

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



mgr Piotr Baszuk

MIEDŹ I ARSEN JAKO MARKERY WYSTĘPOWANIA RAKA JELITA GRUBEGO

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Marcin Lener

Szczecin 2022r.

*Serdeczne podziękowania składam
Promotorowi Panu dr hab. Marcinowi Lener
za merytoryczne wsparcie, poświęcony czas i wyrozumiałość
okazaną w trakcie powstawania niniejszej pracy.*

Szczególne podziękowania składam Panu Profesorowi Janowi Lubińskiemu za wieloletnią współpracę, wiele wartościowych uwag i sugestii oraz umożliwienie przeprowadzenia badań bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

*Dziękuję mojej żonie – Karolinie, córce – Basi,
rodzicom – Marzenie i Jerzemu
oraz teściom – Elżbiecie i Andrzejowi
za wsparcie okazane w trakcie powstawania niniejszej pracy.*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
1. Nota informacyjna.....	9
1.1. Źródło finansowania.....	9
2. Wstęp	10
2.1. Epidemiologia raka jelita grubego	10
2.2. Wybrane czynniki ryzyka raka jelita grubego.....	11
2.3. Patogeneza molekularna i struktura histopatologiczna raka jelita grubego	13
2.4. Metody diagnostyki raka jelita grubego.....	15
2.4.1. Inwazyjne metody wykrywania raka jelita grubego.....	15
2.4.2. Nieinwazyjne metody wykrywania raka jelita grubego – markery.....	17
2.5. Stężenie wybranych pierwiastków w organizmie jako markery występowania raków.	22
2.5.1. Stężenie seleniu w organizmie jako marker występowania stanów przedrakowych i raka jelita grubego.....	22
2.5.2. Stężenie arsenu w organizmie a występowanie raków.	24
2.5.3. Stężenie miedzi w organizmie jako marker występowania raka jelita grubego..	24
2.6. Modyfikacje stężeń pierwiastków jako markerów występowania raka jelita grubego poprzez polimorfizmy w wybranych genach.	29
3. Cel pracy	31
4. Materiały i metody	32
Publikacja nr 1:	32
„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105	32
Publikacja nr 2:	32
“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628	32
4.1. Grupa badana	32
4.2. Grupa kontrolna	33
4.3. Pomiar stężenia arsenu i miedzi	34

4.4.	Genotypowanie próbek DNA.....	35
4.5.	Analiza statystyczna.....	36
5.	Wyniki.....	37
5.1.	Publikacja nr 1:	37
	„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105	37
5.2.	Publikacja nr 2:	41
	“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628	41
6.	Wnioski	54
7.	Publikacje będące podstawą rozprawy.....	55
7.1.	Publikacja nr 1:	55
	„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105	55
7.2.	Publikacja nr 2:	65
	“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628	65
8.	Suplement.....	76
9.	Streszczenie.....	98
10.	Summary	100
11.	Piśmiennictwo	102
12.	Oświadczenia współautorów publikacji.....	114

Wykaz stosowanych skrótów

GLOBOCAN (ang. *Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*) – Globalna Baza Danych Zawierająca Statystyki Dotyczące Raka

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

RR (ang. *relative risk*) – ryzyko względne

HNPCC (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością

FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) – rodzinna polipowatość gruczolakowa

CIN (ang. *chromosomal instability*) – niestabilność chromosomowa

MSI (ang. *microsatellite instability*) – niestabilność mikrosatelitarna

CIMP (ang. *CpG island methylator phenotype*) – fenotyp metylatora wysp CpG

AJCC (ang. *The American Joint Committee on Cancer*) – Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka

TNM (ang. *tumor node and metastasis*) – guz (pierwotny), węzeł (chłonny) i przerzut (odległy)

MSI-H (ang. *advanced microsatellite instability-high*) – wysoka niestabilność mikrosatelitarna

MSS (ang. *microsatellite stable*) – stabilność mikrosatelitarna

FOBT (ang. *fecal occult blood test*) – test na krew utajoną w kale

FIT (ang. *fecal immunochemical test*) – immunochemiczny test na krew utajoną w kale

CI (ang. *confidence interval*) – przedział ufności

HGB – hemoglobina

RBC – liczba erytrocytów

HCT – hematokryt

MCV – średnia objętość erytrocytów

MCH – średnia zawartość hemoglobiny w krwinkach czerwonych

-Wykaz stosowanych skrótów-

MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych

PR (ang. *prevalence ratio*) – współczynnik rozpowszechnienia

OR (ang. *odds ratio*) – iloraz szans

p (ang. *p-value*) – prawdopodobieństwo testowe

EDTA (ang. *sodium ethylenediaminetetraacetic acid*) – kwas sodowy etylenodiaminotetraoctowy

CREB (ang. *cAMP-response element binding protein*) – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP

cAMP (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) – cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

ICP-MS (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) – spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej

DRC (ang. *dynamic reaction cell*) – dynamiczna komora reakcyjna

TMAH (ang. *tetramethylammonium hydroxide*) – wodorotlenek tetrametyloamonowy

NIST (ang. *National Institute of Standards and Technology*) – Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii

Cv % (ang. *calculated recurrency*) – współczynnik wariancji

LAMP (ang. *Lead And Multielement Proficiency Program*) – Program Biegłości Prowadzenia Oznaczeń Stężeń Ołowiu oraz Innych Pierwiastków

CDC (ang. *Center for Disease Control and Prevention*) – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób

QMEQAS (ang. *Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme*) – Program Zewnętrznej Kontroli Jakości organizowany przez Centre du Toxicologie de Quebec

SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

1. Nota informacyjna

Niniejszą rozprawę doktorską pt. „Miedź i arsen jako markery występowania raka jelita grubego” stanowi cykl 2 artykułów oryginalnych, w których jestem pierwszym autorem. Artykuły opublikowano w międzynarodowych czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation Reports (Thomson Reuters). Łączna wartość współczynnika oddziaływania (Impact Factor - IF) dla cyklu wymienionych prac (według Thomson Reuters Journal Citation Reports 2019) wynosi 12,162 oraz 200 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Rozprawę doktorską stanowią następujące publikacje:

- Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener.

„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

IF: 6,081. MNiSW: 100.

- Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

IF: 6,081. MNiSW: 100.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015r. (§5.2) do pracy zostały dołączone oświadczenia kandydata oraz pozostałych współautorów publikacji określające indywidualny wkład w powstawanie prac stanowiących rozprawę doktorską.

1.1. Źródło finansowania.

Pracę wykonano dzięki dofinansowaniu z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju; numer projektu: PBS3/B7/26/2015.

2. Wstęp

2.1. Epidemiologia raka jelita grubego

Według danych GLOBOCAN (ang. *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*) dotyczących zachorowalności i umieralności na raka, opracowanych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (ang. *International Agency Research on Cancer – IARC*), rak jelita grubego jest trzecim, po raku piersi (11,7%) i raku płuca (11,4%) najczęściej rozpoznawanym nowotworem na świecie u obu płci [1]. W 2020 roku na świecie zdiagnozowano 1 880 725 przypadków raka jelita grubego, co stanowiło 10% wszystkich zdiagnozowanych zachorowań na raka [1].

Rak jelita grubego jest główną, wymienianą na drugim miejscu zaraz po raku płuca (18%), przyczyną zgonów z powodu raka u obu płci. Z powodu tej choroby w 2020 roku zmarło 915 880 osób, co stanowiło 9,4% wszystkich zgonów spowodowanych rakiem [1]. U kobiet rak tego narządu stanowił 9,4% wszystkich zdiagnozowanych raków zajmując drugie miejsce zaraz po raku piersi (24,5%) i odpowiadał za 9,5% zgonów wywołanych rakiem zajmując trzecie miejsce po raku piersi (15,5%) i płuca (13,7%). Z kolei u mężczyzn rak tego narządu stanowił 10,6% wszystkich rozpoznanych raków i został sklasyfikowany na trzecim miejscu po raku płuca (14,3%) i raku prostaty (14,1%). Jednocześnie stanowił przyczynę 9,3% wszystkich zgonów spowodowanych rakiem u mężczyzn zajmując trzecie miejsce po raku płuca (21,5%) i raku wątroby (10,5%) [1].

Raporty opracowane w 2021 roku przez Krajowy Rejestr Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie, bazujące na polskiej populacji – odzwierciedlają światową charakterystykę zapadalności i umieralności na raka jelita grubego. Najczęściej diagnozowanymi nowotworami złośliwymi u kobiet są: rak piersi (22,9%), rak płuca (9,9%) oraz rak jelita grubego (9,5%), które również odpowiadają za największy odsetek zgonów z powodu raka w następującej kolejności: rak płuca (17,9%), rak piersi (15,1%) oraz rak jelita grubego (11,6%). U mężczyzn najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym jest rak prostaty (20,6%). Podobnie jak u kobiet, drugim i trzecim najczęściej diagnozowanymi rakami są: rak płuca (16,2%) oraz rak jelita grubego (12,2%). Rak jelita grubego u mężczyzn odpowiada za 13% zgonów spowodowanych rakiem, zajmując drugie miejsce zaraz po raku płuca (27,4%) a przed rakiem prostaty (10,3%) [2].

2.2. Wybrane czynniki ryzyka raka jelita grubego

Na ryzyko zachorowania na raka jelita grubego wpływają zarówno czynniki genetyczne, jak i związane ze stylem życia (Tabela 1). Jednak żaden pojedynczy czynnik ryzyka nie odpowiada za większość przypadków raka jelita grubego [3]. Poza starszym wiekiem i płcią męską, w badaniach epidemiologicznych zidentyfikowano i ustalono czynniki ryzyka, które często współwystępują i wchodzi w interakcje [4]. Wśród nich można wymienić: rodzinny wywiad raka jelita grubego [5], nieswoiste zapalenie jelit [6], palenie tytoniu [7], nadmierne spożywanie alkoholu [8], wysokie spożycie czerwonego i przetworzonego mięsa [9], otyłość [10] i cukrzycę [11]. Część z wymienionych czynników, głównie związanych z trybem życia, można modyfikować i odpowiadają one za większą część obciążenia chorobą na poziomie populacji, pomimo mniejszego ryzyka względnego (RR głównie pomiędzy 1,2 a 2,0) [4].

Jednak najsilniejszy wzrost ryzyka raka jelita grubego występuje u osób pochodzących z rodzin z krewnymi pierwszego stopnia z rakiem tego narządu, w tym szczególnie u osób z wieloma chorymi krewnymi lub krewnymi zdiagnozowanymi w młodym wieku oraz osób z nieswoistym zapaleniem jelit [4]. Szacuje się, że około 5–10% wszystkich raków jelita grubego rozwija się w warunkach określonych dziedzicznych zespołów nowotworowych. Do dwóch głównych poznanych zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w przebiegu których dochodzi do rozwoju raka jelita grubego należą: dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPCC/zespół Lyncha) związany z mutacjami genów *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EpCAM* oraz rodzinna polipowatość gruczolakowa (FAP) związana z mutacjami w obrębie genów *APC*, *MUTYH*. Zwiększone ryzyko zachorowania na raka jelita grubego występuje również w przebiegu odmian FAP, takich jak zespół: Gardnera i Turcota, w zespołach Peutz-Jeghersa (mutacje genu *LKB1/STK11*), Cowdena (mutacje genu *PTEN*), oraz polipowatości młodzieńczej (mutacje genów *SMAD4*, *BMPR1A*), jak również w przebiegu atenuowanej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego oraz zespołu płaskiego gruczolaka [3]. Pojawiające się wyniki badań sugerują inne potencjalne czynniki wpływające na zwiększone ryzyko zachorowania na raka jelita grubego. Przykładem mogą być badania sugerujące, że zakażenie *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium spp.* i innymi potencjalnymi czynnikami zakaźnymi może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem raka jelita grubego [12–14].

Do uznanych czynników prewencyjnych raka jelita grubego należy aktywność fizyczna [15], stosowanie hormonalnej terapii zastępczej [16], aspiryny [17,18] oraz endoskopia z usunięciem zmian przedrakowych [19,20] (Tabela 1). Niektóre, nie do końca

jednoznaczne dane sugerują działanie ochronne diet bogatych w owoce, warzywa, błonnik zbożowy i produkty pełnoziarniste [21,22], mleczne [23] lub ryby [24] i ewentualnie statyny [25].

Tabela 1 . Czynniki ryzyka raka jelita grubego [4].

	Ryzyko
Czynniki socjodemograficzne	
Starszy wiek	↑↑↑
Płeć męska	↑↑
Czynniki medyczne	
Historia rodzinna	↑↑↑
Zapalna choroba jelit	↑↑
Cukrzyca	↑
Zakażenie <i>Helicobacter pylori</i>	(↑)
Inne infekcje	(↑)
Endoskopia jelita grubego	↓↓
Hormonalna terapia zastępcza	↓
Aspiryna	↓
Statyny	(↓)
Czynniki stylu życia	
Palenie	↑
Nadmierne spożycie alkoholu	↑
Otyłość	↑
Aktywność fizyczna	↓
Czynniki dietetyczne	
Wysokie spożycie mięsa czerwonego i przetworzonego	↑
Owoce i warzywa	(↓)
Błonnik zbożowy i produkty pełnoziarniste	(↓)
Ryby	(↓)
Nabiał	(↓)

↑↑↑=bardzo silny wzrost ryzyka, ↑↑=silny wzrost ryzyka, ↑=umiarkowany wzrost ryzyka, ↓↓=silna redukcja ryzyka, ↓=umiarkowana redukcja ryzyka. Nawiasy pokazują prawdopodobne, ale nie w pełni ugruntowane asocjacje.

2.3. Patogeneza molekularna i struktura histopatologiczna raka jelita grubego

W patogenezie raka jelita grubego wyróżnia się 3 główne szlaki związane z niestabilnością genomową: niestabilność chromosomową (CIN) obserwowaną nawet w 70% przypadków raka jelita grubego [26], niestabilność mikrosatelitarną (MSI), która jest wykrywana w około 15% wszystkich przypadków raka jelita grubego (3% przypadków związanych z występowaniem zespołu Lyncha, 12% powodowanych sporadyczną hipermetylacją promotora genu *MLH1*) [27–29] oraz fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP) [30,31].

Zaproponowany przez Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (ang. *The American Joint Committee on Cancer – AJCC*) międzynarodowy system klasyfikacji nowotworów złośliwych TNM (ang. *tumor node and metastasis*) jest jednym z kluczowych parametrów klinicznych w odniesieniu do prognozowania progresji choroby oraz określającym odpowiednie postępowanie terapeutyczne. Jako klasyfikatory wykorzystuje on: charakterystykę guza pierwotnego (T) – w szczególności jego rozmiar oraz fakt naciekania okolicznych tkanek; przerzuty do węzłów chłonnych (N) oraz przerzuty do narządów odległych (M). W zależności od wielkości guza pierwotnego wyróżnia się 4 stopnie jego rozwoju (T1–T4). Guzy o charakterze nieinwazyjnym, nieprzekraczające granicy tkanki danego narządu określane są jako raki *in situ* (Tis). W przypadku braku możliwości oceny ogniska pierwotnego klasyfikowane są jako Tx, a w przypadku braku dowodów na istnienie guza pierwotnego – jako T0.

W odniesieniu do oceny występowania przerzutów w węzłach chłonnych wyróżnia się następujące kategorie:

- N1–N3: przerzuty obecne w coraz odleglejszych węzłach chłonnych,
- N0: brak przerzutów w węzłach chłonnych,
- Nx: brak możliwości oceny przerzutów w węzłach chłonnych.

Odnośnie przerzutów do narządów odległych wyróżnia się następujące klasyfikatory

- M1: obecność przerzutów odległych,
- M0: brak przerzutów odległych,
- Mx: brak możliwości oceny obecności przerzutów odległych.

W praktyce klinicznej na podstawie klasyfikatorów TNM określany jest jeden z 4 stopni zaawansowania klinicznego nowotworu (ang. *stage*). Ogólna charakterystyka poszczególnych stopni zaawansowania kształtuje się następująco [32–34]:

- stopień I: występowanie guza ograniczone do organu pierwotnego, bez cech rozsiewu w odniesieniu do węzłów chłonnych i naczyń krwionośnych,
- stopień II: lokalne rozprzestrzenianie się guza do otaczających tkanek oraz najbliższych węzłów chłonnych,
- stopień III: rozległy guz pierwotny z cechami naciekania do głębszych struktur tkankowych oraz do dalszych węzłów chłonnych,
- stopień IV: zmiany o charakterze mocno zaawansowanym z cechami przerzutów odległych.

Ze względu na stopień złośliwości histologicznej wyróżnia się 3 stopnie zróżnicowania (ang. *grading*) raków [32,35]:

- G1: najbardziej zróżnicowane (najlepiej rokujące),
- G2: średnio zróżnicowane,
- G3: najmniej zróżnicowane (najgorzej rokujące),
- Gx: brak możliwości oceny stopnia złośliwości histologicznej.

Przeważającą większość raków jelita grubego stanowią gruczolakoraki (*adenocarcinoma*) wywodzące się z komórek nabłonka błony śluzowej. Stanowią one około 90% wszystkich przypadków zdiagnozowanych raków. Wśród gruczolakoraków jelita grubego można wyróżnić: gruczolakoraka śluzowego (*mucinous adenocarcinoma*) oraz gruczolakoraka z komórkami sygnetowatymi (*signet ring cell adenocarcinoma*).

W przypadku gruczolakoraka śluzowego, ponad 50% jego objętości stanowią mucyny zlokalizowane w dużych, gruczołowatych strukturach. Większość gruczolakoraków śluzowych występuje u pacjentów z HNPCC, charakteryzuje się wysoką niestabilnością mikrosatelitarną (MSI-H) oraz oceniana jest jako raki wysokozróżnicowane i lepiej rokujące, w odróżnieniu od gruczolakoraków śluzowych, stabilnych mikrosatelitarnie (MSS), które na ogół są bardziej agresywne.

Do gruczolakoraków z komórkami sygnetowatymi zalicza się te, u których więcej niż 50% komórek stanowią komórki posiadające wyraźne wewnątrzcytoplazmatyczne struktury zawierające mucyny, które poprzez wypychanie jądra komórkowego na obwód komórek nadają im charakterystyczny kształt. Gruczolakoraki z komórkami sygnetowatymi charakteryzują się

wysokim stopniem złośliwości histologicznej i zazwyczaj oznaczają gorsze rokowanie w porównaniu do typowych gruczolakoraków. Wyjątek stanowią gruczolakoraki z komórkami sygnetowatymi charakteryzujące się wysoką niestabilnością mikrosatelitarną, które lepiej rokują [33].

Pozostałymi, rzadziej występującymi typami raka jelita grubego są: raki gruczołowo-płaskonabłonkowe (*adenosquamous carcinoma*), raki wrzecionowatokomórkowe (*spindle cell carcinoma*), raki płaskonabłonkowe (*squamous cell carcinoma*), raki neuroendokrynne (*neuroendocrine neoplasms*) oraz raki niezróżnicowane (*undifferentiated carcinoma*) [33,35].

2.4. Metody diagnostyki raka jelita grubego.

Ze względu na specyfikę raka jelita grubego polegającą na stosunkowo długim rozwoju klinicznym choroby oraz fakt, że pełnoobjawowe przypadki są zazwyczaj zaawansowane klinicznie, wczesna diagnostyka wymieniana jest jako jeden z głównych sposobów osiągnięcia dobrych wyników leczenia [36]. Badania przesiewowe w kierunku wczesnego wykrywania raka jelita grubego można podzielić na inwazyjne oraz nieinwazyjne.

2.4.1. Inwazyjne metody wykrywania raka jelita grubego.

Do inwazyjnych metod wczesnej diagnostyki raka jelita grubego należą: kolonoskopia, sigmoidoskopia oraz kolonografia oparta na tomografii komputerowej.

Skuteczność wykrywania raka jelita grubego z zastosowaniem kolonoskopii przekracza 95% [37–43]. U osób pochodzących z rodzin z HNPCC zaleca się wykonywanie kolonoskopii co 1–2 lata poczynając od 20–25 r.ż. W rodzinach, w których rak jelita grubego wystąpił w młodszym wieku, kolonoskopię należy rozpocząć wykonywać o 5 lat wcześniej od wieku najmłodszej osoby z rakiem jelita grubego [44].

Wykonywanie kolonoskopii w 10–letnich odstępach czasu po ukończeniu 50 roku życia pozwala na wykrycie ~70% raków w niskim stopniu zaawansowania klinicznego co wiąże się z około 30% redukcją śmiertelności z powodu raka jelita grubego. Realizacja programu kolonoskopowego w rodzinach z HNPCC powoduje blisko 100% redukcję zgonów

spowodowanych rakiem jelita grubego [38,45,46]. Do jednej z głównych zalet kolonoskopii należy zaliczyć możliwość usunięcia zmian przedrakowych lub małych zmian wskazujących na obecność ognisk rakowych już w momencie ich zidentyfikowania. Metoda ta umożliwia dostęp diagnostyczny zarówno do proksymalnej jak i dystalnej części jelita grubego [37]. Do niewątpliwych wad metody należy jej inwazyjność. Pacjent wymaga wcześniejszego przygotowania do badania poprzez zmianę diety, użycie środków przeczyszczających a niekiedy uspokajających. Dodatkowo istnieje ryzyko perforacji jelita w trakcie badania, wystąpienia krwawienia po wykonaniu badania, zwłaszcza jeżeli w jego trakcie wykonywano usunięcie wykrytych polipów [47].

Sigmoidoskopia, wykonywana po ukończeniu 50 roku życia wykrywa ponad 95% raków jelita grubego, jednak jedynie końcowego odcinka jelita grubego [37]. Badania wykazały około 60% spadek śmiertelności z powodu raka jelita grubego zlokalizowanego w końcowym odcinku jelita grubego dzięki przeprowadzaniu badań przesiewowych opartych o sigmoidoskopię [48]. Podobnie jak w przypadku kolonoskopii, zaletami sigmoidoskopii są możliwości zidentyfikowania zmian o charakterze przedrakowym, wczesnych ognisk rakowych oraz możliwość usunięcia zmian w momencie ich wykrycia. Dyskomfort związany z sigmoidoskopią jest porównywany do kolonoskopii przeprowadzanej w znieczuleniu [47,49].

Kolonografia to metoda diagnostyczna oparta na tomografii komputerowej, polegająca na radiologicznej wizualizacji jelita grubego. W porównaniu do kolonoskopii i sigmoidoskopii jest klasyfikowana jako metoda półinwazyjna [50]. Niesie za sobą niższe ryzyko powikłań [51] oraz jest lepiej tolerowana przez pacjentów [52]. Metoda ta umożliwia stworzenie trójwymiarowego obrazu struktury jelita grubego umożliwiającego wykrycie ognisk mogących sugerować zmiany nowotworowe, które mogą być następnie potwierdzone za pomocą tradycyjnej kolonoskopii [53]. Czułość kolonografii opartej na tomografii komputerowej w wykrywaniu raka jelita grubego przekracza 90% w przypadku polipów o rozmiarach $\geq 10\text{mm}$ oraz 78% w przypadku polipów o rozmiarach $\geq 6\text{mm}$ [54]. Do wad metody należy wymienić kumulujące się koszty wykonania badania w przypadku konieczności wykonania dodatkowej kolonoskopii w następstwie kolonografii, narażenie pacjenta na promieniowanie, które nie występuje w przypadku kolonoskopii i sigmoidoskopii [55], a także fakt, że wynik badania często zależy od interpretacji radiologów opisujących dane badanie [37].

2.4.2. Nieinwazyjne metody wykrywania raka jelita grubego – markery.

Testy przesiewowe raka jelita grubego, które wykorzystują nieinwazyjnie wykrywalne markery są przedmiotem badań od wielu lat. Niektóre z takich markerów są stosowane w diagnostyce raka jelita grubego, często jako uzupełnienie metod inwazyjnych, z kolei inne markery o potencjale diagnostycznym są nadal badane. Do nieinwazyjnych metod związanych z wczesną diagnostyką raka jelita grubego należą: test wykrywający hemoglobinę w kale (FOBT), immunochemiczny test wykrywający hemoglobinę w kale (FIT), liczne testy umożliwiające wykrycie we krwi/osoczu/surowicy charakterystycznych dla raka białek, zmiany w DNA, mikroRNA, analizy charakterystycznych metabolitów endogennych, w tym lotnych związków organicznych, analizy struktury mikrobiomu jelitowego, płytek krwi, a także analizy rejestrów danych medycznych oparte o techniki uczenia maszynowego oceniające wyniki morfologii krwi (algorytm ColonFlag) [36,56–60].

Z historycznego punktu widzenia jednym z najpopularniejszych testów umożliwiających wykrycie białek charakterystycznych dla obecności raka jelita grubego jest test FOBT, który był wykorzystywany przez dekady ze względu na prostotę oraz stosunkowo niskie koszty wykonania. Test FOBT umożliwia wykrycie hemoglobiny w analizowanej próbce, przy czym nie jest on swoisty dla ludzkiej krwi w przeciwieństwie do testu FIT, który wykorzystuje specyficzne przeciwciała umożliwiające wykrycie hemoglobiny ludzkiej w badanej próbce [61]. W związku z tym jest on coraz częściej zastępowany testem FIT [62]. W odniesieniu do kolonoskopii, test FOBT charakteryzuje się czułością wykrywania raka jelita grubego oraz zmian przedrakowych na poziomie odpowiednio 33%–75% oraz 11%–25%, podczas gdy wykazana czułość testu FIT wynosi odpowiednio 71%–75% w przypadku raka jelita grubego oraz 27%–29% w przypadku wykrywania gruczolaków. Specyficzność testów FOBT (Hemoccult® II) oraz FIT (HemeSelect™) przekracza odpowiednio 98% oraz 94% [62–66]. Do zalet testów FOBT oraz FIT należy niewątpliwie ich nieinwazyjny charakter. Wykonanie testu nie wymaga uciążliwego dla pacjenta wcześniejszego przygotowania, samo badanie nie powoduje również dyskomfortu jak w przypadku kolonoskopii czy sigmoidoskopii. Mimo zalet, testy FOBT oraz FIT mają dość wysoką tendencję wykazywania wyników fałszywie negatywnych [47,49].

Przeprowadzono liczne badania na temat możliwości wykrywania białek związanych z obecnością raka jelita grubego w próbkach krwi, osocza oraz surowicy. Wskazywanych jest wiele potencjalnych markerów mogących wykryć obecność raka tego narządu na podstawie dostarczonej próbki, jednak wiele z nich charakteryzuje się stosunkowo

niską czułością lub specyficznością [36]. Wśród białek przydatnych w diagnostyce raka jelita grubego, jednocześnie możliwych do wykrycia w surowicy zalicza się białka: *CA11-19* (czułość: 98%; specyficzność: 84%) [67], *Cyr61* (czułość: 83%; specyficzność: 97%) [68], integrynę *B6* (czułość: ~70%; specyficzność: ~100%) [69] oraz *TFF3* (czułość ~74%; specyficzność: ~95%) [68].

Kolejnym obszarem zainteresowania dotyczącym, wczesnej diagnostyki raka jelita grubego są markery oparte o analizę DNA i mRNA. Mutacje genów, zwłaszcza *K-RAS* i *APC* były pierwszymi markerami DNA powiązanymi z rakiem jelita grubego i ocenionymi w celu opracowania nowych nieinwazyjnych metod wczesnego wykrywania i badań przesiewowych raka jelita grubego [36]. Jednak w wyniku prac oceniających wykorzystanie tylko mutacji jako markerów diagnostycznych, okazało się, że stosowanie testów DNA nie zapewnia możliwości uzyskania zadowalającego poziomu czułości diagnostycznej. Jedno z amerykańskich badań przeprowadzone w grupie złożonej z pacjentów objętych przesiewową kolonoskopią i obejmującego panel 21 zmian w DNA (między innymi: mutacje punktowe w genach *K-RAS*, *APC* i *TP53*, a także marker niestabilności mikrosatelitarnej *BAT-26*, wykazało, że czułość diagnostyczna panelu nieznacznie przekraczała 50% [70]. Relatywnie niskie poziomy czułości testów diagnostycznych opartych o analizę mutacji DNA, spowodowały przekierowanie uwagi badaczy na poszukiwanie zmian epigenetycznych, mogących wykazywać istotny związek z występowaniem raka jelita grubego. Wykazano, że analiza poziomu metylacji wybranych genów: *BMP3*, *NDGR4*, *SEPT9*, *SFRP2*, *SPG20*, *TFPI2* oraz *VIM* w próbkach kału, pozwala na uzyskanie czułości diagnostycznej od 50% do 92% oraz specyficzności na poziomie od 80% do 100% w odniesieniu do wykrywania przypadków raka jelita grubego [71–73]. Ze względu na problematyczność związaną z uzyskaniem powtarzalnych wyników wspomnianych analiz, podjęto próby skonstruowania paneli diagnostycznych odnoszących się do kilku wybranych genów. Połączenie analizy profilu metylacji genów: *BMP3* i *NRG4* oraz *SFRP2* i *VIM*, wydaje się zwiększać zarówno czułość, jak i swoistość wykrywania jelita grubego, jednak te doniesienia wymagają dalszej weryfikacji [71,74]. Pierwszym komercyjnym testem diagnostycznym specyficznym dla raka jelita grubego bazującym na analizie poziomu metylacji w genie *VIM* był test Colosure™ [75], który został zastąpiony bardziej wydajnym testem Cologuard®, opartym o analizę panelu różnych markerów: poziomu metylacji w genach *NDRG4* i *BMP3*, obecności mutacji w genie *K-RAS* oraz obecności hemoglobiny w próbkach stolca [76]. Ze względu na złożoną, wieloetapową procedurę przeprowadzania diagnostyki oraz stosunkowo wysokie koszty wynoszące około 600\$, test Cologuard® wydaje się interesującym uzupełnieniem testu FIT, jednak nie zastępuje go w powszechnie stosowanym schemacie postępowania związanym z wczesną diagnostyką raka jelita grubego [36].

