

## بررسی مقایسه‌ای تأثیر مکمل ویتامینی توأم در مقایسه با تک ویتامین‌های D<sub>3</sub>، A، E در کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

دکتر فریبا نباتچیان<sup>۱</sup>، مجتبی آشتیانی<sup>۲</sup>، علی نوروزی<sup>۳</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان پستان مسئله مهم اپیدمیولوژیک و بیشترین علت مرگ و میر زنان می‌باشد. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در این بیماری ایفا می‌کند. آنتی‌اکسیدانها مانند بعضی از ویتامینها، توجه بسیاری از دانشمندان را برای مقابله با استرس اکسیداتیو به خود جلب کرده است. هدف این تحقیق، تعیین تأثیر مکمل ویتامینی در کاهش استرس اکسیداتیو در سرطان پستان است.

**روش بررسی:** در مطالعه حاضر، ۳۸ موش BALB-C مورد استفاده قرار گرفت و در آن‌ها سرطان پستان به روش کاشت سلول ایجاد شد. موش‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند: ۴ موش به مدت ۱ ماه مکمل ویتامینی، ۴ موش ویتامین A، ۴ موش ویتامین E و ۴ موش ویتامین D دریافت کردند. بعد از یک ماه موش‌ها به سرطان پستان مبتلا شدند. در گروه دوم موش‌ها بدون مکمل ویتامینی، مبتلا شدند. در گروه سوم، موش‌ها با مکمل ویتامینی به بیماری مبتلا نشدند. در سرم خون موش‌ها، میزان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی به روش الیزا اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** کاتالاز در موش‌هایی که مکمل ویتامینی دریافت کرده بودند و به بیماری مبتلا شدند، بطور معنی‌داری افزایش یافت ( $P=0/049$ ). اما افزایش آن با ویتامین D معنی‌دار نبود ( $P=0/287$ ). همچنین، سوپراکسید دیسموتاز نیز در موش‌هایی که مکمل ویتامینی دریافت کرده و به بیماری مبتلا شدند، بطور معنی‌داری افزایش داشت ( $P=0/0249$ ). اگرچه، این افزایش با ویتامین D معنی‌دار نبود ( $P=0/24$ ). هم‌چنین، میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در موش‌هایی که مکمل ویتامینی دریافت نموده و به بیماری مبتلا شدند بطور معنی‌داری افزایش یافت ( $P<0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** استفاده از مکمل ویتامینی با میزان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی ارتباط معنی‌دار دارد و می‌تواند مارکرهای آنتی اکسیدان را افزایش دهد.

**واژه‌های کلیدی:** مکمل ویتامینی، استرس اکسیداتیو، سرطان پستان

دریافت مقاله: دی ۱۳۹۴

پذیرش مقاله: فروردین ۱۳۹۵

\* نویسنده مسئول:

دکتر فریبا نباتچیان:

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email:  
nabatchi@sina.tums.ac.ir

<sup>۱</sup> دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

<sup>۳</sup> کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## مقدمه

سرطان پستان یک مسئله بسیار مهم اپیدمیولوژیک با گسترش جهانی است که بیشترین علت مرگ و میر در زنان را تشکیل می‌دهد.

این بیماری به علت بدخیمی در سلول‌های مجاری پستان و همچنان لوبول‌های پستان رخ می‌دهد (۱ و ۲). عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی در ایجاد این بیماری نقش دارند. طبق محاسبات انستیتو ملی سرطان ایالات متحده آمریکا، از هر ۸ زن ۱ نفر در طول زندگی خود به این سرطان مبتلا می‌شود (۳). براساس مطالعات انجام شده ی پیشین، سن ابتلا به سرطان پستان در ایران حدوداً ۱۰ سال از سایر کشورها پایین‌تر است، و سالانه ۱۰ هزار مورد جدید به تعداد مبتلایان در کشور افزوده می‌شود و از این ۱۰ هزار نفر، حدود ۳۵۰۰ نفر فوت می‌شوند (۴).

بالاترین میزان شیوع در اروپای غربی و شمالی، استرالیا و آمریکای شمالی گزارش شده است که در اصل به دلیل تغییرات فاکتورهای تولیدمثلی و هورمونی و دسترسی به برنامه های غربالگری می‌باشد. سرطان پستان یک عارضه پیچیده است و می‌تواند نتیجه فرآیندی باشد که شامل مکانیسم‌های استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی است (۵ و ۶). اکسیدان‌ها در پاسخ به هر دو فرآیند اندوژن و اگزوژن تشکیل می‌شوند و قادر هستند که ماکرومولکول‌های مهم سلولی و DNA را تخریب کنند و از طریق مسیرهای مختلف، اثرات منفی این رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند. در واقع نبود تعادل بین دو فرآیند اکسیداسیون-آنتی اکسیدان‌ها، قادر به آسیب‌رسانی به سلول‌های مجاری و لوبول‌های پستان و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان است (۷-۹). اخیراً آنتی اکسیدان‌ها از جمله: ویتامین A و

