

Stężenie miedzi w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem prostaty w Polsce

Miedź jest pierwiastkiem z grupy metali przejściowych i to właśnie zdolność miedzi do przechodzenia między stanem utlenionym i zredukowanym wykorzystywana jest w układach biologicznych. [1] W większym stężeniu miedź jest dla organizmu toksyczna, głównie z powodu jej wysokiego potencjału oksydoredukcyjnego. [2] Z tego też powodu niezbędna jest w organizmie precyzyjna kontrola transportu tego pierwiastka oraz jego homeostaza. [3]

Miedź pełni swoje różne funkcje w strukturze białek oraz jako katalizator dzięki zdolności do zmian stopnia utlenienia i redukcji i występuje w stanie utlenionym (Cu^{2+}) lub zredukowanym (Cu^{+}). Jony miedziowe mogą uczestniczyć w szerokim spektrum interakcji z białkami, umożliwiając powstawanie złożonych struktur oraz pośredniczenie w skomplikowanych reakcjach biochemicznych. Miedź może także relokować inne metale, np. cynk, z ich miejsc ligandowych w metaloproteinach, co skutkuje nieprawidłową strukturą albo inhibicją aktywności enzymatycznej tych białek. [4]

Miedź funkcjonuje głównie jako kluczowy kofaktor katalityczny w wielu enzymach i jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu wielu podstawowych procesów komórkowych, włączając w to oddychanie komórkowe, oczyszczanie z wolnych rodników, tworzenie tkanki łącznej i produkcję melaniny oraz syntezę neuroprzekaźników i neuropeptydów. [2] Miedź, podobnie jak inne pierwiastki śladowe, jest z jednej strony niezbędna dla organizmu, z drugiej jednak strony jest bardzo niebezpieczna. Generalnie jednak stany, które charakteryzują się ogólnym lub komórkowo-specyficznym nagromadzeniem miedzi zdarzają się rzadko i najczęściej występują w wyniku określonych zaburzeń o podłożu genetycznym [1].

Związek pomiędzy miedzią a nowotworami nie został do tej pory jednoznacznie wyjaśniony. Jak dotąd opublikowano szereg prac badających miedź jako czynnik ryzyka wystąpienia raków [5, 6,7,8,9,10,11,12]. Prace te dają niejednoznaczne wyniki. Pośród wykazanych prac widnieje jedno doniesienie z Polski. Zowczak i wsp. sugerują, że w grupach wszystkich raków: piersi, płuc, przewodu żołądkowo-jelitowego i ginekologicznych podwyższone jest stężenie miedzi w surowicy. Zowczak i wsp. nie wskazują jednak ile razy podwyższone jest ryzyko raków w stosunku do grupy kontrolnej i czy zależy ono od ich lokalizacji.

Do tej pory w literaturze została opisana silna korelacja pomiędzy pacjentami ze zdiagnozowanym rakiem trzustki a ryzykiem zgonu w zależności od stężenia miedzi w surowicy. Pacjenci z rakiem trzustki ze stężeniem miedzi w surowicy poniżej $1025,88 \mu\text{g/l}$ wykazują 26-krotnie obniżone ryzyko zgonu w porównaniu do podgrupy-kwartyla o najwyższym stężeniu miedzi w surowicy tj. powyżej $1453,79 \mu\text{g/l}$ (OR: 26, $p < 0.0001$; 95%CI: 8,79-76,90) [13].

Stężenie miedzi w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem prostaty w Polsce

W niniejszej pracy postanowiono natomiast ocenić korelację pomiędzy ryzykiem zgonów u mężczyzn z rakiem prostaty a stężeniem miedzi w surowicy krwi. Nieoczekiwanie stwierdzono, że istnieje bardzo mocna 30-krotna korelacja.

Protokół badań

Grupa badana

Do badania włączono 357 pacjentów Samodzielnych Publicznych Szpitali Klinicznych nr 1/2 ze zdiagnozowanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem prostaty. Od każdego pacjenta włączonego do badania uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu, pobrano próbkę krwi oraz uzyskano dane rodowodowo-kliniczne. Krew została zebrana w latach 2009-2015 w momencie diagnozy raka prostaty jednak przed rozpoczęciem leczenia. Pacjenci zostali poinformowani o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. W 2020 roku zebrano informacje o zgonach w trakcie obserwacji prospektywnej. Uzyskano ją z Departamentu Ewidencji Państwowych Ministerstwa Cyfryzacji. Średni okres obserwacji dla pacjentów żyjących wyniósł 5 lat.

Material

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi w celu pomiaru stężenia miedzi. Po pobraniu materiał przechowywano w -80°C do momentu oznaczenia stężenia miedzi.

Metoda oznaczania zawartości miedzi w surowicy

1.1 Aparat

Do określenia zawartości miedzi wykorzystana została technika spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Do wykonania pomiaru wykorzystano spektrometr mas ELAN DRC-c (PerkinElmer) oraz NexION 350D (PerkinElmer). Wykorzystanie ICP-MS pozwala uzyskać limity detekcji $< 0,1 \mu\text{g/l}$. Podczas prowadzenia oznaczeń populacji nieeksponowanej zawodowo na metale i ich związki, czułość aparatury odgrywa kluczową rolę.

1.2 Przygotowanie do pomiaru

Zebrane próby surowicy, zostały rozmrożone z temperatury -80°C do temperatury pokojowej, w dniu wykonywania analiz. Każda próbka została dokładnie wymieszana przy użyciu wstrząsarki lub wortexu w celu uzyskania możliwie największej homogenności materiału.

Stężenie miedzi w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem prostaty w Polsce

Stosując możliwie najprostszą technikę, próbki surowicy zostały rozcieńczone w stosunku 1:30 (50 µl surowicy : 1450 µl buforu).

