ارتباط سطح سرمی روی و مس با بیان ژن آنزیم تلومراز در افراد مبتلا به سرطان ریه

نصرت اله ضرغامی*،[۱و۲] هاله میکائیلی، [۱] خلیل انصارین، [۱] عباس مهاجری، [۳] رضا حاج حسینی
[۱]مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، [۲]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، [۳]دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۱/۲۸ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۳/۱۳

Correlation between Serum Levels of Zinc and Copper and Telomerase Gene Expression in Lung Cancer Patients

Zarghami N.[*1,2], Mikaeili H.[1], Ansarin K.H.[1], Mohajeri A[1], Hajhosseini R.[3]
[1]Lung and tuberculosis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, [2] Drug applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, [3]Department of Biology, Tehran Payam Noor University, Tehran, Iran

Received: 9 Feb. 2008, Accepted: 2 Jun. 2008

Objectives: Lung cancer is the leading cause of cancer related death in men and women in world wide. In molecular biology of lung cancer, different genes particularly telomerase gene expression seems to be under regulation of variety of factors. The aim of this study was to evaluate the correlation between serum levels of Zn, Cu, and their ratio and telomerase gene expression in lung cancer patients. **Methods:** In this cross sectional study, 50 subjects with lung cancer and 20 patients with lung disease were recruited. The concentration of Zn and Cu were measured by atomic Absorption Spectrophotometry (AAS). Telomerase gene expression was carried out using TRAP Assay. **Results:** The mean serum levels of Cu and the ration of Cu/Zn were significantly higher in lung cancer patients than non tumor lung disease (120.8 ± 5.70 vs. 107.20± 6.50 ug/dl) and (1.6 ±0.4 vs. 1.1 ±0.2) respectively ($p<0.05$). The mean serum levels of Zn were not significant between two groups. The Mean relative activity of telomerase as indirect telomerase gene expression, was significantly higher in lung cancer subjects than controls (32.80 ±16.10 vs. 0.00 percent) ($p<0.01$). There was a relatively positive correlation between telomerase activity and Cu concentration in lung cancer patients($r = 0.36$, $p<0.05$). There was a positive and significant correlation between Cu levels and age ($r = 0.39$, $p<0.01$) and the Cu/Zn ratio and Cu concentration ($r = 0.36$, $p<0.05$). However, there was a reverse and highly significant correlation between Cu/Zn ration and Zn concentration ($r = -0.72$, $p<0.01$). In categorized lung carcinomas, the mean concentration of Cu was higher in small cell lung carcinoma (123.70 ±2.8 ug/dl) than in non-small cell lung carcinoma (117.60 ±4.8 ug /dl) and this difference was significant ($p<0.05$). Telomerase activity was significantly higher in small cell lung carcinoma (112 ±0.57 percent) than non-small cell lung carcinoma (6.4 ±2.5 percent) ($p<0.05$). There was no difference in Zn and Cu/Zn ration in categorized lung cancer patients. **Conclusion:** It is speculated that evaluation of Zn, Cu in lung tumors could have some biological function in telomerase gene expression which indicate initiation and progression of tumor tissues.

