

Dorota Skrajnowska, Barbara Bobrowska, Andrzej Tokarz, Marzena Kuras

WPLYW MIEDZI I RESWERATROLU NA ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH PIERWIASTKÓW W GUZACH NOWOTWOROWYCH U SZCZURÓW

Katedra i Zakład Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie
Kierownik: dr hab. A. Tokarz, prof. nadzw.

Celem pracy było zbadanie czy jony miedzi i resweratrol obecne w diecie szczurów wpłyną na szybkość indukcji nowotworowej oraz zmiany w zawartości pierwiastków w tkance rakowej gruczołu sutkowego. Wykazano, że niezależnie od zastosowanej diety nie nastąpiło zahamowanie indukcji nowotworowej gruczołu sutkowego szczurów wywołane DMBA. W grupach suplementowanych Cu i resweratrolem wystąpiło wyraźne przyspieszenie tworzenia się guzów. W badanej tkance nowotworowej nastąpił wzrost ilości Fe i spadek Mg w porównaniu do zdrowej tkanki gruczołu sutkowego szczurów.

Hasła kluczowe: nowotwór piersi, wapń, magnez, cynk, żelazo, miedź, fosfor.
Key words: breast cancer, calcium, magnesium, zinc, iron, copper, phosphorus.

W oparciu o wyniki badań nad chemicznie indukowaną karcynogenezą u zwierząt doświadczalnych stwierdzono chemoprewencyjne właściwości związków polifenolowych (1, 2). Z kolei prokancerogenne działanie miedzi wiąże się z wytwarzaniem reaktywnych rodników tlenowych uszkadzających nici DNA oraz inicjowaniem procesu angiogenezy guza (3). Przeprowadzono wiele badań potwierdzających skuteczność stosowania chelatorów miedzi (np. penicylaminy, tetratiomolibdenianu, kaptoprylu, jonów cynku) w leczeniu przeciwnowotworowym (4, 5). W prezentowanej pracy jako chelator miedzi zastosowano resweratrol, ze względu na to że jest to związek naturalnie występujący w przyrodzie i wykazujący silne właściwości antyoksydacyjne (2). Grupy hydroksylowe polifenoli wchodząc w reakcje z wolnymi rodnikami, tworzą bardziej stabilne kompleksy. Polifenole kompleksując jony Cu (II) i Fe (II), mogą hamować aktywność enzymów np. oksydazy ksantynowej i procesów nasilających powstawanie wolnych rodników (1, 2, 6).

Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi czy wzbogacenie diety w miedź lub resweratrol podawany łącznie z jonami miedzi wpłynie na szybkość indukcji nowotworowej oraz czy nastąpią zmiany w zawartości pierwiastków w tkance rakowej gruczołu sutkowego szczurów.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach użyto samice szczurów szczepu *Sprague-Dawley*. Jony miedzi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w dawce 42,6 mg Cu/kg paszy oraz resweratrol w dawce 0,2 mg/kg mc. podawano w postaci wodnego roztworu w ilości 0,4 ml za pomocą sondy dożołądkowej od 40 dnia do 20 tygodnia życia. W celu wywołania nowotworu, szczurom z grup badanych podawano w 50 i 80 dniu życia, 80 mg/kg masy ciała DMBA (7,12 - dimetylobenzo[*a*]antracen). Dietę standardową (Labofeed H) (21,3 mg Cu/kg paszy) - podawano zwierzętom bez ograniczeń.

