

*Dorota Skrajnowska, Barbara Bobrowska,
Martyna Wereszczyńska, Andrzej Tokarz*

WPLÝW SUPLEMENTACJI JONÓW MIEDZI I RESWERATROLU NA ZAWARTOŚĆ SKŁADNIKÓW MINERALNYCH W SIERŚCI SZCZURÓW Z WYINDUKOWANYM CHEMICZNIE NOWOTWOREM GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Dr hab. *A. Tokarz* prof. nadzw.

Celem pracy było zbadanie czy jony miedzi i resweratrol obecne w diecie szczurów wpłyną na zmiany w zawartości pierwiastków (Cu, Fe, Ca, Zn, Mg i P) w sierści szczurów z wyindukowanym za pomocą DMBA (7,12 - dimetylo benzo[a]antracen) nowotworem gruczołu sutkowego. Proces nowotworzenia w tkance gruczołu sutkowego powodował szereg zmian w stężeniach pierwiastków w sierści. Zastosowana suplementacja jonów miedzi oraz kombinacja Cu i resweratrolu miała istotny odmienny wpływ na dystrybucję pierwiastków do sierści.

Hasła kluczowe: nowotwór piersi, miedź, żelazo, wapń, cynk, magnez, fosfor, resweratrol.

Key words: breast cancer, copper, iron, calcium, zinc, magnesium, phosphorus, resveratrol.

Pierwiastki dostają się do organizmu człowieka różnymi szlakami – drogą wziewną, pokarmową (woda, żywność, preparaty farmaceutyczne), poprzez skórę, następnie z krwią trafiają do tkanek i narządów, a usuwane są z organizmu z moczem, kałem, potem i dystrybucją do sierści czy włosów (1). Wiązanie pierwiastków przez powstające białko włosa (głównie aminokwas - cysteinę) zależy od wielu czynników jak: dobrze zbilansowana dieta, odpowiednia strawność i przyswajalność poszczególnych składników diety, wreszcie od sprawnych mechanizmów dystrybucji (1-3). Analiza włosów nawet po wielu latach umożliwia określenie składu i ocenę zatrucia np. pierwiastkami toksycznymi jak ołów, rtęć i kadm, co wykorzystuje medycyna sądowa (1-3). Analiza włosów ciągle jednak nie jest powszechnie stosowanym badaniem w kierunku diagnostyki różnych chorób. Wiąże się to przede wszystkim z trudnością w standaryzacji zakresu wartości referencyjnych. Czynniki, które mają znaczący ale niejednoznaczny wpływ na poziom pierwiastków we włosach są: wiek, płeć, fragment włosa pobranego do analizy, miejsce pobrania włosa, jego kolor, miejsce zamieszkania, stosowana dieta czy stres (3-5). Nie do końca wiadomo w jakim stopniu przewlekły proces chorobowy wpływa na skład mineralny włosów (3,6). W przypadku zwierząt laboratoryjnych nie

ma większości tych problemów, można więc uzyskane wyniki próbować przełożyć na toczący się proces chorobowy. Jednak w piśmiennictwie w zasadzie nie ma informacji na temat różnic w poziomach określonych składników mineralnych w sierści zwierząt w trakcie różnych chorób, także procesu nowotworowego.

Celem pracy jest określenie wpływu diety wzbogaconej w miedź (w ilościach przekraczających 2-krotny poziom w paszy) oraz połączenie miedzi z resweratrolelem - na zmiany w stężeniach analizowanych składników mineralnych (Cu, Zn, Mg, Ca, Fe i P) w sierści szczurów z wyindukowanymi za pomocą DMBA nowotworami gruczołu sutkowego.