Key Words: *Zn, Cu, Telomerase, Lung Cancer.*

زمینه و هدف: سرطان ریه مهمترین و شایعترین علت مرگ و میرناشی از سرطان در سراسر جهان است. در بیولوژی مولکولی سرطان ریه بیان ژن های مختلف بویژه ژن تلومراز تحت تاثیر فاکتور های مختلف قرار می گیرد. در این پژوهش ارتباط مقادیر عناصر کمیاب روی ، مس و نسبت این دودرسرم با بیان ژن آنزیم تلومراز ، در سرطان ریه مورد بررسی قرار گرفت. **روشها:** این مطالعه از نوع مقطعی – توصیفی تعداد ۵۰ فرد مبتلا به سرطان ریه بعنوان گروه مورد و۲۰ بیمار مبتلا به بیماریهای غیر تومورال ریوی بعنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند .میزان فعالیت تلومراز با روش TRAP Assay در نمونه های بیوپسی بافت تومورال ریه اندازه گیری شد .همچنین مس و روی سرمی به اسپکترومتری جذب اتمی اندازه گیری شدند. **یافته ها:** میانگین غلظت سرمی مس و نسبت مس به روی در بیماران به طور معنی داری بـــــــــــالاتر از گـــروه کنترل (۵/۷ ± ۱۲۰/۸ در مقابل ٦/۵ ± ۱۰۷/۲ میکروگرم در دسی لیتر) میباشد (۰/۰۵ >p). اما میانگین غلظت سرمی روی بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود ندارد (۰/۰۵ < p). میانگین نسبت مس به روی در بیماران به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل (۰/٤ ± ۱/٦ در مقابل۰/۲ ± ۱/۱) می باشد (۰/۰۵ >p). میانگین میزان فعالیت آنزیم تلومراز بیماران تفاوت کاملا معنی داری را با گروه کنترل (۱٦/۱ ± ۳۲/۸ در مقابل صفر درصد) نشان داد (۰/۰۱ > p). همبستگی مستقیم و معنی داری بین میزان سرمی مس با میزان فعالیت آنزیم تلومراز بیماران وجود دارد (۰/۳٦ = r و ۰/۰۵ >p). بین غلظت تام مس سرمی و افزایش سن بیماران همبستگی مثبت مشاهده شد (۰/۳۹ = r و۰/۰۱ > p). همبستگی بین نسبت مس به روی با غلظت سرمی مس بیماران مثبت و معنی دار بود (۰/۳٦ = r و۰/۰۵ > p) ولی همبستگی میزان سرمی روی با نسبت مس به روی منفی و معنی دار محاسبه شد (۰/۷۲- = r و۰/۰۱ > p). میانگین غلظت سرمی مس افراد مبتلا به کارسینومای یاخته کوچک (۲/۸ ± ۷/ ۱۲۳ میکروگرم در دسی لیتر) نسبت به کارسینومای یاخته غیر کوچک(٤/۸ ± ٦/ ۱۱۷ میکروگرم در دسی لیتر), بالا و معنی دار می باشد (۰/۰۵ >P). بیماران مبتلا به کارسینومای یاخته کوچک میانگین غلظت تلومراز بالا (۰/۵۷ ± ۱۱۲ درصد) و معنی داری نسبت به کارسینوماهای یاخته غیرکوچک (۲/۵ ± ٦/٤ درصد) داشتند (۰/۰۵ >P). این وضعیت در مورد عنصر روی و نیز نسبت مس به روی در کارسینوماهای یاخته غیر کوچک نسبت به کارسینومای یاخته کوچک غیر معنی دار ارزیابی شد (۰/۰۵ <P). **نتیجه گیری:** بر اساس نتایج بدست آمده می توان تصور کرد که تعیین میزان روی و مس و فعالیت آنزیم تلومراز در سرطان ریه بتواند نقش بیولوژیک در آغاز و پیشرفت بافت تومورال داشته باشد که نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی : *روی ، مس ، تلومراز ، سرطان ریه.*

*نویسنده مسئول: نصرت اله ضرغامی، استاد، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز، ایران، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، تلفن: ۳۳٦٤۹۰۱ – ۰٤۱، نمابر: ۳۳٦٤۹۰۱ – ۰٤۱۱

**Corresponding Author: Nosratollah Zarghami, Professor, Lung and Tuberculosis Research Center, University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Drug applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Tel: +98-411-3364901; Fax: +98-411-*3364901, *E-mail: Zarghami@tbzmed.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های پیکری (غیرسرطانی)، قابلیت همانندسازی خیلی زیاد و نامحدود آنها می‌باشد و مهم‌ترین کنترل‌کننده‌های همانندسازی سلولی بخشی از ساختار کروموزوم به‌نام تلومر (Telomere) می‌باشد (۱). DNA پلیمرازها نمی‌توانند انتهاهای ′5 کروموزم‌های خطی را به‌طور کامل همانندسازی کنند و در هر تقسیم سلولی قسمتی (50-100bp) از انتهاهای ′5 از بین می‌رود (۲). از آنجا که تلومرها نقش مهمی در کنترل سرعت تقسیم سلولی و فرایند پیری (Aging) ایفا می‌نمایند، هنگامی‌که فرایند کوتاه‌شدن تلومر به حد خطرناک (حذف توالی‌های کددهنده) برسد، باعث مرگ طبیعی سلول (Senscence) می‌گردد (۲،۳). ثابت‌ماندن طول تلومر براثر فعالیت آنزیمی به‌نام تلومراز (Telomerase) صورت می‌پذیرد. این آنزیم یک ترانس‌کریپتاز معکوس (Reverse Transcriptase) می‌باشد که با اضافه‌کردن توالی‌های تکراری جداشده از انتهای ′5 کروموزوم‌ها، باعث جایگزین‌نمودن قطعات از دست‌رفته DNA در طول هر تقسیم سلولی می‌گردد و بدین‌وسیله از کوتاه‌شدن تلومرها جلوگیری نموده، فرایند مرگ طبیعی سلولی را متوقف می‌سازد. تلومراز تقریباً در تمام سلول‌های سرطانی فعال است و تحقیقات نشان می‌دهد که سطح فعالیت تلومراز با مراحل پیشرفت سرطان ارتباط دارد (٤). لذا اندازه‌گیری فعالیت تلومراز می‌تواند نشانگری مطمئن در تشخیص سرطان و تعیین مراحل پیشرفت آن باشد. علاوه بر سلول‌های توموری، سلول‌های طبیعی مشخصی مانند سلول‌های بنیادی (stem cells) و سلول‌های رده زاینده (Germ line cells) از قدرت پرولیفراسیون نامحدودی برخوردار می‌باشند که این مسأله به‌دلیل پایداری طول تلومرهای این سلول‌ها می‌باشد. تلومراز به طور جالب توجهی در طیف وسیعی از سلول‌های سرطانی دوباره فعال می‌شود (۵). فعالیت تلومراز عمومی‌ترین نشانگر مولکولی برای شناسایی سرطان انسان است و در ۸۵ درصد کل تومورها قابل‌ردیابی می‌باشد، در حالی‌که اکثریت بافت‌های سالم سطوح پایینی از فعالیت تلومراز را از خود نشان می‌دهند یا فاقد فعالیت تلومراز می‌باشند. مطالعات مختلف نشان داده که اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در تشخیص مراحل اولیه سرطان که قابل‌ردیابی با روش‌های دیگر نمی‌باشد، مؤثر است. بنابراین تلومراز می‌تواند یک نشانگر اولیه و مستقل سرطان محسوب گردد (٦). در بعضی موارد (به‌طور قابل‌توجه در مورد نروبلاستوما، تومورهای معده و پستان)، سطح بالای فعالیت تلومراز با پیش‌آگهی بدی همراه می‌باشد که نشان‌دهنده این است که فعالیت تلومراز می‌تواند به عنوان یک نشانگر پیشگویی‌کننده مورد استفاده قرار بگیرد (۸ ، ۷). لذا به‌رغم اثبات بالابودن سطح فعالیت تلومراز در سلول‌های توموری با منشأهای مختلف و همچنین اندازه‌گیری سطح فعالیت این آنزیم در سرطان ریه که به‌طور پراکنده انـــجام گرفته (۱۰ ، ۹)، تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای که دال بر تعیین سطح فعالیت این آنزیم در سلول‌های طبیعی (میرا) انسانی و سلول‌های سرطانی بخصوص سرطان ریه باشد، در ایران مشاهده نگردیده، لذا این مطالعه به منظور تعیین سطح فعالیت آنزیم تلومراز در افراد گروه کنترل (بیماریهای ریه غیر سرطانی) و مورد (افراد مبتلا به سرطان ریه) انجام گردید.