پیش‌سازهای آن، ویتامین C، E، K، D، سلنیوم و روی، توجه بسیاری از دانشمندان را برای مقابله با استرس‌های اکسیداتیو در بسیاری از بیماری‌ها همچون: دیابت، سیستمیک فیبروزیس، مشکلات قلبی-عروقی و انواع سرطان‌ها به خصوص سرطان پستان، به خود جلب کرده است (۱۲-۱۰). در مطالعات گذشته، بررسی اثرات استفاده روزانه از آنتی‌اکسیدان‌ها به صورت مولتی ویتامین انجام نشده است و فقط به صورت ویتامین‌های منفرد چون: A/C/K/E/D3 و پیش‌سازهای ویتامین A دیده می‌شود (۱۳). AquADEKS یکی از مکمل‌های آنتی اکسیدانی است که به سه شکل قرص، کپسول و قطره خوراکی موجود است. این مکمل ترکیبی از ویتامین‌ها و مواد معدنی آنتی اکسیدانی همچون روی و سلنیوم می‌باشد که با داشتن مجموعه ویتامین‌های: A/D3/E/K و همچنین مواد معدنی روی و سلنیوم قادر است پس از مصرف دوره‌ای ۲ تا ۳ ماهه سطوح شاخص‌های آنتی اکسیدانی در سرم و اریتروسیت‌ها را افزایش دهد و به نوبه ی خود باعث کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های اکسیداتیو و همچنین مقاومت بدن نسبت به انواع سرطان‌ها و مشکلات قلبی-عروقی و دیابت و سیستمیک فیبروزیس در کودکان شود (۱۴). با توجه به جامع بودن این مکمل از نظر محتوای ویتامین‌ها و مواد معدنی آنتی اکسیدانی که نقش مهمی در متعادل کردن سطح آنتی‌اکسیدان توتال در پلاسما، و مالون دی آلدئید، هیدروژن پراکسیداز، GSH، سوپر اکسید دیس موتاز و کاتالاز دارند، منبع بسیار مناسبی برای مطالعه حاضر بود تا مقایسه‌ای نسبی با ویتامین‌های منفرد که در مطالعات قبلی صورت گرفت، انجام شود. اهمیت مصرف این مولتی ویتامین در سال

در گروه اول، ۱۶ موش به چهار زیر گروه تفکیک شدند: ۴ موش به مدت ۱ ماه در رژیم مکمل ویتامینی AquADEKs قرار گرفتند. مکمل آنتی اکسیدانی به صورت قطره خوراکی از شرکت AmericaRX خریداری گردید. هر ویال این مکمل حاوی ۶۰ میلی لیتر محلول بود. ۴۰۰ میکرولیتر آن در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و روزانه ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش گاوژ گردید. ۴ موش به مدت ۱ ماه در رژیم ویتامین A قرار گرفتند. ویتامین A از شرکت داروسازی اُسوه خریداری شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از ویتامین در ۱۰ میلی لیتر روغن زیتون حل شد و روزانه ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش گاوژ گردید. در طول آزمایش، دو موش تلف شد. ۴ موش به مدت ۱ ماه در رژیم ویتامین E قرار گرفتند. ویتامین E از شرکت داروسازی اُسوه خریداری گردید. ۲۵ میکرولیتر از آن در ۱۰ میلی لیتر آب حل شد و روزانه ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش گاوژ گردید. در طول آزمایش، یک موش تلف شد. ۴ موش نیز به مدت ۱ ماه در رژیم ویتامین D3 قرار گرفتند. ویتامین D3 از شرکت داروسازی اُسوه خریداری گردید. ۲۵ میکرولیتر از ویتامین در ۱۰ میلی لیتر روغن زیتون حل شد و روزانه ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش گاوژ گردید. در طول آزمایش، دو موش تلف شد. بعد از یک ماه هر ۴ زیر گروه به روش کاشت سلولی (Cell Implant) (۱۷) به بیماری سرطان پستان مبتلا شدند.

در این روش، یک موش BALB-C مبتلا به سرطان سینه انتخاب شد و پس از تایید موش توموری و مدل سرطان خودبخودی (Spontaneous) پستان، تومور به صورت استریل از بدن موش مذکور خارج و داخل سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شد.

۲۰۱۱ در کودکان مبتلا به سیستمیک فیبروزیس مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه آن متعادل کردن سطوح آنتی اکسیدانی و بهبودی عملکرد ریه بیماران بود که در مقابله با استرس‌های اکسیداتیو گزارش شد (۱۵ و ۱۶). با توجه به مطالعات محدودی که در مورد مصرف روزانه این آنتی اکسیدان‌ها در کشور ایران برای پیشگیری و مقابله با سرطان پستان صورت گرفته است، ضروری است تا درخصوص تأثیر مهم مکمل‌های آنتی اکسیدانی در کاهش استرس‌های اکسیداتیو در سرطان پستان مطالعه‌ای انجام گیرد. از آنجا که تاکنون مطالعه‌ای بر روی مصرف روزانه مکمل آنتی اکسیدانی AquADEKs و سایر مکمل‌ها در پیشگیری و یا درمان سرطان پستان صورت نگرفته است، هدف مطالعه‌ی حاضر مقایسه‌ی تأثیر مکمل ویتامین‌ها در کاهش استرس اکسیداتیو در میان موش‌های ماده مبتلا به تومور پستان است که این دارو را در کنار تک ویتامین‌های A/D3/E با دوزهای معین و روزانه دریافت کرده بودند.

