

بررسی برخی پارامترهای خونی و بیان ژن‌های P53 و IL6 در شاغلین مجتمع مس در مقایسه با افراد کنترل

حدیث احمدی راد^۱، مینا همتی^۲، مهدی محمودی^۱، احمدرضا صیادی اناری^۳، محمدرضا میرزایی^۱، علیرضا خوشدل^۴، مریم امیری^۵، فهیمه محمدیان شهر بابکی^۱، محمدرضا حاجی زاده^{۱*}

- ۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
- ۲- گروه آموزشی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
- ۳- مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
- ۴- گروه آموزشی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
- ۵- گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۰۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی صنعتی از جمله آلودگی با عناصر کمیاب توانایی اعمال عوارض بیولوژیکی بسیار زیادی از جمله سرطان و بیماری‌های التهابی بر روی انسان دارد. بر همین مبنا ما در این تحقیق برخی فاکتورهای آگاهی دهنده در بروز التهاب و سرطان از جمله p53 و IL6 و برخی اندیس‌های خونی در افرادی که به طور طبیعی در معرض عناصر کمیاب بودند را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: جمعیت مورد مطالعه شامل دو گروه ۴۵ نفری بودند که گروه اول کارگران در معرض آلودگی صنعتی و گروه دوم را گروه کنترل تشکیل داد که در اینجا مقایسه برخی پارامترهای بیوشیمیایی، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و نیز بیان ژن‌های p53 و IL6 در بین دو گروه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آزمایشات نشان داد که بیان ژن IL6 و P53 افزایش معنی داری در گروه در معرض آلودگی نسبت به گروه کنترل داشته است (P-Value (p53)=0.001 (IL6)=0.003). همچنین میزان تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در گروه در معرض آلودگی افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت (P-Value (WBC)=0.001, (RBC)=0.009). آنزیم‌های کبدی ALT, AST نیز افزایش یافته و ALP کاهش یافته بود و CRP نیز در تمامی افراد مورد مطالعه منفی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی بر این است که قرار گرفتن در معرض آلودگی صنعتی میزان بیان ژن‌های IL6, p53 و همچنین برخی پارامترهای خونی را تغییر داده است و ممکن است در آینده خطرات جدی برای افراد در معرض آلودگی ایجاد کند.

کلمات کلیدی: آلودگی صنعتی، عناصر کمیاب، IL6, p53

مقدمه

آلودگی است که در اثر فعالیت‌های مصنوعی ایجاد می‌شود. در میان صنایع کارخانه‌های تولید مواد شیمیایی، منابع اصلی آلودگی هوا هستند. آلاینده‌ها شامل منواکسیدکربن (CO)، دی‌اکسیدنیترژن (NO₂)، دی‌اکسیدگوگرد (SO₂)، ذرات معلق و عناصر کمیاب می‌باشد (۱-۳). عناصر کمیاب اهمیت زیستی فراوانی دارند. اما در صورتی که افراد طولانی مدت در تماس مستقیم با این عناصر قرار گیرند جنبه سمیتی آن‌ها بیش تر

با توجه به گسترش شهرها و افزایش منابع آلاینده‌ها، هوای اغلب شهرهای بزرگ و صنعتی آلوده می‌باشد و با توجه به خطراتی که این آلودگی برای سلامت افراد ساکن در مناطق آلوده دارد، شناخت و آگاهی نسبت به جوانب مختلف این مسأله از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. آلودگی ناشی از صنایع، منبع اصلی

* نویسنده مسئول: محمدرضا حاجی زاده، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
Email: hajjizadehus@yahoo.com



بیان ژن دیگری که غلظت عناصر کمیاب روی آن اثر می‌گذارد اینترلوکین ۶ است این سایتوکاین هم در ایمنی ذاتی و هم ایمنی اکتسابی نقش دارد (۱۹-۲۰). سایتوکاین التهابی اینترلوکین ۶ قابلیت القا بلوغ و تمایز سلولی را دارد (۲۱-۲۳).

در تومورهای مختلف و بیماری‌های التهابی افزایش سطح IL6 دیده شده است (۲۴). اینترلوکین ۶ اثرات تنظیمی بر روی حیات سلول، رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های سرطانی دارد و با تومور زایی، رگ زایی و کاشکسی رابطه دارد (۲۵-۲۸).

با توجه به تحقیق قبلی که در این زمینه صورت گرفته مشاهده شده که تماس طولانی مدت افراد با مس و مولیبدن باعث افزایش غلظت این عناصر در خون افراد در معرض می‌شود (۶). سطح آنزیمی ALT و AST در افرادی که در معرض آلودگی با سرب و کادمیوم بودند به طور چشمگیری افزایش یافته است (۲۹-۳۰). در مطالعه‌ی دیگر مشاهده شده افرادی که در معرض مستقیم آرسنیک بودند نیز سطح سرمی آنزیم‌های کبدی افزایش یافته و همچنین میزان پروتئین اینترلوکین ۶ نیز با افزایش همراه بوده است (۳۱).