Innym komercyjnie dostępnym testem diagnostycznym raka jelita grubego jest Epi proColon®. Test wykrywa krążące DNA guza, które jest uwalniane z komórek nowotworowych i opiera się o ocenę poziomu metylacji regionu promotorowego v2 genu *SEPT9* w osoczu. W przeprowadzonych badaniach czułość testu Epi proColon® w wykrywaniu raka jelita grubego wyniosła około 73% i nie była gorsza od czułości FIT wynoszącej 71-75%. Jednak swoistość Epi proColon® była niższa niż FIT (82% w porównaniu z 94%) [77].

Jednym z czynników regulujących poziom wielu procesów biologicznych, w tym ekspresji genów mogących wpływać na karcynogenezę, jest niekodujące RNA (ncRNA), a w szczególności mikroRNA [78,79]. Ponieważ mikroRNA jest związane z obecnością guzów jelita grubego, zasugerowano, że jego oznaczanie w próbkach kału może stanowić nową metodę diagnostyczną we wczesnym wykrywaniu i badaniach przesiewowych raka jelita grubego [80–83]. Wyniki badań opisujących analizę mikroRNA w próbkach kału są niejednoznaczne. Do tej pory, jednym z lepiej poznanych markerów mikroRNA w odniesieniu do wykrywania raka jelita grubego jest miR–21, jednak nie charakteryzuje się on zadowalającym poziomem czułości (od 56% do 86%) i specyficzności (od 73% do 81%) [80]. Markery miR–451 oraz miR–223 odznaczały się stosunkowo dobrymi poziomami czułości i specyficzności (odpowiednio: 88% i 100% w przypadku miR–451 oraz 77% i 96% w przypadku miR–223) w analizowanej grupie [84], jednak istnieją badania, w których przy wykorzystaniu paneli składających się z kilku markerów mikroRNA, poziomy czułości i specyficzności są niższe [80,85]. Wyniki czułości i specyficzności testów opartych o markery mikroRNA w przypadku, gdy badanym materiałem jest osocze lub surowica sprawiają trudności w jednoznacznej ocenie ich przydatności. Również w tym przypadku przeprowadzono wiele badań w odniesieniu do markera miR–21 (czułość markera miR–21 wynosiła od 65% do 91,4%, a swoistość od 74,4% do 95%) [80,86–88]. Panele diagnostyczne umożliwiające analizę kilku markerów mikroRNA charakteryzują się czułością i specyficznością przekraczającą 90% [89,90]. Złożoność procedur laboratoryjnych oraz konieczność starannej optymalizacji i standaryzacji uznawane są za największe niedogodności diagnostyki opartej o wykorzystanie analiz mikroRNA [91].

Kolejnym obszarem zainteresowania badaczy w kontekście wczesnej diagnostyki raka jelita grubego jest metabolomika. Ta dziedzina koncentruje się na ocenie szerokiego spektrum metabolitów wytwarzanych przez organizm. Część z nich można zaklasyfikować jako lotne związki organiczne, które są obecne w formie gazowej w wytwarzanych przez organizm substancjach, przez co mogą być potencjalnie wykorzystywane w diagnostyce różnych chorób, w tym raka jelita grubego [92]. Mając na uwadze specyfikę zapachową lotnych związków organicznych, podjęto próby skonstruowania paneli umożliwiających ich analizę

(opracowanie tzw. „elektronicznego nosa”) opartą o chromatografię gazową czy spektrometrię mas, które uważane są za złoty standard w kontekście analiz metabolitów związanych z występowaniem raka jelita grubego [92,93]. Mimo stosunkowo wysokiej czułości i specyficzności takich analiz, nierzadko przekraczających 90%, wysoki koszt wykonania badań oraz złożoność techniczna pomiarów wykorzystujących kombinacje technik chromatografii gazowej, spektrometrii mas etc., są głównymi przeszkodami we ich wdrożeniu w rutynowej diagnostyce raka jelita grubego [36].

Charakterystyka budowy końcowego odcinka przewodu pokarmowego, polegająca na występowaniu stałych interakcji pomiędzy tkankami jelita a florą mikrobiologiczną powoduje, że potencjalna rola mikroorganizmów w karcynogenezie raka jelita grubego wydaje się najbardziej oczywista spośród wszystkich chorób nowotworowych. Badania wskazujące na istotną rolę struktury mikrobiomu jelit w procesach zapalnych mogących prowadzić do przerwania ciągłości tkanek oraz ich potencjalne działanie genotoksyczne mogące przyspieszać procesy transformacji nowotworowej kierują uwagę badaczy na aspekt związany z analizą mikrobiomu jelitowego i jego ewentualnym wpływem na występowanie raka jelita grubego [94–96]. W proponowanych nieinwazyjnych panelach diagnostycznych raka jelita grubego wykorzystujących analizę mikrobiomu jelit, niezwykle często wskazywana jest istotna rola obecności bakterii *Fusobacterium nucleatum*, która opisywana jest jako czynnik przyczyniający się do występowania między innymi choroby zapalnej jelit czy samego raka [94,96,97]. Z uwagi na obiecujące wyniki dotychczasowych badań, możliwość wykorzystania analiz mikrobiomu jelit, wydaje się interesującym uzupełnieniem powszechnie obowiązujących metod diagnostyki raka jelita grubego, jednak ze względu na swoją specyfikę wymaga dalszych badań weryfikujących wyniki prezentowanych badań oraz ewentualne opracowanie ustandaryzowanych paneli diagnostycznych [36].

Istnieją badania wskazujące na istotny związek pomiędzy wysoką liczbą płytek krwi (trombocytozą) a występowaniem raków [98–100]. Badania przeprowadzone przez Giannakeasa m.in. na populacji kanadyjskiej wskazują na związek pomiędzy trombocytozą a ryzykiem wystąpienia raków: jajnika, żołądka, jelita grubego, płuc, nerek oraz przełyku w okresie co najmniej dwóch lat od momentu wykonania analizy morfologii krwi [60]. W przypadku raka jelita grubego, ryzyko względne wystąpienia raka w okresie 2 lat od momentu wykonania analizy morfologii krwi było ponad pięciokrotnie wyższe (RR: 5,41; 95% CI: 4,80–6,10) u pacjentów z trombocytozą w porównaniu do osób charakteryzujących się liczbą płytek krwi pozostającym w zakresach uznawanych za zgodne z normą [60]. Przytoczone badanie posiada ograniczenie: zgromadzone dane oraz struktura przeprowadzonego eksperymentu sugerują, że proces nowotworowy u osób z trombocytozą,

mógł być obecny już w momencie wykonywania analiz morfologii krwi. W związku z powyższym nie jest jasne czy podwyższone miano płytek krwi powoduje występowanie raka lub jego szybszy rozwój, czy jest ono spowodowane już toczącym się procesem nowotworowym. Jednak potencjalnie, nadpłytkowość może okazać się przydatnym markerem diagnostycznym raka jelita grubego. Opisywane badanie wskazuje że osoby z nadpłytkowością o niewyjaśnionej etiologii powinny być poddane badaniom przesiewowym w kierunku wczesnej diagnostyki nowotworowej.

W związku z rozwojem narzędzi opartych o algorytmy uczenia maszynowego, podjęto próby przeprowadzenia analiz danych pochodzących z rejestrów danych medycznych, obejmujących wyniki morfologii krwi w celu typowania pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia w jelicie grubym zmian o charakterze przedrakowym a także raków [57,58,101,102]. Jednym z narzędzi umożliwiającym wykonanie wspomnianych analiz jest algorytm ColonFlag, wykorzystujący informacje o wieku i płci pacjentów oraz parametry morfologiczne dotyczące: hemoglobiny (HGB), liczby erytrocytów (RBC), hematokrytu (HCT), średniej objętości erytrocytów (MCV), średniej zawartości hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCH) oraz średniego stężenia hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCHC), do generowania wyników w formie końcowej punktacji (score) w zakresie od 0 do 100. Wspominane parametry są niezbędnymi danymi do prawidłowego funkcjonowania algorytmu ColonFlag. W przypadku braku którejkolwiek z wymienionych składowych badania morfologicznego, algorytm uzupełnia brakujące dane o wartości specyficzne dla wieku i płci danego pacjenta. Dodatkowe składowe badań morfologicznych zwiększają sprawność działania metody aczkolwiek nie są niezbędne do jej wykonania. Z analiz wykonanych przez Hilsdena i in. wynika że algorytm ColonFlag jest w stanie wykryć zmiany przedrakowe, takie jak zaawansowane polipy gruczolakowate. Wyniki tych badań sugerują, że skuteczność algorytmu ColonFlag była niższa u pacjentów z wcześniej występującymi zmianami polipowatymi w obrębie jelita grubego. Czułość analizowanego algorytmu w porównaniu z powszechnie wykorzystywanymi testami umożliwiającymi wykrywanie raków jelita grubego (kolonoskopia, FIT) jest niska, w związku z czym nie powinien być on rozpatrywany jako narzędzie zamiennie z nimi stosowane, a raczej jako dodatkowe narzędzie identyfikujące osoby z podwyższonym ryzykiem wystąpienia zmian przedrakowych, czy samych raków jelita grubego wśród pacjentów, którzy nie byli poddani testowi FIT, czy kolonoskopii. Jednocześnie sugeruje się, że takie osoby powinny być kierowane na standardowe badania przesiewowe w kierunku diagnostyki występowania raka jelita grubego [59].

2.5. Stężenie wybranych pierwiastków w organizmie jako markery występowania raków.

Pomimo identyfikacji coraz to nowych markerów o potencjale wczesnego wykrywania raka jelita grubego, zidentyfikowanie osób zagrożonych chorobą w grupie osób bez historii rodzinnej lub zidentyfikowanego markera genetycznego nadal pozostaje wyzwaniem. Z tego też powodu podejmowane są kolejne badania nad próbami identyfikacji takich markerów. Istnieją dwie główne metody badania związku między markerami a występowaniem raków. Pierwsza z nich, opiera się na obserwacji prospektywnej kohorty, gdy osoby początkowo nie są dotknięte chorobą. W ten sposób badamy czynniki ryzyka raka. Druga metoda, opierająca się o model „case-control”, bada występowanie raka. Chociaż projekt badania „case-control” ma ograniczenia, ponieważ nie wyklucza wpływu samego nowotworu na oznaczane parametry biochemiczne, ten rodzaj badania jest bardzo przydatny do identyfikacji markerów wczesnego wykrywania raka.

2.5.1. Stężenie selenu w organizmie jako marker występowania stanów przedrakowych i raka jelita grubego.

Uważa się, że największy wpływ na inicjację i rozwój raków ma interakcja różnych czynników ryzyka, powodująca kumulację wielu zmian genetycznych/epigenetycznych/metabolicznych w obrębie komórki [103–108]. Wśród czynników mogących w sposób istotny wpływać na występowanie nowotworów wymieniany jest nadmiar/niedobór wybranych mikroelementów [109–112].

Dla przykładu, polsko-estońskie badanie przeprowadzone w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie wykazało, że u pacjentów z niskim stężeniem selenu (Se) w surowicy ($<40\mu\text{g/L}$) w porównaniu do pacjentów charakteryzujących się wysokim stężeniem selenu w surowicy ($>72\mu\text{g/L}$) prawdopodobieństwo występowania raka jelita grubego było podwyższone ponad 13-krotnie [113]. Istniejące wyniki badań, generalnie potwierdzają odwrotną korelację pomiędzy stężeniem selenu w organizmie a występowaniem zarówno raka jelita grubego, jak i zmian przedrakowych. W amerykańskim badaniu obejmującym 451 osób poddanych kolonoskopii, w którym 69% uczestników miało stężenie selenu w organizmie $<140\mu\text{g/L}$, a 31% $>140\mu\text{g/L}$, sugerowano zmniejszoną częstość występowania gruczolaków jelita grubego

przy wyższych poziomach selenu (tzw. „*prevalence ratio*”, PR: 0.6) [114]. W innym badaniu pochodzącym z USA stwierdzono, że u pacjentów ze stężeniem selenu na czczo poniżej 128µg/L, znacznie częściej występował jeden lub więcej polipów gruczolakowatych (OR: 4,2) [115]. Związek pomiędzy stężeniem selenu a występowaniem gruczolaków jelita grubego o dużych rozmiarach na obszarze geograficznym o niskim stężeniu selenu został opisany również przez grupę z Hiszpanii [116]. W badaniu tym stwierdzono istotną, odwrotną zależność pomiędzy stężeniem selenu w surowicy a rozpoznaniem polipów gruczolakowatych dużych rozmiarów. Osoby z wyższym stężeniem selenu w surowicy krwi ($\geq 82,11\mu\text{g/L}$) miały mniejsze prawdopodobieństwo znalezienia się w grupie z gruczolakiem niż osoby o niższym stężeniu selenu ($< 82,11\mu\text{g/L}$, OR: 0,17; 95% CI: 0,03–0,84) [116].

Kilka badań dostarczyło dowodów na wpływ obniżonego stężenia selenu w organizmie na wzrost prawdopodobieństwa występowania raków jelita grubego. W badaniu z Kanady przeprowadzonym na 1048 przypadkach (402 raki jelita grubego) stwierdzono statystycznie istotną, odwrotną asocjację pomiędzy stężeniem selenu oznaczonym w paznokciach stóp a występowaniem raka okrężnicy dla obu płci łącznie (OR: 0,42; 95% CI: 0,19–0,93; $p=0,009$) i kobiet ($p=0,050$) [117]. Kilka badań z Azji również potwierdziło związek pomiędzy stężeniem selenu a występowaniem raka jelita grubego. Przykładem mogą być badania ośrodków chińskich i japońskich. W badaniu przeprowadzonym przez Zhao i in. we krwi chorych na raka jelita grubego zaobserwowano istotnie niższe wartości selenu niż u osób zdrowych [118]. Nomura i in. wykazali wzrost względnego ryzyka dla okrężnicy u osób z najniższej ćwiartki stężenia selenu w surowicy w porównaniu z ryzykiem względnym dla osób z najwyższej ćwiartki stężenia selenu (RR: 1,8) [119].

Również wcześniejsze małe badania (19 osób z rakiem żołądka, 25 osób z rakiem jelita grubego, 25 osób grupy kontrolnej) przeprowadzone w Polsce na Górnym Śląsku wykazały, że stężenie selenu w osoczu u chorych na raka przewodu pokarmowego ($37,0\pm 11,05\text{ng Se/ml}$ lub $38,4\pm 12,6\text{ng Se/ml}$ odpowiednio u pacjentów z rakiem żołądka lub okrężnicy) było istotnie niższe w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną w tym samym wieku ($51,4\pm 14,4\text{ng Se/ml}$) [120].

Wyniki niektórych badań nie potwierdzają asocjacji pomiędzy stężeniem selenu w organizmie a występowaniem raka jelita grubego. W badaniu przeprowadzonym przez Takata i in. nie zaobserwowano korelacji między stężeniem selenu w surowicy i występowaniem raka jelita grubego wśród kobiet po menopauzie rekrutowanych z 40 ośrodków klinicznych w Stanach Zjednoczonych [121]. Związek pomiędzy stężeniem selenu oznaczanym w paznokciach a występowaniem raka jelita grubego nie został zaobserwowany również w badaniu holenderskim [122].

Przedstawione powyżej wyniki badań nad selenem jako markerem wykrywania raka jelita grubego skłoniły nas do analogicznych badań nad innymi pierwiastkami.

2.5.2. Stężenie arsenu w organizmie a występowanie raków.

Innym mikroelementem, który opisywany jest jako istotnie związany z występowaniem nowotworów jest arsen (As) [123–127]. Dotychczas wiele badań retrospektywnych wskazywało na związek pomiędzy wyższym stężeniem arsenu w organizmie a występowaniem nowotworów o różnej lokalizacji, w tym raków piersi, prostaty, płuca, przełyku, jamy ustnej, pęcherza moczowego, raka skóry [123–127]. Jednak w żadnym z tych doniesień nie analizowano związku pomiędzy stężeniem arsenu w organizmie a występowaniem raka jelita grubego. Niedawno opublikowane wyniki badania amerykańskiego wskazują na związek pomiędzy najwyższym kwartylem ekspozycji w porównaniu z najniższym zagregowanym, skumulowanym stężeniem arsenu oznaczanym w wodzie pitnej a występowaniem raków, w tym raka jelita grubego (RR: 1,64) [128].

2.5.3. Stężenie miedzi w organizmie jako marker występowania raka jelita grubego.

Jednym z podstawowych mikroskładników odżywczych jest miedź (Cu). Pierwiastek ten jest niezbędny jako kofaktor katalityczny lub jako składnik strukturalny białek i odgrywa rolę w krytycznych funkcjach biologicznych, takich jak aktywność enzymatyczna, transport tlenu i sygnalizacja komórkowa. Miedź jest wysoce aktywna w reakcjach utleniania i redukcji – łatwo oddaje i przyjmuje elektrony do przejścia pomiędzy dwoma stanami walencyjnymi ($\text{Cu}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}$). Od tej aktywności zależy wiele krytycznych enzymów, stąd miedź odgrywa ważną rolę w wielu reakcjach biologicznych [129]. Miedź katalizuje produkcję wolnych rodników, które mogą uszkadzać lipidy, białka, DNA i inne biomolekuły [113,114]. Miedź odgrywa również rolę w angiogenezie, warunkującej wzrost guza, w którym mogą pośredniczyć zależne od miedzi oksydazy aminowe [130]. W kilku badaniach stwierdzono wysokie stężenie miedzi w surowicy w wielu różnych nowotworach w tym w chłoniaku, mięsaku z komórek siateczki, nowotworach krtani, rakach szyjki macicy, piersi, trzustki, żołądka i płuc [112,131,132]. Kilka wcześniejszych badań oceniło związek

pomiędzy stężeniem miedzi w organizmie a rakiem jelita grubego. W badaniach tych oceniano miedź jako czynnik ryzyka (badania prospektywne – Tabela 2) jak również jako marker występowania raka (badania „*case-control*” – Tabela 3).

Tabela 2. Badania prospektywne dotyczące związku pomiędzy stężeniem miedzi w organizmie a rakiem jelita grubego.

Kraj	<i>n</i>	Liczba chorych (<i>n</i>)	Liczba zdrowych (<i>n</i>)	Materiał	Czas pobrania próbek	Średni poziom Cu		OR	<i>p</i>	Piśmiennictwo
						Osoby z rakiem jelita grubego	Osoby zdrowe			
10 krajów europejskich (Dania, Francja, Niemcy, Grecja, Włochy, Holandia, Norwegia, Hiszpania, Szwecja, Wielka Brytania)	1932	966	966	surowica	3,8 lat (średnia 2,1) przed rozpoznaniem raka jelita grubego	1,39mg/L	1,36mg/L	1,50	0,02	Stępień, EPIC 2017 [133]
USA	4663	24	4639	surowica	do 2 lat przed diagnozą	1,24mg/L	1,19mg/L	1.71	0,429	Zhang, NHANES 2021 [134]

Tabela 3. Badania „case-control” dotyczące związku pomiędzy stężeniem miedzi a występowaniem raka jelita grubego.

Kraj	n	Liczba chorych (n)	Liczba zdrowych (n)	Materiał	Czas pobrania próbek	Średnie stężenie Cu		p	Piśmiennictwo
						Osoby z rakiem jelita grubego	Osoby zdrowe		
Iran	80	40	40	krw	podczas diagnozy	0,82mg/L	0,61mg/L	0,03	Ranjbary 2020 [135]
Brazylia	74	46	28	osocze	podczas diagnozy	1,2mg/L	1,06mg/L	<0,01	Ribeiro 2016 [136]
Indie	60	30	30	surowica	podczas diagnozy	1,66mg/L	0,99mg/L	<0,001	Gupta 1993 [137]
Irak	120	90	30	surowica	podczas diagnozy	0,47mg/L	0,80mg/L	<0,001	Al–Ansari 2020 [138]
Republika Czeska	24	17	7	surowica	podczas diagnozy	0,95mg/L	1,21mg/L	0,899	Milde 2001 [139]

W największym badaniu prospektywnym (badanie EPIC) w badanej kohorcie zidentyfikowano 966 przypadków zachorowań na raka jelita grubego. Zostały one sparowane z 966 zdrowymi osobami stanowiącymi grupę kontrolną. Krew pobierano do sześciu lat przed diagnozą raka jelita grubego. Wśród osób, u których rozwinął się rak jelita grubego w ciągu dwóch lat od pobrania krwi, iloraz szans dla stężenia miedzi w najwyższym kwintylu w porównaniu z najniższym kwintylem wyniósł 4,00 (95% CI: 1,74–9,16). Wśród osób, u których rozwinął się rak jelita grubego ponad dwa lata po pobraniu krwi, iloraz szans dla stężenia miedzi w najwyższym kwintylu w porównaniu z najniższym wyniósł 1,04 (95% CI: 0,69–1,56) [133]. Dane te sugerują, że podwyższony poziom miedzi w surowicy jest raczej markerem obecności istniejącego raka jelita grubego, a nie czynnikiem ryzyka rozwoju raka.

W drugim badaniu prospektywnym, NHANES, zaobserwowano związek pomiędzy wyższym stężeniem miedzi w surowicy a zwiększonym ryzykiem raka jelita grubego (OR: 1,71; 95% CI: 0,37–7,88), ale nie był to wynik statystycznie istotny ($p=0,4$) [134]. Jednak w badaniu NHANES wystąpiły jedynie 24 przypadki zachorowania na raka jelita grubego.

Istotny związek pomiędzy wysokim stężeniem miedzi w organizmie a występowaniem raka jelita grubego odnotowano w badaniach „*case-control*” pochodzących z Iranu, Brazylii oraz Indii, chociaż były one przeprowadzone na relatywnie niewielkich grupach uczestników (Tabela 3) [135–137]. Wyniki dwóch innych badań z Iraku i Czech są sprzeczne z powyższą obserwacją. Istotnie niższe ($<0,001$) stężenie miedzi w surowicy w grupach chorych na raka jelita grubego (0,47mg/L) zaobserwowano w retrospektywnym badaniu 90 chorych na raka tego narządu i 30 osób zdrowych (średnie stężenie miedzi w surowicy: 0,80mg/L) z Iraku [138]. W małym badaniu „*case-control*” z regionu Moraw w Czechach, przeprowadzonym na 17 pacjentach z rakiem jelita grubego i 7 osobach z grupy kontrolnej, wyższe (choć nieistotne statystycznie) stężenie miedzi w surowicy stwierdzono wśród osób z grupy kontrolnej (odpowiednio stężenie miedzi 0,95mg/L vs 1,21mg/L; $p=0,899$) [139].

Mechanizm(y) powodujący(e) wzrost stężenia miedzi we krwi/surowicy pacjentów z rakiem nie jest (są) znany(e). W mysim modelu raka stwierdzono, że występowaniu podwyższonego stężenia miedzi w surowicy towarzyszy spadek stężenia miedzi w wątrobie. Sugeruje to, że dystrybucja miedzi w organizmie, w której pośredniczy wątroba, może być zasadniczo zmieniona przez nowotwór [129,140]. Wciąż nie ma informacji na temat tego, czy transformacja komórek w nowotwór złośliwy może napędzać akumulację miedzi [129].

Dotychczasowe wyniki badań pochodzących z różnych populacji, uzasadniają przeprowadzenie badań „*case-control*” korelujących stężenia miedzi we krwi z występowaniem

raków jelita grubego w polskiej populacji. W badaniach prospektywnych przeprowadzonych w naszym Ośrodku wykazano, że ryzyko raków związane ze stężeniem arsenu i miedzi jest zależne od płci. Ponieważ markery ryzyka niejednokrotnie pokrywają się z markerami występowania raków, w niniejszej pracy oceniano również wyodrębnione podgrupy mężczyzn i kobiet.

2.6. Modyfikacje stężeń pierwiastków jako markerów występowania raka jelita grubego poprzez polimorfizmy w wybranych genach.

Według istniejącego stanu wiedzy, wydaje się, że określone stężenia niektórych pierwiastków śladowych są związane zarówno z ryzykiem jak i występowaniem nowotworów. Wykazano również, że polimorfizmy genetyczne mogą zmieniać funkcję i/lub poziom ekspresji ważnych genów, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie pierwiastków śladowych [141,142]. W niniejszej pracy postanowiono wykonać analizy polimorfizmów wybranych genów, o których wiadomo, że kodowane przez nie białka związane są z procesami: transformacji nowotworowej i/lub metabolizmem ksenobiotyków i/lub stresem oksydacyjnym.

W niniejszej pracy oceniono korelację pomiędzy występowaniem raka jelita grubego a stężeniami arsenu i miedzi we krwi oraz polimorfizmami czynnościowymi w wybranym panelu genów.

Na podstawie cech funkcjonalnych, założonej częstości genotypów oraz potencjalnego związku z występowaniem raka, do realizacji niniejszego projektu wybrano 10 polimorfizmów genów. Wyselekcjonowano następujące geny i polimorfizmy w ich obrębie: podrodzinę B kasety wiążącej ATP – *ABCB1* (rs2032582) [143,144], s-transferazę P1 glutationu – *GSTP1* (s1695) [145], gen naprawy poprzez wycięcia nukleotydów – *ERCC2* (rs13181): kodujący białko uczestniczące w eliminacji niektórych potencjalnie toksycznych ksenobiotyków oraz uczestniczące w naprawie DNA poprzez wycinanie nukleotydów [146], rentgenowskie białko uzupełniające krzyżową naprawę DNA 1 – *XRCC1* (rs1799782) [147,148], katalazę – *CAT* (rs1001179): kluczowy enzym antyoksydacyjny w obronie organizmu przed stresem oksydacyjnym, następnie peroksydazę-1 glutationu – *GPX1* (rs1050450), dysmutazę ponadtlenkową 2 – *SOD2* (rs4880) [149] i NAD(P)H dehydrogenazę chinonową 1 – *NQO1* (1800566) [150], które są enzymami stresu antyoksydacyjnego, regulowany koaktywator transkrypcji 3 – *CRTC3* (rs12915189), który odgrywa rolę w regulacji transkrypcji genów zależnych od CREB w sposób niezależny od fosforylacji [151],

metalotioneinę 1B – *MT1B* (rs7191779), która bierze udział w homeostazie metali i ochronie przed toksycznością metali ciężkich, uszkodzeniem DNA i stresem oksydacyjnym [152].

3. Cel pracy

Celem pracy była odpowiedź na pytanie:

Czy stężenie arsenu i/lub miedzi we krwi osobno lub w połączeniu z określonymi polimorfizmami genów może być wykorzystywane jako marker występowania raka jelita grubego?

4. Materiały i metody

Publikacja nr 1:

„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

Publikacja nr 2:

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

4.1. Grupa badana

W populacyjnym badaniu „*case-control*” wzięło udział 187 osób obu płci z rakiem jelita grubego potwierdzonym w badaniu histopatologicznym. Osoby zakwalifikowane do badania zdiagnozowane zostały w latach 2011–2017 w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1/2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską oraz na podstawie pozytywnej decyzji Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie z dnia 21 czerwca 2010 roku, nr decyzji: KB–0012/73/10. Wszyscy pacjenci włączeni do badania wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniach naukowych prowadzonych w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

oraz wypełnili ankietę zawierającą informacje odnośnie płci, wieku zachorowania, danych klinicznych, statusu palenia tytoniu oraz rodzinnej historii zachorowania na raki.

Od każdego z uczestników badania ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego, krótko po postawieniu diagnozy, została pobrana krew żylna do oznaczenia stężenia arsenu i miedzi oraz wykonania analiz DNA. Krew pobrano przed rozpoczęciem właściwego leczenia, tak aby zastosowana terapia nie zaburzała wyników oznaczeń stężenia arsenu i miedzi w organizmie. Pacjenci biorący udział w badaniu zostali poproszeni o pozostawanie na czczo przez sześć godzin przed pobraniem próbki krwi. Próbka krwi w objętości 10ml, została pobrana do certyfikowanej probówki dedykowanej do ilościowego oznaczania pierwiastków śladowych (Vacutainer® System, Tibe #368381, Becton, Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA) zawierających kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) a następnie była przechowywana w temperaturze -80°C do momentu wykonania pomiaru stężenia pierwiastków. Jednocześnie od pacjentów pobrana została próbka 10ml krwi do probówek zawierających 10% EDTA w celu izolacji DNA do wykonania genotypowania.

4.2. Grupa kontrolna

W badaniach dotyczących ustaleniu, czy stężenie arsenu we krwi może być markerem występowania raków jelita grubego, do 182 (97%, 78 kobiet i 104 mężczyzn) spośród 187 osób z rakiem jelita grubego włączonych do badania, przyporządkowano jedną, zdrową osobę będącą dla niej tzw. „sparowaną kontrolą”, dopasowaną pod względem płci, palenia tytoniu (tzw. paczkolata $\pm 20\%$), roku urodzenia (± 3 lata) oraz liczby nowotworów wśród krewnych pierwszego stopnia. Z kolei w badaniach dotyczących określenia asocjacji pomiędzy stężeniem miedzi we krwi a występowaniem raka jelita grubego, jedną, zdrową osobę grupy kontrolnej przyporządkowano, wg powyższych kryteriów, do każdej spośród 187 osób z rakiem jelita grubego włączonych do badania (100%, 83 kobiety i 104 mężczyzn).

Uczestnicy grupy kontrolnej zostali zakwalifikowani do badania w oparciu o dane rejestru należącego do Międzynarodowego Centrum Nowotworów Dziedzicznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Osoby te były uczestnikami przeprowadzonego przez niniejszy Ośrodek populacyjnego badania obejmującego 1,3 miliona mieszkańców Polski, którego celem było zidentyfikowanie rodzinnych agregacji nowotworów. Wszyscy uczestnicy grupy kontrolnej wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniach naukowych

oraz wypełnili ankiety zawierające informacje na temat wieku, płci, statusu palenia tytoniu oraz rodzinnej historii zachorowania na nowotwory złośliwe. Materiał biologiczny od uczestników tego rejestru został pobrany w latach 2012–2017.