نقش بیولوژیکی عناصر ضروری کمیاب به ویژه تغییرات سطوح مس و روی بدن در سرطانهای مختلف طی چندین سال اخیر مورد توجه تیم های تحقیقاتی مختلف قرار گرفته است (۱۱،۱۲). روی یکی از مهمترین عناصر کمیاب بدن جزء مهم ساختمانی بیش از ۲۰۰ متالوآنزیم دخیل در مسیرهای تکثیر سلولی، ترمیم DNA ، آنتی اکسیدانهای ضد رادیکالهای آزاد (فاکتورهای دخیل در ایجاد سرطان) مانند آنزیم روی/مس سوپراکسید دیسموتار و غیره است (۱۳). همچنین پروتئینAPA1 حامل کوفاکتور روی با اتصال به پروموتور ژن آنزیم تلومراز (مسئول تکثیر نامحدود سلولهای سرطانی) باعث کاهش بیان آن می گردد (۱٤،۱۵). مس به عنوان دیگر عنصرکمیاب بدن جزیی از ساختار برخی از پروتئینها مانند سرلوپلاسمین پلاسمایی، فاکتور رشد اندوتلیال رگی و ترانس کوپرنین است که میزان این سه فاکتور به همراه یون مس در سرم برخی افراد دارای سرطانهای بدخیم افزایش می یابد (۱۳،۱٦). گزارشات متعدد حاکی از آن است سلولهای سرطانی به علت توانایی جذب یون مس از بخش غیر سرلوپلاسمایی پلاسما دارای غلظت بسیار بالایی از یون مس بوده و این عنصر در رگ زایی توموری از طریق مسیر آمین اکسیدازی وابسته به یون مس نقش مهمی در رشد توموری ایفاء می کند (۱۷). از آنجائیکه رقابت زیادی بین این دو عنصر روی و مس برای ورود به سلول های بافت وجود دارد، تغییرات سطوح مس به روی در سرم نیز مهم است. با این حال نتایج متفاوتی در مورد مزیت استفاده از تغییرات این دو عنصر و نسبت مس به روی بدن در سرطانهای مختلف به ویژه سرطان ریه از نقطه نظر تشخیص، پیش آگهی سرطان گزارش شده است (۱۸). از این رو با توجه به اکثر گزارش‌های قبلی مبنی بر افزایش سطح فعالیت آنزیم تلومراز در بسیاری از انواع سرطان‌ها هدف دیگر این مطالعه پاسخ به این سؤال بود که

Archive of SID

www.SID.ir

آیا بین سطح فعالیت تلومراز در بیماریهای ریوی غیر سرطانی با سطح فعالیت تلومراز در نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران سرطان ریه ارتباطی وجود دارد و نیز آیا غلظت سرمی عناصر روی و مس با فعالیت آنزیم تلومراز در ارتباط می باشند؟

۲- مواد و روشها

در این مطالعه موردی – شاهدی تعداد ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه به عنوان گروه مورد و ۲۰ بیمار مبتلا به بیماریهای غیر توموراال ریوی (عفونی ریوی، التهاب و غیره) به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. جمع آوری نمونه های بافت توموراال از دی ماه ۱۳۸۲ تا بهمن ماه ۱۳۸٤ در بیمارستان امام دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. پروتکل مطالعه در کمیته اخلاق مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تائید و از تمام بیماران رضایت کتبی حاصل گردید. بر اساس مطالعات سیتولوژی و هیستوپاتولوژی نمونه های بیوپسی ، افراد بیمار در دو گروه عمده کارسینومای یاخته های کوچک، و غیر کوچک (آدنوکارسینوم، یاخته سنگفرشی، و یاخته های بزرگ) سرطان ریه تقسیم بندی شدند. از همه افراد مورد مطالعه ۵ میلی لیتر خون گرفته و سرم آن با سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد جدا شد. نمونه های بیوپسی بیماران به همراه کلیه نمونه های سرمی تا اجام آنالیز های مربوط در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۱: استخراج سیتوزول بافت توموری