از طرفی بر اساس مقالات اشاره شده ارتباط این عناصر و سایر آلودگی‌های صنعتی می‌تواند تغییرات متفاوتی در روند بروز بیماری‌های سرطانی و التهابی ایجاد کند، بر همین اساس هدف از این مطالعه بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های p53 و IL6 و همچنین میزان ALT, AST, RBC, WBC در خون و بررسی کیفی CRP در افرادی که در معرض غلظت بالایی از آلودگی صنعتی قرار دارند در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد و حجم هر گروه طبق مطالعه (۳۲) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$n = (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (S_1^2 + S_2^2) / (\mu_1 - \mu_2)^2$$

α : خطای نوع اول

β : خطای نوع دوم

S₁: انحراف معیار متغیر مورد مطالعه در گروه مورد

S₂: انحراف معیار متغیر مورد مطالعه در گروه کنترل

μ_1 : میانگین متغیر مورد مطالعه در گروه مورد

μ_2 : میانگین متغیر مورد مطالعه در گروه کنترل

$\beta = 10\%$, $\alpha = 5\%$, $S_1 = 3.23$, $S_2 = 3.01$, $\mu_1 = 7.01$, $\mu_2 = 4.69$

می‌شود. عناصری مانند مس، مولیبدن، سلنیوم، کروم، نیکل، آهن، روی، وانادیوم، منگنز، سیلیکون، بور، فلئوئور و آرسنیک به علت ضرورت و کمیت محدود در بدن انسان تحت عنوان عناصر کمیاب شناخته شده‌اند (۴-۷).

تعداد زیادی از مقالات نشان می‌دهند که عناصر کمیاب دارای پتانسیلی در ایجاد سرطان هستند و محققان توانستند ارتباط محکمی بین آلودگی صنعتی و سرطان ایجاد کنند (۸). همچنین شواهد زیادی وجود دارند که آلودگی هوا باعث القای پاسخ التهابی سیستمیک می‌شود و در این جا ماکروفاژها نقش مهمی را در بلع و پاک‌سازی آلاینده‌های استنشاقی بازی می‌کنند. علاوه بر این نشان داده شده که طیف وسیعی از مواد استنشاقی باعث تحریک ماکروفاژها در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند: IL8, IL6 و TNF- α می‌شوند (۹-۱۳).

یون مس به دلیل دخالت در فعالیت‌های اکسیداسیون و احیا نقش اساسی در تولید متابولیت‌های آزاد اکسیژن دارد، رادیکال‌های آزاد قابلیت اتصال به اجزای طبیعی سلول را داشته و منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و تخریب اسیدهای نوکلئیک می‌شوند و از این طریق در آغاز و پیشرفت پدیده‌ی کارسینوژنز و ایجاد سرطان‌های مختلف نقش دارند (۱۴). سطح بالای مس با افزایش استرس اکسیداتیو باعث افزایش بروز و پیشرفت سرطان می‌شود. این عنصر در بافت‌های توموری خاصیت آنژیوژنزی نشان می‌دهد و به عنوان مارکر مهمی برای سرطان سینه شناخته شده است (۱۵-۱۶).

P53 یکی از ژن‌هایی است که بیان آن در سرطان‌های مختلف تغییر می‌کند و پروتئین آن به عنوان سرکوبگر تومور می‌باشد و همچنین دارای مکانیسم‌های ضد سرطانی زیادی می‌باشد. همچنین در آپوپتوز، در پایداری ژنوم و جلوگیری از فعالیت‌های رگ‌زایی نقش دارد (۱۶-۱۷).

مس می‌تواند باعث جاگیری روی در پروتئین p53 شود و آن را به یک پروتئین غیر طبیعی تبدیل کند و باعث اختلال در عملکرد این پروتئین شود. با وجود القای p53 تجمع مس در کبد به طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند که این می‌تواند باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان در موش و انسان شود. به طور کلی عدم تعادل در مس و روی منجر به بیان بیشتر p53 می‌شود (۱۸).



تخلیص RNA (Pars tous) ساخت کشور ایران مطابق با پروتکل آن صورت گرفت. صحت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز در آگاروز یک درصد و رنگ آمیزی با Green Viewer DNA و مشاهده سه باند RNA با دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت (۳۶).

