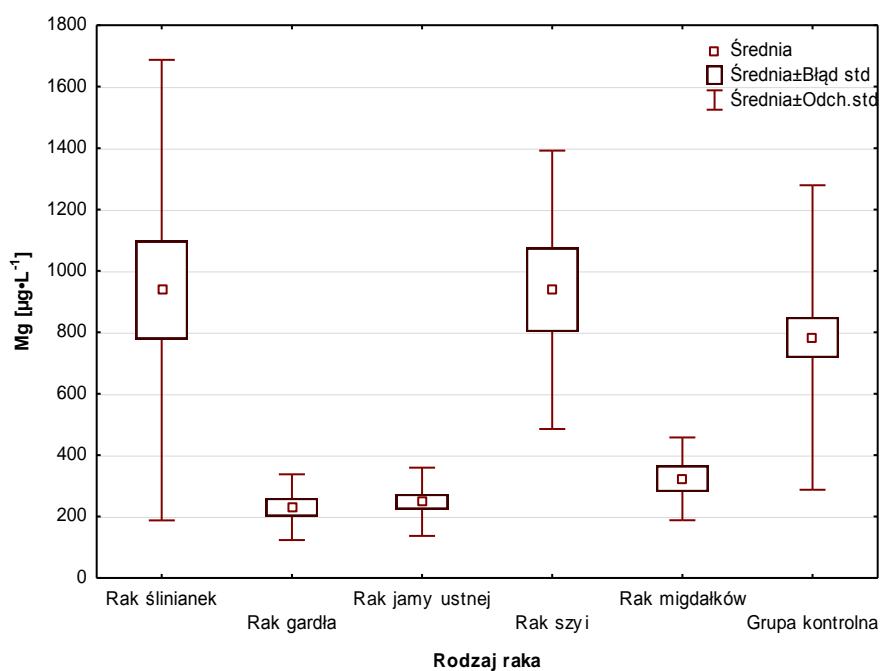
W celu statystycznej oceny różnic między średnimi wartościami stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów przeprowadzono za pomocą nieparametrycznej analizy wariancji - testu ANOVA rang Kruskala - Wallisa. Wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 49 (zestawiono tam tylko grupy, których stężenia danego pierwiastka różniły się w sposób statystycznie istotny z $p < 0,05$) oraz graficznie na Rycinach 77 - 86.

Tabela 49. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala-Wallisa

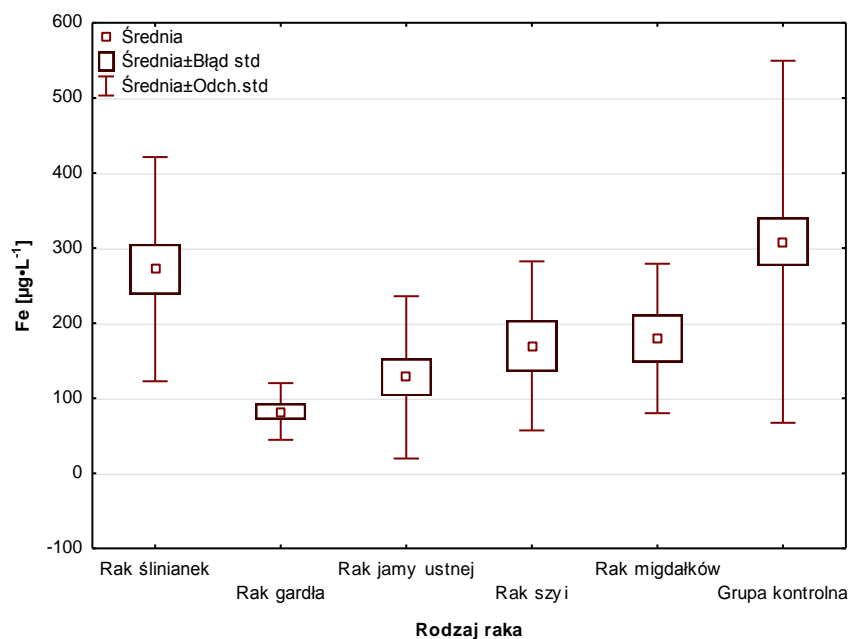
Pierwiastek	Zmienna grupująca: grupy Grupa A: Rak ślinianek (n=23) Grupa B: Rak gardła (n=13) Grupa C: Rak jamy ustnej (n=22) Grupa D: Rak szyi (n=12) Grupa E: Rak migdałków (n=10)	
	Test Kruskala-Wallisa	p
Ca	A vs C	0,04
Mg	A vs B	0,0000
	A vs C	0,0000
	A vs E	0,03
	B vs D	0,0004
	C vs D	0,0003
Cu	A vs C	0,005
Fe	A vs B	0,005
	A vs C	0,02
Mn	A vs B	0,01
	A vs B	0,004
Co	A vs B	0,002
	A vs C	0,01
Cr	C vs D	0,005
Cd	A vs B	0,0000
	A vs C	0,05
Pb	A vs B	0,0006
	A vs C	0,0003
	A vs E	0,0006



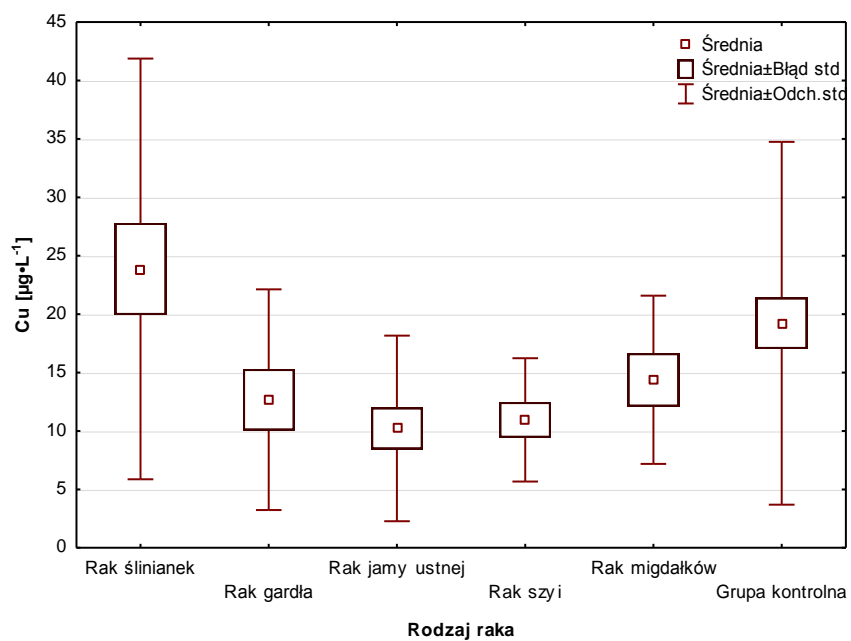
Rycina 77. Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



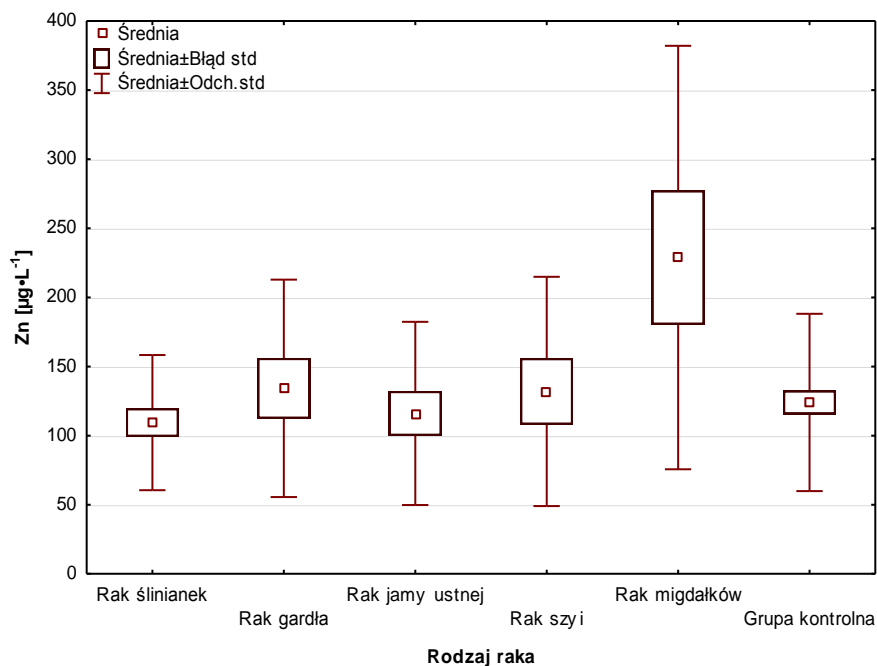
Rycina 78. Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



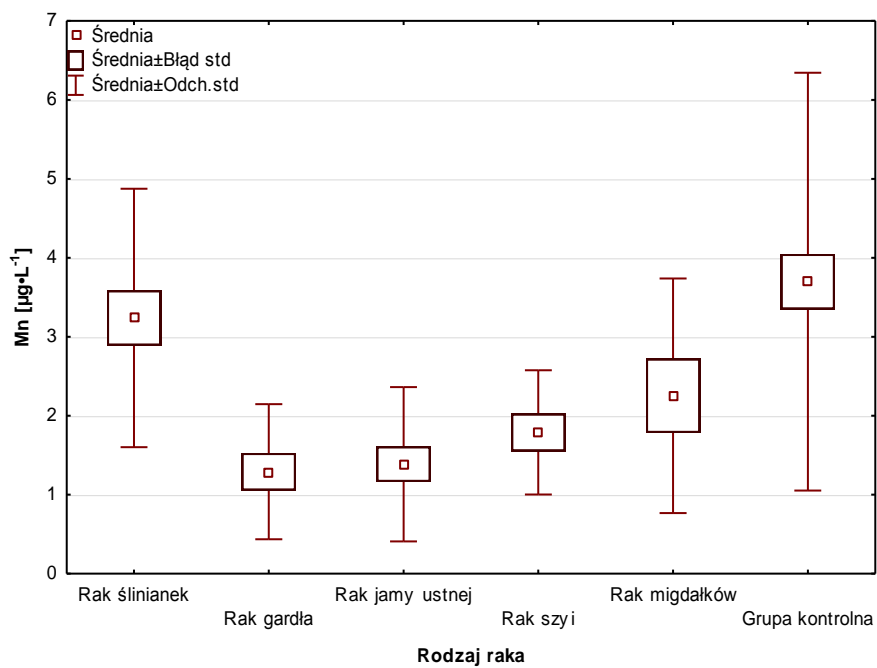
Rycina 79. Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



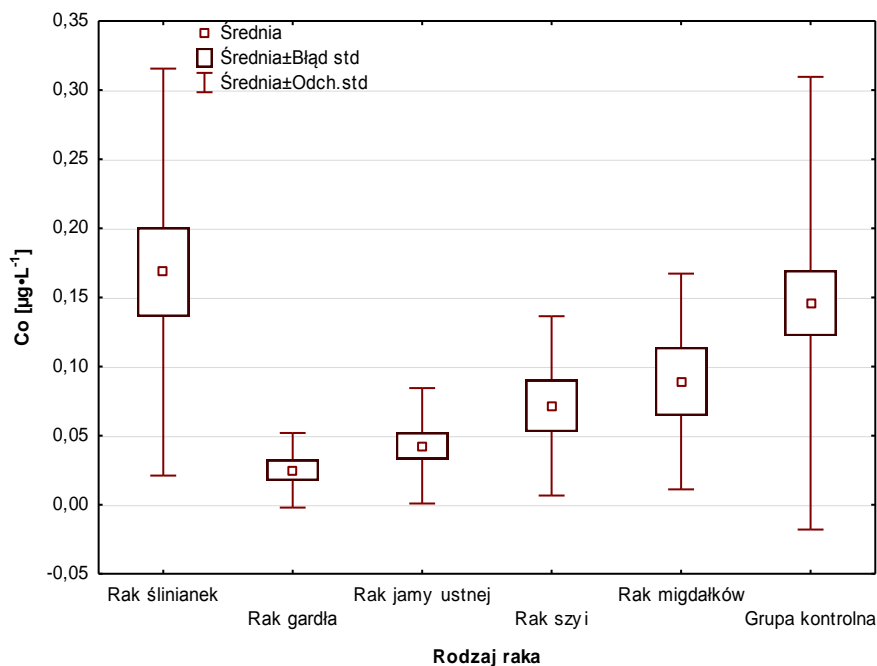
Rycina 80. Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



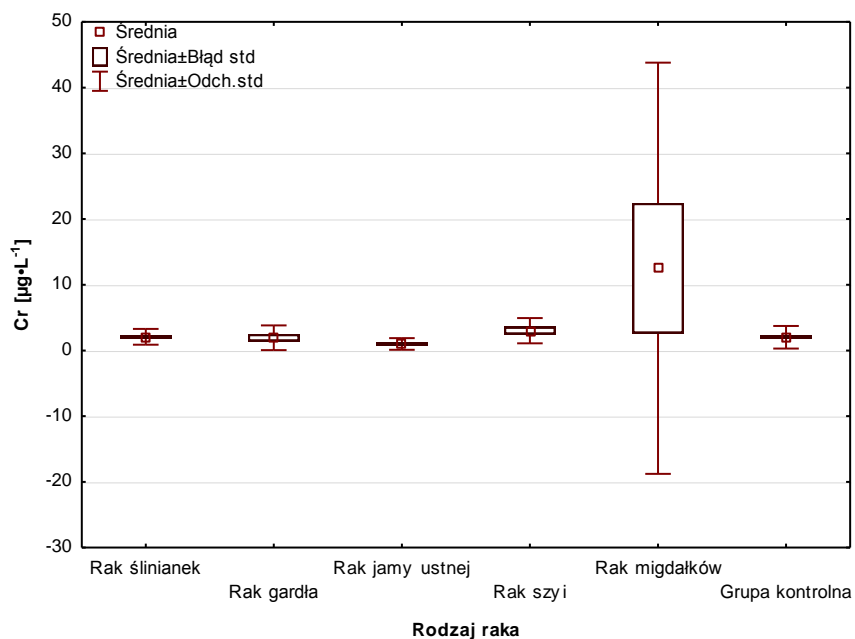
Rycina 81. Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



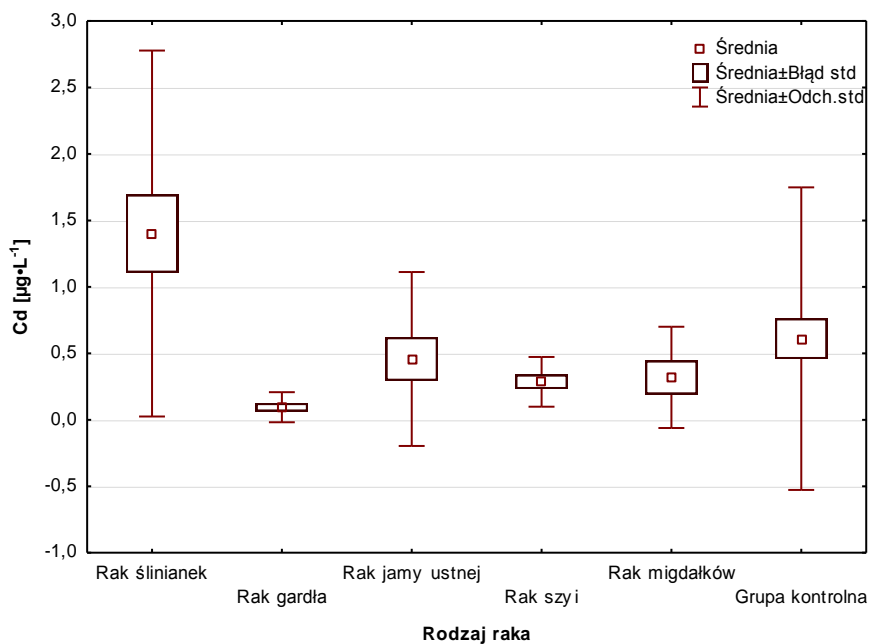
Rycina 82. Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



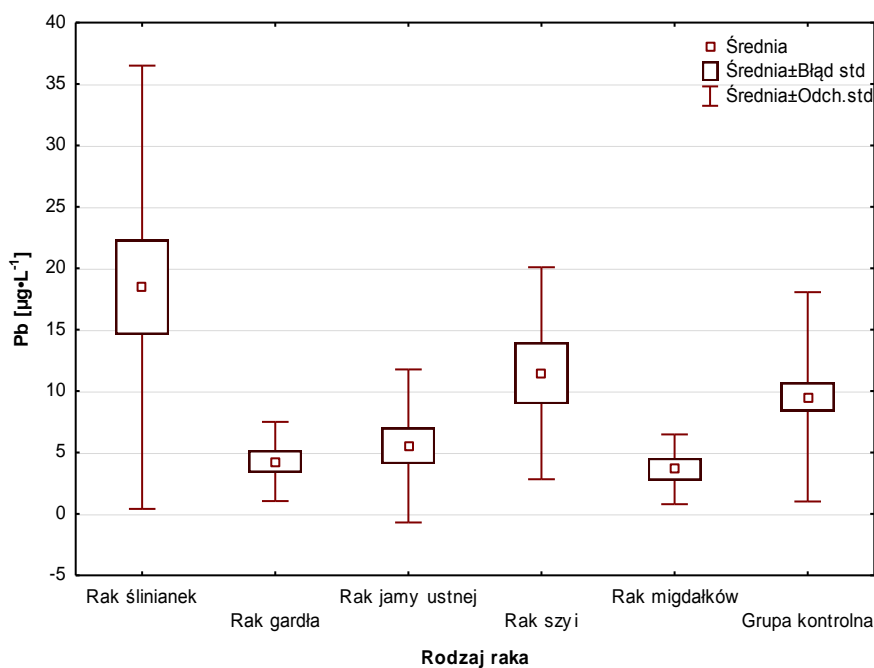
Rycina 83. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) w paznokciach testem Kruskala-Wallis



Rycina 84. Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) w paznokciach testem Kruskala-Wallis



Rycina 85. Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa



Rycina 86. Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) w paznokciach testem Kruskala-Wallisa

5.2.3.3. Analiza skupień

W celu sprawdzenia czy uzyskane dane otrzymane w wyniku analizy paznokci, pobranych od osób z różnymi nowotworami głowy i szyi oraz zdrowych umożliwiają jednoznaczne rozróżnienie obydwu tych grup wykonano analizę skupień.

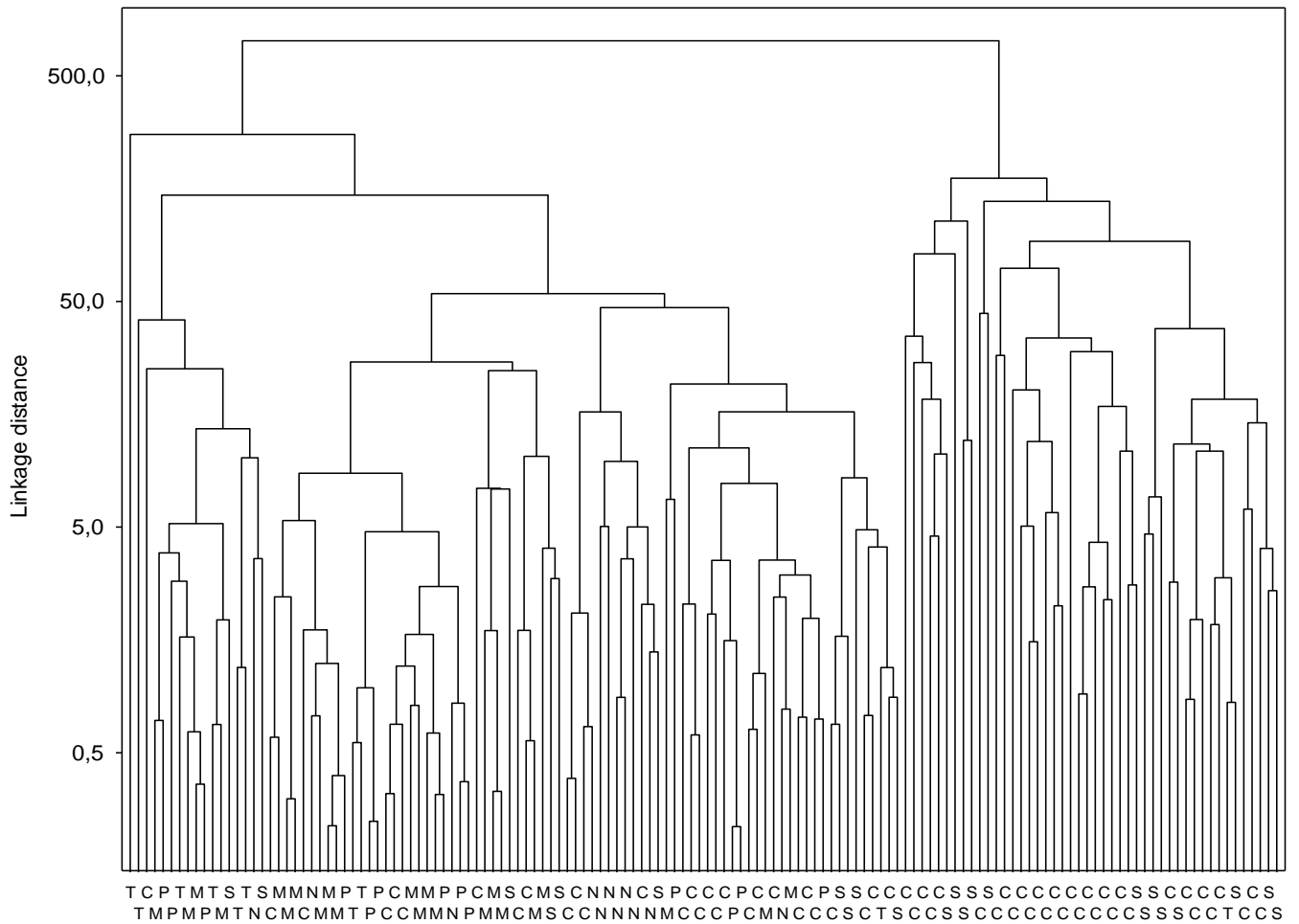
Przed analizą dane poddano autoskalowaniu. Grupowanie danych przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda. Za miarę odległości między skupieniami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa. Wyniki analizy skupień dla próbek paznokci od wszystkich badanych grup przedstawiono w formie dendrogramu na Rycinie 87, natomiast Ryciny 88 - 92 przedstawiają dendrogramy otrzymane dla każdej z grup pacjentów osobno oraz grupy kontrolnej.

Analiza dendrogramu (Rycina 87) sporządzonego na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy wszystkich próbek paznokci nie pozwala na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup. Można jednak zauważyć, że klaster po prawej stronie w znacznej części składa się z osób z grupy kontrolnej.

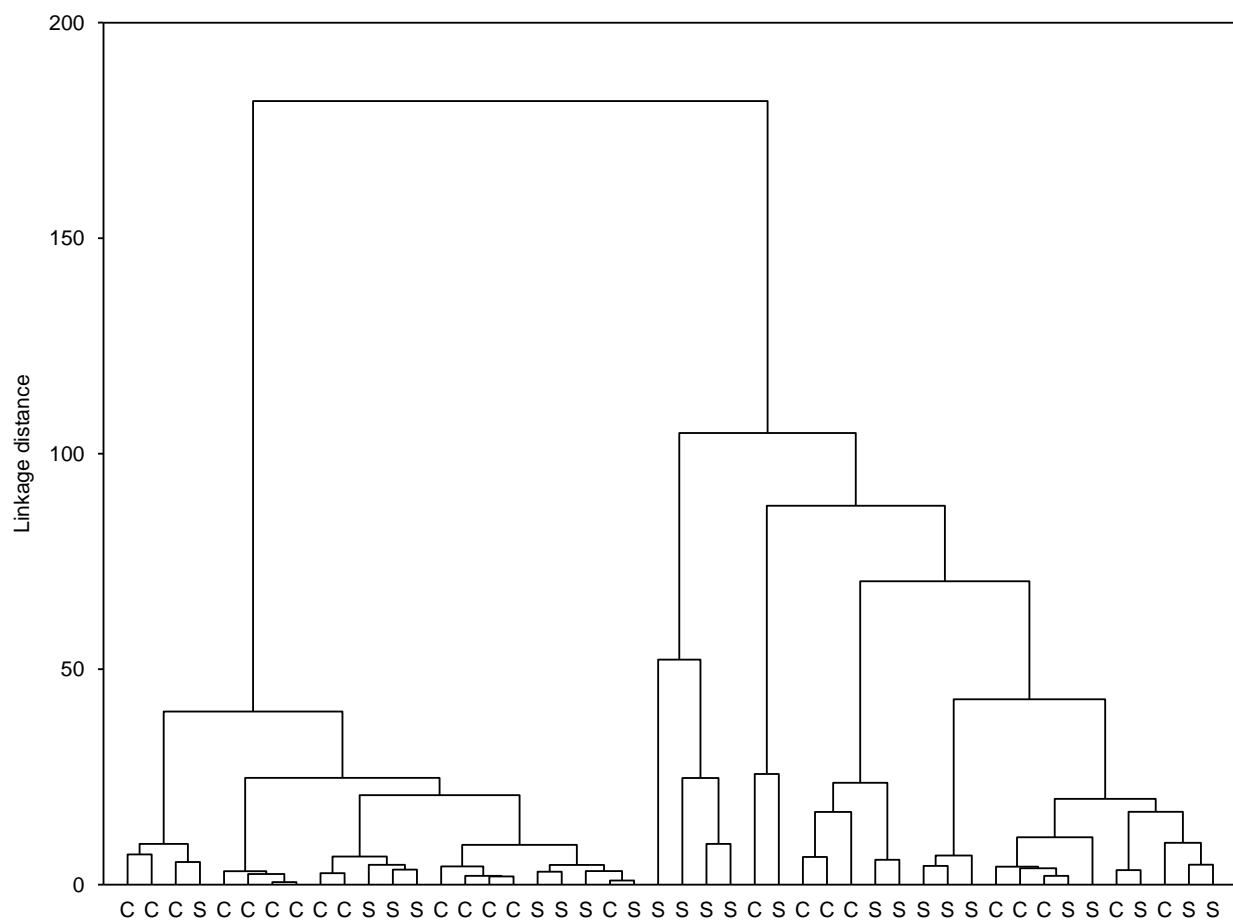
Analiza dendrogramu (Rycina 88) sporządzonego na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem ślinianek nie pozwala na wyraźne wyróżnienie dwóch skupisk obiektów. Dwa klasterzy nie obejmują wyłącznie osób z jednej grupy – w lewym znajduje się 14 osób z grupy kontrolnej oraz 8 z rakiem ślinianek, zaś w prawym – 15 pacjentów i 9 zdrowych osób.

W przypadku dendrogramu (Rycina 89) sporządzonego na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem gardła podział jest bardziej wyraźny. Lewy klaster obejmuje wyłącznie osoby z grupy kontrolnej, natomiast w klasterze z prawej strony skupione są wszystkie osoby z rakiem gardła oraz 5 osób z grupy kontrolnej. Podobne grupowanie widać na dendrogramie (Rycina 90) sporządzonym na podstawie wyników dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem jamy ustnej. Po lewej stronie znajduje się skupienie obejmujące wyłącznie zdrowe osoby, zaś prawy klaster skupia wszystkich pacjentów i 9 osób z grupy kontrolnej.

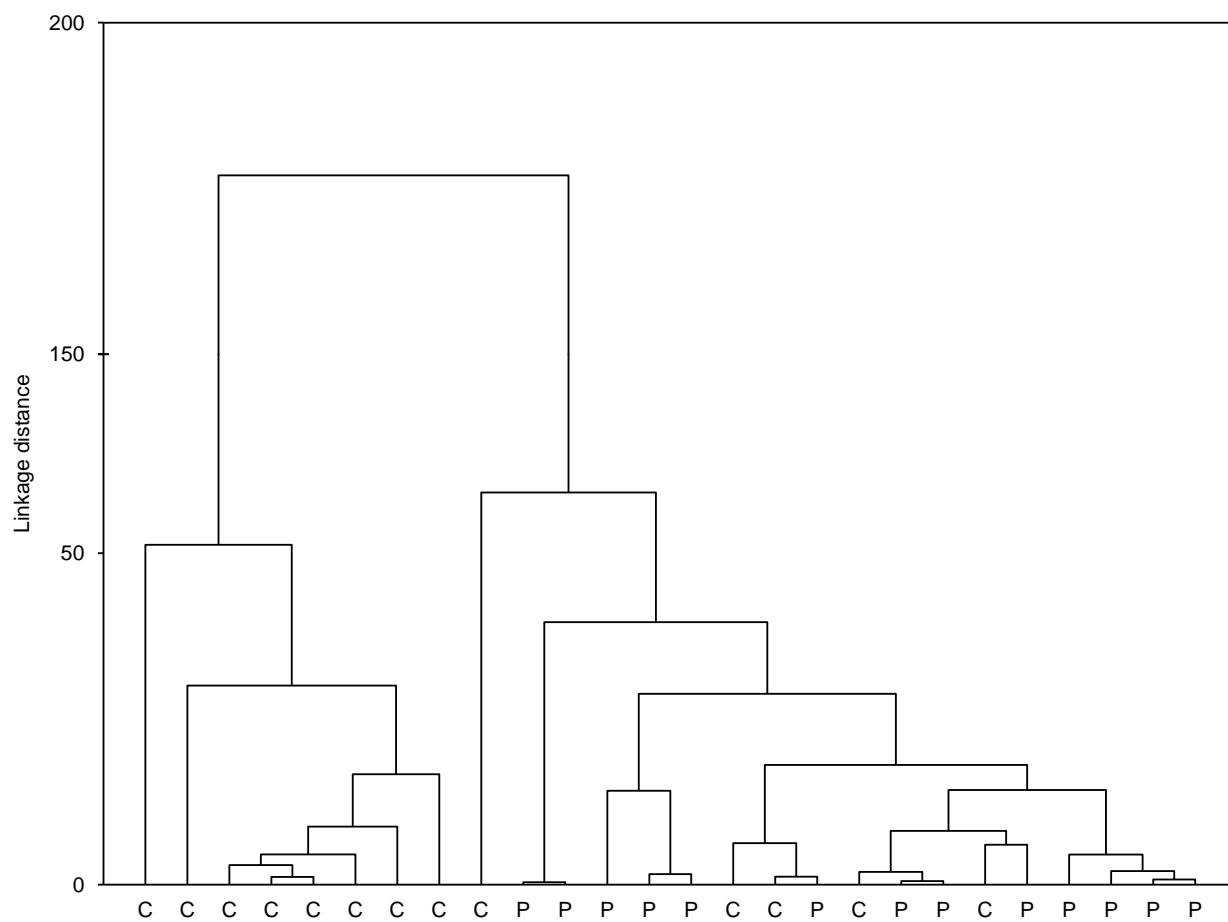
Analiza dendrogramu (Rycina 91) dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem szyi nie pozwala na wyraźne wyróżnienie klasterów dla obu grup. Z kolei na dendrogramie (Rycina 92) sporządzonym dla wyników od osób z grupy kontrolnej oraz pacjentów z rakiem migdałków wyraźnie widać podział na te dwie grupy – prawy klaster skupia zdrowe osoby (z jednym pacjentem), zaś lewy – osoby z nowotworem (z dwoma zdrowymi osobami).