جهت استخراج سیتوزول توموری، ابتدا نمونه های بافت توموری با استفاده از دستگاه Tissue hammering که در آزمایشگاه طراحی شده بود در ازت مایع پودر شدند. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی (۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۸)، یک میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ میلی مولار بنزآمیدین، ۵ میلی مولار بتامرکاپتواتانل، ۰/۵ درصد chaps، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ میلی مولار EDTA) اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. فاز رویی به آرامی به میکروتیوب جدید منتقل شد (۱۹).

۲-۲: اندازه گیری روی ومس

ابتدا نمونه های سرم توسط آب دیونیزه شده به نسبت ۱ به ۵ رقیق گردید، سپس توسط دستگاه جذب اتمی (Atomic Absorption Spectroscopy Analytical CTA 2000 (Chemtech مقدار روی و مس اندازه گیری شد. اساس این دستگاه، تحریک یون ها به وسیله شعله یا حرارت است که الکترونها به یک لایه بالاتر برانگیخته شده و با برگشت به حالت اولیه، اشعه UV ساطع می شود که در طول موج مشخص برای هر یون توسط بخش ثبات دستگاه ثبت می شود. برای کنترل کیفی این آزمایش از مواد مرجع استاندارد استفاده شد.

۲-۳: TRAP Assay

جهت اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش TRAP Assay[1] مبتنی بر دو تکنیک واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی و الیزا بر اساس روش هولت استفاده شد(۱۹). به منظور بهینه سازی شرایط TRAP-PCR غلظت واکنشگر برای حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکروگرم نمونه پروتئین استخراجی حاوی آنزیم تلومراز، ۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار ، ٦۰ نانوگرم از آغازگر، ۵ میکرولیتر استاندارد حاوی نمونه و ۱٦ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر DNA استریل تنظیم و آماده شد. لازم به ذکر است که در این واکنش Taq Polymerase نقش آنزیم تلومراز را ایفا میکند پس از آماده سازی واکنشگرها برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل شرکت اپندروف تنظیم گردید. در این برنامه یک دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد جهت آماده سازی آنزیم تلومراز برای شروع فعالیت و سپس یک دور به مدت ۱ دقیقه جهت تک رشته ای شدن کلی در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد، ۲۷ دور شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه که دمای اتصال آن برای آغازگر در کیت ۳۰ درجه سانتیگراد مشخص شده است، سنتزتوالیهای تلومری به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتیگراد و باز شدن رشته به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد بر روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد پس از انجام PCR برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش ELISA استفاده شد. در اولین قدم ۳ میکرولیتر از نمونه تکثیری بر روی پلیت متحرک و ساکن شد. پس از انکوبه کردن پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اطاق سه بار با استفاده از بافر مربوطه شستشو داده شد. سپس آنتی بادی نشاندار شده با بیوتین به کمپلکس حاصله افزوده شد. آنتی بادی مربوطه با پراکسیداز تربچه کنژوگه شده بود. با اضافه کردن محلول سو بستر ا که حاوی ۵، ۵، ۳، ۳- تترا متیل بنزن (TMB) است، واکنش رنگی صورت گرفته و مقدار رنگ ایجاد شده در طول موج ٤۵۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. با قرار دادن مقادیر جذب شده از نمونه ها در منحنی استاندارد بدست آمده میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در نمونه های مجهول شناسایی شد.

[1] Telomeric Repeat Amplification Protocol

Archive of SID

www.SID.ir

٤-۲: آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون T مستقل استفاده شد . معنی دار بودن آماری($p< ۰/۰۵$) برای کلیه آزمونهای آماری دو دنباله ای در نظر گرفته شد. کلیه آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 11.5 انجام شد.

