

Dorota Skrajnowska, Barbara Bobrowska-Korczak, Andrzej Tokarz

WPLYW ZASTOSOWANYCH DIET NA ZMIANY W ZAWARTOŚCI MIEDZI W KOŚCI UDOWEJ I SIERŚCI SZCZURÓW Z RAKIEM SUTKA

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

Celem pracy było zbadanie wpływu suplementacji diety cynkiem oraz cynkiem razem ze związkami polifenolowymi na zawartość miedzi w kości udowej oraz sierści szczurów z rakiem sutka. Przewlekły proces nowotworowy i zastosowana suplementacja diety wywołały istotne zmiany ilości miedzi w kości udowej.

Hasła kluczowe: cynk, miedź, resweratrol, genisteina, kość udowa, sierść, szczury.
Key words: zinc, copper, resveratrol, genistein, femur, hair, rats.

Nowotworowe przerzuty osteolityczne stwierdza się u 70–80% kobiet z zaawansowanym rakiem gruczołu sutkowego (1, 2). Obecność komórek nowotworowych w tkance kostnej doprowadza do obniżenia wytrzymałości mechanicznej kości oraz zwiększonej podatności na złamanie (2). Resorpcja kostna z powodu przerzutów może być również jedną z przyczyn bardzo niebezpiecznej dla życia hiperkalcemii (1, 2). Stosunkowo niewiele jest badań dotyczących wpływu jonów cynku i fitoestrogenów oraz współistniejącej choroby nowotworowej na stan mineralny kośćca. A przecież związki te odgrywają bardzo ważną rolę zarówno w prawidłowym tworzeniu się kości, sprawnym obrocie metabolicznym tej tkanki, jak i w niezwykle złożonym procesie nowotworzenia (3–5). W licznych badaniach wykazano, że do oceny stanu przemiany mineralnej w organizmie można wykorzystać analizę mikro- i makroelementów we włosach (3, 6–8). Po pierwsze, pierwiastki występują we włosach w dużo większym stężeniu niż we krwi, w przypadku cynku różnica jest stukrotna. Ponadto, możliwe jest uzyskanie informacji odnośnie zawartości pierwiastków w dłuższym okresie takim jak dwa, trzy miesiące. Inną korzyścią przemawiającą za analizą włosów jest fakt, iż stężenia mikro- i makroelementów we krwi mogą ulegać zmianom np. pod wpływem emocji. Takich wahań nie obserwuje się analizując próbki włosów. W badaniach wykazano, że zachodzi korelacja między stężeniem pierwiastków we włosach a ich ilością w narządach wewnętrznych organizmu (7, 8). Wykazano, że poziom miedzi we włosach koreluje znacząco z jej zawartością w wątrobie, sercu i nerkach, natomiast nie koreluje z ilością tego pierwiastka w surowicy. Podobnie, poziom cynku we włosach odpowiada zawartości w kościach i w jądrach, a poziom selenu w tym materiale biologicznym korelował z ilością tego składnika

w wątrobie i płucach (7, 8). Dodatkowymi korzyściami wynikającymi z analizy pierwiastkowej włosów jest to, iż próbki włosów mogą być bezinwazyjnie pobrane od dawcy i wysyłane do laboratorium.

Celem pracy była ocena wpływu suplementacji diety cynkiem oraz cynkiem w połączeniu z resweratrolelem i genisteiną, na zmiany w zawartości miedzi w kości udowej i sierści szczurów w przebiegu raka gruczołu sutkowego.

MATERIAŁ I METODY

W pracy użyto samice szczurów szczepu Sprague-Dawley o początkowej masie ciała 100 ± 20 g. Dietę standardową (Labofeed H) (77 mg Zn/kg paszy) – podawano zwierzętom bez ograniczeń. Dodatkowo, wybranym grupom szczurów podawano cynk (jako $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ w wodnym roztworze) w dawce stanowiącej 231 mg Zn/kg paszy oraz cynk razem z resweratrolelem lub genisteiną (w dawkach po 0,2 mg poli-fenoli/kg mc.) w ilości 0,4 mL, za pomocą zgłębnika dożołądkowo, od 40. dnia do 20. tygodnia życia. 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. Po dekapitacji zwierząt, izolowano kości udowe oraz sierść. Próbki odpowiednio oczyszczono, suszono, ważono a następnie mineralizowano i oznaczano stężenie miedzi za pomocą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (PU-9100).