ابتدا RNA با استفاده از کیت (Pars tous) به cDNA تبدیل شد. برای سنتز cDNA، در مرحله اول مقدار ۳ میکرولیتر RNA تام، ۱ میکرولیتر Random hexamer، ۲ میکرولیتر oligo dt، ۴ میکرولیتر DEPC در دستگاه ترموسایکلر (از شرکت Bio-Rad مدل ۱۰۰۰ C) برنامه 70cDNA به مدت ده دقیقه قرار دادیم و سپس آن را از دستگاه خارج و مدت ۲ دقیقه خنک شد و در مرحله دوم میزان ۱۰ میکرولیتر RT MIX به مخلوط اضافه کرده و به دستگاه برنامه 42cDNA داده و در نهایت بعد از ۶۰ دقیقه cDNA ساخته شد

۳ میکرولیتر از cDNA سنتز شده را به همراه ۲ میکرولیتر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز و ۵ میکرولیتر DNase free مخلوط کردیم و در دستگاه RT-PCR (از شرکت Bio-Rad مدل CFX96) قرار دادیم.

پرایمرهای استفاده شده پرایمرهای فوروارد و ریورس اختصاصی هر ژن بودند که توالی آن‌ها را توسط نرم افزار Oligo 7 پرایمر طراحی کردیم.

P53: F: TGAAGCTCCCAGAATGCCAG
R: GCTGCCCTGGTAGGTTTTCT
IL6: F: TGCAATAACCACCCCTGACC
R: ATTTGCCGAAGAGCCCTCAG

برای پایش هر مرحله از سایبر گرین (شرکت Genet Bio) استفاده شد. غلظت مورد نظر نسبت به غلظت ژن بتا-اکتین گزارش شد. از بتا-۲-اکتین به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت (۳۶).

اطلاعات چک لیست‌ها پس از جمع آوری توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت میزان تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی به صورت «انحراف معیار \pm میانگین» گزارش شد. Independent two-sample t-test استفاده شد. بیان ژن‌های مورد نظر به دلیل پراکندگی غیر نرمال از طریق آزمون TestMan-whitney اندازه‌گیری شدند و سطح معنی داری در این آزمون‌ها ۰/۰۵ است.

برای هر گروه $n=38$ نفر ولی برای اطمینان بیشتر هر گروه ۴۵ نفر در نظر گرفته شد.

نمونه‌ها به صورت در دسترس انتخاب شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. معیارهای ورود به مطالعه شامل سن ۵۶-۳۰ سال، سابقه کاری بالای ۱۰ سال و محل کار (ذوب و تغلیظ) و معیارهای خروج شامل افراد مبتلا به سرطان، بیماری‌های مزمن، اعتیاد به مواد مخدر، مصرف مشروبات الکلی می باشند زیرا این عوامل بیان ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۳۳-۳۵). گروه اول شامل کارگران شرکت مس سرچشمه رفسنجان و گروه دوم شامل کارگران علوم پزشکی شهرستان رفسنجان بودند. این افراد با پر کردن فرم رضایت نامه وارد مطالعه شدند و در پرسش نامه دیگر اطلاعات فردی شامل سن، جنس، مصرف دخانیات و مواد مخدر، مصرف مشروبات الکلی، شاخص توده بدن (BMI)، سابقه کار و محل کار ثبت شد و تا جای ممکن سعی شد موارد ذکر شده در پرسشنامه در هر دو گروه، یکسان سازی شود.

از افراد مورد مطالعه ۱۰ میلی لیتر خون به صورت ناشتا (۱۲ ساعت) گرفته شد و به سه قسمت به صورت زیر تقسیم شد. ابتدا دو میلی لیتر از آن برای تخلیص mRNA درون لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) منتقل شد، یک میلی لیتر آن جهت اندازه گیری WBC، RBC درون لوله‌های CBC ریخته شد و بقیه آن برای آزمایشات بیوشیمیایی درون لوله‌های آزمایش منتقل شد و به صورت لخته در آمد.

ابتدا بلافاصله خون درون لوله‌های CBC جهت تعیین تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با دستگاه کولومتر سنجیده شد.

برای جداسازی سرم: خون لخته شده به مدت ۱۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰rpm قرار داده شد و سپس ماده شفاف رویی آن توسط سمپلر برداشته و درون تیوپ ریخته و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای انجام آزمایشات نگه داری شد (۳۱).