Materiał do badań stanowiły guzy gruczołu sutkowego. Analizowane pierwiastki oznaczono po mineralizacji na mokro w mineralizatorze mikrofalowym (MULTIWAVE, Anton Paar, Perkin Elmer). Zawartość P określono metodą spektrofotometryczną *Scheelego* (7), natomiast Ca, Mg, Fe i Zn metodą ICP-OES (Optima 3100XL, Perkin Elmer), a Cu metodą FAAS (PY-UNICAM 9100). Ocena odzysku przeprowadzono wykorzystując: NCS ZC 71001 Beef Liver (Cu – 118%; Fe – 109%; Ca – 115%; Zn – 105%; Mg – 96%; P – 103%).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zastosowana dawka miedzi (dwukrotnie przekraczająca ilość w paszy), nie powodowała braku apetytu i utraty masy ciała szczurów, a nawet w grupie otrzymującej łącznie Cu i resweratrol masa ciała istotnie wzrosła (tab. I). Niezależnie od zastosowanej diety efektywność indukcji nowotworowej za pomocą DMBA wynosiła 100%. Występowały zarówno guzy pojedyncze jak i mnogie – maksymalnie do 6/szczura. Przy czym w grupie szczurów suplementowanych Cu i resweratrolem pierwsze wyczuwalne palpacyjnie guzy pojawiły się tydzień wcześniej niż w grupie na diecie standardowej (co przekłada się na około 6 miesięcy w odniesieniu do życia człowieka) (8) (tab. I). Zwiększone stężenie Cu stwierdzono w różnych typach nowotworów (9, 10). Wykazano, że mobilizacja miedzi endogennej, związanej w jądrze, przez resweratrol może wywoływać uszkodzenia i fragmentację DNA w ludzkich komórkach raka i tym samym indukować ich apoptozę (9, 11). Jednakże w dużej mierze uzależnione to jest od odpowiednio dobranej wysokiej dawki resweratrolu (2, 9, 12). Zastosowana w naszych badaniach ilość resweratrolu nie zadziałała ochronnie (prawdopodobnie ze względu na wysoką dodatkową podaż jonów miedzi) w stosunku do procesu tworzenia się guzów (tab. I).

Tabela I. Efektywność indukcji nowotworowej i wpływ zróżnicowanej diety na masę ciała szczurów

Table I. Tumor induction and body weight of rats in relation to diet

Rodzaj diety	Liczba guzów w grupie	Liczba guzów/ szczura	Czas pojawienia się guzów (tydzień)	Masa ciała (g)	
				$\bar{X} \pm SD$	
				grupa badana (DMBA+)	grupa kontrolna (DMBA-)
standard	9/9 (100%)	1-5	15	206 ± 8* (n=8)	253 ± 14 (n=6)
standard + Cu	9/9 (100%)	1-5	14	231 ± 22 (n=9)	210 ± 15 (n=7)
standard + Cu + resweratrol	12/12 (100%)	2-6	14	229 ± 13* (n=12)	192 ± 9 (n=8)

* – różnice istotne statystycznie dla stopnia istotności $p \leq 0,05$, * - statistical significance $p \leq 0,05$

Prezentowane badania wykazały, że wzbogacenie diety szczurów w Cu lub Cu i resweratrol powodowało istotny, dwukrotny wzrost zawartości Cu (i P) w tkance nowotworowej w stosunku do zdrowej (tab. II). Podwyższone stężenie Cu w tkankach nowotworowych prawdopodobnie, stymuluje rozwój guza w gruczole sutkowym, poprzez angiogenezę i oksydatywne uszkodzenie DNA (9, 10). Z kolei zwiększone stężenie P w guzach w porównaniu do tkanek zdrowych może wynikać z faktu, że rozwijający się guz potrzebuje dostarczenia większej porcji energii w postaci adenosynotrifosforanu (ATP) (13).

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że niezależnie od zastosowanej diety w wyindukowanych guzach, nastąpił wzrost ilości Fe i spadek Mg w porównaniu do zdrowej tkanki gruczołu sutkowego (tab. II). Żelazo w wysokich stężeniach, zwłaszcza jeśli nastąpi uwolnienie z połączeń białkowych może inicjować peroksydację lipidów, uszkadzać komórki katalizując reakcję powstawania wolnych rodników i doprowadzać do mutacji DNA. Może także inicjować powstawanie stanu zapalnego oraz stymulować wzrost guza, poprzez nasilenie angiogenezy (10, 13). Otrzymane wyniki są zgodne z badaniami prowadzonymi przez innych badaczy (10, 14). Z kolei Mg jest niezbędny do powielania i naprawy DNA, a deficyt tego pierwiastka sprzyja mutacjom DNA prowadzącym do inicjacji pierwszego etapu karcinogenezy. Jednakże ochronna rola Mg w procesie nowotworzenia w dużej mierze zależy od stopnia zaawansowania choroby. W wielu pracach wykazano, że zmiana diety z ubogomagnezowej na normalną powoduje dramatyczny wzrost guzów, który w części można wytłumaczyć nasileniem angiogenezy, bowiem komórki śródbłonna są czułe na zewnątrzkomórkowy poziom tego kationu (15).