4.3. Pomiar stężenia arsenu i miedzi

Do określenia stężenia arsenu i miedzi w próbkach krwi wykorzystano technikę spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP–MS). Do wykonania analiz użyto spektrometru Elan DRC–e (PerkinElmer, Concord, ON, Kanada). Oznaczenia stężenia arsenu zostały przeprowadzone w trybie DRC („*Dynamic Reaction Cell*”) z wykorzystaniem tlenu jako gazu reakcyjnego. Zastosowanie tlenu w komorze reakcyjnej pozwoliło na syntezę jonu $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$ o $m/z=91$ i tym samym uniknięcie poważnych interferencji spektralnych właściwych dla nominalnej masy izotopu arsenu $m/z=75$.

W dniu wykonywania analiz, zgromadzone próbki krwi zostały rozmrożone z temperatury -80°C do temperatury pokojowej a następnie zostały dokładnie wymieszane za pomocą worteksu. Próbki zostały rozcieńczone 30–krotnie w alkalicznym buforze. Odczynnik składał się z wody o wysokiej czystości ($>18\text{ M}\Omega$), TMAH (AlfaAesar, Kandel, Niemcy), Tritonu X–100 (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), n–butanolu (Merck, Darmstadt, Niemcy), rodu (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), złota (VWR, Steinheim, Niemcy) i EDTA (Sigma–Aldrich, Leuven, Belgia). Alkaliczne środowisko zapewnia dobrą rozpuszczalność składników krwi, nie dopuszczając do precypitacji żadnej z frakcji. Dodatkowo wprowadzony został niejonowy surfaktant Tryton T–100, który zapewnił lepszą dyspersję rozpuszczonych składników krwi, ułatwił rozpuszczanie białek oraz spowodował szybsze wypłukanie próbki z układu wprowadzenia spektrometru. Do uzyskania stabilności jonów metali rozpuszczonych w roztworze zastosowano dodatek kwasu wersenowego. Ze względu na specyfikę próbki przeznaczonej do pomiaru, zastosowany został dodatek butanolu, w celu niwelacji efektu związanego ze znaczną ilością węgla w badanej próbce.

Spektrometr kalibrowano przy użyciu zewnętrznej techniki kalibracji. Standardy kalibracyjne przygotowywano codziennie świeże, z $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Multi–Element Calibration Standard 3 (PerkinElmer Pure Plus, Shelton, CT, USA) przez rozcieńczenie ślepyim odczynnikiem do końcowego stężenia $0,033\mu\text{g/L}$; $0,066\mu\text{g/L}$; $0,099\mu\text{g/L}$; $0,2\mu\text{g/L}$; $0,5\mu\text{g/L}$; $1\mu\text{g/L}$; $2\mu\text{g/L}$ do oznaczania $^{91}\text{AsO}^+$. Współczynniki korelacji dla krzywych kalibracyjnych

były zawsze większe niż 0,999. W celu korekcji efektu matrycy i dryfu spektrometru zastosowano dodatek standardu wewnętrznego – rodu (103Rh).

Metoda pomiarów została zwalidowana z wykorzystaniem materiałów referencyjnych: ClinCheck (Recipe, Niemcy) oraz NIST 955c (National Institute of Standards and Technology, Stany Zjednoczone). Wskaźniki odzysku dla analizowanych pierwiastków wahały się od 80% do 105%, współczynnik wariancji dla przeprowadzonych pomiarów (Cv%) wynosił poniżej 15% dla wszystkich mierzonych elementów. Laboratorium badawcze jest członkiem dwóch niezależnych zewnętrznych programów oceny jakości: LAMP organizowanego przez CDC (LAMP: *Lead And Multielement Proficiency Program*; CDC: *Center for Disease Control*) oraz QMEQAS organizowanego przez *Institut National de Santé Publique du Québec* (QMEQAS: *Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme*).

4.4. Genotypowanie próbek DNA.

Próbki DNA pochodzącej od uczestników badania zostały wyizolowano przy użyciu metody detergentowej [153]. Genotypowanie dziesięciu wybranych SNP-ów (polimorfizmy pojedynczego nukleotydu–SNP) w obrębie dziesięciu genów: rs2032582 w *ABCB1*, rs1695 w *GSTP1*, rs13181 w *ERCC2*, rs1799782 w *XRCC1*, rs1001179 w *CAT*, rs1050450 w *GPX1*, rs4880 w *SOD2*, rs1800566 w *NQO1*, rs12915189 w *CRTC3* i rs7191779 w *MT1B* przeprowadzono przy użyciu wcześniej zaprojektowanego testu genotypowania (Genotyping Assay x40, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Każda próbka reakcyjna testu zawierała 2,5µl głównego miksu reakcyjnego (LightCycler 480 Probe Master Mix, Roche Diagnostics, Basel, Szwajcaria), 0,125µl sond molekularnych właściwych dla każdego z badanych polimorfizmów (Genotyping Assay × 40 TaqMan, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), 1,375µl wody dejonizowanej (Roche Diagnostics, Bazylea, Szwajcaria) i 1µl wyizolowanego DNA. Próbkę analizowano na 384–dołkowych płytkach. Każda płytka zawierała kontrolę pozytywną, negatywną i ślepą z wykorzystaniem wody. Wyniki genotypowania zebrano i przeanalizowano przy użyciu aparatu LightCycler 480 Instrument i programu LightCycler 480 Basic Software Version 1.5 (Roche Diagnostics, Bazylea, Szwajcaria).

4.5. Analiza statystyczna.

W celu oszacowania związku pomiędzy stężeniem arsenu, stężeniem arsenu i określonego genotypu z występowaniem raka jelita grubego u kobiet, stężeniem miedzi lub stężeniem miedzi i określonego genotypu, uczestnicy badania zostali przypisani do jednej z czterech kategorii uszeregowanych rosnąco według stężenia arsenu/miedzi (tzw. ćwiartek: Q1–Q4) ustalonych na podstawie rozkładu poziomów arsenu/miedzi wśród osób grupy kontrolnej. Związek pomiędzy stężeniem badanych pierwiastków, osobno lub w połączeniu z wybranymi polimorfizmami genów a występowaniem raka jelita grubego, został oszacowany za pomocą ilorazu szans (OR) oraz 95% przedziałów ufności (95% CI) z wyznaczeniem wartości prawdopodobieństwa testowego (p). Jako podgrupa referencyjna, użyta przy szacowaniu OR oraz 95% CI, została przyjęta ćwiartka, w której zaobserwowano najniższą proporcję liczby osób ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego do osób zdrowych. W przypadku badań, w których oznaczano stężenie arsenu była to ćwiartka o najwyższym stężeniu arsenu (Q4), a w badaniach nad potencjalnym związkiem stężenia miedzi z występowaniem raka jelita grubego, była to ćwiartka o najniższym stężeniu miedzi (Q1).

W badaniach nad stężeniem arsenu we krwi a występowaniem raka jelita grubego, oszacowanie wartości OR, 95% CI oraz p zostało wykonane przy wykorzystaniu wieloczynnikowego modelu bezwarunkowej regresji logistycznej uwzględniającego w analizie następujące czynniki: stężenie arsenu we krwi (przedstawione w ćwiartkach), wiek pacjentki w momencie pobrania krwi (wyrażony ilościowo) oraz status palenia tytoniu (wyrażony jakościowo jako tak/nie). Z kolei w badaniach dotyczących stężenia miedzi we krwi jako markera występowania raka jelita grubego, oszacowanie wartości OR, 95% CI oraz p zostało wykonane przy wykorzystaniu jednoczynnikowego modelu warunkowej regresji logistycznej.

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu środowiska programistyczno–statystycznego R („R environment: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing”, Vienna, Austria version: 4.0.4) w oparciu o autorski, opracowany przez doktoranta od podstaw skrypt obliczeniowy.

5. Wyniki

5.1. Publikacja nr 1:

„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

Badania przeprowadzono w grupie 83 kobiet z rakiem jelita grubego oraz 78 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Charakterystykę kobiet włączonych do badania przedstawiono w Tabeli nr 4.

Tabela 4. Charakterystyka kobiet włączonych do badania.

	Liczba kobiet biorących udział w badaniu <i>n=161</i>	Wiek Średnia (Zakres)	Palenie tytoniu		Stopień zaawansowania klinicznego raka jelita grubego					Brak danych
			Tak	Nie	I	II	III	IV		
Chore	83	67,17 (35–90)	23	60	15	32	28	4	4	
Zdrowe	78	67,24 (36–88)	22	56	–	–	–	–	–	

Średnie stężenie arsenu wśród pacjentek z rakiem jelita grubego wyniosło 1,05µg/L (zakres od 0,27µg/L do 7,04µg/L), natomiast w grupie kontrolnej 1,25µg/L (zakres od 0,33µg/L do 7,11µg/L), przy czym różnica ta była statystycznie istotna ($p=0,02$). Po podziale uzyskanych wyników na ćwiartki odpowiadające wzrastającym wartościom stężenia arsenu, największą liczbę pacjentek z rakiem jelita grubego ($n=40$) zaobserwowano

w ćwiartce z najniższymi wartościami stężenia arsenu (Q1: 0,27–0,67µg/L, Tabela 5). Najniższe stężenie arsenu we krwi związane było z ponad 3–krotnym (OR: 3,69; 95% CI: 1,50–9,50; $p=0,005$) wzrostem częstości występowania raka jelita grubego w porównaniu do ćwiartki z najwyższymi wartościami stężenia arsenu we krwi (Q4: 1,47–7,11µg/L) (Tabela 5). Zaobserwowano także istotne różnice w stężeniach arsenu pomiędzy pacjentami ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego w I i II stopniu zaawansowania klinicznego, a grupą kontrolną (mediana odpowiednio 0,9 oraz 0,66, $p=0,01$).

Tabela 5. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia arsenu we krwi u kobiet.

Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =83	Liczba zdrowych <i>n</i> =78	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	40 (48%)	20 (26%)	3,69	1,50–9,50	0,005
Q2: 0,68–0,88	11 (13%)	19 (24%)	1,06	0,37–3,05	>0,9
Q3: 0,92–1,44	21 (25%)	19 (24%)	2,03	0,78–5,44	0,2
Q4: 1,47–7,11	11 (13%)	20 (26%)	–	–	

Analiza rozkładu liczby przypadków raka jelita grubego w poszczególnych ćwiartkach utworzonych dla osób z określonym genotypem w obrębie analizowanych genów, wykazała zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego u kobiet należących do ćwiartki z najniższym stężeniem arsenu (Q1: 0,27–0,67µg/L), będących jednocześnie nosicielkami funkcjonalnych polimorfizmów takich jak: *CAT*, rs1001179–nonCC (OR: 19,4; 95% CI: 3,69–159,0; $p=0,001$) (Tabela 6); *ABCB1* rs2032582–CC (OR: 14,8; 95% CI: 1,95–318; $p=0,024$) (Tabela 7); *GPX1* rs1050450–CC (OR: 11,6; 95% CI: 2,74–60,9; $p=0,002$) (Tabela 8); *CRTC3* rs12915189–nonGG (OR: 10,3; 95% CI: 2,42–52,8; $p=0,003$) (Tabela 9). W obrębie pozostałych 6 genów różnice w liczbie zachorowań pomiędzy poszczególnymi ćwiartkami stężeń arsenu nie były istotne statystycznie lub liczebności poszczególnych podgrup były małe (wyniki w Tabelach S1–S16 w suplemencie załączonym do niniejszej pracy).

Tabela 6. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>CAT</i> rs1001179–nonCC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =35	Liczba zdrowych <i>n</i> =29	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	20 (57%)	5 (17%)	19,4	3,69–159	0,001
Q2: 0,68–0,88	4 (11%)	7 (24%)	2,53	0,36–22,9	0,4
Q3: 0,92–1,44	9 (26%)	7 (24%)	6,00	1,08–49,2	0,056
Q4: 1,47–7,11	2 (5,7%)	10 (34%)	–	–	

Tabela 7. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>ABCB1</i> rs2032582–CC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =29	Liczba zdrowych <i>n</i> =32	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	14 (48%)	10 (31%)	14,8	1,95–318	0,024
Q2: 0,68–0,88	4 (14%)	7 (22%)	5,74	0,61–132	0,2
Q3: 0,92–1,44	10 (34%)	7 (22%)	13,4	1,71–292	0,032
Q4: 1,47–7,11	1 (3,4%)	8 (25%)	–	–	

Tabela 8. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>GPX1</i> rs1050450–CC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =35	Liczba zdrowych <i>n</i> =33	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	18 (51%)	4 (12%)	11,6	2,74–60,9	0,002
Q2: 0,68–0,88	5 (14%)	8 (24%)	1,65	0,35–8,12	0,5
Q3: 0,92–1,44	6 (17%)	8 (24%)	1,83	0,42–8,53	0,4
Q4: 1,47–7,11	6 (17%)	13 (39%)	–	–	

Tabela 9. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>CRTC3</i> rs12915189–nonGG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =36	Liczba zdrowych <i>n</i> =35	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	21 (58%)	5 (14%)	10,3	2,42–52,8	0,003
Q2: 0,68–0,88	4 (11%)	12 (34%)	0,85	0,16–4,49	0,8
Q3: 0,92–1,44	7 (19%)	8 (23%)	2,18	0,48–11,1	0,3
Q4: 1,47–7,11	4 (11%)	10 (29%)	–	–	

W podgrupie mężczyzn nie zaobserwowano istotnie zwiększonej częstości występowania raka jelita grubego w zależności od: stężenia arsenu we krwi, jak również stężenia arsenu we krwi w połączeniu z analizowanymi polimorfizmami oraz badanych polimorfizmów analizowanych osobno (dane nieopublikowane).

Dla żadnego z genotypów analizowanych osobno, nie zaobserwowano zwiększonej częstości występowania raka jelita grubego (Tabele S17–S26 w suplemencie załączonym do niniejszej pracy).

5.2. Publikacja nr 2:

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.”

Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

W badaniu wzięły udział 374 osoby. Charakterystykę uczestników badania przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu.

Cecha	Liczba chorych, n=187	Liczba zdrowych, n=187
Rok urodzenia	1923–1985 (1949) ¹	1926–1986 (1949)
Wiek w momencie pobrania krwi	32–94 (68)	31–91 (68)
Rok w momencie pobrania krwi	2011–2017 (2014)	2012–2019 (2014)
Płeć		
Kobiety	83 (44%) ²	83 (44%)
Mężczyźni	104 (56%)	104 (56%)
Status palenia		
Nie	141 (75%)	140 (75%)
Tak	46 (25%)	47 (25%)
Stopień zaawansowania klinicznego		
I	27 (14%)	–
II	74 (40%)	–
III	57 (30%)	–
IV	14 (7.5%)	–
Brak danych	15 (8.0%)	–
Lokalizacja		
Okrężnica	81 (43%)	–
Odbytnica/Zgięcie esiczo–odbytnicze	91 (49%)	–
Brak danych	15 (8%)	–
Stopień zróżnicowania histologicznego		
G1	14 (7.5%)	–
G2	109 (58%)	–
G3	33 (18%)	–
Rak śluzowy	10 (5.3%)	–
Brak danych	21 (11%)	–
Obecność przerzutów		–
Nie	100 (53%)	–
Tak	69 (37%)	–
Brak danych	18 (9.6%)	–

¹ Zakres (Średnia); ² n (%).

Średnie stężenie miedzi we krwi wśród osób grupy badanej i kontrolnej wyniosło odpowiednio: 1 031µg/L (zakres od 657µg/L do 2 043µg/L) oraz 864µg/L (zakres od 589µg/L do 1 433µg/L) przy czym różnica ta była statystycznie istotna ($p<0.001$). W obrębie wszystkich osób włączonych do badania zaobserwowano asocjację pomiędzy wysokim stężeniem miedzi we krwi a wzrostem częstości występowania raka jelita grubego (Tabela 11). Po podziale uzyskanych wyników na ćwiartki odpowiadające wzrastającym wartościom stężenia miedzi, największą liczbę przypadków raków jelita grubego ($n=117$) zaobserwowano w ćwiartce z najwyższymi wartościami stężenia miedzi (Q4: 931–2 043µg/L). Wysokie stężenie miedzi we krwi związane było z ponad 12–krotnym (OR: 12,7; 95% CI: 4,98–32,3; $p<0,001$) wzrostem częstości występowania raka jelita grubego w porównaniu do ćwiartki z najniższymi wartościami stężenia miedzi we krwi (Q1: 589µg/L do 768µg/L).

Tabela 11. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych $n=187$	Liczba zdrowych $n=187$	OR	95% CI	p
Q1: 589–768	11 (5,9%)	47 (25%)	–	–	–
Q2: 768–854	33 (18%)	46 (25%)	3,34	1,30–8,61	0,012
Q3: 855–930	26 (14%)	47 (25%)	3,46	1,25–9,56	0,017
Q4: 931–2 043	117 (63%)	47 (25%)	12,7	4,98–32,3	<0,001

Wśród wszystkich kobiet średnie stężenie miedzi we krwi wyniosło 1 003µg/L (zakres od 657µg/L do 1 899µg/L), a wśród wszystkich mężczyzn, wyniosło 902µg/L (zakres od 589µg/L do 2 043 µg/L), przy czym różnica w stężeniu miedzi pomiędzy kobietami a mężczyznami była statystycznie istotna ($p<0,001$). Związek między najwyższymi wartościami stężenia miedzi we krwi (Q4: 931–2 043µg/L) a zwiększoną częstością występowania raka jelita grubego był obserwowany zarówno w grupie kobiet (Tabela 12), jak i mężczyzn (Tabela 13), przy czym asocjacja ta była silniejsza w grupie mężczyzn (OR: 15,1; 95% CI: 4,84–47,2; $p<0,001$), niż u kobiet (OR: 5,25; 95% CI: 1,02–27,0; $p=0,047$). Jednak 77% obserwowanych przypadków raka jelita grubego u kobiet i 51% przypadków raka u mężczyzn miało stężenie miedzi w ćwiartce odpowiadającej najwyższym wartościom badanego parametru (Q4).

Tabela 12. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi u kobiet.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych n=83	Liczba zdrowych n=83	OR	95% CI	p
Q1: 589–768	2 (2,4%)	8 (9,6%)	–	–	–
Q2: 768–854	5 (6,0%)	15 (18%)	0,78	0,11–5,40	0,8
Q3: 855–930	12 (14%)	25 (30%)	1,17	0,18–7,62	0,9
Q4: 931–2 043	64 (77%)	35 (42%)	5,25	1,02–27,0	0,047

Tabela 13. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi u mężczyzn.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych n=104	Liczba zdrowych n=104	OR	95% CI	p
Q1: 589–768	9 (8,7%)	39 (38%)	–	–	–
Q2: 768–854	28 (27%)	31 (30%)	4,94	1,59–15,3	0,006
Q3: 855–930	14 (13%)	22 (21%)	4,56	1,31–15,8	0,017
Q4: 931–2 043	53 (51%)	12 (12%)	15,1	4,84–47,2	<0,001

W tabeli 14 przedstawiono średnie wartości stężenia miedzi w odniesieniu do charakterystyki klinicznej zdiagnozowanych raków jelita grubego. Statystycznie istotne, wyższe średnie stężenia miedzi we krwi zaobserwowano w przypadkach raka jelita grubego będących w III–IV stadium zaawansowania klinicznego w porównaniu ze stadium I–II ($p<0,04$) oraz w grupie raków w stadium zróżnicowania G3 w porównaniu z rakami w stadium zróżnicowania G1–G2 ($p<0,001$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w średnich wartościach stężeniach miedzi w zależności od obecności/braku przerzutów czy lokalizacji raka.

Tabela 14. Średnie stężenie miedzi w zależności od charakterystyki klinicznej raków jelita grubego.

Cecha		<i>n</i>	Średnie stężenie Cu we krwi (µg/L)	<i>p</i>
Stopień zaawansowania klinicznego	I–II	101	1 002,7 (663,1–1 899,3)	0,04
	III–IV	71	1 083,7 (657,1–2 043,2)	
Stopień zróżnicowania histologicznego	G1–G2	123	1 000,7 (663,1–1 899,3)	<0,001
	G3	33	1 149,5 (791,6–2 043,2)	
Przerzuty	Nie	100	1 016,9 (663,1–1 899,3)	0,2
	Tak	69	1 069,2 (657,1–2 043,2)	
Lokalizacja	Jelito	81	1 048,7 (701,8–1 548,7)	0,33
	Odbytnica/zgięcie esiczo–odbytnicze	91	1 027,1 (657,1–2 043,2)	

W tabelach 15–22 przedstawiono wyniki analiz dla asocjacji pomiędzy stężeniem miedzi we krwi a częstością występowania raka jelita grubego w zależności od charakterystyki klinicznej.

Związek pomiędzy rosnącymi wartościami stężenia miedzi we krwi a wzrostem częstości występowania raka jelita grubego zaobserwowano zarówno u pacjentów z rakiem jelita grubego w I–II stopniu zaawansowania (Tabela 15), jak i u pacjentów z rakiem jelita grubego w stopniu zaawansowania III–IV (Tabela 16).

Tabela 15. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków w I i II stopniu zaawansowania klinicznego

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =101	Liczba zdrowych <i>n</i> =101	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	4 (4,0%)	25 (25%)	–	–	–
Q2: 768–854	21 (21%)	25 (25%)	7,11	1,52–33,3	0,013
Q3: 855–930	13 (13%)	26 (26%)	5,59	1,12–28,0	0,036
Q4: 931–2 043	63 (62%)	25 (25%)	21,0	4,54–97,0	<0,001

Tabela 16. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =71	Liczba zdrowych <i>n</i> =71	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	3 (4,2%)	17 (24%)	–	–	–
Q2: 768–854	10 (14%)	18 (25%)	1,70	0,38–7,56	0,5
Q3: 855–930	11 (15%)	16 (23%)	2,59	0,53–12,7	0,2
Q4: 931–2 043	47 (66%)	20 (28%)	7,99	2,15–29,7	0,002

Opisywany związek obserwowano także w podgrupie pacjentów z rakiem jelita grubego najbardziej i średnio zróżnicowanym (G1–G2) (Tabela 17) oraz z rakiem słabo zróżnicowanym (G3) (Tabela 18).

Tabela 17. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków w stopniu zróżnicowania G1 i G2.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =123	Liczba zdrowych <i>n</i> =123	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	7 (5,7%)	29 (24%)	–	–	–
Q2: 768–854	25 (20%)	33 (27%)	4,19	1,15–15,2	0,030
Q3: 855–930	20 (16%)	30 (24%)	4,76	1,21–18,7	0,026
Q4: 931–2 043	71 (58%)	31 (25%)	13,6	3,80–48,4	<0,001

Tabela 18. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków w stopniu zróżnicowania G3.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =33	Liczba zdrowych <i>n</i> =33	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	0 (0%)	9 (27%)	–	–	–
Q2: 768–854	1 (3,0%)	7 (21%)	–	–	–
Q3: 855–930	3 (9,1%)	10 (30%)	2,10	0,21–47,5	0,6
Q4: 931–2 043	29 (88%)	7 (21%)	29,0	4,24–591	0,003

Najwyższe wartości stężenia miedzi (w przedziale od 931µg/L do 2 043µg/L) związane ze zwiększoną częstością występowania raków jelita grubego stwierdzono niezależnie od występowania przerzutów (Tabele 19, 20).

Tabela 19. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród pacjentów z przerzutami.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych n=69	Liczba zdrowych n=69	OR	95% CI	p
Q1: 589–768	2 (2,9%)	16 (23%)	–	–	–
Q2: 768–854	10 (14%)	18 (26%)	2,64	0,50–14,0	0,3
Q3: 855–930	13 (19%)	16 (23%)	4,87	0,83–28,7	0,08
Q4: 931–2 043	44 (64%)	19 (28%)	11,8	2,47–56,1	0,002

Tabela 20. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród pacjentów bez przerzutów.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych n=100	Liczba zdrowych n=100	OR	95% CI	p
Q1: 589–768	5 (5,0%)	24 (24%)	–	–	–
Q2: 768–854	18 (18%)	26 (26%)	5,41	1,11–26,4	0,037
Q3: 855–930	12 (12%)	27 (27%)	4,44	0,88–22,5	0,072
Q4: 931–2 043	65 (65%)	23 (23%)	21,4	4,52–101	<0,001

Opisywaną asocjację między wysokimi stężeniami miedzi we krwi a zwiększoną częstością występowania raka jelita grubego zaobserwowano również dla różnych lokalizacji raka jelita grubego (Tabele 21–22).

Tabela 21. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków zlokalizowanych w okrężnicy.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =81	Liczba zdrowych <i>n</i> =81	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	1 (1,2%)	20 (25%)	–	–	–
Q2: 768–854	17 (21%)	27 (33%)	7,55	0,93–61,2	0,058
Q3: 855–930	9 (11%)	18 (22%)	10,0	1,08–93,4	0,042
Q4: 931–2 043	54 (67%)	16 (20%)	45,1	5,29–386	<0,001

Tabela 22. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od stężenia miedzi we krwi wśród raków zlokalizowanych w zgięciu esiczo–odbytniczym.

Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =91	Liczba zdrowych <i>n</i> =91	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	6 (6,6%)	22 (24%)	–	–	–
Q2: 768–854	13 (14%)	17 (19%)	3,27	0,83–13,0	0,091
Q3: 855–930	16 (18%)	25 (27%)	3,42	0,82–14,2	0,092
Q4: 931–2 043	56 (62%)	27 (30%)	9,89	2,68–36,5	<0,001

Analiza rozkładu liczby przypadków raka jelita grubego w poszczególnych ćwiartkach utworzonych dla osób z określonym genotypem w obrębie analizowanych genów, wykazała zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego u osób należących do ćwiartki z najwyższym stężeniem miedzi (Q4: 931–2 043µg/L), będących jednocześnie nosicielami funkcjonalnych polimorfizmów takich jak: *ABCB1* rs2032582–nonCC (OR: 33,7; 95% CI: 4,04–281; *p*=0,001) (Tabela 23); *MT1B* rs7191779–nonGG (OR: 16,6; 95% CI: 3,32–83,4; *p*<0,001) (Tabela 24); *CAT* rs1001179–CC (OR: 16,1; 95% CI: 3,68–70,7; *p*<0,001) (Tabela 25); *SOD2* rs4880–nonGG (OR: 15,9; 95% CI: 3,27–77,0; *p*<0,001) (Tabela 26);

GSTP1 rs1695–nonAA (OR: 15,9; 95% CI: 1,54–164; $p=0,02$) (Tabela 27);
XRCC1 rs1799782–CC (OR: 15,6; 95% CI: 5,00–48,5; $p<0,001$) (Tabela 28) – dane dotychczas
nieopublikowane.

**Tabela 23. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych
w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1* i stężenia miedzi we krwi.**

<i>ABCB1</i> rs2032582–nonCC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =82	Liczba zdrowych <i>n</i> =82	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	5 (6,1%)	22 (27%)	–	–	–
Q2: 768–854	15 (18%)	21 (26%)	7,35	0,88–61,3	0,065
Q3: 855–930	8 (9,8%)	18 (22%)	7,49	0,81–69,1	0,076
Q4: 931–2 043	54 (66%)	21 (26%)	33,7	4,04–281	0,001

**Tabela 24. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych
w zależności od polimorfizmu genu *MT1B* i stężenia miedzi we krwi.**

<i>MT1B</i> rs7191779–nonGG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =91	Liczba zdrowych <i>n</i> =91	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	2 (2,2%)	16 (18%)	–	–	–
Q2: 768–854	15 (16%)	30 (33%)	2,77	0,56–13,8	0,2
Q3: 855–930	16 (18%)	21 (23%)	6,70	1,25–36,0	0,027
Q4: 931–2 043	58 (64%)	24 (26%)	16,6	3,32–83,4	<0,001

Tabela 25. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT* i stężenia miedzi we krwi.

<i>CAT</i> rs1001179–CC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =77	Liczba zdrowych <i>n</i> =77	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	4 (5,2%)	18 (23%)	–	–	–
Q2: 768–854	15 (19%)	22 (29%)	2,67	0,70–10,2	0,2
Q3: 855–930	10 (13%)	21 (27%)	3,44	0,76–15,6	0,11
Q4: 931–2 043	48 (62%)	16 (21%)	16,1	3,68–70,7	<0,001

Tabela 26. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2* i stężenia miedzi we krwi.

<i>SOD2</i> rs4880–nonGG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =90	Liczba zdrowych <i>n</i> =90	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	4 (4,4%)	19 (21%)	–	–	–
Q2: 768–854	15 (17%)	21 (23%)	4,49	0,95–21,2	0,058
Q3: 855–930	10 (11%)	22 (24%)	4,12	0,75–22,6	0,1
Q4: 931–2 043	61 (68%)	28 (31%)	15,9	3,27–77,0	<0,001

Tabela 27. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>GSTP1</i> rs1695–nonAA					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =58	Liczba zdrowych <i>n</i> =58	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	1 (1,7%)	9 (16%)	–	–	–
Q2: 768–854	7 (12%)	19 (33%)	1,14	0,09–14,3	>0,9
Q3: 855–930	11 (19%)	14 (24%)	5,94	0,48–73,0	0,2
Q4: 931–2 043	39 (67%)	16 (28%)	15,9	1,54–164	0,02

Tabela 28. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>XRCC1</i> rs1799782–CC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =147	Liczba zdrowych <i>n</i> =147	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	8 (5,4%)	36 (24%)	–	–	–
Q2: 768–854	25 (17%)	39 (27%)	3,60	1,14–11,4	0,029
Q3: 855–930	17 (12%)	36 (24%)	2,99	0,86–10,4	0,085
Q4: 931–2 043	97 (66%)	36 (24%)	15,6	5,00–48,5	<0,001

-Wyniki-

Dla polimorfizmów w obrębie pozostałych 4 genów różnice w liczbie zachorowań pomiędzy poszczególnymi ćwiartkami stężeń miedzi nie były istotne statystycznie lub liczebności poszczególnych podgrup były małe (Tabele S27–S40 w suplemencie załączonym do niniejszej pracy).

Dla żadnego z genotypów analizowanych osobno, nie zaobserwowano zwiększenia prawdopodobieństwa występowania raka jelita grubego (Tabele S41–S50 w suplemencie załączonym do niniejszej pracy).