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 0,2mg/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) (21,3mg Cu/kg paszy) - podawano zwierzętom bez ograniczeń. W celu przeprowadzenia analizy pierwiastków, sierść oczyszczono acetonem, osuszono i zmineralizowano na mokro (Plazmatronika). Zawartość pierwiastków oznaczono z wykorzystaniem metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) a fosfor oznaczono metodą spektrofotometryczną *Scheelego* (7). Ocenę odzysku przeprowadzono wykorzystując materiał referencyjny NCS DC 73347 Hair (Cu – 91%; Fe – 92%; Ca – 90%; Zn – 93%; Mg – 98%; P -113%).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie analizy pierwiastkowej włosów, można wnioskować o zmianach patologicznych zachodzących w organizmie np. poziom metali ciężkich we włosach ludzkich, odzwierciedla stopień skażenia organizmu (1). Nie wiadomo jednak, czy w trakcie przewlekłego procesu nowotworowego poziom pierwiastków we włosach zmienia się w sposób charakterystyczny. Coraz większą rolę w terapii przeciwnowotworowej odgrywają badania nad wykorzystaniem hamowania unaczynienia komórek rakowych. Do endogennych promotorów angiogenezy należą m.in. jony miedzi (8). Przeprowadzono wiele badań potwierdzających skuteczność stosowania chelatorów miedzi (np. penicylaminy, tetratiomolibdenianu, kaptoprylu, jonów cynku) w leczeniu przeciwnowotworowym (9). 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 (10). 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 (10).

Tabela 1. Zawartość wybranych pierwiastków w sierści szczurów w zależności od diety

Table 1. Concentration of selected elements in hair of rats in relation to diet

Pierwiastek ($\mu\text{g/g}$)	Dieta standardowa		Dieta standardowa + Cu		Dieta standardowa + Cu + resweratrol	
	Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna
	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$
	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)
Miedź	12,6 \pm 0,74 (8)	12,2 \pm 1,56 (6)	10,2 \pm 2,11a (8)	15,52 \pm 1,43b (7)	17,82 \pm 1,13a (11)	15,5 \pm 0,56 b (7)
Żelazo	12,7 \pm 2,91a(8)	9,92 \pm 1,08 (6)	6,73 \pm 1,72a (8)	9,22 \pm 0,5 (7)	10,77 \pm 1,24 (11)	9,54 \pm 0,59 (8)
Wapń	307,9 \pm 34,9a (8)	434,2 \pm 54,1 (6)	261,6 \pm 97,8a (8)	371,3 \pm 29,5b (7)	328,1 \pm 55,8 (11)	282,0 \pm 54,5b (8)
Cynk	195,7 \pm 7,14a (7)	163,8 \pm 10,9 (6)	124,8 \pm 38,9a (7)	176,5 \pm 11,67 (7)	181,8 \pm 6,03a (11)	120,2 \pm 17,1b (8)
Magnez	124,0 \pm 2,99a (7)	168,5 \pm 7,6 (5)	85,2 \pm 22,2a (7)	133,6 \pm 17,5b (7)	127,6 \pm 17,9 (11)	120,2 \pm 17,1b (8)
Fosfor	305,5 \pm 10,1a (8)	358,2 \pm 41,3 (6)	176,4 \pm 36,7a (8)	298,9 \pm 30,4b (7)	271,5 \pm 32,1a (11)	220,4 \pm 31,0b (8)

a - różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) pomiędzy stężeniem pierwiastków w grupach (DMBA+) i (DMBA-) dla każdego rodzaju diety

b - różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) pomiędzy stężeniem pierwiastków dla każdego rodzaju diety (DMBA-) w porównaniu do diety standardowej (DMBA-)

(n) – liczba prób; X – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe

a - differences ($p \leq 0,05$) between concentrations of metals in DMBA(+) and DMBA(-) groups of each type of diet.

b - differences ($p \leq 0,05$) between concentrations of metals in each type of diet (DMBA-) relative to standard diet (DMBA-).