Wartość odzysku określono dla certyfikowanego materiału referencyjnego: NCS ZC 71001, Beef Liver i był on następujący: Cu – 94% oraz DC73347 (GSH-1) Hair: Cu – 91%.

Do oceny istotności statystycznej różnic między badanymi grupami zastosowano test t-Studenta, dla $p \leq 0,05$.

Przeprowadzone badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Etycznej ds. Badań nad zwierzętami WUM (numer 12 z dnia 18 marca 2008).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zastosowane diety oraz zaawansowany nowotwór gruczołu sutkowego w małym stopniu wpłynęły na poziom miedzi w sierści szczurów ale wystąpiło silnie oddziaływanie na zawartość tego pierwiastka w kości udowej (tab. I, II).

Miedź odgrywa istotną rolę w procesie angiogenezy nowotworowej. Jest niezbędnym czynnikiem do aktywacji komórek śródbłonka (9, 10). W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w poziomie miedzi w sierści szczurów badanych otrzymujących dietę standardową i dietę wzbogaconą cynkiem oraz cynkiem i resweratrolelem (tab. I), w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Dopiero, zastosowanie diety z cynkiem i genisteiną wywołało wzrost poziomu miedzi o 18% (tab. I). Istotny wzrost poziomu miedzi stwierdzili *Pasha* i współprac. (7) oceniając zawartość tego pierwiastka we włosach pacjentów cierpiących na różne typy nowotworów. Podobny kierunek zmian wykazali w swojej pracy *Guo* i współprac. (11) w badaniach nad nowotworem prostaty.

Tabela I. Porównanie stężenia miedzi w sierści szczurów z rakiem sutka w stosunku do grup kontrolnych na tej samej diecie.

Table I. A comparison of the copper level in the femur of the rats from the study groups and the control groups fed the same diet

| Dieta ↓ | Grupa badana (n=8) | | | | Grupa kontrolna (n=6) | | | | p |
|--------------------|--------------------|-------|-----------|------|-----------------------|-------|-----------|------|-----------|
| | min. | maks. | \bar{x} | SD | min. | maks. | \bar{x} | SD | |
| Standard | 11,96 | 14,38 | 12,67 | 0,74 | 10,12 | 14,34 | 12,27 | 1,56 | NS |
| Cynk | 11,06 | 13,70 | 12,10 | 0,96 | 10,62 | 12,66 | 11,89 | 0,76 | NS |
| Cynk + resweratrol | 6,98 | 16,74 | 12,71 | 3,75 | 8,17 | 14,12 | 11,70 | 2,69 | NS |
| Cynk + genisteina | 12,96 | 16,03 | 14,44 | 1,00 | 10,29 | 13,69 | 12,19 | 1,18 | p < 0,002 |

* – 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

Tabela II. Porównanie stężenia miedzi w kości udowej szczurów z rakiem sutka w stosunku do grup kontrolnych na tej samej diecie

Table II. A comparison of the differences between the copper level in the femur of the rats from the study groups and the control groups on the same diet

| Dieta ↓ | Grupa badana (n=8) | | | | Grupa kontrolna (n=5) | | | | p |
|--------------------|--------------------|-------|-----------|-------|-----------------------|-------|-----------|-------|-----------|
| | min. | maks. | \bar{x} | SD | min. | maks. | \bar{x} | SD | |
| Standard | 3,249 | 3,840 | 3,603 | 0,178 | 3,453 | 5,357 | 4,335 | 0,679 | p < 0,02 |
| Cynk | 3,272 | 3,817 | 3,512 | 0,168 | 3,199 | 3,602 | 3,328 | 0,162 | NS |
| Cynk + resweratrol | 4,628 | 4,971 | 4,753 | 0,125 | 4,286 | 4,541 | 4,365 | 0,107 | p < 0,001 |
| Cynk + genisteina | 3,508 | 3,952 | 3,758 | 0,169 | 3,177 | 3,721 | 3,515 | 0,220 | p < 0,05 |