آنزیم‌های: ترانس آمینازها (ALT و AST)، آلکالین فسفاتاز به وسیله دستگاه اتوانالایزر BT-3000 اندازه گیری شدند. همچنین CRP به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص mRNA از خون و سنتز cDNA استخراج Total RNA سلولی به صورت مستقیم از خون کامل (درون لوله‌هایی حاوی مواد ضد انعقاد بود) با استفاده از کیت

نتایج

افزایش یافته بود، در حالی که میزان ALP در این افراد نسبت به گروه کنترل مطابق با جدول شماره ۲ کاهش یافته است. در این مطالعه تعداد گلبول‌های سفید و قرمز افراد در معرض آلودگی و همچنین گروه کنترل نیز مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۳) که تعداد گلبول سفید و گلبول قرمز به صورت معنی داری در گروه در معرض نسبت به کنترل افزایش یافته است. CRP

در این تحقیق ۹۰ نفر مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل دو گروه ۴۵ نفری بودند. گروه اول شامل افرادی که در معرض مستقیم آلودگی قرار داشتند و گروه دوم را کارگران علوم پزشکی شهرستان رفسنجان تشکیل دادند. مشخصات دموگرافیک افراد شرکت کننده در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: مشخصات دموگرافیک افراد شرکت کننده در مطالعه

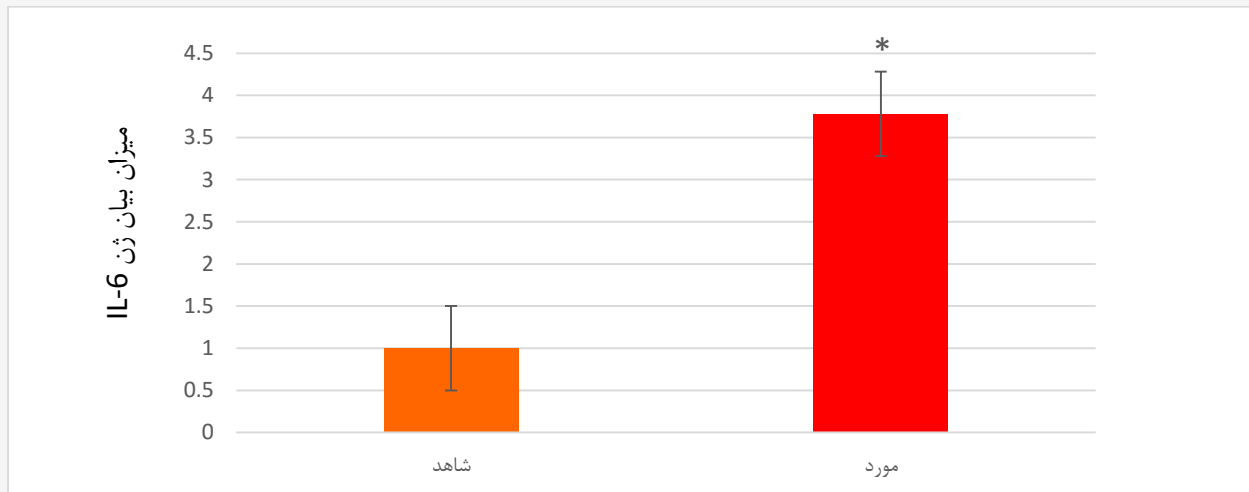
شاخص	افراد در معرض آلودگی	افراد گروه کنترل	P value
*سن (سال)	۵/۶±۳۹/۹	۶/۶±۴۰/۵	۰/۲۰
*BMI (کیلوگرم بر مترمربع)	۲/۶±۲۵/۳	۳/۱±۲۵/۱	۰/۶۱
*سابقه کاری (سال)	۴/۱±۱۵/۴	۱۶/۹±۶/۱	۰/۰۸
**استفاده از دخانیات (درصد)	۶ نفر (۱۳٪)	۶ نفر (۱۳٪)	۰/۹۵

نیز به صورت کیفی بررسی شد و مشخص شد که تست همه افراد در هر دو گروه منفی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر که بر روی کارگران شاغل در کارخانه مس

در این مطالعه بیان دو ژن P53 و IL6 در افرادی که در معرض آلودگی صنعتی و افراد کنترل مورد بررسی قرار گرفت (مطابق با نمودار ۱ و ۲). آزمون مقایسات (Mann whitney –test) بیان در هر دو ژن به صورت معنی داری افزایش یافته بود.

