غلظت مس, روی وسلنیوم در سرم وسیتوزول بافت تومور بیماران مبتلاء به سرطان پستان

نصرت اله ضرغامی*[۱]، جهانبخش اسدی[۲]، قربان محمد زاده [۳]، یعقوب اسدی[٤]

[۱]مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۲]مرکز تحقیقات بیوشیمی و اختلالات متابولیک دانشگاه علوم پزشکی گلستان، [۳]مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [٤]دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت تهران

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۱/۸ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۱۵

Levels of Copper, Zinc and Selenium in Serum and Tumor Cytosol Extracts in Breast Cancer Patient

Zarghami N.[1], Asadi J.[2], Mohammadzadeh G.[3], Asadi Y.[4]

[1,3] Drug Applied and nutritional Science Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, [3]Biochemistry and Metabolic Disorders Research Center, Gholestan University of Medical Sciences, [4]Faculty of chemistry Elm-O-Sanat University

Received: 2008/1/28, Accepted: 2008/5/4

Objectives: Breast cancer is the most common cancer in women. The aim of this study was to compare the concentration of Zinc, Selenium and Copper in serum and tumor cytosol extracts of breast cancer patients and controls. **Methods:** This cross sectional study was composed of 50 women diagnosed with breast cancer and 50 control individuals. Tissue samples were obtained from 32 women diagnosed with breast cancer and 24 normal individuals. Serum and cytosol extract levels of Zn, Cu and selenium were measured by using atomic absorption spectrophotometry with Graphite furnace. **Results:** The Mean serum levels of Zn, Cu and Se in breast cancer patients were 0.969±.19, 1.47±.48 mg/Land 60.04±23.38mg/L, respectively. The mean serum levels of Zn, Cu and Se in normal individual were 1.07±.35, 1.09±.20 mg/L and 92.42±18.70 µg/L, respectively. There was not significant difference in the mean of Zn between two groups but there was a significant difference in the mean of Cu between two groups. (P<0.002). The ratio of Cu/Zn in breast cancer patient and controls were 1.52 and 1.12, respectively. This difference was statistically significant (P<0.001). There was a significant difference in serum levels of Se between patients (92.42 ±18.7 µg/L) and controls (60.30 ± 23.38 µg/L) (P<0.001). The Mean cytosol levels of Zn in breast cancer patients and controls were 66.75±72.5 and 28.29±3.84µg/g, respectively and this difference was significant (P< 0.006). There was a significant difference in cytosol levels of Cu between patients (28.29 ± 3.8 µg/gr) and controls (21.02 ± 6.08) (P<0.002). The ratio of Cu/Zn in patients and controls were 0.42 and 0.79, respectively. This difference was statistically significant (P<0.000). In addition, there was a significant difference in cytosol levels of Se between patient (1.01±0.42 µg/gr) and control subjects (0.51±0.22 µg/gr) (P<0.01**). Conclusion:** Based on the obtained results, it is speculated that changes of serum and cytosolic levels of Se, Zn and Cu traces in breast cancer patients could have important and biological roles in breast cancer progression.

Key Words: *Breast Cancer, Zn, Cu selenium, and tumor cytosol*

زمینه و هدف: سرطان پستان شایعترین نوع سرطان در زنان است. هدف از این مطالعه مقایسه سطوح سرمی وسیتوزولی روی، مس و سلنیوم بیماران مبتلا به سرطان پستان با افراد کنترل می باشد. **روشها:** در این مطالعه مقطعی تعداد۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و۵۰ فردکنترل بررسی شدند. نمونه های بافتی از ۳۲ زن مبتلاء به سرطان پستان و۲٤ فرد کنترل تهیه گردید.سطوح سرمی وسیتوزولی مس و روی و سلنیوم به روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی با کوره گرافیتی اندازه گیری شدند. **نتایج** : میانگین سطوح سرمی روی، مس و سلنیوم بیماران مبتلا بـه سـرطان پـستان بـه ترتیـب۰/۱۹±۰/۹۷،۰/٤۷±۱/٤۷ لیتـر و۶۰/۰۳ ±۲۳/۳۸ mg/L بود. میانگین سطوح سرمی روی، مـس و سـلنیوم افـراد کنتـرل بـه ترتیـب ۰/۳۵± ۱/۰۷ و۰/۲±۱/۰۹ و۱۸/۷±۹۲/٤۲ mg/L بـود . اختلاف میانگین سطوح سرمی روی دوگروه ازنظر آماری معنی دار نبوداما اختلاف میانگین مس دوگروه از نظر آماری معنی داری بوده اسـت (p<۰.۰۰۲). نسبت مس به روی در گروه بیما ر۱/۵۲ ودر گروه کنتر ل ۱/۱۲ بود واختلاف این دو نسبت بین دو گـروه از نظـر آمـاری معنـی دار بـود (p<۰.۰۰۱). بـین سطوح سرمی سلنیوم بیماران مبتلا به سرطان پستان (۱۸/۷ µg/L ± ۹۲/٤۲) و افراد کنترل (۲۳/۳۸ µg/L ± ۶۰/۰۳) از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود داشت (P<۰.۰۰۱). میانگین سطوح سیتوزولی روی بیماران وافراد کنترل به ترتیب ٦٦/۷۵±۷۲/۵ و ۲٦/۷±۲۸/۵ میکروگرم درهر گرم از بافـت بـوده اسـت واین اختلاف از نظر آماری معنی داری بود (P<۰/۰۰٦). اختلاف بین میانگین سـطوح سـیتوزولی مـس بیمـاران (۲۸/۲۹±۳/۸٤µg/gr) و افـراد کنـــــترل (۲۱/۰۲±٦/ ۰۸ µg/gr) از نظر آماری معنی داری بود (P<۰/۰۰۰). همچنین, اخـتلاف میـانگین سـطوح سـیتوزولی سـلنیوم بیمـاران (۱/۰۱±۰/٤۲µg/gr) و افرادکنترل (۰/۵۱±۰/۲۲µg/gr) از نظر آماری معنی داری بود (P<۰/۰۱). **نتیجه‌گیری:** تغییرات سطوح سرمی وسیتوزولی مس ، روی وسلنیوم بیماران مبتلا به سرطان پستان احتمالا نشان دهنده نقش بیولوژیکی ومهم این عناصر در پیشرفت سرطان پستان است.