6. Wnioski

1. Stężenie arsenu we krwi poniżej 0,67µg/L może być związane ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego u kobiet.
2. Stężenie miedzi we krwi powyżej 900µg/L może być związane ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego niezależnie od płci.
3. Oznaczenie stężeń arsenu i miedzi we krwi może stanowić marker selekcji pacjentów do dalszej diagnostyki raka jelita grubego.
4. Efekt selekcji kobiet do diagnostyki raka jelita grubego na podstawie oceny stężenia arsenu we krwi może być zwiększony w podgrupach nosicieli polimorfizmów w obrębie takich genów jak: *CAT* rs1001179–nonCC, *ABCB1* rs2032582–CC, *GPX1* rs1050450–CC, *CRTC3* rs12915189–nonGG.
5. Efekt selekcji osób (niezależnie od płci) do diagnostyki raka jelita grubego na podstawie oceny stężenia miedzi we krwi może być zwiększony w podgrupach nosicieli polimorfizmów takich genów jak: *ABCB1* rs2032582–nonCC, *MT1B* rs7191779–nonGG, *CAT* rs1001179–CC, *SOD2* rs4880–nonGG, *GSTP1* rs1695–nonAA, *XRCC1* rs1799782–CC.

7. Publikacje będące podstawą rozprawy

7.1. Publikacja nr 1:

„Low blood–As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Piotr Baszuk, Paulina Stadnik, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Tomasz Huzarski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Józef Kładny, Rodney J. Scott, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

Communication

Low Blood-As Levels and Selected Genotypes Appears to Be Promising Biomarkers for Occurrence of Colorectal Cancer in Women

Piotr Baszuk ^{1,2,†} , Paulina Stadnik ^{1,†}, Wojciech Marciniak ^{1,2} , Róża Derkacz ^{1,2}, Anna Jakubowska ¹ , Cezary Cybulski ^{1,2} , Tomasz Huzarski ^{1,2,3} , Jacek Gronwald ^{1,2} , Tadeusz Dębniak ¹, Katarzyna Białkowska ¹, Sandra Pietrzak ¹, Józef Kładny ⁴, Rodney J. Scott ^{5,6,7} , Jan Lubiński ^{1,2,*}  and Marcin R. Lener ¹ 

- ¹ International Hereditary Cancer Center, Department of Genetics and Pathology, Pomeranian Medical University in Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin, Poland; piotr.baszuk@pum.edu.pl (P.B.); paulina.z.stadnik@gmail.com (P.S.); wojciech.marciniak@read-gene.com (W.M.); roza.derkacz@gmail.com (R.D.); aniaj@pum.edu.pl (A.J.); cezarycy@pum.edu.pl (C.C.); huzarski@pum.edu.pl (T.H.); jgron@pum.edu.pl (J.G.); debniak@pum.edu.pl (T.D.); katarzyna.kaczmar@gmail.com (K.B.); sandra.pietrzak@pum.edu.pl (S.P.); marcinlener@poczta.onet.pl (M.R.L.);
- ² Read-Gene, Grzeczka, ul. Alabastrowa 8, 72-003 Grzeczka, Dobra (Szczecińska), Poland
- ³ Department of Clinical Genetics and Pathology, University of Zielona Góra, ul. Zyty 28, 65-046 Zielona Góra, Poland
- ⁴ Department of General Surgery and Surgical Oncology, First Clinical Hospital of Pomeranian Medical University in Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin, Poland; jkladny@onet.pl
- ⁵ Priority Research Centre for Cancer Research, Innovation and Translation, Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, NSW 2308, Australia; rodney.scott@newcastle.edu.au
- ⁶ School of Biomedical Sciences and Pharmacy, Faculty of Health and Medicine, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia
- ⁷ Division of Molecular Medicine, Pathology North, John Hunter Hospital, New Lambton, NSW 2305, Australia
- * Correspondence: lubinski@pum.edu.pl; Tel.: +48-91-441-72-50
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Baszuk, P.; Stadnik, P.; Marciniak, W.; Derkacz, R.; Jakubowska, A.; Cybulski, C.; Huzarski, T.; Gronwald, J.; Dębniak, T.; Białkowska, K.; et al. Low Blood-As Levels and Selected Genotypes Appears to Be Promising Biomarkers for Occurrence of Colorectal Cancer in Women. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1105. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091105>

Academic Editor: Raghu Sinha

Received: 31 July 2021

Accepted: 26 August 2021

Published: 28 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In following study we examined whether blood arsenic (As) levels combined with specific polymorphisms in *MT1B*, *GSTP1*, *ABCB1*, *NQO1*, *CRTC3*, *GPX1*, *SOD2*, *CAT*, *XRCC1*, *ERCC2* can be used as a marker for the detection of colorectal cancer (CRC) among Polish women. A retrospective case-control study of CRC included 83 CRC cases and 78 healthy controls. From each study participant pre-treatment peripheral blood was collected for As level measurement by inductively coupled-plasma mass spectrometry (ICP-MS). We estimated the odds ratio (OR) of the association between blood-As levels and CRC using multivariable unconditional logistic regression models. A low blood-As level (0.27–0.67 µg/L) was associated with an increased frequency of CRC (OR: 3.69; $p = 0.005$). This correlation was significantly greater when participants carried particular gene variants: *CAT*, rs1001179-nonCC (OR: 19.4; $p = 0.001$); *ABCB1* rs2032582-CC (OR: 14.8; $p = 0.024$); *GPX1* rs1050450-CC (OR: 11.6; $p = 0.002$) and *CRTC3* rs12915189-nonGG (OR: 10.3; $p = 0.003$). Our study provides strong evidence that low blood-As levels are significantly associated with increased CRC occurrence and that particular gene variants significantly enhanced this correlation however, due to the novelty of these findings, we suggest further validation before a definitive statement that the combined effect of low blood-As levels with specific gene polymorphisms is a suitable CRC biomarker.

Keywords: colorectal cancer; arsenic level; biomarkers

1. Introduction

There are 2 major methods to study association between biomarkers and cancer. The first one studies the risk of cancer development and is based on a prospective cohort when patients are initially unaffected. The other method, a case-control study explores cancer occurrence. Although the case-control study design has limitations as it does not exclude

influence of tumour itself on biochemical parameters, this type of study is very useful to establish the most efficient criteria of cancer surveillance. Malignant tumours are the leading cause of death worldwide [1,2]. According to GLOBOCAN 2020 data, colorectal cancer (CRC) was the third most frequently diagnosed cancer and was classified as one of the most common types of cancers in both men and women [3]. It is believed that the interaction of various risk factors cause the accumulation of many genetic/epigenetic/metabolic changes within the cell has the greatest impact on cancer initiation and development [4–9]. It is known that low concentrations of some trace elements is beneficial for human health, however it has also been shown that genetic polymorphisms that alter the function or expression of important genes that play key roles in the metabolism of trace elements may contribute to the increased risk of cancer development [10,11]. Moreover, several trace elements are considered as chemical carcinogens that may contribute to the carcinogenic process [10,11]. The IARC report determined arsenic (As) and its compounds as one of the most carcinogenic trace elements that mankind is exposed to [10,12,13]. Although As is ubiquitous in the environment, and human exposure can occur from many natural and anthropogenic sources, diet is classified as one of the major source of As exposure [14]. Biomolecular mechanisms of As clearance are still poorly understood, however there are some theories that its biotransformation may exert carcinogenesis in both a genotoxic and non-genotoxic manner [15,16]. Recently we have been able to show that As is a major cancer risk factor for women in Poland—high levels of blood As (the highest quartile) is associated with more than 10-times higher risk of breast cancers as compared to quartile with the lowest As levels [17]. The above correlations have not been observed in our studies of men (data not shown). So far many retrospective revisions have indicated an association between the concentration of As in human samples and the occurrence of various cancer types [18–26], however none of these reports studied the relationship between As exposure and CRC occurrence. It is well established that increased risks of cancer are associated with polymorphisms of different genes. For the studies herein, we selected polymorphisms in genes reported to be directly involved in malignant transformation and/or xenobiotic metabolism and/or oxidative stress. As some studies have already explored the combined effects of metal levels with DNA variants of genes involved in carcinogenesis [27,28], we decided to explore whether functional polymorphisms in a panel of genes selected by us correlates with the frequency of CRC linked with blood-As levels in Polish women. Based on functional characteristics, high mutant-allele frequency (MAF > 25%) and potential relationship with cancer development and occurrence, 10 gene polymorphisms were studied. We selected the following genes: ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 (*ABCB1*) [29,30] and glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) [31] participating in elimination of some potentially toxic xenobiotics excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group 2 (*ERCC2*) [32] and X-ray repair cross-complementing protein 1 (*XRCC1*) [33,34] that are involved in DNA repair, catalase (*CAT*), glutathione peroxidase-1 (*GPX1*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*) [35] and NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (*NQO1*) [36] that are anti-oxidative stress enzymes, CREB Regulated Transcription Coactivator 3 (*CRTC3*) that plays a role in a regulation of CREB-dependent gene transcription in a phosphorylation-independent manner [37], metallothionein 1B (*MT1B*) which is involved in metal homeostasis and protection against heavy metal toxicity, DNA damage, and oxidative stress [38]. The aim of this study was to answer the following questions: Can blood-As levels be used as a biomarker for CRC occurrence in Polish women? Can specific gene polymorphisms be used as a biomarker for CRC occurrence in Polish women? Does the combined effect of blood-As levels and specific gene polymorphisms influence CRC frequency in Polish women?

2. Materials and Methods

2.1. Study Group

A population based retrospective case-control study of CRC was conducted on the cohort of 161 Polish women. The characteristics of cases and control participants are

presented in Table 1. All study subjects provided written informed consent to participate in the study and were randomly included in the study between 2012 and 2017. For each cancer patient, one unaffected individual registered at the International Hereditary Cancer Centre, Pomeranian Medical University of Szczecin, was matched as a healthy control. Participants were matched for year of birth (± 3 years), sex, smoking status (pack-years $\pm 20\%$) and the total number of malignancies among first degree relatives. In all cases cancer was confirmed by histopathological examination. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and with the consent of the Ethics Committee of Pomeranian Medical University in Szczecin under the number KB-0012/73/10.

Table 1. Characteristics of female CRC cases and controls.

Total, n = 161	Participants	Age (Mean/Range)	Smoking Status		Stage of CRC				
			Yes	No	I	II	III	IV	Unknown
Cases	83	67.17 (35–90)	23	60	15	32	28	4	4
Controls	78	67.24 (36–88)	22	56	-	-	-	-	-

2.2. Measurement of Blood-As Level

10 mL of peripheral blood was collected into a vacutainer tube containing sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from all study participants and then stored at -80°C until the day of analysis. Study subjects were fasting for at least six hours before sample collection. Blood samples were taken from patients' pre-treatment at the time of diagnosis. Total arsenic concentration in their blood was measured by the inductively coupled plasma mass spectrometer method reported in our previous study [17].

2.3. Molecular Analysis

Ten selected variants in ten genes were genotyped: rs13181 in *ERCC2*, rs1799782 in *XRCC1*, rs7191779 in *MT1B*, rs1695 in *GSTP1*, rs2032582 in *ABCB1*, rs1800566 in *NQO1*, rs12915189 in *CRTC3*, rs1050450 in *GPX1*, rs4880 in *SOD2*, and rs1001179 in *CAT*. From each individual included in the study, a 10 mL peripheral blood sample was collected in a vacutainer tube containing 1 mL of 10% sodium EDTA. The genomic DNA was isolated using the detergent method [39]. SNP Analyses were performed using a pre-designed Genotyping Assay $\times 40$ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Each reaction mixture consisted of 2.5 μL LightCycler 480 Probe Master Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), the assay 0.125 μL (Genotyping Assay $\times 40$ TaqMan) (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) and 1.375 μL deionized water (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Samples were analyzed on 384-well plates. Each plate was included positive, negative and water-blind control. The genotyping data were collected and analyzed using the LightCycler 480 Instrument and the program of the LightCycler 480 Basic Software Version 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

2.4. Statistical Analysis

For the estimation of association of As levels or As level and genotype with female CRC occurrence, study participants were assigned to one of four categories (quartiles-Q) based on the As levels distribution among controls. The association of As level with CRC occurrence was estimated with odds ratio (OR) at 95% confidence intervals using multivariable unconditional logistic regression model. The fourth quarter was utilized as the reference category for the odds ratio calculation. All calculations were performed using: "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria" (R version 4.0.4 (10 October 2020)).

3. Results

The lowest blood-As level (0.27–0.67 $\mu\text{g/L}$ –Q1) was associated with a 3.69-fold (95% CI 1.50–9.50); $p = 0.005$) increase in the risk of CRC when compared to blood As levels of 4th

quartile (1.47–7.11 µg/L) (Table 2). Apart from that, significant differences were observed in As levels between controls and Stage I-II patients (median 0.9 and 0.66 respectively)— p -value = 0.01.

Table 2. CRC occurrence risk associated with As level in blood in women.

As Blood Level (µg/L)	Cases/Controls
Q1: 0.27–0.67	40/20
Q2: 0.68–0.88	11/19
Q3: 0.92–1.44	21/19
Q4: 1.47–7.11	11/20

Q1 vs. Q4 (reference), cases/controls: 40/20 vs. 11/20; OR: 3.69 (95% CI 1.50–9.50); p = 0.005.

By comparing quartiles, further examination of the candidate gene variants showed a significantly greater probability of CRC occurrence in women with the lowest (0.27–0.67 µg/L) blood-As levels carrying functional polymorphisms such as: *CAT*, rs1001179-nonCC (OR: 19.4 (95% CI 3.69–159.0); p = 0.001) (Table 3), *ABCB1* rs2032582-CC (OR: 14.8 (95% CI 1.95–318); p = 0.024) (Table 4), *GPX1* rs1050450-CC (OR: 11.6 (95% CI 2.74–60.9); p = 0.002) (Table 5), *CRTC3* rs12915189-nonCG (OR: 10.3 (95% CI 2.42–52.8); p = 0.003) (Table 6). In the remaining 6 genes results were statistically non-significant or groups of cases/controls were very small.

None of the presented genotypes increased predisposition to CRC when blood-As level was not considered (Appendix A, Tables A1–A4).

Table 3. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *CAT* gene polymorphism and blood-As concentration in women.

As Blood Level (µg/L)	<i>CAT</i> rs1001179			
	nonCC		CC	
	Cases	Controls	Cases	Controls
Q1: 0.27–0.67	20 (57%)	5 (17%)	20 (42%)	15 (31%)
Q2: 0.68–0.88	4 (11%)	7 (24%)	7 (15%)	12 (24%)
Q3: 0.92–1.44	9 (26%)	7 (24%)	12 (25%)	12 (24%)
Q4: 1.47–7.11	2 (5.7%)	10 (34%)	9 (19%)	10 (20%)

CAT rs1001179-nonCC: Q1 vs. Q4 (reference), OR: 19.4 (95% CI 3.69–159); p = 0.001.

Table 4. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *ABCB1* gene polymorphism and blood-As concentration in women.

As Blood Level (µg/L)	<i>ABCB1</i> rs2032582			
	CC		nonCC	
	Cases	Controls	Cases	Controls
Q1: 0.27–0.67	14 (48%)	10 (31%)	26 (48%)	10 (22%)
Q2: 0.68–0.88	4 (14%)	7 (22%)	7 (13%)	12 (26%)
Q3: 0.92–1.44	10 (34%)	7 (22%)	11 (20%)	12(26%)
Q4: 1.47–7.11	1 (3.4%)	8 (25%)	10 (19%)	12(26%)

ABCB1 rs2032582-CC: Q1 vs. Q4 (reference), OR: 14.8 (95% CI 1.95–318); p = 0.024.

Table 5. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *GPX1* gene polymorphism and blood-As concentration in women.

As Blood Level (µg/L)	<i>GPX1</i> rs1050450			
	CC		nonCC	
	Cases	Controls	Cases	Controls
Q1: 0.27–0.67	18 (51%)	4 (12%)	22 (46%)	16 (36%)
Q2: 0.68–0.88	5 (14%)	8 (24%)	6 (12%)	11 (24%)
Q3: 0.92–1.44	6 (17%)	8 (24%)	15 (31%)	11 (24%)
Q4: 1.47–7.11	6 (17%)	13 (39%)	5 (10%)	7 (16%)

GPX1 rs1050450-CC: Q1 vs. Q4 (reference), OR: 11.6 (95% CI 2.74–60.9); p = 0.002.

Table 6. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *CRTC3* gene polymorphism and blood-As concentration in women.

As Blood Level (µg/L)	<i>CRTC3</i> rs12915189			
	GG		nonGG	
	Cases	Controls	Cases	Controls
Q1: 0.27–0.67	19 (40%)	15 (35%)	21 (58%)	5 (14%)
Q2: 0.68–0.88	7 (15%)	7 (16%)	4 (11%)	12 (34%)
Q3: 0.92–1.44	14 (30%)	11 (26%)	7 (19%)	8 (23%)
Q4: 1.47–7.11	7 (15%)	10 (23%)	4 (11%)	10 (29%)

CRTC3 rs12915189-nonGG: Q1 vs. 4 (reference), OR: 10.3 (95% CI 2.42–52.8); $p = 0.003$.

4. Discussion

CRC is one of the major causes of morbidity and mortality in many well-developed countries and its occurrence is increasing in developing areas of the world.

This current retrospective report showed a novel finding that low blood-As levels are strongly associated with higher probability of CRC occurrence in women.

Since our published data achieved in our prospective cohort of women strongly suggested blood-As levels in women should be low, because it is correlated with an extremely low risk of all cancer development including CRC, we hypothesized that low blood-As levels in CRC patients (current retrospective study) may be due to significantly higher As metabolism occurring in cancerous cells during the growth of the CRC. Observed correlation may be also site-specific since in analogous studies performed in Our Centre, breast and lung cancer female patients did not show association between As level and tumour occurrence (data not shown). Mechanisms behind our observations need further investigations including somatic and genetic changes of various pathways involved in cancer development.

Recently, we recognized unexpectedly that one of mechanisms of As induced carcinogenesis may be via estrogens. Experimental studies on animals have shown dependence of As effects on sex [40]. In prospective cohorts we also observed that As associated cancer risk was correlated with hormonal status: in women, higher blood As level was associated with higher cancer risk but in men, especially at age < 60 yrs, higher blood As level was associated with lower cancer risk (data not shown). In females, As may influence on development of cancers by disrupting the function of estrogen receptors and suppressing the signaling pathway of estrogen [41,42]. As is also a potential metallo-estrogen [43,44].

Surprisingly, to the best of our knowledge, there are no published retrospective case-control studies on the relationship between As levels in any biological sample and CRC occurrence.

It is well known that apart from many environmental factors, genetic predisposition plays a significant role in the CRC development and occurrence [45]. From the panel of selected genes in this study, we presented that gene variants such as: *CAT*, rs1001179-nonCC, *ABCB1* rs2032582-CC, *GPX1* rs1050450-CC, *CRTC3* rs12915189-nonGG significantly enhanced already greater CRC occurrence among women with ≤ 0.67 µg/L blood-As concentration, although none of these genotypes presented a significant effect on CRC occurrence on their own when blood-As levels were not considered. It is in agreement with results of former studies presenting no impact of polymorphisms of *ABCB1* rs2032582, *GPX1* rs1050450, *CAT* rs1001179 on CRC occurrence among respectively Asian [29], Norwegian [46], Iranian [47] German [48] and US populations [49].

As far as we are aware, this is the first report exploring the impact of *CRTC3* rs12915189 polymorphism on its own, but also in combination with blood-As levels on CRC occurrence. According to our findings, *CRTC3* rs12915189-nonGG itself did not predispose to a higher frequency of CRC, however with blood-As levels below or equal to 0.67 µg/L it significantly increased the occurrence of CRC among women from Poland.

Based on our data and assumptions, we consider that to exclude the occurrence of CRC, a colonoscopy should be offered to women with a low blood-As level as a result of

either an As-free diet or found in their initial regular blood tests and in association with gene variants described above.

We are convinced that after further validation (also on larger numbers of cases and controls) the combination effects of low blood-As levels with *CAT* rs1001179-nonCC, *ABCB1* rs2032582-CC, *GPX1* rs1050450-CC, *CRTC3* rs12915189-nonGG maybe a suitable CRC biomarker in Polish women.

5. Conclusions

Low blood-As level (0.27–0.67 µg/L) significantly increases probability of the CRC occurrence in women.

CAT rs1001179-nonCC, *ABCB1* rs2032582-CC, *GPX1* rs1050450-CC, *CRTC3* rs12915189-nonGG polymorphisms enhance the already existing, increased probability of female CRC occurrence associated with low blood-As levels (0.27–0.67 µg/L).

Author Contributions: Conceptualization, P.B., P.S. and J.L.; methodology, P.B., W.M. and J.L.; software, P.B.; validation, W.M.; formal analysis, P.B., M.R.L.; investigation, P.B., P.S., W.M., R.D., M.R.L., A.J., K.B. and J.K.; resources, M.R.L., A.J., C.C., T.H., J.G., T.D., J.K. and J.L.; data curation, P.B., P.S., W.M., R.D., K.B., S.P., J.L. and M.R.L.; writing—original draft preparation, P.B., P.S., R.J.S. and J.L.; writing—review and editing, R.J.S., J.L. and M.R.L.; visualization, P.B., P.S., S.P., R.J.S., M.R.L. and J.L.; supervision, J.L. and M.R.L.; project administration, A.J., J.K., M.R.L. and J.L.; funding acquisition, A.J. and J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the National Centre for Research and Development Project: PBS3/B7/26/2015.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Pomeranian Medical University in Szczecin (protocol code KB-0012/73/10).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: J.L. is the CEO of Read-Gene SA. These authors are part-time employees of Read-Gene SA: P.B., W.M., R.D., C.C., T.H., J.G. The other authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *CAT* gene polymorphism only.

<i>CAT</i> rs1001179			
	Overall	Cases	Controls
CC	97 (60%)	48 (58%)	49 (63%)
nonCC	64 (40%)	35 (42%)	29 (37%)

CAT rs1001179-nonCC: OR: 1.23 (95% CI 0.65–2.33); $p = 0.5$.

Table A2. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *ABCB1* gene polymorphism only.

<i>ABCB1</i> rs2032582			
	Overall	Cases	Controls
CC	61 (38%)	29 (35%)	32 (41%)
nonCC	100 (62%)	54 (65%)	46 (59%)

ABCB1 rs2032582-nonCC: OR: 1.30 (95% CI 0.68–2.46); $p = 0.4$.

Table A3. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *GPX1* gene polymorphism only.

<i>GPX1</i> rs1050450			
	Overall	Cases	Controls
CC	68 (42%)	35 (42%)	33 (42%)
nonCC	93 (58%)	48 (58%)	45 (58%)

GPX1 rs1050450-nonCC: OR: 1.01 (95% CI 0.54–1.88); $p > 0.9$.

Table A4. Numbers of CRC cases and healthy controls depending on *CRTC3* gene polymorphism only.

<i>CRTC3</i> rs12915189			
	Overall	Cases	Controls
CC	90 (56%)	47 (57%)	43 (55%)
nonCC	71 (44%)	36 (43%)	35 (45%)

CRTC3 rs12915189-nonCC: OR: 0.94 (95% CI 0.50–1.76); $p = 0.8$.

References

- Nagai, H.; Kim, Y.H. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J. Thorac. Dis.* **2017**, *9*, 448–451. [\[CrossRef\]](#)
- Zawadzka, I.; Jeleń, A.; Pietrzak, J.; Żebrowska-Nawrocka, M.; Michalska, K.; Szmajda-Krygier, D.; Mirowski, M.; Łochowski, M.; Kozak, J.; Balcerzak, E. The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy-preliminary report. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6188. [\[CrossRef\]](#)
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Andersson, T.M.-L.; Engholm, G.; Brink, A.-L.; Pukkala, E.; Stenbeck, M.; Tryggvadottir, L.; Weiderpass, E.; Storm, H. Tackling the tobacco epidemic in the Nordic countries and lower cancer incidence by 1/5 in a 30-year period-The effect of envisaged scenarios changing smoking prevalence. *Eur. J. Cancer* **2018**, *103*, 288–298. [\[CrossRef\]](#)
- Crowe, F.L.; Appleby, P.N.; Travis, R.C.; Key, T.J. Risk of hospitalization or death from ischemic heart disease among British vegetarians and nonvegetarians: Results from the EPIC-Oxford cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *97*, 597–603. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, T.; Yang, B.; Zheng, J.; Li, G.; Wahlqvist, M.L.; Li, D. Cardiovascular disease mortality and cancer incidence in vegetarians: A meta-analysis and systematic review. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *60*, 233–240. [\[CrossRef\]](#)
- Lewandowska, A.M.; Rudzki, M.; Rudzki, S.; Lewandowski, T.; Laskowska, B. Environmental risk factors for cancer—Review paper. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2019**, *26*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schulz, M.; Hoffmann, K.; Weikert, C.; Nöthlings, U.; Schulze, M.B.; Boeing, H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 942–946. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Weiderpass, E. Lifestyle and cancer risk. *J. Prev. Med. Public Health* **2010**, *43*, 459–471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mulware, S.J. Trace elements and carcinogenicity: A subject in review. *3 Biotech* **2013**, *3*, 85–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nawi, A.M.; Chin, S.-F.; Azhar Shah, S.; Jamal, R. Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Iran. J. Public Health* **2019**, *48*, 632–643.
- Chung, J.-Y.; Yu, S.-D.; Hong, Y.-S. Environmental Source of Arsenic Exposure. *J. Prev. Med. Public Health* **2014**, *47*, 253–257. [\[CrossRef\]](#)
- IARC. *Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts*; IARC: Lyon, France, 2012; ISBN 978-92-832-1320-8.
- Baker, B.A.; Cassano, V.A.; Murray, C.; Exposure, A.T.F. on A. Arsenic Exposure, Assessment, Toxicity, Diagnosis, and Management: Guidance for Occupational and Environmental Physicians. *J. Occup. Environ. Med.* **2018**, *60*, e634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Im, J.; Chatterjee, N.; Choi, J. Genetic, epigenetic, and developmental toxicity of *Chironomus riparius* raised in metal-contaminated field sediments: A multi-generational study with arsenic as a second challenge. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *672*, 789–797. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sage, A.P.; Minatel, B.C.; Ng, K.W.; Stewart, G.L.; Dummer, T.J.B.; Lam, W.L.; Martinez, V.D. Oncogenomic disruptions in arsenic-induced carcinogenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 25736–25755. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marciniak, W.; Derkacz, R.; Muszyńska, M.; Baszuk, P.; Gronwald, J.; Huzarski, T.; Cybulski, C.; Jakubowska, A.; Falco, M.; Dębniak, T.; et al. Blood Arsenic Levels and the Risk of Familial Breast Cancer in Poland. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 2721–2727. [\[CrossRef\]](#)
- Benderli Cihan, Y.; Sözen, S.; Öztürk Yıldırım, S. Trace elements and heavy metals in hair of stage III breast cancer patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 360–379. [\[CrossRef\]](#)
- Hsueh, Y.-M.; Su, C.-T.; Shiue, H.-S.; Chen, W.-J.; Pu, Y.-S.; Lin, Y.-C.; Tsai, C.-S.; Huang, C.-Y. Levels of plasma selenium and urinary total arsenic interact to affect the risk for prostate cancer. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *107*, 167–175. [\[CrossRef\]](#)

