

*Dorota Skrajnowska, Barbara Bobrowska-Korczak, Marta Klepacz,  
Andrzej Tokarz*

## WPLYW ZASTOSOWANYCH DIET NA ZMIANY W ZAWARTOŚCI WYBRANYCH PIERWIASTKÓW W ŚLEDZIONACH SZCZURÓW Z RAKIEM SUTKA

Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: dr hab. *A. Tokarz*

*Celem pracy było zbadanie wpływu suplementacji cynkiem, miedzią i związkami polifenolowymi na masę śledzion oraz zawartość w nich pierwiastków (Zn, Mg, Cu, Ca, F) u szczurów z rakiem sutka. Przewlekły proces nowotworowy i zastosowana suplementacja diety wywołały istotne zmiany w masie śledzion i ilości żelaza.*

Hasła kluczowe: cynk, miedź, resweratrol, genisteina, śledziona, szczury

Key words: zinc, copper, resveratrol, genistein, spleen, rats

Rolą śledziony jest oczyszczanie krwi z antygenów, wydzielanie przeciwciał, namnażanie limfocytów T i B, niszczenie zużytych erytrocytów oraz gromadzenie żelaza i hemoglobiny (1-3). Nie do końca poznano mechanizm, dzięki któremu śledziona wydaje się być narządem stosunkowo odpornym na przerzuty nowotworowe (4,5). Podkreśla się rolę ciągłego przepływu krwi przez zatoki śledziony, co może redukować adhezję komórek nowotworowych. Obecność humoralnych substancji niszczących komórki nowotworowe, które działają w śledzionie, może być również przyczyną tego zjawiska (6). Ponadto, w przebiegu różnych chorób układowych także nowotworowych często występuje zjawisko splenomegalii (6-9). Tak duże zmiany zarówno w masie jak i w liczbie erytrocytów oraz płytek krwi u pacjentów z nowotworami, mogą świadczyć o zaburzonej homeostazie składników mineralnych w tym narządzie. Może to zwłaszcza dotyczyć żelaza, pierwiastka dla którego śledziona jest magazynem rezerw ustrojowych. Tym bardziej, że u 50% pacjentów onkologicznych rozwija się anemia, świadcząca o wyniszczeniu organizmu wskutek intensywnie rozwijającego się procesu nowotworowego (10).

Celem pracy była ocena wpływu suplementacji diety cynkiem oraz miedzią w połączeniu z resweratrolem i genisteiną, na zmiany w składzie mineralnym śledziony (Zn, Mg, Cu, Ca i Fe) w przebiegu raka gruczołu sutkowego. Oznaczone stężenia badanych pierwiastków mogą stanowić swoisty wskaźnik zmian zachodzących w narządach w trakcie trwania przewlekłego procesu nowotworowego, być może także w powiązaniu z zastosowaną dietą.

## MATERIAŁ I METODY

W badaniach użyto samice szczurów szczepu Sprague – Dawley o początkowej masie ciała  $100 \pm 20$  g. Aklimatyzacja badanych zwierząt do warunków laboratoryjnych trwała 10 dni. Szczury miały zapewniony stały dostęp do wody i paszy, przetrzymywane były w pomieszczeniu o stałej temperaturze ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i kontrolowanym 12. godzinnym rytmie dziennie-nocnym. Zwierzęta podzielono na grupy badane i kontrolne. W celu wywołania nowotworu gruczołu sutkowego, szczurom z grup badanych podano w 50. i 80. dniu życia 7,12 - dimetylobenzo[a]antracen (DMBA) w ilości 80 mg/kg masy ciała. Zastosowano następujące diety: 1. dietę standardową (Labofeed H) (77 mg Zn / kg paszy; 21,3 mg Cu / kg paszy) (grupa badana i kontrolna); 2. dietę standardową z dodatkiem Zn (231 mg Zn/kg paszy) (grupa badana i kontrolna); 3. dietę standardową z dodatkiem Zn (231 mg Zn/kg paszy) i resweratrolu (0,2 mg/kg m.c.) (grupa badana i kontrolna); 4. dietę standardową z dodatkiem Zn (231 mg Zn/kg paszy) i genisteiny (0,2 mg/kg m.c.) (grupa badana i kontrolna); 5. dietę standardową z dodatkiem Cu (42,6 mg Cu/kg paszy) (grupa badana i kontrolna); 6. dietę standardową z dodatkiem Cu (42,6 mg Cu/kg paszy) i resweratrolu (0,2 mg/kg m.c.) (grupa badana i kontrolna). Zwierzęta otrzymywały w/w suplementy w postaci wodnego roztworu, w ilości 0,4 mL, za pomocą zgłębnika, dożyłdkowo, od 40 dnia do 20 tygodnia życia. Po dekapitacji zwierząt, pobierano śledziony, ważono je, następnie mineralizowano i oznaczano stężenia cynku, magnezu, miedzi, wapnia i żelaza przy użyciu płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (PU-9100).