۳- نتایج

در این مطالعه ۵۰ فرد (۳۸ مرد و ۱۲ زن) مبتلا به سرطان ریه با میانگین سنی ۹/۳۷ ± ٦۳/۸۸ (محدوه سنی ۵۵ تا ۷۳ سال) که قبلا توسط روش تهاجمی برونکوسکوپیک و هیستوپاتولوژیک سرطان ریه در آنها تائید شده بود مورد بررسی قرار گرفتند. از نظر هیستوپاتولوژی تعداد ۱۸ نفر دارای کارسینومای یاخته های کوچک و ۳۲ نفر دارای کارسینومای یاخته های غیر کوچک بودند. تعیین مقادیر سرمی روی و مس به همراه میزان بیان ژن تلومراز (به طور غیر مستقیم سنجش فعالیت آنزیم تلومراز) در سطح بافتهای تومورال و غیر تومورال ریه نشان داد که میانگین غلظت سرمی مس و نسبت مس به روی در افراد مبتلا به سرطان ریه به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل می باشد ($P< ۰/۰۵$). اما بین میانگین غلظت سرمی روی در افراد بیمار و کنترل تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$). میانگین میزان فعالیت آنزیم تلومراز گروه بیمار تفاوت کاملا معنی داری را با گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۱$). (جدول ۱). مقادیر سرمی روی و مس به همراه میزان فعالیت آنزیم تلومراز در بافت تومورال بیماران دارای کارسینومای یاخته کوچک و غیر کوچک نشان داد که میانگین غلظت سرمی مس افراد مبتلا به کارسینومای یاخته غیر کوچک نسبت به کارسینومای یاخته کوچک، بالا و معنی دار می باشد ($P< ۰/۰۵$). بیماران مبتلا به کارسینومای یاخته کوچک میانگین غلظت تلومراز بالا و معنی داری نسبت به کارسینوماهای یاخته غیرکوچک داشتند ($P< ۰/۰۵$). این وضعیت در مورد عنصر روی و نیز نسبت مس به روی در کارسینوماهای یاخته غیر کوچک نسبت به کارسینومای یاخته کوچک غیر معنی دار ارزیابی شد ($P> ۰۵/$). (جدول ۲). در مطالعه همبستگی و پراکندگی مقادیر متوسط شاخصهای اندازه گیری شده مس و روی و فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه های سرطان ریه نشان داد که همبستگی مستقیم و معنی داری ($r = ۰/۳٦$ و $p< ۰/۰۵$) بین میزان سرمی مس با میزان فعالیت آنزیم تلومراز بیماران وجود دارد (نمودار ۱). همچنین بین غلظت تام مس سرمی و افزایش سن بیماران همبستگی مثبت ($r = ۰/۳۹$ و $p < ۰/۰۱$) مشاهده شد (نمودار ۲). همبستگی بین نسبت مس به روی با غلظت سرمی مس گروه مورد مثبت و معنی دار بود ($r = ۰/۳٦$ و $p < ۰/۰۵$) ولی همبستگی میزان سرمی روی با نسبت مس به روی منفی و معنی دار محاسبه شد ($r = -۰/۷۲$ و $p < ۰/۰۱$).

جدول شمارهٔ ۱. مشخصات سنی و سطوح سرمی مس،روی و نسبت مس به روی به همراه میزان فعالیت آنزیم تلومراز در گروه شاهد و بیمار.

متغیر	کنترل میانگین ± انحراف معیار	مورد میانگین ± انحراف معیار
سن (سال)	٦۸/۳ ± ۳/۸	٦٤/۹ ± ۱/٤
مس (میکروگرم در دسی لیتر)	۱۰۷/۲ ± ٦/۵	۱۲۰/۸ ± ۵/۷
روی (میکروگرم در دسی لیتر)	۸۷/۰ ± ٤/۱	۳۸/۸ ± ۳/۸
نسبت مس به روی	۱/۱ ± ۰/۲	۱/٦ ± ۰/٤
تلومراز (درصد)	صفر	۳۲/۸ ± ۱٦/۱