20. Jablonska, E.; Socha, K.; Reszka, E.; Wieczorek, E.; Skokowski, J.; Kalinowski, L.; Fendler, W.; Seroczynska, B.; Wozniak, M.; Borawska, M.H.; et al. Cadmium, arsenic, selenium and iron- Implications for tumor progression in breast cancer. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *53*, 151–157. [\[CrossRef\]](#)
21. Kazi, T.G.; Wadhwa, S.K.; Afridi, H.I.; Talpur, F.N.; Tuzen, M.; Baig, J.A. Comparison of essential and toxic elements in esophagus, lung, mouth and urinary bladder male cancer patients with related to controls. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 7705–7715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Kim, T.-H.; Seo, J.-W.; Hong, Y.-S.; Song, K.-H. Case-control study of chronic low-level exposure of inorganic arsenic species and non-melanoma skin cancer. *J. Dermatol.* **2017**, *44*, 1374–1379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Melak, D.; Ferreccio, C.; Kalman, D.; Parra, R.; Acevedo, J.; Pérez, L.; Cortés, S.; Smith, A.H.; Yuan, Y.; Liaw, J.; et al. Arsenic Methylation and Lung and Bladder Cancer in a Case-control Study in Northern Chile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *274*, 225–231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Pineda-Belmontes, C.P.; Hernández-Ramírez, R.U.; Hernández-Alcaraz, C.; Cebrián, M.E.; López-Carrillo, L. Genetic polymorphisms of PPAR gamma, arsenic methylation capacity and breast cancer risk in Mexican women. *Salud Publica Mex.* **2016**, *58*, 220–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ismail, P.; Yousif, A.; Harki, E. Alterations of Some Heavy Metals and Trace Elements Levels in Breast Cancer. *Med. Chem.* **2017**, *7*, 458–460. [\[CrossRef\]](#)
26. Wadhwa, S.K.; Kazi, T.G.; Chandio, A.A.; Afridi, H.I.; Kolachi, N.F.; Khan, S.; Kandhro, G.A.; Nasreen, S.; Shah, A.Q.; Baig, J.A. Comparative study of liver cancer patients in arsenic exposed and non-exposed areas of Pakistan. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 86–96. [\[CrossRef\]](#)
27. Safaraz, M.; Besharat, S.; Salimi, S.; Azarhoush, R.; Behnampour, N.; Joshaghani, H.R. Association between selenium, cadmium, and arsenic levels and genetic polymorphisms in DNA repair genes (XRCC5, XRCC6) in gastric cancerous and non-cancerous tissue. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2019**, *55*, 89–95. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhang, Q.; Jiang, C.; Li, H.; Zhang, C.; Wu, H.; Huang, F. Effect of the Interaction Between Cadmium Exposure and CLOCK Gene Polymorphisms on Thyroid Cancer: A Case-Control Study in China. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *196*, 86–95. [\[CrossRef\]](#)
29. He, T.; Mo, A.; Zhang, K.; Liu, L. ABCB1/MDR1 gene polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis of case-control studies. *Colorectal Dis.* **2013**, *15*, 12–18. [\[CrossRef\]](#)
30. Martinelli, M.; Scapoli, L.; Cura, F.; Rodia, M.T.; Ugolini, G.; Montroni, I.; Solmi, R. Colorectal cancer susceptibility: Apparent gender-related modulation by ABCB1 gene polymorphisms. *J. BioMed. Sci.* **2014**, *21*, 89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Ritambhara, null; Tiwari, S.; Vijayaraghavalu, S.; Kumar, M. Genetic Polymorphisms of Xenobiotic Metabolizing Genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1), Gene-Gene Interaction with Association to Lung Cancer Risk in North India; A Case Control Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2019**, *20*, 2707–2714. [\[CrossRef\]](#)
32. Rump, A.; Benet-Pages, A.; Schubert, S.; Kuhlmann, J.D.; Janavičius, R.; Macháčková, E.; Foretová, L.; Kleibl, Z.; Lhota, F.; Zemankova, P.; et al. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-national Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006248. [\[CrossRef\]](#)
33. Caldecott, K.W. XRCC1 protein; Form and function. *DNA Repair (Amst.)* **2019**, *81*, 102664. [\[CrossRef\]](#)
34. Mok, M.C.Y.; Campalans, A.; Pilon, M.C.; Guarné, A.; Radicella, J.P.; Junop, M.S. Identification of an XRCC1 DNA binding activity essential for retention at sites of DNA damage. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3095. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 287–293. [\[CrossRef\]](#)
36. Ross, D.; Siegel, D. NQO1 in protection against oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 67–72. [\[CrossRef\]](#)
37. Ozanne, J.; Prescott, A.R.; Clark, K. The clinically approved drugs dasatinib and bosutinib induce anti-inflammatory macrophages by inhibiting the salt-inducible kinases. *BioChem. J.* **2015**, *465*, 271–279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Si, M.; Lang, J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 107. [\[CrossRef\]](#)
39. Lahiri, D.K.; Schnabel, B. DNA Isolation by a Rapid Method from Human Blood Samples: Effects of MgCl₂, EDTA, Storage Time, and Temperature on DNA Yield and Quality. *BioChem. Genet.* **1993**, *31*, 321–328. [\[CrossRef\]](#)
40. Huang, M.C.; Douillet, C.; Su, M.; Zhou, K.; Wu, T.; Chen, W.; Galanko, J.A.; Drobná, Z.; Saunders, R.J.; Martin, E.; et al. Metabolomic profiles of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice: Effect of sex and arsenic exposure. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 189–202. [\[CrossRef\]](#)
41. Gamble, M.V.; Liu, X.; Slavkovich, V.; Pilsner, J.R.; Ilievski, V.; Factor-Litvak, P.; Levy, D.; Alam, S.; Islam, M.; Parvez, F.; et al. Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 1202–1209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Chatterjee, A.; Chatterji, U. Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2010**, *8*, 80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Aquino, N.B.; Seigny, M.B.; Sabangan, J.; Louie, M.C. Role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: Metalloestrogens or not? *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2012**, *30*, 189–224. [\[CrossRef\]](#)
44. Ruiz-Ramos, R.; López-Carrillo, L.; Albores, A.; Hernández-Ramírez, R.U.; Cebrian, M.E. Sodium arsenite alters cell cycle and MTHFR MT1/2, and c-Myc protein levels on MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *241*, 269–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Marley, A.R.; Nan, H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **2016**, *7*, 105–114. [\[PubMed\]](#)

46. Hansen, R.; Saebo, M.; Skjelbred, C.F.; Nexø, B.A.; Hagen, P.C.; Bock, G.; Bowitz Lothe, I.M.; Johnson, E.; Aase, S.; Hansteen, I.L.; et al. GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett.* **2005**, *229*, 85–91. [[CrossRef](#)]
47. Jamhiri, I.; Saadat, I.; Omidvari, S. Genetic polymorphisms of superoxide dismutase-1A251G and catalase C-262T with the risk of colorectal cancer. *Mol. Biol. Res. Commun.* **2017**, *6*, 85–90.
48. Funke, S.; Hoffmeister, M.; Brenner, H.; Chang-Claude, J. Effect modification by smoking on the association between genetic polymorphisms in oxidative stress genes and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2009**, *18*, 2336–2338. [[CrossRef](#)]
49. Labadie, J.; Goodman, M.; Thyagarajan, B.; Gross, M.; Sun, Y.; Fedirko, V.; Bostick, R.M. Associations of oxidative balance-related exposures with incident, sporadic colorectal adenoma according to antioxidant enzyme genotypes. *Ann. Epidemiol.* **2013**, *23*, 223–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7.2. Publikacja nr 2:

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.”

Piotr Baszuk, Wojciech Marciniak, Róża Derkacz, Anna Jakubowska, Cezary Cybulski, Jacek Gronwald, Tadeusz Dębniak, Tomasz Huzarski, Katarzyna Białkowska, Sandra Pietrzak, Magdalena Muszyńska, Józef Kładny, Steven A. Narod, Jan Lubiński, Marcin R. Lener. Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628



Article

Blood Copper Levels and the Occurrence of Colorectal Cancer in Poland

Piotr Baszuk ^{1,2}, Wojciech Marciniak ^{1,2}, Róża Derkacz ^{1,2}, Anna Jakubowska ¹, Cezary Cybulski ^{1,2}, Jacek Gronwald ^{1,2}, Tadeusz Dębniak ¹, Tomasz Huzarski ^{1,2,3}, Katarzyna Białkowska ¹, Sandra Pietrzak ¹, Magdalena Muszyńska ^{1,2}, Józef Kładny ⁴, Steven A. Narod ^{5,6}, Jan Lubiński ^{1,2} and Marcin R. Lener ^{1,*}

¹ International Hereditary Cancer Center, Department of Genetics and Pathology, Pomeranian Medical University in Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin, Poland; piotr.baszuk@pum.edu.pl (P.B.); wojciech.marciniak@read-gene.com (W.M.); roza.derkacz@gmail.com (R.D.); aniaj@pum.edu.pl (A.J.); cezarycy@pum.edu.pl (C.C.); jgron@pum.edu.pl (J.G.); debniak@pum.edu.pl (T.D.); huzarski@pum.edu.pl (T.H.); katarzyna.kaczmar@gmail.com (K.B.); sandra.pietrzak@pum.edu.pl (S.P.); magda_mac@wp.pl (M.M.); lubinski@pum.edu.pl (J.L.)

² Read-Gene, Grzeczka, ul. Alabastrowa 8, 72-003 Grzeczka, Dobra (Szczecińska), Poland

³ Department of Clinical Genetics and Pathology, University of Zielona Góra, ul. Zyty 28, 65-046 Zielona Góra, Poland

⁴ Department of General Surgery and Surgical Oncology, First Clinical Hospital of Pomeranian Medical University in Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin, Poland; jkladny@onet.pl

⁵ Women's College Research Institute, Toronto, ON M5G 1N8, Canada; steven.narod@wchospital.ca

⁶ Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, ON M5T 3M7, Canada

* Correspondence: marcinlener@poczta.onet.pl; Tel.: +48-91-441-7250



Citation: Baszuk, P.; Marciniak, W.; Derkacz, R.; Jakubowska, A.; Cybulski, C.; Gronwald, J.; Dębniak, T.; Huzarski, T.; Białkowska, K.; Pietrzak, S.; et al. Blood Copper Levels and the Occurrence of Colorectal Cancer in Poland. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1628. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111628>

Academic Editor: Raghu Sinha

Received: 24 September 2021

Accepted: 2 November 2021

Published: 5 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: There is a need for sensitive and specific biomarkers for the early detection of colorectal cancer. In this retrospective study, we assessed whether a high blood copper level was associated with the presence of colorectal cancer. The blood copper level was measured among 187 colorectal cancer patients and 187 matched controls. Cases and controls were matched for sex, smoking status (yes/no) and year of birth. Among the cases, the mean blood copper level was 1031 µg/L (range 657 µg/L to 2043 µg/L) and among the controls, the mean blood copper level was 864 µg/L (range 589 µg/L to 1433 µg/L). The odds ratio for colorectal cancer for those in the highest quartile of copper level (versus the lowest) was 12.7 (95% CI: 4.98–32.3; $p < 0.001$). Of the patients with stage I–II colon cancer, 62% had a copper level in the highest quartile. A blood copper level in excess of 930 µg/L is associated with an increase in the prevalence of colorectal cancer in the Polish population and its potential use in early detection programs should be considered.

Keywords: copper; colorectal cancer; biomarkers

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in men and women [1]. The early diagnosis of colorectal cancer is promoted as a means to reduce the burden of the disease in society. There are several approaches to the early diagnosis of colorectal cancer, including pre-screening of stool samples or blood tests for relevant biomarkers (proteins; DNA; mRNA and long non-coding RNA; microRNA; metabolites and gut microbiome) followed by colonoscopies or sigmoidoscopies where appropriate [2]. Others have recommended computer-assisted algorithms for evaluating complete blood counts (CBCs) or platelets [3–5]. To date, non-invasive tests for colorectal cancer pre-screening have not been proven to be effective in terms of reducing cancer mortality.

Potential biomarkers for cancer can be identified by using a case-control design. The biomarkers are measured in newly-diagnosed cancer cases and in closely matched healthy controls and the levels are compared. It is important to acquire the blood sample prior to treatment to avoid the possibility that the treatment influences the level of the biomarker.

Several trace elements are critical for human health [6–8]. One essential micronutrient is copper (Cu). It is required as a catalytic cofactor or as a structural component for proteins and plays a role in critical biological functions such as enzyme activity, oxygen transport and cell signaling. Cu is highly redox active, readily donating and accepting electrons to shift between its two valence states ($\text{Cu}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}$). Many critical enzymes depend on this activity and hence Cu plays an important role in biological oxidation–reduction (redox) reactions [9]. It can catalyze the production of free radicals and this can be damaging to lipids, proteins, DNA and other biomolecules [10,11]. Cu is not a carcinogen per se, but these activities make it potentially toxic.

In patients with cancer (or inflammation) Cu concentrations rise in the plasma and the synthesis and secretion of ceruloplasmin by the liver is enhanced. Ceruloplasmin is a major Cu transporter that binds Cu in circulation [12]. The elevated ceruloplasmin concentrations in each of these conditions would provide additional Cu uptake by cells in normal tissues and as well as cancer cells. Transcuperine (a second Cu-binding protein) appears to be increased in malignancy. Enhanced uptake of Cu from non-ceruloplasmin fractions of plasma, which together account for the relatively high levels of Cu in tumor cells, was demonstrated in neoplastic cells. Cu also plays a role in angiogenesis, a requirement for tumor growth, which may be mediated by Cu-dependent amine oxidases [13].

Several studies have reported high serum Cu levels in a wide range of cancers including lymphoma, reticulum cell sarcoma, laryngeal carcinomas, cervical, breast, pancreas, stomach and lung cancers [14–16]. Elevated serum Cu levels correlated with disease stage in breast and colorectal cancer [17,18].

The aim of the study was to assess whether blood Cu levels are associated with the presence of colorectal cancer.

2. Materials and Methods

2.1. Study Group

A total of 187 subjects with pathologically-confirmed colorectal cancer were enrolled for study. Cases originated from the Department of General Surgery and Surgical Oncology, Clinical Hospital of Pomeranian Medical University in Szczecin. Blood samples were taken from cases shortly after diagnosis and prior to treatment (between 2011 and 2017).

The controls were identified from a research registry housed at the International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University in Szczecin. Controls were participants in a population-based study of the 1.3 million inhabitants of Poland designed to identify familial aggregations of cancers conducted by our center. Blood samples from participants of the aforementioned registry were taken between 2012 and 2017.

Each case was assigned to one control matched for sex, smoking status (yes/no) and year of birth (± 3 years).

The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and with the consent of the Ethics Committee of Pomeranian Medical University in Szczecin under the number KB-0012/73/10 of 21 June 2010. All participants provided written informed consent to be enrolled in the herein study between 2011 and 2017. The overall characteristics of individuals enrolled into the following study are presented in Table 1.

2.2. Measurement of Blood Copper Level

For analysis, 10 mL of peripheral blood was collected into a vacutainer tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from all study participants and then stored at -80°C until the day of analysis. Study subjects fasted for at least six hours before sample collection. Determination of ^{65}Cu was performed using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) (ELAN DRC-e, PerkinElmer, Concord, ON, Canada). Before each assay, the instrument was tuned to achieve the manufacturers' optimum criteria. Oxygen was used as a reaction gas. The spectrometer was calibrated using an external calibration technique. Calibration standards were prepared fresh daily, from 10 $\mu\text{g/mL}$ Multi-Element Calibration Standard 3 (PerkinElmer Pure Plus, Shelton, CT, USA) by

dilution with a blank reagent to the final concentration of 5; 10 and 50 µg/L for Cu determination. Correlation coefficients for calibration curves were always greater than 0.999. Matrix-matched calibration was used. Rhodium was set as the internal standard.

Table 1. Characteristics of individuals enrolled into the study.

Characteristic	Cases, <i>n</i> = 187	Controls, <i>n</i> = 187
Year of birth	1923–1985 (1949) ¹	1926–1986 (1949)
Age at blood draw	32–94 (68)	31–91 (68)
Year of blood draw	2011–2017 (2014)	2012–2019 (2014)
Sex		
Female	83 (44%) ²	83 (44%)
Male	104 (56%)	104 (56%)
Smoking		
No	141 (75%)	140 (75%)
Yes	46 (25%)	47 (25%)
Colon cancer stage		
I	27 (14%)	-
II	74 (40%)	-
III	57 (30%)	-
IV	14 (7.5%)	-
Missing	15 (8.0%)	-
Site		
Colon	81 (43%)	-
Rectum/Rectosigmoid	91 (49%)	-
Junction	15 (8%)	-
Missing	15 (8%)	-
Grading		
G1	14 (7.5%)	-
G2	109 (58%)	-
G3	33 (18%)	-
Mucinous	10 (5.3%)	-
Missing	21 (11%)	-
Metastases present		
No	100 (53%)	-
Yes	69 (37%)	-
Missing	18 (9.6%)	-

¹ Range (Mean); ² *n* (%).

The analysis protocol assumed a 30-fold dilution of blood in a blank reagent. The blank reagent consisted of high purity water (>18 MΩ), TMAH (AlfaAesar, Kandel, Germany), Triton X-100 (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), *n*-butanol (Merck, Darmstadt, Germany), rhodium (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), gold (VWR, Steinheim, Germany) and EDTA (Sigma-Aldrich, Leuven, Belgium).

The accuracy and precision of all measurements were tested using certified reference material (CRM), Clincheck Plasmonorm Blood Trace Elements Level 1 (Recipe, Munich, Germany). Recovery rates were between 80% and 105% for analyzed elements; calculated recurrence (Cv%) was below 15% for all the measured elements. The testing laboratory was a member of two independent external quality assessment schemes: LAMP organized by the CDC (LAMP: Lead And Multielement Proficiency Program; CDC: Center for Disease Control) and QMEQAS organized by the Institut National de Santé Publique du Québec (QMEQAS: Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme).

2.3. Statistical Analysis

All study participants were assigned to one of four quartiles according to increasing Cu concentrations among the controls. The cut-off levels for the quartiles were used in all calculations. To estimate the association of Cu levels with colorectal cancer occurrence, odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated using univariable conditional logistic regression. The baseline (first quartile) of blood Cu was taken as the

reference group. All statistical calculations were performed using: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/> (R version 4.0.4; accessed on 10 October 2020).

3. Results

Among the 187 controls, the mean blood Cu level was 864 µg/L (range 589 µg/L to 1433 µg/L) and among all cases, the mean blood Cu level was 1031 µg/L (range 657 µg/L to 2043 µg/L). In the overall analysis there was a positive association between blood Cu level and colorectal cancer (Table 2). The odds ratio for those within the highest Cu quartile, compared to the baseline quartile was 12.7 (95% CI: 4.98–32.3; $p < 0.001$).

Table 2. Blood copper levels and CRC occurrence.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 187	Controls <i>n</i> = 187	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	11 (5.9%)	47 (25%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	33 (18%)	46 (25%)	3.34	1.30–8.61	0.012
Q3 855–930 µg/L	26 (14%)	47 (25%)	3.46	1.25–9.56	0.017
Q4 931–2043 µg/L	117 (63%)	47 (25%)	12.7	4.98–32.3	<0.001

Among all women, the mean blood Cu level was 1003 µg/L (range 657 µg/L to 1899 µg/L) and among all men, the mean blood Cu level was 902 µg/L (range 589 µg/L to 2043 µg/L) ($p < 0.001$). The association between Cu level and colon cancer was present for women (Table 3) and for men (Table 4). The odds ratio for a Cu in the highest quartile was stronger in men (OR: 15.1; 95% CI: 4.84–47.2; $p < 0.001$) than in women (OR: 5.25; 95% CI: 1.02–27.0; $p = 0.047$). However, 77% of cases in women and 51% of cases in men had a Cu level in the highest quartile.

Table 3. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among women.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 83	Controls <i>n</i> = 83	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	2 (2.4%)	8 (9.6%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	5 (6.0%)	15 (18%)	0.78	0.11–5.40	0.8
Q3 855–930 µg/L	12 (14%)	25 (30%)	1.17	0.18–7.62	0.9
Q4 931–2043 µg/L	64 (77%)	35 (42%)	5.25	1.02–27.0	0.047

Table 4. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among men.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 104	Controls <i>n</i> = 104	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	9 (8.7%)	39 (38%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	28 (27%)	31 (30%)	4.94	1.59–15.3	0.006
Q3 855–930 µg/L	14 (13%)	22 (21%)	4.56	1.31–15.8	0.017
Q4 931–2043 µg/L	53 (51%)	12 (12%)	15.1	4.84–47.2	<0.001

Cu levels according to cancer characteristics are presented in Table 5. Statistically significant higher mean Cu levels were found for cancer stage III–IV compared to stage I–II ($p < 0.04$) and G3 cancers compared with G1–G2 tumors ($p < 0.001$). There was no difference in metastases or cancer localization.

Table 5. Copper levels by colon cancer characteristics.

Characteristics		<i>n</i>	Mean Copper Level, µg/L (Range)	<i>p</i> -Value
Stage	I–II	101	1002.7 (663.1–1899.3)	0.04
	III–IV	71	1083.7 (657.1–2043.2)	
Grade	G1–G2	123	1000.7 (663.1–1899.3)	<0.001
	G3	33	1149.5 (791.6–2043.2)	
Metastases	No	100	1016.9 (663.1–1899.3)	0.2
	Yes	69	1069.2 (657.1–2043.2)	
Localisation	Colon	81	1048.7 (701.8–1548.7)	0.33
	Rectum/rectosigmoid junction	91	1027.1 (657.1–2043.2)	

The probability of cancer occurrence depending on Cu levels after stratification of individuals into quartiles is presented in Tables 6–13.

Table 6. Blood copper levels and the occurrence of stage I–II colorectal cancer.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 101	Controls <i>n</i> = 101	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	4 (4.0%)	25 (25%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	21 (21%)	25 (25%)	7.11	1.52–33.3	0.013
Q3 855–930 µg/L	13 (13%)	26 (26%)	5.59	1.12–28.0	0.036
Q4 931–2043 µg/L	63 (62%)	25 (25%)	21.0	4.54–97.0	<0.001

Table 7. Blood copper levels and the occurrence of stage III–IV colorectal cancer.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 71	Controls <i>n</i> = 71	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	3 (4.2%)	17 (24%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	10 (14%)	18 (25%)	1.70	0.38–7.56	0.5
Q3 855–930 µg/L	11 (15%)	16 (23%)	2.59	0.53–12.7	0.2
Q4 931–2043 µg/L	47 (66%)	20 (28%)	7.99	2.15–29.7	0.002

Table 8. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among G1–G2 patients.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 123	Controls <i>n</i> = 123	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	7 (5.7%)	29 (24%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	25 (20%)	33 (27%)	4.19	1.15–15.2	0.030
Q3 855–930 µg/L	20 (16%)	30 (24%)	4.76	1.21–18.7	0.026
Q4 931–2043 µg/L	71 (58%)	31 (25%)	13.6	3.80–48.4	<0.001

Table 9. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among G3 patients.

Copper Level	Cases <i>n</i> = 33	Controls <i>n</i> = 33	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Q1 589–768 µg/L	0 (0%)	9 (27%)	NA	NA	NA
Q2 768–854 µg/L	1 (3.0%)	7 (21%)	—	—	
Q3 855–930 µg/L	3 (9.1%)	10 (30%)	2.10	0.21–47.5	0.6
Q4 931–2043 µg/L	29 (88%)	7 (21%)	29.0	4.24–591	0.003

Table 10. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among patients with metastases.

Copper Level	Cases n = 69	Controls n = 69	OR	95% CI	p-Value
Q1 589–768 µg/L	2 (2.9%)	16 (23%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	10 (14%)	18 (26%)	2.64	0.50–14.0	0.3
Q3 855–930 µg/L	13 (19%)	16 (23%)	4.87	0.83–28.7	0.080
Q4 931–2043 µg/L	44 (64%)	19 (28%)	11.8	2.47–56.1	0.002

Table 11. Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer among patients without metastases.

Copper Level	Cases n = 100	Controls n = 100	OR	95% CI	p-Value
Q1 589–768 µg/L	5 (5.0%)	24 (24%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	18 (18%)	26 (26%)	5.41	1.11–26.4	0.037
Q3 855–930 µg/L	12 (12%)	27 (27%)	4.44	0.88–22.5	0.072
Q4 931–2043 µg/L	65 (65%)	23 (23%)	21.4	4.52–101	<0.001

Table 12. Blood copper levels and the occurrence of cancer localized in the colon.

Copper Level	Cases n = 81	Controls n = 81	OR	95% CI	p-Value
Q1 589–768 µg/L	1 (1.2%)	20 (25%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	17 (21%)	27 (33%)	7.55	0.93–61.2	0.058
Q3 855–930 µg/L	9 (11%)	18 (22%)	10.0	1.08–93.4	0.042
Q4 931–2043 µg/L	54 (67%)	16 (20%)	45.1	5.29–386	<0.001

Table 13. Blood copper levels and the occurrence of cancer localized in rectum/rectosigmoid junction.

Copper Level	Cases n = 91	Controls n = 91	OR	95% CI	p-Value
Q1 589–768 µg/L	6 (6.6%)	22 (24%)	—	—	
Q2 768–854 µg/L	13 (14%)	17 (19%)	3.27	0.83–13.0	0.091
Q3 855–930 µg/L	16 (18%)	25 (27%)	3.42	0.82–14.2	0.092
Q4 931–2043 µg/L	56 (62%)	27 (30%)	9.89	2.68–36.5	<0.001

An association was present both for patients with stage I–II colorectal cancer (Table 6) and stage III–IV colorectal cancer (Table 7).

An association was present also for patients with low-grade colon cancer (Table 8) and with high-grade colon cancer (Table 9).

The highest levels of Cu associated with increased frequency of cancer were found irrespective of the occurrence of metastases (Tables 10 and 11).

The copper–cancer association also shows similar characteristics in different cancer localizations (Tables 12 and 13).

4. Discussion

In this retrospective study, we found a strong and significant association between blood Cu level and the occurrence of colorectal cancer in the Polish population. The odds ratio for the highest quartile of blood Cu, compared to the baseline quartile was 12.7 (95% CI: 4.98–32.3; $p < 0.001$). The association was strong for cancers detected at the early stage as well as at late stage and was present irrespective also of grading, metastases and cancer localization.

The odds ratio according to highest quartile was stronger in men than in women—OR: 15.1 vs. 5.25 respectively. There is evidence that blood Cu level in women is dependent on the use of hormones; possibly the higher blood Cu levels in women are caused by

the hormone replacement therapy that is in use by 50% of Polish women above age 50 years [19,20].

Several prior studies have evaluated the association between Cu and colorectal cancer. Tables 14 and 15 summarize these studies. In these studies the research samples were either collected before the onset of the disease (prospective studies) or after diagnosis (case-control studies).

Table 14. Prospective studies on association between copper level and risk of colorectal cancer.

Country	n	Cases (n)	Controls (n)	Material	Time of Material Collection	Mean Cu Level		OR	p	Ref.
						Cases	Controls			
10 European countries (Denmark, France, Germany, Greece, Italy, The Netherlands, Norway, Spain, Sweden, U.K.)	1932	966	966	serum	3.8 years (mean 2.1) before CRC diagnosis	1.39 mg/L	1.36 mg/L	1.50	0.02	Stepień, EPIC 2017 [21]
U.S.	4663	24	4639	serum	up to 2 years before diagnosis	1.24 mg/L	1.19 mg/L	1.71	0.429	Zhang, NHANES 2021 [22]

Table 15. Case-control studies on the association between copper level and occurrence of colorectal cancer.

Country	n	Cases (n)	Controls (n)	Material	Time of Material Collection	Mean Cu Level		p	Ref.
						Cases	Controls		
Iran	80	40	40	blood	at diagnosis	0.82 mg/L	0.61 mg/L	0.03	Ranjbari 2020 [23]
Brasil	74	46	28	plasma	at diagnosis	1.2 mg/L	1.06 mg/L	<0.01	Ribeiro 2016 [24]
India	60	30	30	serum	at diagnosis	1.66 mg/L	0.99 mg/L	<0.001	Gupta 1993 [18]
Iraq	120	90	30	serum	at diagnosis	0.47 mg/L	0.80 mg/L	<0.001	Al-Ansari 2020 [25]
Czech Republic	24	17	7	serum	at diagnosis	0.95 mg/L	1.21 mg/L	0.899	Milde 2001 [26]
Poland	374	187	187	blood	at diagnosis	1.03 mg/L	0.86 mg/L	<0.001	Baszuk 2021

Several previous studies reported positive associations between serum Cu level and colorectal cancer risk or occurrence. The largest study (the EPIC study) identified 966 incidence cases of colorectal cancer in the cohort. These were matched with 966 healthy controls. Blood was taken up to six years prior to diagnosis. Among those who developed colorectal cancer within two years of the blood draw, the odds ratio for a Cu level in the highest quintile compared to the lowest quintile was 4.00 (95% CI: 1.74–9.16). Among those who developed colorectal cancer more than two years after the blood draw, the odds ratio for a Cu level in the highest quintile compared to the lowest quintile was 1.04 (95% CI: 0.69–1.56) [21]. These data suggest that an elevated serum Cu is a biomarker for the presence of existing colorectal cancer rather than a risk factor for the development of cancer. In our study, the blood was taken at the time of diagnosis and the odds ratios were more extreme than those in the EPIC study. It is not clear to what extent the association is present or attenuated if the blood had been taken two years in the past.

In the second prospective study, NHANES there was an association seen between higher Cu level and increased risk of colorectal cancer (OR: 1.71; 95% CI: 0.37–7.88) but this was not statistically significant ($p = 0.4$) [22]. However, there were only 24 cases in the NHANES study and the data were not restricted to those diagnosed shortly after the blood draw.

A significant association between high Cu level and occurrence of colorectal cancer has been reported in other case control studies [18,23–26], but these were much smaller in size (Table 15). There are two small studies with results in contrast to our observations. A significantly lower (<0.001) serum Cu level in CRC patient groups (0.47 mg/L) was observed in a retrospective study of 90 CRC patients and 30 healthy persons (mean serum Cu level: 0.80 mg/L) from Iraq [25]. In a small case-control study from the Moravian region of the Czech Republic, conducted on 17 CRC patients and 7 control subjects, a higher (although not significantly) serum Cu level was found among controls (Cu level 0.95 mg/L vs 1.21 mg/L respectively; $p = 0.899$) [26].

Our data indicate that there are systematic differences in blood Cu levels between colorectal cancer patients and unaffected individuals in the Polish population. A blood Cu level above 900 $\mu\text{g/L}$ was found in 132 of 187 cancer patients (sensitivity = 71%; specificity = 64%) and above 1000 $\mu\text{g/L}$ is detecting 87 of 187 cancer patients (sensitivity = 47%; specificity = 88%).

We reported previously that serum selenium level is also a marker for the occurrence of colorectal cancer [27], however with lower sensitivity and specificity than Cu.

The mechanism(s) that cause Cu levels to increase in the blood/serum of cancer patients is (are) not known. In a mouse model of carcinoma, the occurrence of elevated serum Cu was found to be concomitant with a decrease in Cu within the liver. This suggests that Cu distribution around the body, which is mediated by the liver, may be fundamentally altered by cancer [9,28]. There is still no information on whether cellular transformation to malignancy can drive Cu accumulation, or on the mechanisms by which cells adapt to tolerate the ensuing oxidative pressure [9]. In our case-control study, the Cu measurements were made after the diagnosis of colorectal cancer, although before therapy.

The strengths of our study include a large number of patients from the same geographical region who were diagnosed in the same institution and the blood samples in the cases that were taken shortly after diagnosis but before treatment. A limitation of our study is the relatively small sample size, but the observed associations for Cu levels were strong consistent and highly significant. We did not have information on the use of hormone replacement therapy. The level of blood Cu in the population may vary between countries and the laboratory assays used may also show differences. Therefore it is important to establish norms in each population if blood Cu is to be used as a clinical test.

Our study suggests that blood Cu level may be a marker of colorectal cancer and may be informative in selecting individuals for colonoscopy who might benefit from surveillance for early detection of colorectal cancer. At present, the choice of biomarkers useful for population screening for colonoscopies is very limited. The FIT (fecal immunochemical test) is the most frequently used for screening. The Cologuard[®] stool test with complex targets or Epi ProColon test analyzing SEPT9 methylation in the blood, is prohibitively expensive (USD 600). However, FIT sensitivity is relatively modest (66–74%) [2]. Thus, further research incorporating panels of various biomarkers such as Cu levels might increase sensitivity and specificity.

5. Conclusions

A high blood Cu level ($>900 \mu\text{g/L}$) is associated with a significantly increased occurrence of colorectal cancer in the Polish population. Determination of the level of Cu has the potential as a marker for the selection of patients for further surveillance with colonoscopy.