واژه های کلیدی: *سرطان پستان، روی، مس، سلنیوم, سیتوزول بافت تومور.*

*نـــــویسنده مسئول: دکتر نصرت اله ضرغامی، دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی و دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۳۳٦۳۲۳٤ – ۰٤۱۱، نمابر: ۳۳٦۳۲۳۱ – ۰٤۱۱

**Corresponding Author: Dr. Nosratollah Zarghami, Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411- 3363234; Fax: 0411-* 3363231
E-mail: Zarghami@tbzmed.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

سرطان پستان شایعترین نوع سرطان در زنان است (۱). برای شروع وپیشرفت تومورهای پستان ترکیبی از عوامل داخلی و خارجی نقش دارند که از جمله این عوامل می توان به عناصر کمیاب اشاره کرد (۱). با توجه به نقش تغذیه ای عناصر کمیاب به ویژه روی و مس و ارتباط مستقیم آن با ایجاد سرطان، مطالعات زیادی درباره نحوه ایجاد تومور و یا محدود کردن تومور توسط این عناصرانجام شده است (۲ و۱). روی یکی از مهمترین این عناصر است که در ۳۰۰ نوع متالوآنزیم نقش دارد (۱). روی نه تنها در عمل و ساختمان آنزیمها نقش دارد، بلکه به عنوان آنتی اکسیدان در پروتئین متالوتیونئین ها هم محسوب می شود (٤ و۳). هم چنین روی به عنوان قسمتی از قطعه انگشت روی[1] درگیرنده های هورمونی و در پروتئین APA1[2] و دیگر اشکال پروتئینی در تنظیم بیان ژنی نقش دارد(۵ و۳). قطعه انگشت روی با اتصال به قسمتی از DNA باعث کاهش بیان ژن تلومراز(آنزیمی که باعث نامیرایی سلول های سرطانی می شود) می گردد (٦ و ۵ ،۲). روی سبب آزاد شدن سیتوکروم C ازمیتوکندری سلول ها و به دنبال آن فعال شدن آنزیم هایی به نام کاسپاز می شود و در نهایت از این طریق سبب مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز) میشود (٦و ۵).برایند اعمال سلولی روی کاهش تعداد سلولهای تومور و کاهش حجم تومور است (۸). مس دیگر عنصرکمیاب است که یکی از اجزای حداقل ۹ فاکتور رشد به ویژه فاکتور رشد اندوتلیال رگی[3] است. این فاکتور رشد همراه با افزایش سطوح سرمی مس در شروع ، پیشرفت تومورو متاستاز ازطریق آنژیوژنز(ایجاد رگهای جدید) نقش دارد (۸ و۷). از طرفی به دلیل رقابت زیاد بین مس وروی برای ورود به درون سلول ها نسبت مس به روی سرم اهمیت زیادی دارد(۱۰ و ۹، ۸، ۷)

یافته های حاصل از پژوهش هایی که توسط Piccinini صورت گرفت نشان داد که غلظت روی در افراد مبتلا به سرطان پستان نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد. و برخلاف مطالعات دیگر نتیجه گرفت که نسبت Cu/Zn در افراد مبتلاء به سرطان پستان دچار تغییر می شود. همچنین در این مطالعه سطح سرمی مس نسبت به گروه کنترل افزایش داشت (۹). سلنیوم کوفاکتور مهم برای دو آنزیم تئوردوکسین ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است که به عنوان آنتی اکسیدان در بدن نقش مهمی درکاهش ابتلا به سرطان دارد (۱۱). همچنین مطالعات روی بافتهای سرطان پستان و کلورکتال نشان داد که کاهش سطح سلنیوم با افزایش میزان فعالیت آنزیم تلومراز همراه بوده است (۱۲و۱۰) و سبب افزایش فرآیند آپوپتوزدر بافت ها میشود. (۱۱). لذا با توجه به نتایج ضد و نقیض در مطالعات انجام یافته، هدف از مطالعه حاضرغلظت های روی ، مس و سلنیوم سرم و سیتوزول بافت تومور بیماران مبتلا به سرطان پستان و افرادکنترل می باشد.