Zawartość wapnia i cynku w tkance nowotworowej była istotnie podwyższona jedynie w grupie suplementowanej Cu i resweratolem (tab. II). Pomimo znanych interakcji Zn-Cu, we wchłanianiu jelitowym oraz wiązaniu metalotioneiny, nie zaobserwowano istotnych zmian w ilości cynku w większości guzów (tab. II).

Tabela II. Porównanie zawartości pierwiastków w guzach gruczołu sutkowego szczurów (DMBA+), otrzymujących różnicowane diety w odniesieniu do tkanki zdrowej gruczołu sutkowego (DMBA-)

Table II. Comparing contents of minerals between tumor and health tissues of mammary glands of rats in relation to diet

Dieta →	Rodzaj diety					
	standard		standard + Cu		standard + Cu + resweratrol	
	guz	zdrowa tkanka	guz	zdrowa tkanka	guz	zdrowa tkanka
Cu (µg/g)	2,92±0,85 (n=7)	2,57±0,79 (n=5)	2,52±0,66* (n=8)	1,25±0,36 (n=7)	2,40±0,51* (n=10)	1,27±0,36 (n=8)
Zn (µg/g)	17,6±0,9 (n=7)	17,6±1,7 (n=5)	18,2±1,3 (n=8)	17,0±1,2 (n=7)	17,1±1,4* (n=10)	18,6±0,8 (n=8)
Fe (µg/g)	50,7±22,6* (n=7)	17,7±3,1 (n=5)	39,7±15,5* (n=8)	17,4±2,9 (n=7)	39,0±11,6* (n=10)	17,4±2,3 (n=8)
Mg (µg/g)	153,6±10,5* (n=7)	224,4±33,8 (n=5)	171,9±12,6* (n=8)	245,9±11,9 (n=7)	157,0±12,9* (n=10)	253,0±14,4 (n=8)
Ca (µg/g)	518,0±363 (n=7)	399,9±462 (n=5)	161,8±156,7 (n=8)	80,9±35,9 (n=6)	242,9±109,7* (n=10)	64,8±2,8 (n=8)
P (mg/g)	2,30±0,16 (n=7)	2,16±0,11 (n=5)	2,52±0,19* (n=8)	1,87±0,21 (n=7)	2,22±0,19* (n=10)	1,78±0,1 (n=8)

* – różnice istotne statystycznie w zawartości pierwiastków pomiędzy guzem i zdrową tkanką dla $p \leq 0,0$.

WNIOSKI

1. Niezależnie od zastosowanej diety (standardowa, Cu; Cu + resweratrol) nie wystąpiły różnice w indukcji nowotworowej gruczołu sutkowego szczurów pod wpływem DMBA.

2. Suplementacja diety wyłącznie jonami Cu lub w połączeniu z resweratrolem wyraźnie przyspieszała tworzenie się guzów.

3. Niezależnie od zastosowanej diety w guzach gruczołu sutkowego nastąpił wzrost ilości Fe i spadek Mg w porównaniu do zdrowej tkanki gruczołu sutkowego.