## روش بررسی

این تحقیق، یک مطالعه‌ی بنیادی-کاربردی بود که در آن از ۳۸ موش BALB-C ماده در محدوده وزن ۱۸-۲۰ گرم به عنوان مدل حیوانی استفاده گردید. موش‌ها از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه شد. دمای محل نگهداری حیوانات در شرایط  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و محدوده ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود و موش‌ها از غذای فشرده مخصوص جوندگان (ساخت شرکت دام پارس تهران) تغذیه شدند. پس از ۱ هفته، کار تحقیقاتی روی موش‌ها آغاز گردید. موش‌ها به ۴ گروه اصلی تقسیم شدند:

روش الیزا در نمونه‌ها براساس تکنیک ساندویچ با آنتی‌بادی مضاعف با اتصال آنزیمی انجام شد. کاتالاز به چاهک آنزیم آنتی‌بادی منوکلونال که از قبل با آنتی بادی منوکلونال پوشیده شده بود اضافه گردید و انکوباسیون انجام شد. آنتی بادی‌های کاتالاز که با بیوتین نشاندار شده بودند با استرپتاویدین - HRP ترکیب شده و تشکیل کمپلکس ایمنی دادند. سپس مجدداً انکوباسیون انجام و دوباره شسته شد تا آنزیم متصل نشده رفع گردد. سپس محلول کروموزن A و B اضافه گردید تا رنگ مایع به آبی تغییر نماید و در اثر اسید، سرانجام رنگ زرد ایجاد شود. میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز توسط کیت شماره (Cat. No. BYEK1111) تهیه شده از کمپانی Biospess اندازه‌گیری گردید. این کیت براساس روش استاندارد ساندویچ با اتصال آنزیمی (ELISA) عمل می‌نماید. آنتی‌بادی بر علیه سوپراکسید دیسموتاز به صورت خالص روی پلیت‌های ۹۶ چاهکی را پوشانده بود و آنتی بادی بر علیه SOD یا Super Oxide Dismutase یا کونژوگه شده با HRP یا Horseradish Peroxidase به عنوان آنتی بادی‌های تشخیصی به کار گرفته شد. استانداردها، نمونه‌های آزمایش و آنتی بادی متصل با HRP متعاقباً به چاهک‌ها اضافه و مخلوط شدند و سپس از انکوباسیون، کونژوگه‌های غیرمتصل رفع شدند. در اثر کاتالیز سوپراکسید، رنگ آبی تولید شد که بعد از افزودن اسید به زرد تغییر رنگ یافت. شدت رنگ زرد متناسب با مقدار SOD در نمونه بود. جذب نوری نمونه‌ها در ۴۵۰ نانومتر انجام پذیرفت.

میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAOC) توسط کیت شماره (Cat. No. DM P-4100) تهیه شده از کمپانی Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG یا LDN اندازه‌گیری گردید. اساس اندازه‌گیری روی واکنش پراکسیدها با پراکسیداز است که در ادامه یک واکنش

تومور در داخل سرم به قطعات به اندازه ۳ میلی متر مکعب تقسیم شد. پس از آنکه موش‌ها با تزریق داخل صفاقی داروی بیهوشی کتامین (به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گزلین (به میزان ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند، قطعات آماده شده تومور با روش جراحی در زیر پوست ناحیه پهلوئی چپ موش پیوند گردید و محل جراحی با کلیس مخصوص بخیه زده شد (۱۸).

بعد از ۳ هفته، تومور لمس گردید و پس از لمس تومور تجویز مکمل و ویتامین‌ها به مدت یک ماه ادامه یافت. سپس از قلب موش خونگیری انجام، سرم آنها جدا شد و در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. مجموعاً از ۱۶ موش این گروه، ۵ موش تلف شدند و ۱۱ موش به مرحله بعد رسیدند.

در گروه دوم، موش‌ها با همان زیرگروه‌های گروه قبلی، تفکیک گردیدند. پس از یک هفته نگهداری در مرکز نگهداری حیوانات، بدون دریافت هیچ‌گونه مکمل ویتامینی، به روش تزریق سلول‌های سرطانی ۴T۱ (۱۹) رؤیت و لمس گردید. در این زمان، تجویز مکمل‌های ویتامینی AquADEKs، E و A برای موش‌های بیمار آغاز گردید. بعد از ۲ ماه، از قلب موش‌ها خونگیری انجام و سپس سرم آنها جدا شد و در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. در گروه سوم، ۱۱ موش به مدت ۲ ماه مکمل‌های ویتامینی را دریافت کردند و بعد از ۲ ماه خونگیری از قلب موش‌ها انجام و سپس سرم آنها جدا شد و در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. در گروه چهارم، ۶ موش بدون دریافت مکمل‌های ویتامینی و بدون اینکه توموری شوند بصورت شاهد قرار گرفتند.

