تأثير مزيج كبريتات النحاس المائية وحامض الاسكوربك على الخلايا السرطانية

سلمان علي احمد*، عبد علي ذاكر ورشيد محمد رشيد*****

*** كلية العلوم/ جامعة النهرين**

**** كلية العلوم/ جامعة الأنبار**

***** كلية التربية/ جامعة الأنبار**

الخلاصة

يعد هذا البحث دراسة استكشافية لفعالية مزيج كبريتات النحاس المائية وحامض الاسكوربك في التأثير على نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وقد تضمنت الدراسة اختبار الفعالية السمية لهذا المعقد في كل من الخط السرطاني Human Epidermoid Larynx والخط السرطاني Ahmed- Mohammed – Mammary adenocarcinoma. تم استخدام أربعة تراكيز من المعقد 62.5 و125 و250 و500 مايكروغرام/ مليلتر ولفترتي تعريض 24 و48 ساعة وكانت النتائج كالآتي:

ا ذ التأثير المعنوي لهذا المزيج ابتدأ منذ المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر بالنسبة لنوعي الخطوط الخلوية السرطانية في مدتي التعريض ونجد ان جميع التأثيرات كانت معنوية خلال مدتي التعريض للخط الخلوي السرطاني Hep-2 فيما لم تكن كذلك بالنسبة للخط الخلوي السرطاني Amn3 كذلك فان التأثير السام لهذا المزيج كان في تزايد مع ازدياد الجرعة والزمن مما يشير إلى ظاهرة الاعتماد على الجرعة والزمن.

Cytotoxic effect of mixture of copper sulphate and ascorbic acid on Cancer cell lines

S. A. Ahmed*, A. A. Thaker and R. M. Rasheed*****

***College of Science\University of Al- Al-Nahryn**

****College of Science\University of Al-Anbar**

*****College of Education\University of Al-Anbar**

Abstract

This research aims to explore the *in vitro* antitumor activity of a mixture of copper sulphate and ascorbic acid. The investigation of the cytotoxic effect of the prepared compound on different cell lines, Ahmed- Mohammed (Mammary adenocarcinoma) and Human Epidermoid Larynx), in four concentrations: (62.5, 125, 250 and 500 µg/ml), with two exposure times (24 and 48 hrs). The results were as the following:

Copper sulphate and ascorbic acid mixture: The effect of this mixture started with the first addition of (62.5 µg/ml) to the two different cell lines in the two exposure periods where all effects were considerable for the cell line Hep-2 whear as there is no effect on the cell line Amn3 in addition to the cytotoxic effect for this mixture is directly proportional to dose and time.

المقدمة

يعد حامض الاسكوربك أو فيتامين C من الفيتامينات الذائبة في الماء ومضادا للأكسدة البايولوجية، وهو ثابت في المحاليل الحامضية لكنه حساس جداً تجاه الأكسدة التي تتسارع بوجود ايون النحاسيك وعند ارتفاع درجات الحرارة وكذلك عند التعرض للهواء أو الضوء(1).

يتواجد هذا الحامض بشكلين رئيسيين هما الشكل المختزل والشكل المؤكسد وكلا الشكلين لهما القدرة في التأثير على نمو الخلية من خلال إحداث تغيير في عملية التكاثر الخلوي أو/و الحث على موت الخلية في مختلف الأنظمة الخلوية (2). ويعد حامض الاسكوربك أساسياً في العديد من الأنسجة الحية (2). إذ يلعب أدواراً بيولوجية مهمة فهو عامل مضاد للأكسدة ويعمل كاسحاً لأصناف الأوكسجين الفعالة (3) كما انه يشترك كأنزيم مساعد في بعض التفاعلات ويلعب دوراً فعالاً في الحد من تطور بعض الأمراض فهو يحمي الجهاز الوعائي القلبي من آفات تصلب الشرايين ويعمل على منع تجمع الصفيحات الدموية مع بعضها ويعجل التئام الجروح (4) ولحامض الاسكوربك تأثير مضاد للهستامين ويساعد في تكوين أملاح الصفراء في الكبد فضلاً عن إزالة التأثير السام للكحول(5) وله أيضاً دور مهم في عملية بناء البروتين المسمى Collagen (6) وتكوين وصيانة المواد ما بين الخلايا التي تربط خلايا العظام والأسنان وجدران الشعيرات الدموية وان نقص هذا الفيتامين يؤدي إلى الإصابة بداء الإسقربوط Scurvy(6).