(n) - test number; X – mean; SD – standard deviation

Celem pracy była próba określenia przydatności sierści szczurów jako tkanki „odpowiadającej” zarówno na nowotworową chorobę przewlekłą jak i stosowaną dietę. Aby ocenić efektywność oddziaływania diet, początkowo porównano grupy kontrolne otrzymujące: Cu lub Cu z resweratrolem z grupą kontrolną karmioną dietą standardową. Okazało się, że zmiany zawartości pierwiastków w sierści szczurów będących na dietach suplementowanych mają w zasadzie taki sam charakter. W obydwu grupach nastąpiło podwyższenie ilości Cu i obniżenie zawartości Ca, Mg, P oraz Zn, bez zmian dla poziomu żelaza, w stosunku do sierści szczurów nie suplementowanych, pozostających na diecie standardowej. Można więc przyjąć, że dodatkowa ilość miedzi w diecie szczurów efektywnie zmieniła skład mineralny pierwiastków, natomiast podaż resweratrolu nie miała w tym kontekście dużego znaczenia. Suplementacja diety szczurów zdrowych jonami miedzi (i resweratrolu) istotnie podwyższała jej poziom w sierści, co świadczy o efektywnym gromadzeniu się nadmiaru podawanego pierwiastka w tkance magazynowej oraz istotnie obniżała poziom pozostałych analizowanych składników mineralnych w sierści, co może świadczyć o zaburzonym metabolizmie tych biopierwiastków. Na uwagę zasługuje fakt, pewnej stabilizacji odnośnie zawartości żelaza, niezależnie od zastosowanej suplementacji w grupie szczurów zdrowych.

Zupełnie odmiennie przedstawia się sytuacja gdy zostaje włączony czynnik kancerogeny (DMBA) bardzo silnie modyfikujący metabolizm ustroju (Tabela 1). W sierści szczurów karmionych tylko dietą standardową i otrzymujących DMBA wystąpił istotny wzrost stężenia Fe i Zn oraz obniżenie poziomów Ca, Mg i P, w stosunku do szczurów kontrolnych, nie traktowanych DMBA. Uzyskane wyniki podwyższenia poziomów Zn i Fe we włosach pacjentów z różnymi typami nowotworów znajdują potwierdzenie w innych pracach (11-13).

Ponadto, badania wykazały, że wzbogacenie diety szczurów w jony Cu lub Cu z resweratrolem powodowało istotne, ale niejednokrotnie zupełnie odmiennie, zmiany w sierści szczurów. I tak, suplementacja jonami miedzi wywołała w sierści szczurów z nowotworem obniżenie zawartości wszystkich badanych pierwiastków w stosunku do sierści szczurów na takiej samej diecie, ale bez kancerogenu. Natomiast, gdy zastosowano suplementację skojarzoną z udziałem jonów miedzi i resweratrolu nastąpiło zwiększenie ilości Cu, Zn i P, bez zmian w stosunku do Ca, Fe i Mg. Z przedstawionych wyników badań można sądzić, że długotrwała modyfikacja diety zwłaszcza jonami miedzi szczególnie jednoznacznie wpłynęła na zmiany w składzie mineralnym sierści dla grup badanych (DMBA+) w stosunku do kontroli (DMBA-). Tymczasem dodatek resweratrolu do jonów miedzi - całkowicie modyfikował skład mineralny sierści szczurów z grupy badanej w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej analogiczną dietę.

WNIOSKI

1. Suplementacja diety szczurów zdrowych wyłącznie jonami miedzi lub w połączeniu z resweratrolem przyczyniała się do zmian ilościowych szeregu pierwiastków w sierści szczurów, co świadczy o wyraźnej zależności składu mineralnego włosów od diety.

2. Zastosowanie kancerogenu (DMBA) wpływało także na zmiany w składzie mineralnym sierści szczurów, jednak ich charakter był zmienny i w dużej mierze zależny od rodzaju zastosowanej diety.