میزان آنزیم کاتالاز توسط کیت شماره (Cat. No: CKE 90105) از کمپانی Hangzhou East Biopharm اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری در این کیت براساس

زیر گروه دوم: بعد از دریافت ویتامین D به مدت یک ماه، با کاشت سلول سرطانی مبتلا به سرطان پستان شدند.

زیر گروه سوم: بعد از دریافت ویتامین E به مدت یک ماه، با کاشت سلول سرطانی مبتلا به سرطان پستان شدند.

زیر گروه چهارم: بعد از دریافت ویتامین A به مدت یک ماه، با کاشت سلول سرطانی مبتلا به سرطان پستان شدند.

در گروه دوم، موش‌ها به همان زیر گروه‌ها تقسیم شدند. پس از سرطانی شدن موش‌ها، تجویز مکمل ویتامینی بر روی آنها انجام پذیرفت. در گروه سوم، موش‌ها، بدون ابتلا به سرطان، مکمل‌های ویتامینی را دریافت کردند. در گروه چهارم، موش‌ها بدون ابتلا به سرطان، هیچ‌گونه مکمل ویتامینی نیز دریافت نکردند و به عنوان شاهد مورد نظر قرار گرفتند.

رنگی سوپسترای کرموزن تترامتیل بنزیدین انجام می‌شود. رنگ آبی تولید شده بعد از افزودن محلول متوقف‌کننده به زرد تبدیل شده و به طریق فتومتریک در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

آنالیز آماری داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه (One - Way ANOVA) برنامه آماری Graphpad انجام شد و سطح معنی‌داری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

میزان آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و همچنین ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در ۴ گروه موش مورد بررسی قرار گرفت: در گروه اول ۱۶ موش در ۴ زیر گروه قرار گرفتند:

زیر گروه اول: بعد از دریافت AquADEKs به مدت یک ماه، با کاشت سلول سرطانی مبتلا به سرطان پستان شدند.

**جدول ۱: میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در چهار گروه موش با دریافت ۴ نوع ویتامین Graphpad بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه و (A, E, D3, AquADEKs) (mmol/L)**

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / شماره گروه
$P < 0/001$	۴۲/۸۹۹	۰/۵۵۷	۰/۴۲۷۲	۰/۶۶۳۶	گروه اول
$P = 0/۸۸۲$	۰/۲۱۷	۰/۰۷۲	۰/۵۰۳۹	۱/۵	گروه دوم
$P < 0/001$	۶۰/۸۲۰	۲/۵۲۰	۰/۸۸۵۹	۱/۰۰۹	گروه سوم
$P = 0/۸۲۷$	۰/۲۹۷	۰/۰۰۲	۰/۰۷۵۱	۰/۳۱۸۲	گروه چهارم

**جدول ۲: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ۴ گروه موش با دریافت ۴ نوع ویتامین (KU/L) بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه و Graphpad**

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / شماره گروه
$P = 0/001$	۲۵/۳۲	۶۳۸/۸۹۱	۱۳/۳۶۵۷	۹۲/۳۸۸۹	گروه اول

P=۰/۰۱۵	۹/۲۰۱	۳۶۵۱/۹۴۹	۳۴/۷۹۴۷	۷۶/۴۵۵۶	گروه دوم
P=۰/۷۳۸	۰/۳۲۰	۱۲۰/۲۴۷	۱۷/۶۵۰۹۸	۷۰/۷۲۲۲	گروه سوم
P=۰/۵۸۲	۰/۵۹۳	۶/۷۷۵	۳/۲۰۳۵	۸۰/۵۳۳۳	گروه چهارم

جدول ۳: میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ۴ گروه موش با دریافت ۴ نوع ویتامین (U/ml) بر

اساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Graphpad

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / نوع ویتامین
P=۰/۰۱۹	۶/۵۹۱	۰/۸۶۱	۰/۵۹۱۳	۴/۴۱۸۲	گروه اول
P=۰/۰۹۲	۳/۲۱۳	۲/۸۷۱	۱/۲۱۹۳	۵/۴۰۹۱	گروه دوم
P=۰/۱۲۶	۲/۶۹۹	۱/۰۳۱	۰/۷۵۹۴	۵۲/۴۵۵	گروه سوم
P=۰/۷۰۵	۰/۴۸۲	۰/۰۹۵	۰/۴۰۷۶	۴/۲۲۷۳	گروه چهارم

جدول ۴: میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در بین ۴ گروه موش به تفکیک دریافت ویتامین‌ها (mmol/L)