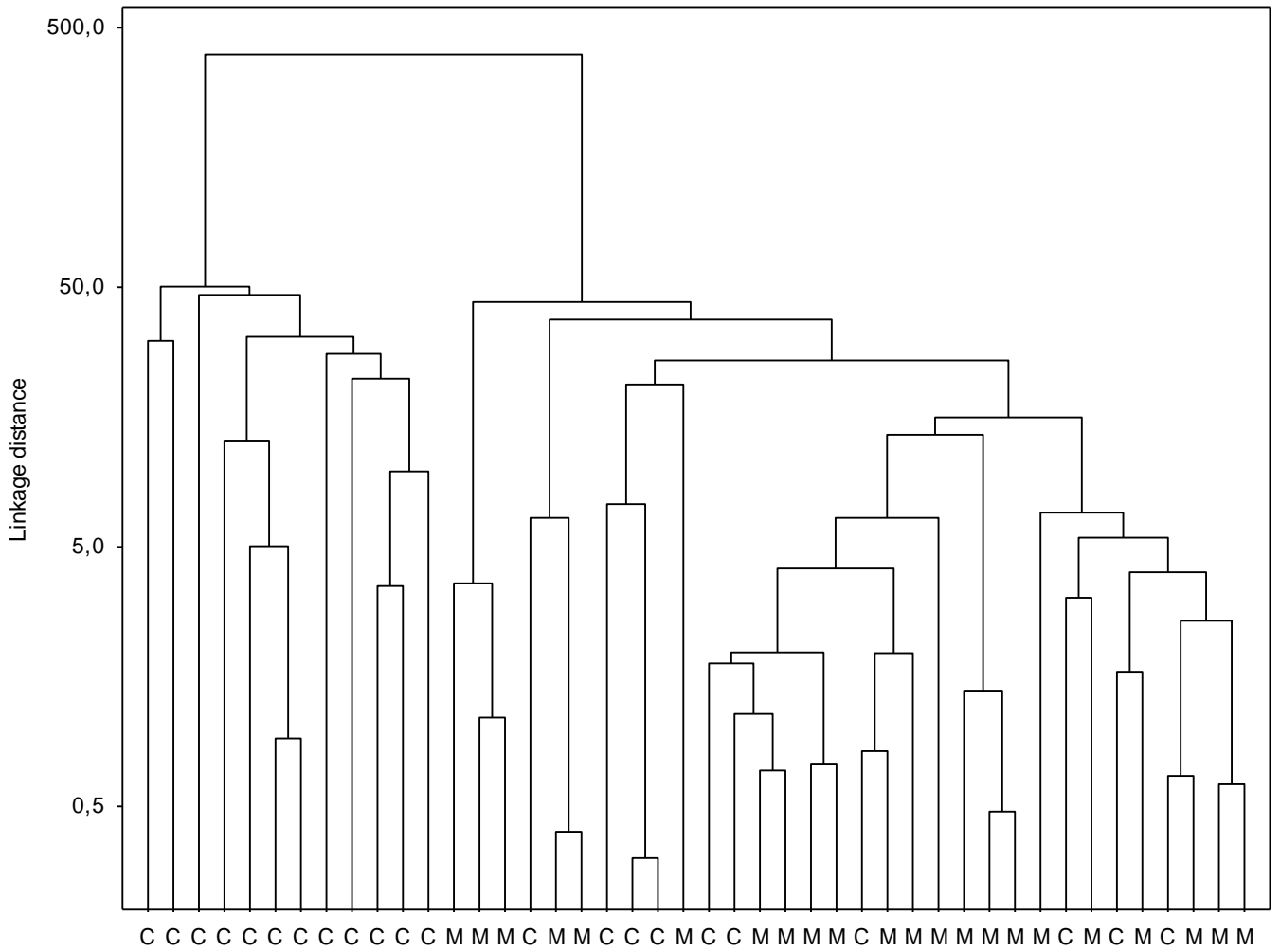
Rycina 87. Dendrogram dla wszystkich próbek paznokci (skala logarytmiczna);
 C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak
 szyi; S – rak ślinianek



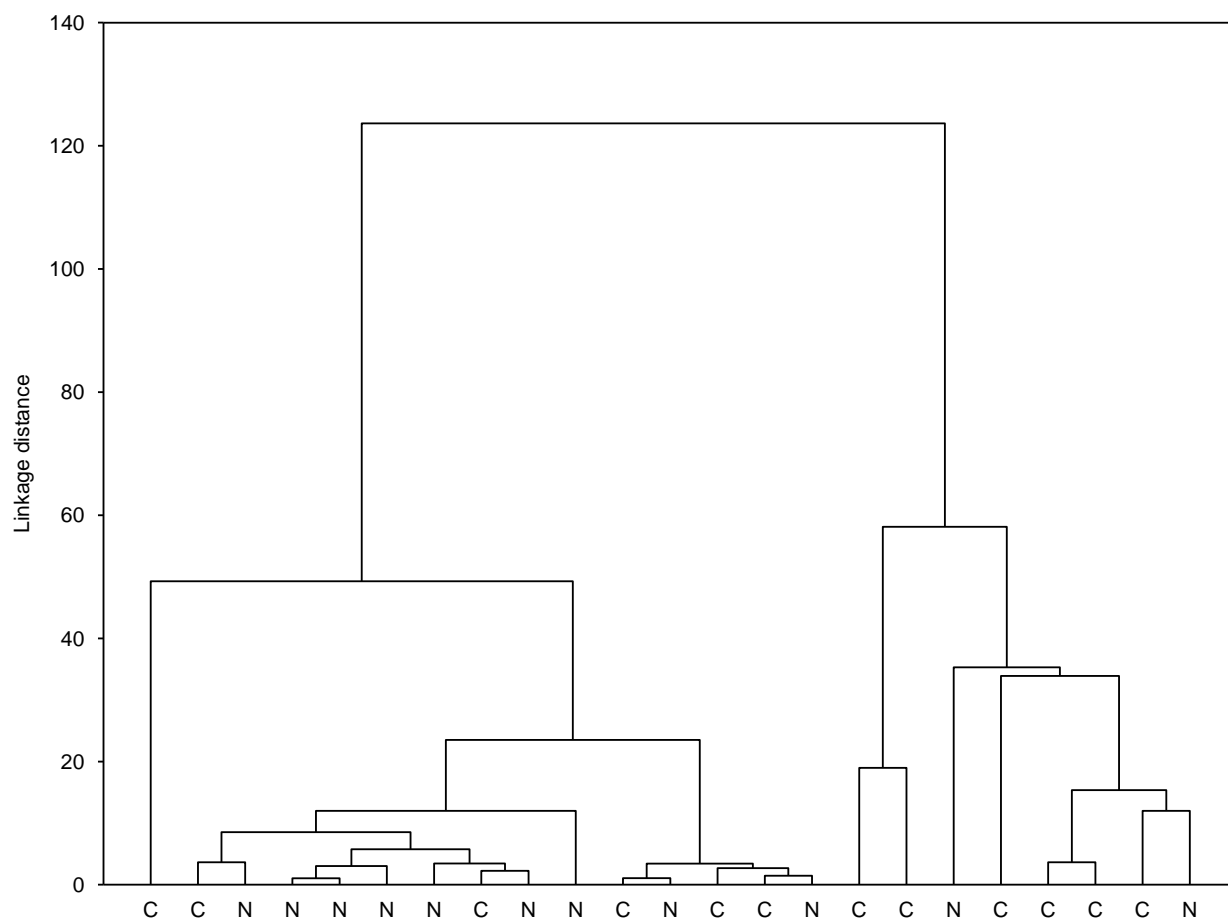
Rycina 88. Dendrogram dla próbek paznokci;
 C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek



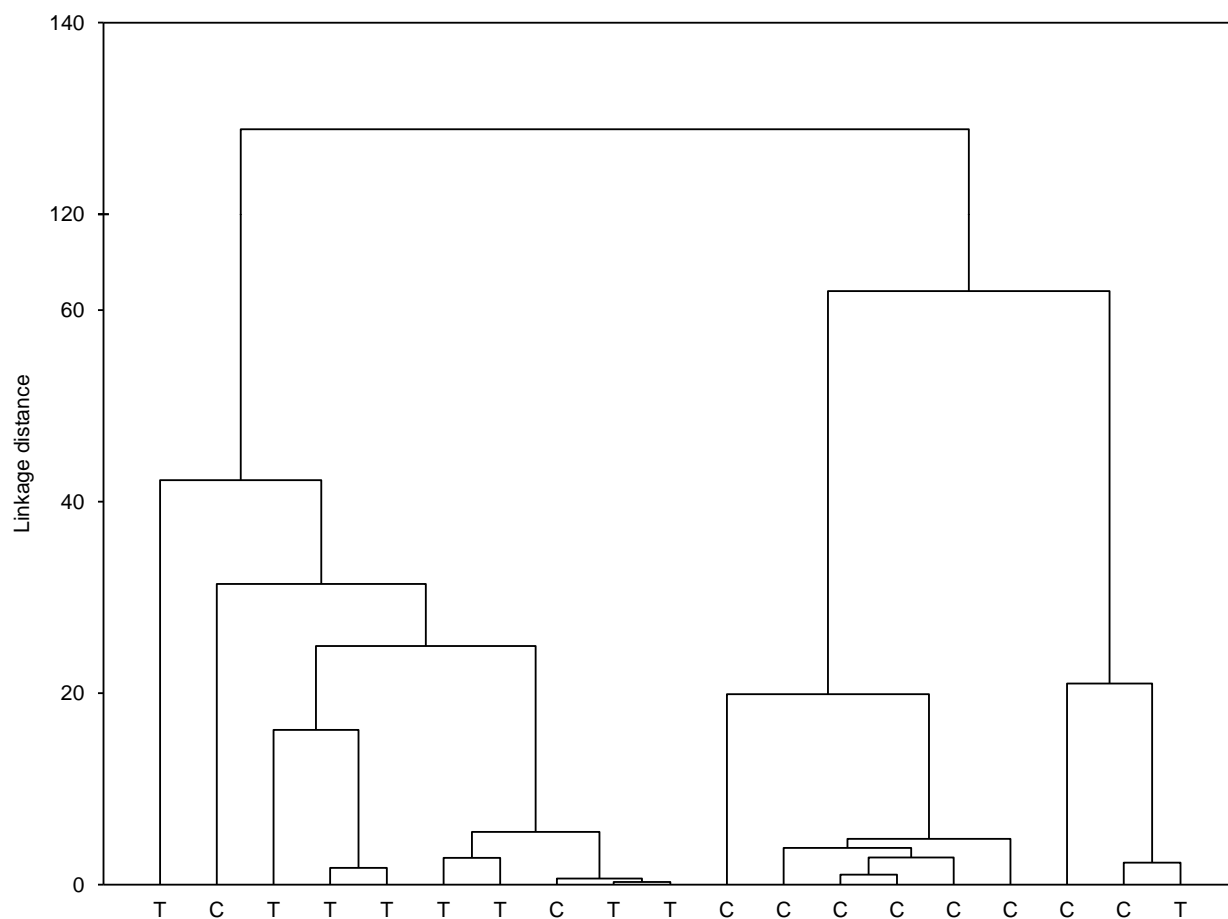
Rycina 89. Dendrogram dla wszystkich próbek paznokci;
 C - grupa kontrolna; P – rak gardła



Rycina 90. Dendrogram dla próbek paznokci (skala logarytmiczna);
 C - grupa kontrolna; M – rak jamy ustnej



Rycina 91. Dendrogram dla próbek paznokci;
 C - grupa kontrolna; N – rak szyi



Rycina 92. Dendrogram dla próbek paznokci;
 C - grupa kontrolna; T – rak migdałków

5.2.3.4. Analiza dyskryminacyjna

W celu stworzenia modelu różnicującego pacjentów z pięcioma rodzajami raka oraz zdrowych ludzi przeprowadzono analizę dyskryminacyjną. Zbudowano go opierając się na grupie 61 osób, u których nie zdiagnozowano nowotworu oraz 80 osób z pięcioma rodzajami nowotworów.

Ze względu na brak rozkładu normalnego stężeń analizowanych pierwiastków w badanych grupach dane zostały poddane logarytmowaniu. Równanie funkcji dyskryminacyjnej zbudowano stosując metodę krokową postępującą. Wartości parametrów, które miały wpływ na konstrukcję modelu, były następujące: tolerancja - 0,01, F wprowadzania - 1, F usunięcia - zero oraz liczba kroków - 10.

Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy wszystkich dostępnych próbek umieszczono w Tabeli 50. Obliczono wartość wielowymiarowej statystyki lambda Wilksa, przybliżoną wartość statystyki F oraz odpowiadający jej poziom istotności.

Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (lambda Wilksa = 0,258; F = 4,487; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup sześciu pierwiastków, tylko jeden z metali (Co) nie znalazł się w modelu. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma magnez (Mg), następnie ołów (Pb) i cynk (Zn), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to chrom (Cr) i mangan (Mn).

Tabela 50. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla wszystkich grup

N=141	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Mg	0,332	0,778	7,260	0,000
Cu	0,281	0,920	2,219	0,056
Pb	0,303	0,853	4,377	0,001
Ca	0,289	0,892	3,066	0,012
Zn	0,293	0,882	3,406	0,006
Mn	0,286	0,903	2,738	0,022
Cr	0,282	0,916	2,332	0,046
Fe	0,273	0,945	1,467	0,205
Cd	0,271	0,952	1,282	0,276

Ze względu na dyskryminację sześciu grup skonstruowano pięć funkcji dyskryminacyjnych. Ich interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które przedstawiono w Tabeli 51.

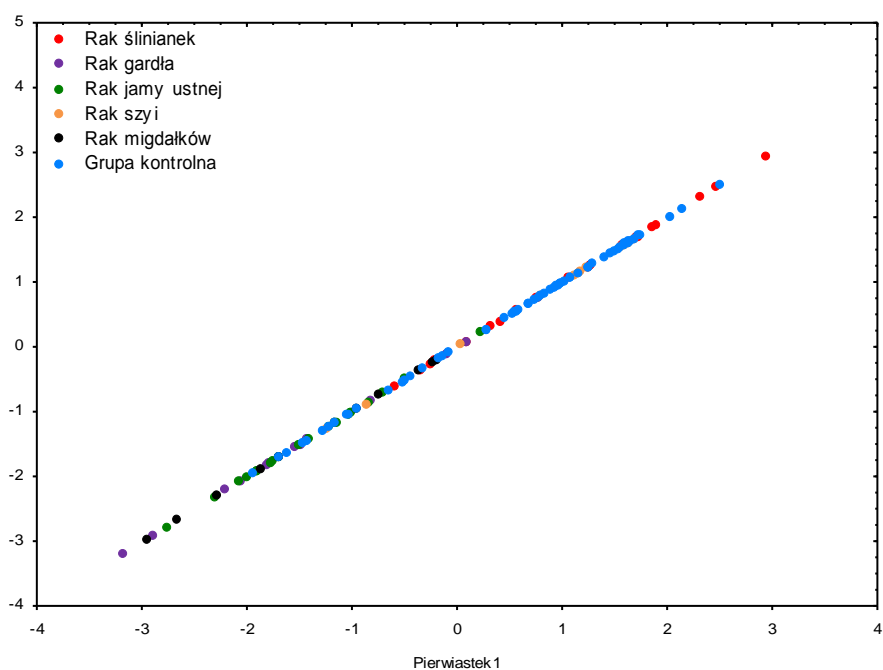
Na pierwszą funkcję dyskryminacyjną największy wpływ mają magnez (Mg) i cynk (Zn), na drugą – ołów (Pb) i mangan (Mn), na trzecią – miedź (Cu) i wapń (Ca), na czwartą – ołów (Pb) i cynk (Zn), a na piątą – kadm (Cd) i wapń (Ca). Istotność poszczególnych funkcji

dyskryminacyjnych zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że wszystkie funkcje są statystycznie istotne ($p < 0,05$).

Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 93.

Tabela 51. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

	Pierw1	Pierw2	Pierw3	Pierw4	Pierw5
Mg	0,734	0,248	-0,006	0,133	-0,229
Cu	0,158	-0,127	0,742	0,078	0,356
Pb	0,333	0,573	0,108	-0,710	-0,023
Ca	0,198	-0,417	-0,633	0,394	0,627
Zn	-0,363	0,105	0,537	0,423	-0,226
Mn	-0,098	-0,804	0,040	-0,158	-0,595
Cr	0,175	0,455	0,276	0,431	0,290
Fe	-0,068	0,369	-0,136	0,381	-0,226
Cd	-0,135	0,100	0,109	-0,088	0,642
Wart.wł.	1,065	0,313	0,154	0,129	0,096
Skum.pro	0,606	0,784	0,872	0,945	1,000



Rycina 93. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna nie rozróżnia wyraźnie wszystkich grup, jednak widać, że po prawej stronie wykresu znajdują się punkty odpowiadające pacjentom z rakiem ślinianek, zaś po lewej – z nowotworami gardła i jamy ustnej.

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 52.

Tabela 52. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,163	Rak gardła p=,092	Rak jamy ustnej p=,156	Rak szyi p=,085	Rak migdałków p=,071	Grupa kontrolna p=,433
Mg	30,669	22,944	23,837	31,578	24,238	28,568
Cu	23,113	21,827	18,601	19,748	22,405	21,492
Pb	-5,010	-8,641	-8,051	-5,873	-10,345	-8,213
Ca	102,041	103,996	102,364	104,352	100,492	106,925
Zn	27,989	31,534	29,828	28,553	34,623	27,851
Mn	-49,559	-50,676	-47,774	-52,493	-46,864	-47,829
Cr	1,911	1,746	-0,479	3,448	1,132	0,842
Fe	-0,422	-0,390	-0,390	-0,308	-0,368	-0,420
Cd	0,096	0,190	0,101	0,081	0,084	0,088
Stała	-243,422	-233,029	-223,011	-251,032	-232,164	-247,881

Wyższa wartość bezwzględna współczynnika stojącego przy danej zmiennej wejściowej wskazuje na większy jej wpływ na tworzenie danej funkcji klasyfikacyjnej i samą klasyfikację do danej grupy.

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 53.

Prawie 60% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację, w 80,3% poprawną, uzyskano w przypadku grupy kontrolnej, drugą w kolejności dla grupy pacjentów z rakiem jamy ustnej (72,7%). Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem gardła – jedynie 7,7% poprawnych klasyfikacji.

Tabela 53. Macierz klasyfikacji

Grupa	Rak ślinianek p=,163	Rak gardła p=,092	Rak jamy ustnej p=,156	Rak szyi p=,085	Rak migdałków p=,071	Grupa kontrolna p=,433	Rak ślinianek p=,163
Rak ślinianek	39,1	9	0	0	2	0	12
Rak gardła	7,7	0	1	7	1	2	2
Rak jamy ustnej	72,7	0	1	16	0	3	2
Rak szyi	33,3	3	0	1	4	1	3
Rak migdałków	50,0	0	0	0	0	5	5
Grupa kontrolna	80,3	1	2	7	0	2	49
Razem	59,6	13	4	31	7	13	73

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej postanowiono stworzyć model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz gardła. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek paznokci od tych dwóch grup umieszczono w Tabeli 54.

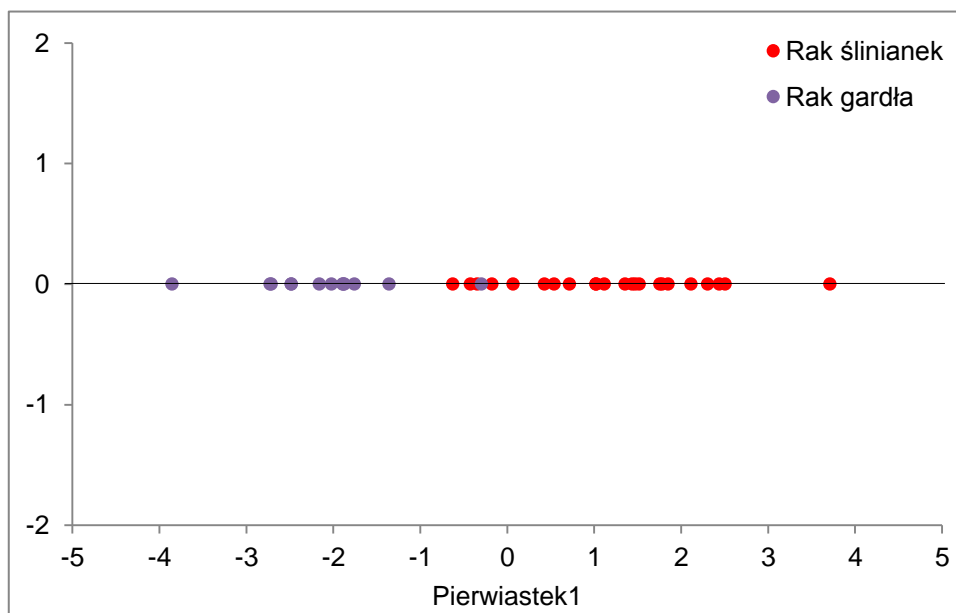
Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (lambda Wilksa = 0, 271; F = 28,631; p<0,000). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup jedynie trzech pierwiastków, zaś aż siedem znalazło się poza modelem. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma magnez (Mg).

Tabela 54. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi

N=36	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Mg	0,482	0,563	24,805	0,000
Pb	0,323	0,841	6,068	0,019
Mn	0,307	0,884	4,193	0,049

Ze względu na dyskryminację dwóch grup skonstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą 0,777 dla magnezu (Mg), 0,478 dla ołowiu (Pb) i 0,409 dla manganu (Mn). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna. Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 94.

Funkcja dyskryminacyjna nie rozróżnia wyraźnie obydwu grup, jednak widać wyraźnie, że na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem gardła są po lewej stronie wykresu, a z nowotworem ślinianek - po prawej stronie wykresu.



Rycina 94. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 55.

Tabela 55. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,639	Rak gardła p=,361
Mg	52,438	41,588
Pb	8,914	4,553
Mn	5,534	1,263
Stała	-82,525	-50,374

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 56.

Ogólnie klasyfikacja jest poprawna w 97,2%. Prawidłowo w 100% zakwalifikowano wszystkie przypadki z grupy z rakiem gardła, natomiast w przypadku grupy z rakiem ślinianek klasyfikacja była w 92,3% poprawna.

Tabela 56. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak ślinianek p=,639	Rak gardła p=,361
Rak ślinianek	100	23	0
Rak gardła	92,3	1	12
Razem	97,2	24	12

Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem ślinianek oraz jamy ustnej. Podstawowe statystyki oceniające moc dyskryminacyjną poszczególnych zmiennych wejściowych w przypadku analizy próbek paznokci od tych dwóch grup umieszczono w Tabeli 57.

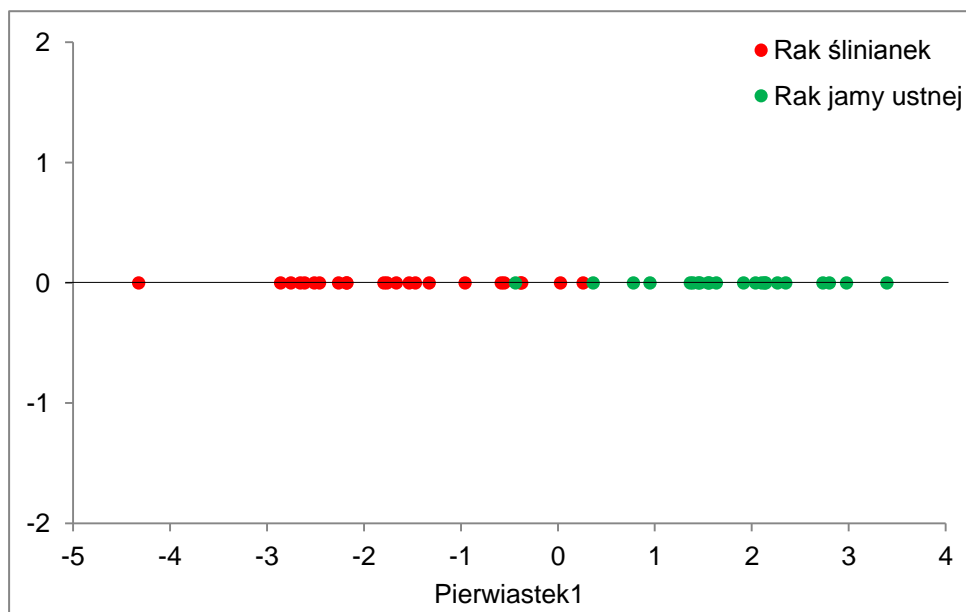
Dyskryminacja typów grup przez zmienne znajdujące się w modelu jest statystycznie istotna (λ Wilksa = 0,242; $F = 31,32$; $p < 0,000$). Krytyczny poziom istotności p wskazuje na istotny wkład w dyskryminację grup trzech z czterech pierwiastków: magnezu (Mg), chromu (Cr) oraz ołowiu (Pb), natomiast sześć pierwiastków znalazło się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma magnez (Mg).

Ze względu na dyskryminację dwóch grup skonstruowano jedną funkcję dyskryminacyjną. Jej interpretację oraz ocenę przydatności oparto na analizie kanoniczej. W jej wyniku otrzymano standaryzowane wartości współczynników funkcji dyskryminacyjnej, które wynoszą kolejno - 0,776 dla magnezu (Mg), - 0,455 dla chromu (Cr) oraz - 0,405 dla ołowiu (Pb). Istotność funkcji dyskryminacyjnej zbadano wykonując test chi - kwadrat kolejnych pierwiastków. Na jego podstawie stwierdzono, że funkcja jest statystycznie istotna.

Tabela 57. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz jamy ustnej

N=45	Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacyjnej			
	Lambda Wilksa	Cząstkowa lambda Wilksa	F usunięcia	p
Mg	0,437	0,554	32,172	0,000
Cr	0,284	0,852	6,964	0,012
Pb	0,276	0,878	5,540	0,024
Ca	0,254	0,952	2,010	0,164

Wyniki analizy dyskryminacyjnej przedstawiono również w postaci graficznej na Rycinie 95.



Rycina 95. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej

Funkcja dyskryminacyjna nie rozróżnia wyraźnie obydwu grup, jednak na wykresie rozrzutu funkcji kanonicznej pacjenci z nowotworem ślinianek są skupieni po lewej stronie wykresu, a z nowotworem jamy ustnej - po prawej stronie wykresu.

W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji obydwu grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. Ich wartości umieszczono w Tabeli 58.

Tabela 58. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Zmienna	Rak ślinianek p=,511	Rak jamy ustnej p=,489
Mg	62,504	50,114
Cr	-3,668	-9,220
Pb	-0,158	-4,048
Ca	143,882	138,033
Stała	-327,678	-272,757

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do dwóch grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* zebrano w Tabeli 59.

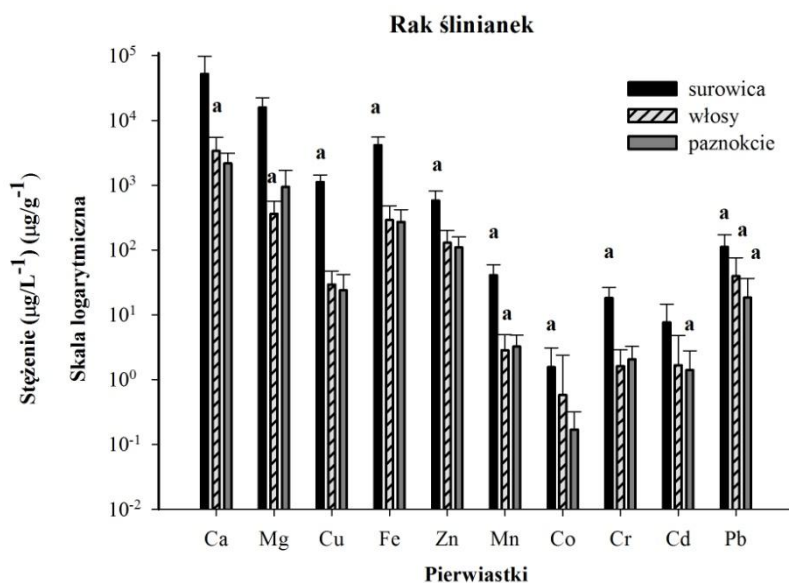
Klasyfikacja jest w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

Tabela 59. Macierz klasyfikacji

Grupa	Poprawna kwalifikacja %	Rak ślinianek p=,511	Rak jamy ustnej p=,489
Rak ślinianek	95,7	22	1
Rak jamy ustnej	95,5	1	21
Razem	95,6	23	21

5.2.4. Porównanie pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych pomiędzy surowicą krwi a materiałami alternatywnymi w grupach pacjentów z nowotworem ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałków oraz grupą kontrolną nienowotworową

Rycina 96 przedstawia porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów z rakiem ślinianek.



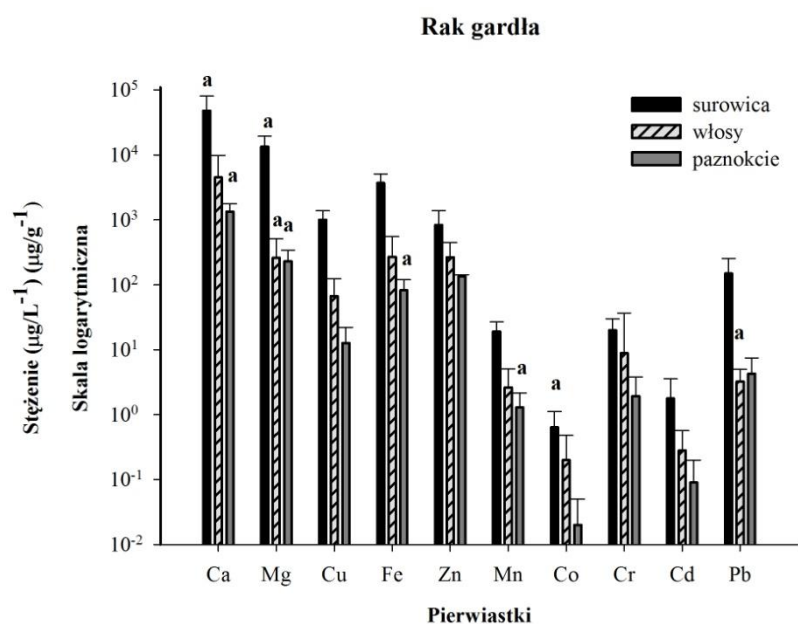
Rycina 96. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem ślinianek

Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Wykazano, że najwyższe wartości stężeń, zarówno pierwiastków niezbędnych, jak i toksycznych, występują w surowicy krwi pacjentów z nowotworem ślinianek. Statystycznie istotne różnice stężeń w surowicy krwi wykazano w następujących metalach: miedź (Cu), żelazo (Fe), cynk (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co), chrom (Cr) i ołów (Pb) w odniesieniu do grupy kontrolnej. We włosach, statystycznie istotne różnice wykazano w przypadku wapnia (Ca), magnezu (Mg), manganu (Mn) oraz ołowiu (Pb), natomiast w paznokciach w kadmie (Cd) i ołowiu (Pb), w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartości stężeń w materiałach alternatywnych były podobne zarówno w pierwiastkach niezbędnych, jak i toksycznych, natomiast najwyższe różnice pomiędzy stężeniami we włosach i paznokciach odnotowano w przypadku kobaltu (Co), ołowiu (Pb) i magnezu (Mg). W przypadku dwóch pierwszych pierwiastków wartości te były wyższe we włosach, w paznokciach wyższe stężenia odnotowano dla magnezu.

Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów z rakiem gardła przedstawione zostało na Rycinie 97.



Rycina 97. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem gardła

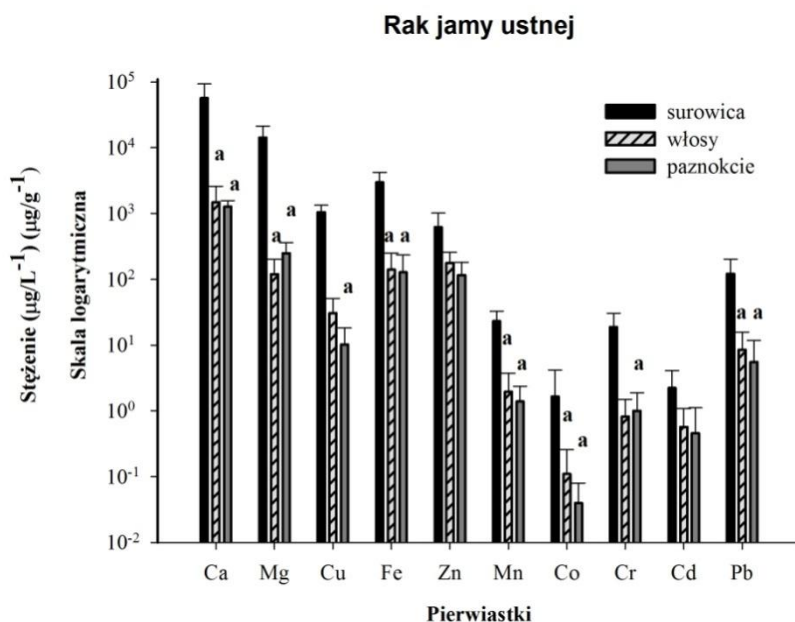
Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Najwyższe wartości stężeń odnotowano w surowicy krwi pacjentów z nowotworem gardła, zarówno w pierwiastkach niezbędnych, jak i toksycznych. Statystycznie istotną różnicę stężeń w porównaniu do grupy kontrolnej w tym materiale biologicznym wykazano w przypadku wapnia (Ca), magnezu (Mg) i kobaltu (Co).

We włosach statystycznie istotne różnice w porównaniu do grupy kontrolnej wykazano w przypadku magnezu (Mg) i ołowiu (Pb), natomiast w paznokciach w wapniu (Ca), magnezie (Mg), żelazie (Fe) i manganie (Mn). Najwyższe różnice stężeń pomiędzy pierwiastkami w materiałach alternatywnych wykazano w przypadku miedzi (Cu), kobaltu (Co) i chromu (Cr). Wyższe wartości stężeń wymienionych pierwiastków odnotowano we włosach.

Na Rycinie 98 przedstawiono porównanie stężeń pierwiastkach niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów z rakiem jamy ustnej.



Rycina 98. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem jamy ustnej

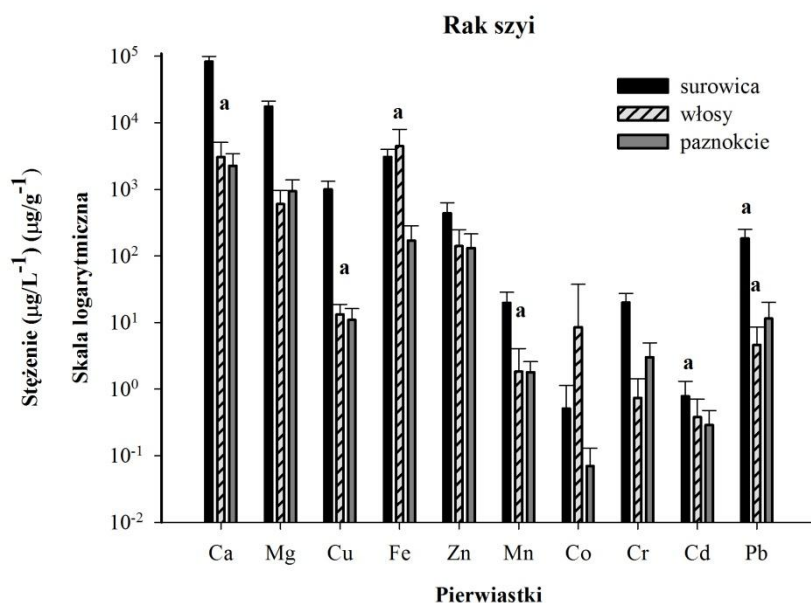
Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

W surowicy krwi wykazano najwyższe wartości stężeń, zarówno w przypadku pierwiastków niezbędnych, jak i toksycznych, jednak nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej. We włosach statystycznie istotne różnice stwierdzono w przypadku wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe), manganu (Mn), kobaltu (Co) i ołowiu (Pb), natomiast w paznokciach w przypadku wapnia (Ca), magnezu (Mg), miedzi (Cu), żelaza (Fe), manganu (Mn), kobaltu (Co), chromu (Cr) i ołowiu (Pb), w odniesieniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej.

Wartości stężeń pierwiastków w materiałach alternatywnych kształtowały się na podobnych poziomach, natomiast najwyższe różnice pomiędzy stężeniami we włosach i paznokciach wykazano w przypadku miedzi (Cu) i kobaltu (Co). W obu przypadkach wartości stężeń pierwiastków były wyższe we włosach.

Rycina 99 przedstawia porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów z rakiem szyi.



Rycina 99. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem szyi

Objaśnienia:

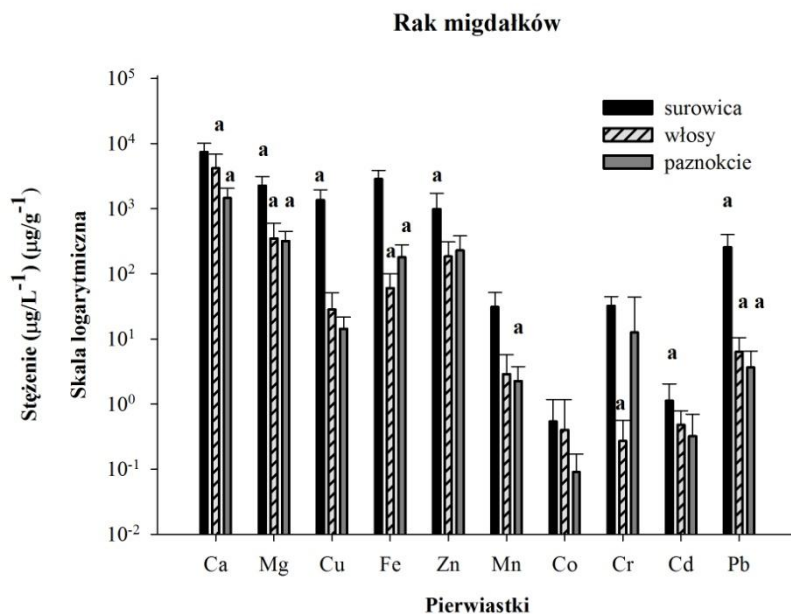
^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Statystycznie istotne różnice w surowicy krwi odnotowano dla kadmu (Cd) i ołowiu (Pb) w odniesieniu do grupy kontrolnej. Za wyjątkiem żelaza (Fe) i kobaltu (Co) w surowicy krwi wykazano najwyższe wartości stężeń w porównaniu do materiałów alternatywnych. W tych dwóch metalach wartości stężeń surowicy krwi były niższe niż wartości stężeń pierwiastków we włosach.

We włosach statystycznie istotne różnice stwierdzono dla wapnia (Ca), miedzi (Cu), żelaza (Fe), manganu (Mn) i ołowiu (Pb), natomiast w paznokciach nie wykazano różnic statystycznie istotnych w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej.

Najwyższe różnice stężeń w materiałach alternatywnych odnotowano dla żelaza (Fe) i kobaltu (Co). Wartości te były wyższe we włosach niż w paznokciach.

Na Rycinie 100 przedstawiono porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów z rakiem migdałków.



Rycina 100. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem migdałków

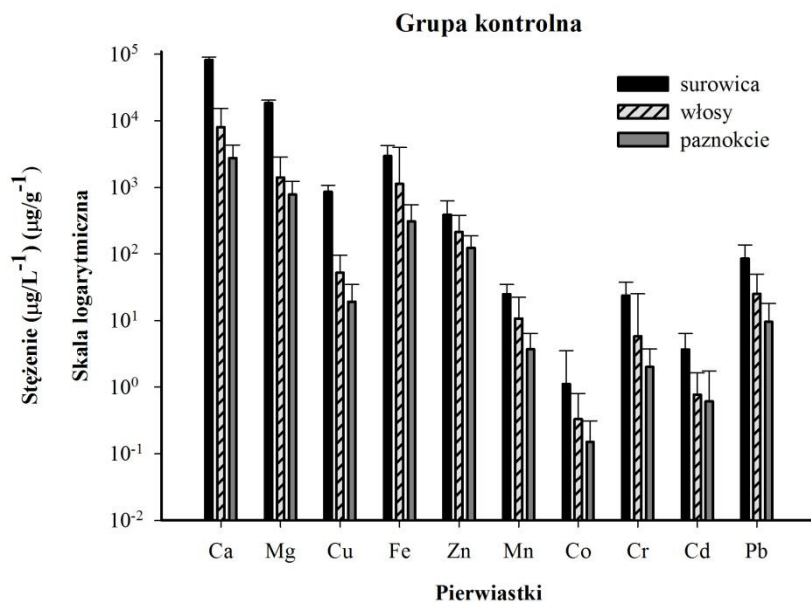
Objaśnienia:

^a istotna statystycznie różnica stężeń w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a)

Najwyższe wartości stężeń, zarówno dla pierwiastków niezbędnych jak i toksycznych wykazano w surowicy krwi. Statystycznie istotne różnice w odniesieniu do grupy kontrolnej odnotowano w tym materiale dla magnezu (Mg), miedzi (Cu), cynku (Zn), kadmu (Cd) i ołowiu (Pb).

We włosach statystycznie istotne różnice stwierdzono w przypadku następujących metali: wapń (Ca), magnez (Mg), żelazo (Fe), chrom (Cr) i ołów (Pb), natomiast w paznokciach w przypadku wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe), manganu (Mn) i ołowiu (Pb), w porównaniu do grupy kontrolnej. Zdecydowanie najwyższą różnicę stężeń w materiałach alternatywnych wykazano w przypadku chromu (Cr), wartość ta była wyższa w paznokciach.

Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi i materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) u pacjentów grupy kontrolnej, nienowotworowej przedstawione zostało na Rycinie 101.



Rycina 101. Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z grupy kontrolnej, nienowotworowej

Najwyższe wartości stężeń wykazano w pierwiastkach niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi pacjentów.

Największą różnicę stężeń w materiałach alternatywnych wykazano dla wapnia (Ca), manganu (Mn) i chromu (Cr). Wartości stężeń we włosach były w tych pierwiastkach wyższe niż w paznokciach.

6. DYSKUSJA

Nowotwory głowy i szyi stanowią jeden z głównych, światowych problemów zdrowotnych. Każdego roku diagnozowanych jest ponad pół miliona nowych przypadków zachorowań [Goldenberg et al., 2004]. Ten rodzaj nowotworu jest najpopularniejszym na świecie wśród mężczyzn powyżej 55 roku życia. W ostatnich latach w Centralnej i Wschodniej Europie obserwowany jest wzrost zachorowalności i umieralności na nowotwory głowy i szyi. W krajach zachodnich za 75% przypadków wystąpienia tej choroby odpowiadają palenie tytoniu i spożywanie mocnego alkoholu, będące głównymi czynnikami ryzyka [Marron et al., 2010]. Poza tymi używkami, za powstanie nowotworu może odpowiadać wirus brodawczaka ludzkiego (HPV), nieprawidłowa dieta, zły stan uzębienia i nieodpowiednia higiena jamy ustnej, narażenia zawodowe, długotrwałe narażenie na palenie bierne oraz jeżeli wśród członków rodziny wystąpiły w przeszłości nowotwory [Mehanna et al., 2011].

Pomiar pierwiastków śladowych w organizmie człowieka staje się coraz bardziej popularnym narzędziem oceny stanu zdrowia pacjenta wśród klinicystów. Odchylenia w przyjmowaniu i prawidłowym metabolizmie pierwiastków mogą być związane z wystąpieniem wielu stanów chorobowych [Forrer et al., 2001]. Niektóre pierwiastki śladowe stanowią część enzymów (np. miedź - tyrozynazy, oksydazy cytochromu c i dysmutazy ponadtlenkowej), inne związane są także z syntezą hormonów (np. selen, niezbędny w syntezie trijodotyroniny). Występujące w zbyt małych stężeniach w organizmie mogą prowadzić do wystąpienia chorób: w przypadku niedoboru cynku może dojść do wystąpienia anemii hemolitycznej, z niedoborem miedzi i cynku związane są niektóre choroby niedokrwienne serca [Forrer et al., 2001].

Z drugiej jednak strony, patologicznie wysokie poziomy pierwiastków śladowych mogą również świadczyć o nieprawidłowościach: choroba Wilsona, która charakteryzuje się wyjątkowo wysokim poziomem miedzi, związanym z zaburzeniem jej metabolizmu, czy hemochromatoza związana z nagromadzeniem żelaza w organizmie [Forrer et al., 2001].

Niektóre pierwiastki, takie jak: ołów, kadm, cynk, selen czy miedź, gdy zostaną przyjęte w zbyt wysokich ilościach, mogą prowadzić do intoksykacji u ludzi i zwierząt [Forrer et al., 2001].

W trakcie toczącego się w organizmie procesu nowotworowego nastąpić może wiele niekorzystnych zmian. Dochodzi między innymi do zaburzenia homeostazy pierwiastków niezbędnych, takich jak cynk czy magnez. Ciężko jest wykazać te zmiany w oparciu o pomiar stężenia pierwiastków we krwi ze względu na działalność ustroju w celu utrzymania wewnętrznej równowagi.

Jednym z czynników mogących wywołać zmiany nowotworowe są metale kancerogenne zawarte w dymie tytoniowym. Rola metali ciężkich w kancerogenezie została potwierdzona w wielu badaniach. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowała między innymi chrom jako metal prawdopodobnie kancerogeny dla człowieka i kobalt, który ma potwierdzone działanie kancerogenne [IARC, 2006; IARC, 2012]. Większość badań dotyczy jednak narażenia przemysłowego, mało jest informacji o negatywnym wpływie tych metali przez przyjmowanie ich z wodą, żywnością, czy

używkami. Również obecny stan wiedzy na temat zaburzeń w gospodarce pierwiastkami niezbędnymi jest fragmentaryczny.

Krew lub osocze/surowica krwi stanowią najbardziej popularny materiał badawczy, służący jako biomarker do diagnozowania niedoboru lub narażenia na metale toksyczne [Rodrigues et al., 2008]. Krew lub mocz, stanowiące klasyczny materiał badawczy, dobrze odzwierciedlają aktualne narażenie na wiele pierwiastków, jednak ich wartości bardzo często wahają się w relatywnie szerokim zakresie stężeń [Torrente et al., 2005].

Włosy, stanowiące alternatywny w stosunku do surowicy krwi biologiczny materiał badawczy, są bogatym źródłem informacji na temat zaburzeń pierwiastkowych zachodzących w organizmie. Paznokcie, pomimo nielicznych doniesień naukowych na temat możliwości ich wykorzystania w ocenie narażenia na metale toksyczne i zaburzeń w gospodarce pierwiastkami niezbędnymi, również są cennym, alternatywnym materiałem badawczym [Palmeri et al., 2000, Woźniak et al., 2012].

Zarówno włosy, jak i paznokcie cechują się wieloma zaletami – ich pobieranie jest nieinwazyjne i proste, co wyróżnia je spośród klasycznego materiału, jakim jest krew. Pozwalają także na określenie przewlekłego narażenia, oddając przy tym średnie stężenia pierwiastków w całym organizmie z okresu kilku miesięcy [Herman et al., 2013].

Palenie tytoniu i spożywanie mocnego alkoholu uznane zostały za główne czynniki powstawania nowotworów głowy i szyi. W wielu badaniach wykazano, że palacze papierosów oraz osoby zamieszkujące tereny zanieczyszczone mają wyższy poziom kadmu we krwi i w moczu, przy czym poziom tego pierwiastka u osób palących tytoń jest ponad dwukrotnie wyższy od osób, które nie są palaczami [Afridi et al., 2011].

Liście tytoniu gromadzą duże ilości pierwiastków takich jak kadm, nikiel, żelazo, ołów, miedź, w związku z czym palenie tytoniu jest istotnym źródłem narażenia na te metale u osób palących [Afridi et al., 2011]. Badania wykazały, że równoczesne palenie tytoniu i spożywanie alkoholu prowadzi do zwiększenia wchłaniania i gromadzenia się pierwiastków takich jak kadm, nikiel, ołów we wszystkich tkankach [Afridi et al., 2011].

Celem pracy było określenie różnic i zależności w poziomach pierwiastków niezbędnych (cynk, miedź, magnez, wapń, żelazo, mangan) i metali kancerogennych (kadm, kobalt, chrom VI, ołów) w badanych materiałach alternatywnych (włosy, paznokcie) i surowicy krwi u pacjentów z nowotworami głowy i szyi z uwzględnieniem wpływu na te poziomy palenia tytoniu i picia alkoholu oraz rodzaju stosowanej diety.

Pacjenci zostali podzieleni w zależności od danej jednostki chorobowej na następujące grupy badawcze: pacjenci z rakiem ślinianek (26 osób), gardła (13 osób), jamy ustnej (13 osób), szyi (10 osób), migdałków (10 osób) oraz pacjenci grupy kontrolnej, nienowotworowej (55 osób).

Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie i zoptymalizowanie procedury jednoczesnego oznaczania pierwiastków niezbędnych (cynk, miedź, magnez, wapń, żelazo, mangan) i metali kancerogennych (kadm, kobalt, chrom VI, ołów), zarówno w materiałach alternatywnych, jakimi są włosy i paznokcie oraz w klasycznym materiale biologicznym - surowicy.

Podjęto próbę opracowania techniki przygotowania materiałów alternatywnych pod kątem oznaczania w nich wymienionych pierwiastków. Szczególną uwagę zwrócono na proces pobierania materiału do analizy oraz późniejszego przygotowania do procesu

mineralizacji. Istotnym celem było usunięcie zewnętrznych zanieczyszczeń, które mogłyby spowodować zafałszowanie wyniku analitycznego. Ważnym był fakt, aby proces przygotowania próbek nie wymagał dużej ilości czasu oraz ilości zużytych odczynników. Praca z tego rodzaju materiałem jest specyficzna i wymaga zachowania ostrożności, ponieważ na każdym etapie istnieje niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki.

Proces pobierania włosów i paznokci prowadzony był bez użycia metalowych narzędzi, do tego celu zastosowano ceramiczne nożyczki. Opracowana procedura mycia i suszenia włosów jest zgodna z założeniami przyjętymi w literaturze [Afridi et al., 2011; Seńczuk – Przybyłowska et al., 2011; Woźniak et al., 2011; Woźniak et al., 2012; Herman et al., 2013]. Stanowi integralną część przygotowania materiału alternatywnego do prowadzenia w nich późniejszych oznaczeń zawartości pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych.

W kolejnym etapie przeprowadzono proces mineralizacji próbek surowicy krwi, włosów i paznokci. W tym celu podjęto próbę opracowania i zoptymalizowania procesu rozkładu matrycy próbek w systemie mikrofalowym. Etap ten przeprowadzono przy użyciu mineralizatora MARS 6 (CEM-USA). W systemie zastosowano technologię One Touch, która na podstawie typu użytej próbki pozwala na określenie typu i liczby naczyń, temperatury roztwarzania, czasu wzrostu temperatury i wygrzewania oraz mocy wyjściowej promieniowania mikrofalowego. Pełna moc urządzenia generuje promieniowanie mikrofalowe o mocy ok. 1800 W. Mineralizacja prowadzona była w teflonowych, wysokociśnieniowych naczyniach typu Xpress.

Przeprowadzona mineralizacja była zgodna z założeniami przyjętymi w literaturze [Guo et al., 2007; Szynkowska et al., 2009; Unkiewicz, Winiarczyk et al., 2009], a jej zoptymalizowanie i wybór odpowiednich programów mineralizacyjnych pozwolił na właściwe wykonanie tego etapu oznaczenia.

W zależności od stężenia, w jakim dany pierwiastek występuje w próbce, w kolejnym etapie zastosowano dwie techniki oznaczania pierwiastków niezbędnych i toksycznych: oznaczanie za pomocą spektrometru optycznego ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP OES) oraz spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP MS). Wapń i magnez – pierwiastki, które w materiale biologicznym występują w wyższych stężeniach, oznaczano za pomocą spektrometru optycznego, natomiast pozostałe pierwiastki: żelazo, miedź, cynk, mangan, kadm, ołów, kobalt, chrom, występujące w niższych stężeniach, oznaczono stosując spektrometr mas. W celu wyeliminowania interferencji spektralnych przeszkadzających w oznaczeniu chromu, zastosowano dynamiczną komorę reakcyjną (DRC). Podobne techniki i warunki pomiarowe zastosowano w badaniach Batista i wsp. [Batista et al., 2008], Chojnackiej i wsp., [Chojnacka et al., 2006a; 2006b], Sreenivasa Rao i wsp. [Sreenivasa Rao et al., 2002].

W pracy podjęto próbę oceny poziomu pierwiastków niezbędnych (wapń, magnez, cynk, miedź, żelazo, mangan) i metali kancerogennych (kadm, kobalt, chrom, ołów) u pacjentów z nowotworami ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałków, porównując te poziomy do grupy osób zdrowych, bez zmian nowotworowych. Do oceny wykorzystano materiały alternatywne, jakimi są włosy i paznokcie, w odniesieniu do klasycznego materiału biologicznego – surowicy krwi.

Ze względu na dużą zmienność osobniczą związaną z różnorodnym składem pierwiastkowym każdej jednostki, często trudność sprawia wyznaczenie zakresu wartości

stężeń referencyjnych. Dieta, miejsce zamieszkania, cechy indywidualne wpływają na stan organizmu, dlatego ważnym czynnikiem było wybranie odpowiedniej grupy kontrolnej, która byłaby narażona na te same czynniki środowiskowe i zewnętrzne. Stanowiły ją osoby zdrowe, zamieszkujące podobne tereny, co osoby z grupy pacjentów z istniejącymi nowotworami.

W związku z powyższym bardzo ważnym elementem badań było przeprowadzenie badań ankietowych zarówno wśród pacjentów nowotworowych, jak i osób stanowiących grupę kontrolną. Pytania zawarte w kwestionariuszu ankiety dotyczyły przede wszystkim stylu życia i nawyków żywieniowych. Miały na celu określenie elementów determinujących poziom stężeń pierwiastków w organizmie. Respondenci odpowiadali na pytania dotyczące głównych czynników odpowiedzialnych za powstawanie nowotworów głowy i szyi – palenia tytoniu i spożywania alkoholu.

Grupę kontrolną obejmowały osoby pochodzące z miast poniżej i powyżej 100 tysięcy mieszkańców. W przeważającej części były to osoby cechujące się średnim i wyższym wykształceniem. Pacjenci chorujący na nowotwory byli mniej wyedukowani – większość posiadała wykształcenie średnie lub zasadnicze. Podobnych danych dostarczyło badanie przeprowadzone przez Tachezy i wsp., w którym edukacja pacjentów grupy nowotworowej w większości przypadków nie przekroczyła okresu 13 lat [Tachezy et al., 2009]. Metaanaliza przeprowadzona na podstawie 41 badań, w których udział wzięło 15 344 pacjentów i 33 852 osób z grupy kontrolnej wykazała, że wystąpienie nowotworu jamy ustnej związane z niskim statusem społeczno – ekonomicznym, w tym niskim poziomem wykształcenia, jest istotne i może być porównywalne z innymi czynnikami ryzyka [Conway et al., 2008]. Należy zwrócić większą uwagę, by strategie w zakresie zdrowia publicznego, dotyczące profilaktyki i wczesnego wykrywania nowotworów głowy i szyi, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się, były skierowane do osób o niższym statusie społeczno – ekonomicznym, w których ryzyko rozwinięcia się choroby jest najwyższe [Conway et al., 2008].

Palenie tytoniu i spożywanie alkoholu są głównymi czynnikami ryzyka powstawania nowotworów głowy i szyi. Fakt ten został potwierdzony w wielu badaniach naukowych [Castellsagué et al., 2004; Döbrössy, 2005; Ragin et al., 2006; Hashibe et al., 2007; Hashibe et al., 2009].

W roku 1957, palenie papierosów zostało po raz pierwszy uznane za niezależny czynnik ryzyka w powstawaniu nowotworów jamy ustnej i części ustnej gardła [Ragin et al., 2006]. Bezpośredni, kancerogenny skutek działania posiadają zawarte w tytoniu N-nitrozoaminy i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [Goldenberg et al., 2004].

Uważa się, że w krajach Unii Europejskiej około 60% nowotworów jamy ustnej, krtani i gardła wśród mężczyzn i 30% wśród kobiet, może być przypisane paleniu tytoniu jako jednemu czynnikiowi ryzyka [Döbrössy, 2005].

W badaniach własnych wykazano, że grupa pacjentów stanowiących kontrolę w badaniu, w większości przypadków nie paliła papierosów, zarówno w przeszłości, jak i w chwili obecnej. Przeważająca część respondentów nie spożywała również alkoholu. Można założyć, że fakt nie stosowania używek przez pacjentów grupy kontrolnej związany był ze zwiększeniem ochrony organizmu przed rozwinięciem się procesu nowotworowego.

Znaczny odsetek pacjentów z nowotworami głowy i szyi to osoby, które odpowiedziały twierdząco na pytania dotyczące stosowania używek, zawarte w kwestionariuszu ankiety.

Pacjenci z nowotworami ślinianek, którzy w przeszłości palili tytoń, stanowili 62% osób z tym rodzajem nowotworu. Statystyki dotyczące nowotworu gardła są jeszcze bardziej zatrważające – wszystkie osoby w tej grupie to byli palacze tytoniu. Spośród pacjentów z nowotworem jamy ustnej, 74% osób paliło w przeszłości, z nowotworem szyi – 70% respondentów odpowiedziało twierdząco, natomiast w przypadku nowotworów migdałka podniebiennego – aż 90% osób to byli palacze. Wyniki badań własnych są zgodne z twierdzeniem Marur i Forastiere, według których nałogowi palacze tytoniu są 5 do 25 - krotnie bardziej narażeni na rozwój nowotworów głowy i szyi niż osoby niepalące [Marur, Forastiere, 2008].

Ilość wypalanych papierosów w przeszłości u pacjentów z nowotworami głowy i szyi była bardzo wysoka. Ośmioro pacjentów (25%) z nowotworami ślinianek wypalało od 11 – 20 sztuk papierosów, a 4 osoby (13%) paliły w przeszłości powyżej 20 sztuk papierosów dziennie. W przypadku pacjentów z nowotworem gardła i jamy ustnej najwięcej osób – 7 (64%) pacjentów paliło od 11 – 20 papierosów. Powyżej 20 sztuk papierosów dziennie wypalali pacjenci z nowotworem szyi i migdałka podniebiennego. W badaniu przeprowadzonym przez Almeida i wsp., u większości pacjentów z nowotworami głowy i szyi poziom uzależnienia od nikotyny był wysoki lub bardzo wysoki i częstość wypalania powyżej 20 papierosów na dzień przez dłuższy okres czasu była wysoka [Almeida et al., 2014]. Autorka wykazała również istotną zależność pomiędzy historią związaną z paleniem tytoniu a stopniem zaawansowania choroby [Almeida et al., 2014]. Zadowalającym był fakt, że w badaniach własnych żaden z pacjentów z nowotworem gardła i migdałka podniebiennego nie pali obecnie papierosów, w przypadku nowotworów ślinianek i jamy ustnej ponad 70% było wolnych od nałogu. Ze względu na małą ilość odpowiedzi udzielonych na to pytanie przez chorych z nowotworami szyi, nie można stwierdzić, ile osób paliło tytoń i jaki był czas od ewentualnego zaprzestania nałogu. Ważną częścią ankiety było pytanie dotyczące okresu, w którym zaprzestano palenia. Według Marron i wsp., zaprzestanie palenia tytoniu korzystnie wpływa na ryzyko wystąpienia nowotworów głowy i szyi już po okresie 1 – 4 lat od nie stosowania tej używki [Marron et al., 2010]. Również Rodriguez i wsp. potwierdzili w swojej pracy, że związane z paleniem papierosów ryzyko powstania nowotworów jamy ustnej, zmniejsza się w ciągu kilku lat od zaprzestania nałogu [Rodriguez et al., 2004]. W badaniach własnych większość pacjentów z nowotworami głowy i szyi zaprzestało palenia tytoniu ponad rok od czasu wypełnienia kwestionariusza ankiety, tylko w przypadku nowotworów jamy ustnej respondenci porzucili nałóg w ciągu ostatniego miesiąca. Almeida i wsp. w swoim badaniu potwierdzili, że fakt dowiedzenia się o istniejącej chorobie nowotworowej stanowi motywujący czynnik do zaprzestania nałogu [Almeida et al., 2014]. Zdecydowana większość pacjentów biorących udział w tym badaniu (88,7%), którzy przestali palić tytoń, uczynili to po usłyszeniu diagnozy lub w trakcie leczenia [Almeida et al., 2014]. Badania prowadzone u pacjentów z innym rodzajem nowotworów głowy i szyi – z nowotworem krtani wykazały, że ryzyko wystąpienia raka tej części ciała gwałtownie obniża się wraz z upływem czasu od zaprzestania palenia. Altieri i wsp. potwierdzili w swoich badaniach, że korzystny efekt związany z zaprzestaniem palenia jest już zauważalny po kilku latach od zakończenia stosowania tej używki i że ryzyko wystąpienia nowotworu krtani zmniejsza się o ponad 70% po 10 lub większej ilości lat od zaprzestania palenia [Altieri et al., 2002]. Niewielka część pacjentów będących uczestnikami badania nadal pali papierosy,

szczególnie respondenci z nowotworem ślinianek i jamy ustnej. Ważnym jest uświadomienie pacjentów, że wśród chorych, u których zdiagnozowano nowotwór głowy i szyi, kontynuowanie palenia po rozpoznaniu choroby związane jest z wyższym ryzykiem rozwinięcia się drugiego nowotworu, większej toksyczności i ogólnego gorszego rokowania w porównaniu do osób, które zaprzestały palenia kilka lat przed diagnozą lub w okolicy czasu diagnozy [Kashigar et al., 2013].