Z uwagi na specyfikę pomiaru do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamonowego (TMAH). W celu lepszej dyspersji rozpuszczonych składników krwi zastosowano dodatek niejonowego surfaktantu w postaci Trytonu X-100. Wykorzystanie tego związku nie tylko ułatwia rozpuszczanie m.in. białek ale także przyczynia się do szybszego wypłukiwania próbki z układu wprowadzenia spektrometru. Do korekcji efektu matrycy oraz dryfu aparatu użyty został standard wewnętrzny w postaci rodu (105Rh). Do uzyskania stabilności jonów metali rozpuszczonych w roztworze zastosowany został dodatek kwasu wersenowego (EDTA). Dodatkowo, z racji zawartości związków zawierających węgiel, zastosowano dodatek butanolu do wszystkich roztworów w celu niwelacji efektu związanego ze znaczną ilością węgla w badanej próbce.

1.3 Warunki pomiaru

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem kwadrupolowej celi reakcyjnej spektrometru, tzw. trybie DRC (ang. Dynamic Reaction Cell) aparatu Elan DRC-e oraz NexION 350D (PerkinElmer) z tlenem jako gazem reakcyjnym.

1.4 Walidacja pomiarów

Do walidacji pomiarów zastosowano następujący materiał referencyjny ClinCheck (Recipe, Niemcy). Jest to standard odniesienia powszechnie stosowane w spektrometrii, pozwalający na potwierdzenie precyzji, czułości i specyfiki pomiaru.

Statystyka

Różnice w częstościach pomiędzy analizowanymi grupami oceniano poprzez analizę wieloczynnikową.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną zależność między ryzykiem zgonu u mężczyzn ze zdiagnozowanym rakiem prostaty a stężeniem miedzi w surowicy.

Mężczyźni z rakiem prostaty oraz ze stężeniem miedzi w surowicy poniżej **958,06 µg/l** wykazują istotnie 6 krotnie zmniejszone ryzyko zgonu (grupa I vs IV: OR=6,04, p<0,0001; 95%CI: 2,60-14,05).



Stężenie miedzi w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem prostaty w Polsce

Tabela 2. Częstość zgonów w zależności od stężenia miedzi w surowicy u mężczyzn z rakiem prostaty.

Grupa	Zakres Cu µg/l	Żyjący	Zgony	OR	p.value
I	≤958,06	82	8	ref.	Ref.
II	958,07-1062,58	76	13	1,75	0,25
III	1062,59-1195,95	78	11	1,45	0,48
IV	≥1195,96	56	33	6,04	<0,0001

Mężczyźni z rakiem prostaty oraz stężeniem miedzi w surowicy poniżej 900 µg/l wykazują istotnie blisko trzydziestokrotnie zmniejszone ryzyko zgonu w stosunku do podgrupy ze stężeniem cynku w surowicy powyżej 1200 µg/l (grupa I vs III: OR=29,3, p=0,0001; 95%CI: 3,9-222,8).

Tabela 3. Częstość zgonów w zależności od stężenia miedzi w surowicy u mężczyzn z rakiem prostaty.

Grupa	Zakres Cu µg/l	Żyjący	Zgony
I	≤900	48	1
II	900-1200	190	31
III	≥1200	54	33

Stężenie miedzi w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem prostaty w Polsce

Literatura

1. Linder M.C.: The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutation Research* 733 (2012), s. 83 – 91.
2. Zhao L., Xia Z., Wang F.: Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism. *Frontiers in Pharmacology* 5(Article 33) (2014), s. 1 – 23.
3. Ellingsen D.G., Horn N., Aaseth J.: Copper. *Handbook on The Toxicology of Metals 3rd Edition*; Red.: Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T.; Academic Press (2007), s. 529 – 546.
4. Feste R.A., Thiele D.J.: Copper: an essential metal in biology. *Current Biology* 21(21) (2011), s. R877 – R883.
5. Haines A.P., Thompson S.G., Basu T.K., Hunt R.: Cancer, retinol binding protein, zinc and copper. *The Lancet* 1(8262) (1982), s. 52 – 53.
6. Kok F.J., Van Duijin C.M., Hofman A., Van Der Voet G.B., De Wolff F.A., Ch. Paays C.H., Valkenburg H.A.: Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. *American Journal of Epidemiology* 128(2) (1988), s. 352 – 359.
7. Coates R.J., Weiss N.S., Daling J.R., Rettmer R.L., Warnik G.R.: Cancer risk in relation to serum copper levels. *Cancer Research* 49 (1989), s. 4353 – 4356.
8. Overvad K., Wang D.Y., Olsen J., Allen D.S., Thorling E.B., Bulbrook R.D., Hayward J.L.: Copper in human mammary carcinogenesis: a case-cohort study. *American Journal of Epidemiology* 137(4) (1993), s. 409 – 414.
9. Garland M., Morris S.J., Colditz G.A., Stampfer M.J., Spate V.L., Baskett C.K., Rosner B., Speizer F.E., Willett W.C., Hunter D.J.: Toenail trace element levels and breast cancer: a prospective study. *American Journal of Epidemiology* 144(7) (1996), s. 653 – 660.
10. Wu T., Sempos C.T., Freudenheim J.L., Muti P., Smit E.: Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Annals of Epidemiology* 14(3) (2004), s. 195 – 201.
11. Leone N., Courbon D., Ducimetiere P., Zureik M.: Zinc, copper, and magnesium and risk for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 17(3) (2006), s. 308 – 314.
12. Zowczak M., Iskra M., Torliński L., Cofta S. Analysis of Serum Copper and Zinc Concentrations in Cancer Patients. *Biological Trace Element Research* 2001, 82(1).
13. Lener, M. R. et al. Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res Treat* 48, 1056–1064 (2016).