

The Effect of Consumption Nettle Extract and Aerobic Training on MMP2 and FGF2 Gene Expression in Mice with Melanoma

Vahid Z¹, Alireza B^{2*}, Asieh AD³, Hosein AN⁴

1- PhD Student in Sport Physiology, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

2- Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3- Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Sport Physiology, Science and research Branch, Islamic Azad University, tehran, Iran.

Corresponding Author: Alireza B, Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Email: alireza54.barari@gmail.com

Received: 12 Jan 2022

Accepted: 15 Feb 2022

Abstract

Introduction: Cancer is one of causes of death in the world that resulting of abnormal cells growth in the body.

Methods: 20 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups including: control, aerobic, nettle and aerobic + nettle. The training program included running on a treadmill for 30 minutes at a speed of 16 meters per minute. One meter per minute was added every week until it reached 22 meters per minute in the eighth week. The experimental group consumed 30 mg / kg / day of nettle ethanol extract orally for 8 weeks. RT PCR was used to measure the expression of MMP2 and FGF2 genes.

Results: Data analysis showed that consumption of nettle extract and endurance training did not have a significant effect on MMP2 and FGF2 gene expression in different groups ($p = 0.064$, $p = 0.405$, respectively). Although a decrease in MMP2 and FGF2 gene expression was observed in nettle and hybrid groups; but it did not reach a significant level.

Conclusions: The results showed that nettle may reduce angiogenic activity and cancer prognostic factor in mice with melanoma.

Keywords: Nettle extract, MMP2, FGF2, Melanoma cancer.

تأثیر مصرف عصاره گزنه و تمرینات هوازی بر بیان ژن MMP2 و FGF2 در موش های مبتلا به سرطان ملانوما

وحید ذوالقدری^۱، علیرضا براری^{۲*}، آسیه عباسی دلویی^۳، حسین عابد نطنزی^۴

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
 ۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
 ۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
 ۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: علیرضا براری، دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
 ایمیل: alireza54.barari@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

چکیده

مقدمه: سرطان یکی از علل مرگ و میر در جهان است که در نتیجه رشد غیرطبیعی سلول ها در بدن ایجاد می شود.
روش کار: ۲۰ موش صحرایی نر ویستار به صورت تصادفی به ۴ گروه شامل گروه های: کنترل، هوازی، گزنه و هوازی+گزنه تقسیم شدند. برنامه تمرین شامل دویدن روی تردمیل بدون شیب به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود. هر هفته یک متر بر دقیقه اضافه شد تا در هفته هشتم به ۲۲ متر بر دقیقه رسید. گروه تجربی میزان 30 mg/kg/day عصاره اتانولی گیاه گزنه را به روش خوراکی و به مدت ۸ هفته مصرف کردند. برای اندازه گیری میزان بیان ژن MMP2 و FGF2 از RT PCR استفاده شد.
یافته ها: تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که مصرف عصاره گزنه و تمرینات استقامتی بر بیان ژن MMP2 و FGF2 در گروه های مختلف تأثیر معناداری ندارد (به ترتیب $p=0.405$, $p=0.064$). اگرچه روند کاهش در بیان ژن MMP2 و FGF2 در گروه های گزنه و ترکیبی مشاهده شد؛ ولی به سطح معناداری نرسید.
نتیجه گیری: نتایج نشان داد که احتمال دارد گزنه فعالیت آنژیوژنیک و میزان فاکتور پیش آگهی سرطان را در موش های مبتلا به سرطان ملانوما کاهش دهد.
کلیدواژه ها: عصاره گزنه، FGF2، MMP2، سرطان ملانوما.