Wartość odzysku określono dla certyfikowanego materiału referencyjnego: NCS ZC 71001, Beef Liver i był on następujący: Cu – 94%; Fe – 108%; Ca – 103%; Zn – 109%; Mg – 96%.

Do oceny istotności statystycznej różnic między grupami: kontrolną i badaną, na takiej samej diecie, zastosowano test t – Studenta, dla  $p = 0,05$

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań wskazują, że nowotwór gruczołu sutkowego powoduje bardzo duży przyrost masy śledzion w grupach badanych w stosunku do grup zwierząt kontrolnych. Niezależnie od zastosowanej suplementacji diety, chemiczna indukcja nowotworu gruczołu sutkowego za pomocą DMBA spowodowała bardzo duży przyrost masy śledzion – od 74% do 138%, w stosunku do grup kontrolnych pozostających na analogicznych dietach (tab. I). Wyjątkiem była grupa suplementowana cynkiem podawanym łącznie z genisteiną, w której, masa śledziony wzrosła o 27%, ale nie była to zmiana istotna statystycznie (tab. I). Powiększenie śledziony może być jednym z objawów rozprzestrzeniania się choroby, co potwierdzają doniesienia naukowe (7-9). Śledziona stanowi duży węzeł chłonny, a jej podstawową funkcją jest modelowanie odpowiedzi immunologicznej (leukocyty) oraz usuwanie nieprawidłowych, starych krwinek czerwonych, a także magazynowanie żelaza i hemoglobiny. Immunosupresyjny efekt działania DMBA prawdopodobnie skutkuje zmniejszeniem białej i czerwonej masy śledziony, a tym samym ilości limfoblastów i limfocytów wywołując kompensacyjny efekt powiększenia śledziony.

Tabela I. Porównanie mas oraz stężeń badanych pierwiastków w śledzionach szczurów z rakiem sutka w stosunku do grup kontrolnych na tej samej diecie  
 Table I. A comparison of the mass and the bioelements levels in the spleen of the rats from the study groups and the control groups on the same diet