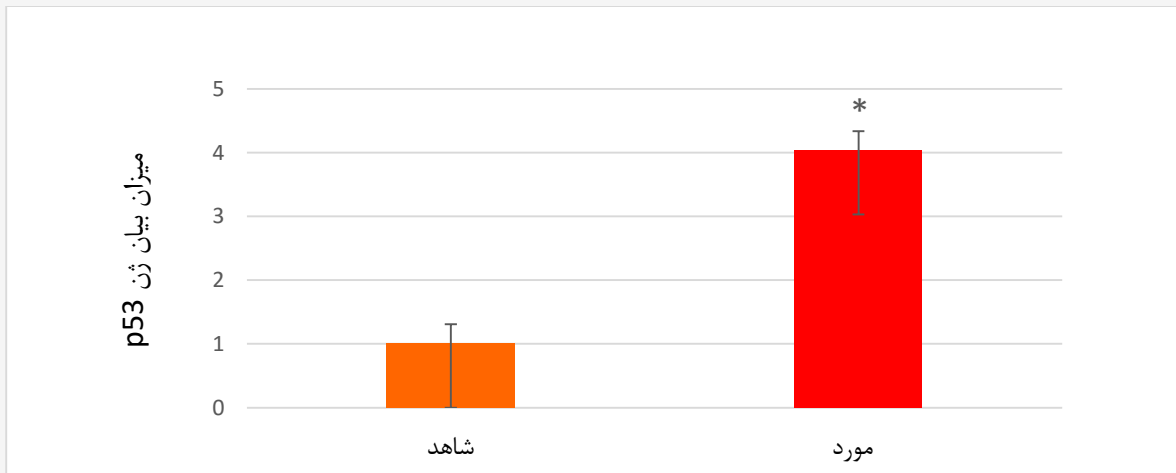


نمودار ۱: مقایسه میانگین بیان ژن IL6 در گروه مورد و کنترل

*P<0.05 IL6=0.0037 p-value, معنی دار است.

صنعتی رفسنجان انجام شد. مشاهده گردید که میزان بیان ژن‌های P53 و IL6 در سلول‌های خونی این افراد نسبت به گروه

همچنین مقایسه آنزیم‌های کبدی بین دو گروه انجام شد که ALT و AST در سرم افراد در معرض آلودگی نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲: مقایسه میانگین بیان ژن P53 در گروه مورد و شاهد

* P-value p53=0.00, P<0.05 معنی دار است

کنترل افزایش داشته است. از آن جایی که در مطالعات قبلی مشخص شده که افرادی که در ارتباط مستقیم با آلودگی هستند می‌تواند احتمالاً خطر بروز سرطان و سایر بیماری‌های التهابی را افزایش دهد. نسبت مس به روی در پلاسما به عنوان یک بیومارکر

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در افراد کارگر در مجتمع مس با گروه کنترل

P value	میانگین و انحراف معیار گروه کنترل	میانگین و انحراف معیار گروه مورد	آنزیم‌های کبدی
۰/۸۴	۱/۴±۲۸/۸	۱/۵±۲۹/۹	AST (Unit)
۰/۱۵	۹/۶± ۳۳/۰	۳/۵±۳۸/۷	ALT (Unit)
۰/۲۴	۸/۹±۲۲۹/۹	۴۱/۹±۲۵۵/۵	ALP (Unit)

جدول ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار اندیس‌های خونی در افراد کارگر در مجتمع مس با گروه کنترل

P value	میانگین و انحراف معیار گروه کنترل	میانگین و انحراف معیار گروه مورد	اندیس خونی
۰/۰۰۱	۰/۲± ۶/۲×۱۰ ^۳	۰/۰± ۶/۲۹×۱۰ ^۳	گلبول سفید* (تعداد در میکرولیتر)
۰/۰۰۹	۰/۰± ۵/۲۳×۱۰ ^۶	۰/۰± ۵/۲۶×۱۰ ^۶	گلبول قرمز* (تعداد در میکرولیتر)

* میزان P-value < 0.05 به صورت معنی دار است

هشدار دهنده در تمام مرگ و میرها در افراد سالخورده می‌باشد به طوری که یک ارتباط مستقیم بین مارکرهای التهاب (IL-6, CRP) و نسبت مس به روی در پلاسما وجود دارد (۳۷). مس به عنوان یک عنصر کمیاب در بدن دارای نقش‌های حیاتی گوناگونی می‌باشد. مس در مقادیر کم باعث افزایش تجمعات گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در داخل سلول می‌شود که

غلطت بعضی از عناصر در خون آن‌ها افزایش می‌یابد. مطابق با پژوهشی که ما در این زمینه انجام دادیم مشخص گردید که افرادی که در معرض مستقیم با آلودگی هستند، غلظت مس و مولیبدن در آن‌ها افزایش یافته است (۶). ما در این مطالعه، ارتباط بین آلودگی صنعتی و پروتئین P53 در بدن را مورد بررسی قرار دادیم که مشخص شد میزان بیان پروتئین P53 افزایش یافته که



دیده شده در مطالعه Arsalane و همکاران نیکل هیدروکسی کربنات باعث افزایش اینترلوکین ۶ و TNF-alpha در ماکروفاژها می‌شود (۴۶)، در این مطالعه همچنین نشان داده شد که تماس مستقیم با آلودگی صنعتی باعث افزایش تعداد گلبول سفید و قرمز نیز می‌شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ انجام شده نشان می‌دهد که آلودگی با بنزن باعث کاهش RBC می‌شود ولی اثری بر میزان WBC ندارد (۴۷) که نتایج آن متفاوت با نتایج به دست آمده در این تحقیق بوده است و دلیل آن را می‌توان به نوع آلودگی عناصر کمیاب ربط داد.