مقدمه

سرطان نسبت داده می شوند. ملانوما بدخیم ۲ درصد از کل سرطان ها را شامل می شود، ولی عامل ۱ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان است. عوامل مستعد کننده این بیماری داشتن نژاد سفید، در معرض آفتاب شدید قرار گرفتن، سابقه ی خانوادگی، ژنتیک، سابقه ی ملانوما قبلی، سرکوب ایمنی و خال های غیر طبیعی است. بررسی داده های پزشکی در آمریکا بین سال های ۱۹۷۵ تا ۲۰۰۶ نشان داد که میزان بروز ملانوم در میان زنان بیشتر از مردان است و سن بروز این سرطان بالای ۴۰ سال می باشد و میزان مرگ و میر در میان افراد سالخورده و میان سال بیشتر

سرطان رشد و تکثیر کنترل نشده سلول های غیر طبیعی در بدن می باشد و یک بیماری مهلک با آمار مرگ و میر بالا هست که درگیری های روانی و اقتصادی زیادی را به دنبال دارد (۱). درمان و پیشگیری از سرطان یک چالش بزرگ در جوامع بشری در سراسر دنیا به شمار می رود. میزان شیوع آن در کشورهای دنیا متفاوت گزارش شده است و روز به روز در حال افزایش می باشد (۲). برابر آمارهای منتشر شده در مجموع سالانه ۵۰ میلیون مرگ در جهان روی می دهد که بیش از ۵ میلیون آن ها به انواع مختلف

وحید ذوالقدری و همکاران

تومور کاهش می‌دهد و منجر به کاهش حجم تومور می‌شود (۹). مورفی و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش حجم تومور را در موش‌های سرطانی گروه تجربی که به مدت ۲۰ هفته فعالیت استقامتی انجام می‌دادند را مشاهده کردند و آن را به افت عوامل التهابی نسبت دادند (۱۰). برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند فعالیت ورزشی منظم دارای اثرات ضدالتهابی است و موجب کاهش سطوح مارکرهای التهابی در افراد سالم و بیماران مبتلا به بیماری‌های متابولیکی می‌شود. این احتمال وجود دارد که ورزش منظم از طریق افت عوامل التهابی از جمله $TNF-\alpha$ که به عنوان پل ارتباطی بین التهاب و سرطان معرفی شده است، در کاهش حجم تومور و کمک به بهبود درمان سرطان عمل کند (۱۱). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکاره‌ای مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیمارهای مختلف عضلانی مرتبط با آن هستند. دردهای اخیر، تأثیر فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه‌ی محققان حوزه‌ی ورزش قرار گرفته است. امروزه فعالیت بدنی منظم به عنوان ابزاری در ارتقاء سلامت بافتهای بدن و بهبود دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدانی مطرح بوده و توجه بسیاری از پژوهشگران حوزه مطالعات آسیب سلولی به ویژه در اندامهای مهم حیاتی از جمله قلب، مغز، کبد، عضلات و سلولهای خونی را به خود جلب کرده است. در این زمینه، تعدادی از محققان عنوان کردند که یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ۴۸ ساعت می‌تواند موجب تسریع در فرآیند آپوپتوز شود. این درحالی است که برخلاف فعالیت ورزشی، انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافتهای مختلف می‌شود (۱۲). تمرین و فعالیت بدنی منظم می‌تواند خطر آسیب دیدگی، استرس اکسایشی و واکنش‌های التهابی از آشفتگی‌های مکانیکی و اکسیدانی را کاهش دهد (۱۳).

از طرفی طب سنتی سالها است که به عنوان منبع ارزشمندی در صنعت داروسازی می‌باشد و ایران سابقه طولانی در استفاده از ترکیبات طبیعی بویژه گیاهان دارد. بسیاری از داروهای متداول از منابع گیاهی منشأ گرفته‌اند. در گذشته پایه بسیاری از داروها از جمله آسپیرین، دیگوسین و مورفین گیاهی بود (۱۴). همچنین نشان داده شده که یک سری از ترکیبات طبیعی از جمله گیاهان باعث القاء مسیره‌ای آپوپتوز می‌شوند که در سلولهای سرطان مهار شده‌اند. توانایی القاء آپوپتوز در سلولهای سرطانی و توقف تکثیر این سلولها موضوع بسیاری از تحقیقات ایمونوفارماکولوژی می‌باشد. از جمله علل اصلی بروز سرطانها می‌توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی‌ها اشاره کرد (۱۳). فرآورده‌های طبیعی به ویژه گیاهان دارای