بر اساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Graphpad

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / نوع ویتامین
P<۰/۰۰۱	۵۸/۹۴۳	۱/۳۰۲	۰/۵۲۷۲	۰/۶۷۵۰	AQ
P=۰/۰۰۶	۲۲/۸۸۰	۱/۴۳۰۰	۰/۸۰۵۳	۱/۱۵	D <sub>3</sub>
P=۰/۰۰۱	۱۷/۳۰۷	۰/۷۲۱	۰/۴۷۶۴	۰/۶۱۶۷	E
P=۰/۲۰۴	۲/۴۴۷	۱/۱۶۸	۰/۸۷۹۵	۱/۳۷۵۰	A

جدول ۵: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بین ۴ گروه موش به تفکیک دریافت ویتامین‌ها (KU/L) بر اساس

آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Graphpad

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / نوع ویتامین
P=۰/۰۴۹	۳/۵۱۱	۱۰۴۹/۹۳۷	۲۱/۱۹۵۱	۷۶/۹۴۳۸	AQ
---	---	---	---	---	A
P=۰/۲۸۷	۱/۷۹۶	۵۲۰/۶۲۳	۱۹/۷۱۸۳	۷۰/۰۵۰	D <sub>3</sub>
P<۰/۰۰۱	۱۰۳/۱۹۴	۱۳۵۲/۹۶۳	۱۹/۴۵۵۷	۹۰/۷۸۳۳	E

جدول ۶: میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بین ۴ گروه موش به تفکیک دریافت ویتامین‌ها (U/ml) بر اساس

آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Graphpad

Sig	F	Mean square	Std. deviation	Mean	آماره / نوع ویتامین
P=۰/۰۲۵	۴/۴۸۰	۳/۱۸۶	۱/۰۹۸۱	۵/۱۹۳۷	AQ

P=۰/۰۰۸	۱۹/۱۲۰	۱/۴۵۸	۰/۸۱۶۵	۴/۸۶۲۵	<b>D3</b>
P=۰/۰۰۲	۱۳/۸۱۰	۰/۹۹۰	۰/۵۶۷۴۹	۴/۵۷۵۰	<b>E</b>
P=۰/۱۲۳	۳/۶۱۳	۱/۶۳۵	۰/۹۷۹۴	۴/۴۲۵۰	<b>A</b>

## بحث

نتایج به دست آمده نشان داد که مقادیر ویتامین D با بقا بیماران مبتلا به سرطان سینه ارتباط دارد. افزایش غلظت ویتامین D به طور معنی داری با بقای طولانی تر بیماران مربوط است (۲۸). Shao و همکاران در مطالعه ی خود نشان داده اند که کمبود ویتامین D به عنوان یک عامل خطر برای سرطان سینه به شمار می آید (۲۹). اگرچه، اطلاعات به دست آمده در مورد مقادیر ویتامین D، ارتباط بین این متابولیت و سرطان سینه را تایید نمی کنند (۳۰).

تحقیق حاضر درخصوص ویتامین D روی ۴ موش در هر گروه استوار بود که دو موش از بین رفتند. نتایج تحقیق به دست آمده نشان داد که تجویز ویتامین D به موش به عنوان مدل آزمایشگاهی باعث افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (P=۰/۰۰۷۸)، و همچنین افزایش میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (P< ۰/۰۰۵۶) به طور معنی دار می شود. لیکن تجویز ویتامین D هیچ ارتباط معنی داری را با آنزیم کاتالاز نشان نداد.

ویتامین E یا به عبارتی دیگر توکوفرول ها به عنوان مهارکنندگان اکسیداسیون لیپیدی شناخته شده اند (۳۱) و خواص آنتی اکسیدانی به دلیل هیدروژن های فنلی در حلقه کرومانول است که به رادیکال های آزاد چربی داده می شوند (۳۲).

$\alpha$  - توکوفرول آنتی اکسیدان بهتری نسبت به توکوفرول های دیگر است، در عین حال ظرفیت

سرطان سینه، شایع ترین نوع سرطان در زنان در کشورهای توسعه یافته است و مرگ و میر ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه نیز رو به افزایش است (۲۰). افزایش در میزان شیوع و مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه می تواند به دلیل تنوع فاکتورهایی مانند: رشد جمعیت، سن، تغییر شرایط زندگی و مهاجرت به جوامع بیگانه باشد (۲۱). پیش بینی های بیست ساله برای افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از آن در مناطق کمتر توسعه یافته و پیشرفته، نشان می دهد که سازمان بهداشت جهانی (WHO) باید حمایت های بیشتری از تحقیق روی پیشگیری های اولیه سرطان و توسعه استراتژی های مؤثر مانند آنچه که به تغذیه مربوط می شود، داشته باشد (۲۲).

در دهه های گذشته، میزان پایین ویتامین D به عنوان یک عامل خطر بالقوه برای سرطان های مختلف بیان شده است (۲۳ و ۲۴). این بررسی شامل: سرطان کولورکتال (۲۵) و سرطان سینه (۲۶) می شود. مقادیر ۲۵- هیدروکسی ویتامین D، بهترین بیومارکر در نظر گرفته می شود، زیرا آنها با ترکیبات غذایی و نور خورشید در ارتباط هستند (۲۷). مطالعات نشان داده اند که ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D یا فرم فعال ویتامین D می تواند تکثیر سلول سرطانی و آنژیوژنز را مهار کند و آپوپتوز سلولی را القا نماید (۱۸).