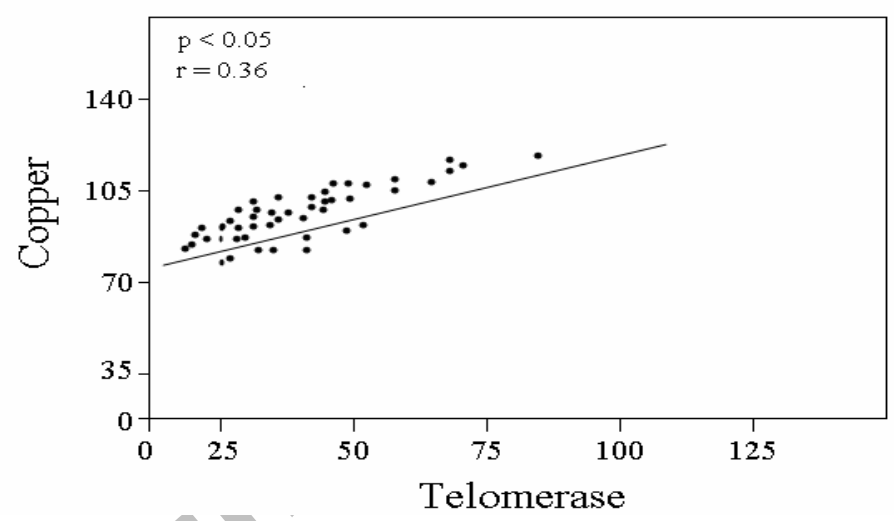
Archive of SID

www.SID.ir

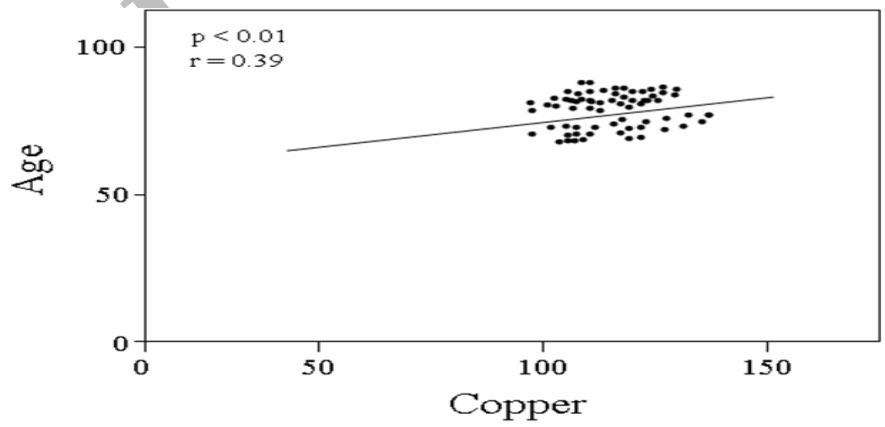
جدول شمارهٔ ۲. مقایسهٔ سطوح سرمی مس ، روی و نسبت مس به روی به همراه میزان فعالیت آنزیم تلومراز در کارسینومای یاختهٔ کوچک و غیر کوچک ریه.

متغیر	کارسینومای یاختهٔ کوچک میانگین ± انحراف معیار	کارسینومای یاختهٔ غیر کوچک میانگین ± انحراف معیار	P Value
سن	۶۱/۲۲ ± ۱۰/۳	۶۴/۰ ± ۷/۸	NS
مس (میکروگرم در دسی لیتر)	۱۲۳/۷ ± ۲/۸	۱۱۷/۶ ± ۴/۸	< ۰/۰۵
روی (میکروگرم در دسی لیتر)	۸۲/۷ ± ۱/۴	۸۱/۲ ± ۲/۹	NS
نسبت مس به روی	۱/۵ ± ۰/۰۲	۱/۴ ± ۰/۵	NS
تلومراز (درصد)	۱۱۲/۰ ± ۰/۵۷	۶/۴ ± ۲/۵	< ۰/۰۵