4. Dodatkowe wzbogacanie diety szczurów w Cu powodowało wzrost jej zawartości w guzie.

D. Skrajnowska, B. Bobrowska, A. Tokarz, M. Kuras

THE EFFECT OF COPPER AND RESVERATROL ON TUMOR CONCENTRATIONS OF TRACE ELEMENTS IN RATS

Summary

The aim of the study was to assess the impact of DMBA-induced rat breast cancer on the copper, zinc, calcium, magnesium and phosphorus concentrations in cancerous tissues (tumours) of rats in comparison with corresponding tissues of normal animals. Female Sprague-Dawley rats were divided into groups which, apart from the standard diet, were treated with copper ions or copper ions and resveratrol via gavage. In the study group, the rats were treated with a dose of 80 mg/body weight of DMBA (7,12-dimethyl-1,2- benz[*a*]anthracene) given in rapeseed oil at 50 and 80 days of age to induce

breast cancer (*adenocarcinoma*). After wet microwave mineralization of the tissues, phosphorus content was determined using Scheele's spectrophotometry, copper with FAAS (PU 9100) and the content of the remaining elements with the ICP-OES technique (Optima 3100XL, Perkin Elmer). Regardless of the diet (standard; Cu; Cu + resveratrol), DMBA-induced breast carcinogenesis was not inhibited. On the contrary, in the supplemented groups, tumorigenesis developed at a considerably faster rate. The induced tumors showed increased Fe and decreased Mg levels in contrast to those in the normal control tissue. Supplementation of the rat diet with Cu or Cu + resveratrol resulted in an increased copper level in the tumour.

PIŚMIENNICTWO

1. Hudson E.A., Dinh P.A., Kokubun T., Simmonds MS, Gescher A.: Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 1163- 1170.- 2. Alkhalaf M., El-Mowafy A., Renno W., Rachid O, Ali A, and Al-Attayah R.: Resveratrol-induced Apoptosis In Human Breast Cancer Cells Is Mediated Primarily through the Caspase-3-dependent Pathway. *Arch. Medical Research*, 2008; 39: 162-168.- 3. Nasulewicz A., Opolski A.: Rola miedzi w procesie angiogenezy nowotworowej - implikacje kliniczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2002; 56 (6): 691-705.- 4. Cox C., Teknos TN, Barrios M., Brewer G.J., Dick R.D., Merajver S.D.: The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 2001; 111: 696-701.- 5. Brewer G.J., Dick R.D, Grover DK., LeClaire V., Tseng M., Wicha M., Pienta K., Redman B.G., Jahan T., Sondak V.K., Strawderman M., LeCarpentier G., Merajver S.D.: Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: phase I study. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 1-10.- 6. Lodovici M., Guglielmi F., Meoni M., Dolara P.: Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.*, 2001; 39: 1205-1210.- 7. Olędzka R., Woźniak J.: Analiza bromatologiczna. Jakość zdrowotna żywności, Wyd. Akademii Medycznej, Warszawa, 2007; 68-70.- 8. Quinn R.: Comparing rats to humans age: How old is my rat in people years? *Nutrition*, 2005; 21 (6): 775-777.- 9. Ahmad A., Syed F.A., Singh S., Hadi S.M.: Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, 2005; 159: 1-12.- 10. Naga Raju G.J., Sarita P., Ravi Kumar M., Rahana Murty G.A.V., Seetharami Reddy B., Lakshminarayana S., Vijayan V., Rama Lakshmi P.V.B., Satyanarayana Gavarasana, Bhuloka Reddy S.: Trace elements correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.*, 2006; 247: 361-367.

11. Clement M.V., Hipara J.I, Chawdhury S.H., Pervaiz, S.: Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 1998; 92: 996-1002.- 12. Hsu H.Y., Tsang S.F., Lin K.W., Yang S. C., Lin C. N.: Cell death induced by flavonoid glycosides with and without copper, *Food Chem. Toxicol.*, 2008; 46: 2394-2401.- 13. Durak I., Kavutcu M., Canbolat O, Isik AU, Akyol O: Concentrations of some major and minor elements in larynx tissues with and without cancer. *Bio Metals*, 1994; 7: 45-48.- 14. Cui Y., Vogt S., Olson N., Glass A.G., Rohan T.E.: Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2007; 16 (8): 1682-1685.- 15. Anastassopoulou J., Theophanides T.: Magnesium – DNA interaction and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002; 42 (1): 79-91.

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