۲- مواد و روش ها

در این مطالعه۵۰ زن مبتلا به سرطان پستان با تائید پاتولوژی و با میانگین سنی ۵۰-۳۰ و ۵۰ فرد (افرادی که برای جراحی پلاستیک مراجعه می کردند یا افرادی که فیبروآدنومای پستان داشتند) با میانگین سنی مشابه گروه بیماران به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پروتکل این مطالعه با تائید کمیته اخلاق پژوهش بیمارستان امام واخذ رضایت از تمام بیماران انجام گردید.برای مطالعه ۵ میلی لیتر خون از بیماران مذکور و افراد کنترل گرفته شد. خون گرفته شده، بلافاصله به آزمایشگاه آورده شد و به وسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سرم آن جدا شده و در ۸۰- درجه سانتی گراد فریز شد، تا بعد از جمع آوری همه نمونه ها، اندازه گیری انجام شود.جهت حذف عناصر فلزی مداخله گر عمل شستشو روی تمام نمونه ها انجام گرفت. بعد از جمع آوری نمونه ها، عمل آماده سازی نمونه ها برای اندازه گیری روی، مس وسلنیم سرم انجام شد (۱۲).

۲-۱: اندازه گیری روی ومس سرم

ابتدا تمام نمونه های سرم با آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۵ رقیق گردیدند. جهت هضم یون های فلزی موجود در نمونه ها، ۱۰۰ میکرولیتر اسید نیتریک (۱۰٪) به ۵۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده اضافه گردید. سپس برای اندازه گیری مقدار عنصر روی و مس موجود در سرم از دستگاه Atomic absorption spectrophotometry: AA 6300G, Shimadzu استفاده شده است. اساس این دستگاه، تحریک یون های فلزات مس و روی به وسیله جریان مصرفی ۱۰ mA است که باعث تحریک و ساطع شدن یکسری طیف هایی مرئی وUV می شود که طول موج نشر برای مس ۳۲٤/۷ nm و برای روی ۲۱۳/۹ nm است (۱۲).

[1] Motif Zinc Finger

[2] Another Partner ARF-1

[3] Vessels Endothelial Growth Factor

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۲: اندازه گیری سلنیوم سرم

۲-۲-۱: وسایل مورد نیاز

دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (AA 6300G, Shimadzu,Japan) با اتمایزر کوره گرافیتی (GFA-EX7i) و لامپ سلنیوم (Hamamatssu Photonics,K.K.,Japan) با طول موج نشر ۱۹٦ nm و جریان مصرفی ۲۳ mA و پهنای شکاف ۰/۷ nm همراه با کوره گرافیتی پیرولیتیک سکودار برای اندازه گیری مقدار سلنیم موجود در سرم خون استفاده شده است(۱۲).

جهت حذف کاتیونها ، تمام وسایل و ظروف پلاستیکی و شیشه ای در اسید نیتریک ۱۰ درصد قرار داده و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند.

۲-۳: روش اندازه گیری سلنیوم

ابتدا۵۰ میکرولیتر نمونه را با احتیاط و بدون تماس سر سمپلر با جداره ها در ته لوله های پیچ دار می ریزیم. برای هضم یون های فلزی مداخله گر موجود در نمونه های فوق، ۱۰۰ میکرولیتر اسید نیتریک (٦۵٪) و ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 اضافه گردید. جهت مقایسه مقدار سلنیوم موجود در هر نمونه، به نمونه مشابه دیگر مقدار ۱۰ میکرولیتر از استاندارد سلنیوم ۵۰۰ میکروگرم در لیتر اضافه گردید که به این ترتیب غلظت استاندارد اضافه شده برابر با ۱۰۰ میکروگرم در لیترخواهد بود.

جهت تکمیل عملیات هضم یون های مداخله گر، لوله های آزمایش حدود ۲ ساعت داخل آب مقطر با دمای جوش قرار داده شدند. پس از این عمل، نمونه های به دمای محیط رسیده و سپس ٤/۵ میلی لیتر آب دیونیزه به نمونه های فوق اضافه گردید.

جهت جدا سازی سلنیوم موجود در نمونه های هضم ورقیق شده به روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی، مخلوط استخراج کننده- پخش کننده به شرح زیر آماده گردید:

ابتدا ۲۵ میلی لیتر اتانول به عنوان فاز پخش کننده درون بالن ژوژه ریخته وسپس ۰/۰۰۵g آمونیوم پیرولیدین دی تیوکاربامات (APDC) به عنوان عامل کمپلکس کننده به آن اضافه گردید. سپس ۱/۷۵ میلی لیتر تترا کلرید کربن به عنوان استخراج کننده اضافه شده و با اتانول به حجم رسانده شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از مخلوط تهیه شده توسط سرنگ شیشه ای با سرعت درون نمونه های هضم و رقیق شده، تزریق گردید. محلول هضم و رقیق شده به علت ایجاد قطرات ریز تترا کلرید کربن در سراسر مخلوط پخش و به حالت کدر درمی آید. سلنیوم موجود در محیط به سبب ایجاد کمپلکس آب گریز با APDC به درون قطرات ریز تترا کلرید کربن نفوذ و استخراج گردید.

پس از این مرحله برای ته نشین شدن فاز استخراجی تترا کلرید کربن، لوله های آزمایش به مدت دو دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. حجم تقریبی فاز استخراجی ته نشین شده تترا کلرید کربن حدود ۲۵ میکرولیتر است که در انتهای لوله مخروطی جمع می گردد.