Author Contributions: Conceptualization, P.B., M.R.L. and J.L.; methodology, P.B., W.M., M.M. and J.L.; software, P.B.; validation, W.M. and M.M.; formal analysis, P.B. and M.R.L.; investigation, P.B., W.M., R.D., M.M., M.R.L., A.J., K.B. and J.K.; resources, M.R.L., A.J., C.C., T.H., J.G., T.D., J.K. and J.L.; data curation, P.B., W.M., R.D., K.B., S.P., J.L. and M.R.L.; writing—original draft preparation, P.B., M.R.L.; S.A.N. and J.L.; writing—review and editing, S.A.N., J.L. and M.R.L.; visualization, P.B., S.P., S.A.N., M.R.L. and J.L.; supervision, J.L. and M.R.L.; project administration, A.J., J.K., M.R.L. and J.L.; funding acquisition, A.J. and J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the National Centre for Research and Development Project: PBS3/B7/26/2015.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Pomeranian Medical University in Szczecin (protocol code KB-0012/73/10).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: J.L. is the CEO of Read-Gene SA. The following authors are part-time employees of Read-Gene SA: P.B., W.M., R.D., C.C., J.G., T.H. and M.M. The other authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Loktionov, A. Biomarkers for Detecting Colorectal Cancer Non-Invasively: DNA, RNA or Proteins? *World J. Gastrointest Oncol.* **2020**, *12*, 124–148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Giannakeas, V.; Narod, S.A. Incidence of Cancer Among Adults With Thrombocytosis in Ontario, Canada. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2120633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Goshen, R.; Mizrahi, B.; Akiva, P.; Kinar, Y.; Choman, E.; Shalev, V.; Sopik, V.; Kariv, R.; Narod, S.A. Predicting the Presence of Colon Cancer in Members of a Health Maintenance Organisation by Evaluating Analytes from Standard Laboratory Records. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 944–950. [\[CrossRef\]](#)
5. Goshen, R.; Choman, E.; Ran, A.; Muller, E.; Kariv, R.; Chodick, G.; Ash, N.; Narod, S.; Shalev, V. Computer-Assisted Flagging of Individuals at High Risk of Colorectal Cancer in a Large Health Maintenance Organization Using the ColonFlag Test. *JCO Clin. Cancer Inf.* **2018**, *2*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Mulware, S.J. Trace Elements and Carcinogenicity: A Subject in Review. *3 Biotech* **2013**, *3*, 85–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Mulware, S.J. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *J. Biophys.* **2013**, *2013*, 192026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Nawi, A.M.; Chin, S.-F.; Azhar Shah, S.; Jamal, R. Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Iran J. Public Health* **2019**, *48*, 632–643.
9. Denoyer, D.; Masaldan, S.; Fontaine, S.L.; Cater, M.A. Targeting Copper in Cancer Therapy: ‘Copper That Cancer’. *Metallomics* **2015**, *7*, 1459–1476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Arredondo, M.; Núñez, M.T. Iron and Copper Metabolism. *Mol. Asp. Med.* **2005**, *26*, 313–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Yoshida, Y.; Furuta, S.; Niki, E. Effects of Metal Chelating Agents on the Oxidation of Lipids Induced by Copper and Iron. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1210*, 81–88. [\[CrossRef\]](#)
12. Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. Trace Elements in Human Physiology and Pathology. Copper. *Biomed. Pharm.* **2003**, *57*, 386–398. [\[CrossRef\]](#)
13. Linder, M.C.; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry and Molecular Biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 797–811. [\[CrossRef\]](#)
14. Schwartz, M.K. Role of Trace Elements in Cancer. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 3481–3487.
15. Gupte, A.; Mumper, R.J. Elevated Copper and Oxidative Stress in Cancer Cells as a Target for Cancer Treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32–46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lener, M.R.; Scott, R.J.; Wiechowska-Kozłowska, A.; Serrano-Fernández, P.; Baszuk, P.; Jaworska-Bieniek, K.; Sukiennicki, G.; Marciniak, W.; Muszyńska, M.; Kładny, J.; et al. Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res. Treat* **2016**, *48*, 1056–1064. [\[CrossRef\]](#)
17. Sharma, K.; Mittal, D.K.; Kesarwani, R.C.; Kamboj, V.P.; Chowdhery. Diagnostic and Prognostic Significance of Serum and Tissue Trace Elements in Breast Malignancy. *Indian J. Med. Sci.* **1994**, *48*, 227–232. [\[PubMed\]](#)
18. Gupta, S.K.; Shukla, V.K.; Vaidya, M.P.; Roy, S.K.; Gupta, S. Serum and Tissue Trace Elements in Colorectal Cancer. *J. Surg. Oncol.* **1993**, *52*, 172–175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Milne, D.B. Copper Intake and Assessment of Copper Status. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 1041–1045. [\[CrossRef\]](#)
20. Bureau, I.; Anderson, R.A.; Arnaud, J.; Raysigui, Y.; Favier, A.E.; Roussel, A.-M. Trace Mineral Status in Post Menopausal Women: Impact of Hormonal Replacement Therapy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2002**, *16*, 9–13. [\[CrossRef\]](#)
21. Stepien, M.; Jenab, M.; Freisling, H.; Becker, N.-P.; Czuban, M.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; Boutron-Ruault, M.-C.; Mancini, F.R.; et al. Pre-Diagnostic Copper and Zinc Biomarkers and Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 699–707. [\[CrossRef\]](#)

22. Zhang, C.; Cheng, R.; Ding, J.; Li, X.; Niu, H.; Li, X. Serum Copper and Zinc Levels and Colorectal Cancer in Adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination 2011–2016. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
23. Ranjbary, A.G.; Mehrzad, J.; Dehghani, H.; Abdollahi, A.; Hosseinkhani, S. Variation in Blood and Colorectal Epithelia's Key Trace Elements Along with Expression of Mismatch Repair Proteins from Localized and Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *194*, 66–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Ribeiro, S.M.d.F.; Moya, A.M.T.M.; Braga, C.B.M.; Domenici, F.A.; Feitosa, M.R.; Feres, O.; Rocha, J.J.R.d.; Cunha, S.F.d.C.d. Copper-Zinc Ratio and Nutritional Status in Colorectal Cancer Patients during the Perioperative Period. *Acta Cir. Bras.* **2016**, *31*, 24–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Al-Ansari, R.F.; Al-Gebori, A.M.; Sulaiman, G.M. Serum Levels of Zinc, Copper, Selenium and Glutathione Peroxidase in the Different Groups of Colorectal Cancer Patients. *Casp. J. Intern. Med.* **2020**, *11*, 384–390. [\[CrossRef\]](#)
26. Milde, D.; Novák, O.; Stuka, V.; Vyslouil, K.; Macháček, J. Serum Levels of Selenium, Manganese, Copper, and Iron in Colorectal Cancer Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *79*, 107–114. [\[CrossRef\]](#)
27. Lener, M.R.; Gupta, S.; Scott, R.J.; Tootsi, M.; Kulp, M.; Tammesoo, M.-L.; Viitak, A.; Metspalu, A.; Serrano-Fernández, P.; Kladny, J.; et al. Can Selenium Levels Act as a Marker of Colorectal Cancer Risk? *BMC Cancer* **2013**, *13*, 214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Majumder, S.; Dutta, P.; Choudhuri, S.K. The Role of Copper in Development of Drug Resistance in Murine Carcinoma. *Med. Chem.* **2005**, *1*, 563–573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

8. Suplement

Tabela S1. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>SOD2</i> rs4880–GG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =23	Liczba zdrowych <i>n</i> =24	OR	95% CI	<i>P</i>
Q1: 0,27–0,67	14 (61%)	5 (21%)	6,92	1,10–61,5	0,051
Q2: 0,68–0,88	2 (8,7%)	7 (29%)	0,70	0,06–7,80	0,8
Q3: 0,92–1,44	5 (22%)	7 (29%)	1,78	0,25–16,4	0,6
Q4: 1,47–7,11	2 (8,7%)	5 (21%)	–	–	–

Tabela S2. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>GSTP1</i> rs1695–AA					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =29	Liczba zdrowych <i>n</i> =31	OR	95% CI	<i>P</i>
Q1: 0,27–0,67	17 (59%)	9 (29%)	5,95	1,29–34,6	0,03
Q2: 0,68–0,88	5 (17%)	8 (26%)	1,55	0,26–10,4	0,6
Q3: 0,92–1,44	4 (14%)	6 (19%)	1,85	0,28–13,5	0,5
Q4: 1,47–7,11	3 (10%)	8 (26%)	–	–	–

Tabela S3. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>NQO1</i> rs1800566–GG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =52	Liczba zdrowych <i>n</i> =52	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	28 (54%)	14 (27%)	5,59	1,75–20,4	0,005
Q2: 0,68–0,88	4 (7,7%)	10 (19%)	1,12	0,23–5,32	0,9
Q3: 0,92–1,44	15 (29%)	14 (27%)	2,99	0,88–11,3	0,089
Q4: 1,47–7,11	5 (9,6%)	14 (27%)	–	–	–

Tabela S4. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>ERCC2</i> rs13181–nonTT					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =63	Liczba zdrowych <i>n</i> =51	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	29 (46%)	10 (20%)	4,65	1,66–14,0	0,004
Q2: 0,68–0,88	8 (13%)	14 (27%)	0,89	0,27–2,85	0,8
Q3: 0,92–1,44	15 (24%)	10 (20%)	2,49	0,83–7,91	0,11
Q4: 1,47–7,11	11 (17%)	17 (33%)	–	–	–

Tabela S5. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *MT1B* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>MT1B</i> rs7191779–nonGG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =54	Liczba zdrowych <i>n</i> =50	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	26 (48%)	11 (22%)	4,27	1,46–13,3	0,009
Q2: 0,68–0,88	7 (13%)	14 (28%)	0,88	0,25–2,99	0,8
Q3: 0,92–1,44	12 (22%)	9 (18%)	2,35	0,72–8,01	0,2
Q4: 1,47–7,11	9 (17%)	16 (32%)	–	–	–

Tabela S6. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>XRCC1</i> rs1799782–CC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =72	Liczba zdrowych <i>n</i> =69	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	34 (47%)	18 (26%)	4,26	1,59–12,3	0,005
Q2: 0,68–0,88	10 (14%)	17 (25%)	1,33	0,42–4,26	0,6
Q3: 0,92–1,44	20 (28%)	16 (23%)	2,81	1,00–8,46	0,056
Q4: 1,47–7,11	8 (11%)	18 (26%)	–	–	–

Tabela S7. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *MT1B* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>MT1B</i> rs7191779–GG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =29	Liczba zdrowych <i>n</i> =28	OR	95% CI	<i>P</i>
Q1: 0,27–0,67	14 (48%)	9 (32%)	3,31	0,52–28,3	0,2
Q2: 0,68–0,88	4 (14%)	5 (18%)	1,83	0,21–19,9	0,6
Q3: 0,92–1,44	9 (31%)	10 (36%)	2,01	0,29–18,3	0,5
Q4: 1,47–7,11	2 (6,9%)	4 (14%)	–	–	–

Tabela S8. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>ABCB1</i> rs2032582–nonCC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =54	Liczba zdrowych <i>n</i> =46	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	26 (48%)	10 (22%)	3,16	1,05–9,96	0,043
Q2: 0,68–0,88	7 (13%)	12 (26%)	0,71	0,20–2,48	0,6
Q3: 0,92–1,44	11 (20%)	12 (26%)	1,07	0,33–3,51	>0,9
Q4: 1,47–7,11	10 (19%)	12 (26%)	–	–	–

Tabela S9. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>SOD2</i> rs4880–nonGG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =60	Liczba zdrowych <i>n</i> =54	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	26 (43%)	15 (28%)	2,99	1,06–8,91	0,043
Q2: 0,68–0,88	9 (15%)	12 (22%)	1,28	0,38–4,35	0,7
Q3: 0,92–1,44	16 (27%)	12 (22%)	2,30	0,75–7,32	0,15
Q4: 1,47–7,11	9 (15%)	15 (28%)	–	–	–

Tabela S10. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>GSTP1</i> rs1695–nonAA					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =54	Liczba zdrowych <i>n</i> =47	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	23 (43%)	11 (23%)	2,96	0,94–9,87	0,069
Q2: 0,68–0,88	6 (11%)	11 (23%)	0,75	0,19–2,92	0,7
Q3: 0,92–1,44	17 (31%)	13 (28%)	1,92	0,60–6,41	0,3
Q4: 1,47–7,11	8 (15%)	12 (26%)	–	–	–

Tabela S11. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>NQO1</i> rs1800566–nonGG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =31	Liczba zdrowych <i>n</i> =26	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	12 (39%)	6 (23%)	2,03	0,45–9,68	0,4
Q2: 0,68–0,88	7 (23%)	9 (35%)	0,77	0,16–3,71	0,7
Q3: 0,92–1,44	6 (19%)	5 (19%)	1,15	0,22–6,27	0,9
Q4: 1,47–7,11	6 (19%)	6 (23%)	–	–	–

Tabela S12. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>GPX1</i> rs1050450–nonCC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =48	Liczba zdrowych <i>n</i> =45	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	22 (46%)	16 (36%)	1,96	0,53–7,79	0,3
Q2: 0,68–0,88	6 (12%)	11 (24%)	0,79	0,17–3,76	0,8
Q3: 0,92–1,44	15 (31%)	11 (24%)	1,93	0,49–8,14	0,4
Q4: 1,47–7,11	5 (10%)	7 (16%)	–	–	–

Tabela S13. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>CRTC3</i> rs12915189–GG					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=47	Liczba zdrowych <i>n</i>=43	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	19 (40%)	15 (35%)	1,58	0,47–5,53	0,5
Q2: 0,68–0,88	7 (15%)	7 (16%)	1,39	0,33–5,99	0,7
Q3: 0,92–1,44	14 (30%)	11 (26%)	1,71	0,49–6,21	0,4
Q4: 1,47–7,11	7 (15%)	10 (23%)	–	–	–

Tabela S14. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>CAT</i> rs1001179–CC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=48	Liczba zdrowych <i>n</i>=49	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	20 (42%)	15 (31%)	1,56	0,50–4,99	0,4
Q2: 0,68–0,88	7 (15%)	12 (24%)	0,63	0,16–2,34	0,5
Q3: 0,92–1,44	12 (25%)	12 (24%)	1,12	0,33–3,85	0,9
Q4: 1,47–7,11	9 (19%)	10 (20%)	–	–	–

Tabela S15. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>XRCC1</i> rs1799782–nonCC					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =11	Liczba zdrowych <i>n</i> =9	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	6 (55%)	2 (22%)	–	–	–
Q2: 0,68–0,88	1 (9,1%)	2 (22%)	–	–	–
Q3: 0,92–1,44	1 (9,1%)	3 (33%)	–	–	–
Q4: 1,47–7,11	3 (27%)	2 (22%)	–	–	–

Tabela S16. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2* i stężenia arsenu we krwi u kobiet.

<i>ERCC2</i> rs13181–TT					
Stężenie As we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =20	Liczba zdrowych <i>n</i> =27	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 0,27–0,67	11 (55%)	10 (37%)	–	–	–
Q2: 0,68–0,88	3 (15%)	5 (19%)	–	–	–
Q3: 0,92–1,44	6 (30%)	9 (33%)	–	–	–
Q4: 1,47–7,11	0 (0%)	3 (11%)	–	–	–

Tabela S17. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1* u kobiet.

<i>ABCB1</i> rs2032582						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	61 (38%)	29 (35%)	32 (41%)	–	–	–
nonCC	100 (62%)	54 (65%)	46 (59%)	1,30	0,68–2,46	0,4

Tabela S18. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT* u kobiet.

<i>CAT</i> rs1001179						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	97 (60%)	48 (58%)	49 (63%)	–	–	–
nonCC	64 (40%)	35 (42%)	29 (37%)	1,23	0,65–2,33	0,5

Tabela S19. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1* u kobiet.

<i>GSTP1</i> rs1695						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
AA	60 (37%)	29 (35%)	31 (40%)	–	–	–
nonAA	101 (63%)	54 (65%)	47 (60%)	1,23	0,65–2,34	0,5

Tabela S20. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1* u kobiet.

<i>NQO1</i> rs1800566						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	104 (65%)	52 (63%)	52 (67%)	–	–	–
nonGG	57 (35%)	31 (37%)	26 (33%)	1,19	0,62–2,29	0,6

Tabela S21. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1* u kobiet.

<i>XRCC1</i> rs1799782						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	141 (88%)	72 (87%)	69 (88%)	–	–	–
nonCC	20 (12%)	11 (13%)	9 (12%)	1,17	0,46–3,07	0,7

Tabela S22. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2* u kobiet.

<i>SOD2</i> rs4880						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	47 (29%)	23 (28%)	24 (31%)	–	–	–
nonGG	114 (71%)	60 (72%)	54 (69%)	1,16	0,59–2,30	0,7

Tabela S23. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *MT1B* u kobiet.

<i>MT1B</i> rs7191779						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	57 (35%)	29 (35%)	28 (36%)	–	–	–
nonGG	104 (65%)	54 (65%)	50 (64%)	1,04	0,55–1,99	0,9

Tabela S24. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1* u kobiet.

<i>GPX1</i> rs105045						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	68 (42%)	35 (42%)	33 (42%)	–	–	–
nonCC	93 (58%)	48 (58%)	45 (58%)	1,01	0,54–1,88	>0,9

Tabela S25. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3* u kobiet.

<i>CRTC3</i> rs12915189						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	90 (56%)	47 (57%)	43 (55%)	–	–	–
nonGG	71 (44%)	36 (43%)	35 (45%)	0,94	0,50–1,76	0,8

Tabela S26. Liczba osób z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2* u kobiet.

<i>ERCC2</i> rs13181						
Genotyp	Łącznie	Chorzy	Zdrowi	OR	95% CI	<i>p</i>
nonTT	114 (71%)	63 (76%)	51 (65%)	–	–	–
TT	47 (29%)	20 (24%)	27 (35%)	0,60	0,30–1,19	0,14

Tabela S27. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2* i stężenia miedzi we krwi.

<i>ERCC2</i> rs13181–nonTT					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =92	Liczba zdrowych <i>n</i> =92	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	6 (6,5%)	23 (25%)	–	–	–
Q2: 768–854	13 (14%)	22 (24%)	2,63	0,67–10,3	0,2
Q3: 855–930	13 (14%)	20 (22%)	3,72	0,85–16,2	0,081
Q4: 931–2 043	60 (65%)	27 (29%)	11,1	2,97–41,3	<0,001

Tabela S28. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>NQO1</i> rs1800566–GG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =86	Liczba zdrowych <i>n</i> =86	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	7 (8,1%)	24 (28%)	–	–	–
Q2: 768–854	14 (16%)	15 (17%)	2,92	0,88–9,64	0,079
Q3: 855–930	8 (9,3%)	21 (24%)	1,66	0,37–7,34	0,5
Q4: 931–2 043	57 (66%)	26 (30%)	7,68	2,38–24,8	<0,001

Tabela S29. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>GPX1</i> rs1050450–CC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =40	Liczba zdrowych <i>n</i> =40	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	4 (10%)	10 (25%)	–	–	–
Q2: 768–854	9 (22%)	9 (22%)	1,93	0,41–9,19	0,4
Q3: 855–930	4 (10%)	12 (30%)	0,95	0,16–5,71	>0,9
Q4: 931–2 043	23 (57%)	9 (22%)	5,24	1,14–24,0	0,033

Tabela S30. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3* i stężenia miedzi we krwi.

<i>CRTC3</i> rs12915189–GG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=53	Liczba zdrowych <i>n</i>=53	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	8 (15%)	14 (26%)	–	–	–
Q2: 768–854	6 (11%)	13 (25%)	0,80	0,23–2,84	0,7
Q3: 855–930	8 (15%)	12 (23%)	1,31	0,30–5,76	0,7
Q4: 931–2 043	31 (58%)	14 (26%)	4,56	1,32–15,7	0,016

Tabela S31. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>ABCB1</i> rs2032582–CC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=31	Liczba zdrowych <i>n</i>=31	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	3 (9,7%)	8 (26%)	–	–	–
Q2: 768–854	4 (13%)	8 (26%)	1,10	0,18–6,88	>0,9
Q3: 855–930	5 (16%)	6 (19%)	1,62	0,28–9,31	0,6
Q4: 931–2 043	19 (61%)	9 (29%)	3,54	0,86–14,6	0,080

Tabela S32. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>GSTP1</i> rs1695-AA					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=28	Liczba zdrowych <i>n</i>=28	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	3 (11%)	6 (21%)	–	–	–
Q2: 768–854	8 (29%)	6 (21%)	2,70	0,36–19,9	0,3
Q3: 855–930	4 (14%)	7 (25%)	1,43	0,18–11,1	0,7
Q4: 931–2 043	13 (46%)	9 (32%)	2,43	0,44–13,3	0,3

Tabela S33. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>GPX1</i> rs105045-nonCC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i>=51	Liczba zdrowych <i>n</i>=51	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	2 (3,9%)	11 (22%)	–	–	–
Q2: 768–854	6 (12%)	14 (27%)	–	–	–
Q3: 855–930	8 (16%)	14 (27%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	35 (69%)	12 (24%)	–	–	–

Tabela S34. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2* i stężenia miedzi we krwi.

<i>SOD2</i> rs4880–GG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =14	Liczba zdrowych <i>n</i> =14	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	1 (7,1%)	6 (43%)	–	–	–
Q2: 768–854	2 (14%)	1 (7,1%)	–	–	–
Q3: 855–930	5 (36%)	5 (36%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	6 (43%)	2 (14%)	–	–	–

Tabela S35. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT* i stężenia miedzi we krwi.

<i>CAT</i> rs1001179–nonCC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =32	Liczba zdrowych <i>n</i> =32	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	1 (3,1%)	10 (31%)	–	–	–
Q2: 768–854	6 (19%)	7 (22%)	–	–	–
Q3: 855–930	2 (6,2%)	7 (22%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	23 (72%)	8 (25%)	–	–	–

Tabela S36. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>XRCC1</i> rs1799782–nonCC					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =2	Liczba zdrowych <i>n</i> =2	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	0 (0%)	1 (50%)	–	–	–
Q2: 768–854	0 (0%)	0 (0%)	–	–	–
Q3: 855–930	1 (50%)	1 (50%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	1 (50%)	0 (0%)	–	–	–

Tabela S37. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2* i stężenia miedzi we krwi.

<i>ERCC2</i> rs13181–TT					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =21	Liczba zdrowych <i>n</i> =21	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	1 (4,8%)	4 (19%)	–	–	–
Q2: 768–854	3 (14%)	5 (24%)	–	–	–
Q3: 855–930	2 (9,5%)	4 (19%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	15 (71%)	8 (38%)	–	–	–

Tabela S38. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1* i stężenia miedzi we krwi.

<i>NQO1</i> rs1800566–nonGG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =23	Liczba zdrowych <i>n</i> =23	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	0 (0%)	5 (22%)	–	–	–
Q2: 768–854	7 (30%)	9 (39%)	–	–	–
Q3: 855–930	1 (4,3%)	5 (22%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	15 (65%)	4 (17%)	–	–	–

Tabela S39. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3* i stężenia miedzi we krwi.

<i>CRTC3</i> rs12915189–nonGG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =36	Liczba zdrowych <i>n</i> =36	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	2 (5,6%)	6 (17%)	–	–	–
Q2: 768–854	11 (31%)	13 (36%)	–	–	–
Q3: 855–930	3 (8,3%)	12 (33%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	20 (56%)	5 (14%)	–	–	–

Tabela S40. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *MT1B* i stężenia miedzi we krwi.

<i>MT1B</i> rs7191779–GG					
Stężenie Cu we krwi (µg/L)	Liczba chorych <i>n</i> =19	Liczba zdrowych <i>n</i> =19	OR	95% CI	<i>p</i>
Q1: 589–768	0 (0%)	5 (26%)	–	–	–
Q2: 768–854	2 (11%)	3 (16%)	–	–	–
Q3: 855–930	3 (16%)	6 (32%)	–	–	–
Q4: 931–2 043	14 (74%)	5 (26%)	–	–	–

Tabela S41. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *NQO1*.

<i>NQO1</i> rs1800566						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	250 (67%)	119 (64%)	131 (70%)	–	–	–
nonGG	124 (33%)	68 (36%)	56 (30%)	1,36	0,87–2,14	0,2

Tabela S42. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *SOD2*.

<i>SOD2</i> rs4880						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	111 (30%)	50 (27%)	61 (33%)	–	–	–
nonGG	263 (70%)	137 (73%)	126 (67%)	1,31	0,85–2,02	0,2

Tabela S43. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GPX1*.

<i>GPX1</i> rs105045						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	176 (47%)	84 (45%)	92 (49%)	–	–	–
nonCC	198 (53%)	103 (55%)	95 (51%)	1,18	0,79–1,77	0,4

Tabela S44. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ERCC2*.

<i>ERCC2</i> rs13181						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
nonTT	258 (69%)	126 (67%)	132 (71%)	–	–	–
TT	116 (31%)	61 (33%)	55 (29%)	1,18	0,74–1,86	0,5

Tabela S45. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *MT1B*.

<i>MT1B</i> rs7191779						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	115 (31%)	55 (29%)	60 (32%)	–	–	–
nonGG	259 (69%)	132 (71%)	127 (68%)	1,14	0,73–1,78	0,6

Tabela S46. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CAT*.

<i>CAT</i> rs1001179						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	232 (62%)	116 (62%)	116 (62%)	–	–	–
nonCC	142 (38%)	71 (38%)	71 (38%)	1,00	0,64–1,56	>0,9

Tabela S47. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *CRTC3*.

<i>CRTC3</i> rs12915189						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
GG	204 (55%)	104 (56%)	100 (53%)	–	–	–
nonGG	170 (45%)	83 (44%)	87 (47%)	0,92	0,62–1,37	0,7

Tabela S48. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *XRCC1*.

<i>XRCC1</i> rs1799782						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	332 (89%)	167 (89%)	165 (88%)	–	–	–
nonCC	42 (11%)	20 (11%)	22 (12%)	0,90	0,48–1,70	0,7

Tabela S49. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *GSTP1*.

<i>GSTP1</i> rs1695						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
AA	157 (42%)	82 (44%)	75 (40%)	–	–	–
nonAA	217 (58%)	105 (56%)	112 (60%)	0,87	0,59–1,29	0,5

Tabela S50. Liczba osób (niezależnie od płci) z rakiem jelita grubego i osób zdrowych w zależności od polimorfizmu genu *ABCB1*.

<i>ABCB1</i> rs2032582						
Genotyp	Łącznie	Liczba chorych	Liczba zdrowych	OR	95% CI	<i>p</i>
CC	136 (36%)	71 (38%)	65 (35%)	–	–	–
nonCC	238 (64%)	116 (62%)	122 (65%)	0,85	0,54–1,34	0,5

9. Streszczenie

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów występujących u mężczyzn i kobiet. Istnieje kilka sposobów wykrywania wczesnego raka jelita grubego, w tym badanie w kale lub krwi odpowiednich markerów (białek; DNA; mRNA i długich niekodujących RNA; mikroRNA; metabolitów i mikrobiomu jelit, płytek krwi), a także algorytmy wykorzystujące techniki uczenia maszynowego. Do inwazyjnych metod wczesnej diagnostyki raka jelita grubego należą: kolonoskopia, sigmoidoskopia oraz kolonografia oparta na tomografii komputerowej. Istnieje potrzeba identyfikacji nowych markerów do potencjalnego wykorzystania we wczesnej diagnostyce raka jelita grubego. W ciągu ostatnich dziesięcioleci jednym z badanych zagadnień jest wpływ pierwiastków oraz dziedziczonych zmian w obrębie genów na ryzyko i występowanie raka.

W niniejszej pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy stężenie arsenu i/lub miedzi we krwi osobno lub w połączeniu z określonymi polimorfizmami genów może być wykorzystywane jako marker występowania raka jelita grubego?

Retrospektywne badania „*case-control*” przeprowadzono u 187 osób obu płci z rozpoznaniem raka jelita grubego oraz równolicznej grupie kontrolnej. Od wszystkich osób włączonych do badań uzyskano pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniach naukowych oraz informacje na temat wieku, płci, statusu palenia tytoniu oraz rodzinnej historii zachorowania na nowotwory złośliwe, a od osób chorych dodatkowo dane kliniczne odnośnie raka jelita grubego. Od każdego uczestnika badania pobrano krew obwodową przed leczeniem do pomiaru poziomu arsenu i miedzi metodą spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS) oraz próbkę krwi do analiz DNA. Genotypowanie dziesięciu wybranych SNP-ów w obrębie dziesięciu genów: rs13181 w *ERCC2*, rs1799782 w *XRCC1*, rs7191779 w *MT1B*, rs1695 w *GSTP1*, rs2032582 w *ABCB1*, rs1800566 w *NQO1*, rs12915189 w *CRTC3*, rs1050450 w *GPX1*, rs4880 w *SOD2* i rs1001179 w *CAT* przeprowadzono przy użyciu wcześniej zaprojektowanego testu genotypowania opartego o sondy TaqMan. Oszacowano związek pomiędzy stężeniem arsenu, miedzi we krwi lub stężeniem arsenu, miedzi i określonymi genotypami a częstością występowania raka jelita grubego. Uczestnicy badania zostali przypisani do jednej z czterech, uszeregowanych rosnąco pod względem stężenia badanych pierwiastków ćwiartek. Analizę statystyczną wykonano przy wykorzystaniu modelu regresji logistycznej opartego o środowisko programistyczno-statystyczne „R”.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że niskie stężenie arsenu we krwi (0,27–0,67µg/L) wiązało się ze zwiększoną częstością występowania raka jelita grubego u kobiet (OR: 3,69; $p=0,005$). Ta asocjacja była silniejsza u kobiet należących do ćwiartki z najniższym stężeniem arsenu będących jednocześnie nosicielkami określonych polimorfizmów genów: *CAT* rs1001179–nonCC (OR: 19,4; $p=0,001$); *ABCB1* rs2032582–CC (OR: 14,8; $p=0,024$); *GPX1* rs1050450–CC (OR: 11,6; $p=0,002$) i *CRTC3* rs12915189–nonGG (OR: 10,3; $p=0,003$).