W połowie lat 50. zauważony został związek przyczynowy pomiędzy zwiększonym spożyciem alkoholu a wystąpieniem płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej, gardła, krtani i przetyku [Altieri et al., 2005].

Przeprowadzone badania własne dotyczące spożywania alkoholu w przeszłości potwierdziły, że większość pacjentów z nowotworami głowy i szyi stosowała ten rodzaj używki. Najgorsze statystyki dotyczyły respondentów z nowotworami migdałka podniebiennego, ponieważ w tej grupie wszyscy pacjenci spożywali w przeszłości alkohol, w tym 60% z nich wypijało powyżej pięciu drinków tygodniowo. W przypadku pacjentów grupy kontrolnej, większość osób nie spożywała w przeszłości alkoholu, jednak różnice w porównaniu do respondentów niepijących były niewielkie. W momencie wypełniania kwestionariusza ankiety, 77% pacjentów grupy kontrolnej odpowiedziało, że nie spożywa alkoholu. Podobnie było w przypadku chorych na nowotwory głowy i szyi. Pacjenci z nowotworem szyi nie odpowiedzieli na to pytanie, dlatego nie można stwierdzić, czy obecnie piją oni alkohol. Pomimo, że większość pacjentów nie spożywa alkoholu, w każdej z grup znaleźć można osoby, które nadal stosują tę używkę w codziennym życiu.

Badania epidemiologiczne związane z nowotworami głowy i szyi wykazały, że długotrwałe przyjmowanie alkoholu i liniowa korelacja dotycząca długości i ilości konsumpcji wpływa na powstające zmiany nowotworowe [Boffetta, Hashibe, 2006]. Dlatego tak ważnym jest zaprzestanie stosowania tej używki, bowiem według Altieri i wsp. korzystny efekt zdrowotny po zaprzestaniu spożywania alkoholu widoczny był już w okresie 5 lat od jego odstawienia, ale oczywiście skutki zrezygnowania z nałogu picia zauważalne są dopiero po upływie długiego okresu czasu [Altieri et al., 2005]. Natomiast Marron i wsp. w swoich badaniach wykazali, że korzystny wpływ na ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi zauważyć można dopiero po okresie 20 lat od zaprzestania spożywania alkoholu [Marron et al., 2010]. W kwestionariuszu ankiety respondentom zadano również pytanie dotyczące ilości i rodzaju spożywanego alkoholu, zarówno w przeszłości, jak i w momencie badania. Zaobserwowano, że w przeszłości najczęściej alkoholu (2 – 5 drinków tygodniowo) wypijali pacjenci z nowotworem ślinianek oraz gardła, natomiast pacjenci z nowotworem migdałka podniebiennego wypijali powyżej 5 drinków tygodniowo. Preferencje, co do rodzaju spożywanego alkoholu były podobne – większość pacjentów najchętniej spożywała piwo, za wyjątkiem pacjentów z nowotworem gardła, którzy najchętniej spożywali wódkę. Większość badań naukowych wskazuje, że ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi u osób spożywających piwo, wino lub mocny alkohol jest porównywalne. Purdue i wsp. zebrali dane z 15 badań kliniczno - kontrolnych dotyczących nowotworów głowy i szyi, aby wykazać niezależny związek pomiędzy chorobą a spożywaniem piwa, wina i mocnego alkoholu. Przeprowadzone badanie sugeruje, że ryzyko względne wystąpienia nowotworów głowy i szyi dla osób spożywających piwo i mocny alkohol jest porównywalne. Autorzy zaobserwowali słabszy związek dotyczący umiarkowanego spożywania wina, jednak nie

można wykluczyć, że dieta i inne czynniki stylu życia mogą mieć wpływ na wytłumaczenie tego zjawiska. Jednak ze względu na różnorodność otrzymanych wyników, badanie to powinno być interpretowane z ostrożnością [Purdue et al., 2009].

Freedman i wsp. wykazali w swoim badaniu zależność pomiędzy alkoholem i nowotworami głowy i szyi osobno u mężczyzn i u kobiet. Podobnie jak w badaniach innych autorów [Polesel et al., 2005; Sturgis et al., 2004] naukowcy dowiedli, że istnieje znaczący dawko – zależny związek pomiędzy zwiększonym spożyciem alkoholu a ryzykiem wystąpienia nowotworów głowy i szyi (szczególnie wśród mężczyzn, ale także wśród kobiet pijących alkohol) [Freedman et al., 2007]. Wyniki były porównywalne dla piwa, wina i mocnego alkoholu, jednakże tylko 0,3% badanych osób wypijało >3 szklanek wina dziennie. Ciekawym był fakt wskazania przez autorów, że zarówno mężczyźni, jak i kobiety, którzy deklaruje wypijanie jednego drinka dziennie, mieli niższe wskaźniki zachorowalności na nowotwory głowy i szyi od osób, które nie spożywały alkoholu. Naukowcy podkreślają jednak, że stwierdzenie to powinno być interpretowane z uwagą i potwierdzone w dalszych badaniach [Freedman et al., 2007].

Dokonano wielu prób, aby usystematyzować skutki wywołane przez odmienne typy napojów alkoholowych [Bagnardi et al., 2001] na powstawanie nowotworów w obrębie głowy i szyi. Badanie kohortowe przeprowadzone w Danii wśród 156 osób z nowotworami w obrębie gardła i przełyku wykazało, że umiarkowane spożywanie wina nie jest związane z ryzykiem powstania nowotworów górnego odcinka przewodu pokarmowego, podczas gdy umiarkowane spożycie piwa i mocnego alkoholu może zwiększać to ryzyko [Grønbaek et al., 1998]. Przypuszczalnie jest to spowodowane faktem, że w krajach takich jak Dania, osoby pijące wino posiadają wiele nawyków związanych ze zdrowym trybem życia (odpowiednia dieta, niskie BMI), które mogą prowadzić do zmniejszenia uszkodzeń w obrębie jamy ustnej [Tjønneland et al., 1999].

Maserejian i wsp. zaobserwowali podobnie zwiększone ryzyko wystąpienia ustnych zmian przednowotworowych dla mocnego alkoholu, wina i piwa, ale związek ten był istotny tylko dla piwa i mocnego alkoholu (graniczna istotność), które były najczęściej spożywanymi napojami dla tej grupy badanej. Autorzy dowiedli, że rodzaj alkoholu, który jest przeważnie najchętniej konsumowany przez daną grupę populacji, odpowiada za zwiększone ryzyko wystąpienia choroby i decydująca jest całkowita ilość spożytego etanolu [Maserejian et al., 2006]. Do podobnych wniosków doszli w swojej pracy Altieri i wsp., którzy dokonali analizy danych z badania kliniczno - kontrolnego przeprowadzonego we Włoszech i Szwajcarii. Grupę badaną stanowiło 749 osób chorych na nowotwór jamy ustnej i gardła oraz 1 772 pacjentów szpitala stanowiących grupę kontrolną (niepijących i niepalących). Istotny wzrost poziomu ryzyka nastąpił wraz ze zwiększaniem się ilości całkowitego spożycia alkoholu w porównaniu do osób niepijących i pijących małe ilości alkoholu. Podobnie, zwiększone ryzyko powstania nowotworów zauważono dla osób pijących wino. W populacjach, w których wino jest często spożywanym napojem alkoholowym, może dochodzić do powstania nowotworów jamy ustnej i gardła spowodowanym właśnie tym trunkiem. Potwierdza to fakt, że najczęściej spożywany alkohol w danej populacji zdaje się być największym zagrożeniem dla powstania nowotworu [Altieri et al., 2004].

Do interesujących wyników doszli w swoim badaniu Tramacere i wsp., którzy wykazali, że spożywanie nawet najmniejszej ilości alkoholu może prowadzić do powstania

zwiększonego ryzyka wystąpienia nowotworu jamy ustnej i gardła. Był to znaczący wzrost (20%) dla spożycia jednego lub mniejszej ilości drinków na dzień [Tramacere et al., 2010]. Być może było to częściowo związane z zaniżaniem ilości spożywanego alkoholu, zarówno przez osoby chore, jak i te z grupy kontrolnej [Tramacere et al., 2010].

Wiele badań naukowych potwierdza fakt, że łączne spożywanie alkoholu i palenie tytoniu zwiększa ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi. W badaniach własnych również wykazano, że pacjenci z nowotworami głowy i szyi stosowali oba rodzaje używek. Fakt ten mógł doprowadzić do zwiększonego ryzyka powstania nowotworu. Według Döbrössy każdy z czynników osobno może skutkować 2-3-krotnie zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia choroby, jednakże ryzyko powstania nowotworów jamy ustnej i krtani jest wielokrotnie (nawet 15 – krotnie), kiedy palenie tytoniu i spożywanie alkoholu występuje łącznie [Döbrössy, 2005]. Zheng i wsp. wykazali, że u osób pijących duże ilości alkoholu i palących tytoń, ryzyko wystąpienia nowotworów jamy ustnej i gardła jest 300 – krotnie większe w porównaniu do tych, którzy nigdy nie pili alkoholu i nie palili tytoniu [Zheng et al., 2004]. Hashibe i wsp., na podstawie badania powstałego z połączenia 17 jednostkowych badań kliniczno - kontrolnych, również wykazali wielokrotny efekt szkodliwego działania dymu tytoniowego i alkoholu na ryzyko powstawania nowotworów głowy i szyi, szczególnie dla nowotworów jamy ustnej i gardła, a także krtani. Dodatkowo, łączne palenie papierosów i spożywanie alkoholu częściej zwiększa odsetek chorych na wyżej wymienione nowotwory wśród mężczyzn niż wśród kobiet [Hashibe et al., 2009].

W kwestionariuszu ankiety znalazły się również pytania dotyczące rodzaju spożywanej diety. Większość pacjentów, zarówno z grupy kontrolnej, jak i nowotworowej, najchętniej spożywała drób, szynkę, jaja i białe sery. Najrzadziej natomiast były konsumowane kielki, owoce morza i szpinak. Wszystkie te produkty stanowią bogate źródło witamin i mikroelementów. Szpinak znany jest ze swoich właściwości antynowotworowych – jest bogaty w potas, magnez, fosfor, zawiera także witaminę C, będącą popularnym antyoksydantem. Owoce morza zawierają natomiast żelazo, magnez, wapń, cynk oraz selen, znany ze swoich właściwości przeciwnowotworowych. Również kielki chronią przed rozwojem raka, posiadają duże ilości potasu, fosforu, żelaza, cynku, jodu, selenu oraz witamin A, C i z grupy B. Mała ilość spożywanych kielków i owoców morza może być związana z niezajomością ich wartości odżywczych oraz ze stosowanej mało zróżnicowanej diety. Obecnie zalecaną jest dieta śródziemnomorska, uważana za dietę zmniejszającą ryzyko powstania nowotworu. Artykuły żywieniowe i napoje, zawierające w swoim składzie antyoksydanty, uważane są za produkty o działaniu przeciwnowotworowym [Meurman, 2010]. Dieta ta opiera się na spożywaniu dużej ilości warzyw i owoców, ryb oraz owoców morza.

W wielu badaniach wykazano, że spożycie większej ilości owoców i warzyw prowadzi do zmniejszonego ryzyka powstania nowotworów tego rejonu [Li et al., 2012].

Lucenteforte i wsp., na podstawie przeglądu badań innych autorów wykazali, że owoce i warzywa stanowią najważniejszy i najbardziej pożądany składnik diety u chorych z nowotworami jamy ustnej i gardła. Wśród badań prowadzonych we Włoszech, 20 - 25% nowotworów tego rejonu spowodowanych było niskim spożyciem warzyw i owoców, a ilość ta wzrosła do 85 – 95%, kiedy rozważono jeszcze palenie tytoniu i spożycie alkoholu [Lucenteforte et al., 2009]. Wiedza na temat wpływu mleka i innych produktów mlecznych,

tak samo jak wpływu kawy i herbaty na powstawanie nowotworów jamy ustnej i gardła, jest niedostateczna [Lucenteforte et al., 2009].

W innym badaniu Lucenteforte i wsp., dotyczącym wpływu diety na powstawanie nowotworów głowy i szyi potwierdzili, że zwiększone spożycie warzyw i owoców wiąże się z obniżonym ryzykiem powstania tego typu nowotworów (nawet 50-70%) [Lucenteforte et al., 2010]. W badaniu własnym większość pacjentów z nowotworami głowy i szyi spożywała w dużych ilościach produkty, które Luceneforte i wsp. uznali za mogące mieć szkodliwy efekty na zdrowie (jaja, mięso). Autorzy wykazali również, że dieta zawierająca ryby ma korzystny wpływ na ludzki organizm [Lucenteforte et al., 2010].

W badaniu Edefonti i wsp., w którym udział wzięło 804 pacjentów chorych na nowotwory jamy ustnej i 2080 pacjentów hospitalizowanych z powodu chorób nienowotworowych, przeprowadzono analizę pięciu głównych wzorców żywieniowych: produktów pochodzenia zwierzęcego, produktów bogatych w skrobię, tłuszcze nienasycone, witaminy i błonnik oraz zawierających retinol i niacynę. Dowiedziono, że dieta bogata w owoce i warzywa, płatki, oliwę z oliwek, wyrażone w grupie „witaminy i błonnik”, „bogate w skrobię” oraz „nienasycone tłuszcze”, wykazuje efekt ochronny, natomiast spożywanie dużych ilości produktów nabiałowych i mięsa, wyrażonych w grupie „produkty pochodzenia zwierzęcego” jest szkodliwe dla organizmu ludzkiego [Edefonti et al., 2010]. Badanie to było zgodne z jednym z największych europejskich badań kliniczno - kontrolnych przeprowadzonych przez Lagiou i wsp. [Lagiou et al., 2008]. Autorzy dowiedli, że nawyki żywieniowe odgrywają bardzo ważną rolę w etiologii nowotworów górnych dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Spożywanie świeżych, nieskrobiowych warzyw, owoców, oliwy z oliwek i herbaty związane jest z obniżonym ryzykiem wystąpienia nowotworów tej części ciała, natomiast spożycie czerwonego mięsa może prowadzić do zwiększenia ryzyka powstania raka, szczególnie przełyku [Lagiou et al., 2008].

Istnieje mało badań dostarczających informacji na temat stanu odżywienia pacjentów z nowotworami. Wiadomym jest fakt, że osoby chorujące na to schorzenie często są niedożywione i osłabione, a stan ten postępuje w czasie trwania choroby. Syndrom anoreksji i kacheksji, często występujący u pacjentów z nowotworem, związany jest w wielu przypadkach z pesymistyczną diagnozą oraz złą jakością życia chorych [Hutton et al., 2006]. Zrozumienie preferencji i nawyków żywieniowych w tej grupie pacjentów jest konieczne do opracowania skutecznych zaleceń w celu poprawy stanu zdrowia i jakości życia.

Hutton i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród 151 pacjentów będących w zaawansowanym stadium nowotworowym, zbadali ich nawyki żywieniowe, na podstawie dokumentacji dotyczącej rodzaju spożywanych pokarmów i substancji odżywczych [Hutton et al., 2006]. Autorzy zaobserwowali dużą różnorodność w wyborze spożywanych pokarmów i składników odżywczych. Jedzenie konsumowane przez pacjentów z zaawansowanym nowotworem odpowiadało w dużej mierze typowym pokarmom spożywanym przez osoby zdrowe. Jednak nawet wśród osób, które spożywały największą ilość pokarmów, zauważalny był spadek masy ciała. Może to świadczyć o tym, że dieta pacjentów nie była wystarczająco kaloryczna, aby utrzymać prawidłową masę ciała. Ciekawym był fakt, że 70% osób badanych nie wybierało suplementów diety dostępnych na rynku [Hutton et al., 2006]. Także w badaniach własnych, zdecydowana większość pacjentów nie stosowała żadnych suplementów diety.

Istotnym jest ułożenie odpowiednio zbilansowanego jadłospisu dla pacjentów z nowotworami, aby mogli dostarczyć organizmowi jak największej ilości energii potrzebnej do walki z chorobą.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie analizy statystycznej, wyznaczając średnią arytmetyczną i podstawowe parametry statystyczne. Wyniki podzielone zostały pod kątem materiału biologicznego u pacjentów z grupy badanej - nowotworowej i kontrolnej - nienowotworowej. Miało to na celu zróżnicowanie poziomów pierwiastków niezbędnych i toksycznych zarówno u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, jak i u osób zdrowych, stanowiących kontrolę w badaniu. Wyznaczono wartości stężeń pierwiastków dla surowicy krwi, włosów i paznokci.

W przypadku klasycznego materiału biologicznego, wartości stężeń pierwiastków niezbędnych (wapnia, magnezu, miedzi, żelaza, cynku i manganu) były porównywalne do danych literaturowych, jednak w przypadku pierwiastków toksycznych (kobaltu, chromu VI, kadmu i ołowiu) ich poziomy były wyższe. Najwyższe różnice odnotowano dla ołowiu, w przypadku którego wartości były wielokrotnie wyższe niż te, które opisano w literaturze. Także w przypadku manganu odnotowano znacznie wyższe wartości, zarówno u pacjentów grupy kontrolnej, jak i nowotworowej [Minoia et al., 1990; Forrer et al., 2001; Alimonti et al., 2005].

Wśród pacjentów z grupy nowotworowej, wartości pierwiastków niezbędnych (wapnia, magnezu, miedzi, żelaza, cynku i manganu) i toksycznych (kobaltu, chromu VI, kadmu i ołowiu) wyznaczane były dla pięciu różnych rodzajów nowotworów: ślinianki, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego. Ze względu na różnicowość grup i zmienności osobnicze pacjentów, wartości stężeń pierwiastków w surowicy krwi różniły się pomiędzy grupami.

W przypadku wapnia najwyższe wartości odnotowano dla pacjentów z nowotworem szyi, najniższe u osób z rakiem gardła. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego pierwiastka może wywołać szkody w organizmie. U pacjentów z nowotworami obserwuje się często przekroczoną górną granicę tego pierwiastka. Stan ten określany jest jako hiperkalcemia. U chorych z nowotworami głowy i szyi we wczesnym etapie rozwoju, problem hiperkalcemii nie jest powszechny, natomiast u chorych w zaawansowanym stadium choroby częstość występowania jest bardzo wysoka. Zwykle wykrycie następuje zbyt późno, kiedy pojawią się już objawy, co w konsekwencji oznacza złe rokowanie dla pacjenta [Alsirafy et al., 2009; Bradley, Hoskin, 2006]. Około 80% pacjentów z nowotworową hiperkalcemią umiera w ciągu roku, a średni czas przeżycia wynosi od 3 do 4 miesięcy [Seccareccia, 2010].

Nimonkar i Borle w badaniu przeprowadzonym wśród 70 pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem jamy ustnej wykazali podwyższony, całkowity poziom wapnia w surowicy 12 pacjentów (17,4%), co stanowiło istotny wskaźnik obecnej hiperkalcemii [Nimonkar, Borle, 2009]. Iwase i wsp. wykazali, że wśród 246 pacjentów z nowotworem jamy ustnej, zdiagnozowano 10 (4,1%) pacjentów z obecną hiperkalcemią. Wszystkie osoby z tym schorzeniem znajdowały się w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej [Iwase et al., 2001].

Stężenia magnezu w surowicy krwi pacjentów z grupy kontrolnej przewyższały wartości uzyskane u osób z nowotworami, za wyjątkiem nowotworów migdałka

podniebiennego, gdzie wartości te były najwyższe. Najmniejsze stężenie tego pierwiastka zaobserwowano u pacjentów z nowotworami gardła.

Niedobór magnezu w organizmie może spowodować wystąpienie różnego rodzaju stanów chorobowych. Nadmierne spożywanie alkoholu może doprowadzić do utraty magnezu, co w połączeniu z dietą ubogą w ten pierwiastek może wiązać się z całkowitym wyczerpaniem zasobów magnezu w organizmie. W istocie, większość chronicznych alkoholików to osoby z objawami dużego niedoboru magnezu [DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997]. Pacjenci z nowotworami głowy i szyi spożywali bardzo mało szpinaku, który zawiera duże ilości magnezu, większość z nich przyznała się także do spożywania alkoholu, co może obniżać poziom tego pierwiastka w organizmie.

W przypadku kolejnego pierwiastka niezbędnego – miedzi, najniższe wartości zanotowano dla grupy kontrolnej, natomiast w grupach nowotworowych wartości te były podwyższone. Najwyższą wartość wykazano u pacjentów z nowotworami migdałka podniebiennego. Fakt wyższego stężenia miedzi jest zgodny z danymi literaturowymi, które wskazują, że metabolizm miedzi ulega zmianie podczas trwającego procesu zapalnego, infekcji i nowotworu. Stężenie miedzi i ceruloplazminy ulega w tym czasie zwiększeniu, podczas gdy poziomy innego pierwiastka – np. żelaza, są obniżone [Tapiero et al., 2003].

Dane literaturowe wskazują, że zarówno w osoczu, jak i w tkankach nowotworowych pacjentów chorych na raka, występują podwyższone poziomy miedzi w porównaniu do osób zdrowych. Oprócz miedzi, większość z tych badań koncentruje się na określeniu stężenia cynku, żelaza i selenu. Interesującym jest fakt, że poziomy tych pierwiastków były znacznie obniżone u osób chorych na raka, w przeciwieństwie do poziomów miedzi, których wartości były podwyższone lub znacznie podwyższone, w porównaniu do zdrowych osób [Jomova, Valko, 2011]. W badaniach własnych poziomy cynku i żelaza u pacjentów nowotworowych były wyższe od stężeń u osób z grupy kontrolnej, w przypadku miedzi wyższe wartości tego pierwiastka były zgodne z danymi literaturowymi.

Najwyższe wartości żelaza wykazano u pacjentów z nowotworami ślinianek, w przypadku cynku, pacjenci z nowotworami migdałka podniebiennego cechowali się najwyższymi stężeniami.

Utrzymanie prawidłowego poziomu żelaza jest bardzo ważne, ponieważ u osób z nowotworem jamy ustnej zaobserwowano wystąpienie niedoboru tego pierwiastka. W badaniu Khanna i Karjodkar stwierdzono statystycznie istotne obniżenie poziomu żelaza w grupie osób ze stanem przedrakowym [Khanna, Karjodkar, 2006]. Anemia jest najczęstszym czynnikiem odpowiedzialnym za niedobór żelaza. Ważnym czynnikiem może być również niedostateczne przyjmowanie pokarmu ze względu na występowanie pieczenia i powstawanie pęcherzyków w jamie ustnej [Khanna, Karjodkar, 2006]. Obserwowane obniżenie żelaza w surowicy krwi może być skutkiem niedożywienia spowodowanego obciążeniem pacjenta chorobą nowotworową [Khanna, Karjodkar, 2006].

Niedożywienie stanowi jeden z głównych problemów pacjentów z nowotworami. Nie zawsze dotyczy to wszystkich rodzajów raka, ale u pacjentów z nowotworami jamy ustnej problem ten jest poważny i występuje bardzo często. Nieprawidłowa dieta może również przyczynić się do rozwoju tego typu nowotworu, głównie z powodu niedostatecznej ilości dostarczanego cynku, witamin i innych niezbędnych pierwiastków [Kazi et al., 2010].

Badania epidemiologiczne potwierdziły, że zawartość cynku w surowicy pacjentów z nowotworami była niższa niż u zdrowych osób [Kazi et al., 2010]. Inne badania wykazały, że niedobór cynku związany był ze zwiększeniem rozmiarów tworzącego się nowotworu i ogólnego stadium rozwoju nowotworów głowy i szyi [Kazi et al., 2010]. Również Prasad i wsp. wykazali w swoim badaniu, że u większości pacjentów chorujących na nowotwory głowy i szyi występuje niedobór cynku i zaburzenia odporności [Prasad et al., 1998]. Autorzy wykazali, że zbyt małe ilości tego pierwiastka były związane ze zwiększoną wielkością guza oraz nieplanowanymi hospitalizacjami. Najdłuższy okres bez istniejących objawów chorobowych miał miejsce u pacjentów, u których suplementacja cynkiem i stan odżywienia organizmu były wystarczające. Według autorów, jeżeli wyniki te znajdą potwierdzenie w większych badaniach, suplementacja cynkiem może być zalecana u pacjentów z nowotworami głowy i szyi w celu zmniejszenia występowania chorób towarzyszących związanych z rakiem, poprawy funkcji immunologicznych, a być może nawet opóźnienia nawrotu choroby [Prasad et al., 1998].

W badaniach własnych stężenie cynku w surowicy krwi pacjentów grup nowotworowych było zgodne z zakresem wartości referencyjnych, w grupie kontrolnej wartości te były obniżone. Jedno z pytań zawartych w kwestionariuszu ankiety dotyczyło przyjmowania suplementów diety zawierających cynk. Większość pacjentów zarówno z nowotworami, jak i tych z grupy kontrolnej przyznała, że nie stosuje takich preparatów. Badania naukowe dowiodły, że tylko u osób z niedoborem cynku zauważalne były pozytywne efekty suplementacji tym pierwiastkiem, natomiast w przypadku, gdy poziom był prawidłowy, takie zależności nie zostały potwierdzone. Konieczne są dalsze badania, aby wykazać to powiązanie [Jomovaa, Valko, 2011].

Interesujące wyniki uzyskano dla manganu, zarówno u pacjentów nowotworowych, jak i grupy kontrolnej. Wartości te były bowiem znacząco wyższe od danych zawartych w literaturze [Minoia et al., 1990; Forrer et al., 2001; Alimonti et al., 2005]. Najwyższe stężenia odnotowano u pacjentów z nowotworem ślinianek, najniższe u chorych z nowotworem gardła. Należałoby przeanalizować narażenie środowiskowe i zawodowe wśród badanej grupy osób, a także sprawdzić stan spożywanej przez nich wody, ponieważ często wspomniane czynniki wpływają na podwyższenie poziomów manganu z surowicy.

Poziomy pierwiastków toksycznych w surowicy krwi pacjentów nowotworowych i grupy kontrolnej znacząco przewyższają wartości uzyskane przez innych autorów [Minoia et al., 1990; Forrer et al., 2001; Alimonti et al., 2005]. Wyższe wartości kadmu, ołowiu i chromu u pacjentów z nowotworem jelita grubego, w porównaniu do grupy kontrolnej, otrzymali w swojej pracy także Emre i wsp. [Emre et al., 2013].

Najwyższe wartości kobaltu odnotowano u pacjentów z nowotworem jamy ustnej, najniższe u osób z nowotworem szyi. Ciekawym był fakt, że u pacjentów grupy kontrolnej wartości stężeń były wyższe niż u osób z nowotworem gardła, szyi i migdałka podniebiennego.

Przewlekłe, zawodowe narażenie na kobalt może prowadzić do wystąpienia chorób układu oddechowego oraz reakcji alergicznych [Lison et al., 2001; ATSDR, 2004]. Ważnym byłoby zbadanie, w jakim stopniu uczestnicy badania byli narażeni na szkodliwe działanie kobaltu w swoim środowisku pracy. Oprócz ryzyka zawodowego, istnieją jeszcze inne czynniki mogące wpływać na podwyższone wartości kobaltu w surowicy krwi. Zwiększone

poziomy tego pierwiastka obserwowane są również u palaczy. Tytoń zawiera kobalt (Co) w ilości około $<0,3 - 2,3 \mu\text{g/g}$ suchej masy i około 0,5% tego pierwiastka znajduje się w dymie tytoniowym inhalowanym przez palacza [WHO, 2006].

Zawodowe narażenie na chrom sześciowartościowy związane jest ze zwiększonym ryzykiem powstawania nowotworów układu oddechowego, w tym przede wszystkim nowotworów nosa i zatok przynosowych oraz płuc [ATSDR, 2000]. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) sklasyfikowała chrom jako czynnik rakotwórczy dla ludzi, związek stwarzający jeden z największych potencjalnych zagrożeń dla zdrowia w obszarach miejskich [ATSDR, 2000]. Wśród pracowników ekspozowanych na sześciowartościowy chrom w środowisku pracy zauważono wyższy odsetek zachorowań na nowotwory płuc w porównaniu do pracowników nienarażonych [Jomovaa, Valko, 2011]. Jednakże nowotwór ten może wystąpić, kiedy poziomy stężenie pierwiastka będą na tyle wysokie, że spowodują przekroczenie mechanizmów obronnych organizmu [Jomovaa, Valko, 2011].

Poza ekspozycją zawodową na związki chromu VI narażeni są także palacze. Badanie Chen i wsp. wykazało, że pracownicy cementowni chorujący na wyprysk skórny i palący papierosy posiadają wyższe stężenia Cr VI w organizmie w porównaniu do osób chorych, ale niepalących [Chen et al., 2008].

W badaniach własnych zauważono znacząco podwyższone wartości chromu w surowicy krwi pacjentów z nowotworami głowy i szyi. Najwyższe stężenie tego metalu odnotowano u chorych na nowotwory migdałka podniebiennego. Podobnie wysokie wartości zauważyli Emre i wsp. u pacjentów z nowotworami jelita grubego [Emre et al., 2013].

Palenie papierosów stanowi istotne źródło kadmu. Zawartość metalu w papierosie i dymie tytoniowym została przebadana przez wielu naukowców. Średnia ilość kadmu w papierosie mieściła się w zakresie 0,5 do 1,5 μg . Różnice w wartościach wynikały przede wszystkim z odmiennych marek papierosów [Bernhard et al., 2005]. Po wypaleniu jednego papierosa, do płuc palacza z dymem tytoniowym przenika około 0,1 - 0,2 μg tego pierwiastka [Czeczot, Skrzycki, 2010]. Mortada i wsp. wykazali, że w krwi palaczy zawartość kadmu była o 1,9 razy większa w porównaniu do osób niepalących [Mortada et al., 2004].

W przeprowadzonych badaniach własnych najwyższe wartości kadmu w surowicy krwi odnotowano u pacjentów z nowotworami ślinianki. Znacznie podwyższone wartości zaobserwowano także w przypadku grupy kontrolnej. Poza paleniem papierosów, na podwyższone poziomy kadmu w organizmie wpływ ma przyjmowana żywność, która u niepalącej populacji stanowi podstawowe źródło narażenia.

IARC określa kadm jako związek należący do Grupy 1 substancji rakotwórczych dla człowieka [IARC, 1993]. Narażenie zawodowe powoduje powstawanie nowotworów prostaty i płuc. Dane epidemiologiczne silniej podkreślają związek pomiędzy kadmem a nowotworem płuca niż prostaty. Badania wskazują także, że związek pomiędzy tym toksycznym pierwiastkiem a nowotworem żołądka, wątroby i nerek jest niejednoznaczny [Waalkes, 2000]. Podwyższone wartości kadmu w badaniach własnych mogą mieć związek z rozwijającym się nowotworem głowy i szyi.