۲-٤: اندازه گیری غلظت سلنیوم استخراجی با GF-AAS

برای اندازه گیری غلظت سلنیوم استخراجی از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب اتمی با کوره گرافیتی سکودار با اصلاحگر جذب زمینه ای لامپ دوتریوم استفاده گردیده است که لامپ دوتریوم سبب حذف جذب زمینه ناشی از نمکهای مختلف موجود در سرم از جمله فسفات می شود. در این روش, ۲۰ میکرو لیتر از فاز استخراجی ته نشین شده تترا کلرید کربن بوسیله سمپلر به داخل کوره سکو دار تزریق گردید. غلظت سلنیوم موجود در نمونه ها با مقایسه سیگنال های حاصل از جذب اتم های سلنیوم موجود در نمونه هایی که استاندارد اضافه نشده واضافه شده محاسبه گردید. از آنجایی که ترکیبات سلنیوم به شدت در داخل کوره گرافیتی در مراحل مختلف خشک کردن و خاکستر سازی تبخیر می شود، برای اجتناب از این موضوع از اصلاح گر استفاده شد. جهت اصلاح از محلول ppm ۱۰۰۰ ایریدیوم (Ir) و برنامه دمایی مناسب که در جدول زیر آمده، استفاده گردید (۱۳).

۲-۵: اندازه گیری روی ،مس و سلنیوم بافت

نمونه ها در دو گروه بیمار وکنترل دسته بندی شدند. نمونه های بیمار شامل ۵۰ بیمار مبتلاء به سرطان پستان (آدنوکارسینوم, لوبولار کارسینوم, داکتال کارسینومای با درجات مختلف) و نمونه های کنترل۵۰ فرد با (فیبرو آدنوما, فیبروکیستیک, آبسه) بودند.

۲-٦: خرد کردن بافت

وسایل ومواد مورد نیاز جهت خرد کردن بافت عبارتند بودند از یخ خشک، متال، ازت مایع، تیغ بیستوری، پنس وغیره. برای انجام آزمایش ابتدا متال را در داخل ظرف حاوی یخ خشک قرار می دهیم سپس مقداری از بافت را برش داده در داخل متال قرار می دهیم و مقداری ازت مایع روی بافت می ریزیم و با استفاده از دستگاه Tissue hammering خرد می کنیم و پودر حاصله را در داخل اپندروف می ریزیم ودر ۸۰- قرار می دهیم تا بعدا تومور سیتوزول آن را استخراج کنیم. برای کلیه نمونه های بافتی این عمل را انجام می دهیم (۱٤).

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۷: استخراج سیتوزول جهت اندازه گیری روی، مس و سلنیوم

۱-۷-۲: مواد لازم

جهت استخراج سیتوزول برای اندازه گیری روی، مس و سلنیوم موادی نظیر سدیم آزاید (Sodium Azaide)، تریس(Tris)، سدیم کلراید (Na Cl)، ای دی تی ای (EDTA)، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و تریتون ایکس۱۰۰ (Triton – X100) نیاز است.

روش کار: ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر بافر لیز کننده با pH = ۷/۵ شامل سدیم آزاید (۱۰ میلی مولار)، تریس (۵۰ میلی مولار)، سدیم کلراید (۱۰۰میلی مولار)، ای دی تی ا (۱۰ میلی مولار)، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (۱۰۰میلی مولار)، تریتون ایکس۱۰۰ (۱٪) را تهیه و با آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم. سپس یک میلی لیتر بافر به ۲۰۰ میلی گرم از بافت پودر شده اضافه و روی روتاتور به مدت ۳ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. بعد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و فاز رویی را که همان سیتوزول است به میکروتیوب استریل انتقال می دهیم. سپس با روش فوق هر سه عنصر مذکور اندازه گیری شدند (۱۵).

۲-۸:آنالیز آماری

تمام مقادیر کمی در این مطالعه به صورت mean ± SD گزارش گردیدند. جهت مقایسه معنی دار بودن اختلاف میانگین عناصر اندازه گیری شده در گروه بیمار وگروه کنترل آزمون t مستقل استفاده گردید. بررسی آماری داده های حاصل با استفاده از نسخه شماره ١٤ نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.در این مطالعه P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

۳- نتایج

همانطورکه در جدول شماره۱ مشاهده می شود ، میانگین سطوح سرمی روی و مس بیماران مبتلا به سرطان پستان به ترتیب ۰/۱۹±۰/۹۷، ۰/٤۸ ±۱/٤۷میلی گرم در لیتر و مقدار سلنیوم ۲۳/۳۸ ±۶۰/۰۳میکروگرم در لیتر بود. از طرفی میانگین سطوح سرمی روی، مس و سلنیوم افراد سالم به ترتیب ۰/۳۵ ± ۱/۰۷ ،۰/۲۰±۱/۰۹ میلی گرم در لیتر و۱۸/۷۰±٤۲/ ۹۲ میکروگرم در لیتر بود . اختلاف میانگین سطوح سرمی روی بیماران وافراد کنترل از نظر آماری معنی داری نبود، اما اختلاف میانگین سطوح سرمی مس بیماران وافراد کنترل از نظر آماری معنی داری بود (P<۰/۰۰۲).