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano również, że wysokie stężenie miedzi we krwi (931–2 043µg/L) związane jest ze zwiększoną częstością występowania raka jelita grubego (OR: 12,7; 95% CI: 4,98–32,3; $p<0,001$). Obserwowana asocjacja była silniejsza u osób należących do ćwiartki z najwyższym stężeniem miedzi będących jednocześnie nosicielkami polimorfizmów genów: *ABCB1* rs2032582–nonCC (OR: 33,7; 95% CI: 4,04–281; $p=0,001$); *MT1B* rs7191779–nonGG (OR: 16,6; 95% CI: 3,32–83,4; $p<0,001$); *CAT* rs1001179–CC (OR: 16,1; 95% CI: 3,68–70,7; $p<0,001$); *SOD2* rs4880–nonGG (OR: 15,9; 95% CI: 3,27–77,0; $p<0,001$); *GSTP1* rs1695–nonAA (OR: 15,9; 95% CI: 1,54–164; $p=0,02$) i *XRCC1* rs1799782–CC (OR: 15,6; 95% CI: 5,00–48,5; $p<0,001$).

W wyniku przeprowadzonych prac sformułowano następujące wnioski:

1. Stężenie arsenu we krwi poniżej 0,67µg/L może być związane ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego u kobiet.
2. Stężenie miedzi we krwi powyżej 900µg/L może być związane ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego niezależnie od płci.
3. Oznaczenie stężeń arsenu i miedzi we krwi może stanowić marker selekcji pacjentów do dalszej diagnostyki raka jelita grubego.
4. Efekt selekcji kobiet do diagnostyki raka jelita grubego na podstawie oceny stężenia arsenu we krwi może być zwiększony w podgrupach nosicielek polimorfizmów w obrębie takich genów jak: *CAT* rs1001179–nonCC, *ABCB1* rs2032582–CC, *GPX1* rs1050450–CC, *CRTC3* rs12915189–nonGG.
5. Efekt selekcji osób (niezależnie od płci) do diagnostyki raka jelita grubego na podstawie oceny stężenia miedzi we krwi może być zwiększony w podgrupach nosicieli polimorfizmów takich genów jak: *ABCB1* rs2032582–nonCC, *MT1B* rs7191779–nonGG, *CAT* rs1001179–CC, *SOD2* rs4880–nonGG, *GSTP1* rs1695–nonAA, *XRCC1* rs1799782–CC.

10. Summary

Colorectal cancer is one of the most common types of cancer in both men and women. There are several approaches to detect early colorectal cancer including testing relevant markers in stool or blood (proteins; DNA; mRNA and long non-coding RNA; microRNA; metabolites, gut microbiome and platelets) as well as algorithms using machine learning techniques. Invasive methods of early detection of colorectal cancer include: colonoscopy, sigmoidoscopy and colonography based on computed tomography. There is a need to identify new markers for early detection of colorectal cancer. The influence of elements and inherited changes in genes on cancer risk and incidence has been one of the issues studied in the last decades.

In this study we examined whether blood arsenic and/or copper levels combined with specific polymorphisms can be used as a marker for colorectal cancer detection.

A retrospective case-control studies were performed among 187 colorectal cancer patients and 187 matched controls. All participants provided written informed consent to be enrolled into the following study. Information about: age, sex, smoking status and familial aggregation of cancer was obtained from all participants. All diagnosed participants were asked about additional clinical data related with colorectal cancer. From each study participant pre-treatment peripheral blood was collected for arsenic and copper level measurements using inductively coupled-plasma mass spectrometry (ICP-MS) and for genotyping. Selected variants in ten genes were genotyped: rs13181 in *ERCC2*, rs1799782 in *XRCC1*, rs7191779 in *MT1B*, rs1695 in *GSTP1*, rs2032582 in *ABCB1*, rs1800566 in *NQO1*, rs12915189 in *CRTC3*, rs1050450 in *GPX1*, rs4880 in *SOD2*, and rs1001179 in *CAT*. Analyses were performed using a pre-designed test based on TaqMan probes. The association of arsenic and copper levels or arsenic and copper levels and selected genotypes with colorectal cancer occurrence has been estimated. All study individuals were assigned to one of four subgroups (quartiles) according to increasing elements levels. All statistical calculations were performed using R: A language and environment for statistical computing.

According to the study results – a low blood arsenic level (0.27–0.67µg/L) was associated with an increased frequency of colorectal cancer among women (OR: 3.69; $p=0.005$). This correlation was significantly greater among women carrying functional polymorphisms: *CAT* rs1001179–nonCC (OR: 19.4; $p=0.001$); *ABCB1* rs2032582–CC (OR: 14.8; $p=0.024$); *GPX1* rs1050450–CC (OR: 11.6; $p=0.002$) and *CRTC3* rs12915189–nonGG (OR: 10.3; $p=0.003$).

As a result of the research performed, it was also observed that high blood copper level (931–2043µg/L) is associated with an increased incidence of colorectal cancer (OR: 12.7; 95% CI: 4.98–32.3; $p<0.001$). This correlation was significantly greater among study participants carrying particular gene variants: *ABCB1* rs2032582–nonCC (OR: 33.7; 95% CI: 4.04–281; $p=0.001$); *MT1B* rs7191779–nonGG (OR: 16.6; 95% CI: 3.32–83.4; $p<0.001$); *CAT* rs1001179–CC (OR: 16.1; 95% CI: 3.68–70.7; $p<0.001$); *SOD2* rs4880–nonGG (OR: 15.9; 95% CI: 3.27–77.0; $p<0.001$); *GSTP1* rs1695–nonAA (OR: 15.9; 95% CI: 1.54–164; $p=0.02$) and *XRCC1* rs1799782–CC (OR: 15.6; 95% CI: 5.00–48.5; $p<0.001$).

Based on above studies the conclusions were as follows:

1. Blood arsenic level below 0.67µg/L can be associated with increased colorectal cancer occurrence among women.
2. Blood copper level above 900µg/L can be associated with increased colorectal cancer occurrence regardless of sex.
3. Blood arsenic and copper level measurements can be valuable marker in order to select patients for further colorectal cancer diagnostics.
4. Selection effect of women for colorectal cancer diagnosis based on blood arsenic level may be stronger in subgroups of individuals with particular gene polymorphisms: *CAT* rs1001179–nonCC, *ABCB1* rs2032582–CC, *GPX1* rs1050450CC, *CRTC3* rs12915189–nonGG.
5. Selection effect regardless of sex for colorectal cancer diagnosis based on blood copper level may be stronger in subgroups of individuals with particular gene polymorphisms: *ABCB1* rs2032582–nonCC, *MT1B* rs7191779–nonGG, *CAT* rs1001179–CC, *SOD2* rs4880–nonGG, *GSTP1* rs1695–nonAA, *XRCC1* rs1799782–CC.

11. Piśmiennictwo

- [1] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] Didkowska, J.; Wojciechowska, U.; Olasek, P.; Caerano dos Santos, F.; Michałek, I. Nowotwory Złośliwe w Polsce w 2019 Roku.
- [3] Weitz, J.; Koch, M.; Debus, J.; Höhler, T.; Galle, P. R.; Büchler, M. W. Colorectal Cancer. *Lancet Lond. Engl.* **2005**, *365* (9454), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17706-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17706-X).
- [4] Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C. P. Colorectal Cancer. *Lancet Lond. Engl.* **2014**, *383* (9927), 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
- [5] Taylor, D. P.; Burt, R. W.; Williams, M. S.; Haug, P. J.; Cannon-Albright, L. A. Population-Based Family History-Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach. *Gastroenterology* **2010**, *138* (3), 877–885. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.044>.
- [6] Jess, T.; Rungoe, C.; Peyrin-Biroulet, L. Risk of Colorectal Cancer in Patients with Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2012**, *10* (6), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.01.010>.
- [7] Liang, P. S.; Chen, T.-Y.; Giovannucci, E. Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Incidence and Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Cancer* **2009**, *124* (10), 2406–2415. <https://doi.org/10.1002/ijc.24191>.
- [8] Fedirko, V.; Tramacere, I.; Bagnardi, V.; Rota, M.; Scotti, L.; Islami, F.; Negri, E.; Straif, K.; Romieu, I.; La Vecchia, C.; Boffetta, P.; Jenab, M. Alcohol Drinking and Colorectal Cancer Risk: An Overall and Dose-Response Meta-Analysis of Published Studies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2011**, *22* (9), 1958–1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>.
- [9] Chan, D. S. M.; Lau, R.; Aune, D.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *PloS One* **2011**, *6* (6), e20456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456>.
- [10] Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Zhang, P.; Shi, C.; Zou, Y.; Qin, H. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PloS One* **2013**, *8* (1), e53916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053916>.
- [11] Jiang, Y.; Ben, Q.; Shen, H.; Lu, W.; Zhang, Y.; Zhu, J. Diabetes Mellitus and Incidence and Mortality of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Eur. J. Epidemiol.* **2011**, *26* (11), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9617-y>.
- [12] Sonnenberg, A.; Genta, R. M. Helicobacter Pylori Is a Risk Factor for Colonic Neoplasms. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108* (2), 208–215. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.407>.
- [13] Kostic, A. D.; Gevers, D.; Pedamallu, C. S.; Michaud, M.; Duke, F.; Earl, A. M.; Ojesina, A. I.; Jung, J.; Bass, A. J.; Tabernero, J.; Baselga, J.; Liu, C.; Shivdasani, R. A.; Ogino, S.; Birren, B. W.; Huttenhower, C.; Garrett, W. S.; Meyerson, M. Genomic Analysis Identifies Association of Fusobacterium with Colorectal Carcinoma. *Genome Res.* **2012**, *22* (2), 292–298. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>.
- [14] Boleij, A.; van Gelder, M. M. H. J.; Swinkels, D. W.; Tjalsma, H. Clinical Importance of Streptococcus Gallolyticus Infection among Colorectal Cancer Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2011**, *53* (9), 870–878. <https://doi.org/10.1093/cid/cir609>.
- [15] Boyle, T.; Keegel, T.; Bull, F.; Heyworth, J.; Fritschi, L. Physical Activity and Risks of Proximal and Distal Colon Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2012**, *104* (20), 1548–1561. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs354>.

- [16] Lin, K. J.; Cheung, W. Y.; Lai, J. Y.-C.; Giovannucci, E. L. The Effect of Estrogen vs. Combined Estrogen-Progestogen Therapy on the Risk of Colorectal Cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, *130* (2), 419–430. <https://doi.org/10.1002/ijc.26026>.
- [17] Bosetti, C.; Rosato, V.; Gallus, S.; Cuzick, J.; La Vecchia, C. Aspirin and Cancer Risk: A Quantitative Review to 2011. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2012**, *23* (6), 1403–1415. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds113>.
- [18] Rothwell, P. M.; Fowkes, F. G. R.; Belch, J. F. F.; Ogawa, H.; Warlow, C. P.; Meade, T. W. Effect of Daily Aspirin on Long-Term Risk of Death Due to Cancer: Analysis of Individual Patient Data from Randomised Trials. *Lancet Lond. Engl.* **2011**, *377* (9759), 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62110-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62110-1).
- [19] Brenner, H.; Chang-Claude, J.; Seiler, C. M.; Rickert, A.; Hoffmeister, M. Protection from Colorectal Cancer after Colonoscopy: A Population-Based, Case-Control Study. *Ann. Intern. Med.* **2011**, *154* (1), 22–30. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-1-201101040-00004>.
- [20] Elmunzer, B. J.; Hayward, R. A.; Schoenfeld, P. S.; Saini, S. D.; Deshpande, A.; Waljee, A. K. Effect of Flexible Sigmoidoscopy-Based Screening on Incidence and Mortality of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS Med.* **2012**, *9* (12), e1001352. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001352>.
- [21] Aune, D.; Chan, D. S. M.; Lau, R.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T. Dietary Fibre, Whole Grains, and Risk of Colorectal Cancer: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *BMJ* **2011**, *343*, d6617. <https://doi.org/10.1136/bmj.d6617>.
- [22] Aune, D.; Lau, R.; Chan, D. S. M.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T. Nonlinear Reduction in Risk for Colorectal Cancer by Fruit and Vegetable Intake Based on Meta-Analysis of Prospective Studies. *Gastroenterology* **2011**, *141* (1), 106–118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.013>.
- [23] Aune, D.; Lau, R.; Chan, D. S. M.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T. Dairy Products and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2012**, *23* (1), 37–45. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr269>.
- [24] Wu, S.; Feng, B.; Li, K.; Zhu, X.; Liang, S.; Liu, X.; Han, S.; Wang, B.; Wu, K.; Miao, D.; Liang, J.; Fan, D. Fish Consumption and Colorectal Cancer Risk in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Med.* **2012**, *125* (6), 551–559.e5. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.01.022>.
- [25] Lochhead, P.; Chan, A. T. Statins and Colorectal Cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2013**, *11* (2), 109–e14. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.08.037>.
- [26] Pino, M. S.; Chung, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2059–2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- [27] Boland, C. R.; Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2073–2087.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>.
- [28] Niv, Y. Microsatellite Instability and MLH1 Promoter Hypermethylation in Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13* (12), 1767–1769. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i12.1767>.
- [29] Muzny, D. M.; Bainbridge, M. N.; Chang, K.; Dinh, H. H.; Drummond, J. A.; Fowler, G.; Kovar, C. L.; Lewis, L. R.; Morgan, M. B.; Newsham, I. F.; Reid, J. G.; Santibanez, J.; Shinbrot, E.; Trevino, L. R.; Wu, Y.-Q.; Wang, M.; Gunaratne, P.; Donehower, L. A.; Creighton, C. J.; Wheeler, D. A.; Gibbs, R. A.; Lawrence, M. S.; Voet, D.; Jing, R.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Stojanov, P.; McKenna, A.; Lander, E. S.; Gabriel, S.; Getz, G.; Ding, L.; Fulton, R. S.; Koboldt, D. C.; Wylie, T.; Walker, J.; Dooling, D. J.; Fulton, L.; Delehaunty, K. D.; Fronick, C. C.; Demeter, R.; Mardis, E. R.; Wilson, R. K.; Chu, A.; Chun, H.-J. E.; Mungall, A. J.; Pleasance, E.; Gordon Robertson, A.; Stoll, D.; Balasundaram, M.; Birol, I.; Butterfield, Y. S. N.; Chuah, E.; Coope, R. J. N.; Dhalla, N.;

- Guin, R.; Hirst, C.; Hirst, M.; Holt, R. A.; Lee, D.; Li, H. I.; Mayo, M.; Moore, R. A.; Schein, J. E.; Slobodan, J. R.; Tam, A.; Thiessen, N.; Varhol, R.; Zeng, T.; Zhao, Y.; Jones, S. J. M.; Marra, M. A.; Bass, A. J.; Ramos, A. H.; Saksena, G.; Cherniack, A. D.; Schumacher, S. E.; Tabak, B.; Carter, S. L.; Pho, N. H.; Nguyen, H.; Onofrio, R. C.; Crenshaw, A.; Ardlie, K.; Beroukhim, R.; Winckler, W.; Getz, G.; Meyerson, M.; Protopopov, A.; Zhang, J.; Hadjipanayis, A.; Lee, E.; Xi, R.; Yang, L.; Ren, X.; Zhang, H.; Sathiamoorthy, N.; Shukla, S.; Chen, P.-C.; Haseley, P.; Xiao, Y.; Lee, S.; Seidman, J.; Chin, L.; Park, P. J.; Kucherlapati, R.; Todd Auman, J.; Hoadley, K. A.; Du, Y.; Wilkerson, M. D.; Shi, Y.; Liquori, C.; Meng, S.; Li, L.; Turman, Y. J.; Topal, M. D.; Tan, D.; Waring, S.; Buda, E.; Walsh, J.; Jones, C. D.; Mieczkowski, P. A.; Singh, D.; Wu, J.; Gulabani, A.; Dolina, P.; Bodenheimer, T.; Hoyle, A. P.; Simons, J. V.; Soloway, M.; Mose, L. E.; Jefferys, S. R.; Balu, S.; O'Connor, B. D.; Prins, J. F.; Chiang, D. Y.; Neil Hayes, D.; Perou, C. M.; Hinoue, T.; Weisenberger, D. J.; Maglinte, D. T.; Pan, F.; Berman, B. P.; Van Den Berg, D. J.; Shen, H.; Triche Jr, T.; Baylin, S. B.; Laird, P. W.; Getz, G.; Noble, M.; Voet, D.; Saksena, G.; Gehlenborg, N.; DiCara, D.; Zhang, J.; Zhang, H.; Wu, C.-J.; Yingchun Liu, S.; Shukla, S.; Lawrence, M. S.; Zhou, L.; Sivachenko, A.; Lin, P.; Stojanov, P.; Jing, R.; Park, R. W.; Nazaire, M.-D.; Robinson, J.; Thorvaldsdottir, H.; Mesirov, J.; Park, P. J.; Chin, L.; Thorsson, V.; Reynolds, S. M.; Bernard, B.; Kreisberg, R.; Lin, J.; Iype, L.; Bressler, R.; Erkkilä, T.; Gundapuneni, M.; Liu, Y.; Norberg, A.; Robinson, T.; Yang, D.; Zhang, W.; Shmulevich, I.; de Ronde, J. J.; Schultz, N.; Cerami, E.; Ciriello, G.; Goldberg, A. P.; Gross, B.; Jacobsen, A.; Gao, J.; Kaczkowski, B.; Sinha, R.; Arman Aksoy, B.; Antipin, Y.; Reva, B.; Shen, R.; Taylor, B. S.; Chan, T. A.; Ladanyi, M.; Sander, C.; Akbani, R.; Zhang, N.; Broom, B. M.; Casasent, T.; Unruh, A.; Wakefield, C.; Hamilton, S. R.; Craig Cason, R.; Baggerly, K. A.; Weinstein, J. N.; Haussler, D.; Benz, C. C.; Stuart, J. M.; Benz, S. C.; Zachary Sanborn, J.; Vaske, C. J.; Zhu, J.; Szeto, C.; Scott, G. K.; Yau, C.; Ng, S.; Goldstein, T.; Ellrott, K.; Collisson, E.; Cozen, A. E.; Zerbino, D.; Wilks, C.; Craft, B.; Spellman, P.; Penny, R.; Shelton, T.; Hatfield, M.; Morris, S.; Yena, P.; Shelton, C.; Sherman, M.; Paulauskis, J.; Gastier-Foster, J. M.; Bowen, J.; Ramirez, N. C.; Black, A.; Pyatt, R.; Wise, L.; White, P.; Bertagnolli, M.; Brown, J.; Chan, T. A.; Chu, G. C.; Czerwinski, C.; Denstman, F.; Dhir, R.; Dörner, A.; Fuchs, C. S.; Guillem, J. G.; Iacocca, M.; Juhl, H.; Kaufman, A.; Kohl III, B.; Van Le, X.; Mariano, M. C.; Medina, E. N.; Meyers, M.; Nash, G. M.; Paty, P. B.; Petrelli, N.; Rabeno, B.; Richards, W. G.; Solit, D.; Swanson, P.; Temple, L.; Tepper, J. E.; Thorp, R.; Vakiani, E.; Weiser, M. R.; Willis, J. E.; Witkin, G.; Zeng, Z.; Zinner, M. J.; The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* **2012**, *487* (7407), 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- [30] Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Pradilla Dieste, A.; Cerrada, E.; Rodriguez Yoldi, M. J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- [31] Lao, V. V.; Grady, W. M. Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *8* (12), 686–700. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.
- [32] Telloni, S. M. Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2017**, *1606*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1.
- [33] Fleming, M.; Ravula, S.; Tatishchev, S. F.; Wang, H. L. Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3* (3), 153–173. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>.
- [34] Amin, M. B.; Greene, F. L.; Edge, S. B.; Compton, C. C.; Gershenwald, J. E.; Brookland, R. K.; Meyer, L.; Gress, D. M.; Byrd, D. R.; Winchester, D. P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, *67* (2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- [35] Wojciechowska, U.; Didkowska, J. Zachorowania i Zgony Na Nowotwory Złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii Im. Marii

- Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne Na Stronie [Http://Onkologia.Org.Pl/Raporty/](http://Onkologia.Org.Pl/Raporty/) Dostęp z Dnia 16/02/2022.
- [36] Loktionov, A. Biomarkers for Detecting Colorectal Cancer Non-Invasively: DNA, RNA or Proteins? *World J. Gastrointest. Oncol.* **2020**, 12 (2), 124–148. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i2.124>.
- [37] Simon, K. Colorectal Cancer Development and Advances in Screening. *Clin. Interv. Aging* **2016**, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>.
- [38] Singh, H.; Turner, D.; Xue, L.; Targownik, L. E.; Bernstein, C. N. Risk of Developing Colorectal Cancer Following a Negative Colonoscopy Examination: Evidence for a 10-Year Interval between Colonoscopies. *JAMA* **2006**, 295 (20), 2366–2373. <https://doi.org/10.1001/jama.295.20.2366>.
- [39] Regula, J.; Rupinski, M.; Kraszewska, E.; Polkowski, M.; Pachlewski, J.; Orlowska, J.; Nowacki, M. P.; Butruk, E. Colonoscopy in Colorectal-Cancer Screening for Detection of Advanced Neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 355 (18), 1863–1872. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054967>.
- [40] Imperiale, T. F.; Wagner, D. R.; Lin, C. Y.; Larkin, G. N.; Rogge, J. D.; Ransohoff, D. F. Risk of Advanced Proximal Neoplasms in Asymptomatic Adults According to the Distal Colorectal Findings. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 343 (3), 169–174. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007203430302>.
- [41] Lieberman, D. A.; Weiss, D. G.; Bond, J. H.; Ahnen, D. J.; Garewal, H.; Chejfec, G. Use of Colonoscopy to Screen Asymptomatic Adults for Colorectal Cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 343 (3), 162–168. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007203430301>.
- [42] Schoenfeld, P.; Cash, B.; Flood, A.; Dobhan, R.; Eastone, J.; Coyle, W.; Kikendall, J. W.; Kim, H. M.; Weiss, D. G.; Emory, T.; Schatzkin, A.; Lieberman, D.; CONCeRN Study Investigators. Colonoscopic Screening of Average-Risk Women for Colorectal Neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352 (20), 2061–2068. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa042990>.
- [43] Rockey, D. C.; Paulson, E.; Niedzwiecki, D.; Davis, W.; Bosworth, H. B.; Sanders, L.; Yee, J.; Henderson, J.; Hatten, P.; Burdick, S.; Sanyal, A.; Rubin, D. T.; Sterling, M.; Akerkar, G.; Bhutani, M. S.; Binmoeller, K.; Garvie, J.; Bini, E. J.; McQuaid, K.; Foster, W. L.; Thompson, W. M.; Dachman, A.; Halvorsen, R. Analysis of Air Contrast Barium Enema, Computed Tomographic Colonography, and Colonoscopy: Prospective Comparison. *Lancet Lond. Engl.* **2005**, 365 (9456), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17784-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17784-8).
- [44] Lynch, H. T.; Lynch, J. Lynch Syndrome: Genetics, Natural History, Genetic Counseling, and Prevention. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2000**, 18 (21 Suppl), 19S–31S.
- [45] Baxter, N. N.; Goldwasser, M. A.; Paszat, L. F.; Saskin, R.; Urbach, D. R.; Rabeneck, L. Association of Colonoscopy and Death from Colorectal Cancer. *Ann. Intern. Med.* **2009**, 150 (1), 1–8. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-1-200901060-00306>.
- [46] Müller, A. D.; Sonnenberg, A. Prevention of Colorectal Cancer by Flexible Endoscopy and Polypectomy. A Case-Control Study of 32,702 Veterans. *Ann. Intern. Med.* **1995**, 123 (12), 904–910. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-123-12-199512150-00002>.
- [47] Levin, B.; Lieberman, D. A.; McFarland, B.; Andrews, K. S.; Brooks, D.; Bond, J.; Dash, C.; Giardiello, F. M.; Glick, S.; Johnson, D.; Johnson, C. D.; Levin, T. R.; Pickhardt, P. J.; Rex, D. K.; Smith, R. A.; Thorson, A.; Winawer, S. J. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* **2008**, 134 (5), 1570–1595. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.002>.
- [48] Hoff, G.; Grotmol, T.; Skovlund, E.; Bretthauer, M.; Norwegian Colorectal Cancer Prevention Study Group. Risk of Colorectal Cancer Seven Years after Flexible Sigmoidoscopy Screening: Randomised Controlled Trial. *BMJ* **2009**, 338, b1846. <https://doi.org/10.1136/bmj.b1846>.

- [49] Binefa, G.; Rodríguez-Moranta, F.; Teule, À.; Medina-Hayas, M. Colorectal Cancer: From Prevention to Personalized Medicine. *World J. Gastroenterol. WJG* **2014**, *20* (22), 6786–6808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786>.
- [50] Obaro, A. E.; Burling, D. N.; Plumb, A. A. Colon Cancer Screening with CT Colonography: Logistics, Cost-Effectiveness, Efficiency and Progress. *Br. J. Radiol.* **2018**, *91* (1090), 20180307. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180307>.
- [51] Pickhardt, P. J. Incidence of Colonic Perforation at CT Colonography: Review of Existing Data and Implications for Screening of Asymptomatic Adults. *Radiology* **2006**, *239* (2), 313–316. <https://doi.org/10.1148/radiol.2392052002>.
- [52] von Wagner, C.; Smith, S.; Halligan, S.; Ghanouni, A.; Power, E.; Lilford, R. J.; Morton, D.; Dadswell, E.; Atkin, W.; Wardle, J.; SIGGAR Investigators. Patient Acceptability of CT Colonography Compared with Double Contrast Barium Enema: Results from a Multicentre Randomised Controlled Trial of Symptomatic Patients. *Eur. Radiol.* **2011**, *21* (10), 2046–2055. <https://doi.org/10.1007/s00330-011-2154-y>.
- [53] de Haan, M. C.; Pickhardt, P. J.; Stoker, J. CT Colonography: Accuracy, Acceptance, Safety and Position in Organised Population Screening. *Gut* **2015**, *64* (2), 342–350. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308696>.
- [54] Johnson, C. D.; Chen, M.-H.; Toledano, A. Y.; Heiken, J. P.; Dachman, A.; Kuo, M. D.; Menias, C. O.; Siewert, B.; Cheema, J. I.; Obregon, R. G.; Fidler, J. L.; Zimmerman, P.; Horton, K. M.; Coakley, K.; Iyer, R. B.; Hara, A. K.; Halvorsen, R. A.; Casola, G.; Yee, J.; Herman, B. A.; Burgart, L. J.; Limburg, P. J. Accuracy of CT Colonography for Detection of Large Adenomas and Cancers. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359* (12), 1207–1217. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800996>.
- [55] Brenner, D. J.; Georgsson, M. A. Mass Screening With CT Colonography: Should the Radiation Exposure Be of Concern? *Gastroenterology* **2005**, *129* (1), 328–337. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.021>.
- [56] Goshen, R.; Mizrahi, B.; Akiva, P.; Kinar, Y.; Choman, E.; Shalev, V.; Sopik, V.; Kariv, R.; Narod, S. A. Predicting the Presence of Colon Cancer in Members of a Health Maintenance Organisation by Evaluating Analytes from Standard Laboratory Records. *Br. J. Cancer* **2017**, *116* (7), 944–950. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.53>.
- [57] Goshen, R.; Choman, E.; Ran, A.; Muller, E.; Kariv, R.; Chodick, G.; Ash, N.; Narod, S.; Shalev, V. Computer-Assisted Flagging of Individuals at High Risk of Colorectal Cancer in a Large Health Maintenance Organization Using the ColonFlag Test. *JCO Clin. Cancer Inform.* **2018**, *2*, 1–8. <https://doi.org/10.1200/CCI.17.00130>.
- [58] Ayling, R. M.; Wong, A.; Cotter, F. Use of ColonFlag Score for Prioritisation of Endoscopy in Colorectal Cancer. *BMJ Open Gastroenterol.* **2021**, *8* (1), e000639. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2021-000639>.
- [59] Hilsden, R. J.; Heitman, S. J.; Mizrahi, B.; Narod, S. A.; Goshen, R. Prediction of Findings at Screening Colonoscopy Using a Machine Learning Algorithm Based on Complete Blood Counts (ColonFlag). *PloS One* **2018**, *13* (11), e0207848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207848>.
- [60] Giannakeas, V.; Narod, S. A. Incidence of Cancer Among Adults With Thrombocytosis in Ontario, Canada. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4* (8), e2120633. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.20633>.
- [61] Lieberman, D. A. Clinical Practice. Screening for Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (12), 1179–1187. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0902176>.
- [62] Young, G. P.; Symonds, E. L.; Allison, J. E.; Cole, S. R.; Fraser, C. G.; Halloran, S. P.; Kuipers, E. J.; Seaman, H. E. Advances in Fecal Occult Blood Tests: The FIT Revolution. *Dig. Dis. Sci.* **2015**, *60* (3), 609–622. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3445-3>.
- [63] Whitlock, E. P.; Lin, J. S.; Liles, E.; Beil, T. L.; Fu, R. Screening for Colorectal Cancer: A Targeted, Updated Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* **2008**, *149* (9), 638–658. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00245>.