Grupa	Masa śledziony (g) $\bar{x} \pm SD$	Zn ( $\mu\text{g/g}$ ) $\bar{x} \pm SD$	Mg ( $\mu\text{g/g}$ ) $\bar{x} \pm SD$	Cu ( $\mu\text{g/g}$ ) $\bar{x} \pm SD$	Ca ( $\mu\text{g/g}$ ) $\bar{x} \pm SD$	Fe (mg/g) $\bar{x} \pm SD$
<b>Standard</b> badana (n=7) kontrola (n=6)	1,173 $\pm$ 0,307 * 0,6483 $\pm$ 0,0578	21,81 $\pm$ 1,69 20,24 $\pm$ 0,69	184,9 $\pm$ 21,4 168,9 $\pm$ 17,4	33,15 $\pm$ 4,15 35,26 $\pm$ 3,75	57,57 $\pm$ 4,48 58,40 $\pm$ 3,21	0,586 $\pm$ 0,187* 1,071 $\pm$ 0,206
<b>Zn</b> badana (n=7) kontrola (n=6)	0,905 $\pm$ 0,203 * 0,508 $\pm$ 0,076	20,05 $\pm$ 1,04* 18,60 $\pm$ 0,53	190,8 $\pm$ 20,8 170,8 $\pm$ 7,5	38,54 $\pm$ 4,23 50,8 $\pm$ 10,7	54,88 $\pm$ 28,22* 90,53 $\pm$ 17,54	1,018 $\pm$ 0,310* 1,429 $\pm$ 0,170
<b>Zn + resweratrol</b> Badana (n=8) kontrola (n=6)	1,233 $\pm$ 0,244 * 0,616 $\pm$ 0,075	19,91 $\pm$ 0,76 18,35 $\pm$ 1,59	202,8 $\pm$ 9,7* 169,2 $\pm$ 10,0	44,2 $\pm$ 1,93 47,34 $\pm$ 10,7	93,10 $\pm$ 7,72 98,18 $\pm$ 17,0	0,600 $\pm$ 0,328* 1,403 $\pm$ 0,215
<b>Zn + genisteina</b> Badana (n=8) kontrola (n=6)	0,760 $\pm$ 0,269 0,600 $\pm$ 0,050	17,17 $\pm$ 1,71* 21,16 $\pm$ 2,39	171,8 $\pm$ 16,8 159,1 $\pm$ 7,1	43,89 $\pm$ 9,01 40,62 $\pm$ 3,26	86,40 $\pm$ 12,88 82,83 $\pm$ 12,37	1,014 $\pm$ 0,387 1,345 $\pm$ 0,105
<b>Cu</b> Badana (n=7) Kontrola (n=6)	0,903 $\pm$ 0,234 * 0,514 $\pm$ 0,132	19,43 $\pm$ 1,09 19,40 $\pm$ 0,62	185,1 $\pm$ 8,0* 170,7 $\pm$ 5,3	44,75 $\pm$ 9,76* 63,02 $\pm$ 4,36	78,23 $\pm$ 21,55* 107,9 $\pm$ 17,0	0,894 $\pm$ 0,255 1,235 $\pm$ 0,424
<b>Cu + resweratrol</b> Badana (n=7) Kontrola (n=6)	0,998 $\pm$ 0,285 * 0,421 $\pm$ 0,075	18,26 $\pm$ 1,91 17,39 $\pm$ 4,79	168,6 $\pm$ 21,6 165,7 $\pm$ 12,9	31,93 $\pm$ 3,31* 66,45 $\pm$ 6,69	39,21 $\pm$ 3,97* 46,76 $\pm$ 5,95	0,429 $\pm$ 0,322* 1,568 $\pm$ 0,304

\* – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą badaną a kontrolną; n – liczba próbek,  $\bar{x}$  – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe

\* – statistically significant results of the comparison between study and control group; (n) – test number;  $\bar{x}$  – mean value; SD – standard deviation

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że proces nowotworowy silnie modyfikuje skład mineralny tkanek śledziony. Dla większości zastosowanych diet w śledzionach szczurów z nowotworem gruczołu sutkowego wystąpiło bardzo silne obniżenie stężenia żelaza od 29% – 73%, a także wapnia, od 16%- 39% (tab. I). Największy spadek stężenia żelaza odnotowano w grupie suplementowanej miedzią i resweratolem. Tak silny ubytek żelaza w śledzionach szczurów dotkniętych rakiem mógł także być przyczyną splenomegalii wywołanej odpowiedzią ze strony układu immunologicznego na niedobór żelaza i tym samym hemoglobiny oraz pobudzenia mechanizmów kompensacyjnych wykorzystujących „rezerwy” żelaza (11). Podobną tendencję spadkową obserwowano w odniesieniu do miedzi. Zjawisko to zaobserwowano w grupie otrzymującej wyłącznie miedź (spadek o 29%) (tab. I) jak również miedź w połączeniu z resweratolem (spadek o 52%), nie było natomiast istotnych zmian w grupach suplementowanych cynkiem, pomimo znanego antagonizmu cynkowo – miedziowego. Istnieje wiele doniesień naukowych potwierdzających, że metabolizm miedzi i żelaza jest zaburzony w chorobach nowotworowych (12). Zmienione nowotworowo komórki kumulują miedź z różnych tkanek, prawdopodobnie ze względu na jej rolę w procesie angiogenezy. Niewielkie zmiany dotyczyły zawartości cynku i magnezu w śledzionach szczurów z wyindukowanym rakiem gruczołu sutkowego w stosunku do grup kontrolnych (bez nowotworu) (tab. I). Uzyskane wyniki stanowią jedno z pierwszych doniesień i dlatego trudno jest odnieść je do danych z piśmiennictwa, bowiem w przypadku choroby nowotworowej, śledziona wydaje się być organem stosunkowo mało narażonym i rzadko badanym w kontekście zmian zawartości pierwiastków. Zważywszy jednak na bardzo zaburzoną homeostazę niektórych pierwiastków, zwłaszcza żelaza, wydaje się, że warto kontynuować ten kierunek badań.