همچنین با مشاهده جدول شماره۱ نسبت مس به روی در گروه بیمار ۱/۵۲ و در گروه کنترل ۱/۱۲ بود و اختلاف فوق بین دو گروه از نظر آماری معنی داری بود (P<۰/۰۰۱). هم چنین اختلاف معنی داری از نظر آماری بین سطوح سرمی سلنیوم بیماران مبتلا به سرطان پستان وافراد کنترل وجود داشت (P<۰/۰۰۱). از طرفی با مشاهده جدول شماره۲، مقدارسطوح سیتوزولی روی گروه بیمار وگروه کنترل به ترتیب ۷۲/۵±٦٦/۷۵ و ۲۸/۵±۲٦/۷ میکروگرم درهر گرم از بافت بوده است و اختلاف فوق از نظر آماری معنی داری بود(P<۰/۰۰٦). سطوح سیتوزولی مس در بیماران وافراد کنترل بترتیب ۳/۸٤±۲۸/۲۹ و ٦/۰۸±۲۱/۰۲ میکروگرم در هر گرم از بافت بوده است که از نظر آماری این اختلاف معنی داری بود (P<۰/۰۰۰۱). نسبت مس سیتوزولی به روی سیتوزولی در گروه بیمار ۰/٤۲ و در گروه کنترل ۰/۷۹ بود واختلاف فوق بین دو گروه از نظر آماری معنی داری بوده است (P<۰/۰۰۱). همچنین، سطوح سیتوزولی سلنیوم در بیماران وافراد کنترل به ترتیب۰/٤۲±۱/۰۱ و ۰/۲۲±۰/۵۱ میکروگرم در گرم از بافت بوده است که از نظر آماری اختلاف فوق معنی دار بود (P<۰/۰۱).

جدول شماره ۱ – برنامه دمایی کوره گرافیتی جهت اصلاح سطح کوره با ایریدیوم

Step	Temperature (°C)	Ramp Time (s)	Hold Time (s)	Argon Flow Rate (ml/min^{-1})
1	110	1	40	250
2	130	20	50	250
3	1200	20	30	250
4	2000	1	5	250

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۲ – برنامه کاری کوره برای اندازه گیری سلنیوم پس از بهینه سازی

Step	Temperature (°C)	Ramp Time (s)	Hold Time (s)	Argon Flow Rate (ml/min^{-1})
1	80	5	10	250
2	1000	5	4	250
3	2050	º	4	4
4	2250	º	2	1000

جدول شماره ۳- سطح سرمی روی، مس و سلنیوم و نسبت سطح سرمی مس به روی بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل

متغیرها	کنترل (n =۵۰)	انحراف معیار±میانگین بیمار (n =۵۰)	P value
روی(میلی گرم در لیتر)	۱/۰۷±۰/۳۵	۰/۹۷±۰/۱۹	NS
مس(میلی گرم در لیتر)	۱/۰۹±۰/۲۰	۱/٤۷±۰/٤۷	۰/۰۰۲
نسبت سطح سرمی مس به روی	۱/۱۲	۱/۵۲	۰/۰۰۰
سلنیوم (میکروگرم درلیتر)	۹۲/٤۲±۱۸/۷	٦۰/۰۳±۲۳/۳۸	۰/۰۱

NS: Not Significant

جدول شماره ٤- مقایسه سطح سیتوزولی روی، مس و سلنیوم و نسبت سطح سیتوزولی مس به روی در بافت تومور بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل

متغیرها	کنترل (n =۲٤)	انحراف معیار±میانگین بیمار (n =۳۲)	P value
روی(میکرو گرم در گرم)	۲٦/۷±۲۸/۵	٦٦/۷۵±۷۲/۵	۰/۰۰٦
مس(میکرو گرم در گرم)	۲۱/۰۲±٦/۰۸	۲۸/۲۹±۳/۸	۰/۰۰۲
نسبت سطح سیتوزولی مس به روی	۰/۷۹	۰/٤۲	۰/۰۰۰
سلنیوم(میکروگرم در گرم)	۰/۵۱	۱/۰۵	۰./۰۱

٤- بحث

مطالعات متعدد نشان داده اندکه سطوح سرمی روی و مس بیماران مبتلا به سرطان پستان دچارتغییر می شود (۱۷). در مطالعه حاضر، مشاهده گردید که اختلاف میانگین سطوح سرمی روی افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل از نظر آماری معنی داری نبوده است (P =۰/۱۱۹)، این نتیجه هماهنگ با یافته های Yeou-Lih Huang در کشور تایوان و Piccnini در مودنای ایتالیا است (۱۷و۹). بر خلاف نتایج فوق Kuo HW وهمکاران در مطالعه ای نشان داد که سطوح سرمی روی در افراد مبتلاء به سرطان پستان بطور معنی داری کاهش می یابد (۱۸). درمطالعه ما مشاهده گردید که سطوح سرمی مس افراد مبتلا به سرطان پستان نسبت به افرادکنترل بطور معنی داری افزایش می یابد (P<۰/۰۰۱). این یافته هماهنگ با یافته هایی است که توسط Nelson RL و همکاران در شهر مکزیک و هم چنین Psathakis D و همکاران در شانگهای چین بدست آمده است (۲۰ و۱۹). مس کوفاکتورمعمول حداقل ۳۰ آنزیم می باشد و ممکن است به عنوان کاتالیست در تشکیل گونه های واکنشگر