در بررسی که Maalmi و همکاران انجام دادند

سرطان پستان و کنترل‌ها دیده نمی‌شود، اما ظرفیت تام آنتی اکسیدانی پایین‌تر؛ یعنی افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند با سرطان پستان مرتبط باشد (۵۶). در این تحقیق نیز نشان داده شد که استفاده از مکمل آنتی اکسیدانی با میزان آنزیم کاتالاز، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی ارتباط معنی‌دار دارد.

### نتیجه‌گیری

تجویز و مصرف ویتامین‌های D و E می‌تواند با مارکرهای استرس اکسیداتیو و افزایش آنها و همچنین ظرفیت تام آنتی اکسیدانی ارتباط معنی‌دار داشته باشد و در صورت امکان و تولید مکملی که تمام ویتامین‌ها را دارا باشد، می‌توان با مصرف یک دوز دارو به طور واضح مارکرهای آنتی اکسیدان را در بدن بیمار مبتلا به سرطان پستان و یا قبل از ابتلا به بیماری سرطان افزایش داد و از تعدد مصرف دارو خودداری نمود و بدین ترتیب به نتایج مناسب در مورد پیشگیری و درمان دست یافت.

### تشکر و قدردانی

پژوهشگران لازم می‌دانند تا بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌های طرح را فراهم نمودند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی نمایند. ضمناً این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۹۱-۰۴-۳۱-۲۰۰۴۵ می‌باشد.

بیشتری نسبت به ۷- توکوفرول و ۸- توکوفرول در عملکرد به عنوان پرواکسیدان دارد (۳۳). ویتامین E می‌تواند در برابر انواع گوناگون سرطان شامل: سرطان پستان، پروستات و کولون با مکانیسم‌های گوناگون مانند: القای ژن سرکوبگر تومور P53، تنظیم کاهشی پروتئین‌های P53 موتانت، فعال کردن پروتئین‌های شوک حرارت HSP یا Heat Shock Protein و داشتن اثر ضد رگ‌زایی به واسطه‌ی مهار فاکتور رشد TGF یا Transforming Growth Factor مفید باشد (۳۴).

مطالعات زیادی در مورد ویتامین E و سرطان‌ها انجام شده است که نتایج آن‌ها نشان می‌دهد ویتامین E سبب کاهش خطر ابتلا به سرطان می‌شود (۳۵-۴۵). اگرچه بعضی مطالعات نیز، ارتباطی بین بروز سرطان پستان با ویتامین E نیافته‌اند (۵۲-۴۶).

در تحقیق حاضر، میزان آنزیم کاتالاز با ویتامین E ارتباط معنی‌داری را نشان داد. هم‌چنین، میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با ویتامین E و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی نیز با ویتامین E ارتباط معنی‌دار را نشان داد.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که مصرف کاروتنوئیدها و میزان رتینول با خطر سرطان پستان ارتباطی ندارد (۵۵-۵۳). در تحقیق حاضر نیز ارتباط ویتامین A با میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی معنی‌دار نبود.

تحقیقات نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی تمام سرطان‌ها دخالت دارد. اگرچه Sener و همکاران نشان داده‌اند که اختلاف معنی‌داری بین مقادیر هیدروپراکسید لیپیدی بیماران مبتلا به



1. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2012. Available at: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2012/>. 2012.
2. Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL, Zaks TZ, Sacchini V & McCormick B. Cancer of the breast. 4th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia: Elsevier Inc; 2008: 1875-943.
3. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J & et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995; 378(6559): 789-92.
4. Montazeri A, Vahdaninia M, Harirchi I, Harirchi AM, Sajadian A, Khaleghi F, et al. Breast cancer in Iran: need for greater women awareness of warning signs and effective screening methods. Asia Pacific Family Medicine Journal 2008; 7(1): 1-7.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E & Forman D. Global cancer statistics. A Cancer Journal for Clinicians 2011; 61(2): 69-90.
6. Misotti AM & Gnagnarella P. Vitamin supplement consumption and breast cancer risk: a review. Ecanermedscience 2013; 7(1): 365-79.
7. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. Journal of the National Cancer Institute 2008; 100(9): 672-9.
8. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. Lancet 1998; 352(9132): 930-42.
9. Hasan HR, Mathkor TH & Al-Habal MH. Superoxide dismutase isoenzyme activities in plasma and tissues of Iraqi patients with breast cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012; 13(6): 2571-6.
10. Peluso M, Munia A, Risso GG, Catarzi S, Piro S & Ceppi M. Breast fine-needle aspiration malondialdehyde deoxyguanosine adduct in breast cancer. Free Radical Research 2011; 45(4): 477-82.
11. Li Y, Ambrosone CB, McCullough MJ, Ahn J, Stevens VL, Thun MJ, et al. Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk. Carcinogenesis 2009; 30(5): 777-8.
12. Halliwell B & Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. California: Clarendon Press; 1989: 178-9.
13. Ambrosone CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. Antioxidants and Redox Signaling 2000; 2(4): 903-17.
14. Pan SY, Zhou J, Gibbons L, Morrison H & Wen SW. Antioxidants and breast cancer risk- a population-based case-control study in Canada. Bio Med Central Cancer 2011; 11(1): 372.
15. Michels KB, Mohllajee AP, Roset Bahmanyar E, Beehler GP & Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. Cancer 2007; 109(12): 2712-49.