* – 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

Przeprowadzone w ostatnich latach badania świadczą, że nie tylko wapń jest ważnym pierwiastkiem dla wzrostu i wytrzymałości szkieletu, ale również pierwiastki śladowe, w tym cynk i miedź, wywierają istotny wpływ na metabolizm tkanki kostnej (12). Rola cynku w tkance kostnej wynika po pierwsze z faktu, że będąc składnikiem macierzy kości pełni funkcję strukturalną. Hydroksyapatyt kości zawiera jony tego pierwiastka w postaci połączeń z fluorem i fosforanami. Po drugie, cynk bierze aktywny udział w procesie tworzenia się kości poprzez stymulację osteoblastów i inhibicję resorpcji kości przez osteoklasty. Oddziaływanie to jest możliwe przede wszystkim ze względu na to, że jony cynku wchodzą w skład enzymów: fosfatazy alkalicznej, anhydrazy węglanowej, polimerazy DNA i RNA oraz aktywują syntetazę aminoacetylo-tRNA w osteoblastach, stymulując syntezę białek i procesy kościotwórcze (13). Miedź z kolei, będąc kofaktorem oksydazy

lizyny jest niezbędna do syntezy kolagenu, co warunkuje prawidłową strukturę i wytrzymałość tkanki kostnej (14).

W prezentowanej pracy stwierdzono, że szczury z zaawansowaną chorobą nowotworową, otrzymujące jedynie paszę standardową, wykazywały obniżoną ilość miedzi w kości udowej, w stosunku do grupy kontrolnej na tej samej diecie. Zastosowana suplementacja diety szczurów cynkiem nie wywołała deficytu miedzi, objawiającego się jej ubytkiem z tkanki kostnej (tab. II), pomimo, że nadmierne spożycie cynku często wiąże się z wtórnie wywołanym niedoborem miedzi (15). Cynk działa bowiem antagonizycznie w stosunku do miedzi, gdyż w komórkach jelita stymuluje syntezę metalotioneiny – enzymu, który wiążąc miedź uniemożliwia jej wchłonięcie do układu krwionośnego.

Natomiast zastosowanie suplementacji cynku w połączeniu z resweratrolom lub z genisteiną w istotny sposób zwiększało poziom miedzi w kości udowej szczurów badanych (z wyindukowanym rakiem sutka), o odpowiednio 12% i 13% w stosunku do szczurów kontrolnych analogicznie suplementowanych (tab. II). W innych pracach potwierdzono, że efekt anaboliczny genisteiny na metabolizm kości zwiększa się w wyniku podawania jej łącznie z cynkiem (m.in. poprzez stymulowanie aktywności fosfatazy alkalicznej, wzrost zawartości wapnia, wzrost ekspresji genów w osteoblastach, indukcję apoptozy osteoklastów) (16, 17). Tym samym, wydaje się, że połączenie tych związków wspomaga hamujący wpływ na resorpcję kości. Mechanizm, dzięki któremu substancje te działają synergistycznie nie został w pełni wyjaśniony. Wykluczono jednak najprostszą możliwość, czyli zwiększenie absorpcji jelitowej cynku przez genisteinę (16).

WNIOSKI

Chemicznie indukowana kancerogeneza gruczołu sutkowego wpłynęła na zmniejszenie ilości miedzi w tkance kostnej szczurów. Zastosowana suplementacja diety cynkiem i związkami polifenolowymi wydaje się w pewnym stopniu niwelować te niekorzystne zmiany.

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

THE EFFECT OF APPLIED DIETS ON CHANGES IN COPPER LEVEL IN THE FEMUR AND HAIR OF RATS WITH BREAST CANCER

Summary

In this work we examined the effect of dietary supplementation with zinc or zinc in combination with resveratrol or genistein on the copper levels in the hair and femur of rats with the chemically induced mammary carcinogenesis compared to the control rats.