Archive of SID

www.SID.ir

اکسیژن (ROS[1]) و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای نقش داشته باشد (۲۱ و۱۷ ،۸). سوپراکسید دیسموتازموجود در سیتوپلاسم سلول های یوکاریوت، آنزیم آنتی اکسیدانی است که در جایگاه فعال آن روی و مس وجود دارد (۸). هم چنین مس در ساختار شیمیایی آنزیم های تولیدکننده کاتیکول آمین ها وATP نقش دارد (۲۱). در موردنقش فلزاتی مانند مس و روی و نسبت این دو عنصر در ارتباط با شروع و پیشرفت تومور بررسی های زیادی شده است. از طرفی تحقیقات مختلف نشان داده اند که نسبت مس به روی نیزدارای اهمیت است. در مطالعه ما مشاهده گردید که افزایش نسبت مس به روی سرم ازنظرآماری معنی داری بوده است (P<۰/۰۰۱). این نتایج تایید کننده یافته های پژوهش هایی است که توسط Nelson RL و همکاران در شهر مکزیکو وهم چنین Psathakis D همکاران در شانگهای چین انجام شده است (۲۰ و۱۹). این پدیده نشان می دهد که افزایش مس و یا افزایش نسبت مس به روی همراه با افزایش مالون دی آلدئید سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب سیستم آنتی اکسیدانی و تولید رادیکال های هیدروکسیل می شود. که این به نوبه خود با حمله به DNA سبب ایجاد موتاسیون و در نهایت منجر به سرطان می شود (۲۵ و۲٤ ،۲۳ ،۲۲ ،۸). از طرفی کاهش روی مانع از رقابت مناسب با ورود مس به درون بافت ها می شود، این شرایط زمینه را برای ورود هرچه بیشتر مس به درون بافت ها مساعدتر می کند(۲٦و۷). مس یکی از عوامل مهم رشد بافت ها خصوصا زمانی که رشد بافت حدود۲ میلی متر باشد، در نظر گرفته می شود (۲٦و۷) چرا که دراین زمان تغذیه و خون رسانی دچار اختلال می شود. بنابراین جهت رفع نیازمندی های سلول به غذا و اکسیژن ، باید رگ های جدید به وجود آید، برای این فرایند فاکتورهای رشد به ویژه فاکتور رشد اندوتلیالی رگی (VEGF , TNF-α و bFGF و اینترلوکین -۱مورد نیاز است. افزایش یون مس از طریق افزایش تشکیل رگ های جدید درآغازو متاستاز تومور نقش دارد. مس به عنوان یکی از اجزاء حداقل ۹ فاکتور رشد ، سهم عمده ای در تولید رگهای جدید دارد (۲٦ و۷،۲۵). بررسی های مختلف نشان دادند که با افزایش نسبت مس به روی ممکن است فرایند تولید رگ های جدید افزایش یابد (۲٦و۷). در مطالعه ما مشاهده گردید که اختلاف سطوح سرمی سلنیوم بین بیماران وافراد کنترل از نظر آماری معنی دار بوده است (p<۰/۰۰۰۱). این نتیجه نیز هم سو با مطالعه Ebert R. و همکاران و دیگر بررسی ها بوده است (۷ و ۵، ٤ ،۳ ،۱). سلنیوم جزء مهمی از دو آنزیم تئوردوکسین ردوکتاز و گلوتاتیون پروکسیداز است. گلوتاتیون پراکسیداز جزوگروهی از سلنوپروتئین ها است که در تنظیم غلظت داخل سلولی هیدروپروکسیدها نقش دارد. هم چنین گلوتاتیون به عنوان آنتی اکسیدان نقش مهمی دارد. تئوردوکسین ردوکتاز دیگر آنزیم گروه سلنوپروتئین ها است که همراه با تئوردوکسین سیستم اکسیداسیون و احیاء را تشکیل می دهندکه نقش های متعدد، از جمله اکسیداسیون و احیاء فاکتورهای نسخه برداری و تامین اکسی والان های احیاء کننده برای سنتز دی اکسی ریبونوکلوئیدهای DNA دارد. هماهنگ با کاهش سلنیوم سرم، کاهش تئوردوکسین ردوکتاز و خطر ایجاد سرطان مشاهده می شود (۲۷و۱۱). هم چنین .Chen WX و همکاران درمطالعه ای روی رده سلولی سرطان ریه مشاهده کردند که تیمار سلول ها با دوز زیاد سلنیوم ومدت زمان طولانی ازطریق کاهش فعالیت آنزیم تلومراز و کاهش رشد رده سلولی سرطان ریه، منجر به افزایش روند آپوپتوز قبل از پیک دیپلوئید سلول خواهد شد (۲۸). برخلاف یافته های بالا Sanz Alaejos و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه ای آینده نگر بیان کردند که اختلاف سطح سرمی سلنیوم افراد سرطانی نسبت به افراد کنترل از نظر آماری معنی دار نیست (۲۹). در مطالعه ما مشاهده گردید که افزایش سطوح سیتوزولی روی در افراد مبتلاء به سرطان پستان نسبت به افراد گروه کنترل ازنظر آماری معنی داری بوده است (P<۰/۰۰٦). این نتیجه هم سو با یافته های Inescoو همکاران در سال ۲۰۰٦ و هم چنین دیگر محققان می باشد که نشان دادند، سطوح روی در بافت افراد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با گروه سالم افزایش معنی داری داشته است (۳٤-۳۰ ،۱۸). دلیل افزایش سطوح سیتوزولی روی موجود دربافت پستان افراد مبتلاء به سرطان پستان می تواند مکانیسم دفاعی بدن جهت تامین روی لازم برای رشد و تکثیر سلولی باشد (۳۰). تاکنون مدرکی مبنی بر کاهش سطوح سیتوزولی روی موجود در بافت سرطان پستان وجود ندارد. ولی در بررسی که درسال ۲۰۰۵ توسط Gupta ودیگر محققین صورت گرفت، مشاهده گردید که میزان روی در سرطان کیسه صفرا کاهش معنی دار داشته است (۳٦ و ۳۵).