كما ويعد النحاس واحداً من العناصر النادرة الأساسية التي تؤدي أفعالا مهمة في ايض الإنسان والحيوان والنبات فهو يدخل في تركيب العديد من العناصر المغذية الأساسية والعديد من الأنزيمات ويشترك في حماية أغشية الخلايا من التلف لكونه واحداً من العوامل المضادة للأكسدة (7) وله دور مهم في ايض الدهون ونمو العظام ونضج الأنسجة الضامة إضافة إلى دوره في ايض الحديد من خلال تحفيز عملية تحويل الحديديك إلى حديدوز مما يسهل من امتصاصه من قبل الأمعاء. ان لايونات النحاس Cu^{+2} أثراً مهماً تحققه في ثباتية النظام الحشوي النووي وانطواء الحمض النووي DNA (8). ان تراكم ايونات النحاس يحث على مسار موت الخلية من خلال إحداث الضرر في الحمض النووي DNA وفعالية الـ P53 (9). الهدف من البحث متابعة تأثير المزيج أعلاه على خطين من الخطوط السرطانية خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

- **تحضير مزيج من كبريتات النحاس المائية وحامض الاسكوربك.**

تم وزن غرام واحد من Ascorbic Acid ومزج مع 1.98 غرام من كبريتات النحاس المائية $CuSo_4 . 5H_2o$ بشكل جيد حيث تم استخدام المزيج كعلاج كيميائي بالمشاركة Combination Chemotherapy.

- **الزرع النسيجي.**

تم تحضيره وفقا لطريقة (10) الخاصة بالزرع النسيجي. أما الوسط الزرعي (RPMI-1640) Rosswell Pork Momeral Institute فقد احتوى المواد الآتية:

RPMI-1640 with hopes buffer, L-glutamin	10.4 غرام
Crystaline Penecillin	0.5 مليلتر = 100000 i.µ.
Streptomycin	0.5 مليلتر = 0.1 غرام
Bovine Calf Serum	%10
Sodium bicarbonate (%4.4)	دليل الأس الهيدروجيني (7.2)

أكمل الحجم إلى لتر بإضافة الماء المقطر مزدوج التقطير، ثم عقم بمرشح ذو ثقوب بقطر (0.22) مايكرون.

- **المضادات الحيوية.**

أذيبت مكونات عبوة Benzyl Pencillin بسعة 1000000 i.µ في 5 مليلتر من الماء المقطر، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر (100000 i.µ.)، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة – 20 ْم.

أذيبت عبوة واحدة من الـ Streptomycin سعة 1 غم في 5 مليلتر من الماء المقطر، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة – 20 ْم.

- **الخطوط الخلوية Cell Lines.**

1- الخط الخلوي السرطاني Human epidermoid Larynx Carcinoma (HeP-2)

وهو خلايا سرطان الخجرة لر جل يبلغ من العمر 57 سنة، وهذا الخط تم تطعيبه ُ للنمو على وسط RPMI-1640 المجهز بـ 10% مصل العجل البقري.

2- الخط الخلوي السرطاني Ahmed-Mohammed-Nahi-(AMN-3).

وهو سرطان الغدة اللبنية (Mammary adenocarcinoma) لإناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي (*In vivo* Spontaneous mammary adenocarcinoma).

- **اختبار سمية المواد الكيميائية والمستخلص النباتي على نمو الخطوط الخلوية السرطانية.**

تم تحضير المحاليل وفقا لطريقة Abdul-Majeed (11).حضر ت كل من المركبات المستعملة عن طريق إذابة 0.02 غرام من المركب في 10مللتر من المذيب{الوسط SFM +Dimethyl sulf oxide (DMSO)} ثم عقمت باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وحضرت منه أربع تراكيز مختلفة هي (500،250،125،62.5) مايكروغرام/ مليلتر وتحت ظروف معقمة. استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير.