Female Sprague-Dawley rats were divided into groups which, apart from the standard diet, were treated by gavage with zinc ions ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) or zinc with resveratrol or genistein. The study was conducted for 14 weeks (from 40 days until 20 weeks of age). To induce mammary tumorigenesis, the rats from the study group were administered by gavage DMBA (7,12-dimethyl-1,2-benz[*a*]anthracene) in rapeseed oil at a dose of 80 mg/kg body weight at 50 and 80 days of age.

The copper content was determined after wet microwave mineralization of the samples with flame atomic absorption spectrometry (FAAS).

The applied supplementation with zinc ions and polyphenols (resveratrol, genistein) had a significant effect on the concentrations of copper in the femur of study rats.

PIŚMIENNICTWO

1. *Chen Y.C., Sosnoski D.M., Mastro A.M.*: Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. *Breast Cancer Res.*, 2010; 12(6): 215-226. – 2. *Rolski W., Kawecki A.*: Przerzuty do kości. Obraz kliniczny. Możliwości terapeutyczne w opiece paliatywnej. *Medycyna paliatywna*, 2010; 4: 190-197. – 3. *Memon A.U., Kazi T.G., Afridi H.I., Jamali M.K., Arain M.B., Jalbani N., Syed N.*: Evaluation of zinc status in whole blood and scalp hair of female cancer patients. *Clin. Chem. Acta.*, 2007; 379(1-2): 66-70. – 4. *Uchiyama S., Yamaguchi M.*: Genistein and zinc synergistically stimulate apoptotic cell death and suppress RANKL signaling-related gene expression in osteoclastic cells. *J. Cell. Biochem.*, 2007; 101(3): 529-542. – 5. *Sinha D., Sarkara N., Biswas J., Bishavee A.*: Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.*, 2016; 40-41: 209-232. – 6. *Park H.S., Shin K.O., Kim J.S.*: Assessment of reference values for hair minerals of Korean preschool children, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2007; 116(2): 119-130. – 7. *Pasha Q., Malik S.A., Iqbal J., Shah M.H.*: 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(3): 207-216. – 8. *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. Clin. Nutri.*, 2004; 58(10): 1359-1364. – 9. *Nasulewicz A., Opolski A.*: Rola miedzi w procesie angiogenezy nowotworowej – implikacje kliniczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2002; 56(6): 691-705. – 10. *Karimi G., Shahar S., Homayouni N., Rajikan R., Abu Bakar N.F., Othman M.S.*: Association between trace element and heavy metal levels in hair and nail with prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012; 3(9): 4249-4253.
11. *Guo J., Deng W., Zhang L., Li C., Wu P., Mao P.*: Prediction of prostate cancer using hair trace element concentration and support vector machine method. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2007; 116(3): 257-271. – 12. *Yamaguchi M.*: Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mole Cell Bioch.*, 2010; 338(1-2): 241-254. – 13. *Mazurek-Mochol M., Machoy-Mokrzyńska A.*: Zawartość cynku we krwi, moczu, kościach oraz w zębach szczurów po doustnym podaniu tego pierwiastka. *Czas. Stomat.*, 2005; 58(3): 194-200. – 14. *Mir E., Hossein-nezhad A., Bahrami A., Bekheirina M.R., Javadi E., Askar Naderi A., Larijani B.*: Adequate serum copper concentration could improve bone density, postpone bone loss and protect osteoporosis in women. A supplementary issue on osteoporosis. *Iranian J. Publ. Health*, 2007; 24-29. – 15. *Nielsen F.H., Milne D.B.*: A moderately high intake compared to a low intake of zinc depresses magnesium balance and alters indices of bone turnover in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Nutri.*, 2004; 58(5): 703-710. – 16. *Yamaguchi M., Gao Y.H., Ma Z.J.*: Synergetic effect of genistein and zinc on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of female rats. *J. Bone Miner. Metab.*, 2000; 18(2): 77-83. – 17. *Uchiyama S., Yamaguchi M.*: Anabolic effect of betacyanoxanthin in osteoblastic MC3T3-E1 cells is enhanced with 17beta-estradiol, genistein, or zinc sulfate in vitro: the unique effect with zinc on Runx2 and alpha1(I) collagen mRNA expressions. *Mol. Cell Biochem.* 2008; 307: 209-219.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1