## WNIOSKI

1. Zaawansowany rak sutka, niezależne od zastosowanej diety przyczynia się do istotnego wzrostu masy śledziony.
2. W trakcie choroby nowotworowej następują szczególnie intensywne zmiany w rozmieszczeniu żelaza. Wydaje się, że zablokowanie dostępu tkance nowotworowej do magazynu żelaza w śledzionie może być jedną z dróg wspomaganie leczenia tej choroby.

D. Skrajnowska, B. Bobrowska-Korczak, M. Klepacz, A. Tokarz

THE EFFECT OF APPLIED DIETS ON CHANGES IN CHOSEN MINERAL LEVELS  
IN THE SPLEEN OF RATS WITH BREAST CANCER

### Summary

The aim of the study was to investigate the effect of dietary zinc ions or copper, and in combination with resveratrol or genistein on the level of some minerals (zinc, magnesium, copper, calcium and iron) in the spleen, in the conditions of the ongoing process of cancer induced by 7,12 – dimethylbenz [a] anthracene (DMBA).

Regardless of dietary supplementation the chemical induction of breast cancer with DMBA resulted in statistically significant spleen weight gain relative to the control. During the process of neoplastic changes the distribution of elements, especially iron is modified.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Goląb J., Jakóbsiak M., Lasek W.*: Immunologia. PWN, 2009. – 2. *Hardasik D., Kostecki J., Zaniwski M.*: Guzy przerzutowe do śledziony – przegląd literatury. *Chir Pol*, 2008; 10: 175-180. – 3. *Peters A. M.*: Why the spleen is a very rare site for metastases from epithelial cancers? *Med Hypotheses*, 2012; 78: 26-28. – 4. *Weigelt B., Peterse J.L., van't Veer L.J.*: Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nat Rev Cancer*: 2005; 5: 591-602. – 5. *Genc V., Akbari M., Karaca A.S., Çakmak A., Ekinci C., Gürel M.*: Why is isolated spleen metastasis a rare entity? *Turk J Gastroenterol*, 2010; 21(4): 452-453. – 6. *Chapel F., Baume D., Bereder J-M.*: Unusual Vascular Changes in the Red Pulp of the Spleen Accompanying Breast Carcinoma Metastasis. *Pathol Res Prac*, 1999; 195: 53-56. – 7. *Paolini R., Toffoli S., Poletti A., Casara D., Moschino P., Fabris F., Girolami A.*: Splenomegaly as the first manifestation of thyroid cancer metastases. *Tumori*, 1997; 83(4): 779-782. – 8. *Klein B., Stein M., Kuten A., Steiner M.*: Splenomegaly and Solitary Spleen Metastasis in Solid Tumors. *Cancer*, 1987; 60: 100-102. – 9. *Comperat E., Bardier-Dupas A., Camparo P.*: Splenic metastases. Clinicopathologic presentation, differential diagnosis and pathogenesis. *Arch Patol Lab Med* 2007; 131: 965-969. – 10. *Pawlicki M., Rolski J., Zemelka T.*: Leczenie anemii u chorych na nowotwory złośliwe. *Współcz Onkol*, 2002; 6(10): 654-663.
11. *Gibson J.N., Jellen L.C., Unger E.L., Morahan G., Mehta M., Earley C.J., Allen R.P., Lu L., Jones B.C.*: Genetic Analysis of Iron Deficiency Effects on the Mouse Spleen. *Mamm Genome*, 2011; 22: 556-562. – 12. *Siddiqui M.K.J., Jyoti, Singh S., Mehrotra P.K., Singh K., Sarangi R.*: Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. *Environ Int*, 2006; 32: 630-637.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.