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم^2 بمحلول التربسين/ فرسين ثم أضيف له 20 مليلتر من الوسط الزرعي الجديد من المصل (SFM). ثم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة جيدة إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة أوتوماتيكية، بحيث احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (1×10^5 خلية/حفرة). بعد ان تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue). ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 ْم لمدة تتراوح بين 12–18 ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وتم إضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقا وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز كما تم عمل ثلاث مكرر ات للسيطرة. وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 ْم في حاضنة مزودة بـ 5% من غاز ثاني اوكسيد الكربون.

بعدمرور مدة التعر يض المحددة للحضن. اخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه 50مايكرو ليتر من محلول صبغة الأحمر المتعادل وأعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة ليحضن ساعتين بعدها اخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة، إذ ان الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها. بعد ذلك أضيف لكل حفرة 50 مايكرو ليتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي المحمض بالايثانول المطلق بنسبة (1:1) (محلول استخلاص الصبغة)، إذ يقوم هذا المحلول باستخراج الصبغة من الخلايا الحية التي كانت قد أخذت الصبغة.قر أ ت النتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر.

تم إجراء التحليل الإحصائي بإيجاد قيمة اقل فرق معنوي عند مستوى احتمالية 5% للمقارنة ما بين المتوسطات لعاملي التركيز والوقت.

النتائج

- **الخط الخلوي السرطاني Hep – 2:**

الجدول رقم (1) يوضح نتائج التأثير السمي لمزيج حامض الاسكوربك وكبريتات النحاس المائية على نمو خلايا الخط السرطاني Hep – 2. وتبين النتائج ان التأثير المعنوي لهذا المزيج ظهر مع أول معاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدتي التعريض. وا ذ أفضل تأثير معنوي ظهر في المدة 48 ساعة عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر فيما كان اقل تأثير معنوي ظهر خلال المدة 24 ساعة مع المعاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر. وا ذ التأثير المعنوي كان في ازدياد مع ازدياد التراكيز المستخدمة خلال مدة التعريض 24 ساعة، وهي كذلك خلال مدة التعريض الثانية بالمقارنة مع قيم السيطرة.

ويتضح من خلال نتائج التحليل الإحصائي ان خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep– 2 كانت أكثر تأثراً بالتراكيز المستخدمة في مدة التعريض 48 ساعة بالمقارنة مع مدة التعريض 24 ساعة وان الفرق بينهما كان معنوياً . وان التراكيز المستخدمة كانت ذات تأثير معنوي وان هذا التأثير ازداد تدريجياً مع ازدياد التركيز إذ كان أفضل هذه التأثيرات عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر.

جدول (1) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Hep – 2 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من حامض الاسكوربك + كبريتات النحاس المائية خلال مدتي التعريض 24 و48 ساعة

متوسطات الكثافة الخلوية			تركيز Ascorbic acid + Copper Sulphate Penta hydrate مايكرو غرام/ مليلتر
$\overline{X}_c$	48	24	
0.549	0.516	0.583	0
0.349	0.241	0.458	62.5
0.273	0.128	0.419	125
0.190	0.051	0.330	250
0.081	0.044	0.119	500
	0.196	0.381	$\overline{X}_t$

L. S. D. P ≥ O.O5 T * C= 0.03101 C= 0.02193 T= 0.01387

- **الخط الخلوي السرطاني Amn3.**

الجدول رقم (2) يوضح نتائج التحليل الإحصائي لتأثير التراكيز المختلفة من حامض الاسكوربك وكبريتات النحاس المائية في تثبيط نمو خلايا الخط الخلوي Amn3 خلال مدتي التعريض 24 و48 ساعة.