افزایش در میزان ALT, AST و کاهش میزان ALP از دیگر یافته‌های این مطالعه است که در افراد در معرض تماس مستقیم و بیش از اندازه مس نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. تست‌های عملکرد کبد (ALT, AST, ALP) ابزار خوبی برای شناسایی اختلال در کبد هستند. مطالعات زیادی در رابطه با آلودگی عناصر کمیاب انجام شده که از میان آن‌ها می‌توان به سرب، کادمیوم و آرسنیک اشاره کرد که موجب افزایش سطح آنزیم‌های کبد می‌شود و در نهایت منجر به آسیب بافتی کبد می‌گردد (۲۹-۳۰) که این با نتایج ما تقریباً هم خوانی دارد. در این مطالعه می‌توان افزایش سطح ALT و AST را در سرم افراد در معرض مستقیم آلودگی مشاهده کرد تا اینجا با سایر مطالعات هم خوانی دارد اما کاهش ALP برخلاف مطالعات قبلی بوده که احتمالاً این متغیر وابسته به نوع آلودگی متفاوت است.

مطالعات فراوانی در زمینه آلودگی با عناصر کمیاب انجام شده ولی تا کنون در این مورد تحقیقی صورت نگرفته است که این مساله نقطه قوت این پژوهش است. یکی از مواردی که باید در مطالعات دیگر به آن پردازند جمع آوری نمونه از نقاط مختلف کارخانه‌هاست، همچنین بررسی سایر فاکتورهای التهابی و سرطانی در افراد در معرض آلودگی است، تا بتوان از بروز بیماری‌های خطرناک جلوگیری کرد.

با توجه به مطالعه صورت گرفته می‌توان به این نتیجه رسید که آلودگی عناصر کمیاب که جزئی از آلودگی صنعتی محسوب می‌شود، عوارض بیولوژیکی فراوانی از جمله موارد مورد مطالعه در اینجا را مستقیماً تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق افزایش بیومارکرهای ALT, AST, WBC, RBC و کاهش ALP در سرم افراد در معرض آلودگی مشاهده شد. همچنین میزان بیان ژن‌های

این تجمعات باعث از بین رفتن میکروبوها و در نهایت منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌گردد. تجمعات مس با ایجاد گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن باعث آسیب DNA و متعاقب آن فعال‌سازی پروتئین P53 و مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌گردد. در سوی مقابل مقادیر افزایش یافته مس در بدن با مکانیسمی متفاوت باعث جابجایی نامناسب عنصر روی در جایگاه خود بر روی پروتئین P53 و ایجاد موتاسیون در این پروتئین می‌شود. موتاسیون در پروتئین p53 موجب بسته بندی نامناسب و اختلال عملکرد این پروتئین شده و منجر به افزایش خطر ابتلا به نئوپلاسم می‌گردد (۳۸). در این پژوهش میزان P53 افزایش یافته و دلیل آن را می‌توان یک عکس العمل از طرف بدن در برابر آلودگی صنعتی بیان کرد زیرا در صورتی که آسیب به DNA افزایش یابد سلول برای رفع این آسیب دیدگی میزان P53 را افزایش داده تا القای آپوپتوز ایجاد شود. در مقاله‌ای که میزان P53 در کارگران در معدن ذغال سنگ اندازه گیری کردند آن‌ها هم با افزایش بیان این ژن در افراد در معرض رو به رو شدند (۳۹). از سویی دیگر محققان با تحقیق بر روی سایر عناصر کمیاب این نتایج ارائه کردند که افزایش آرسنیک ممکن است باعث القای متیل سیتوزین ترانسفراز شود که با افزایش mRNA آنزیم همراه است این دلیل هایپرمتیلاسیون اولیه را توجیه می‌کند و باعث افزایش بیان p53 می‌شود از سوی دیگر تماس طولانی مدت با آرسنیک باعث نقص در SAM که به دلیل مصرف بیش از اندازه گروه‌های متیل توسط آرسنیک و یا عدم وجود گروه‌های متیل که باعث کم شدن سیتوزین‌های متیله می‌شود و به دنبال آن هیپومتیلاسیون ایجاد می‌شود (۴۰-۴۲) و همچنین گفته شده که کبالت و نیکل باعث مهار باند شدن p53 به DNA تک رشته می‌شوند (۴۳). ترکیب کبالت کلرید باعث القای گونه‌های اکسیژن (ROS) و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۴۴). مطالعه‌ای در هند بر روی کارگران پمپ بنزین و اثر آلودگی بنزین بر بیان p53، نتایج آن‌ها نیز مشابه نتایج به دست آمده در اینجا ارائه شده است (۴۵).