Toksyczność ołowiu najczęściej diagnozuje się za pomocą podwyższonego stężenia metalu we krwi [Jomovaa, Valko, 2011]. Jednak ze względu na krótki okres połowicznego zaniku (35 dni) w krwioobiegu, stężenie pierwiastka w tym materiale nie może być stosowane

do diagnozowania i wyklucza dowody ekspozycji na ten pierwiastek, jeśli narażenie wystąpiło wcześniej niż sześć tygodni przed badaniem [Patrick, 2006].

Ołów może wywoływać nowotwory, m. in. płuca i żołądka. Wykazały to badania przeprowadzone wśród osób zawodowo narażonych na toksyczne działanie ołowiu [Fu, Boffetta, 1995]. Naukowcy z IARC zebrali dane dotyczące opisywanych przypadków wystąpienia nowotworów przez różnych autorów. W opracowaniu tym opisano przypadki wystąpienia nowotworów wszystkich rejonów, m.in. nerek, płuca, żołądka, odbytnicy i ośrodkowego układu nerwowego [IARC, 2006].

W badaniach własnych wartości stężenia ołowiu w surowicy krwi pacjentów były znacznie podwyższone – najwyższe wartości odnotowano u chorych na nowotwór migdałka podniebiennego. Pacjenci w większości palili tytoń, a ołów, jako jeden z metali toksycznych, stanowi ich składnik. Zmierzono poziomy ołowiu w różnych markach papierosów. Wynosiły one od 1,33 do 3,61 $\mu\text{g/g}^{-1}$ suchej masy, średnio przyjmując wartość 2,46 $\mu\text{g/g}^{-1}$ [Ashraf, 2012]. Również Iwuoha i wsp. przeprowadzili podobne badanie w czterech, różnych markach papierosów i wykazali, że poziomy tego toksycznego pierwiastka znacząco przekraczają dopuszczalny limit [Iwuoha et al., 2013].

Według klasyfikacji IARC z 2006 roku nieorganiczne związki ołowiu są prawdopodobnie kancerogenne dla człowieka i należą do grupy 2A. Organiczne związki ołowiu nie zostały zakwalifikowane jako kancerogenne dla człowieka (Grupa 3). Naukowcy zaznaczyli jednak, że organiczne związki ołowiu są przynajmniej częściowo metabolizowane do formy jonowej, która może powodować taką samą toksyczność jak związki nieorganiczne [Rousseau et al., 2005; IARC, 2006].

Wartości stężeń wybranych pierwiastków w surowicy krwi pacjentów grupy kontrolnej i grupy nowotworowej zostały porównane z najwyższymi, dopuszczanymi stężeniami ustalonymi dla określonych metali. Zgodnie z danymi literaturowymi [Alimonti 2005; Duh, Cook, 2005; Lee 2013] otrzymane wartości zgadzały się z najwyższymi wartościami stanowiącymi zakres fizjologiczny, który dla wapnia wynosi 8,6 – 10,0 mg/dL, magnezu 16 – 26 mg/L, miedzi 70 – 140 $\mu\text{g/dL}$ (dla mężczyzn) i 80 – 155 $\mu\text{g/dL}$ (dla kobiet), żelaza 65 – 175 $\mu\text{g/dL}$ (dla mężczyzn) i 50 – 170 $\mu\text{g/dL}$ (dla kobiet), cynku 70 – 120 $\mu\text{g/dL}$. Jedynie dla manganu, dla którego zakres fizjologiczny wynosi 1,5 – 2,5 $\mu\text{g/L}$, wartości stężeń uzyskane w badaniach własnych były wielokrotnie wyższe.

Wartości stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych oznaczone w surowicy krwi były wielokrotnie wyższe od tych, które uzyskano w materiałach alternatywnych – włosach i paznokciach.

W surowicy krwi pacjentów z nowotworami głowy i szyi wykazano statystycznie istotne różnice stężeń w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku nowotworów ślinianek odnotowano różnice statystycznie istotne dla miedzi, żelaza, cynku, manganu, kobaltu, chromu VI i ołowiu w porównaniu do grupy nienowotworowej. Dla nowotworów z rakiem gardła istotne statystycznie różnice uzyskano dla wapnia, magnezu oraz kobaltu. U pacjentów z rakiem szyi różnice statystycznie istotne odnotowano dla kadmu i ołowiu, natomiast w przypadku nowotworów migdałka podniebiennego istotne statystycznie różnice wykazano dla wapnia, magnezu, miedzi, cynku, kadmu i ołowiu ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a). Jedynie w przypadku pacjentów z nowotworem jamy ustnej nie stwierdzono

statystycznie istotnych różnic w poziomach stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej.

Analizując włosy jako materiał alternatywny dla surowicy krwi odnotowano występowanie wyższych wartości stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych od tych, które występują w literaturze. Istotnym jest, że również w poszczególnych pracach naukowych, wartości te różnią się znacząco między sobą [Guo et al., 2005; Chojnacka et al., 2006; Pasha et al., 2007; Pasha et al., 2010; Afridi et al., 2011; Nasli – Esfahani et al., 2011; Al – Farsi et al., 2013; Blaurock – Busch et al., 2014; Qayyum, Shah, 2014].

Analizując stężenie wapnia w grupie kontrolnej wykazano znacząco wyższą wartość tego pierwiastka, porównując go do grup nowotworowych. Odnotowano wartości statystycznie istotne ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney'a) w przypadku nowotworów ślinianek, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej. Najwyższe wartości wapnia wśród grup nowotworowych wykazano u pacjentów z nowotworem gardła i migdałka podniebiennego, najniższe u osób z nowotworem jamy ustnej. Także w przypadku magnezu stężenie we włosach pacjentów z grupy kontrolnej było wyższe niż u pacjentów chorych na nowotwory głowy i szyi. Statystycznie istotne różnice odnotowano w przypadku nowotworów gardła i migdałka podniebiennego.

Unkiewicz – Winiarczyk i wsp. wykazali niższe wartości dla wapnia i magnezu we włosach osób palących papierosy [Unkiewicz – Winiarczyk et al., 2009]. W badaniach własnych większość pacjentów z nowotworami była w przeszłości uzależniona od nikotyny. Niskie poziomy tych pierwiastków mogły być spowodowane zmniejszonym dostarczaniem ich do organizmu wraz z dietą. Palacze są bowiem często osobami, które cierpią na zaburzenia odczuwania smaku [Unkiewicz – Winiarczyk et al., 2009]. Osoby chorujące na nowotwory głowy i szyi mają również utrudnioną możliwość spożywania pokarmów, ze względu na brak łaknienia, zaburzenia smaku, utratę apetytu, suchość w ustach, ból w jamie ustnej, zakażenia i trudności w połykaniu i przeżuwanie pokarmów [www.onkonet.pl]. Guo i wsp. również wykazali podwyższone wartości dla wapnia i magnezu we włosach pacjentów stanowiących grupę kontrolną, w porównaniu do grupy chorych z nowotworem prostaty [Guo et al., 2007]. Z kolei Pasha i wsp. u pacjentów z nowotworami zarejestrowali wyższe wartości dla tych dwóch niezbędnych pierwiastków, w porównaniu do zdrowych osób [Pasha et al., 2007].

W przypadku miedzi wykazano statystycznie istotne różnice w odniesieniu do grupy kontrolnej we włosach pacjentów z nowotworami szyi, natomiast w przypadku żelaza różnice te zaobserwowano u osób z rakiem jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego. W grupie kontrolnej odnotowano wyższe poziomy żelaza niż w przypadku wszystkich grup nowotworowych, natomiast poziom stężenia miedzi we włosach był najwyższy u chorych z nowotworem gardła. Pacjenci z rakiem jamy ustnej, ślinianek, szyi i migdałka podniebiennego cechowali się niższym stężeniem miedzi niż pacjenci grupy kontrolnej.

Badania innych autorów, którzy prowadzili pomiary dotyczące zawartości pierwiastków w ludzkim organizmie, różniły się poziomami ich stężeń. Joo i wsp. wykazali, że u pacjentek z nowotworami gruczołu sutkowego, poziomy żelaza i miedzi były niższe, niż u osób w grupie kontrolnej [Joo i wsp., 2009]. Za wyjątkiem poziomów miedzi u chorych z nowotworem gardła, w badaniach własnych również potwierdzono te same zależności.

W badaniu Al-Farsi i wsp. także wykazano wyższe poziomy miedzi w grupie kontrolnej, natomiast w przypadku żelaza wyższe wartości odnotowano u dzieci chorych na autyzm [Al – Farsi et al., 2013]. U pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego [Pasha et al., 2010] i płuca wykazano wyższe wartości żelaza i miedzi u osób chorujących na raka w porównaniu do grupy kontrolnej. Te same zależności wykazał w swoim badaniu Pasha i wsp. [Pasha et al., 2007].

W badaniach własnych najwyższe wartości stężeń cynku we włosach wykazano w przypadku nowotworów gardła. U osób z nowotworami jamy ustnej, ślinianek, szyi i migdałka podniebiennego wartości stężeń tego metalu były niższe niż u pacjentów grupy kontrolnej. Nie odnotowano wartości istotnych statystycznie w żadnym z badanych grup nowotworów w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Memon i wsp. w badaniu prowadzonym u kobiet z nowotworem gruczołu sutkowego i jajnika wykazali niższe wartości cynku we włosach chorych pacjentek w odniesieniu do grupy kontrolnej [Memon et al., 2007]. Również Unkiewicz-Winiarczyk i wsp. wykazali obniżone stężenia cynku we włosach osób palących papierosy [Unkiewicz - Winiarczyk et al., 2009]. Zakładając, że poziom cynku we włosach stanowi odzwierciedlenie jego zawartości w całym organizmie, można stwierdzić, że palenie papierosów prowadzi do jego obniżenia.

Niedostateczna podaż cynku oraz nieprawidłowe przyswajanie tego pierwiastka mogą być powodem niedostatecznych ilości w organizmie [Unkiewicz - Winiarczyk et al., 2009]. Wykazano także antagonistyczne działanie kadmu zawartego w dymie papierosowym w stosunku do cynku, które może prowadzić do obniżenia jego poziomu [Unkiewicz, Winiarczyk et al., 2009]. Karimi i wsp. oraz Qayyum i Shah, odpowiednio u pacjentów z rakiem prostaty i płuc, także wykazali wyższe stężenie cynku w grupie kontrolnej, niż u grupy nowotworowej [Karimi et al., 2012; Qayyum, Shah, 2014]. Natomiast Pasha i wsp. wykazali wyższe wartości cynku u pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego [Pasha et al., 2010].

Ostatnim badanym pierwiastkiem niezbędnym w badaniu własnym był mangan. Wykazano statystycznie istotne różnice stężeń u pacjentów z nowotworami ślinianek, jamy ustnej i szyi w porównaniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej. Najwyższe wartości manganu wykazano u pacjentów grupy kontrolnej. Leung i Huang wyznaczyli stężenie 11 pierwiastków niezbędnych, w tym manganu, we włosach ochotników [Leung, Huang, 1997]. Osoby te zostały podzielone na cztery grupy – kontrolną (grupa A), chorzy na nowotwór nosogardła - dopiero zdiagnozowani (grupa B), pacjenci po trzech (grupa C) i po sześciu miesiącach leczenia (grupa D) [Leung, Huang, 1997]. W badaniu wykazano niższe wartości manganu u pacjentów dopiero zdiagnozowanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Autorzy zauważyli jednak, że wraz z upływem czasu leczenia, różnice w wartościach pierwiastków zaczynają się zmniejszać i wyrównywać z poziomem metali u pacjentów grupy kontrolnej [Leung, Huang, 1997].

W badaniach własnych zbadano także poziomy stężeń pierwiastków toksycznych we włosach pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz w grupie kontrolnej. Podwyższone poziomy pierwiastków toksycznych, które zaobserwowano w badaniach własnych, mogą być związane z dużą ilością zaburzeń fizjologicznych występujących u ludzi [Pasha et al., 2007].

Jak powszechnie wiadomo, kobalt jest niezbędnym składnikiem witaminy B12. Jednak w wyższych stężeniach może mieć właściwości nowotworowe [Qayyum, Shah, 2014].

Inhalowanie dużych ilości kobaltu może głównie uszkadzać płuca, prowadząc do astmy, zapalenia płuc czy nowotworu. Kancerogenne właściwości kobaltu związane są z jego zdolnością do hamowania mechanizmów naprawczych i wywoływania uszkodzeń DNA [Qayyum, Shah, 2014]. Najwyższe stężenie tego metalu wyznaczono we włosach pacjentów z nowotworem szyi, najniższe u chorych z rakiem jamy ustnej – była to różnica statystycznie istotna w odniesieniu do grupy kontrolnej. Pasha i wsp. w swoim badaniu wykazali wyższe stężenia kobaltu u pacjentów z różnymi typami nowotworu w porównaniu do grupy kontrolnej [Pasha et al., 2007]. Z kolei Leung i Huang wykazali niższe stężenia tego metalu u pacjentów z nowotworami nosogardzieli niż w grupie kontrolnej [Leung, Huang, 1997].

Inhalowanie chromu VI może prowadzić do owrzodzenia nosa, kataru oraz problemów z oddychaniem, takich jak astma, kaszel czy duszność. Długotrwała ekspozycja na ten pierwiastek może spowodować uszkodzenie wątroby, nerek, zaburzenia krążenia i układu nerwowego [Abdulrahman et al., 2012]. Chrom jest pierwiastkiem, który wykazuje działanie kancerogenne. Badania eksperymentalne potwierdziły, że chrom stymuluje produkcję rodników tlenowych, które wywołują uszkodzenia DNA [Pasha et al., 2010]. W badaniach własnych najwyższe stężenie chromu VI oznaczono we włosach pacjentów z nowotworami gardła, najniższy poziom tego pierwiastka, stanowiący istotną statystycznie różnicę w odniesieniu do grupy kontrolnej, odnotowano we włosach osób z nowotworem migdałków. We wcześniejszych badaniach własnych prowadzonych w grupie pacjentów z nowotworami krtani i ślinianek wykazano wyższe stężenie chromu VI we włosach i paznokciach osób chorujących na nowotwór ślinianek w porównaniu do materiału alternatywnego pacjentów z rakiem krtani [Woźniak et al., 2011]. Qayyum i Shah w swoich badaniach wykazali natomiast wyższe stężenia chromu u pacjentów grupy kontrolnej w porównaniu do osób chorujących na nowotwór płuca [Qayyum, Shah, 2014]. Z kolei Pasha i wsp. stwierdzili odwrotne zależności – u pacjentów z różnymi typami nowotworów wykazano wyższe poziomy tego metalu niż u osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną [Pasha et al., 2007].

Kancerogenne właściwości kadmu mogą być związane z wieloma czynnikami, takim jak palenie tytoniu czy poziom hormonów płciowych. Wyniki Åkesson i wsp. potwierdziły hipotezę, że kadm może wpływać na poziom estrogenów i w związku z tym zwiększać ryzyko hormonozależnych nowotworów [Åkesson et al., 2008]. Palacze tytoniu i osoby zamieszkujące tereny zanieczyszczone mają wyższe wartości kadmu we krwi i moczu, przy czym palenie tytoniu powoduje wielokrotnie podwyższone wartości tego pierwiastka w porównaniu do osób wolnych od nałogu [Afridi et al., 2011]. Badania potwierdziły, że łączne spożywanie alkoholu i palenie prowadzi do zwiększonego wchłaniania i kumulacji kadmu we wszystkich tkankach organizmu [Afridi et al., 2011].

U pacjentów chorych na nowotwór ślinianek wykazano podwyższone stężenie kadmu, a najniższy poziom zaobserwowano w grupie osób z nowotworem gardła. W przypadku tego metalu nie odnotowano różnic statystycznie istotnych w stosunku do grupy kontrolnej. Blaurock – Busch i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród pacjentów z różnymi typami nowotworów wykazali porównywalne stężenie kadmu u osób chorych i grupy kontrolnej, jednak najwyższe stężenia zaobserwowano u pacjentów z nowotworem gruczołu sutkowego [Blaurock – Busch et al., 2014]. Qayyum i Shah wykazali natomiast wyższy poziom kadmu u pacjentów z nowotworami płuca niż w grupie kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014].

Ołów jest bardzo toksycznym metalem, może dostać się do organizmu wieloma drogami. Posiada zdolność do kumulowania się, prowadząc do uszkodzenia wielu organów i układów [Abdulrahman et al., 2012]. Uważany jest za pierwiastek o działaniu mutagennym, m.in. z powodu nasilania peroksydacji lipidów [Blaurock – Busch et al., 2014]. Ołów może występować w wysokich stężeniach u osób palących papierosy [Afridi et al., 2011]. Badania epidemiologiczne wykazały również potencjalny związek pomiędzy narażeniem zawodowym na związki ołowiu a występowaniem nowotworów płuca [Qayyum, Shah, 2014].

Otrzymano dużą rozbieżność w poziomach stężeń ołowiu w poszczególnych grupach chorych pacjentów i grupy kontrolnej. Wysoki poziom zaobserwowano u osób z nowotworem ślinianek, natomiast dużo niższy u chorych na raka gardła. Interesującym był fakt, że we wszystkich grupach pacjentów z nowotworami głowy i szyi odnotowano różnice statystycznie istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej ($p \leq 0,05$, test U Manna - Whitney’ a). Również w badaniach innych autorów wartości stężeń ołowiu różniły się pomiędzy sobą. Qayyum i Shah wykazali wyższe wartości ołowiu u osób z nowotworem płuca w porównaniu do grupy kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014]. Poziomy stężenie ołowiu w powyższych badaniach były zbliżone do uzyskanych w niniejszej pracy. Pasha i wsp. także określili podobne wartości dla ołowiu we włosach, jak w badaniach własnych - były one wyższe u pacjentów nowotworowych [Pasha et al., 2007; Pasha et al., 2010]. Natomiast Blaurock – Busch i wsp. porównali wartości ołowiu i innych pierwiastków we włosach pacjentów z różnymi typami nowotworów. Najwyższe wartości ołowiu wykazano we włosach pacjentów z nowotworami gruczołu sutkowego i były one znacząco wyższe niż u chorych na raka macicy. Porównując wszystkie przypadki nowotworowe, autorzy wykazali wyższe poziomy stężenia ołowiu we włosach chorych niż u osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną [Blaurock – Busch et al., 2014].

Drugim analizowanym materiałem alternatywnym były paznokcie pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz osób grupy kontrolnej. Wartości stężeń pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych w tym materiale były zróżnicowane. Autorzy innych prac badawczych także wykazywali szeroki zakres przedziału wartości stężeń pierwiastków [Samanta et al., 2004; Bergomi et al., 2005; Mehra et al., 2005; Batista et al., 2008; Carneiro et al., 2011; Nasli-Esfahani et al., 2011; Abdulrahman et al., 2012; Qayyum, Shah et al., 2014]. W większości przypadków poziomy pierwiastków w paznokciach pacjentów badań własnych przewyższały wartości stężeń określonych w literaturze.

Analizując poziom wapnia najwyższe wartości stężeń dla tego pierwiastka uzyskano u pacjentów grupy kontrolnej, najniższe u osób z nowotworem jamy ustnej. Statystycznie istotne różnice odnotowano w przypadku pacjentów z nowotworem gardła, jamy ustnej i migdałka podniebiennego, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wartości stężeń wapnia, jakie wykazano w paznokciach pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz u osób grupy kontrolnej były niższe od tych uzyskanych we włosach badanych grup, jedynie w przypadku jamy ustnej wartości stężeń były bardzo zbliżone. Qayyum i Shah uzyskali w swojej pracy nieznacznie wyższe wartości poziomu wapnia u pacjentów z nowotworami płuca w porównaniu do pacjentów grupy kontrolnej. Były one jednak niższe niż wartości otrzymane w badaniach własnych [Qayyum, Shah, 2014].

Najwyższe wartości stężeń dla magnezu wykazano w paznokciach pacjentów z nowotworami ślinianek i szyi (poziomy te były jednakowe), najniższe natomiast u chorych

z rakiem gardła. Wykazano statystycznie istotne różnice w poziomach magnezu w paznokciach pacjentów z nowotworami jamy ustnej, gardła i migdałka podniebiennego w porównaniu do grupy kontrolnej.

Porównując wartości stężeń magnezu we włosach i paznokciach pacjentów, wykazano wyższe poziomy w paznokciach osób chorych na nowotwory ślinianek i szyi, natomiast w przypadku kontroli zdecydowanie wyższe wartości odnotowano we włosach badanych. Carneiro i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród zdrowych, brazylijskich uczniów (12 – 18 lat) wykazali znacząco wyższe wartości stężeń magnezu w paznokciach, w porównaniu do włosów. Analizując uzyskane przez nich wyniki można stwierdzić, że poziomy stężeń były dużo niższe niż otrzymane w badaniach własnych [Carneiro et al., 2011]. Qayyum i Shah uzyskali wyższe wartości tego niezbędnego dla organizmu pierwiastka w grupie kontrolnej, niż u osób chorujących na nowotwór płuca [Qayyum, Shah, 2014]. Uzyskane przez nich wyniki były niższe niż te, które wykazano w badaniach własnych. Natomiast Nasli-Esfahani i wsp., którzy przeprowadzili porównanie stężeń pierwiastków we włosach, paznokciach, surowicy i moczu pacjentów chorych na cukrzycę, odnotowali nieznacznie wyższe wartości magnezu w paznokciach osób stanowiących grupę kontrolną w porównaniu do cukrzyków [Nasli-Esfahani et al., 2011]. Zakres stężeń był podobny do uzyskanego w grupie chorych na nowotwory gardła i jamy ustnej w badaniach własnych.

W niniejszych badaniach wykazano najwyższe wartości stężenia miedzi u pacjentów z nowotworami ślinianek, najniższe poziomy zaobserwowano u osób z rakiem jamy ustnej – w tym przypadku były to różnice statystycznie istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej, nienowotworowej. Bergomi i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród niedawno zdiagnozowanych pacjentów chorujących na nowotwór skóry, wykazali wyższe wartości miedzi w paznokciach u nóg, niż u osób grupy kontrolnej [Bergomi et al., 2005]. Może być to związane z nieprawidłowym metabolizmem białek zawierających miedź w przebiegu choroby [Bergomi et al., 2005]. Poziomy uzyskane przez autorów były dużo niższe od tych, które otrzymano w badaniach własnych.

Mehra i wsp. przeprowadzili badania wśród ochotników, którzy zostali podzieleni na grupy badawcze w zależności od ich nawyków osobistych – palenia tytoniu, spożywania alkoholu, diety, a także historii medycznej [Mehra, Juneja, 2005]. Poziomy miedzi u pacjentów palących tytoń w przedziale wiekowym 51 – 60 lat były wyższe, niż u osób grupy kontrolnej. Wartości te były statystycznie istotne. U osób z chorobami skóry, nadciśnieniem i chorobami psychicznymi również wykazano wyższe wartości tego pierwiastka niż w grupie osób zdrowych. Poziomy stężeń miedzi u chorych pacjentów były podobne do otrzymanych w badaniach własnych, natomiast wartości stężeń zaobserwowane u palaczy odpowiadały wynikom uzyskanym dla pacjentów z nowotworami ślinianek [Mehra, Juneja, 2005].

Najwyższe stężenie żelaza zaobserwowano w grupie kontrolnej, najniższe natomiast u pacjentów z nowotworem gardła. Statystycznie istotne różnice w odniesieniu do grupy kontrolnej otrzymano w przypadku osób z nowotworami jamy ustnej, gardła i migdałka podniebiennego. Bergomi i wsp. również wykazali wyższe wartości średnich poziomów żelaza u pacjentów z grupy kontrolnej w porównaniu do osób chorych na nowotwór skóry [Bergomi et al., 2005]. We wcześniej prowadzonych badaniach własnych także zaobserwowano dużo wyższe stężenie żelaza zarówno we włosach, jak i w paznokciach

pacjentów grupy kontrolnej w porównaniu do osób chorych na nowotwór krtani oraz jamy ustnej i języka [Woźniak et al., 2012]. Poziom żelaza w paznokciach pacjentów z nowotworem ślinianki był tylko nieznacznie niższy niż w grupie kontrolnej [Woźniak et al., 2012]. Natomiast Mehra i Juneja w swoich badaniach odnotowali wyższe stężenia tego pierwiastka u osób cierpiących na choroby skóry, oczu, cukrzycę czy problemy z oddychaniem. We wszystkich przypadkach były to wartości statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej [Mehra, Juneja, 2005]. Również Qayyum i Shah wykazali wyższy poziom żelaza u pacjentów z nowotworami płuc w porównaniu do grupy kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014]. Karimi i wsp. w swoim badaniu przeprowadzonym wśród chorych na nowotwór prostaty stwierdzili, że wysoki poziom żelaza w paznokciach może być związany ze zbyt dużym jego przyjmowaniem z żywnością lub suplementami diety, co z kolei może stanowić źródło reaktywnych form tlenu [Karimi et al., 2012]. Wiadomym jest bowiem fakt, że łatwiej przyswajalna jest forma żelaza hemowego, które występuje przede wszystkim w czerwonym mięsie i podrobach.

W badaniach własnych odnotowano najwyższe stężenie cynku w paznokciach pacjentów z nowotworem migdałka podniebiennego, najniższe natomiast u chorych z nowotworem ślinianek. Nie były to jednak różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej.

W większości dostępnych danych literaturowych poziomy cynku w paznokciach osób grupy kontrolnej były wyższe od stężeń otrzymanych u pacjentów grup nowotworowych [Bergomi et al., 2005; Karimi et al., 2012]. Jedynie Qayyum i Shah odnotowali wyższe wartości dla tego pierwiastka w paznokciach chorych na nowotwór płuca niż w grupie kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014].

Lee i Jacobs w swoim badaniu potwierdzili, że cynk posiada właściwości antyoksydacyjne i jego zwiększone spożycie może być związane z obniżeniem powstawania nowotworów płuca wśród kobiet w okresie postmenopauzalnym, spożywających duże dawki suplementów zawierających witaminę C [Lee, Jacobs, 2005]. Dlatego tak ważnym jest uzupełnianie tego pierwiastka u pacjentów nowotworowych.

Mangan, będący pierwiastkiem niezbędnym dla organizmu, stanowi składnik manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), która zmniejsza uszkodzenia oksydacyjne spowodowane działaniem wolnych rodników tlenowych, ale obniżenie jej aktywności prowadzić może do nasilenia stresu oksydacyjnego i w konsekwencji do rozwinięcia się procesu nowotworowego [Spangler, Reid, 2009]. W nowotworach płuc i piersi wykazano niewystarczającą ilość MnSOD [Spangler, Reid, 2009]. W badaniach własnych najwyższe, średnie stężenie manganu zaobserwowano u osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Najniższe wartości tego pierwiastka odnotowano u pacjentów z nowotworem gardła. Statystycznie istotne różnice w średnich zawartościach manganu, w odniesieniu do pacjentów grupy kontrolnej zaobserwowano u pacjentów z nowotworami jamy ustnej, migdałka podniebiennego i gardła. Wartości manganu we włosach i paznokciach pacjentów z nowotworami głowy i szyi kształtowały się na podobnym poziomie. Pacjenci grupy kontrolnej posiadali znacznie niższe wartości manganu w paznokciach, w porównaniu do stężeń tego pierwiastka otrzymanych we włosach tej samej grupy pacjentów. Natomiast Qayyum i Shah odnotowali wyższy poziom tego pierwiastka w paznokciach pacjentów chorych na nowotwór płuc i grupy kontrolnej, niż w drugim, badanym materiale

alternatywnym – we włosach powyższych osób [Qayyum, Shah, 2014]. Porównując poziomy manganu w obrębie jednego materiału biologicznego - paznokci, u pacjentów wykazano wyższe stężenia manganu niż u osób z grupy kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014]. Było to stwierdzenie odbiegające od uzyskanego w badaniach własnych, jednak biorąc pod uwagę fakt, że mangan jest niezbędnym pierwiastkiem w ludzkim organizmie, jego wyższy poziom u osób zdrowych od poziomu stężenia tego pierwiastka u pacjentów chorujących na nowotwory głowy i szyi, wydaje się być prawidłowo przeprowadzonym pomiarem.

W paznokciach pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz w grupie kontrolnej, nienowotworowej zmierzono także poziomy pierwiastków toksycznych – kobaltu, chromu VI, kadmu i ołowiu. Najwyższe stężenie kobaltu zaobserwowano u pacjentów z nowotworem ślinianek, w tej grupie chorych poziomy stężenie pierwiastka były wyższe niż u pacjentów grupy kontrolnej. Najniższe stężenie kobaltu wyznaczono u chorych z rakiem gardła. Różnice statystycznie istotne wykazano w przypadku nowotworu jamy ustnej w porównaniu do grupy kontrolnej. Carneiro i wsp. wykazali podobne wartości kobaltu w paznokciach młodzieży pochodzącej z Porto Alegre do tych otrzymanych w badaniach własnych [Carneiro et al., 2011]. Natomiast Qayyum i Shah w swoich badaniach przeprowadzonych wśród chorych na nowotwór płuca wykazali wyższe wartości kobaltu we włosach i paznokciach pacjentów z rakiem w porównaniu do grupy kontrolnej. Interesującym były bardzo wysokie poziomy stężenie kobaltu, zarówno w grupie chorych, jak i u osób stanowiących kontrolę w badaniu, znacząco przewyższające wartości otrzymane w badaniach własnych [Qayyum, Shah, 2014].

Rogers i wsp. badali poziom pierwiastków u pacjentów z nowotworami górnej części przewodu pokarmowego [Rogers et al., 1993]. Stwierdzili oni podwyższone poziomy kobaltu w paznokciach chorych na nowotwór przełyku i jamy ustnej. Pacjenci chorujący na nowotwór spożywali mniejsze ilości produktów pochodzenia zwierzęcego, niż osoby z grupy kontrolnej, w związku z czym ilość witaminy B₁₂ w ich organizmie powinna być niższa [Rogers et al., 1993]. Poza możliwym, pokarmowym źródłem kobaltu, za jego podwyższony poziom może także odpowiadać narażenie zawodowe niektórych pacjentów [Rogers et al., 1993] i to może być potencjalnym powodem uzyskania takich wyników.

Statystycznie istotne różnice w poziomach chromu VI zaobserwowano u pacjentów z nowotworem jamy ustnej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Najwyższe stężenie tego metalu wykazano u pacjentów z rakiem migdałka podniebiennego, najniższe u chorych na nowotwór jamy ustnej. Bergomi i wsp. wykazali wyższe wartości chromu u pacjentów grupy kontrolnej, niż u chorych na nowotwór skóry [Bergomi et al., 2005]. W badaniach własnych stężenie chromu VI u osób zdrowych było wyższe niż u pacjentów chorych tylko w przypadku pacjentów z nowotworami gardła i jamy ustnej. W badaniu Mehra i Juneja poziom chromu u pacjentów palących tytoń był wyższy w porównaniu do osób niepalących; jedynie w przedziale wiekowym 31 – 40 lat zależność była odwrotna [Mehra, Juneja, 2005]. Wysokie stężenia chromu u większość pacjentów palących tytoń mogą być związane z obecnością metalu w liściach tej rośliny, do której prawdopodobnie przedostaje się on z gleby [Mehra, Juneja, 2005]. Bardzo wysokie stężenia chromu zaobserwowali w swoim badaniu Qayyum i Shah, poziom pierwiastka w grupie kontrolnej odpowiadał wartości uzyskanej u pacjentów z nowotworem migdałka podniebiennego w badaniach własnych. U pacjentów z nowotworami płuca autorzy zaobserwowali wyższe wartości chromu niż u pacjentów grupy kontrolnej [Qayyum, Shah, 2014].