جدول (2) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Amn_3 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من حامض الاسكوربك + كبريتات النحاس المائية خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة

متوسطات الكثافة الخلوية			تركيز Ascorbic acid + Copper Sulphate Penta hydrate مايكرو غرام / مليلتر
$\overline{X}_c$	48	24	
0.179	0.176	0.182	0
0.125	0.109	0.142	62.5
0.080	0.054	0.106	125
0.066	0.066	0.067	250
0.078	0.111	0.045	500
	0.103	0.108	$\overline{X}_t$

L. S. D. P ≥ O.O5 T * C= 0.008470 C= 0.005989 T= 0.003788

ويظهر من النتائج ان التأثير المعنوي لهذا المزيج بدأ من المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدتي التعريض، وان أفضل تأثير معنوي تحقق عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض 24 ساعة واقل تأثير معنوي عند المعاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الأولى 24 ساعةأيضاً . ان جميع الفروق كانت معنوية ما بين التراكيز المستخدمة في مدة التعريض الأولى 24 ساعة. في ما لم تكن كذلك خلال مدة التعريض الثانية 48 ساعة إذ كان التأثير المعنوي في تزايد لغاية المعاملة الثانية 125 مايكروغرام/ مليلتر.

وعند المقارنة ما بين التأثيرات التي أحدثتها هذه التراكيز المختلفة خلال مدتي التعريض نجد أنها كانت أكثر تأثيراً في مدة التعريض الثانية 48 ساعة بالمقارنة مع مدة التعريض الأولى 24 ساعة وان الفرق بينهما كان معنوياً .

وفيما يخص التراكيز المستخدمة نجد أنها كانت ذات تأثير معنوي وا ذ هذا التأثير ازداد تدريجياً مع ازدياد التركيز إلى حد المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر.

المناقشة

توصل الباحث Sartorelli لأحد الأسس المهمة في عملية العلاج الكيميائي للسرطان ألا وهو مفهوم التعاضد أو التآزر Synergism ما بين الأدوية المختلفة والتي تعمل على طرق استقلابية مختلفة أو أنها تعمل على مواقع مختلفة داخل الخلية (12) وهو ما يعرف اليوم بالمعالجة الكيميائية بالمشاركة Combination Chemotherapy والتي تتضمن استخدام أكثر من دواء واحد في معالجة الخلية السرطانية وتستند على مجموعة مبادئ أساسية منها استخدام أدوية تختلف في ميكانيكية عملها مع الاختلاف في نوع السمية التي تحدثها ووقت حدوثها إ نها تكون سامة ان استخدمت لوحدها، وباستخدام هذه المبادئ أصبح من الممكن نظرياً إحداث الهجوع التام بالمعالجة الكيميائية بالمشاركة.

وفي هذه الدراسة تم الجمع ما بين حامض الاسكوربك وكبريتات النحاس المائية ودراسة تأثيرها المثبط لنمو خلايا الخطوط السرطانية كنوع من أنواع المعالجة الكيميائية بالمشاركة.

اظهر فيتامين C القدرة على تثبيط النمو في مختلف الخلايا البشرية السرطانية وحث مسار الموت المبرمج(1) وتثبيط عملية بناء البروتين والحمض النووي DNA مما أد د إلى انخفاض أعداد الخلايا العيوشة Viability ومنع تكوين مركبات N- nitroso Compounds (NOCs) و reactive oxygen metabolites (ROM)(1).

ان تكون وانتشار الخلايا السرطانية يتزامن مع تخريب الحشوة الخارج خلوية Extra Cellular matrix (ECM) بواسطة الأنزيمات المسماة Matrix Metalloproteinase (MMPs). وترتبط عدائية الورم وانتشاره مع فعالية هذه الأنزيمات ويعتقد ان بعض المغذيات ومنها حامض الاسكوربك يمكن ان تعمل كمثبط طبيعي لعملية تحلل هذه الحشوة (ECM) وذلك من خلال تثبيط أنزيمات(MMPs)وبذلك فهي تعمل على تثبيط نمو الورم وانتشاره (13).