- [64] de Wijkerslooth, T. R.; Stoop, E. M.; Bossuyt, P. M.; Meijer, G. A.; van Ballegooijen, M.; van Roon, A. H. C.; Stegeman, I.; Kraaijenhagen, R. A.; Fockens, P.; van Leerdam, M. E.; Dekker, E.; Kuipers, E. J. Immunochemical Fecal Occult Blood Testing Is Equally Sensitive for Proximal and Distal Advanced Neoplasia. *Am. J. Gastroenterol.* **2012**, *107* (10), 1570–1578. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.249>.
- [65] Imperiale, T. F.; Ransohoff, D. F.; Itzkowitz, S. H.; Levin, T. R.; Lavin, P.; Lidgard, G. P.; Ahlquist, D. A.; Berger, B. M. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370* (14), 1287–1297. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311194>.
- [66] Lee, J. K.; Liles, E. G.; Bent, S.; Levin, T. R.; Corley, D. A. Accuracy of Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Intern. Med.* **2014**, *160* (3), 171. <https://doi.org/10.7326/M13-1484>.
- [67] Nikolaou, S.; Qiu, S.; Fiorentino, F.; Rasheed, S.; Tekkis, P.; Kontovounisios, C. Systematic Review of Blood Diagnostic Markers in Colorectal Cancer. *Tech. Coloproctology* **2018**, *22* (7), 481–498. <https://doi.org/10.1007/s10151-018-1820-3>.
- [68] Song, Y. F.; Xu, Z. B.; Zhu, X. J.; Tao, X.; Liu, J. L.; Gao, F. L.; Wu, C. L.; Song, B.; Lin, Q. Serum Cyr61 as a Potential Biomarker for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **2017**, *19* (4), 519–524. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1560-7>.
- [69] Bengs, S.; Becker, E.; Busenhardt, P.; Spalinger, M. R.; Raselli, T.; Kasper, S.; Lang, S.; Atrott, K.; Mamie, C.; Vavricka, S. R.; von Boehmer, L.; Knuth, A.; Tuomisto, A.; Mäkinen, M. J.; Hruz, P.; Turina, M.; Rickenbacher, A.; Petrowsky, H.; Weber, A.; Frei, P.; Halama, M.; Jenkins, G.; Sheppard, D.; Croner, R. S.; Christoph, J.; Britzen-Laurent, N.; Naschberger, E.; Schellerer, V.; Stürzl, M.; Fried, M.; Rogler, G.; Scharl, M. B6 - Integrin Serves as a Novel Serum Tumor Marker for Colorectal Carcinoma. *Int. J. Cancer* **2019**, *145* (3), 678–685. <https://doi.org/10.1002/ijc.32137>.
- [70] Imperiale, T. F.; Ransohoff, D. F.; Itzkowitz, S. H.; Turnbull, B. A.; Ross, M. E.; Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus Fecal Occult Blood for Colorectal-Cancer Screening in an Average-Risk Population. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (26), 2704–2714. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa033403>.
- [71] Liu, R.; Su, X.; Long, Y.; Zhou, D.; Zhang, X.; Ye, Z.; Ma, J.; Tang, T.; Wang, F.; He, C. A Systematic Review and Quantitative Assessment of Methylation Biomarkers in Fecal DNA and Colorectal Cancer and Its Precursor, Colorectal Adenoma. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2019**, *779*, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.01.003>.
- [72] Lam, K.; Pan, K.; Linnekamp, J. F.; Medema, J. P.; Kandimalla, R. DNA Methylation Based Biomarkers in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1866* (1), 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.07.001>.
- [73] Rasmussen, S. L.; Krarup, H. B.; Sunesen, K. G.; Pedersen, I. S.; Madsen, P. H.; Thorlacius-Ussing, O. Hypermethylated DNA as a Biomarker for Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* **2016**, *18* (6), 549–561. <https://doi.org/10.1111/codi.13336>.
- [74] Xiao, Z.; Li, B.; Wang, G.; Zhu, W.; Wang, Z.; Lin, J.; Xu, A.; Wang, X. Validation of Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM) for the Detection of Stool DNA Methylation in Colorectal Neoplasms. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2014**, *431*, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.044>.
- [75] Ned, R. M.; Melillo, S.; Marrone, M. Fecal DNA Testing for Colorectal Cancer Screening: The ColoSure™ Test. *PLoS Curr.* **2011**, *3*, RRN1220. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1220>.
- [76] Tepus, M.; Yau, T. O. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. *Gastrointest. Tumors* **2020**, *7* (3), 62–73. <https://doi.org/10.1159/000507701>.
- [77] Shirley, M. Epi ProColon® for Colorectal Cancer Screening: A Profile of Its Use in the USA. *Mol. Diagn. Ther.* **2020**, *24* (4), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00473-8>.

- [78] Romano, G.; Veneziano, D.; Acunzo, M.; Croce, C. M. Small Non-Coding RNA and Cancer. *Carcinogenesis* **2017**, 38 (5), 485–491. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx026>.
- [79] Iorio, M. V.; Croce, C. M. MicroRNA Involvement in Human Cancer. *Carcinogenesis* **2012**, 33 (6), 1126–1133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs140>.
- [80] Slaby, O. Non-Coding RNAs as Biomarkers for Colorectal Cancer Screening and Early Detection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, 937, 153–170. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_8.
- [81] Hur, K. MicroRNAs: Promising Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets in Human Colorectal Cancer Metastasis. *BMB Rep.* **2015**, 48 (4), 217–222. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.007>.
- [82] Hollis, M.; Nair, K.; Vyas, A.; Chaturvedi, L. S.; Gambhir, S.; Vyas, D. MicroRNAs Potential Utility in Colon Cancer: Early Detection, Prognosis, and Chemosensitivity. *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21 (27), 8284–8292. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i27.8284>.
- [83] Rossi, S.; Di Narzo, A. F.; Mestdagh, P.; Jacobs, B.; Bosman, F. T.; Gustavsson, B.; Majoie, B.; Roth, A.; Vandesompele, J.; Rigoutsos, I.; Delorenzi, M.; Tejpar, S. MicroRNAs in Colon Cancer: A Roadmap for Discovery. *FEBS Lett.* **2012**, 586 (19), 3000–3007. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.048>.
- [84] Phua, L. C.; Chue, X. P.; Koh, P. K.; Cheah, P. Y.; Chan, E. C. Y.; Ho, H. K. Global Fecal MicroRNA Profiling in the Identification of Biomarkers for Colorectal Cancer Screening among Asians. *Oncol. Rep.* **2014**, 32 (1), 97–104. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3193>.
- [85] Wu, C. W.; Cao, X.; Berger, C. K.; Foote, P. H.; Mahoney, D. W.; Simonson, J. A.; Anderson, B. W.; Yab, T. C.; Taylor, W. R.; Boardman, L. A.; Kisiel, J. B.; Ahlquist, D. A. Novel Approach to Fecal Occult Blood Testing by Assay of Erythrocyte-Specific MicroRNA Markers. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, 62 (8), 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4627-6>.
- [86] Carter, J. V.; Galbraith, N. J.; Yang, D.; Burton, J. F.; Walker, S. P.; Galandiuk, S. Blood-Based MicroRNAs as Biomarkers for the Diagnosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Br. J. Cancer* **2017**, 116 (6), 762–774. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.12>.
- [87] Chen, B.; Xia, Z.; Deng, Y.-N.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhu, H.; Xu, N.; Liang, S. Emerging MicroRNA Biomarkers for Colorectal Cancer Diagnosis and Prognosis. *Open Biol.* **2019**, 9 (1), 180212. <https://doi.org/10.1098/rsob.180212>.
- [88] Sabry, D.; El-Deek, S. E. M.; Maher, M.; El-Baz, M. A. H.; El-Bader, H. M.; Amer, E.; Hassan, E. A.; Fathy, W.; El-Deek, H. E. M. Role of MiRNA-210, MiRNA-21 and MiRNA-126 as Diagnostic Biomarkers in Colorectal Carcinoma: Impact of HIF-1 α -VEGF Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, 454 (1–2), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3462-1>.
- [89] Wikberg, M. L.; Myte, R.; Palmqvist, R.; van Guelpen, B.; Ljuslinder, I. Plasma MiRNA Can Detect Colorectal Cancer, but How Early? *Cancer Med.* **2018**, 7 (5), 1697–1705. <https://doi.org/10.1002/cam4.1398>.
- [90] Herreros-Villanueva, M.; Duran-Sachon, S.; Carmen Martin, A.; Perez-Palacios, R.; Vila-Navarro E.; Marcuello, M.; Diaz-Centeno, M.; Cubiella, J.; Soledad Diez, M.; Bujanda, L.; Lanas, A.; Jover, R.; Hernandez, V.; Quintero, E.; Lozano, J. J.; Garcia-Cougil, M.; Martinez-Arranz, I.; Castells, A.; Gironella, M.; Arroyo, R. Plasma MicroRNA Signature Validation for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2019**, 10 (1). <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000003>.
- [91] McDonald, J. S.; Milosevic, D.; Reddi, H. V.; Grebe, S. K.; Algeciras-Schimmich, A. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin. Chem.* **2011**, 57 (6), 833–840. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>.
- [92] Di Lena, M.; Porcelli, F.; Altomare, D. F. Volatile Organic Compounds as New Biomarkers for Colorectal Cancer: A Review. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* **2016**, 18 (7), 654–663. <https://doi.org/10.1111/codi.13271>.
- [93] Bosch, S.; Berkhout, D. J.; Ben Larbi, I.; de Meij, T. G.; de Boer, N. K. Fecal Volatile Organic Compounds for Early Detection of Colorectal Cancer: Where Are We Now? *J.*

- Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, 145 (1), 223–234. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2821-3>.
- [94] Chen, J.; Pitmon, E.; Wang, K. Microbiome, Inflammation and Colorectal Cancer. *Semin. Immunol.* **2017**, 32, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.006>.
- [95] Louis, P.; Hold, G. L.; Flint, H. J. The Gut Microbiota, Bacterial Metabolites and Colorectal Cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, 12 (10), 661–672. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>.
- [96] Amitay, E. L.; Krilaviciute, A.; Brenner, H. Systematic Review: Gut Microbiota in Fecal Samples and Detection of Colorectal Neoplasms. *Gut Microbes* **2018**, 9 (4), 293–307. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1445957>.
- [97] Han, Y. W. *Fusobacterium Nucleatum*: A Commensal-Turned Pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, 23, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.013>.
- [98] Bailey, S. E.; Ukoumunne, O. C.; Shephard, E. A.; Hamilton, W. Clinical Relevance of Thrombocytosis in Primary Care: A Prospective Cohort Study of Cancer Incidence Using English Electronic Medical Records and Cancer Registry Data. *Br. J. Gen. Pract. J. R. Coll. Gen. Pract.* **2017**, 67 (659), e405–e413. <https://doi.org/10.3399/bjgp17X691109>.
- [99] Bailey, S. E. R.; Ukoumunne, O. C.; Shephard, E.; Hamilton, W. How Useful Is Thrombocytosis in Predicting an Underlying Cancer in Primary Care? A Systematic Review. *Fam. Pract.* **2017**, 34 (1), 4–10. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmw100>.
- [100] Ankus, E.; Price, S. J.; Ukoumunne, O. C.; Hamilton, W.; Bailey, S. E. R. Cancer Incidence in Patients with a High Normal Platelet Count: A Cohort Study Using Primary Care Data. *Fam. Pract.* **2018**, 35 (6), 671–675. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmy018>.
- [101] Hornbrook, M. C.; Goshen, R.; Choman, E.; O’Keeffe-Rosetti, M.; Kinar, Y.; Liles, E. G.; Rust, K. C. Early Colorectal Cancer Detected by Machine Learning Model Using Gender, Age, and Complete Blood Count Data. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, 62 (10), 2719–2727. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4722-8>.
- [102] Kinar, Y.; Akiva, P.; Choman, E.; Kariv, R.; Shalev, V.; Levin, B.; Narod, S. A.; Goshen, R. Performance Analysis of a Machine Learning Flagging System Used to Identify a Group of Individuals at a High Risk for Colorectal Cancer. *PloS One* **2017**, 12 (2), e0171759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171759>.
- [103] Andersson, T. M.-L.; Engholm, G.; Brink, A.-L.; Pukkala, E.; Stenbeck, M.; Tryggvadottir, L.; Weiderpass, E.; Storm, H. Tackling the Tobacco Epidemic in the Nordic Countries and Lower Cancer Incidence by 1/5 in a 30-Year Period—The Effect of Envisaged Scenarios Changing Smoking Prevalence. *Eur. J. Cancer* **2018**, 103, 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.031>.
- [104] Crowe, F. L.; Appleby, P. N.; Travis, R. C.; Key, T. J. Risk of Hospitalization or Death from Ischemic Heart Disease among British Vegetarians and Nonvegetarians: Results from the EPIC-Oxford Cohort Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, 97 (3), 597–603. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.044073>.
- [105] Huang, T.; Yang, B.; Zheng, J.; Li, G.; Wahlqvist, M. L.; Li, D. Cardiovascular Disease Mortality and Cancer Incidence in Vegetarians: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, 60 (4), 233–240. <https://doi.org/10.1159/000337301>.
- [106] Lewandowska, A. M.; Rudzki, M.; Rudzki, S.; Lewandowski, T.; Laskowska, B. Environmental Risk Factors for Cancer – Review Paper. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2019**, 26 (1), 1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>.
- [107] Schulz, M.; Hoffmann, K.; Weikert, C.; Nöthlings, U.; Schulze, M. B.; Boeing, H. Identification of a Dietary Pattern Characterized by High-Fat Food Choices Associated with Increased Risk of Breast Cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Br. J. Nutr.* **2008**, 100 (5), 942–946. <https://doi.org/10.1017/S0007114508966149>.
- [108] Weiderpass, E. Lifestyle and Cancer Risk. *J. Prev. Med. Pub. Health* 43 (6), 459–471.
- [109] Mulware, S. J. Trace Elements and Carcinogenicity: A Subject in Review. *3 Biotech* **2013**, 3 (2), 85–96. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0072-6>.

- [110] Mulware, S. J. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *J. Biophys. Hindawi Publ. Corp. Online* **2013**, 2013, 192026. <https://doi.org/10.1155/2013/192026>.
- [111] Nawwi, A. M.; Chin, S.-F.; Azhar Shah, S.; Jamal, R. Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Iran. J. Public Health* **2019**, 48 (4), 632–643.
- [112] Schwartz, M. K. Role of Trace Elements in Cancer. *Cancer Res.* **1975**, 35 (11 Pt. 2), 3481–3487.
- [113] Lener, M. R.; Gupta, S.; Scott, R. J.; Tootsi, M.; Kulp, M.; Tammesoo, M.-L.; Viitak, A.; Metspalu, A.; Serrano-Fernández, P.; Kładny, J.; Jaworska-Bieniek, K.; Durda, K.; Muszyńska, M.; Sukiennicki, G.; Jakubowska, A.; Lubiński, J. Can Selenium Levels Act as a Marker of Colorectal Cancer Risk? *BMC Cancer* **2013**, 13, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-214>.
- [114] Connelly-Frost, A.; Poole, C.; Satia, J. A.; Kupper, L. L.; Millikan, R. C.; Sandler, R. S. Selenium, Apoptosis, and Colorectal Adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2006**, 15 (3), 486–493. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0759>.
- [115] Clark, L. C.; Hixson, L. J.; Combs, G. F.; Reid, M. E.; Turnbull, B. W.; Sampliner, R. E. Plasma Selenium Concentration Predicts the Prevalence of Colorectal Adenomatous Polyps. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **1993**, 2 (1), 41–46.
- [116] Fernández-Bañares, F.; Cabré, E.; Esteve, M.; Mingorance, M. D.; Abad-Lacruz, A.; Lachica, M.; Gil, A.; Gassull, M. A. Serum Selenium and Risk of Large Size Colorectal Adenomas in a Geographical Area with a Low Selenium Status. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, 97 (8), 2103–2108. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05930.x>.
- [117] Ghadirian, P.; Maisonneuve, P.; Perret, C.; Kennedy, G.; Boyle, P.; Krewski, D.; Lacroix, A. A Case-Control Study of Toenail Selenium and Cancer of the Breast, Colon, and Prostate. *Cancer Detect. Prev.* **2000**, 24 (4), 305–313.
- [118] Zhao, N. [A case-control study of risk factors of colorectal cancer in Shanxi Province]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* **1990**, 11 (5), 295–298.
- [119] Nomura, A.; Heilbrun, L. K.; Morris, J. S.; Stemmermann, G. N. Serum Selenium and the Risk of Cancer, by Specific Sites: Case-Control Analysis of Prospective Data. *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, 79 (1), 103–108.
- [120] Scieszka, M.; Danch, A.; Machalski, M.; Drózd, M. Plasma Selenium Concentration in Patients with Stomach and Colon Cancer in the Upper Silesia. *Neoplasma* **1997**, 44 (6), 395–397.
- [121] Takata, Y.; Kristal, A. R.; King, I. B.; Song, X.; Diamond, A. M.; Foster, C. B.; Hutter, C. M.; Hsu, L.; Duggan, D. J.; Langer, R. D.; Petrovitch, H.; Shikany, J. M.; Vaughan, T. L.; Lampe, J. W.; Prentice, R. L.; Peters, U. Serum Selenium, Genetic Variation in Selenoenzymes, and Risk of Colorectal Cancer: Primary Analysis from the Women's Health Initiative Observational Study and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2011**, 20 (9), 1822–1830. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0364>.
- [122] van den Brandt, P. A.; Goldbohm, R. A.; van 't Veer, P.; Bode, P.; Dorant, E.; Hermus, R. J.; Sturmans, F. A Prospective Cohort Study on Toenail Selenium Levels and Risk of Gastrointestinal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85 (3), 224–229. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.3.224>.
- [123] Benderli Cihan, Y.; Sözen, S.; Öztürk Yıldırım, S. Trace Elements and Heavy Metals in Hair of Stage III Breast Cancer Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, 144 (1), 360–379. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9104-z>.
- [124] Hsueh, Y.-M.; Su, C.-T.; Shiue, H.-S.; Chen, W.-J.; Pu, Y.-S.; Lin, Y.-C.; Tsai, C.-S.; Huang, C.-Y. Levels of Plasma Selenium and Urinary Total Arsenic Interact to Affect the

- Risk for Prostate Cancer. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, 107, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.031>.
- [125] Kazi, T. G.; Wadhwa, S. K.; Afridi, H. I.; Talpur, F. N.; Tuzen, M.; Baig, J. A. Comparison of Essential and Toxic Elements in Esophagus, Lung, Mouth and Urinary Bladder Male Cancer Patients with Related to Controls. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, 22 (10), 7705–7715. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3988-z>.
- [126] Kim, T.-H.; Seo, J.-W.; Hong, Y.-S.; Song, K.-H. Case-Control Study of Chronic Low-Level Exposure of Inorganic Arsenic Species and Non-Melanoma Skin Cancer. *J. Dermatol.* **2017**, 44 (12), 1374–1379. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13993>.
- [127] Melak, D.; Ferreccio, C.; Kalman, D.; Parra, R.; Acevedo, J.; Pérez, L.; Cortés, S.; Smith, A. H.; Yuan, Y.; Liaw, J.; Steinmaus, C. Arsenic Methylation and Lung and Bladder Cancer in a Case-Control Study in Northern Chile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, 274 (2), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.014>.
- [128] Krajewski, A. K.; Jimenez, M. P.; Rappazzo, K. M.; Lobdell, D. T.; Jagai, J. S. Aggregated Cumulative County Arsenic in Drinking Water and Associations with Bladder, Colorectal, and Kidney Cancers, Accounting for Population Served. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2021**, 31 (6), 979–989. <https://doi.org/10.1038/s41370-021-00314-8>.
- [129] Denoyer, D.; Masaldan, S.; Fontaine, S. L.; Cater, M. A. Targeting Copper in Cancer Therapy: ‘Copper That Cancer.’ *Metallomics* **2015**, 7 (11), 1459–1476. <https://doi.org/10.1039/C5MT00149H>.
- [130] Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry and Molecular Biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, 63 (5), 797S–811S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797>.
- [131] Gupte, A.; Mumper, R. J. Elevated Copper and Oxidative Stress in Cancer Cells as a Target for Cancer Treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, 35 (1), 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>.
- [132] Lener, M. R.; Scott, R. J.; Wiechowska-Kozłowska, A.; Serrano-Fernández, P.; Baszuk, P.; Jaworska-Bieniek, K.; Sukiennicki, G.; Marciniak, W.; Muszyńska, M.; Kładny, J.; Gromowski, T.; Kaczmarek, K.; Jakubowska, A.; Lubiński, J. Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res. Treat.* **2016**, 48 (3), 1056–1064. <https://doi.org/10.4143/crt.2015.282>.
- [133] Stepien, M.; Jenab, M.; Freisling, H.; Becker, N.-P.; Czuban, M.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; Boutron-Ruault, M.-C.; Mancini, F. R.; Savoye, I.; Katzke, V.; Kühn, T.; Boeing, H.; Iqbal, K.; Trichopoulou, A.; Bamia, C.; Orfanos, P.; Palli, D.; Sieri, S.; Tumino, R.; Naccarati, A.; Panico, S.; Bueno-de-Mesquita, H. B. A.; Peeters, P. H.; Weiderpass, E.; Merino, S.; Jakszyn, P.; Sanchez, M.-J.; Dorronsoro, M.; Huerta, J. M.; Barricarte, A.; Boden, S.; van Guelpen, B.; Wareham, N.; Khaw, K.-T.; Bradbury, K. E.; Cross, A. J.; Schomburg, L.; Hughes, D. J. Pre-Diagnostic Copper and Zinc Biomarkers and Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort. *Carcinogenesis* **2017**, 38 (7), 699–707. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx051>.
- [134] Zhang, C.; Cheng, R.; Ding, J.; Li, X.; Niu, H.; Li, X. Serum Copper and Zinc Levels and Colorectal Cancer in Adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination 2011-2016. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02826-8>.
- [135] Ranjbary, A. G.; Mehrzad, J.; Dehghani, H.; Abdollahi, A.; Hosseinkhani, S. Variation in Blood and Colorectal Epithelia’s Key Trace Elements Along with Expression of Mismatch Repair Proteins from Localized and Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, 194 (1), 66–75. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01749-9>.
- [136] Ribeiro, S. M. de F.; Moya, A. M. T. M.; Braga, C. B. M.; Domenici, F. A.; Feitosa, M. R.; Feres, O.; Rocha, J. J. R. da; Cunha, S. F. de C. da. Copper-Zinc Ratio and Nutritional Status in Colorectal Cancer Patients during the Perioperative Period. *Acta Cir. Bras.* **2016**, 31 Suppl 1, 24–28. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502016001300006>.
- [137] Gupta, S. K.; Shukla, V. K.; Vaidya, M. P.; Roy, S. K.; Gupta, S. Serum and Tissue Trace Elements in Colorectal Cancer. *J. Surg. Oncol.* **1993**, 52 (3), 172–175. <https://doi.org/10.1002/jso.2930520311>.

- [138] Al-Ansari, R. F.; Al-Gebori, A. M.; Sulaiman, G. M. Serum Levels of Zinc, Copper, Selenium and Glutathione Peroxidase in the Different Groups of Colorectal Cancer Patients. *Casp. J. Intern. Med.* **2020**, *11* (4), 384–390. <https://doi.org/10.22088/cjim.11.4.384>.
- [139] Milde, D.; Novák, O.; Stuka, V.; Vyslouil, K.; Macháček, J. Serum Levels of Selenium, Manganese, Copper, and Iron in Colorectal Cancer Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *79* (2), 107–114. <https://doi.org/10.1385/bter:79:2:107>.
- [140] Majumder, S.; Dutta, P.; Choudhuri, S. K. The Role of Copper in Development of Drug Resistance in Murine Carcinoma. *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* **2005**, *1* (6), 563–573. <https://doi.org/10.2174/157340605774598153>.
- [141] Safar zad, M.; Besharat, S.; Salimi, S.; Azarhoush, R.; Behnampour, N.; Joshaghani, H. R. Association between Selenium, Cadmium, and Arsenic Levels and Genetic Polymorphisms in DNA Repair Genes (XRCC5, XRCC6) in Gastric Cancerous and Non-Cancerous Tissue. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* **2019**, *55*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.003>.
- [142] Zhang, Q.; Jiang, C.; Li, H.; Zhang, C.; Wu, H.; Huang, F. Effect of the Interaction Between Cadmium Exposure and CLOCK Gene Polymorphisms on Thyroid Cancer: A Case-Control Study in China. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *196* (1), 86–95. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01904-2>.
- [143] He, T.; Mo, A.; Zhang, K.; Liu, L. ABCB1/MDR1 Gene Polymorphism and Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Colorectal Dis.* **2013**, *15* (1), 12–18. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2012.02919.x>.
- [144] Martinelli, M.; Scapoli, L.; Cura, F.; Rodia, M. T.; Ugolini, G.; Montroni, I.; Solmi, R. Colorectal Cancer Susceptibility: Apparent Gender-Related Modulation by ABCB1 Gene Polymorphisms. *J. Biomed. Sci.* **2014**, *21* (1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0089-8>.
- [145] Ritambhara; Tiwari, S.; Vijayaraghavalu, S.; Kumar, M. Genetic Polymorphisms of Xenobiotic Metabolizing Genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1), Gene-Gene Interaction with Association to Lung Cancer Risk in North India; A Case Control Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2019**, *20* (9), 2707–2714. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2707>.
- [146] Rump, A.; Benet-Pages, A.; Schubert, S.; Kuhlmann, J. D.; Janavičius, R.; Macháčková, E.; Foretová, L.; Kleibl, Z.; Lhota, F.; Zemankova, P.; Betsheva-Krajcir, E.; Mackenroth, L.; Hackmann, K.; Lehmann, J.; Nissen, A.; DiDonato, N.; Opitz, R.; Thiele, H.; Kast, K.; Wimberger, P.; Holinski-Feder, E.; Emmert, S.; Schröck, E.; Klink, B. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-National Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS Genet.* **2016**, *12* (8), e1006248. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006248>.
- [147] Caldecott, K. W. XRCC1 Protein; Form and Function. *DNA Repair* **2019**, *81*, 102664. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102664>.
- [148] Mok, M. C. Y.; Campalans, A.; Pillon, M. C.; Guarné, A.; Radicella, J. P.; Junop, M. S. Identification of an XRCC1 DNA Binding Activity Essential for Retention at Sites of DNA Damage. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 3095. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39543-1>.
- [149] Ighodaro, O. M.; Akinloye, O. A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alex. J. Med.* **2018**, *54* (4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [150] Ross, D.; Siegel, D. NQO1 in Protection against Oxidative Stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.005>.
- [151] Ozanne, J.; Prescott, A. R.; Clark, K. The Clinically Approved Drugs Dasatinib and Bosutinib Induce Anti-Inflammatory Macrophages by Inhibiting the Salt-Inducible Kinases. *Biochem. J.* **2015**, *465* (2), 271–279. <https://doi.org/10.1042/BJ20141165>.
- [152] Si, M.; Lang, J. The Roles of Metallothioneins in Carcinogenesis. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>.

- [153] Lahiri, D. K.; Schnabel, B. DNA Isolation by a Rapid Method from Human Blood Samples: Effects of MgCl₂, EDTA, Storage Time, and Temperature on DNA Yield and Quality. *Biochem. Genet.* **1993**, 31 (7), 321–328. <https://doi.org/10.1007/BF00553174>.

12.Oświadczenia współautorów publikacji

Mgr Piotr Baszuk
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

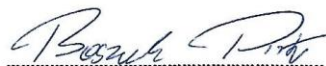
Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, prowadzeniu procesu badawczego, opracowaniu bazy danych pacjentów włączonych do badania, analizie zebranych danych, przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 30%.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, prowadzeniu procesu badawczego, opracowaniu bazy danych pacjentów włączonych do badania, analizie zebranych danych, przygotowaniu manuskryptu i wyniósł 45%.



Mgr Piotr Baszuk

Dr hab. n. med. Marcin Lener
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, projektowaniu metodologii, prowadzeniu procesu badawczego, zarządzaniu danymi, przygotowaniu i korekcie manuskryptu, nadzorowaniu prac, koordynowaniu działalności badawczej i wyniósł 15%

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, projektowaniu metodologii, prowadzeniu procesu badawczego, zarządzaniu danymi, przygotowaniu i korekcie manuskryptu, nadzorowaniu prac, koordynowaniu działalności badawczej i wyniósł 20%

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez mgr Piotra Baszuka jako rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Piotra Baszuka przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



Dr hab. n. med. Marcin Lener

Prof. dr hab. n. med. Jan Lubiński
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

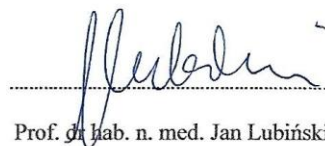
Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, zarządzaniu danymi, przygotowaniu i korekcie manuskryptu, nadzorowaniu prac, koordynowaniu działalności badawczej oraz , udostępnieniu infrastruktury oraz finansowaniu projektu i wyniósł 10%.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentu, zarządzaniu danymi, przygotowaniu i korekcie manuskryptu, nadzorowaniu prac, koordynowaniu działalności badawczej oraz , udostępnieniu infrastruktury oraz finansowaniu projektu i wyniósł 10%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez mgr Piotra Baszuka jako rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Piotra Baszuka przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



Prof. dr hab. n. med. Jan Lubiński

Prof. dr hab. n. med. Jacek Gronwald
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

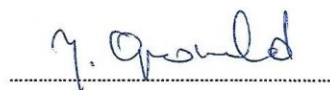
Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 1%.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez mgr Piotra Baszuka jako rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Piotra Baszuka przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



Prof. dr hab. n. med. Jacek Gronwald

Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Dębniak
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

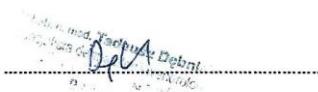
Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 1%.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez mgr Piotra Baszuka jako rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Piotra Baszuka przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.


Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Dębniak

Prof. dr hab. n. med. Cezary Cybulski
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Zakład Genetyki i Patomorfologii
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

OŚWIADCZENIE

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji naukowych:

„Low blood-As levels and selected genotypes appears to be promising biomarkers for occurrence of colorectal cancer in women.” Biomedicines.2021; 9(9):1105. doi: 10.3390/biomedicines9091105

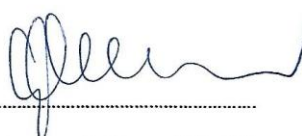
Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 1%.

“Blood copper levels and the occurrence of colorectal cancer in Poland.” Biomedicines. 2021; 9(11):1628. doi: 10.3390/biomedicines9111628

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania i zarządzaniu danymi i wyniósł 2%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez mgr Piotra Baszuka jako rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Piotra Baszuka przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



Prof. dr hab. n. med. Cezary Cybulski