1- Reactive oxygenic species

Archive of SID

www.SID.ir

هم چنین در مطالعه ما مشاهده گردید که میزان سطوح سیتوزولی مس درافراد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با افراد کنترل از نظر آماری افزایش معنی داری داشته است (P<۰/۰۰۰۱).این یافته نیز در راستای نتایج Geraki k. در سال های ۲۰۰٤و ۲۰۰۲ و دیگر محققین بوده است (۳٦-۳۰). همان طور که در این فصل اشاره گردید سلولهای تومور برای رشد و تولید رگ های جدید نیاز بیشتری به مس دارند. برخلاف یافته های حاضر، Inesco وهمکاران در مطالعه ای روی بافت سرطانی افراد مبتلاء به سرطان پستان، اختلاف معنی داری بین سطوح سیتوزولی مس بافت سرطانی و بافت غیر سرطانیمشاهده نکردند (۳۰). از طرف دیگر، در مطالعه ما مشاهده گردید که کاهش نسبت مس به روی سیتوزولی در افراد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با افراد گروه کنترل از نظر اماری معنی داری بوده است (P<۰/۰۰۰۱). این نتیجه مشابه نتایج Inesco و دیگر محققین می باشد (۳۷ و ۳۰). اما دربسیاری از بررسی ها مشاهده شده است که نسبت مس به روی افزایش معنی داری دارد (۳٦-۳۱). همچنین، در این مطالعه مشاهده گردید که سطوح سیتوزولی سلنیوم در افراد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با افراد گروه کنترل از نظرآماری افزایش معنی داری داشته است (P<۰/۰۰۰۱). مشابه چنین یافته های توسط Kuo HW. و Borella P. و دیگر محققین در بررسی های جداگانه ای بدست آمدند(۳۵ ،۳٤ ،۳۲ ،۱۸). اما بر خلاف یافته حاضر، Sharma K. در مطالعه ای نشان داد که میزان سطوح سیتوزولی سلنیوم در ۵۰ فرد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با بافت گروه کنترل کاهش معنی داری داشته است (۳۸).

۵- نتیجه گیری

فقط میزان سطوح سیتوزولی روی بیماران مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با افراد گروه کنترل افزایش معنی داری داشته است. سطح سرمی و سیتوزولی مس بیماران در مقایسه با افراد گروه کنترل افزایش معنی داری داشته است. کاهش سلنیوم در سرم و افزایش سیتوزولی آن در افراد مبتلاء به سرطان پستان در مقایسه با افراد گروه کنترل معنی دار بوده است. بر اساس نتایج حاصل، می توان گفت که تغییرات غلظت های روی ، مس و سلنیوم در سرم وسیتوزول بافت تومور بیماران مبتلا به سرطان پستان احتمالا می تواند نشان دهنده نقش مهم وبیولوژیک این عناصر در روند این نوع از سرطان باشد.

٦- تشکر و قدردانی

هزینه این طرح تحقیقاتی با شماره (۱۵۵/ک/ت) از طرف مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین گردیده است. نویسندگان مراتب تشکر را از همکاران محترم مرکز تحقیقات علوم تغذیه و آزمایشگاه رادیوفارماسی، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در زمان اجرای طرح ابراز می دارند.