Kolejnym badanym metalem był kadm. Jego poziom osiągnął najwyższą wartość u pacjentów z nowotworem ślinianek, najniższą zaobserwowano u chorych na nowotwór gardła. Statystycznie istotne różnice odnotowano u pacjentów z nowotworami ślinianek w porównaniu do grupy kontrolnej.

Dostępne dane literaturowe wskazują na różnorodną zawartość kadmu w paznokciach. Batista i wsp. w doświadczeniu mającym na celu zoptymalizowanie metody badawczej dotyczącej wyznaczenia poziomów pięciu metali w próbkach paznokci, wykazali zbliżone poziomy kadmu do otrzymanych w badaniach własnych [Batista et al., 2008]. Także Mehra i Juneja uzyskali podobne wartości kadmu, w pracy autorów poziom metalu był wyższy u osób palących tytoń w porównaniu do niepalących [Mehra, Juneja, 2005]. W badaniu Bergomi i wsp. poziom badanego metalu toksycznego u pacjentów z nowotworem skóry były niższe od osób z grupy kontrolnej [Bergomi et al., 2005], natomiast wartości uzyskane w niniejszej pracy były wyższe od stężeń otrzymanych w obydwu badanych grupach. Natomiast Qayyum i Shah wykazali wyższe wartości od uzyskanych w badaniach własnych, grupa pacjentów z nowotworem płuca charakteryzowała się wyższym stężeniem metalu niż grupa kontrolna [Qayyum, Shah, 2014]. Według autorów wcześniejsze badania sugerowały, że kadm nie tylko odpowiada za wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu, ale także zakłóca podstawowe systemy antyoksydacyjne, które mogą pośredniczyć w uszkodzeniu DNA, prowadząc do zwiększonego ryzyka powstania nowotworu [Qayyum, Shah, 2014]. Istnieje wiele badań potwierdzających zwiększone statystycznie ryzyko powstania nowotworów płuca u osób narażonych na stosunkowo wysokie stężenia kadmu [Qayyum, Shah, 2014].

Kolejny etap badań obejmował pomiary stężeń ołowiu w paznokciach pacjentów z nowotworami głowy i szyi oraz u osób grupy kontrolnej. Najwyższe wartości uzyskano u pacjentów z nowotworami ślinianek, najniższe u chorych na raka migdałka podniebiennego. Różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej wykazano u pacjentów z nowotworami ślinianek, jamy ustnej i migdałka podniebiennego. Zakres uzyskanych wartości dla ołowiu był stosunkowo szeroki, może to być związane z różnym narażeniem środowiskowym i zawodowym pacjentów na ten metal. Zostało to potwierdzone także w badaniach innych autorów. Samanta i wsp. wykazali podobne zakresy stężeń ołowiu u osób pochodzących z Bengalii Zachodniej w Indiach, terenu o wysokim zanieczyszczeniu arsenem [Samanta et al., 2004]. Stężenia ołowiu zarówno we włosach, jak i w paznokciach, związane były z wpływem narażenia środowiskowego – Samanta i wsp. porównali wyniki swoich badań uzyskanych dla tego toksycznego pierwiastka z danymi innych autorów i potwierdzili tę zależność [Samanta et al., 2004]. Bardzo wysokie poziomy stężenie ołowiu w paznokciach uzyskali Qayyum i Shah u osób z nowotworem płuca [Qayyum, Shah, 2014], natomiast Bergomi i wsp. u chorych na czerniaka skóry oraz Carneiro i wsp. w badaniu przeprowadzonym wśród zdrowych, brazylijskich uczniów otrzymali dużo niższe wartości [Bergomi et al., 2005; Carneiro et al., 2011].

Pierwiastki niezbędne i metale toksyczne odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ludzkiego organizmu. Optymalne spożycie i bezpieczny zakres stężeń każdego pierwiastka w istotny sposób regulują zachodzące procesy życiowe u każdego człowieka. Konieczne są dalsze badania, aby wykazać, jak dany metal i w jakim stężeniu odzwierciedla rzeczywiste narażenie.

Istotne poziomy metali w próbkach paznokci wskazują na ich obecność w środowisku i miejscu pracy badanych grup populacji. Dowodzą także poziomu podatności na choroby i zagrożeń wynikających z obecności tych metali, szczególnie przy długotrwałym narażeniu [Mehra, Juneja, 2005].

Wykazano, że paznokcie są istotnym narzędziem diagnostycznym w ocenie narażenia na metale toksyczne i odzwierciedlają narażenie na pierwiastki toksyczne, jednak dalsze badania przeprowadzone wśród większej populacji badanej są konieczne, aby uzyskać bardziej miarodajne wyniki [Mehra, Juneja, 2005].

Poziom stężenia metali w próbkach biologicznych zależy od wielu czynników, m.in. od środowiska, w którym przebywa badana osoba, płci, wieku, a także od współistniejących chorób. Duże znaczenie odgrywają także stosowane używki – palenie tytonu i spożywanie alkoholu oraz codzienna dieta. W badaniu Saat i wsp. wykazano wyższe poziomy metali toksycznych w paznokciach w porównaniu do drugiego, badanego materiału alternatywnego – włosów [Saat et al., 2013]. Autorzy tłumaczyli ten fakt wyższą zawartością α -keratyny w paznokciach niż we włosach. Stwierdzili, że włosy, paznokcie u rąk i u stóp reprezentują odmienne poziomy metali toksycznych, co spowodowane jest różnicami w procesie wzrostu badanych materiałów [Saat et al., 2013]. Paznokcie u rąk mogą bowiem rosnąć około 3,47 mm na miesiąc, podczas gdy wzrost paznokci u stóp wynosi około 1,62 mm na miesiąc. W tym samym czasie wzrost włosa określany jest na 1,4 cm. Paznokcie u stóp są mniej eksponowanym i wolniej rosnącym materiałem biologicznym, dlatego korzystniej jest używać ich do określenia narażenia w przeszłości. Paznokcie u rąk są natomiast bardziej narażone na zanieczyszczenia środowiskowe [He, 2011; Saat et al., 2013].

Analiza materiału alternatywnego – włosów i paznokci daje podstawy do rozróżnienia badanych populacji.

Aby potwierdzić tę interpretację zastosowano narzędzie chemometryczne, jakim była analiza skupień. Podjęto próbę jednoznacznego rozróżnienia grupy pacjentów z nowotworami głowy i szyi i grupy kontrolnej. Miała ona na celu pogrupowanie elementów w taki sposób, by tworzyły jak najbardziej podobne do siebie klasy i jednocześnie różniły się od pozostałych grup. Grupowanie danych przeprowadzono z wykorzystaniem metody Warda, a za miarę odległości między skupieniami przyjęto kwadrat odległości Euklidesa. Wykreślono dendrogramy dla wszystkich materiałów biologicznych - surowicy krwi, włosów i paznokci. Analiza dendrogramu sporządzonego na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy wszystkich próbek surowicy krwi nie pozwoliła na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup. Nie oznacza to jednak, że nie można było rozróżnić omawianych grup, udało się bowiem wyodrębnić subpopulacje o podobnym charakterze. Najlepsze rozróżnienie grup uzyskano dla grupy kontrolnej i pacjentów z rakiem migdałków.

W przypadku włosów i paznokci interpretacja dendrogramów sporządzonych na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy wszystkich próbek materiału alternatywnego nie pozwala na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup, jednak w przypadku paznokci można zauważyć, że klaster po prawej stronie w znacznej części składa się z osób z grupy kontrolnej. Analiza poszczególnych dendrogramów, podzielonych na grupy pacjentów z danym rodzajem nowotworu i grupę kontrolną, przeprowadzona we włosach, pozwala na wyróżnienie dwóch lub trzech skupisk obiektów, w zależności od schorzenia. W przypadku paznokci podział nastąpił na dwie grupy obiektów, na dendrogramie

sporządzonym dla wyników od osób z grupy kontrolnej oraz pacjentów z rakiem migdałków podział ten był bardzo wyraźny.

Kolejnym krokiem było zastosowanie analizy dyskryminacyjnej, przeprowadzonej w celu stworzenia modelu różnicującego pacjentów z pięcioma rodzajami raka oraz zdrowych ludzi. To narzędzie chemometryczne zastosowano dla surowicy krwi, włosów i paznokci. W przypadku klasycznego materiału biologicznego, dla którego przeprowadzono analizę dyskryminacyjną z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy krwi dla wszystkich grup, największy wkład do ogólnej klasyfikacji miał wapń (Ca), następnie ołów (Pb) i mangan (Mn), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to kadm (Cd) i żelazo (Fe). W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków.

W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że ponad 73% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację, w 100% poprawną, uzyskano w przypadku grupy z rakiem migdałków, drugą w kolejności dla grupy osób zdrowych (96,4%). Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem jamy ustnej – jedynie 15,4% poprawnych klasyfikacji.

Na podstawie przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej stworzono model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz migdałków. Istotny wkład w dyskryminację grup miały jedynie dwa z dziesięciu pierwiastków: kadm (Cd) oraz chrom (Cr), zaś dwa pierwiastki – miedź (Cu) oraz kobalt (Co), znalazły się poza modelem.

W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji ma kadm (Cd). Na podstawie klasyfikacji *post hoc* prawie 92% pacjentów zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację uzyskano dla osób z rakiem ślinianek (96,2%), natomiast mniej trafnych klasyfikacji uzyskano dla osób z rakiem migdałków (80%).

Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem szyi oraz migdałków. Wykazano istotny wkład w dyskryminację grup jedynie trzech z dziesięciu pierwiastków: wapnia (Ca), magnezu (Mg) oraz chromu (Cr), zaś aż sześć pierwiastków znalazło się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji miał magnez (Mg). Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że jest ona w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

W przypadku materiału alternatywnego, przeprowadzono analizę dyskryminacyjną z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla wszystkich grup. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji miało żelazo (Fe), następnie ołów (Pb) i magnez (Mg), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to miedź (Cu) i cynk (Zn). W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że prawie 73% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą

klasyfikację, w 83,3% poprawną, uzyskano w przypadku grupy z rakiem szyi, drugą w kolejności dla grupy osób zdrowych (81,3%). Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem migdałków – 40% poprawnych klasyfikacji.

Na podstawie przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej stworzono model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi. Istotny wkład w dyskryminację grup wykazały jedynie trzy z pięciu pierwiastków, które znalazły się w modelu. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji miało żelazo (Fe). Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że jest ona w 100% poprawna w przypadku obu grup.

Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem szyi oraz gardła. Istotny wkład w dyskryminację grup miały jedynie dwa z dziesięciu pierwiastków: żelazo (Fe) oraz miedź (Cu), zaś aż osiem pierwiastków znalazło się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji miało żelazo (Fe). Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że jest ona w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

Analiza dyskryminacyjna przeprowadzona z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla wszystkich grup wykazała istotny wkład w dyskryminację grup sześciu pierwiastków, tylko jeden z metali – kobalt, nie znalazł się w modelu. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji miał magnez (Mg), następnie ołów (Pb) i cynk (Zn), zaś zmienne o najmniejszym, lecz wysoce istotnym wkładzie to chrom (Cr) i mangan (Mn). W kolejnym kroku klasyfikację obiektów oparto na tych samych danych jak w przypadku procedury dyskryminacji wszystkich grup. Wyznaczone funkcje klasyfikacyjne obliczone zostały dla każdej grupy i posłużyły w celu bezpośredniej klasyfikacji przypadków. W oparciu o otrzymane funkcje klasyfikacyjne zbadano ich trafność i użyteczność, dokonując kwalifikacji pacjentów do omawianych grup. Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że prawie 60% osób zostało poprawnie zakwalifikowanych do swoich grup. Najlepszą klasyfikację, w 80,3% poprawną, uzyskano w przypadku grupy kontrolnej, drugą w kolejności dla grupy pacjentów z rakiem jamy ustnej (72,7%). Z kolei najgorszą klasyfikację uzyskano dla grupy z rakiem gardła – jedynie 7,7% poprawnych klasyfikacji.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonej analizy dyskryminacyjnej postanowiono stworzyć model różnicujący pacjentów z rakiem ślinianek oraz gardła. Wykazano istotny wkład w dyskryminację grup jedynie trzech pierwiastków, zaś aż siedem znalazło się poza modelem. Największy wkład do ogólnej klasyfikacji miał magnez (Mg). Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że jest ona poprawna w 97,2%. Prawidłowo w 100% zakwalifikowano wszystkie przypadki z grupy z rakiem gardła, natomiast w przypadku grupy z rakiem ślinianek klasyfikacja była w 92,3% poprawna.

Kolejny model stworzono w celu zróżnicowania pacjentów z rakiem ślinianek oraz jamy ustnej. Wykazano istotny wkład w dyskryminację grup trzech z czterech pierwiastków: magnezu (Mg), chromu (Cr) oraz ołowiu (Pb), natomiast sześć pierwiastków znalazło się poza modelem. W omawianym modelu największy wkład do ogólnej klasyfikacji miał magnez (Mg). Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały, że jest ona w 100% poprawna w przypadku obu grup, jednak należy zwrócić uwagę na to, że liczba przypadków w obu grupach jest niewielka.

Zastosowana analiza statystyczna jest jedną z technik umożliwiających lepsze rozróżnienie badanych grup, jednak konieczne jest zastosowanie także innych metod

pomiarowych, by móc zweryfikować słuszność przeprowadzonych pomiarów. Badania statystyczne powinny zostać połączone z badaniami klinicznymi, bo dopiero taka analiza pozwoli na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników. Aby możliwe było rutynowe wykorzystanie takiego modelu konieczne jest ujednoczenie technik badawczych i zastosowanie bardziej liczebnych grup badawczych. Może to ułatwić i przyspieszyć proces diagnozowania chorych pacjentów, a także przyczynić do zmniejszenia zachorowalności.

Uzyskane wyniki dostarczyły informacji dotyczących ogólnej kondycji organizmu pacjentów chorujących na nowotwory głowy i szyi, pozwoliły na określenie ich stanu pierwiastkowego i stanowiącą mogą prewencją w diagnostyce powyższej jednostki chorobowej. Badania pierwiastków niezbędnych wskazały na ewentualną konieczność suplementacji tych pierwiastków u pacjentów z badanymi schorzeniami nowotworowymi.

Badanie pozwoliło uświadomić pacjentów, jak istotny wpływ na rozwijający się proces nowotworowy ma palenie papierosów i przyjmowanie mocnego alkoholu. Wykazano, jak zmienia się skład pierwiastkowy organizmu – do jakich zaburzeń dochodzi w poziomach najważniejszych makro i mikroelementów i jak znacznemu podwyższeniu ulega poziom metali uważanych za kancerogenne.

Skuteczne badania wstępne prowadzone z użyciem materiałów alternatywnych pacjentów z nowotworami głowy i szyi spowodować mogą obniżenie kosztów związanych z późniejszym leczeniem. Wcześniejsza diagnostyka może bowiem wpłynąć na późniejsze określenie etiologii choroby.

7. WNIOSKI

- 1) Oznaczenie pierwiastków niezbędnych (wapń, magnez, cynk, miedź, żelazo, mangan) i metali toksycznych (ołów, kadm, kobalt, chrom VI) w surowicy krwi i materiałach alternatywnych – włosach i paznokciach, pozwoliło na opracowanie i zoptymalizowanie procedury analitycznej, która może zostać skutecznie wykorzystana w badaniach klinicznych i toksykologicznych do określania powyższych pierwiastków w bardzo niskich zakresach stężeń.
- 2) Osoby chore na nowotwór ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego częściej spożywały alkohol i paliły tytoń w porównaniu do osób zdrowych, zarówno w przeszłości, jak i w teraźniejszości.
- 3) Najwyższe poziomy stężenie uzyskano we wszystkich pierwiastkach dla surowicy krwi, w porównaniu do włosów i paznokci.
- 4) Poziomy stężenie pierwiastków niezbędnych były wyższe we włosach w porównaniu do paznokci, zarówno u osób chorych na nowotwory głowy i szyi, jak i w grupie kontrolnej (za wyjątkiem magnezu).
- 5) Kobalt i kadm charakteryzowały się wyższym poziomem stężeń we włosach w porównaniu do paznokci u pacjentów z nowotworami i stanowiących grupę kontrolną, natomiast poziom chromu VI i ołowiu był zróżnicowany.
- 6) We wszystkich materiałach biologicznych zachodzą istotne statystycznie różnice stężeń w średnich zawartościach metali w grupach osób chorych na nowotwory głowy i szyi w odniesieniu do grupy kontrolnej.
- 7) Analiza skupień przeprowadzona w surowicy krwi, włosach i paznokciach pacjentów nie pozwala na jednoznaczne rozdzielanie wszystkich grup, można natomiast wyróżnić subpopulacje o podobnym charakterze, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej.
- 8) Analiza dyskryminacyjna wyodrębniła pierwiastki, które wykazały istotną rolę w rozróżnieniu badanych grup. Dla surowicy krwi są to wapń, ołów i mangan, w przypadku włosów żelazo, ołów i magnez, natomiast największy wkład do ogólnej klasyfikacji w paznokciach ma magnez, ołów i cynk.
- 9) Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały poprawny podział przynależności osób do odpowiedniej grupy na podstawie analizy wszystkich materiałów biologicznych.
- 10) Przeprowadzone analizy badawcze i zastosowanie zaawansowanych technik statystycznych potwierdzają korzyści wynikające z zastosowania materiału alternatywnego do rozróżnienia osób chorujących na nowotwory głowy i szyi od osób zdrowych.
- 11) Konieczne jest poszerzenie grupy badawczej i wzięcie pod uwagę dodatkowych czynników mogących mieć wpływ na poziom stężeń pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych, aby ostatecznie wykazać, który z materiałów biologicznych jest najlepszym narzędziem badawczym.

8. STRESZCZENIE

Nowotwory głowy i szyi stanowią istotny problem zdrowia publicznego na całym świecie. Pomimo rosnącej świadomości pacjentów, jakie zagrożenia wynikają ze stosowania używek wpływających na powstawanie nowotworów tej części ciała, ilość nowych zachorowań i śmiertelność z tego powodu cały czas są bardzo wysokie. Według statystyk, co najmniej 75% nowotworów głowy i szyi zdiagnozowanych w Europie, Stanach Zjednoczonych i innych uprzemysłowionych rejonach świata spowodowanych jest połączonym wpływem palenia tytoniu i spożywania alkoholu. Badania naukowe potwierdziły, że używanie produktów tytoniowych (np. palenie papierosów, fajek, i/lub cygar, żucie tytoniu lub zażywanie tabaki), łącznie ze spożywaniem alkoholu odpowiadają za powstawanie nowotworów rejonu głowy i szyi. Działanie to jest nie tyle addytywne, co synergiczne. Istotnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na powstawanie nowotworów głowy i szyi jest również rodzaj stosowanej przez pacjentów diety.

Celem pracy była ocena zaburzeń poziomów pierwiastków niezbędnych (cynk, miedź, magnez, wapń, żelazo, mangan) i metali kancerogennych (kadm, kobalt, chrom VI, ołów) u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, jak również u osób, u których nie zdiagnozowano choroby nowotworowej.

Do badania wykorzystano materiał alternatywny - włosy i paznokcie i podjęto próbę jego porównania z klasycznym materiałem biologicznym - surowicą krwi.

Włosy i paznokcie stanowią bowiem ciągle niedoceniony materiał badawczy, pomimo ich niekwestionowanych zalet. Nieinwazyjne pobranie, wiążące się z mniejszym stresem dla pacjenta, długa możliwość przechowywania próbek i brak zmian w nich zachodzących, potwierdzają korzyści wynikające z ich stosowania.

W pracy zastosowana została autorska metoda ankietowa, która zawierała pytania dotyczące częstotliwości i długofalowości palenia papierosów, spożywania alkoholu, a także miała dostarczyć dodatkowych informacji dotyczących rodzaju stosowanej przez pacjentów diety.

Grupę badaną stanowiło 63 mężczyzn i 31 kobiet, będących pacjentami Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i Kliniki Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pacjenci zostali podzieleni na grupy, w zależności od rodzaju występującego schorzenia. Były to osoby chorujące na nowotwory ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego.

Grupę kontrolną stanowiło 17 mężczyzn i 46 kobiet ze zmianami nienowotworowymi, takimi jak wole guzkowe toksyczne, choroba Graves-Basedowa, przewlekłe zapalenie zatok przynosowych, ucha, migdałków, odczynowe węzły zapalne, uchyłek przetyku, skrzywienie przegrody nosa, polipy nosa i zatok przynosowych, porażenie fałdów głosowych, torbiel zatoki szczękowej oraz pacjenci z chorobami przyzębia i próchnicą zębów.

Byli to pacjenci dwóch powyższych Klinik oraz pacjenci Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Pierwszym etapem badań było wypełnienie przez pacjentów kwestionariusza ankiety. Kolejną część badania stanowiła opracowanie procedury pobrania, mycia i suszenia materiału biologicznego. Następnie odpowiednio przygotowane próbki surowicy krwi, włosów i paznokci poddane zostały procesowi mineralizacji, który przeprowadzono przy użyciu wysokociśnieniowego mineralizatora mikrofalowego – Mars 6, CEM, Matthews, USA, wyposażonego w wysokociśnieniowe naczynia XP – 1500. W celu oznaczenia pierwiastków niezbędnych i metali toksycznych została opracowana i zwalidowana metoda oznaczania wybranych pierwiastków z wykorzystaniem technik ICP MS (spektrometr mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej) oraz ICP OES (spektrometr emisyjny ze wzbudzeniem plazmowym).

Oznaczenie pierwiastków niezbędnych (wapń, magnez, cynk, miedź, żelazo, mangan) i metali toksycznych (ołów, kadm, kobalt, chrom VI) w surowicy krwi i materiałach alternatywnych – włosach i paznokciach, pozwoliło na opracowanie i zoptymalizowanie procedury analitycznej, która może zostać skutecznie wykorzystana w badaniach klinicznych i toksykologicznych do określania powyższych pierwiastków w bardzo niskich zakresach stężeń. Kobalt i kadm charakteryzowały się wyższym poziomem stężeń we włosach w porównaniu do paznokci u pacjentów z nowotworami i stanowiących grupę kontrolną, natomiast poziom chromu VI i ołowiu był zróżnicowany.

W badaniach wykazano, że osoby chore na nowotwór ślinianek, gardła, jamy ustnej, szyi i migdałka podniebiennego częściej spożywały alkohol i paliły tytoń w porównaniu do osób zdrowych, zarówno w przeszłości, jak i w teraźniejszości. We wszystkich materiałach biologicznych potwierdzono obecność statystycznie istotnych różnic stężeń w średnich zawartościach metali w grupach osób chorych na nowotwory głowy i szyi w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Najwyższe poziomy stężeń uzyskano we wszystkich pierwiastkach dla surowicy krwi, w porównaniu do włosów i paznokci. Poziomy stężeń pierwiastków niezbędnych były wyższe we włosach w porównaniu do paznokci, zarówno u osób chorych na nowotwory głowy i szyi, jak i w grupie kontrolnej (za wyjątkiem magnezu).

Znaleziono istotne różnice w zawartości metali między grupą pacjentów z nowotworami głowy i szyi i osobami zdrowymi, co pozwoliło na rozróżnienie badanych grup. W tym celu wykorzystano bardziej zaawansowane narzędzie statystyczne, jakim była analiza chemometryczna. Przeprowadzona analiza skupień pozwoliła wyróżnić subpopulacje o podobnym charakterze, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej, natomiast analiza dyskryminacyjna wyodrębniła pierwiastki, które wykazały istotną rolę w rozróżnieniu badanych grup. Dla surowicy krwi były to wapń, ołów i mangan, w przypadku włosów żelazo, ołów i magnez, natomiast największy wkład do ogólnej klasyfikacji w paznokciach miał magnez, ołów i cynk. Wyniki klasyfikacji *post hoc* wykazały poprawny podział przynależności osób do odpowiedniej grupy na podstawie analizy wszystkich materiałów biologicznych.

Przeprowadzone analizy badawcze i zastosowanie zaawansowanych technik statystycznych potwierdzają korzyści wynikające z zastosowania materiału alternatywnego do rozróżnienia osób chorujących na nowotwory głowy i szyi od osób zdrowych.

Uzyskane wyniki dostarczyły informacji dotyczących ogólnej kondycji organizmu pacjentów chorujących na nowotwory głowy i szyi, pozwoliły na określenie ich stanu pierwiastkowego i stanowiąc mogą prewencją w diagnostyce powyższej jednostki chorobowej. Badania pierwiastków niezbędnych wskazały na ewentualną konieczność suplementacji tych pierwiastków u pacjentów z badanymi schorzeniami nowotworowymi.

Badanie pozwoliło uświadomić pacjentów, jak istotny wpływ na rozwijający się proces nowotworowy ma palenie papierosów i przyjmowanie mocnego alkoholu. Wykazano, jak zmienia się skład pierwiastkowy organizmu – do jakich zaburzeń dochodzi w poziomach najważniejszych makro i mikroelementów i jak znacznemu podwyższeniu ulega poziom metali uważanych za kancerogenne.

Skuteczne badania wstępne prowadzone z użyciem materiałów alternatywnych pacjentów z nowotworami głowy i szyi spowodować mogą obniżenie kosztów związanych z późniejszym leczeniem. Wcześniejsza diagnostyka może bowiem wpłynąć na późniejsze określenie etiologii choroby.

9. SUMMARY

Alternative materials in the assessment of physiological elements and toxic metals levels disorders in patients with head and neck cancer

Key words: head and neck cancer, metals, tobacco, alcohol, blood, hair, nails

Head and neck cancers are a major public health problems worldwide. Despite patients growing awareness, what are the risks arising from the use of drugs that affect the formation of tumors that part of the body, the number of new cases and mortality are still very high. According to statistics, at least 75% of head and neck cancers diagnosed in Europe, the United States and other industrialized areas of the world, are caused by the combined effects of tobacco smoking and alcohol consumption. Scientific studies confirmed, that the use of tobacco products (eg. tobacco smoking, pipes and/or cigars, chewing tobacco or use of snuff), together with alcohol consumption, are responsible for the formation of tumors of the head and neck region. This action is not so much additive as synergistic. An important factor, that may affect the formation of head and neck cancers, is also the type of diet used by the patients.

The aim of the study was physiological (zinc, copper, magnesium, calcium, iron, manganese) and carcinogenic metals (cadmium, cobalt, chromium VI, lead) levels evaluation in patients with head and neck cancers, as well as in people who have not been diagnosed with cancer.

Alternative material – hair and nails, was used in the study and an attempt had been undertaken to compare it with serum, which is a standard, biological material.

Hair and nails are still underestimated research materials, despite their unquestionable advantages. Non – invasive collection, which is associated with less stress for the patient, the possibility of long storage of samples and the lack of changes taking place in them, confirm the benefits of their use.

Questionnaire method had been used in the study, which included questions on the frequency and long-term of tobacco smoking, alcohol consumption and also had to provide additional information concerning the type of diet used by patients.

Subjects were 63 men and 31 women, patients of Otolaryngology and Laryngological Oncology Clinic of Poznan University of Medical Sciences (Heliodor Swiecicki Clinical Hospital at the Karol Marcinkowski Medical University in Poznan) and Head and Neck Clinic and Oncological Laryngology of the Poznan University of Medical Sciences. Patients were divided into groups depending on the type of cancer. These were people suffering from salivary gland, throat, oral cavity, neck and palatal tonsil cancers.

The control group consisted of 17 men and 46 women with non – neoplastic changes, such as toxic nodular goiter, Graves' disease, chronic sinusitis, otitis, tonsillitis, reactive inflammatory nodes, diverticulum of the esophagus, nasal septum, nasal polyps and sinusitis, paralysis of the vocal folds, maxillary sinus cyst and patients with periodontal disease as well as tooth decay. They were the subjects of above mentioned Clinics and patients of Endocrinology, Metabolism and Internal Diseases Clinic of Poznan University of Medical Sciences (Heliodor Swiecicki Clinical Hospital at the Karol Marcinkowski Medical

University in Poznan) and Department of Conservative Dentistry and Periodontology Poznan University of Medical Sciences.

The first stage of the study was to fill out the questionnaire. Second part of the study was to develop procedures of collection, washing and drying of biological material. After careful preparations the biological material has underwent the process of digestion, which was carried out using MARS 6 (CEM, Matthews, USA) Microwave Reaction System, equipped with high-pressure vessels XP – 1500. In order to determine the necessary elements and toxic metals, developed and validated method using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) was performed.

Determination of the necessary elements (calcium, magnesium, zinc, copper, iron, manganese) and toxic metals (lead, cadmium, cobalt, chromium VI) in serum and alternative materials – hair and nails allowed for the development and optimization of analytical procedures that can be effectively used in clinical trials and toxicology to determine these elements in very low concentration ranges. Cobalt and cadmium were characterized by higher concentration level in the hair compared to nails in cancer patients and a control group, while the level of chromium VI and lead were diversified.

Studies have shown that people with salivary glands, throat, oral cavity, neck and palatine tonsil cancers, more frequently consumed alcohol and smoked tobacco, compared to healthy subjects, both in the past and the present. The presence of significant differences in the average concentrations of metal contents in the groups of patients with head and neck cancer, in relation to the control group, was confirmed in all biological samples.

Highest concentration levels received in all the elements of serum, compared to hair and nails. The concentration levels of the necessary elements were higher in the hair compared to nails, both in patients with head and neck cancer, and the control group (except for magnesium).

Significant differences in metal content between patients with head and neck cancer and healthy controls were found, what allowed to distinguish the study groups. For this purpose, more advanced statistical, chemometric tools were used. Cluster Analysis was used to distinguish subpopulations of a similar nature, both in the study and control group. Discriminant Analysis has identified elements, which showed a significant role in distinguishing between treatment groups. For serum were: calcium, lead and manganese, in the case of the hair: iron, lead and magnesium, while the largest contribution to the overall classification of nails had magnesium, lead and zinc. *Post hoc* classification results showed correct distribution of people belonging to a group based on analysis of all biological materials.

Conducted research and advanced statistical techniques application confirm the benefits of using an alternative material to distinguish patients suffering from head and neck cancer from healthy individuals.

Results provided information about the general body condition of patients suffering from head and neck cancer, allowed to determine their elemental state and could provide prevention in the diagnosis of that disease. The study showed a possible need for supplementation of necessary elements in patients with neoplastic diseases.