16. Borek C. Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative Cancer Therapies* 2004; 3(4): 333-41.
17. Greenlee H, Gammon MD, Abrahamson PE, Gaudet MM, Terry MB, Hershman DL, et al. Prevalence and predictors of antioxidant supplement use during breast cancer treatment: the long island breast cancer study project. *Cancer* 2009; 115(14): 3271-82.
18. Ghezelbash B, Zoheir MH, Ghaderi Pakdel F & Zaare S. Synergistic inhibitory effect of *Lactobacillus rhamnosus* and cisplatin on proliferation of tumor cells in mice BALB/C with breast cancer. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2011; 19(5): 701-10[Article in Persian].
19. Sagel SD, Sontag MK, Anthony MM, Emmett P & Papas KA. Effect of an antioxidant-rich multivitamin supplement in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2011; 10(1): 31-6.
20. Sadowska-Woda I, Rachel M, Pazdan J, Bieszczad-Bedrejcuk E & Pawlitzak K. Nutritional supplement attenuates selected oxidative stress markers in pediatric patients with cystic fibrosis. *Nutrition Research* 2011; 31(7): 509-18.
21. Martuti SS, Ulrich CM & White E. Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009; 89(2): 624-33.
22. Mehdipour F. Vitamin B6 fights with breast cancer. Available at: [http://www.tebyan.net/new\\_index.aspx?pid=219251](http://www.tebyan.net/new_index.aspx?pid=219251). 2012.
23. Pabalan N, Jarjanazi H, Sung L, Li H & Ozcelik H. Menopausal status modifies breast cancer risk associated with the myeloperoxidase (MPO) G463A polymorphism in Caucasian women: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7(3): 32389.
24. Klingelhoeffer C, Kämmerer U, Koospal M, Mühling B, Schneider M, Kapp M, et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *Bio Med Central Complement Alternative Medicine* 2012; 12(1): 61.
25. Dai Q, Gao YT, Shu XO, Yang G, Milne G, Cai Q, et al. Oxidative stress, obesity, and breast cancer risk: results from the Shanghai women's health study. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(15): 2482-8.
26. Krishnan AV, Swami S & Feldman D. Equivalent anticancer activities of dietary vitamin D and calcitriol in an animal model of breast cancer: importance of mammary CYP27B1 for treatment and prevention. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* 2013; 136(1): 289-95.
27. Jacobson G, Bhatia S, Smith BJ, Button AM, Bodeker K & Buatti J. Randomized trial of pentoxifylline and vitamin E vs standard follow-up after breast irradiation to prevent breast fibrosis, evaluated by tissue compliance meter. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2013; 85(3): 604-8.
28. Maalmi H, Ordóñez-Mena JM, Schöttker B & Brenner H. Serum 25- hydroxy vitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Cancer* 2014; 50(8): 1510-21.
29. Shao T, Klein P & Grossbard ML. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 2012; 17(1): 36-45.

30. Kühn T, Kaaks R, Becker S, Eomois PP, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and the risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition: a nested case-control study. *International Journal of Cancer* 2013; 133(7): 1689-700.
31. Burton GW & Traber MG. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 1990; 10(1): 357-82.
32. Burton GW & Ingold KU. Vitamin E as an invitro and invivi antioxidant. *American New York Academy of Sciences biology* 1989; 570(1): 7-22.
33. Kamal-Eldin A & Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31(7): 671-701.
34. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM & Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76(4): 703-16.
35. Ambrosone CB, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Graham S, Nemoto T, et al. Interaction of family history of breast cancer and dietary antioxidants with breast cancer risk (New York, United States). *Cancer Causes Control* 1995; 6(5): 407-15.
36. Ray G & Husain SA. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clinical Biochemistry* 2001; 34(1): 71-6.
37. Männistö S, Pietinen P, Virtanen M, Kataja V & Uusitupa M. Diet and the risk of breast cancer in a case-control study: does the threat of disease have an influence on recall bias? *Journal of Clinical Epidemiology* 1999; 52(5): 429-39.
38. Ronco A, De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M & Leborgne F. Vegetables, fruits, and related nutrients and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer Prevention* 1999; 35(2): 111-9.
39. Braga C, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S & Parpinel M. Intake of selected foods and nutrients and breast cancer risk: an age- and menopause-specific analysis. *Nutrition and Cancer Prevention* 1997; 28(3): 258-63.
40. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR & Nemoto T, et al. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88(6): 340-8.
41. London SJ, Stein EA, Henderson IC, Stampfer MJ, Wood WC & Remine S. Carotenoids, retinol, and vitamin E and risk of proliferative benign breast disease and breast cancer. *Cancer Causes & Control* 1992; 3(6): 503-12.
42. Sharhar S, Normah H, Fatimah A, Fadilah RN, Rohi GA, Amin I, et al. Antioxidant intake and status, and oxidative stress in relation to breast cancer risk: a case-control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2008; 9(2): 343-9.