يمتلك فيتامين c القدرة على إيقاف نمو الورم من خلال دوره في تقوية الأنسجة الرابطة المحيطة بالخلايا السرطانية عبر دوره في صناعة مادة الكولاجين Collagen. ومع مزيج من المغذيات فإن فيتامين C تسبب في تثبيط العوامل المهمة في تكوين الأوعية الدموية الجديدة Angiogenesis المغذية للورم ومنها العامل VEGF وهو ما يعرف اليوم بسياسة تجويع الخلايا من خلال حرمانها من الزاد اليومي لنموها عبر تثبيط تكوين الأوعية الدموية الجديدة المغذية للورم (13). يضاف إلى كل هذه التأثيرات كون حامض الاسكوربك ذو فعالية مضادة

للأكسدة بل يعد من أقو ـ مضادات الكرب التاكسدي الناتجة من ازدياد العديد من جذور الأوكسجين الفعالة والتي لها دور سام في العديد من الأمراض ومنها السرطان والشيخوخة(14).

أظهر ت ايونات النحاس القدرة على حث مسار الموت المبرمج من خلال الأضرار التي تحدثها في الحمض النووي DNA(15) إذ ان للنحاس القدرة على الارتباط مع مواقع خاصة في اللولب المزدوج للـDNA مما يؤدي إلى كسر في شريط الـ DNA (16). وان هذه القدرة على الارتباط تكون عالية بالمقارنة مع ايونات أخرى مثل النيكل، الزنك والمغنيسيوم (16). وفي تجارب أخرى لوحظ ان النحاس تسبب في ازدياد التعبير الجيني للجين (RB-1) وهو جين يشفر لبروتين كابح الورموهو بروتين يلعب دوراً مهماً في دورة حياة الخلية ومسار موت الخلية من خلال التحكم بمسار الخلية عبر الطور G وتحفيز التمايز النهائيوا يقاف دورة حياة الخلية (17). يضاف إلى ذلك فإن الجين المشفر للإنزيم المضاد لمسار موت الخلية والمسمى (GPX). Enzyme glutathione peroxidase وجد بمستوى منخفض في الخلايا المعاملة بالنحاس. ا ذ الإنزيم (GPX) يشترك في مسارات مضاد للأكسدة من خلال تحويل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء H_2O ولذلك فإن انخفاض مستوى هذه الخميرة يجعل الخلايا معرضة للهجوم من قبل الجذور الحرة Free radicals و Ros، وهذا مما يزيد من خطورة الأضرار التي يحدثها النحاس في الحمض النووي DNA. ان مجموع هذه التأثيرات السمية لفيتامين c وكبريتات النحاس يمكن ان تفسر هذا التأثير المثبط لنمو خلايا الخطوط السرطانية Hep-2 وAmn3 خلال مدتي التعريض. إذ نلاحظ ان التأثير المعنوي قد بدأ منذ المعاملة الأولى 62.5مايكرو غرام/ مليلتر بالنسبة لنوعي الخطوط وخلال مدتي التعريض ونجد أيضاً ا ذ هذا التأثير المعنوي قد ازداد مع ازدياد التركيز أي ان شدة التأثير السام لهذا المزيج قد ازداد باتجاه التركيز الأعلى وان الخلايا كانت أكثر تحسساً لهذه التراكيز في مدة التعريض الثانية 48 ساعة بالمقارنة مع مدة التعريض الأولى 24 ساعة مما يشير وبقوة إلى ظاهرة الاعتماد على الوقت والتركيز Dose and time dependant أما التباين في شدة التأثير ما بين الخطين فهو ربما يعود إلى الاختلاف في المسار الايضي الذي يسلكه كل نوع من الخلايا بالإضافة إلى اختلاف المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا والذي يؤدي إلى الاختلاف ما بين الخلايا في الاستجابة للمؤثرات التي تتعرض لها الخلايا.

ان طبيعة العلاقة ما بين التراكيز المستخدمة وشدة التأثير السمي للتراكيز المستخدمة بالنسبة لنوعي الخطوط الخلوية هي علاقة عكسية فكلما ازداد التركيز قلت أعداد الخلايا الحية وبمعنى آخر علاقة طردية فكلما زاد التركيز زادت شدة التأثير السمي يستثنى من ذلك فترة التعريض الثانية للخط السرطاني Amn3 إذ استمرت العلاقة عكسية لغاية المعاملة الثانية وهو أمر ربما يعود إلى المقاومة التي تبديها الخلايا تجاه المؤثرات التي تتعرض لها والتي تعرف بالمقاومة المتعددة للأدوية MDR إذ قد يزداد التعبي الجيني Over expression لبعض الجينات المسؤولة عن هذه المقاومة والتي تعد من المشاكل الكبيرة التي تواجه العلاج الكيميائي chemotherapy للعديد من الأمراض ومنها السرطان، ان بإمكان الخلية ان تكون اقل حساسية للدواء في موقع ما من دورة حياتها مما يجعلها أكثر مقاومة له أو من خلال ازدياد قدرتها على ترميم الأذ ـ الذي يصيب الجزيئات الفعالة في الخلية وخاصة الأحماض النووية مما يجعلها أكثر مقاومة لتلك الأدوية.

المصادر

1- Zhang, Z. W.; Abdullahi, M. & Farthing, M. J. G. (2002). Effect of Physiological Concentration of Vitamin C on gastric Cancer Cells Helicobacter. Pylori Gut.,50:165– 169.

2- Brigelius– Flohe, R. & Flohe, L. (1996). Ascorbic acid, cell proliferation, and cell differentiation in culture. subcell Biochem., 25: 83– 107.

3- Ball, B. A.; Medina, V.; Gravancem, C. G. & Baumber, J. (2001). Effect of antioxidant on preservation of motility, Viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. Theriogenology. 56: 577– 589.

4- Wilkinson, I. B.; Meganson, I. L. & Moc Callum, H. (1999). Oral Vitamin C reduces arterial Stiffness and platelet and aggregation in human. J. Cardiovasc. Pharmacol., 34: 690– 693.

5- Frei, B. (1999). On the role of Vitamin C and other antioxidant in atherogenesis and vascular dysfunction . P. S. E. B. M., 222: 196– 204.

6- الدلالي، باسل كامل والركابي، كامل حمودي. (1988). كيمياء الأغذية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

7- Kaplan, L. & Pesce, A. J. (1989). Clinical chemistry. Theory, Analysis and Correlation. 2nd ed. Mosby company, USA.

8- Jayaraju, D. & Anand, K. (2001). Anti Cancer Copper Salicyladoxime Complex inhibits topoisomerase II Catalytic activity. Current Sci., 81, No 7,P. 10.

9- Narayanan, V. S.; Fitch, C. A. & Levenson, C. W. (2001). Tumor Suppressor Protein P53 mRNA and sub – cellular Localization are altered by changes in cellular copper in human HePG2 cells. J. Nutr., 131: 1427– 1432.

10- Freshney, R. I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed.). wiley – Liss, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York.

11- Abdul– Majeed, M. R. (2000). Introduction and Characterization of Su. 99 Plasmacytoma Cell line and its effect on mice Immune response. PhD thesis, Nahrain University.

12- يوسف، محمد عامر الشيخ. (1996). المعالجة الكيميائية للسرطان. منشورات دار علاء الدين. دمشق.

13- Waheed, M. R.; Vadim, I.; Tatiana, K.; Aleksandra, N. & Matthias, R. (2006). Effect of Ascorbic Acid, Lysin, Proline and Green Tea Extract on Human Osteosarcoma cell line MNNG – HOS Xenografts Nude Mice. Med onc. (23) 3:411-417.

14- Niki, E. (1997). Free radicals, Antioxidant and Cancer. In: Higashi, H. O., Sama, T. O., Erao, T. J., watanabe, S. & Yoshikama, T. (Eds.). Food factor for Cancer Prevention Springer-VerLaa, Tokyo, Japan.

15- Sagripanti, J.; Goering, P. L. & Lamanna, A. (1991). Interaction of Copper with DNA and antagonism by other metals. Toxicol. Appl. Pharm., 110: 477– 485.

16- Hickman, E. S.; Moroni, M. C. & Helin, K. (2002). The role of PRB in eye Cancer. J. cell Biochem., 88: 121– 127.

17- Nadine, M.; Tassabehji, W.; VanLandingham. & Gathy, W. L. (2005). Copper Alters the Conformation and transcri-ptional Activity of the Tumor Suppressor Protein P53 in human HePG2 cells. Experimental Biol. Med., 230: 699– 708.