NS = Non Significant



نمودار ۱. نمودار همبستگی بین غلظت سرمی مس و فعالیت آنزیم تلومراز



نمودار ۲. نمودار همبستگی بین غلظت سرمی مس با سن بیماران

www.SID.ir

٤- بحث

سرطان یک مشکل فراگیر در همه جوامع دنیا می باشد که مجموعه ای از عوامل, از جمله تومورمارکرها و عناصر ضروری نظیر روی و مس در شروع و پیشرفت آن نقش دارند. سرطان ریه یکی از شایعترین انواع سرطان می باشد که در این تحقیق با توجه به اهمیت این نوع سرطان, فعالیت آنزیم تلومراز در سطح بافت توموری و نیز مقادیر سرمی روی و مس به عنوان عوامل دخیل در شروع و پیشرفت آن در بیماران ریوی مورد بررسی قرار گرفت (۱۷،۱۸). تلومراز در اکثر سلولهای سوماتیک فاقد فعالیت است در حالیکه در بیش از ۹۰ درصد سلولهای سرطانی دارای فعالیت می باشد. در این مطالعه مشاهده شد میزان فعالیت تلومراز در مبـــــــتلایان به سرطان ریه بالا (۱٦/۱ ± ۳۲/۸ درصد) می باشد در حالیکه در گروه کنترل فعالیتـــی (صفر درصد) مشاهده نشد. این اختلاف فعالیت بین بافتهای سرطانی و غیر سرطانی از نظر آماری کاملا معنی دار بود که این نتایج مشابه با نتایج Mokbel و همکاران می باشد. به این ترتیب اندازه گیری فعالیت آنزیم تلومراز در بافتهای سرطانی ریه می تواند احتمالا به تشخیص کمک کند که این مطلب نشان دهنده یک ارتباط بین فعالیت تلومراز و پیش آگهی بیماری می باشد (۲۰). در رابطه با نقش فلزاتی مانند مس و روی و نسبت این دو عنصر در ارتباط با شروع و پیشرفت سلول های توموری, بررسیهای زیادی شده است، بطوریکه نشانگر تغییرات این دو عنصر در سطح سرمی بیماران سرطانی می باشد (۲۱،۲۲). در مطالعه ما نیز مشاهده شد, غلظت مس و نسبت مس به روی در گروه مورد بیشتر از گروه کنترل است و این اختلاف از نظر آماری بالا می باشد (P< ۰/۰۵). غلظت روی در گروه مورد کمتر از گروه کنترل بود ولی اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد از طرف دیگر همبستگی بین غلظت سرمی مس و روی با نسبت مس به روی بیماران به ترتیب مثبت معنی دار و منفی معنی دار محاسبه شد که این نتایج موافق با نتایج Zowczak, Oyama ,Piccinini و همکاران است. Oyama و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعات خود بر روی ۸٤ بیمار مبتلا به سرطان ریه نشان دادند که غلظت سرمی مس و نسبت سرمی مس به روی بیماران در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری بالا بود (۲۳). در مطالعه این گروه در سال ۱۹۹٤ نیز بر روی ۱٦۲ بیمار مبتلا به سرطان ریه همبستگی بین غلظت سرمی مس و روی با نسبت مس به روی بیماران را به ترتیب مثبت معنی دار و منفی معنی دار محاسبه نمودند (۲٤). همچنین در مطالعات Zowczak و همکاران بر روی بیماران سرطانهای ریه، پستان، گوارش، تخمدان و سرویکس افزایش میزان مس و نسبت مس به روی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و تغییرات کاهشی عنصر روی تنها در مراحل اولیه بیماران دارای سرطان گوارش دیده شد (۱۸). Piccinini در بررسی که بر روی بیماران مبتلا به سرطان ریه انجام داد مشاهده کرد که در سرطان ریه مقدار روی کاهش معنی داری دارد (P<۰/۰۵) (۲۱). افزایش نسبت مس به روی احتمالا باعث می شود, فرایند تولید رگهای جدید افزایش یابد. روی نیز با شرکت در ساختار آنتی اکسیدان پروتئینی, به نام متالوتئنین و گلوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش رادیکال های آزاد و کاهش ورود مس به درون بافت ها می شود در نتیجه, کمبود ملایم مس در بافت عدم رشد سلول های توموری را در پی خواهد داشت (۳۱-۲۵). در مطالعه ما مشاهده شد, همبستگی مستقیم و معنی داری بین سطوح سرمی مس و نسبت مس به روی با میزان فعالیت آنزیم تلومراز در مبتلایان به سرطان ریه وجود دارد(r = ۰/۳٦ و p< ۰/۰۵) با این حال همبستگی بین غلظت سرمی عنصر روی با فعالیت آنزیم تلومراز معنی دار نبـود که این نتایج مشابه با نتایج Nemoto و همکاران است. Nemoto و همکاران در ۲۰۰۰ در مطالعات خود در محیط in vitro حاوی سلولهای NRC2 نشان دادند که تغییرات غلظت عناصر روی و مس در مراحل اولیه کشت این سلولها با فعالیت آنزیم تلومراز همبستگی مثبت معنی داری داشت. البته این تغییرات پس از ٦ ساعت اولیه تنها برای یون مس و نسبت مس به روی با فعالیت آنزیم تلومراز مثبت معنی دار بود. دلیل این مسئله را بدین صورت می توان توجیه نمود که احتمالا اثر عنصر روی بر افزایش فعالیت آنزیم تلومراز بطور غیر مستقیم از طریق بیان ژنهای پاسخ اولیه (early response genes) بوده و با کاهش بیان این ژنها فعالیت آنزیم تلومراز به حالت اولیه باز می گردد. با این حال نقش مس در افزایش فعالیت این آنزیم تاکنون ناشناخته مانده است (۳۲). البته اثبات صـــحت موارد فوق الذکر را می توان از طریق مطالعـــه در محیـــط invitro با تأثیر عناصر روی و مس بر روی بیان ژن TERT آنزیم تلومراز و نیز سایر ژنهایی که در این پروسه بیان می شوند به اثبات رساند. در این مطالعه مشاهده گردید که میانگین غلظت سرمی مس افراد مبتلا به کارسینومای یاخته غیر کوچک نسبت به کارسینومای یاخته کوچک , بالا و معنی دار می باشد (P< ۰/۰۵) که این یافته توسط مطالعات متعددی تائید شده است و به عنـــوان یک مارکـــر تشخیصـــی برای هر دو نوع ســـرطان پیشنـــهاد شده است (۲٤،۲۳، ۱۷،۱۸). بیماران مبتلا به کارسینومای یاخته کوچک

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین غلظت تلومراز بالا و معنی داری نسبت به کارسینوماهای یاخته غیرکوچک داشتند (P<۰/۰۵) که در این خصوص مطلبی که این یافته را تأیید کند بدست نیامده و این امر نیازمند بررسی بیشتر می باشد. بطور خلاصه با توجه به نتایج این مطالعه, تغییرات سطح سرمی و بافتی عناصر کمیاب روی و مس در فعالیتهای بیولوژیکی سلولهای سرطانی بویژه از طریق بیان ژن آنزیم تلومراز احتمالا رل مهمی را ایفا می کند و این امر نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

۵- نتیجه گیری

براساس نتایج بدست آمده می توان تصورکرد که تغییرات سطوح سرمی عناصر کمیاب روی ، مس دربیماران مبتلا به سرطان ریه احتمالا نشان دهنده نقش بیولوژیکی این عناصر در آغاز و یا پیشرفت سرطان ریه باشد و همچنین آنها در ایجاد تغییرات بیان ژن تلومراز در بافت های توموری ریه احتمالا رل مهمی را ایفاء می کنند و این امر نیاز به بررسیهای بیشتر می باشد

تشکر و قدردانی

هزینه این طرح تحقیقاتی از طرف مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریزتامین گردیده است . نویسندگان مراتب تشکر را از همکاران محترم مرکز تحقیقات و آزمایشگاه رادیوفارماسی مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در زمان اجرای طرح ابراز می دارند.