The study allowed patients to realize how significant impact on the process of developing cancer has tobacco smoking and alcohol consumption. It has been shown, how the elemental composition of the body is changing – which problems occur in the level of key macro and micronutrients and how significant is the increase in the level of metals that are carcinogenic.

Effective preliminary study carried out with the use of alternative materials of head and neck cancer patients, can result in costs reduction associated with subsequent treatment. Early diagnosis may indeed affect the following determination of the etiology of the disease.

10. PIŚMIENNICTWO:

1. Abdulrahman F., Akan J., Chellube Z., Waziri M.: Levels of Heavy Metals in Human Hair and Nail Samples from Maiduguri Metropolis, Borno State, Nigeria. *Word Environment*, 2012; 2; 81 - 89.
2. Afridi H., Brabazon D., Kazi T., Naher S.: Evaluation of Essential Trace and Toxic Elements in Scalp Hair Samples of Smokers and Alcohol User Hypertensive Patients. *Biological Trace Element Research*, 2011; 143; 1349 - 1366.
3. Agency for Toxic substances and Disease Registry (ATSDR), 2012. *Toxicological Profile for Chromium*. Atlanta, Georgia.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for Manganese*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2012.
5. Åkesson A., Julin B., Wolk A.: Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Research*, 2008; 68; 6435 - 6441.
6. Al-Farsi Y., Waly M., Al-Sharbati M., Al-Shafae M., Al-Farsi O., Al-Khaduri M., Gupta I., Ouhtit A., Al-Adawi S., Al-Said M., Deth R.: Levels of Heavy Metals and Essential Minerals in Hair Samples of Children with Autism in Oman: a Case-Control Study. *Biological Trace Element Research*, 2013; 151; 181 - 186.
7. Alimonti A., Bocca B., Mannella E., Petrucci F., Zennaro F., Cotichini R., D'Ippolito C., Agresti A., Caimi S., Forte G.: Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population. *Annali dell'Istituto superior di sanità*, 2005; 41; 181 - 187.
8. Almeida A., Bandeira C., Gonçalves A., Araújo A.: Nicotine dependence and smoking habits in patients with head and neck cancer. *Jornal Brasileiro de pneumologia*, 2014; 40; 286 - 293.
9. Alsirafy S.A., Sroor M.Y., Al-Shahri M.Z.: Hypercalcemia in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Prevalence and Potential Impact on Palliative Care. *The Journal of Supportive Oncology*, 2009; 7; 154 - 157.
10. Altieri A., Bosetti C., Gallus S., Franceschi S., Maso L., Talamini R., Levi F., Negri E., Rodriguez T., Vecchia C.: Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncology*, 2004; 40; 904 - 909.
11. Altieri A., Bosetti C., Talamini R., Gallus S., Franceschi S., Levi F., Dal Maso L., Negri E., La Vecchia C.: Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 2002; 87; 1227 - 1229.
12. Altieri A., Garavello W., Bosetti C., Gallus S., La Vecchia C.: Alcohol consumption and risk of laryngeal cancer. *Oral Oncology*, 2005; 41; 956 - 965.
13. Argiris A., Karamouzis M., Raben D., Ferris R.: Head and Neck Cancer. *Lancet*, 2008; 371; 1695 - 1709.
14. Asagba S.: Role of diet in absorption and toxicity of oral cadmium - A review of literature. *African Journal of Biotechnology*, 2009; 8; 7428 - 7436.

15. Ashraf M.: Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. *The Scientific World Journal*, 2012; 729430.
16. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cobalt. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2004; 1-417. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.pdf> . Dostęp - 13.05.2014.
17. Bagchi D., Stohs S., Downs B., Bagchi M., Preuss H.: Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 2002; 180; 5 - 22.
18. Bagnardi V., Blangiardo M., La Vecchia C., Corrao G.: A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *British Journal of Cancer*, 2001; 85; 1700 - 1705.
19. Bailey D., Martin A., McKay H., Whiting S., Mirwald R.: Calcium Accretion in Girls and Boys During Puberty: A Longitudinal Analysis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000; 15; 2245 - 2250.
20. Baranowska I: Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blond (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Occupational and Environmental Medicine*, 1995; 52; 229 - 232.
21. Barbier O., Jacquillet G., Tauc M., Cougnon M., Poujeol P.: Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiology*, 2005; 99; 105 - 110.
22. Barbosa F., Tanus-Santos J., Gerlach R., Parsons P.: A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environmental Health Perspectives*, 2005; 113; 1669 - 1674.
23. Barceloux D.: Copper. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 1999; 37; 217 - 230.
24. Batista B., Rodrigues J., Nunes J., Tormen L., Curtius A., Barbosa F.: Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. *Talanta*, 2008; 76; 575 - 579.
25. Bernhard D., Rossmann A., Wick G.: Metals in Cigarette Smoke. *Life*, 2005; 57; 805 - 809.
26. Bergomi M., Pellacani G., Vincenti M., Bassissi S., Malagoli C., Alber D., Sieri S., Vescovi L., Seidenari S., Vivoli R.: Trace elements and melanoma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005; 19; 69 - 73.
27. Blaurock – Busch E., Busch Y., Friedle A., Buerner H., Parkash C., Kaur A.: Comparing the Metal Concentration in the Hair of Cancer Patients and Healthy People Living in Malwa Region of Punjab, India. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 2014; 8; 1 - 13.
28. Bochenek A., Reicher M. *Anatomia człowieka, tom V*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
29. Boeing H., Dietrich T., Hoffmann K., Pischon T., Ferrari P., Lahmann P., Boutron-Ruault M., Clavel-Chapelon F., Allen N., Key T., Skeie G., Lund E., Olsen A., Tjønneland A., Overvad K., Jensen M., Rohrmann S., Linseisen J., Trichopoulou A., Bamia C., Psaltopoulou T., Weinehall L., Johansson I., Sánchez M., Jakšzyn P., Ardanaz E., Amiano P., Chirlaque M., Quirós J., Wirfalt E., Berglund G., Peeters P., van Gils C., Bueno-de-Mesquita H., Büchner F., Berrino F., Palli D., Sacerdote

- C., Tumino R., Panico S., Bingham S., Khaw K., Slimani N., Norat T., Jenab M., Riboli E.: Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aerodigestive tract: the prospective EPIC-study. *Cancer Causes Control*, 2006; 17; 957 - 969.
30. Boffetta P., Hashibe M.: Alcohol and cancer. *The Lancet Oncology*, 2006; 7; 149 - 156.
 31. Bradley P., Hoskin D.: Hypercalcemia in head and neck squamous cell carcinoma. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 2006; 14; 51 - 54.
 32. Bradshaw P., Siega-Riz A., Campbell M., Weissler M., Funkhouser W., Olshan A.: Associations between dietary patterns and head and neck cancer: the Carolina head and neck cancer epidemiology study. *American Journal of Epidemiology*, 2012; 175; 1225 - 1233.
 33. Brem S., Zagzag D., Tsanaclis A., Gately S., Elkouby M., Brien S.: Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *The American Journal of Pathology*, 1990; 137; 1121 - 1142.
 34. Brewer G., Dick R., Grover D., LeClaire V., Tseng M., Wicha M., Pienta K., Redman B., Jahan T., Sondak V., Strawderman M., LeCarpentier G., Merajver S.: Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clinical Cancer Research*, 2000; 6; 1 - 10.
 35. Brewer G., Yuzbasiyan-Gurkan V. Wilson disease. *Medicine*, 1992, 71; 139 - 164.
 36. Bronner F.: Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutrition Reviews*, 2009; 67; 109 - 113.
 37. Cairo G., Bernuzzi F., Recalcati S.: A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells. *Genes and Nutrition*, 2006; 1; 25 - 40.
 38. Carneiro M., Grotto D., Batista B., Rhoden C., Barbosa Jr F.: Background Values for Essential and Toxic Elements in Children's Nails and Correlation with Hair Levels. *Biological Trace Element Research*, 2011; 144; 339 - 350.
 39. Castellsagué X., Quintana M., Martínez M., Nieto A., Sánchez M., Juan A., Monner A., Carrera M., Agudo A., Quer M., Muñoz N., Herrero R., Franceschi S., Bosch F.: The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 2004; 108; 741 - 749.
 40. Castiglioni S., Maier J.: Magnesium and cancer: a dangerous liason. *Magnesium Research*, 2011; 24; S92 - S100.
 41. Chiu H., Tsai S., Wu T., Yang Ch.: Colon cancer and content of nitrates and magnesium in drinking water. *Magnesium Research*, 2010; 23; 81 - 90.
 42. Chojnacka K., Górecka H, Górecki H.: The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006; 22; 52 - 57.
 43. Chojnacka K., Górecka H, Górecki H.: The influence of living habits and family relationships on element concentrations in human hair. *Science of the Total Environment*, 2006; 366; 612 - 620.

44. Chojnacka K., Michalak I., Zielińska A., Górecka H., Górecki H.: Inter-relationship between elements in human hair: The effect of gender. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010; 73; 2022 - 2028.
45. Chuang S., Jenab M., Heck J., Bosetti C., Talamini R., Matsuo K., Castellsague X., Franceschi S., Herrero R., Winn D., La Vecchia C., Morgenstern H., Zhang Z., Levi F., Dal Maso L., Kelsey K., McClean M., Vaughan T., Lazarus P., Muscat J., Ramroth H., Chen C., Schwartz S., Eluf-Neto J., Hayes R., Purdue M., Boccia S., Cadoni G., Zaridze D., Koifman S., Curado M., Ahrens W., Benhamou S., Matos E., Lagiou P., Szeszenia-Dabrowska N., Olshan A., Fernandez L., Menezes A., Agudo A., Daudt A., Merletti F., Macfarlane G., Kjaerheim K., Mates D., Holcatova I., Schantz S., Yu G., Simonato L., Brenner H., Mueller H., Conway D., Thomson P., Fabianova E., Znaor A., Rudnai P., Healy C., Ferro G., Brennan P., Boffetta P., Hashibe M.: Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*, 2012; 23; 69 - 88.
46. Connolly E., Worthley L.: Intravenous Magnesium. *Critical Care and Resuscitation*, 1999; 1; 162 - 172.
47. Conway D., Petticrew M., Marlborough H., Berthiller J., Hashibe M., Macpherson L.: Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *International Journal of Cancer*, 2008; 122; 2811 - 2819.
48. Cooper G., Kronstrand R., Kintz P.: Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 2012; 218; 20 - 24.
49. Cooper G.: Hair testing is taking root. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2011; 48; 516 - 530.
50. Cox C., Teknos T., Barrios M., Brewer G., Dick R., Merajver S.: the Role of Copper Suppression as an Antiangiogenic Strategy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The Laryngoscope*, 2001; 111; 696 - 701.
51. Crossgrove J., Zheng W.: Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in biomedicine*, 2004; 17; 544 - 553.
52. Curado M., Boyle P.: Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Current Opinion Oncology*, 2013; 25; 229 - 234.
53. Curado M., Hashibe M.: Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current Opinion in Oncology*, 2009; 21; 194 - 200.
54. Czczot H., Skrzycki M.: Kadm – pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2010; 64; 38 - 49.
55. Da Silva A., Barrocas P., Jacob S., Moreira J.: Dietary intake and health effects of selected toxic elements. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005; 17; 79 - 93.
56. Dayan A., Paine A.: Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Human & Experimental Toxicology*, 2001; 20; 439 - 451.
57. De Boeck M., Kirsch-Volders M., Lison D.: Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research*, 2003; 533; 135 - 152.
58. De Flora S.: Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000; 21; 533 - 541.

59. De Sousa Viana G., Garcia K., Menezes-Filho A.: Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011; 181; 255 - 265.
60. Dhawan D., Chadha V.: Zinc: A promising agent in dietary chemoprevention of cancer. *The Indian Journal of Medical Research*, 2010; 132; 676 - 682.
61. Dobrakowski M., Kiełtucki J., Wyparło – Wszelaki M., Kasperczyk S.: Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na zmiany patofizjologiczne w układzie pokarmowym oraz interakcje ołowiu z wybranymi mikroelementami. *Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine*, 2013; 16; 42 - 46.
62. DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997; Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes; Food and Nutrition Board; Institute of Medicine; National Academy Press Washington, D.C.
63. DRI Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001; Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes; Food and Nutrition Board; Institute of Medicine; National Academy Press Washington, D.C.
64. Döbrössy L.: Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2005; 24; 9 - 17.
65. Duh S., Cook J.: Laboratory Reference Range Values. <http://www.stedmanonline.com>. Dostęp - 25.10.2014.
66. Eby G., Eby K.: Magnesium for treatment - resistant depression: A review and hypothesis. *Medical Hypotheses*, 2010; 74; 649 - 660.
67. Edefonti V., Bravi F., La Vecchia C., Randi G., Ferraroni M., Garavello W., Franceschi S., Talamini R., Boffetta P., Decarli A.: Nutrient-based dietary patterns and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 2010; 46; 343 - 348.
68. Emre O., Demir H., Dogan E., Esen R., Gur T., Demir C., Gonullu E., Turan N., Özbay M.: Plasma Concentrations of Some Trace Element and Heavy Metals in Patients with Metastatic Colon Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, 2013; 4; 1085 - 1090.
69. Estrine K.: Neonatal Plumbism Secondary to Maternal Chronic Lead Poisoning and PICA: A Case Report. *Internal Medicine*, 2013; S12; 002.
70. Florek E., Piekoszewski W.: Palenie tytoniu a ciąża. W: *Ciąża wysokiego ryzyka*. Bręborowicz G. Wyd. 3 uaktual. rozsz., Poznań, 2010, 43 – 66.
71. Florek E., Billert H., Piekoszewski W.: Narkotyki i używki w okresie ciąży. W: *Położnictwo. T.2. Medycyna matczyno – płodowa*. Bręborowicz G., Paszkowski T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2012, 511 – 519.
72. 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. *Biological Trace Element Research*, 2001; 80; 77 - 93.
73. Fraga C.: Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005; 26; 235 - 244.

74. Freedman N., Schatzkin A., Leitzmann M., Hollenbeck A., Abnet C.: Alcohol and head and neck risk in a prospective study. *British Journal of Cancer*, 2007; 96; 1469 - 1474.
75. Fu H., Boffetta P.: Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occupational and Environmental Medicine*, 1995; 52; 73 - 81.
76. Gál J., Hursthouse A., Tatner P., Stewart F., Welton R.: Cobalt and secondary poisoning in the terrestrial food chain: Data review and research gaps to support risk assessment. *Environment International*, 2008; 34; 821 - 838.
77. Gaudet M., Olshan A., Chuang S., Berthiller J., Zhang Z., Lissowska J., Zaridze D., Winn D., Wei Q., Talamini R., Szeszenia-Dabrowska N., Sturgis E., Schwartz S., Rudnai P., Eluf-Neto J., Muscat J., Morgenstern H., Menezes A., Matos E, Bucur A, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Kelsey K, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wunsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P, Hashibe M.: Body mass index and risk of head and neck cancer in a pooled analysis of case-control studies in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. *International Journal of Epidemiology*, 2010; 39; 1091 - 1102.
78. Géraud C., Koenen W., Neumayr L., Doobe G., Schmieder A., Weiss C., Goerd S., Faulhaber J.: Lip cancer: retrospective analysis of 181 cases. *Journal of the German Society of Dermatology*, 2012; 10; 121 - 127.
79. Gil F., Hernández A., Márquez C., Femia P., Olmedo P., López-Guarnido O., Pla A.: Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally expose population. *Science of the Total Environment*, 2011; 409; 1172 - 1180.
80. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D.: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2006; 1:22.
81. Goldenberg D., Lee J., Koch W., Kim M., Trink B., Sidransky D., Moon C.: Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 2004; 131; 986 - 993.
82. González-Muñoz M., Peña A., Meseguer I.: Monitoring heavy metal contents in food and hair in a sample of young Spanish subjects. *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46; 3048 - 3052.
83. Goodman V., Brewer G., Merajver S.: Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocrine - Related Cancer*, 2004; 11; 255 - 263.
84. Greer F., Krebs N.: Optimizing Bone Health and Calcium Intakes of Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics*, 2006; 117; 578 - 585.
85. Grønbaek M., Becker U., Johansen D., Tønnesen H., Jensen G., Sørensen T.: Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *British Medical Journal*, 1998; 317; 844 - 847.

86. Guo J., Deng W., Zhang L., Li C., Wu P., Mao P.: Prediction of Prostate Cancer Using Hair Trace Element Concentration and Support Vector Machine Method. *Biological Trace Element Research*, 2007; 116; 257 - 271.
87. Gupte A., Mumper R.: Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 2009; 35; 32 - 46.
88. Gurzau E., Neagu C., Gurzau A.: Essential metals – case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003; 56; 190 - 200.
89. Hambidge K., Krebs N.: Zinc Deficiency: A Special Challenge. *The Journal of Nutrition*, 2007; 137; 1101 - 1105.
90. Hansen M., Johansen J., Menne T.: Chromium allergy: significance of both Cr (III) and Cr (VI). *Contact dermatitis*, 2003; 49; 206 - 212.
91. Harkey M.: Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 1993; 6; 9 - 18.
92. Hashibe M., Brennan P., Benhamou S., Castellsague X., Chen C., Curado M., Dal Maso L., Daudt A., Fabianova E., Fernandez L., Wünsch-Filho V., Franceschi S., Hayes R., Herrero R., Koifman S., La Vecchia C., Lazarus P., Levi F., Mates D., Matos E., Menezes A., Muscat J., Eluf-Neto J., Olshan A., Rudnai P., Schwartz S., Smith E., Sturgis E., Szeszenia-Dabrowska N., Talamini R., Wei Q., Winn D., Zaridze D., Zatonski W., Zhang Z., Berthiller J., Boffetta P.: Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of National Cancer Institute*, 2007; 99; 777 - 789.
93. Hashibe M., Brennan P., Chuang S., Boccia S., Castellsague X., Chen C., Curado M., Dal Maso L., Daudt A., Fabianova E., Fernandez L., Wünsch-Filho V., Franceschi S., Hayes R., Herrero R., Kelsey K., Koifman S., La Vecchia C., Lazarus P., Levi F., Lence J., Mates D., Matos E., Menezes A., McClean M., Muscat J., Eluf-Neto J., Olshan A., Purdue M., Rudnai P., Schwartz S., Smith E., Sturgis E., Szeszenia-Dabrowska N., Talamini R., Wei Q., Winn D., Shangina O., Pilarska A., Zhang Z., Ferro G., Berthiller J., Boffetta P.: Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2009; 18; 541 - 550.
94. Hashibe M.: Risk factors: Tobacco and Alcohol. *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer*, Editor: Andrew F. Olshan, ISBN 978-1-4419-1471-2. Springer New York Dordrecht Heidelberg London; 2010; 65 - 85.
95. Hashizume N., Mori M.: An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. *Japanese Journal of Medicine*, 1990; 29; 368 - 372.
96. Hassan G.: Choroby cywilizacyjne, metale ciężkie, mikroelementy, witaminy, 2004.
97. He K.: Trace Elements in Nails as Biomarkers in Clinical Research. *European Journal of Clinical Investigation*, 2011; 41; 98 - 102.
98. Herman M., Przybyłowicz A., Florek E., Piekoszewski W.: Method of Determination of Low Copper Concentration in Human Hair and Nails. *Journal of Analytical Chemistry*, 2013; 68; 360 - 367.

99. Horn – Ross P., Morrow M., Ljung B.: Diet and the Risk of Salivary Gland Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 1997; 146; 171 - 176.
100. Hutton J., Martin L., Field C., Wismer W., Bruera E., Watanabe S., Baracos V.: Dietary patterns in patients with advanced cancer: implications for anorexia-cachexia therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006; 84; 1163 - 1170.
101. Houston M.: The importance of potassium in managing hypertension. *Current Hypertension Reports*, 2011; 13; 309 - 317.
102. Houston M.: The Role of Magnesium in Hypertension and Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2011; 13; 843 - 847.
103. <http://globocan.iarc.fr>. Globocan, 2012. Dostęp - 05.01.2014.
104. <http://onkologia.org.pl/raporty/>. Dostęp - 21.01.2014.
105. <http://www.epa.gov/teach/>. Dostęp - 16.04.2014
106. Humphris G., Freeman R., Clarke H.: Risk perception of oral cancer in smokers attending primary care: a randomised controlled trial. *Oral Oncology*, 2004; 40; 916 - 924.
107. Iannello S., Belfiore F.: Hypomagnesemia. A review of pathophysiological, clinical and therapeutical aspects. *Panminerva Medica*, 2001; 43; 177 - 209.
108. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 44, Alcohol Drinking. Lyon, France, 1988.
109. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 58, Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. Lyon, France, 1993.
110. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 71, Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two). Lyon, France, 1999.
111. International Agency of Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 83, Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon, France, 2004.
112. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 85, Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines. Lyon, France, 2004.
113. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 86, Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. Lyon, France, 2006.
114. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 87, Inorganic and Organic Lead Compounds. Lyon, France, 2006.
115. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100 C, Arsenic, metals, fibres, and dusts. A review of human carcinogens. Lyon, France, 2012.
116. Iron and Health. Scientific Advisory Committee on Nutrition, London, 2010.

117. Islami F., Tramacere I., Rota M., Bagnardi V., Fedirko V., Scotti L., Garavello W., Jenab M., Corrao G., Straif K., Negri E., Boffetta P., La Vecchia C.: Alcohol drinking and laryngeal cancer: Overall and dose-risk relation – A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*, 2010; 46; 802 - 810.
118. Iwase M., Kurachi Y., Kakuta S., Sakamaki H., Nakamura – Mitsuhashi M., Nagumo M.: Hypercalcemia in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 2001; 5; 194 - 198.
119. Iwuoha G., Ognu E., Onwuachu U.: Levels of selected heavy metals in some brands of Cigarettes marketed in University of Port Harcourt, Rivers State. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 2013; 17; 561 - 564.
120. Jahnen – Dechent W., Ketteler M.: Magnesium basics. *Clinical Kidney Journal*, 2012; 5 (Suppl 1); i3 - i14.
121. Järup L., Berglund M., Elinder C., Nordberg G., Vahter M.: Health effects of cadmium exposure -- a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of work, environment & health*, 1998; 24; 1 - 51.
122. Jee S., Miller E., Guallar E.: The effect of magnesium supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *American Journal of Hypertension*, 2002; 15; 691 - 696.
123. Johnson M., Kenney N., Stoica A., Hilakivi - Clarke L., Singh B., Chepko G., Clarke R., Sholler P., Lirio A., Foss C., Reiter R., Trock B., Paik S., Martin M.: Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature medicine*, 2003; 9; 1081 - 1084.
124. Johnson S.: The multifaceted and widespread pathology of magnesium deficiency. *Medical Hypotheses*, 2001; 56; 163 - 170.
125. Johri N., Jacquillet G., Unwin R.: Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*, 2010; 23; 783 - 792.
126. Jomova K., Valko M.: Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011; 283; 65 - 87.
127. Joo N., Kim S., Jung Y., Kim K.: Hair Iron and Other Mineral's Level in Breast Cancer Patients. *Biological Trace Element Research*, 2009; 129; 28 - 35.
128. Karimi G., Shahar S., Homayouni N., Rajikan R., Bakar N., Othman M.: Association between Trace Element and Heavy Metal Levels in Hair and Nail with Prostate Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012; 13; 4249 - 4253.
129. Kashigar A., Habbous S., Eng L., Irish B., Bissada E., Irish J., Brown D., Gilbert R., Gullane P., Xu W., Huang S., Witterick I., Freeman J., O'Sullivan B., Waldron J., Liu G., Goldstein D.: Social environment, secondary smoking exposure, and smoking cessation among head and neck cancer patients. *Cancer*, 2013; 119; 2701 - 2709.
130. Kawanishi S., Hiraku Y., Murata M., Oikawa S.: The role of metals in site- specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 32; 822 - 832.
131. Kawano Y., Matsuoka H., Takishita S., Omae T.: Effects of Magnesium Supplementation in Hypertensive Patients: Assessment by Office, Home, and Ambulatory Blood Pressures. *Hypertension*, 1998; 32; 260 - 265.

132. Kazi T., Wadhwa S., Afridi H., Kazi N., Kandhoro A., Baig J., Shah A., Kolachi N., Khan S.: Evaluation of cadmium and zinc in biological samples of tobacco and alcohol user male mouth cancer patients. *Human and Experimental Toxicology*, 2010; 29; 221 - 230.
133. Khanna S., Karjodkar F.: Circulating Immune Complexes and trace elements (Copper, Iron and Selenium) as markers in oral precancer and cancer : a randomised, controlled clinical trial. *Head & Face Medicine*, 2006; 2; 33.
134. Koch W., McQuone S.: Clinical and molecular aspects of squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker. *Current Opinion in Oncology*, 1999; 9; 257 - 261.
135. Koranteng-Addo J., Owusu-Ansah E., Boamponsem L., Koka J., Agjei R.: Analyses of lead and zinc levels in human scalp hair in occupationally exposed workers in Cape Coast, Ghana. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2010; 2; 384 - 391.
136. Kumtabtim U., Matusch A., Dani S., Siripinyanond A., Becker J.: Biomonitoring for arsenic, toxic and essential metals in single hair strands by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011; 307; 185 - 191.
137. Lagiou P., Talamini R., Samoli E., Lagiou A., Ahrens W., Pohlabein H., Benhamou S., Bouchardy C., Slamova A., Schejbalova M., Merletti F., Richiardi L., Kjaerheim K., Agudo A., Castellsague X., Macfarlane T., Macfarlane G., Biggs A., Barzan L., Canova C., Simonato L., Lowry R., Conway D., McKinney P., Znaor A., McCartan B., Healy C., Marron M., Hashibe M., Brennan P.: Diet and upper-aerodigestive tract cancer in Europe: the ARCAGE study. *International Journal of Cancer*, 2009; 124; 2671 - 2676.
138. Lai-Cheong J., McGrath J.: Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 2009; 37; 223 - 226.
139. Laudanski T., Sipowicz M., Modzelewski P.: Influence of high lead and cadmium soil content on human reproductive outcome. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 1991; 36; 309 - 315.
140. Lazarević K., Nikolić D., Stošić L., Milutinović S., Videnović J., Bogdanović D.: Determination of lead and arsenic in the tobacco and cigarettes: an important issue of public health. *Central European Journal of Public Health*, 2012; 20; 62 - 66.
141. Lee M.: *Basic Skills in Interpreting Laboratory Data*. Fifth Edition, American Society of Health-System Pharmacists, 2013.
142. Lee D., Jacobs D.: Interaction Among Heme Iron, Zinc, and Supplemental Vitamin C Intake on the Risk of Lung Cancer: Iowa Women's Health Study. *Nutrition and Cancer*, 2005; 52; 130 - 137.
143. Leung P., Huang H.: Analysis of trace element in the hair of volunteers suffering from naso-pharyngeal cancer. *Biological Trace Element Research*, 1997; 57; 19 - 25.
144. Li Q., Chuang S., Eluf-Neto J., Menezes A., Matos E., Koifman S., Wunsch-Filho V., Fernandez L., Daudt A., Curado M., Winn D., Franceschi S., Herrero R., Castellsague X., Morgenstern H., Zhang Z., Lazarus P., Muscat J., McClean M., Kelsey K., Hayes R., Purdue M., Schwartz S., Chen C., Benhamou S., Olshan

- A., Yu G., Schantz S., Ferro G., Brennan P., Boffetta P., Hashibe M.: Vitamin or mineral supplement intake and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *International Journal of Cancer*, 2012; 131; 1686 - 1699.
145. Linder M., Hazegh-Azam M.: Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996; 63; 797S - 811S.
146. Lison D., De Boeck M., Verougstraete V., Kirsch – Volders M.: Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational Environmental Medicine*, 2001; 58; 619 - 625.
147. Llanos M., Ronco A.: Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reproductive Toxicology*, 2009; 27; 88 - 92.
148. Lubin J., Purdue M., Kelsey K., Zhang Z., Winn D., Wei Q., Talamini R., Szeszenia-Dabrowska N., Sturgis E., Smith E., Shangina O., Schwartz S., Rudnai P., Neto J., Muscat J., Morgenstern H., Menezes A., Matos E., Mates I., Lissowska J., Levi F., Lazarus P., La Vecchia C., Koifman S., Herrero R., Franceschi S., Wünsch-Filho V., Fernandez L., Fabianova E., Daudt A., Maso L., Curado M., Chen C., Castellsague X., Brennan P., Boffetta P., Hashibe M., Hayes R.: Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *American Journal of Epidemiology*, 2009; 170; 937 - 947.
149. Lucenteforte E., Garavello W., Bosetti C., La Vecchia C.: Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncology*, 2009; 45; 461 - 467.
150. Lucenteforte E., Garavello W., Bosetti C., La Vecchia C.: Dietary Factors. *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer*, Editor: Andrew F. Olshan, ISBN 978-1-4419-1471-2. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010; 117 - 136.
151. Maret W., Sandstead H.: Zinc requirements and the risk and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2006; 20; 3 - 18.
152. Marron M., Boffetta P., Zhang Z., Zaridze D., Wünsch - Filho V., Winn D., Wei Q., Talamini R., Szeszenia-Dabrowska N., Sturgis E., Smith E., Schwartz S., Rudnai P., Purdue M., Olshan A., Eluf - Neto J., Muscat J., Morgenstern H., Menezes A., McClean M., Matos E., Mates I., Lissowska J., Levi F., Lazarus P., La Vecchia C., Koifman S., Kelsey K., Herrero R., Hayes R., Franceschi S., Fernandez L., Fabianova E., Daudt A., Dal Maso L., Curado M., Cadoni G., Chen C., Castellsague X., Boccia S., Benhamou S., Ferro G., Berthiller J., Brennan P., Møller H., Hashibe M.: Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *International Journal of Epidemiology*, 2010; 39; 182 - 196.
153. Marur S., Forastiere A.: Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 2008; 83; 489 - 501.
154. Maserejian N., Joshipura K., Rosner B., Giovannucci E., Zavras A.: Prospective Study of Alcohol Consumption and Risk of Oral Premalignant Lesions in Men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2006; 15; 774 - 781.