این مطالعه به وضوح افزایش معنی دار IL-6 را در افراد در معرض آلودگی نسبت به افراد کنترل بیان می‌کند که نشان دهنده پیش آگهی بد از بروز بدخیمی‌ها و افزایش میزان مرگ و میر در افراد در معرض ترکیبات مس در مقادیر زیاد می‌باشد. همچنین



مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و هم چنین از اساتید محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و بیرجند که در انجام این طرح ما را یاری کردند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

IL-6 و P53 در خون این افراد نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت که احتمال ایجاد برهم کنش‌های نامتعارف و خطر بروز اختلالات و بدخیمی‌های مرتبط را افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

مقاله فوق نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مشترک دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و بیرجند می‌باشد. بدین وسیله از حمایت

References

1. Ogundiran O, Afolabi Lodovici T, Bigagli E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol*. 2011;1:(1).
2. Heinsohn R.J, Kabel R.L. Sources and control of Air pollution, Prentice Hall New Jersey. 1999: P: 652-666.
3. WHO (1987) Air quality guidelines for Europe, WHO Regional publication series 23/PP 315-323, 338-333. available from <http://www.environmentalhealth.ir/116>.
4. Fleisch A, Wright R, Baccarelli A. Environmental epigenetics: a role in endocrine disease? *J Mol Endocrinol*. 2012;49(2):R61-R7.
5. Naghibhoseini F, KHoshdel Z, Moradisarabi M, SHOjaee S, GHaderi A. Association of serum copper and zinc levels with colorectal cancer. *Feyz*. 2012;16(7):631-2.
6. Hajizade M, Gholamhoseinian A, Khaksarii M. Measurement of the serum level of copper, molybdenum and lipids in personnel of copper complex of sarcheshmeh(kerman). *J Med Sci.Qazvin University*.2004;(32)61-67.
7. Chan S, Gerson B, Subramaniam S. The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. *Clin Lab Med*. 1998;18(4):673-85.
8. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003;68:167-82.
9. Sinden N, Stockley R: Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* 2010, 65:930-936.
10. Mukae H, Hogg JC, English D, Vincent R, VanEeden S: Phagocytosis of particulate air pollutants by human alveolar macrophages stimulates the bone marrow. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol*2000, 279: L924-L931.
11. Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg J, VanEeden S: Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155:1441-1447.
12. Terashima T, Klut ME, English D, Hards J, Hogg J, VanEeden S: Cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in lung microvessels. *Am J Respir Cell Mol Biol*1999, 20:171-177.
13. Van Eeden S, Tan W, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg J: Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:826-830.
14. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol*. 2011 10;283(2-3):65-87
15. Daniel K, Chen D, Orlu S, Cui Q, Miller F, Dou Q. Clloquinol and pyrrolidinedithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005;7(6): R897-R908.
16. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(1):32-46.
17. Almeida L, Custodio A, Pinto G, Santos M, Almeida J, Clara C, et al. Polymorphisms and DNA methylation of



- gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet Mol Res.* 2009; 8(1):8-18.
18. Formigari A, Gregianin E, Irato P. The effect of zinc and the role of p53 in copper-induced cellular stress responses. *J Appl Toxicol.* 2013;33(7):527-36.
19. Garbers C, Thaiss W, Jones G, Waetzig G, Lorenzen I, Guilhot F, et al. Scheller J Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem* 286: 42959–42970
20. Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung.* 2008; 186:403–409.
21. Chakravarti N, Myers J, Aggarwal B. Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane). *Int J Cancer.* 2006; 119(6):1268–75.
22. Duffy S, Taylor J, Terrell J, Islam M, Li Y, Fowler K, Wolf G, Teknos T. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer.* 2008;113(4):750–7.
23. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2003; 197(2):157–68.
24. Bromberg J, Darnell J. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 2000; 19(21):2468–73.
25. Oliveira M, Fraga C, Gomez R, Paula A. Immunohistochemical expression of interleukin-4, -6, -8, and -12 in inflammatory cells in surrounding invasive front of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2009; 31(11):1439–46.
26. Wang Y, Chang S, Tai S, Li W, Wang L. Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2002; 24(9): 850–8.
27. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(17):5426–34.
28. Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Omura K, et al. Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 2010 ;176(2):968–8
29. Goswami K, Gachhui R, Bandopadhyay A: Hepatorenal dysfunction in lead pollution. *J Environ SciEng* 2005, 47(Suppl 1):75–80.
30. Ikeda M, Zhang Z, Shimbo S, Watanabe T, Nakatsuka H, Moon C, Matsuda-Inoguchi N, Higashikawa K: Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia. *Sci Total Environ.* 2000, 249(Suppl 1–3):373–384.
31. Nandana D, Somnath P, Debmita C, Nilanjana B, Niladri S, Tanmoy J, Saptarshi B, Papiya Majumder, Apurba K Bandyopadhyay, J Christopher States and Ashok K Giri. Arsenic exposure through drinking water increases the risk of liver and cardiovascular diseases in the population of West Bengal, India. *BMC Public Health.* 2012, 12:639.
32. Hanova M, Vodickova L, Vaclavikova R, Smerhovsky Z, Stetina R, Hlavac P, Naccarati A, Slyskova J, Polakova V, Soucek P, Kumar R, Hemminki K, Vodicka P. DNA damage, DNA repair rates and mRNA expression levels of cell cycle genes (TP53, p21(CDKN1A), BCL2 and BAX) with respect to occupational exposure to styrene. *Carcinogenesis.* 2011;32(1):74-9.
33. Stenger C, Naves T, Verdier M, Ratinaud MH. The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol.* 2011;39(3):601-9.
34. Méplan C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31663-70.
35. Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer.* 1983;52(5):868-72.
36. Li X, Luo Q, Li J, Wei C, Kong X, Zhang J, et al. Clinical significance of NOB1 expression in breast infiltrating ductal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2013;6(10):2137.
37. Marco maloavolta ea. Plasma copper/zinc ratio : An inflammatory/nutritional biomarker as predictor of all cause mortality in elderly population. *biogerontology.* 2010;11(3):309-19.
38. Formigari A , Irato P. The effect of zinc and the role of p53 in copper-induced cellular stress response. *J Appl Toxicol.* 2013;33(7):527-36.
39. Zhang Q, Zhou F, Yao W, Zhao YB, Li ZY, Xu YB, Wu YM [Effect of coking oven emissions on level of serum oxidation reduction and peripheral white blood cell ar ras P21 and P53 in coke oven workers]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing ZaZhi.* 2008;26(4):212-4.