References:

1. Blachburn E.H. Structure and function of telomerase, Nature, 1997, 266: 569-73
2. Makarov V.L., Hirose Y., Longmar J.P., Long G. Tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanisms for telomere shortening cell, Cell, 1997, 88: 657-66.
3. McElligott R., Wellinger R.J. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes, EMBO, 1997, 16: 3705-14.
4. Watson J.D. End replication problem, Nature, 1999, 239: 197-201.
5. Counter G.M., Avilion A.A., Lefeuvre C.E., Stewat N.G., Gereider G.W., Harvley C.B. Telomere shortening associated with chromosomes instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, EMBO, 1992, 11: 877-82.
6. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast, Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89: 10114-118.
7. Malask A.J., Kumica Z., Brosky M., Faycus J. Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma, Neoplasm, 2004, 51(2): 90-96.
8. Kobayashi T., Kubota K., Takayama T., Macuuchi M. Telomerase activity as a predictive marker for recurrence of hepato-cellular carcinoma after hepatectomy, Am. J. Surgery, 2001, 18: 984-8.
9. Franco S., Ozkaynak M.F., Sandoval C., Tugal O., Jayabose S., Engelhardt M., Moore M.A.S. Telomere dynamics in childhood leukemia and solid tumors: a follow-up study, Leukemia, 2003, 17: 401-410.
10. Piatyszek M.A., Kim N.W., Weinrich S.L., Hiyama E., Shay J.W. Detection of telomerase activity in human myelogenous cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP), Methods Cell Sci., 1995, 17: 1-15.
11. Navarro S.A., Rohan T.E. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence, Cancer Causes Control, 2007, 18(1): 7-27.
12. Schwartz M.K. Role of trace elements in cancer, Cancer Res., 1975, 35(11): 3481-7.
13. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk, J. Nutr. Biochem., 2004, 15(10): 572-8.
14. Benanti J.A., Williams D.K., Robinson K.L., Ozer H.L., Galloway D.A. Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1, Mol. Cell Biol., 2002, 22(21): 7385-97.
15. Liu Q. Zinc Finger Proteins to Study Breast Cancer Angiogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(11): 5525-30.
16. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Beaver SH, Etzel C, Forman MR. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. Int J Cancer 2007; 120(5):1108-15
17. Zowczak M., Iskra M., Paszkowski J., Manczak M., Torlinski L., Wysocka E. Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum of cancer patients, J. Trace Elem. Med. Biol., 2001, 15(2-3): 193-6.
18. Zowczak M., Iskra M., Torlinski L., Cofta S. Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients, Biol. Trace Elem. Res., 2001, 82(1-3): 1-8.
19. Holt S.E., Norton J.C., Wright W.E., Shay J.W. Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAP-eze telomerase detection kit, Methods Cell Sci., 1996, 18: 237-248.
20. Mokbel K., Williams N.J. Telomerase and breast cancer: from diagnosis to therapy, Int. J. Surg. Investig ., 2000, 2(1): 85-8.
21. Piccinini L., Borella P., Bargellini A., et al. A Case -control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected

Archive of SID

www.SID.ir

by breast and lung cancer, Biol. Trace Element Res., 1996, 51: 23-30.
22. Huang Y.L., Snea J.Y., Lin T.H. Association between Oxidative Stresses And Changes of Trace Elements in Patients with Breast, Clinical Biochemistry, 1999, 32(2): 131–136.
23. Oyama T., Kawamoto T., Matsuno K., Osaki T., Matsumoto A., Isse T. A case-case study comparing the usefulness of serum trace elements (Cu, Zn and Se) and tumor markers (CEA, SCC and SLX) in non-small cell lung cancer patients, Anticancer Res., 2003, 23(1B): 605-12.
24. Oyama T., Matsuno K., Kawamoto T., Mitsudomi T., Shirakusa T., Kodama Y. Efficiency of serum copper/zinc ratio for differential diagnosis of patients with and without lung cancer, Biol. Trace Elem. Res., 1994, 42(2): 115-27.
25. Brewer J.G. Copper Control as an Antiangiogenic Anticancer Therapy: Lessons from Treating Wilson S Disease, Copper Control in Antiangiogenesis Anticancer Therapy, 2001, 665-673.
26. Liu Q. Zinc Finger Proteins to Study Breast Cancer Angiogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94 (11): 5525-30.
27. Benanti J.A., Williams D.K., Robinson K.L., Ozer H.L., Galloway D.A. Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1, Mol. Cell Biol., 2002, 22(21): 7385-97.
28. Kim S.Y., Kim J.W., KO Y.S., Koo J.E., Chung H.Y., Lee-Kim Y.C. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and nvasive cancer, Nutr. Cancer, 2003, 47(2): 126-30.
29. Silvia L., Anna M., Alessandra M., Medda et al. Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases, Phytochemistry, 2005, 1751-1758.
30. Duchette R., Gallant S., Wolf C. Tetrathiomolybdate Copper Reduction Therapy as an antiangiogenic treatment for lymphoma and other cancers, http://www.coldcure.com/html/anti_ang.html (Updated: 15 July, 2004).
31. Rosas R., Poo J.L., 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.
32. 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. Pharmacol., 2000, 59(4): 401-5.

Archive of SID

www.SID.ir