155. McCarty M.: Complementary vascular-protective actions of magnesium and taurine: a rationale for magnesium taurate. *Medical Hypotheses*, 1996; 46; 89 - 100.
156. McElwee K., Sinclair R.: Hair physiology and its disorders. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2008; 5; 163 - 171.
157. Meecham H., Humphrey P.: Industrial exposure to cobalt causing optic atrophy and nerve deafness: a case report. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1991; 54; 374 - 375.
158. Mehanna H., Paleri V., West C., Nutting C.: Head and neck cancer – Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *Clinical Otolaryngology*, 2011; 36; 65 - 68.
159. Mehra R., Juneja M.: Elements in scalp hair and nails indicating metal body burden in polluted environment. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2005; 64; 119 - 124.
160. Mehra R., Juneja M.: Fingernails as biological indices of metal exposure. *Journal of Biosciences*, 2005; 30; 253 - 257.
161. Memon A., Kazi T., Afridi H., Jamali M., Arain M., Jalbani N., Syed N.: Evaluation of zinc status in whole blood and scalp hair of female cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 2007; 379; 66 - 70.
162. Meurman J.: Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncology*, 2010; 46; 411 - 413.
163. Minoia C., Sabbioni E., Apostoli P., Pietra R., Pozzoli L., Gallorini M., Nicolau G., Alessio L., Capodaglio E., Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *The Science of the Total Environment*, 1990; 95; 89 - 105.
164. Mlynek V., Skoczyńska A.: Prozapalne działanie kadmu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2005; 59; 1-8.
165. Mortada W., Sobh M., El-Defrawy M.: The exposure to cadmium, lead and mercury from smoking and its impact on renal integrity. *Medical Science Monitor*, 2004; 10, CR112 - 116.
166. Moss M., Lanphear B., Auinger P.: Association of dental caries and blood lead levels. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1999; 281; 2294 - 2298.
167. Murray R., Granner D., Mayes P., Rodwell V.: *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1995 (wydanie III).
168. Nadadur S., Srirama K., Mudipalli A.: Iron transport & homeostasis mechanisms: Their role in health & disease. *The Indian Journal of Medical Research*, 2008; 128; 533 - 544.
169. Nash D., Magder L., Lustberg M., Sherwin R., Rubin R., Kaufmann R., Silbergeld E.: Blood lead blood pressure, and hypertension in perimenopausal and postmenopausal women. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2003; 289; 1523 - 1532.
170. Nasli-Esfahani E., Faridbod F., Larijani B., Ganjali M., Norouzi P.: Trace elements analysis of hair, nail, serum and urine of diabetes mellitus patients by inductively

- coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*, 2011; 10; 1 - 9.
171. Näsman A., Attner P., Hammarstedt L., Du J., Eriksson M., Giraud G., Ährlund-Richter S., Marklund L., Romanitan M., Lindquist D., Ramquist T., Lindholm J., Sparén P., Ye W., Dahlstrand H., Munck-Wikland E., Dalianis T.: Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *International Journal of Cancer*, 2009; 125; 362 - 366.
 172. Nasulewicz A., Wietrzak J., Wolf F., Dzimira S., Madej J., Maier J., Rayssiguier Y., Mazur A., Opolski A.: Magnesium deficiency inhibits primary tumor growth but favors metastasis in mice. *Biochimica et biophysica acta*, 2004; 1739; 26 - 32.
 173. Needleman H.: Lead Poisoning. *Annual Review of Medicine*, 2004; 55; 209 - 222.
 174. Neville B., Day T.: Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 2002; 52; 195 - 215.
 175. Nishijo M., Nakagawa H., Honda R., Tanebe K., Saito S., Teranishi H., Tawara K.: Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occupational & Environmental Medicine*, 2002; 59; 394 - 397.
 176. O'Brien T., Ceryak S., Patierno S.: Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 2003; 533, 3 - 36.
 177. Onizawa K., Yoshida H.: Administration of bisphosphonate for hypercalcemia associated with oral cancer. *Head & Face Medicine*, 2006; 2; 9.
 178. Osredkar J., Sustar N.: Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *Journal of Clinical Toxicology*, 2011; S3:001.
 179. Oxford Cancer Intelligence Unit. Profile of Head and Neck Cancers in England: Incidence, Mortality, and Survival. National Cancer Intelligence Network. 2010.
 180. Oyoo-Okoth E., Admiraal W., Osano O., Ngure V., Kraak M., Omutange E.: Monitoring exposure to heavy metals among children in Lake Victoria, Kenya: Environmental and fish matrix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010; 73; 1797 - 1803.
 181. Palmeri A., Pichini S., Pacifici R., Zuccaro P., Lopez A.: Drugs in Nails. Physiology, Pharmacokinetics and Forensic Toxicology. *Clinical Pharmacokinetics*, 2000; 38; 95 - 110.
 182. Pasha Q., Malik S., Iqbal J., Shah M.: Characterization and Distribution of the Selected Metals in the Scalp Hair of Cancer Patients in Comparison with Normal Donors. *Biological Trace Element Research*, 2007; 118; 207 - 216.
 183. Pasha Q., Malik S., Shaheen N., Shah M.: Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. *Clinica Chimica Acta*, 2010; 411; 531 - 539.
 184. Patki P., Singh J., Gokhale S., Bulakh P., Shrotri D., Patwardhan B.: Efficacy of potassium and magnesium in essential hypertension: a double-blind, placebo controlled, crossover study. *BMJ*, 1990; 301; 521 - 523.
 185. Patrick L.: Lead Toxicity, A Review of the Literature. Part I: Exposure, Evaluation, and Treatment. *Alternative Medicine Review*, 2006; 11; 2 - 22.

186. Pawlak W., Wawrocka – Pawlak M.: Hiperkalcemia w chorobie nowotworowej – patofizjologia, diagnostyka, leczenie. *Współczesna Onkologia*, 2003; 7; 482 - 496.
187. Pelucchi C., Gallus S., Garavello W., Bosetti C., La Vecchia C.: Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Research & Health*, 2006; 29; 193 - 198.
188. Penel N., Berthon C., Everard F., Neu J., Clisant S., N'Guyen M., Villet S., Fournier C., Lefebvre J.: Prognosis of hypercalcemia in aerodigestive tract cancers: Study of 136 recent cases. *Oral Oncology*, 2005; 41; 884 - 889.
189. Polesel J., Dal Maso L., Bagnardi V., Zucchetto A., Zambon A., Levi F., La Vecchia C., Franceschi S.: Estimating dose-response relationship between ethanol and risk of cancer using regression spline models. *International Journal of Cancer*, 2005; 114; 836 - 841.
190. Prasad A.: Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology*, 2008; 43; 370 - 377.
191. Purdue M., Hashibe M., Berthiller J., La Vecchia C., Dal Maso L., Herrero R., Franceschi S., Castellsague X., Wei Q., Sturgis E., Morgenstern H., Zhang Z., Levi F., Talamini R., Smith E., Muscat J., Lazarus P., Schwartz S., Chen Ch, Neto E., Wunsch-Filho V., Zaridze D., Koifman S., Curado M., Benhamou S., Matos E., Szeszenia-Dabrowska N., Olshan A., Lence J., Menezes A., Daudt A., Mates I., Pilarska A., Fabianova E., Rudnai P., Winn D., Ferro G., Brennan P., Boffetta P., Hayes R.: Type of Alcoholic Beverage and Risk of Head and Neck Cancer – A Pooled Analysis within the INHANCE Consortium. *American Journal of Epidemiology*, 2009; 169; 132 - 142.
192. Qayyum M., Shah M.: Comparative Assessment of Selected Metals in the Scalp Hair and Nails of Lung Patients and Controls. *Biological Trace Element Research*, 2014; 158; 305 - 322.
193. Ragin C., Modugno F., Gollin S.: The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Journal of Dental Research*, 2007; 86; 104 - 114.
194. Raja N., Sankaranarayanan K., Dhathathreyan A., Nair B.: Interaction of chromium (III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011; 1808; 332 - 340.
195. Rapuri P., Gallagher J., Kinyamu H., Ryschon K.: Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001; 74; 694 - 700.
196. Rizzetti M., Liberini P., Zarattini G., Catalani S., Pazzaglia U., Apostoli P., Padovani A.: Loss of sight and sound. Could it be the hip? *Lancet*, 2009; 373; 1052 - 1052.
197. Robertson A., Tenenbein M.: Hepatotoxicity in acute iron poisoning. *Human & Experimental Toxicology*, 2005; 24; 559 - 562.
198. Rodrigues J., Batista B., Nunes J., Passos C., Barbosa Jr. F.: Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. *Science of the Total Environment*, 2008; 405; 370 - 376.

199. Rodriguez T., Altieri A., Chatenoud L., Gallus S., Bosetti C., Negri E., Franceschi S., Levi F., Talamini R., La Vecchia C.: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncology*, 2004; 40; 207 - 213.
200. Rogers M., Thomas D., Davis S., Vaughan T., Nevissi A.: A Case-Control Study of Element Levels and Cancer of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1993; 2; 305 - 312.
201. Rojas F., Ojeda C., Pavon J.: Simultaneous separation/preconcentration of nickel and cobalt by dispersive liquid-liquid microextraction prior to determination by FAAS. *European Scientific Journal*, 2013; 9; 20 - 31.
202. Rousseau M., Straif K., Siemiatycki J.: IARC carcinogen update. *Environmental Health Perspectives*, 2005; 113; A580 - A581.
203. Saat N., Chow S., Ghazali A., Hamid Z., Lubis S., Mohamed N., Ishak I., Othman H.: Study of Heavy Metal Levels in Nails and Hairs among Vegetable Farmers in Malaysia. *Research Journal of Applied Sciences*, 2013; 8; 449 - 455.
204. Sabatier M., Arnaud M., Kastenmayer P., Rytz A., Barclay D.: Meal effect on magnesium bioavailability from mineral water in healthy women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 75; 65 - 71.
205. Safai-Kuttel S.: Oral zinc supplementation in anorexia nervosa. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 1990; 82; 14 - 17.
206. Salgueiro M., Zubillaga M., Lysionek A., Sarabia M., Caro R., De Paoli T., Hager A., Weill R., Boccio J.: Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research*, 2000; 20; 737 - 755.
207. Salzman M., Smith E., Koo C: Excessive oral zinc supplementation. *Journal of Pediatric Hematology & Oncology*, 2002; 24; 582 - 584.
208. Samanta G., Sharma R., Roychowdhury T., Chakraborti D.: Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *Science of the Total Environment*, 2004; 326; 33 - 47.
209. Santamaria A.: Manganese exposure, essentiality & toxicity. *The Indian Journal of Medical Research*, 2008; 128; 484 - 500.
210. Sapkota A., Gajalakshmi V., Jetly D., Roychowdhury S., Dikshit R., Brennan P., Hashibe M., Boffetta P.: Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *International Journal of Cancer*, 2007; 121; 1793 - 1798.
211. Scherz H., Kirchoff E.: Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods – A comparison of data originating from different geographical regions of the world. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006; 19; 420 - 433.
212. Seccareccia D.: Cancer – related hypercalcemia. *Canadian Family Physician*, 2010; 56; 244 - 246.
213. Secretan B., Straif K., Baan R., Grosse Y., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology*, 2009; 10; 1033 - 1034.

214. Seńczuk W.: Toksykologia współczesna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa, 2006.
215. Seńczuk – Przybyłowska M., Śmigielńska S., Woźniak A., Przybyłowicz A., Szyfter W., Szyfter K., Piekoszewski W., Staniek H., Gawęcki W., Herman M., Kulza M., Florek E.: Ocena poziomu kadmu i ołowiu u pacjentów z nowotworami głowy i szyi. *Przegląd Lekarski*, 2011; 68; 794 – 802.
216. Shankar A., Prasad A.: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998; 68; 447S - 463S.
217. Shiboski C., Shmidt B., Jordan R.: Tongue and Tonsil Carcinoma. Increasing Trends in the U.S. Population Ages 20 –44 Years. *Cancer*, 2005; 103; 1843 - 1849.
218. Shrivastava R., Upreti R., Seth P., Chaturvedi U.: Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002; 34; 1 - 7.
219. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A.: *Cancer Statistics, 2014*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014; 64; 9 - 29.
220. Simonsen L., Harbak H., Bennekou P.: Cobalt metabolism and toxicology – A brief update. *Science of the Total Environment*, 2012; 432; 210 - 215.
221. Slotnick M., Nriagu J.: Validity of human nails as a biomarker of arsenic and selenium exposure: A review. *Environmental Research*, 2006; 102; 125 - 139.
222. Soldin O., Aschner M.: Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis. *Neurotoxicology*, 2007; 28; 951 - 956.
223. Soudani N., Sefi M., Ben Amara I., Boudawara T., Zeghal N.: Protective effects of Selenium (Se) on Chromium (VI) induced nephrotoxicity in adult rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010; 73; 671 - 678.
224. Spangler J., Reid J.: Environmental Manganese and Cancer Mortality Rates by County in North Carolina: An Ecological Study. *Biological Trace Element Research*, 2010; 133; 128 - 135.
225. Sreenivasa Rao K., Balaji T., Prasada Rao T., Babu Y., Naidu G.: Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 2002; 57; 1333 - 1338.
226. Stea S., Visentin M., Granchi D., Savarino L., Dallari D., Gualtieri G., Rollo G., Toni A., Pizzoferrato A., Montanaro L.: Sister chromatid exchange in patients with joint prostheses. *The Journal of Arthroplasty*, 2000; 15; 772 - 777.
227. Steens W., von Foerster G., Katzer A.: Severe cobalt poisoning with loss of sight after ceramic - metal pairing in a hip - a case report. *Acta Orthopaedica*, 2006; 77; 830 - 832.
228. Stern B., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T.: Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2007; 10; 157 - 222.

229. Stohs S., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M.: Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2000; 19; 201 - 213.
230. Straub D.: Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 2007; 22; 286 - 296.
231. Sturgis E., Wei Q., Spitz M.: Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminars in Oncology*, 2004; 31; 726 - 733.
232. Sukumar A., Subramanian R.: Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi. *Science of the Total Environment*, 2007; 372; 474 - 479.
233. Swaminathan R.: Magnesium Metabolism and its Disorders. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 2003; 24; 47 - 66.
234. Szyrkowska M., Pawlaczyk A., Wojciechowska E., Sypniewski S., Paryjczak T.: Human Hair as a Biomarker in Assessing Exposure to Toxic Metals. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2009; 18; 1151 - 1161.
235. Tachezy R., Klozar J., Rubenstein L., Smith E., Saláková M., Šmahelová J., Ludvíková V., Rotnáglová E., Kodet R., Hamšíková E.: Demographic and Risk Factors in Patients With Head and Neck Tumors. *Journal of Medical Virology*, 2009; 81; 878 - 887.
236. Tam A., Chan Y., Lau F.: A case series of accidental ingestion of hand warmer. *Clinical Toxicology*, 2008; 46; 900 - 904.
237. Tapiero H., Tew K.: Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003; 57; 399 - 411.
238. Tapiero H., Townsend D., Tew K.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003; 57; 386 - 398.
239. Templeton D., Liu Y.: Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemico – Biological Interactions*, 2010; 188; 267 - 275.
240. Tjønneland A., Grønbaek M., Stripp C., Overvad K.: Wine intake and diet in a random sample of 48763 Danish men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999; 69; 49 - 54.
241. Torrente M., Colomina M., Domingo J.: Metal Concentrations in Hair and Cognitive Assessment in an Adolescent Population. *Biological Trace Element Research*, 2005; 104; 215 - 221.
242. Touyz R.: Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24; 107 - 136.
243. Tramacere I., Negri E., Bagnardi V., Garavello W., Rota M., Scotti L., Islami F., Corrao G., Boffetta P., La Vecchia C.: A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: Overall results and dose-risk relation. *Oral Oncology*, 2010; 46; 497 - 503.
244. Troy J., Grandis J., Youk A., Diergaard B., Romkes M., Weissfeld J.: Childhood passive smoke exposure is associated with adult head and neck cancer. *Cancer Epidemiology*, 2013; 37; 417 - 423.
245. Trumbo P., Yates A., Schlicker S., Poos M.: Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum,

- nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*, 2001; 101; 294 - 301.
246. Unkiewicz-Winiarczyk A., Bagniak A., Gromysz-Kalkowska K., Szubartowska E.: Calcium, Magnesium, Iron, Zinc and Copper Concentration In the Hair of Tobacco Smokers. *Biological Trace Element Research*, 2009; 128; 152 - 160.
 247. Uriu-Adams J., Keen C.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005; 26; 268 - 298.
 248. Vincent J.: Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of Nutrition Society*, 2004; 63; 41 - 47.
 249. Vokes E., Weichselbaum R., Lippman S., Ki Hong W.: Head and Neck Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 1993; 328; 184 - 194.
 250. Waalkes M.: Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000; 79; 241 - 244.
 251. Weydert C., Smith B., Xu L., Kregel K., Ritchie J., Davis C., Oberley L.: Inhibition of oral cancer cell growth by adenovirus *MnSOD* plus BCNU treatment. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003; 34; 316 - 329.
 252. Weydert C., Waugh T., Ritchie J., Iyer K., Smith J., Li L., Spitz D., Oberley L.: Overexpression of manganese or copper – zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006; 41; 226 - 237.
 253. Wietrzyk J., Opolski A., Radzikowski Cz.: Przeszczepialne nowotwory jako model doświadczalny do badania procesu przerzutowania i efektywności leczenia przeciwprzerutowego. *Nowotwory*, 2000; 50; 54 - 60.
 254. Wolf F., Cittadini A., Maier J.: Magnesium and tumors: Ally or foe? *Cancer Treatment Reviews*, 2009; 35; 378 - 382.
 255. Wolf R., Cauley J., Baker C., Ferrell R., Charron M., Caggiula A., Salamone L., Heaney R., Kuller.: Factors associated with calcium absorption efficiency in pre- and perimenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 72; 446 - 471.
 256. Wołowiec P., Michalak I., Chojnacka K., Mikulewicz M.: Hair analysis in health assessment. *Clinica Chimica Acta*, 2013; 419; 139 - 171.
 257. World Health Organization: Environmental Health Criteria 221. Zinc. Geneva, 2001.
 258. World Health Organization: Cobalt and inorganic cobalt compounds. Concise international chemical assessment document, 2006.
 259. World Health Organization: Global status report on noncommunicable diseases, 2010.
 260. World Health Organization: Global status report on alcohol and health, 2011a.
 261. World Health Organization: Report on the global tobacco epidemic, 2011. Warning about the dangers of tobacco, 2011b.
 262. World Health Organization: European Tobacco Control Status Report, 2013.
 263. Woźniak A., Wegner A., Seńczuk - Przybyłowska M., Przybyłowicz A., Szyfter W., Golusiński W., Piekoszewski W., Szyfter K., Krejpcio Z., Gawęcki W., Herman M., Kulza M., Chęsy P., Florek E.: Ocena poziomu chromu i kobaltu we włosach i paznokciach pacjentów z guzem krtani i slinianki z uwzględnieniem wpływu palenia tytoniu i picia alkoholu. *Przegląd Lekarski*, 2011; 68; 786 – 793.

264. Woźniak A., Kujawa A., Seńczuk - Przybyłowska M., Kulza M., Gawęcki W., Szybiak B., Herman M., Czarnywojtek A., Kurhańska – Fliskykowska A., Chęsy P., Szyfter W., Walas S., Golusiński W., Szyfter K., Krejpcio Z., Piekoszewski W., Parczewski A., Florek E.: Metale fizjologiczne w surowicy, we włosach i paznokciach pacjentów z nowotworami w obrębie głowy i szyi. *Przegląd Lekarski*, 2012; 69; 785 – 797.
265. www.onkonet.pl. Dostęp - 27.10.2014 r.
266. Wyss A., Hashibe M., Chuang S., Lee Y., Zhang Z., Yu G., Winn D., Wei Q., Talamini R., Szeszenia-Dabrowska N., Sturgis E., Smith E., Shangina O., Schwartz S., Schantz S., Rudnai P., Purdue M., Eluf-Neto J., Muscat J., Morgenstern H., Michaluart P Jr., Menezes A., Matos E., Mates I., Lissowska J., Levi F., Lazarus P., La Vecchia C., Koifman S., Herrero R., Hayes R., Franceschi S., Wünsch-Filho V., Fernandez L., Fabianova E., Daudt A., Dal Maso L., Curado M., Chen C., Castellsague X., de Carvalho M., Cadoni G., Boccia S., Brennan P., Boffetta P., Olshan A.: Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *American Journal of Epidemiology*, 2013; 178; 679 - 690.
267. Yaemsiri S., Hou N., Slining M., He K.: Growth rate of human fingernails and toenails in healthy American young adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2009; 24; 420 - 423.
268. Yamori Y., Taquchi T., Mori H., Mori M.: Low cardiovascular risks in the middle aged males and females excreting greater 24-hour urinary taurine and magnesium in 41 WHO-CARDIAC study populations in the world. *Journal of Biomedical Science*, 2010; 17(Suppl 1); S1 - S21.
269. Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K.: Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2007; 334; 115 - 124.
270. Zhang Z., Morgenstern H., Spitz M., Tashkin D., Yu G., Hsu T., Schantz S.: Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000; 9; 1043 - 1049.
271. Zheng T., Boyle P., Zhang B. et al.: Tobacco use and risk of oral cancer. In: Boyle, P.; Gray, N.; Henningfield, J. Seffrin, J.; and Zatonski, W., eds. *Tobacco: Science, Policy and Public Health*. Oxford: Oxford University Press, 2004; 399 - 432.

11. SPIS RYCIN

Rycina 1. Występowanie i śmiertelność w nowotworach głowy i szyi na świecie (wszystkie grupy wiekowe, obie płcie)

Rycina 2. Występowanie nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Rycina 3. Śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i u mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Rycina 4. Występowanie i śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet we wszystkich grupach wiekowych na świecie

Rycina 5. Występowanie i śmiertelność spowodowana wystąpieniem nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani u kobiet i mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych w Polsce

Rycina 6. Porównanie występowania nowotworów wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet i mężczyzn w Polsce

Rycina 7. Porównanie śmiertelności spowodowanej nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet i mężczyzn w Polsce

Rycina 8. Występowanie i śmiertelność spowodowana nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród mężczyzn w Polsce

Rycina 9. Występowanie i śmiertelność spowodowana nowotworami wargi, jamy ustnej, nosogardzieli, gardła i krtani wśród kobiet w Polsce

Rycina 10. Trendy zachorowalności na nowotwory jamy ustnej i gardła w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1980 - 2010)

Rycina 11. Trendy umieralności na nowotwory jamy ustnej i gardła w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1965 - 2010)

Rycina 12. Trendy zachorowalności na nowotwory krtani w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1980 - 2010)

Rycina 13. Trendy umieralności na nowotwory krtani w Polsce w wybranych grupach wiekowych (lata 1965 - 2010)

Rycina 14. Mapa Polski – liczba nowo zarejestrowanych przypadków wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Rycina 15. Mapa Polski - liczba nowo zarejestrowanych przypadków wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Rycina 16. Mapa Polski – liczba zgonów spowodowana nowotworami jamy ustnej, gardła i krtani wśród mężczyzn w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

Rycina 17. Mapa Polski – liczba zgonów spowodowana nowotworami jamy ustnej, gardła i krtani wśród kobiet w latach 1999 - 2011 na 100 tys. osób (standaryzacja Europa)

- Rycina 18.** Wysokociśnieniowy mineralizator mikrofalowy – Mars 6, CEM, Matthews, USA
- Rycina 19.** Spektrometr mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (Spectrometer ELAN DRC-e Axial Field Technology, Perkin Elmer)
- Rycina 20.** Spektrometr optyczny ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (Optical Emission Spectrometer Optima 2100DV, Perkin Elmer)
- Rycina 21.** Przykładowa krzywa kalibracyjna
- Rycina 22.** Przykładowa krzywa kalibracyjna
- Rycina 23.** Krzywa kalibracyjna – przykładowy wykres
- Rycina 24.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną
- Rycina 25.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną
- Rycina 26.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną
- Rycina 27.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną
- Rycina 28.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w surowicy krwi pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną
- Rycina 29.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 30.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 31.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 32.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 33.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 34.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 35.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 36.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 37.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 38.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) w surowicy krwi testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 39.** Dendrogram dla wszystkich próbek surowicy krwi (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak szyi; S – rak ślinianek
- Rycina 40.** Dendrogram dla próbek surowicy krwi (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek

- Rycina 41.** Dendrogram dla wszystkich próbek surowicy krwi; C - grupa kontrolna; P – rak gardła
- Rycina 42.** Dendrogram dla próbek surowicy krwi; C - grupa kontrolna; M – rak jamy ustnej
- Rycina 43.** Dendrogram dla próbek surowicy krwi; C - grupa kontrolna; N – rak szyi
- Rycina 44.** Dendrogram dla próbek surowicy krwi; C - grupa kontrolna; T – rak migdałków
- Rycina 45.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 46.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 47.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 48.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną
- Rycina 49.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną
- Rycina 50.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną
- Rycina 51.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną
- Rycina 52.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków we włosach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną
- Rycina 53.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 54.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 55.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 56.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 57.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 58.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 59.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 60.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 61.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) we włosach testem Kruskala – Wallisa
- Rycina 62.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) we włosach testem Kruskala - Wallisa

- Rycina 63.** Dendrogram dla wszystkich próbek włosów (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak szyi; S – rak ślinianek
- Rycina 64.** Dendrogram dla próbek włosów; C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek
- Rycina 65.** Dendrogram dla wszystkich próbek włosów; C - grupa kontrolna; P – rak gardła
- Rycina 66.** Dendrogram dla próbek włosów (skala logarytmiczna); C – grupa kontrolna; M – rak jamy ustnej
- Rycina 67.** Dendrogram dla próbek włosów (skala logarytmiczna); C – grupa kontrolna; N – rak szyi
- Rycina 68.** Dendrogram dla próbek włosów; C - grupa kontrolna; T – rak migdałków
- Rycina 69.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 70.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 71.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 72.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem ślinianek a grupą kontrolną
- Rycina 73.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem gardła a grupą kontrolną
- Rycina 74.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem jamy ustnej a grupą kontrolną
- Rycina 75.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem migdałków a grupą kontrolną
- Rycina 76.** Porównanie średnich stężeń pierwiastków w paznokciach pomiędzy pacjentami z nowotworem szyi a grupą kontrolną
- Rycina 77.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia wapnia (Ca) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 78.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia magnezu (Mg) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 79.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia żelaza (Fe) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 80.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia miedzi (Cu) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 81.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia cynku (Zn) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 82.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia manganu (Mn) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 83.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kobaltu (Co) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 84.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia chromu (Cr) w paznokciach testem Kruskala-Wallis

- Rycina 85.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia kadmu (Cd) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 86.** Porównanie badanych grup pod względem stężenia ołowiu (Pb) w paznokciach testem Kruskala-Wallis
- Rycina 87.** Dendrogram dla wszystkich próbek paznokci (skala logarytmiczna); C - grupa kontrolna; T – rak migdałków; P – rak gardła; M – rak jamy ustnej; N – rak szyi; S – rak ślinianek
- Rycina 88.** Dendrogram dla próbek paznokci; C - grupa kontrolna; S – rak ślinianek
- Rycina 89.** Dendrogram dla wszystkich próbek paznokci; C - grupa kontrolna; P – rak gardła
- Rycina 90.** Dendrogram dla próbek paznokci (skala logarytmiczna); C – grupa kontrolna; M –rak jamy ustnej
- Rycina 91.** Dendrogram dla próbek paznokci; C - grupa kontrolna; N – rak szyi
- Rycina 92.** Dendrogram dla próbek paznokci; C - grupa kontrolna; T – rak migdałków
- Rycina 93.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej
- Rycina 94.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji Dyskryminacyjnej
- Rycina 95.** Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwszej funkcji Dyskryminacyjnej
- Rycina 96.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem ślinianek
- Rycina 97.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem gardła
- Rycina 98.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem jamy ustnej
- Rycina 99.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem szyi
- Rycina 100.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z rakiem migdałków
- Rycina 101.** Porównanie stężeń pierwiastków niezbędnych i toksycznych w surowicy krwi, włosach i paznokciach u pacjentów z grupy kontrolnej, nienowotworowej

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Zestawienie stosowanych materiałów odniesienia z certyfikowanymi wartościami oznaczanych pierwiastków oraz wyznaczone wartości stężeń dla próbki laboratoryjnej paznokci

Tabela 2. Proces mycia próbek włosów i paznokci przed mineralizacją

Tabela 3. Programy mineralizacyjne dla mineralizatora MARS 6

Tabela 4. Warunki analizy próbek biologicznych – ICP-OES

Tabela 5. Warunki pomiarowe próbek biologicznych – ICP-MS

Tabela 6. Warunki analizy próbek biologicznych – ICP DRCS MS

Tabela 7. Wyznaczone wartości błędów względnego (RE) dla materiału odniesienia krwi

Tabela 8. Wyznaczone wartości błędów względnego (RE) dla materiału odniesienia włosów

Tabela 9. Wartości odchylenia standardowego oraz współczynniki zmienności dla poszczególnych analitów zawartych w materiale odniesienia krwi, włosów oraz w próbce laboratoryjnej paznokci

Tabela 10. Wartości granicy oznaczalności i wykrywalności dla poszczególnych analitów

Tabela 11. Zakres zależności kalibracyjnej dla poszczególnych analitów

Tabela 12. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów grupy kontrolnej

Tabela 13. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów grupy kontrolnej

Tabela 14. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami ślinianek

Tabela 15. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworami ślinianek

Tabela 16. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami gardła

Tabela 17. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem gardła

Tabela 18. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami jamy ustnej

Tabela 19. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem jamy ustnej

Tabela 20. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami szyi

Tabela 21. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem szyi

Tabela 22. Wyniki ankiety dotyczące danych personalnych pacjentów z nowotworami migdałka podniebiennego

Tabela 23. Wyniki ankiety dotyczące diety spożywanej przez pacjentów z nowotworem migdałka podniebiennego

Tabela 24. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna w surowicy krwi w badanych grupach [$\mu\text{g L}^{-1}$]

Tabela 25. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala – Wallisa

Tabela 26. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy krwi dla wszystkich grup

Tabela 27. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

Tabela 28. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 29. Macierz klasyfikacji

Tabela 30. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz migdałków

Tabela 31. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 32. Macierz klasyfikacji

Tabela 33. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w surowicy dla dwóch grup: pacjentów z rakiem szyi oraz migdałków

Tabela 34. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 35. Macierz klasyfikacji

Tabela 36. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna we włosach w badanych grupach [$\mu\text{g g}^{-1}$]

Tabela 37. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala-Wallisa

Tabela 38. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla wszystkich grup

Tabela 39. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

Tabela 40. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 41. Macierz klasyfikacji

Tabela 42. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi

Tabela 43. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 44. Macierz klasyfikacji

Tabela 45. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków we włosach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem szyi oraz gardła

Tabela 46. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 47. Macierz klasyfikacji

Tabela 48. Średnie wartości stężeń oznaczanych pierwiastków oraz ich ocena statystyczna w paznokciach w badanych grupach [$\mu\text{g g}^{-1}$]

Tabela 49. Analiza post hoc różnic między badanymi grupami – wyniki testu Kruskala-Wallisa

Tabela 50. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla wszystkich grup

Tabela 51. Standaryzowane współczynniki funkcji dyskryminacyjnych

Tabela 52. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 53. Macierz klasyfikacji

Tabela 54. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz szyi

Tabela 55. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 56. Macierz klasyfikacji

Tabela 57. Analiza dyskryminacyjna z użyciem stężeń dziesięciu pierwiastków w paznokciach dla dwóch grup: pacjentów z rakiem ślinianek oraz jamy ustnej

Tabela 58. Współczynniki funkcji dyskryminacyjnej

Tabela 59. Macierz klasyfikacji

13. OŚWIADCZENIA AUTORA

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej p.t.: „**Materiały alternatywne w ocenie zaburzeń poziomów metali niezbędnych i toksycznych u pacjentów z nowotworami głowy i szyi**”.

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis