

این مقاله قابل چاپ است

تأثیر هورمون ۱۷-بتا استرادیول بر مقادیر مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم و بافت پستان موش‌های صحرایی، با و بدون پیش‌تیمار با تاموکسیفن

علی محمد رضائی^۱، محمدرضا ولیلو^{۲*}، زعفر قلی‌نژاد^۳

۱ - دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۲ - استادیار گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳ - استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: m.valilou@iau.ac.ir

چکیده

هر چند هورمون استرادیول با اتصال به گیرنده‌های خود (آلفا و بتا) بر روند سرطان‌زایی تأثیر مشهودی دارد، ولی این احتمال وجود دارد که بخشی از اثرات این هورمون به واسطه ایجاد استرس اکسیداتیو حاصل شود. در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر هورمون ۱۷-بتا استرادیول بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در موش صحرایی (مدل حیوانی) پرداخته شد. بدین منظور تعداد ۱۶ سر موش صحرایی به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. پس از عادت کردن به محیط، در مرحله پیش‌تیمار، موش‌های گروه‌های اول و دوم، تاموکسیفن را به مدت یک هفته، هر روز به میزان ۵ mg/kg و موش‌های گروه‌های سوم و چهارم هم به همان مقدار، آب مقطر دریافت کردند. در ادامه و در مرحله تیمار، موش‌های گروه‌های دوم و سوم استرادیول (یک دوز به میزان ۰/۲ mg/kg) دریافت کردند. ۳ روز پس از مرحله تیمار، نمونه‌های سرم و بافت پستان همه موش‌ها جداسازی شده و مقادیر ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde) سرم اندازه‌گیری شد و نمونه‌های بافتی مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استرادیول و تاموکسیفن، تغییرات آسیب‌شناختی در بافت پستان ایجاد نکردند. همچنین، استرادیول نتوانست سبب تغییرات معنی‌دار در مقادیر مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم شود، اما تاموکسیفن سبب افزایش هر دو فاکتور فوق به شکل محسوس گردید، هرچند تغییرات مذکور از نظر آماری معنی‌دار نبودند. از طرف دیگر همبستگی معنی‌داری بین مقادیر مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مشاهده شد ($p < 0/023$). یافته‌های مطالعه حاضر، تأثیر استرادیول بر ایجاد استرس اکسیداتیو در کوتاه‌مدت را تأیید نمی‌کند، ولی در عین حال نمی‌تواند اثر تاموکسیفن بر القای استرس اکسیداتیو را رد نماید.

کلیدواژه‌ها: استرادیول، تاموکسیفن، مالون‌دی‌آلدئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، موش صحرایی.

مقدمه

بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت، در سال ۲۰۲۰ حدود ۲/۳ میلیون مورد سرطان پستان شناسایی شده که از این تعداد، ۶۸۵۰۰۰ مورد منجر به مرگ شده است (Ferlay et al., 2021). عوامل خطر ساز برای بروز سرطان پستان متفاوت می باشند که از بین آن ها می توان به سن بالا، چاقی، استفاده از الکل، سابقه خانوادگی و استعداد ژنتیکی، مواجهه با اشعه و استفاده از تنباکو اشاره نمود (Kamińska et al., 2015). همچنین از جمله فاکتورهائی که در بروز و پیشرفت سرطان پستان دخالت دارند می توان به مقدار هورمون های استروژنی اشاره کرد. به طور کلی ۳ نوع هورمون استروژنی وجود دارد: استرون استرادیول و استریول که به ترتیب با عناوین E1، E2 و E3 ارائه می شوند (Samavat et al., 2015). استرادیول مهم ترین هورمون زنانه می باشد که در تمام طول حیات جنس مونث به عنوان هورمون اصلی عمل می کند و هورمون های استرون و استریول هم به ترتیب در دوران یائسگی و دوران بارداری اهمیت دارند (Yu et al., 2022). سطح سرمی استروژن ها طی چرخه قاعدگی تغییر می کند و بر این اساس، مقادیر ۱۷ تا استرادیول به عنوان مهم ترین استروژن از میزان ۵ pg/ml تا ۵۰۰ pg/ml در نوسان است، بنابراین می توان مقادیر فوق را به عنوان محدوده نرمال برای زنان در نظر گرفت (O'Bryan et al., 2022).

از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که هورمون های استروژنی در پیشرفت سرطان پستان دخالت دارند (Clemons et al., 2001) و تکثیر سلول های سرطان پستان در حضور استروژن امری اثبات شده است که بخشی از اثرات مذکور به واسطه اتصال گیرنده استروژن و عمل بیان ژن ها صورت می گیرد (Khan et al., 2022). بر این اساس، اتصال استروژن به گیرنده های مربوطه، سبب بیان ژن هایی می شود که به موجب آن سلول ها تکثیر یافته و با تغییر محیط تومور، باعث افزایش تکثیر و متاستاز سلولی می گردند. هرچند نقش استروژن در پیشرفت سرطان، بیشتر از طریق گیرنده استروژن اتفاق می افتد ولی دیدگاهی در خصوص تاثیر اثرات احتمالی این هورمون یا متابولیت های آن در پاتوژنز سرطان پستان از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو وجود ندارد، در حالی که مطالعات پیشنهاد داده اند که متابولیسم اکسیداتیو این هورمون به عنوان شروع کننده سرطان عمل می کند، به این معنی که استروژن تحت متابولیسم قرار گرفته و متابولیت هایی را ایجاد می کند که این متابولیت ها خواص کارسینوژنیک دارند که از آن ها می توان به کاتکول استروژن اشاره کرد. کاتکول استروژن با اتصال به DNA و ایجاد فزون ورده دپورینه شده، سبب ایجاد آسیب در DNA می شود. همچنین در ساختار مولکول فوق، کوئینان و سمی کوئینان وجود دارد که تحت تاثیر واکنش های چرخه ای احیاء می توانند منشأ تولید رادیکال های آزاد باشند که این رادیکال های آزاد به صورت مشخص سبب ژنوتوکسیسیتی، آسیب DNA و آسیب پروتئین ها و نهایتاً استرس اکسیداتیو شده و شروع سرطان را موجب می شوند (Bhat et al., 2003). البته علی رغم نقش تایید شده استروژن در پیشرفت سرطان، نقش آن در ایجاد و شروع سرطان، به طور کامل تأیید نشده است (Russo et al., 2006). همچنین یک دلیل ضمنی برای استنتاج نقش متابولیت های استروژن در شروع سرطان پستان را می توان در ارتباط پلی مورفسم های دو آنزیم دخیل در متابولیسم استروژن، در ایجاد سرطان پستان جست و جو نمود. مطالعات نشان داده است پلی مورفسم های آنزیم های سیتوکروم P450، خانواده ۱، زیرخانواده A، پلی پتید ۱ (CYP1A1) و کاتکول-O-متیل ترانسفراز (COMT) در بروز سرطان پستان دخالت دارند (Modugno et al., 2005). فرآیند متابولیسم استروژن دارای دو مرحله است. ابتدا استروژن توسط آنزیم های سیتوکروم P450 از نوع CYP 1A1 و

CYP 1B1 به کاتکول آمین تبدیل می‌شود. کاتکول آمین ایجاد شده O- متیله می‌گردد. آنزیم O-متیله‌کننده، O-متیل ترانسفراز می‌باشد. مطالعات مختلف مکانیسم‌های مختلفی را پس از تولید رادیکال‌های آزاد توسط متابولیت‌های استروژن مطرح می‌نماید (Bulbul *et al.*, 2022). برخی مطالعات معتقدند متابولیت کاتکول تولیدشده سبب آسیب DNA میتوکندریایی شده که متعاقب آن ترانسفورماسیون سلول‌های نرمال پستان به سلول‌های سرطانی اتفاق می‌افتد (Stepniak *et al.*, 2016). برخی دیگر از مطالعات معتقدند که ترانسفورماسیون ناشی از استروژن از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی از قبیل مسیر پیام‌رسانی پروتئین‌کیناز B یا Akt و مسیر پیام‌رسانی فاکتور هسته ای کاپای بتا یا NFkb اتفاق می‌افتد (Bhat *et al.*, 2003). در مورد نقش استروژن و متابولیت آن در شروع سرطان پستان چندین سوال وجود دارد. نخست آن که آیا آنزیم‌های متابولیت‌کننده استروژن در بافت‌های پستان و سلول‌های پیش سرطانی وجود دارند یا خیر؟ مطالعات نشان داده است که آنزیم CYP1A1 و آنزیم COMT در بافت پستان بیان می‌شوند، لذا می‌توان استنتاج نمود که ایجاد استرس اکسیداتیو به وسیله استروژن و متابولیت‌های آن می‌تواند به صورت محلی و نه به صورت سیستمیک اتفاق بیفتد (Salama *et al.*, 1998). با این حال نقش استرس اکسیداتیو سیستمیک را هم نمی‌توان انکار نمود (Zhang *et al.*, 2021).

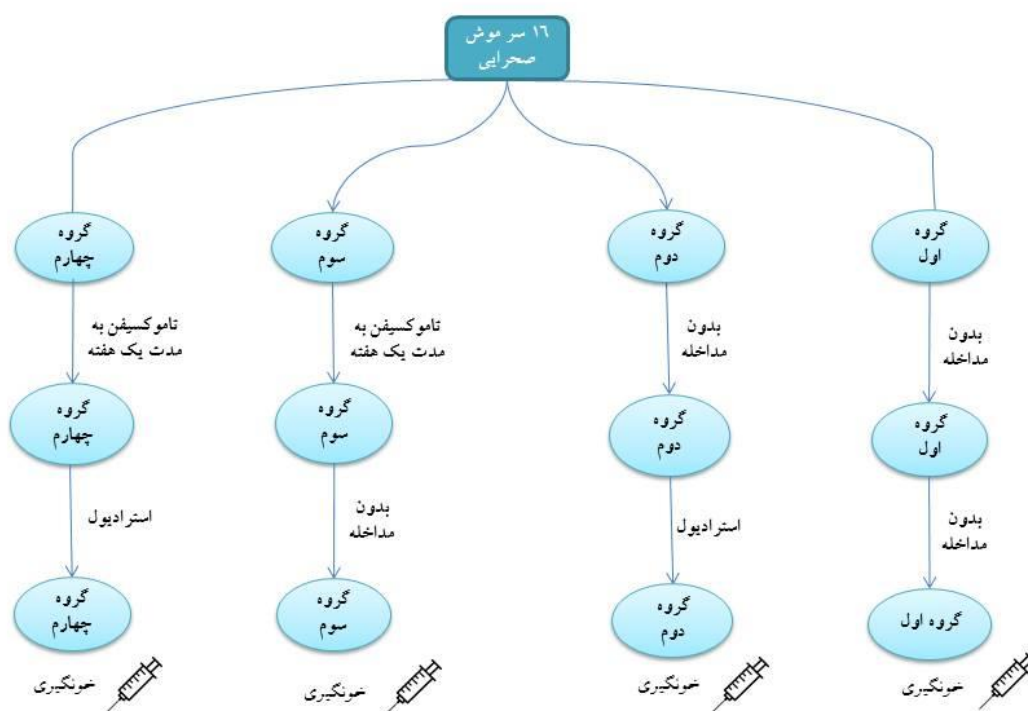
با توجه به این‌که در میان فاکتورهای استرس اکسیداتیو، ظرفیت آنتی‌کسیدان تام و مالون‌دی‌آلدئید بیشترین اطلاعات را در مورد وقوع این پدیده ارائه می‌دهد (Özkan *et al.*, 2022). لذا، در مطالعه حاضر، ضمن تیمار موش‌های صحرایی با داروهای استرادیول و تاموکسیفن (از تاموکسیفن جهت مهار گیرنده استروژن استفاده شد)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون‌دی‌آلدئید سرم موش‌های صحرایی، به عنوان دو متغیر استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین بافت پستان حیوانات مذکور، از نظر بافت شناسی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- نگهداری و تیمار حیوانات مورد مطالعه

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی پس از اخذ مجوزهای لازم، طی ۹ ماه اول سال ۱۴۰۳ انجام شد. تعداد ۱۶ سر موش صحرایی ماده بالغ با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تهیه شد. حیوانات به صورت تصادفی در قفس‌های مخصوص به ۴ گروه ۴ تایی تقسیم شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت کنترل استرس و عادت کردن حیوانات به محیط جدید، موش‌های صحرایی مورد مطالعه، به مدت ده روز بدون هیچ‌گونه مداخله نگهداری شدند و صرفاً آب و غذا در اختیارشان قرار گرفت. کلیه مراحل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه قرار گرفت. شکل ۱ به صورت شماتیک نحوه پیش‌تیمار و تیمار حیوانات را به تصویر کشیده است. پس از دوره عدم مداخله، گروه اول موش‌های صحرایی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و تا پایان دوره تیمار هیچ‌گونه دارویی دریافت نکردند. به گروه‌های سوم و چهارم داروی تاموکسیفن خوراکی (ابوریحان، تهران) به مدت ۱ هفته با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گاوژ شد (Beyssen *et al.*, 2000). پس از یک هفته به

موش‌های یک گروه از دو گروه پیش تیمار شده با داروی تاموکسیفن، داروی استرادیول (ابوریحان، تهران) با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر وزن بدن به صورت زیرجلدی و به صورت تک دوز تزریق شد، ولی حیوانات گروه دیگر پیش تیمار شده، استرادیول دریافت نکردند (Harburger et al., 2009). دوزهای دارویی بر اساس مطالعه بیسن و همکارانش (Beyssen et al., 2000) و مطالعه هابورگر و همکارانش (Harburger et al., 2009) انتخاب شد. گروه دوم استرادیول را در شرایطی دریافت کرد که قبلاً تاموکسیفن دریافت نکرده بودند. در ادامه همه موش‌های مورد مطالعه، با استفاده از هیدروکلراید زایلانین ۲ درصد و کتامین هیدروکلراید ۱۰ درصد، به ترتیب با دوزهای ۴۰ و ۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با تزریق صفاقی، بی‌هوش شدند (Green et al., 1981). سپس خونگیری از قلب حیوانات مذکور انجام شده و سرم مربوطه بلافاصله جدا و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پروتکل ارائه شده در شکل ۱، نحوه تیمار و خونگیری از حیوانات تحقیق را به طور کامل نشان می‌دهد. همچنین همزمان، نمونه‌های تهیه شده از بافت پستان موش‌ها هم، در فرمالین تثبیت شدند.



شکل ۱- نحوه تیمار موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه شاهد بدون مداخله، گروه دریافت کننده استرادیول، گروه دریافت کننده استرادیول با پیش تیمار تاموکسیفن و گروه پیش تیمار با تاموکسیفن بدون دریافت استرادیول.

- تهیه مقطع از بافت پستان موش‌های مورد مطالعه

پس از تثبیت نمونه‌های بافت پستان موش‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی لازم انجام و سپس رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (بهار افشان، ایران) انجام شد. بدین منظور ابتدا مرحله تثبیت بافت‌ها انجام شد. حذف آب یا آبگیری با غلظت‌های متوالی الکل از ۷۰ تا ۱۰۰ درصد (مرک، آلمان) طی سه مرحله دوساعته انجام شد. شفاف سازی، مرحله

آغشته سازی با زایلازین (مرک، آلمان) و قالب گیری با پارافین (بهار افشان، ایران) انجام شد. در ادامه هم مرحله برش زنی یا تهیه سطح مقطع با میکروتوم (مدل cut4050، شرکت Micro TE، ساخت آلمان) انجام گردید. نهایتاً رنگ آمیزی با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شد که شامل پارافین زدایی، آبگیری و اتصال چسباندن لامل است. پس از آماده شدن نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ نوری نیکون (ECLIPSE E100، ساخت کشور ژاپن) لام ها مورد بررسی قرار گرفتند.

- اندازه گیری مقادیر مالون دی آلدئید سرم موش ها

به منظور بررسی تاثیر تیمارهای انجام گرفته در تحقیق حاضر، مقدار مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان بیومارکر استرس اکسیداتیو در سرم، بر اساس روش مبتنی بر تیوباربیتوریک اسید، اندازه گیری شد. بدین منظور ابتدا محلول های کاری تری کلرواستیک (مرک، آلمان) اسید ۱۵ درصد، تیوباربیتوریک اسید (مرک، آلمان) ۰/۵ درصد و اسید کلریدریک (مرک، آلمان) ۰/۲۵ نرمال آماده شدند. در ادامه مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم مورد نظر با ۸۰۰ میکرولیتر از معرف کاری فوق مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای ۹۶ درجه سلسیوس بن ماری (مدل ۸۲۰۸، شرکت پارس آزما)، گرمخانه گذاری شد. بعد از سرد شدن مخلوط، به مدت ۵ دقیقه هم در دمای ۴ درجه سلسیوس و طی سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ (مدل Far test 18000، فرزانه آرمان) شده و بلافاصله جذب نوری محلول فوقانی حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر در مقابل لوله بلانک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Double Beam UV-Vis Spectrophotometry 2100: uv-2100) اندازه گیری و در نهایت غلظت مالون دی آلدئید نمونه با استفاده از ضریب خاموشی محاسبه شد (Senthilkumar et al., 2021).

- اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم موش ها

جهت اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم از روش سنجش قدرت آنتی اکسیدانی با کاهش آهن (FRAP) استفاده شد (Benzie et al., 1996). اساس روش مذکور احیای یون های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون های فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی است که با 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (شرکت سیگمالدریچ، آمریکا) کمپلکس رنگی تشکیل می دهد. این کمپلکس دارای جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر است. محلول FRAP شامل TPTZ ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار در بافر استات (مرک، آلمان) ۳۰۰ میلی مولار است. مقدار یک میلی لیتر محلول FRAP با ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم مخلوط شده و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت هم از ضریب خاموشی نوری کمپلکس، جهت محاسبه ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم استفاده شد.

- تحلیل آماری داده ها

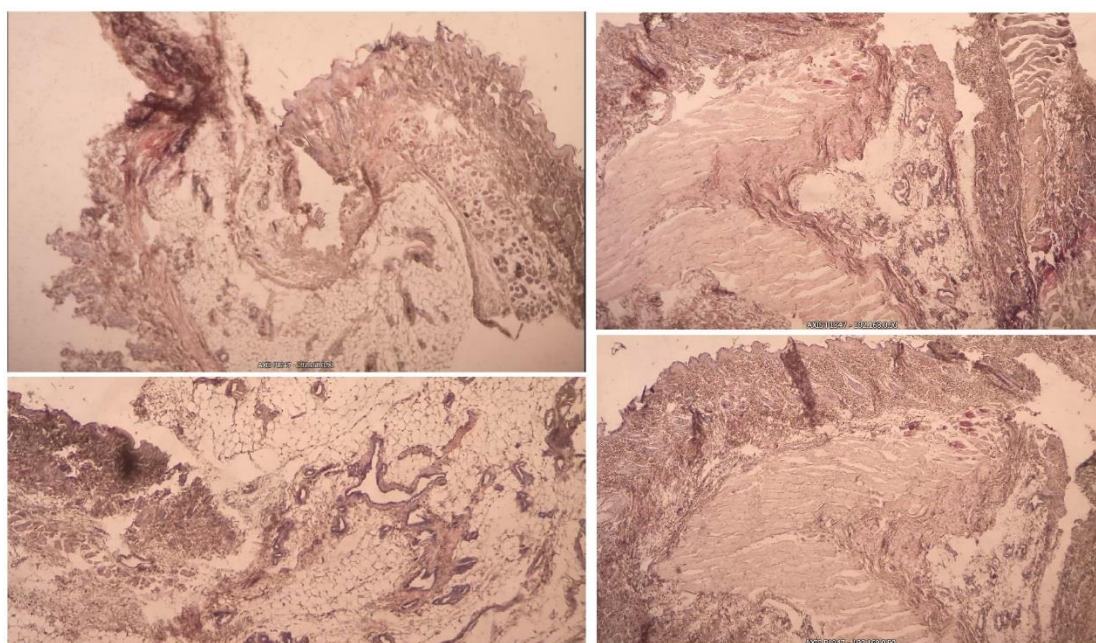
جهت تحلیل داده ها از نرم افزار IBM SPSS Statistics 27 استفاده شد. میانگین ها متغیرها در گروه های مختلف با استفاده از آزمون های تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و کروسکال والیس (Kruskal Wallis test) مقایسه شد.

همچنین برای بررسی همبستگی متغیرهای کمی از آزمون پیرسون استفاده شد. برای اعلام سطح معنی داری نتایج در آزمون‌ها، مقدار p کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- نتایج بافت‌شناسی پستان موش‌ها

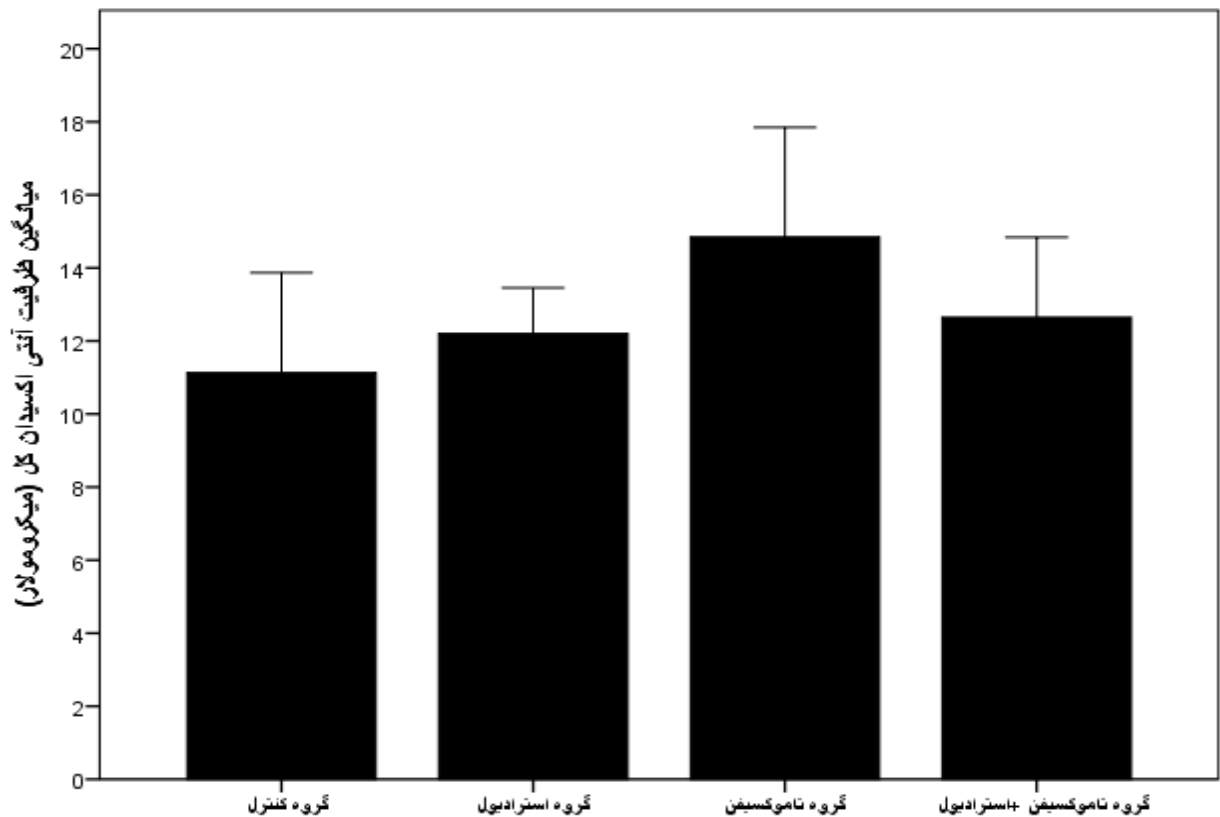
در مقاطع بافتی هیچ تغییری در بافت پستان موش‌های گروه‌های مورد مطالعه، اعم از تکثیر سلولی، مرگ سلولی و التهاب مشاهده نشد و صرفاً در برخی فولیکول‌های مو، آثاری از هیپرتروفی سلولی مشاهده شد که به اثرات استرادیول نسبت داده می‌شد. شکل ۲ تصاویر مقاطع مذکور را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر مقاطع بافتی پستان موش‌های صحرایی مورد مطالعه: بالا-چپ: مربوط به گروه شاهد، پایین-چپ: مربوط به گروه استرادیول، بالا-راست: مربوط به گروه تاموکسیفن و بالا-چپ: مربوط به گروه تاموکسیفن+استرادیول (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگمایی ۱۰×).

- نتایج بررسی مقادیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم

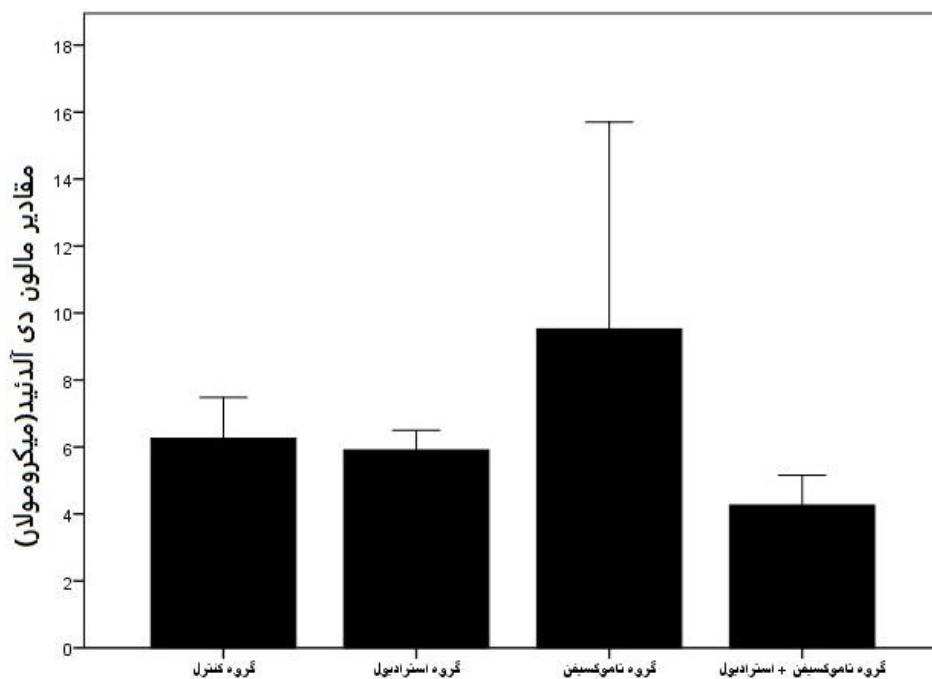
بررسی مقادیر میانگین ظرفیت اکسیدانی نشان داد که حداقل مقدار ۷/۴۸ و حداکثر مقدار ۱۸/۴۱ و میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در این جامعه آماری $12/704 \pm 2/556$ میکرومولار (میکرومول بر لیتر) می‌باشد. میانگین ظرفیت اکسیدانی کل سرم موش‌های گروه شاهد، معادل $11/128 \pm 2/738$ بود. همچنین میانگین مذکور در مورد موش‌های گروه دریافت‌کننده استرادیول، معادل $12/201 \pm 1/255$ ، در سرم موش‌های گروه تاموکسیفن، $14/845 \pm 3/003$ و در سرم موش‌های گروه چهارم که تاموکسیفن و استرادیول را دریافت کرده بودند، به میزان $12/643 \pm 2/195$ میکرومولار بود (نمودار ۱). همچنین مشخص شد که علی‌رغم وجود تغییرات در مقادیر سرمی ظرفیت اکسیدانی تام در سرم موش‌های گروه‌های مورد مداخله، تغییرات مذکور از نظر آماری معنی‌دار نبودند.



نمودار ۱ - مقادیر ظرفیت آنژی اکسیدانی کل سرم موش‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه را نشان می‌دهد. مقادیر p به دست آمده در مقایسه میانگین گروه شاهد با گروه‌های تیمار با استرادیول، تاموکسیفن و تاموکسیفن-استرادیول به ترتیب ۰/۹۱۹، ۰/۱۸۰ و ۰/۸۰۷ می‌باشد.

- نتایج بررسی مقادیر مالون‌دی‌آلدئید سرم

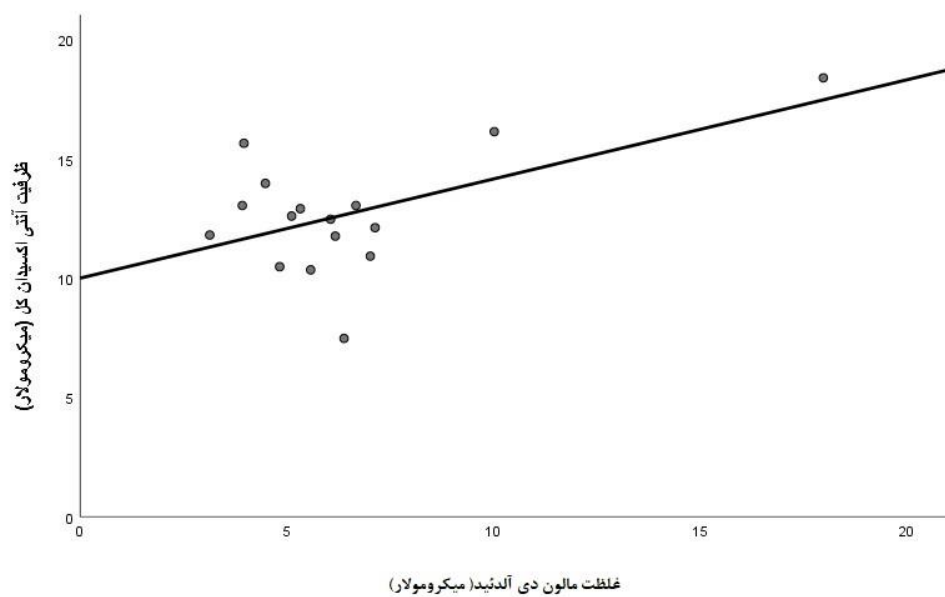
حداقل مقدار مالون‌دی‌آلدئید در سرم موش‌های صحرایی ۳/۱۳۵ و حداکثر مقدار آن ۱۷/۹۸۱ میکرومولار می‌باشد. میانگین مالون‌دی‌آلدئید سرم در جامعه آماری ۱۶ سر موش صحرایی مورد آزمایش، برابر با $6/486 \pm 3/470$ میکرومولار می‌باشد. همچنین بررسی توصیفی مقادیر مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان آن در مورد حیوانات گروه کنترل معادل $6/254 \pm 1/227$ میکرومولار، در خصوص موش‌های گروه دریافت کننده استرادیول، $5/908 \pm 0/593$ میکرومولار، در مورد حیوانات گروه دریافت کننده تاموکسیفن، $9/524 \pm 6/174$ میکرومولار و در خصوص موش‌های گروهی که تاموکسیفن و استرادیول را دریافت کرده‌بود، $4/259 \pm 0/896$ میکرومولار به دست آمد. همچنین مشاهده شد که علی‌رغم افزایش واضح در مقدار مالون‌دی‌آلدئید سرم موش‌های گروه تیمار شده با تاموکسیفن، تغییرات مذکور از نظر آماری معنی‌دار نبود.



نمودار ۲- مقادیر مالون دی آلدئید سرم موش های گروه های مختلف مورد مطالعه را نشان می دهد. مقادیر p به دست آمده در مقایسه میانگین گروه شاهد با گروه های تیمار با استرادیول، تاموکسیفن و تاموکسیفن-استرادیول به ترتیب ۰/۹۹۹، ۰/۴۹۶ و ۰/۸۱۳ می باشد.

- نتایج بررسی همبستگی متغیرهای مورد مطالعه

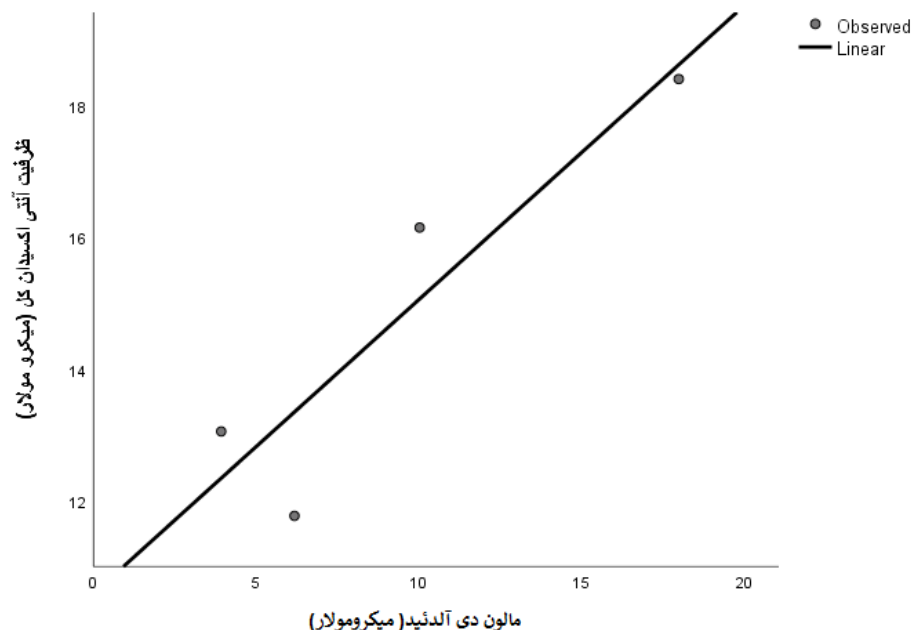
همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می گردد، بررسی همبستگی بین مقادیر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و مالون دی آلدئید سرمی، نشان دهنده همبستگی معنی دار مثبت می باشد ($R=0/319$ و $p=0/223$). همچنین همبستگی دو متغیر مذکور در گروه سوم تیمار شده با تاموکسیفن قابل ملاحظه می باشد. در حالی که چنین همبستگی معنی داری بین سه گروه دیگر برقرار نبود.



نمودار ۳- نشان دهنده همبستگی مقادیر MDA و TAC در کل جامعه ۱۶ سر موش صحرایی مورد مطالعه می باشد.

جدول ۱- همبستگی آماری ظرفیت آنتی اکسیدان کل و مالون دی آلدئید در سرم ۱۶ سر موش

b1	ثابت	سطح معنی داری	F	df1	df2	ضریب	
۰/۴۱۶	۱۰/۰۰۶	۰/۰۲۳	۶/۵۵۱	۱	۱۴	۰/۳۱۹	خطی



نمودار ۴- همبستگی مثبت و معنی دار بین دو متغیر TAC و MDA در گروه پیش تیمار با تاموکسیفن مشاهده شد ($R=0/844$ و $p=0/081$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که هورمون استرادیول و داروی تاموکسیفن، در کوتاه مدت نمی توانند تغییرات آسیب شناختی معنی داری در بافت پستان ایجاد کنند. بر اساس مقادیر مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم به دست آمده از مطالعه حاضر، نه تنها وجود هرگونه اثرات اکسیداتیو برای استرادیول رد شد، بلکه استرادیول در برابر اثرات اکسیداتیو تاموکسیفن خاصیت محافظتی نشان داد.

تحقیقات گسترده در شناخت علل ایجاد کننده سرطان پستان و نقش عوامل مختلف در پیشرفت آن صورت گرفته است، اما این بیماری کشنده همچنان سبب مرگ و میر تعداد زیادی از زنان در سراسر جهان می شود (Giaquinto et al., 2024). علی رغم شناخت فاکتورهای خطر بیماری، اتیولوژی اصلی این بیماری کاملاً مشخص نیست. در خصوص اتیولوژی سرطان پستان ابتدا باید این بیماری را در دو طبقه بندی تقسیم بندی نمود (Madeddu et al., 2014). بدین صورت که سرطان های پستان را می توان در دو دسته با شروع زود هنگام و شروع پس از یائسگی تقسیم نمود (Madeddu et al., 2014). زمینه ی ژنتیکی از جمله تنوع ژنتیکی در ژن BRCA1، تنوع ژنتیکی در گیرنده هورمون ها، آنزیم های متابولیزه کننده هورمون به عنوان مهم ترین عوامل دخیل در بروز و پیشرفت سرطان پستان مطرح هستند (Rosen et al., 2003; Alamri et al., 2024). در این بازه زمانی یکی از مهم ترین اتفاقات بروز فرآیند بلوغ می باشد که ناشی از افزایش و تغییرات سطوح هورمون ها از جمله استروژن ها می باشد (Nordenström et al., 2022).

استروژن به عنوان یک هورمون در سه شکل استرادیول، استریول و استرون وجود دارد که در دوران بلوغ، دوران یائسگی و دوران بارداری در فرایندهای مختلف دخالت دارند. لذا، چنانچه یکی از تغییرات دوران بلوغ را تغییرات هورمونی در نظر بگیریم، می توان فرض نمود که استرادیول سبب بروز سرطان پستان می شود (Steiner et al., 2003). استرادیول به عنوان یک هورمون استروئیدی تنها بافت هایی را تحت تاثیر قرار می دهد که دارای گیرنده برای این هورمون باشند و با اتصال به این گیرنده سبب بروز تغییرات در بافت پستان شامل تکثیر سلولی و تکامل بافتی می شود (Petersen, et al., 1987).

شاید بتوان عنوان نمود، اثرات استرادیول منحصرأ از طریق گیرنده اتفاق نمی افتد و مکانیسم های دیگری قابل طرح است. به نظر می رسد این هورمون می تواند خواص اکسیداتیو از خود نشان دهد و این خصوصیت می تواند مربوط به خود هورمون یا متابولیت های آن باشد. این درحالی است که برخی مطالعات خواص آنتی اکسیدانی برای استروژن تعریف نموده اند. در مطالعه حاضر، ما به بررسی این موضوع پرداختیم. مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان یک بیومارکر استرس اکسیداتیو حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی است (Singh, et al., 2014). نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر MDA تحت تاثیر هورمون استرادیول تغییری نکرده است. دیگر یافته این تحقیق بروز تغییرات اکسیداتیو به شکل افزایش MDA در اثر تزریق تاموکسیفن بود. درحالی که هدف از استفاده از تاموکسیفن بلوکه کردن مسیرهای گیرنده استروژن بود، ما شاهد افزایش مقادیر MDA بودیم هرچند به دلیل پایین بودن تعداد نمونه ها این تغییرات به صورت غیرمعنی دار مشاهده گردید. بررسی مقادیر MDA در گروه چهارم که استرادیول را پس از پیش تیمار با تاموکسیفن دریافت کرده بود، نشان داد که مقادیر MDA القاء شده با تاموکسیفن توسط استرادیول به صورت قابل توجهی کاهش پیدا کرده است. به عبارت دیگر تجویز استرادیول پس از پیش تیمار با تاموکسیفن، اثرات اکسیداتیو آن را کاهش می دهد. اثر مهارى استرادیول در جلوگیری از تولید MDA القاء شده با تاموکسیفن را می توان در یک جمله خلاصه نمود: استرادیول در کوتاه مدت دارای خواص آنتی اکسیدانی است.

به طور رایج TAC به عنوان یک متغیر جهت ارزیابی قابلیت بدن برای مقابله با آسیب های اکسیداتیو تعریف می شود. TAC شامل دو بخش آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم های آنتی اکسیدانی شامل گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پروکسیدوکسین، تیوردوکسین و سایر پروتئین های آنتی اکسیدانی می باشد. در بخش غیر آنزیمی، ویتامین C، ویتامین E و گلوکاتایون، اسید اوریک، بیلی روبین و سایر مولکول های طبیعی بدن دارای قابلیت آنتی اکسیدانی هستند. افزایش TAC مربوط به افزایش این دو بخش و کاهش TAC نتیجه کاهش هر یک از این عوامل می باشد (Mehta et al., 2015).

در گروه پیش تیمار با تاموکسیفن بدون دریافت استرادیول، شاهد روند افزایش TAC بودیم. از طرفی تاموکسیفن سبب افزایش مقادیر MDA شده بود. در مطالعات قبلی خواص اکسیداتیو تاموکسیفن مطرح شده است (Ahmed, et al., 2021). یک تناقض ظاهری در نتایج، این یافته است که یک مولکول دارای خواص اکسیداتیو به نام تاموکسیفن چگونه سبب افزایش TAC شده است. تحلیل نگارندگان این است که تاموکسیفن سبب القاء بخش آنزیمی شده است. این استنتاج بر دو اصل استوار است. نخست این که، مطالعات قبلی حاکی از آن است که خواص اکسیداتیو تاموکسیفن از

طریق مسیرهای سیگنالینگ اتفاق می‌افتد. به عنوان مثال، بکله و همکارانش نشان دادند تاموکسیفن با تاثیر بر Nrf2 بخشی از عناصر سیس تحت عنوان عناصر پاسخ دهنده به آنتی اکسیدان (Anti-oxidant response element) را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Bekele et al., 2016). همچنین امکان تاثیر تاموکسیفن بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق اجزای غیر آنزیمی دور از انتظار است، زیرا مکانیسمی که از طریق آن تاموکسیفن بتواند مولکول‌هایی از قبیل ویتامین C و ویتامین E افزایش دهد، دور از ذهن است و تاکنون مطرح نشده است. به طور خلاصه، تاموکسیفن خاصیت اکسیداتیو دارد که نمی‌تواند سبب افزایش ویتامین C شده و سایر مولکول‌های دارای خواص آنتی اکسیداتیو غیر آنزیمی را القاء کند. همچنین، تاموکسیفن با تولید MDA و تاثیر این عوامل از طریق مسیرهای سیگنالینگ بر بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اثرات خود را به شکل افزایش TAC نشان می‌دهد.

یکی دیگر از یافته‌های این تحقیق وجود یک همبستگی معنی‌دار بین مقادیر آنتی‌اکسیدانی کل و MDA در جامعه ۱۶ عددی موش‌های صحرایی است. نکته جالب توجه این است که با افزایش MDA به عنوان یک بیومارکر استرس اکسیداتیو انتظار می‌رود که TAC کاهش یابد، چرا که نسبت این دو متغیر باید معکوس باشد. در این حالت با افزایش استرس اکسیداتیو بخش غیر آنزیمی TAC مصرف و کمتر می‌شود.

به عنوان مثال کانوار و همکارانش نشان دادند با افزایش MDA مقدار ویتامین C کاهش می‌یابد (Kanwar, et al., 2020). لذا، می‌توان انتظار داشت که یک ارتباط منفی بین مقادیر MDA و آنتی اکسیدان تام برقرار باشد، درحالی‌که در مطالعه حاضر با افزایش MDA مقدار TAC افزایش پیدا کرد. این یافته تأکیدی بر این نکته است که تغییرات در TAC به علت تغییرات بخش آنزیمی می‌باشد. در واقع افزایش TAC را می‌توان پاسخی به مقادیر افزایش یافته‌ی رادیکال‌های آزاد در سرم مدل حیوانی در نظر گرفت.

یکی دیگر از یافته‌های این تحقیق وجود همبستگی بسیار قوی‌تر بین مقادیر MDA و TAC در گروه تیمار شده با تاموکسیفن بودند. این درحالی بود که در سه گروه دیگر همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد. در واقع می‌توان به این صورت استنتاج نمود که TAC و MDA تابع شرایط القایی و نه ایستایی است، بدین معنی که TAC در حالتی که حیوان به حالت ایستا و بدون تغییرات است، نمی‌تواند نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو باشد. در حالی‌که در شرایطی که استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی یا انسان ایجاد شود، TAC در پاسخ به استرس افزایش پیدا می‌کند. این نتایج توسط فیاضی و همکارانش در بیماران مبتلا به سکتة مغزی ایسکمیک به عنوان یک مدل استرس اکسیداتیو قبلاً مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (Fayyazi et al., 2023).

در بررسی‌های بافت‌شناسی مشخص گردید هیچ تغییرات پاتوفیزیولوژیکی در سطح بافت روی نداده است. این موضوع را شاید بتوان به زمان کوتاه تیمارها نسبت داد.

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استرادیول به عنوان یک هورمون طبیعی انتخاب‌شده در فرآیند تکامل دارای خواص اکسیداتیو نبوده و تا حدودی خواص آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. تاموکسیفن به عنوان یک مولکول مهارکننده گیرنده استروژن سبب استرس اکسیداتیو می‌شود. در نهایت، TAC به عنوان یک بیومارکر برای شرایط ایستایی اهمیت نداشته و بیشتر به کمک تحریک‌های اکسیداتیو در بخش آنزیمی القاء شده و در بخش غیر آنزیمی کاهش می‌یابد. لذا

پیشنهاد می‌شود که در تحقیق‌های آتی از مدل‌های انسانی و کارآزمایی‌های بالینی برای بررسی‌های بیشتر استفاده شود. دوره استفاده از استرادیول طولانی و حداقل در بازه زمانی چندین ماهه باشد. در بررسی اثرات تاموکسیفن پیشنهاد می‌گردد که اثرات اکسیداتیو و مسیرهای آن مشخص شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات جناب آقای دکتر امیر امنیت‌طلب و جناب آقای سیامک چراغیان بابت مساعدتشان در اجرای طرح کمال تقدیر و تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان وجود هرگونه تعارض منافع را رد می‌کنند.

منابع

- Ahmed, N.S., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P. and Saso, L. (2021). Tamoxifen and oxidative stress: an overlooked connection. *Discover Oncology*, 12(1): 17-18.
- Alamri, A.M., Alkhilawi, F.A., Khan, N.U., Mashat, R.M. and Tasleem, M. (2024). Exploring pathogenic SNPs and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer: An in silico approach. *Heliyon*, 10(17): 372-97.
- Bekele, R.T., Venkatraman, G., Liu, R.Z., Tang, X., Mi, S., Benesch, M.G., *et al.* (2016). Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Scientific Reports*, 6: 21164.
- Bhat, H.K., Calaf, G., Hei, T.K., Loya, T. and Vadgama, J.V. (2003). Critical role of oxidative stress in estrogen-induced carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3913-3918.
- Russo, J. and Russo I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5): 89-96.
- Bulbul, M., Aydın, T.B., Karaçor, T., Onderci, M., Nacar, M.C., Parlar, A., *et al.* (2022). Carbamazepine protects the endometrium against negative effects of estrogen in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 97(4): 254-260.
- Clemons, M. and Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(4): 276-285.
- Fayyazi, F., Mamaghani, M.M., Abgharmi, B.A., Zarrini, G., Mosarrezai, A., Charkhian, H. and Gholinejad, Z. (2023). N-Acetyl cysteine amide and cerium oxide nanoparticles as a drug delivery for ischemic stroke treatment: Inflammation and oxidative stress crosstalk. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 80: 127300.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., *et al.* (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4): 778-789.
- Beyssen, M., J. Lagorce, D. Clédât, A. Jambut and J. Buxeraud (2000). Antithyroid action of tamoxifen in the rat: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology*, 61(1): 22-30.
- Harburger, L.L., Saadi A. and K.M. Frick (2009). Dose-dependent effects of post-training estradiol plus progesterone treatment on object memory consolidation and hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation in young ovariectomized mice. *Neuroscience*, 160(1): 6-12.

- Green, C.J., Knight, J., Precious, S. and Simpkin, S. (1981). Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory Animals*, 15(2): 163-170.
- Benzie, I.F. and Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Senthilkumar, M., Amaresan, N. and Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of Malondialdehyde (MDA) by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay. *Plant-Microbe Interactions: Laboratory Techniques*. New York, NY, Springer US: 103-105
- Giaquinto, A.N., Sung, H., Newman, L.A., Freedman, R.A., Smith, R.A., Star, J., *et al.* (2024). Breast cancer statistics 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(6); 477-495.
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. and Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 14(3): 196-202.
 - Kanwar, A., Mor, P. and Sonagara, V. (2020). Status of lipid peroxidation and antioxidation in maxillary and vocal cord carcinoma. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research*, 60(5):17-20.
- Khan, M. Z.I., Uzair, M., Nazli, A. and Chen, Z.J. (2022). An overview on estrogen receptors signaling and its ligands in breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114658.
- Madeddu, C., Gramignano, G., Floris, C., Murenu, G., Sollai, G. and Maccio, A. (2014). Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(12): 2519-2529.
- Mehta, S.K. and Gowder, S.J.T. (2015). Members of antioxidant machinery and their functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, (11): 59-85.
- Modugno, F., Zmuda, J.M., Potter, D., Cai, C., Ziv, E., Cummings, S.R., *et al.* (2005). Estrogen metabolizing polymorphisms and breast cancer risk among older white women. *Breast Cancer Research and Treatment*, (93): 261-270.
- Nordenström, A., Ahmed, S.F., Van Den Akker, E., Blair, J., Bonomi, M., Brachet, C. , *et al.* (2022). Pubertal induction and transition to adult sex hormone replacement in patients with congenital pituitary or gonadal reproductive hormone deficiency: an Endo-ERN clinical practice guideline. *European Journal of Endocrinology*, 186(6): 9-49.
- O'Bryan, S.M., Connor, K.R., Drummer, D.J., Lavin, K.M. and Bamman, M.M. (2022). Considerations for sex-cognizant research in exercise biology and medicine. *Frontiers in Sports and Active Living*, 4: 903992.
- Petersen, O., Høyer, P. and Van Deurs, B. (1987). Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Research*, 47(21): 5748-5751.
- Rosen, E.M., Fan, S., Pestell, R.G. and Goldberg, I.D. (2003). BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 196(1): 19-41.
- Salama, S.A., Jamaluddin, M., Kumar, R., Hassan, M.H. and Al-Hendy, A. (2007). Progesterone regulates catechol-O-methyl transferase gene expression in breast cancer cells: distinct effect of progesterone receptor isoforms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 107(3-5): 253-261.
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan A.N., Uzunboy, S., Çapanoğlu E. and Apak R. (2022). Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 209: 114477.
- Samavat, H. and Kurzer, M.S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2): 231-243.
- Singh, Z., Karthigesu, I.P., Singh, P. and Rupinder, K. (2014). Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. *Iranian Journal of Public Health*, 43(Supple 3): 7-16.

- Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., DePasquale, J.A., Pentecost, B.T., Fasco, M.J., *et al.* (1998). Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis*, 19(2): 291-298.
- Steiner, M., Dunn, E. and Born, L. (2003). Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. *Journal of Affective Disorders*, 74(1): 67-83.
- Stepniak, J. and Karbownik-Lewinska, M. (2016). 17 β -estradiol prevents experimentally-induced oxidative damage to membrane lipids and nuclear DNA in porcine ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(1): 17-21.
- Yu, Z., Jiao, Y., Zhao, Y. and Gu, W. (2022). Level of Estrogen in Females-The Different Impacts at Different Life Stages. *Journal of Personalized Medicine*, 12(12): 1995.
- Zhang, K., Ping, L., Du, T., Wang, Y., Sun, Y., Liang, G., *et al.* (2021). A novel systematic oxidative stress score predicts the prognosis of patients with operable breast cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9441896.

The effect of 17-beta-Estradiol on Malondialdehyde levels and Total Antioxidant Capacity in Serum and Breast Tissue of Rats, with and without Pretreatment with Tamoxifen

Rezaei, A.M.¹, Valilou M.R.^{2*}, Zafar Gholinejad, Z.³

1- D.V.M. Student, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

2- Department of Pathobiology, TaMS.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Laboratory Medical Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

*Corresponding author's email: m.valilou@iau.ac.ir.

(Received: -----Accepted: -----)

Abstract

Although the hormone estradiol clearly affects the process of carcinogenesis through binding to its receptors (alpha and beta), it is possible that part of its effects may be mediated through the induction of oxidative stress. In the present study, the effect of 17-beta estradiol on oxidative stress markers in rats (as an animal model) was investigated. For this purpose, sixteen rats were randomly divided into four equal groups. After acclimatization to the environment, in the pre-treatment phase, the rats in groups 1 and 2 received tamoxifen at a dose of 5 mg/kg daily for one week, while the rats in groups 3 and 4 received the same volume of distilled water. Subsequently, during the treatment phase, the rats in groups 2 and 3 received a single dose of estradiol at 0.2 mg/kg. Three days after the treatment phase, serum and mammary tissue samples were collected from all rats, and the levels of total antioxidant capacity (TAC) and serum malondialdehyde (MDA) were measured. The tissue samples were also subjected to histopathological evaluation. The results showed that neither estradiol nor tamoxifen induced pathological changes in the mammary tissue. Moreover, estradiol did not cause significant changes in the serum levels of malondialdehyde and total antioxidant capacity. However, tamoxifen caused a noticeable increase in both parameters, although the changes were not statistically significant. On the other hand, a significant correlation was observed between the levels of malondialdehyde and total antioxidant capacity ($p < 0.023$). The findings of the present study do not support a short-term effect of estradiol in inducing oxidative stress, but at the same time, they do not rule out the potential role of tamoxifen in inducing oxidative stress.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Estradiol, Malondialdehyde, Rat, Tamoxifen, Total Antioxidant Capacity.