Dorota Skrajnowska, Barbara Bobrowska,
Martyna Wereszczyńska, Andrzej Tokarz

THE EFFECT OF COPPER AND RESVERATROL ON HAIR MINERAL CONCENTRATIONS IN RATS WITH DMBA-INDUCED MAMMARY CANCER

Summary

The aim of the study was to assess the impact of copper and resveratrol on the mineral concentrations in hair of rats with DMBA-induced mammary cancer.

Female Sprague-Dawley rats were divided into groups which, apart from the standard diet, were treated with copper ions ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) or copper ions with resveratrol via gavage. In 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*).

It was shown that depending on the applied diet there were significant differences in the content of elements in the examined tissue as compared with the control groups. In the group of unsupplemented rats fed only the standard diet, an increase of Fe and Zn content was observed and a decrease of Ca, Mg and P content in comparison with the rats not supplemented with DMBA. In Cu-supplemented groups a decrease of concentration of all examined trace elements was observed, whereas in the groups that obtained Cu and resveratrol there was a clear increase of Cu, Zn and P content as compared with the hair of rats that were fed the same diets but without DMBA supplementation.

The process of carcinogenesis in the mammary tissue resulted in many changes in the content of trace elements in the rats' hair. The applied supplementation with Cu and Cu + resveratrol had a significantly different effect on the distribution of elements to the hair.

PIŚMIENNICTWO

1. Chojnacka K., Górecka H.H., Chojnacki A., Górecki H.: Inter – element interaction In human hair. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.*, 2005; 20: 369-374.
2. Długaszek M., Szopa M., Mularczyk-Oliwa M.: Investigations of Ni content in human hair, *J. Elementol.*, 2009; 14(2): 229-237.
3. Yasuda H., Yoshida K., Segawa M., Tokuda R., Tsutsiu T., Yasuda Y., Magara S.: Metallomics study using hair mineral analysis and multiple logistic regression analysis: relationship between cancer and minerals, *Environ. Health Prev. Med.*, 2009; 14: 261-266.
4. Klevay L.M., Christopherson D.M., Shuler T.R.: Hair as a Biopsy Material: Trace Element Data on One Man Over Two Decades, *Eur. J. of Clin. Nutr.*, 2004; 58: 1359-1364.
5. Hong S.Ra., Lee S.M., Lim Na.Ri., Chung H.W., Ahn H.S.: Association between hair mineral and age, BMI and nutrient intakes among Korean female adults, *Nutr. Res. and Pract.*, 2009; 3(3), 212-219.
6. Pasha C., Malik S.A., Shaheen N., Shah M.H.: Comparison of trace elements in the scalp hair of malignant and benign breast lesions versus healthy women, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010; 134: 160-173.
7. Olędzka R., Woźniak J.: Analiza bromatologiczna. Jakość zdrowotna żywności., Dział Wydawnictw Akademii Medycznej, Warszawa 2007: 68-70.
8. Eleutherakis V., Karali M., Kokkonouzis I., Tiliakos I, Dimopoulos M.A.: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma: clinical significance and therapeutic approach, *Leukemia and Lymphoma*, 2003; 44(6): 937-948.
9. Brewer GJ, Dick RD, 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.
10. Alkhalaf M., El-Mowafy A., Renno W.,: Resveratrol-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated primarily through the caspase-3-dependent pathway, *Arch. Medical Res.*, 2008; 39: 162-168.

11. *Bhuloka Reddy S., M.J. Charles, Naga Raju G.J. et al.*: Trace elemental analysis of cancer – afflicted intestine by PIXE technique, *Biol. Trace Elem., Res.*, 2004; 102: 265-281. -12. *Pasha Q., Malik S.A., Iqbal J. et al.*: Characterization and distribution of the selected metals in the scalp hair of cancer patients in comparison with normal donors, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2007; 118: 207-216. -13. *Ren Y., Zhang Z., Ren Y. et al.*: Diagnosis of lung cancer based on metal contents in serum and hair using multivariate statistical method, *Talanta*, 1997; 44: 1823-1831.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1