40. Mass M, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997;386(3):263-77.
41. Salazar A, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat Res.* 1997;381(2):259-65.
42. Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, et al. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):431-7.
43. Palecek E, Brázdová M, Cernocká H, Vlk D, Brázda V, Vojtesek B. Effect of transition metal ions on binding of p53 protein to supercoiled DNA and to consensus sequence in DNA fragments. *Oncogene.* 1999;18(24):3617-25.
44. Stenger C, Naves T, Verdier M, Ratinaud M. The cell death response to the ROS inducer cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol.* 2011;39(3):601, .
45. Uzma N, Kumar B, Hazari M. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *Am J Ind Med.* 2010;53(12):1264-70.
46. Arsalane K, Gosset P, Hildebrand HF, Voisin C, Tonnel AB, Wallaert B. Nickel hydroxy carbonate increases tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 secretion by alveolar macrophages. *J Appl Toxicol.* 1994;14(5):375-9.
47. Dong-Hee k, Hee-Kyung J, Sang-Gil L, Hyang-Woo R. The relationship between low-level benzene exposure and blood cell counts in Korean workers. *Occup Environ.* 2015;72(6):421-7.



Original Article

Evaluating Blood Parameters and P53 and IL6 Gene Expression in Personnel of Copper Complex in Comparison with Control Group

Ahmadi Rad H¹, Hemmati M², Mahmoudi M¹, Sayadianari A³, Mirzaee M¹, Khoshdel A⁴, Amiri M⁵,
MohammadainShahrbabaki F¹, Hajizadeh MR^{1*}

1- Molecular medicine research center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

2- Department of Clinical Biochemical, Medical School, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

3- Social Determinants of Mental Health Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

4- Department of Clinical Biochemical, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

5- Department of Clinical Biochemical, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 16 Aug 2015

Accepted: 05 Oct 2015

Abstract

Background & Objectives: Industrial pollution including trace elements is the ability to exert many biological effects such as cancer and inflammatory diseases on humans. Therefore, in this study, some of the inflammation and cancer awareness factors such as P53 and IL6 and some blood indices are examined along with trace elements to which people are normally exposed.

Materials & Methods: The population includes 45 workers subjected to trace elements who are studied in comparison with the control group with some biochemical parameters such as WBC, RBC, and CRP. In addition, gene expressions of p53 and IL6 are measured by Real time PCR technique.

Results: The results show that the gene expressions of IL6 and P53 increases significantly (P –Value p53=0.00, IL6=0.0037). Furthermore, the number of red and white blood cells demonstrate a substantial upsurge. The level of liver enzymes of ALT and AST grows. Additionally, ALP reduces and CRP is negative in all the subjects. (P = 0.001).

Conclusion: The results confirm that industrial pollution is able to induce some changes in gene expressions of P53, IL6, and some blood parameters. It may create serious risks for people who will be exposed to pollution in the future.

Keywords: Industrial pollution, Trace elements, IL6, P53

*Corresponding author: Mohammad Reza Hajizadeh, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
Email: hajizadehus@yahoo.com