7- Reference

1. Holcatova B. Environmental epidemiology of malignancies: The natural European perspective. Cent.eur.J.publ.Hlt, 1998, 6(1): 13-17.
2. Prasad SA, Beck JW, Doerr DT, Shamsa FH, Penny HS, Marks SC,et al. Nutritional and zinc status of head and neck cancer patients: An interpretive Review. J American Collage Nutr, 1998, 17(5): 409-418.
3. Nemoto K, Kondo Y, Himeno S, Suzuki Y, Hara S, Akimoto M,et al. Modulation of Telomerase activity by zinc in human prostatic and renal cancer cells. Biochem Pharma, 2000, 59(4): 401-405.
4. Powell RS. The antioxidant properties of Zinc. J Nutr, 2000, 130:1447-54.
5. Benanti JA, Williams DK, Robinson KL, Ozer HL, Galloway DA. Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1. Mol Cell Biol, 2002, 22(21):7385-97.
6. Qiang Liu. Zinc Finger Proteins To Study Breast Cancer Angiogenesis: Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(11):5525-30.
7. Brewer JG. Copper Control as an Antiangiogenic Anticancer Therapy: Lessons from Treating Wilson S Disease. Exp Biol Med Maywood, 2001, 226(7):665-73.
8. Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. Nutr Cancer, 2003, 47(2):126-30
9. Piccinini L, Borella P, Bargellini A, Medici CI, Zoboli A.. A Case -control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer: Biol Trace Element Res, 1996, 51(1):23-30.
10. Cavallo F, Gerber M, Marubini E, Richardson S, Barbieri A, Costa A,et al. Zinc and copper in breast cancer. A joint study in northern Italy and southern France. Cancer, 1991, 67(3):738-45.
11. Karunasinghe N, Ferguson LR, Tuckey J, Masters J. Hemolysate thioredoxin reductase and glutathione peroxidase activities correlate with serum selenium in a group of New Zealand men at high prostate cancer risk. J Nutr, 2006, 136(8): 2232-5.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałazyn-Sidorczuk M. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status of rats continuously exposed to cadmium and ethanol: Alcohol Alcohol, 2002, 37(3):213-21
13. Wang HC, Peng HW, Kuo MS. Determination of beryllium and selenium in human urine and of selenium in human serum by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry: Anal Sci, 2001, 17(4):527-32
14. Zarghami N, Grass L, Diamandis EP: Steroid hormone regulation of prostate specific antigen expression in breast cancer.Br J Cancer, 1997,75:579-588.
15. Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay WJ. Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAP-eze telomerase detection kit. Methods in Cell Science, 1996, 18: 237-248.
16. Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults: Ann Epidemiol, 2004, 14(3):195-201.
17. Yeou-Lih Huang Jenn-Yuan Snea Te-Hsien Lin. Association between Oxidative Stresses and Changes of Trace Elements in Patients with Breast. Clinical Biochemistry, 1999, 32 (issue 2):131-136
18. Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan: Biol Trace Elem Res, 2002, 89(1), 1-11.
19. Nelson RL, Davis FG, Sutter E, Kikendall JW, Sobin LH, Milner JA, et al. (). Serum selenium and colonic neoplastic risk, Dis. Colon Rectum, 1995, 38: 1306-1310.
20. Psathakis D, Wedemeyer N, Oevermann E, Mitsudomi T, Shirakusa T, Kodama Y. Blood selenium and glutathione peroxidase status in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectma, 1998,41: 328-335.
21. Silvia L, Anna M, Alessandra M, Medda¸et al.Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases. Phytochemistry, 2005, 1751-1758.
22. Haiying Wu and Luyi Yu .Clinical study on serum copper and zinc levels and copper/zinc ratio in malignant lymphoma. Chinese J Cancer research, 1989, 1: 50-53.
23. Celik HA, Aydin HH, Ozsaran A, Kilincsoy N, Batur Y, Ersoz B. Trace elements analysis of ascitic fluid in benign and malignant diseases: Clin Biochem, 2002, 35(6):477-81.
24. Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults: Ann Epidemiol, 2004, 14(3):195-201.
25. Nakayama A, Fukuda H, Ebara M, Hamasaki H, Nakajima K, Sakurai H. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels.Biol Pharm Bull, 2002, 25(4):426-31.
26. Rosas R, Poo JL, Montemayor A, Isoard F, Majluf A, Labardini J. Utility of the copper/zinc ratio in patients with lymphoma or acute or chronic leukemia. Rev Invest Clin, 1995,47(6):447-52.
27. Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, et al. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. Stem Cells, 2006, 24(5):1226-35. Epub 2006 Jan 19.
28. Chen HJ, Yu RA, Wu ZG, Xia T, Yang CF, Yang KD, et al. Effects of selenium on expression of TERT, c-Myc and p53 induced by cadmium in rat liver. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2006,Jan;24(1):35-8.
29. M. Sanz Alaejos, F. J. D´az Romero, and C. D´az Romero. Selenium and Cancert, Some Nutritional Aspects. Nutrition, 2000, 16: 376 –383.
30. Ionescu JG, Novotny J, Stejskal V, Latsch A, Blaurock-Busch E, et al. Increased levels of transition metals in breast cancer tissue. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27 Suppl 1: 36-9.
31. Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DAConcentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. Phys Med Biol, 2002, 47(13):2327-39.
32. Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. Phys Med Biol, 2004, 49(1): 99-110.
33. Borella P, Bargellini A, Caselgrandi E, Piccinini L. Observations on the use of plasma, hair and tissue to evaluate trace element status in cancer. J Trace Elem Med Biol, 1997, 11(3): 162-5.
34. Garg AN, Singh V, Weginwar RG, Sagdeo VNAn elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis. Biol Trace Elem Res, 1994, 46(3): 185-202.
35. Gupta S.K., Singh S.P, Shukla V.K. Copper, Zinc, and Cu/Zn Ratio in Carcinoma of the Gallbladder. Journal of Surgical Oncology, 2005, 91: 204–208.
36. Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. Cancer.1983, 52(5): 868-72.
37. Sherif L. Rizk and Howard H. Sky-Peck. Comparison between Concentrations of Trace Elements in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue1.Cancer research, 1984, 44: 5390-5394.
38. Sharma K, Mittal DK, Kesarwani RC, Kamboj VP, Chowdhery. Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue trace elements in breast malignancy. Indian J Med Sci, 1994, 48(10): 227-32.

Archive of SID

www.SID.ir