43. Levi F, Pasche C, Lucchini F & La Vecchia C. Dietary intake of selected micronutrients and breast-cancer risk. *International Journal of Cancer* 2001; 91(2): 260-3.
44. Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, D'Avanzo B, Talamini R, Parpinel M, et al. Intake of selected micronutrients and the risk of breast cancer. *International Journal of Cancer* 1996; 65(2): 140-4.
45. Dorjgochoo T, Shrubsole MJ, Shu XO, Lu W, Ruan Z, Zheng Y, et al. Vitamin supplement use and risk for breast cancer: the Shanghai breast cancer study. *Breast Cancer Research Treatment* 2008; 111(2): 269-78.
46. Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I & Bastert G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutrition and Cancer Prevention* 2003; 46(2): 131-7.
47. Zaroukian S, Pineault R, Gandini S, Lacroix A & Ghadirian P. Correlation between nutritional biomarkers and breast cancer: a case-control study. *Breast* 2005; 14(3): 209-23.
48. Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Colditz GA, et al. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology* 2005; 161(2): 153-60.
49. Sato R, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Hoffman SC, Norkus EP & Comstock GW. Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Preventive* 2002; 11(5): 451-7.
50. Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC, Norkus EP, Gross M & Helzlsouer KJ. The repeatability of serum carotenoid, retinoid, and tocopherol concentrations in specimens of blood collected 15 years apart. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Preventive* 2001; 10(1): 65-8.
51. Yang YJ, Hwang SH, Kim HJ, Nam SJ, Kong G & Kim MK. Dietary intake of nitrate relative to antioxidant vitamin in relation to breast cancer risk: a case-control study. *Nutrition and Cancer Prevention* 2010; 62(5): 555-66.
52. Smolarek AK & Suh N. Chemopreventive activity of vitamin E in breast cancer: a focus on  $\gamma$  and  $\delta$  tocopherol. *Nutrients* 2011; 3(11): 962-86.
53. Mignone LI, Giovannucci E, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Trentham-Dietz A & Hampton JM. Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. *International Journal of Cancer* 2009; 124(12): 2929-37.
54. Hultén K, Van Kappel AL, Winkvist A, Kaaks R, Hallmans G, Lenner P, et al. Carotenoids, alphanatocopherols, and retinol in plasma and breast cancer risk in northern Sweden. *Cancer Causes Control* 2001; 12(6): 529-37.
55. Dennehy C & Tsourounis C. A review of selective vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas* 2010; 66(4): 370-80.

56. Sener DE, Gönenc A, Akinci M & Torun M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochemical Function* 2007; 25(4): 377-82.

# The Effect of Combined Vitamin Supplements Compared with Single Vitamins D3, A, E in Reducing Oxidative Stress in Female Mice with Breast Cancer

**Nabatchian Fariba<sup>1</sup> (Ph.D.) - Ashteeani Mojtaba<sup>2</sup> (B.S.) - Noroozi Ali<sup>3</sup> (B.S.)**

<sup>1</sup> Associate Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Master of Science Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

<sup>3</sup> Bachelor of Science in Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Abstract

Received : Dec 2015

Accepted : Mar 2016

**Background and Aim:** Breast cancer is epidemiological and most important cause of death in women. Oxidative stress plays an important role in this disease. Antioxidants such as some vitamins has attracted the attention of scientists to deal with oxidative stress. The aim of this study was to determine the effect of vitamin supplements in reducing oxidative stress in breast cancer.

**Materials and Methods:** 38 BALB-C mice were used. They were created in the breast cancer by cell implantation procedure. Rats were divided into 4 groups: 4 mice were given vitamin supplements for 1 month, 4 mice vitamin A, 4 mice, vitamin D, and 4 mice were given vitamin E respectively. After a month mice had breast cancer. In the second group mice without vitamin supplements, were affected. In the third group, mice with vitamin supplements were not affected. In the blood serum of rats, the catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity was measured by ELISA.

**Results:** Catalase activity in mice that received vitamin supplements was significantly increased and were diagnosed ( $P=0.049$ ). But the increase was not significant with vitamin D supplement ( $P=0.287$ ). Superoxide dismutase in mice that received vitamin supplements and were free of disease increased significantly ( $P=0.0249$ ). But the increase was not statistically significant with vitamin D supplement ( $P=0.24$ ). The total antioxidant capacity in mice that received vitamin supplements and were affected with breast cancer was significantly increased ( $P<0.0001$ ). This increase was not significant with vitamin D ( $P=0.006$ ).

**Conclusion:** The use of vitamin supplements with catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity was significantly correlated and may increase the level of antioxidant markers.

**Keywords:** Vitamin Supplements, Oxidative Stress, Breast Cancer

\* Corresponding Author:

Nabatchian F;

Email:

nabatchi@sina.tums.ac.ir