است (۳). متاستاز فرآیند پیچیده‌ی چند مرحله‌ای است که در نتیجه‌ی گسترش سلولهای سرطانی از یک ضایعه‌ی اصلی به عضو و یا اندام‌های بدن ایجاد شده و منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. سلولهای متاستاتیک دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که آن‌ها را قادر به تکثیر و مهاجرت به بافت‌های طبیعی غیرآلوده می‌کنند. مهاجرت از طریق خون یا غدد لنفاوی اتفاق می‌افتد و هم‌زمان با رگ‌زایی و مصرف مواد لازم برای رشد به بافت‌های دور دست حمله می‌کند (۴). آنژیوژنز یا رگ‌زایی به معنی تشکیل مویرگهای جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد. فرآیند آنژیوژنز نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرآیند پیچیده گسترش و متاستاز تومورها که شامل دورشدن سلولهای سرطانی از محل اولیه خودشان، مهاجرت آنها در طول عروق خونی و لنفاوی و پراکنده شدن آنها در نقاط دور دست است، نیز نقش مهمی دارد. به این ترتیب که هر چه عروق بیشتری در بافت تومور تشکیل می‌شود، سلولهای تومور بیشتری از دیواره نفوذپذیر عروق عبور می‌کنند و وارد گردش خون می‌شوند. بنابراین درمانهای آنتی‌آنژیوژنیک در جلوگیری از رشد و متاستاز تومورها مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند (۵). FGF تولید شده به وسیله سلولهای سرطانی باعث القای تکثیر و افزایش زنده ماندن سلولها اندوتلیال می‌شود، FGFs، فعال کننده کلاژناز هستند و جوانه‌زنی رگ‌های جدید را از عروق خونی منجر می‌شوند. باور بر این است درحالی که VEGF برای آغاز رگ‌زایی در تومورها عمل می‌کند، FGF برای نگه‌داری رگ‌زایی و پیشرفت آن مورد نیاز می‌باشد (۶). مطالعات متعددی همبستگی بین تولید عوامل آنژیوژنز و عود، متاستاز و پیش‌آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان را نشان می‌دهند. بیماران مبتلا به سرطان کلیه با سطح بالایی از فاکتور آنژیوژنیک bFGF نسبت به بیماران با سطوح پایین bFGF در تومورهای اولیه میزان بقای کمتری دارند. در نتیجه افزایش آنژیوژنز با توجه به تولید bFGF ممکن است منجر به افزایش پتانسیل متاستاتیک و در نتیجه کاهش بقای بیماران شود (۷).

پژوهش‌های مختلف نشان دادند ورزش منظم خطر انواع سرطان را کاهش می‌دهد (۸) و موجب کاهش حجم تومور می‌گردد. با این وجود ساز و کارهای آن به طور دقیق مشخص نشده است. زیلینسکی و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند فعالیت استقامتی چگالی ماکروفاژها و نوتروفیل‌های داخل توموری که در تولید سایتوکاین‌های رگ‌زا نقش دارند را به ویژه در مراحل اولیه رشد

پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می‌باشند. بسیاری از داروهای ضد سرطانی که سنتز شده‌اند، از جمله تاکسانها، وینکالکالوئیدها، پودو فیلوتوکسین ها و کامپتوتسینها و ... از ترکیبات گیاهی مشتق شده‌اند و برای درمان سرطان های مختلف متاستاتیک و غیر متاستاتیک استفاده می شود (۱۵). از گیاهان دارویی میتوان به گیاه گزنه اشاره کرد که دارای ۴۰ جنس و حدود ۵۰۰ گونه می‌باشد که اکثر آنها در آمریکا، هند، مالزی و نواحی حاره‌ای می‌رویند. در آفریقا و اروپا گونه‌های این تیره بسیار نادر است. گزنه دارای تانن، موسیلاژ، نوعی ماده مومی، اسید فورمیک، فیتوسترین، نیترات پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن، نوعی گلوکوزید با اثر قرمزکننده پوست است. از سرشاخه‌های گیاه، ماده رنگی اورتیسین به دست می‌آید. محققان نشان دادند که گیاه دارویی گزنه با مهار آنزیم 5α -reductase می‌تواند به عنوان یک داروی موثر برای درمان هیپرپلازی پروستات مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). پژوهش حاضر به دنبال پاسخ به این سوال است که هشت هفته تمرینات استقامتی همراه با مصرف عصاره گزنه چه تاثیری بر بیان ژن MMP2 و FGF2 در موش‌های مبتلا به سرطان ملانوما دارد؟

روش کار

آزمودنی‌های این طرح پژوهشی شامل موش‌های صحرایی نر بالغ ۶-۸ هفته‌ای ویستار با میانگین وزن اولیه ۳۰۰-۳۵۰ گرم بودند. این تحقیق که نتیجه کار گروهی می‌باشد با کد اخلاق شماره IR.IAU.M.REC.1399.008 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت مصوب گردید. این حیوانات پس از خریداری به مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انتقال داده شدند. حیوانات پس از ورود به محیط پژوهش و آشنایی دو هفته‌ای با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان، به صورت تصادفی به ۴ گروه ۱. کنترل ۲- هواز ۳- گزنه ۴- هوازی + گزنه تقسیم شدند. پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس‌هایی از جنس پلی کربنات شفاف به ابعاد $15 \times 26/5 \times 42$ ، دمای $2 \pm$ ۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت 5 ± 55 درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب نگهداری شدند. همچنین حیوانات در طی پژوهش از غذای پلت ساخت شرکت به‌پرورکرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به وزن‌کشی هفتگی) تغذیه شدند و بصورت آزاد از طریق بطری‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها براساس کمیته اخلاقی حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. از آنجا

که موش-های آزمایشگاهی به بیماری‌های تنفسی بسیار حساس هستند، از این رو تهویه مناسب برای جلوگیری از تجمع آمونیاک حاصل از ادرار حیوانات در محل نگهداری قرار داده شد. تمرین هوازی چهار روز بعد از شروع مکمل دهی به مدت شش هفته، هفته‌ای ۵ جلسه بر روی تردمیل انجام شد. موش‌ها در گروه تمرین به منظور آشناسازی با تردمیل یک هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۵ روز ورزش کردند. از هفته دوم مرحله اضافه بار به مدت سه هفته تا پایان هفته چهارم اعمال شد. مرحله اضافه بار بدین گونه بود که در هر روز تمرینی ۳ دقیقه به زمان فعالیت و یک متر بر دقیقه به بر سرعت تردمیل افزوده شد، تا اینکه در پایان هفته چهارم سرعت تردمیل به ۲۸ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه فعالیت رسید. از هفته چهارم تا ششم به مدت سه هفته مرحله تثبیت با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه و به مدت یک ساعت ادامه یافت. سلولهای B16F10 از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. این سلولها به دلیل یکسان بودن نوع سلول با گونهی موش مورد مطالعه انتخاب شدند. سلولها در محیط کشت M199 کشت داده شده‌اند و زمانی که تراکم سلول ی به ۸۰ درصد رسید، برای تزریق به موش آماده شدند. تعداد سلول های زنده قبل از تزریق با رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد. به موش‌های موردنظر در روز مطالعه، ۱۰۶ سلول ملانوما به صورت زیر جلدی در پهلوئ چپ تزریق شد (۱۹). جهت تهیه عصاره گزنه مقداری از ساقه و برگ گیاه گزنه را پس از برش به قطعات کوچک جمع‌آوری و شستشو داده، سپس در هوای آزاد خشک کرده و با دستگاه به صورت پودر درآمد. سپس ۶۰ گرم پودر گیاه گزنه را داخل یک بشر ۲/۵ لیتری قرار داده و ۲ لیتر آب مقطر را به آن اضافه کرده و بشر را روی هیتر مخصوص (مدل MR3001 K، شرکت Heidolph آلمان) را حرارت ملایم قرار داده شد. پس از جوشاندن با کاغذ صافی جوشانده مورد نظر تصفیه شد. عصاره گیری داخل دستگاه تقطیر در خلا دوار روتاری (Laboratory ۴۰۰۳ ساخت شرکت Heidolf آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و فشار خلا 65mbar و دور rpm 20 قرار داده شد. برای تهیه محلول، عصاره آبی گیاه گزنه را در آب مقطر حل کرده و برای آنکه کاملاً حل شود و محلولی رقیق و صاف بدست آید آن را داخل لوله فالكون و روی ورتکس قرار دادیم به نحوی که محلول بدست آمده به راحتی از سرنگ انسولین عبور کند، برای تهیه عصاره موردنظر مراحل بالا چندین بار تکرار شد. گروه های تجربی عصاره گزنه را به مدت ۶ هفته و به مقدار ۳۰ میلی گرم روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن

وحید ذوالقدری و همکاران

دستگاه (Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia) با تعداد ۴۰ سیکل استفاده شد. پرایمرهای ۳ ژن به همراه ۱ ژن کنترل یا رفرانس GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) طراحی شد و برای سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد (جدول ۱). برای PCR از 2x master mix و آب، ترکیب پرایمر forward و cDNA، reverse و آب تزیقی استفاده شد. ترکیب حاصله به میزان ۱۰ میکرولیتر در ویال مخصوص دستگاه کوربت تهیه شد و سپس در روتر دستگاه قرار گرفت. میزان سطح mRNAs هر یک از ژنها به طور نسبی در مقایسه با میزان سطح mRNA GAPDH محاسبه گردید.

بدن دریافت کردند. چهار و هشت ساعت بعد از آخرین جلسه فعالیت استقامتی نمونه-گیری انجام شد. موش ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (70 mg/kg) و زایلوزین (3.5 g/kg) بیهوش و به منظور خون گیری از محفظه خارج و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. جهت خون گیری آزمودنی ها به پشت روی میز آزمایشگاه ثابت و با استفاده از سرنگ ۵ سی سی بعد از برش شکم بصورت مستقیم از بطن راست حیوانات خون گیری انجام شد. خون جمع آوری شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ و پس از جداسازی سرم و پلاسما، بافت های مورد نظر برداشته شده و در تانک اذت ۸۰- درجه فریز شد. برای بررسی بیان ژنها از تکنیک Real time PCR توسط

جدول ۱. مشخصات توالی پرایمرهای مربوط به هر یک از ژنها

Gene	Forward	Reverse
MMP2	AGCGAGTGGATGCCGCCTTAA	CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
FGF2	AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG	CCTTTGATAGACACAACCTCCTCTC

انجام شد.

یافته ها

داده های حاصل از متغیرهای تحقیق برای ۴ گروه در قالب (جدول ۲) به صورت توصیفی آورده شده است. میانگین و انحراف معیار مربوط به سطح بیان ژن MMP2 در گروه های مختلف مورد مطالعه نشان می دهد که کمترین غلظت MMP2 در گروه گزنه و بیشترین سطوح آن در گروه های هوازی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می دهد که کمترین غلظت FGF2 در گروه گزنه و بیشترین سطوح آن در گروه هوازی مشاهده شد.

توصیف کمی داده ها با استفاده از شاخص های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک و بررسی تجانس واریانس ها از آزمون لویین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه های مختلف از روش آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی در برنامه ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار مربوط به متغیرهای تحقیق

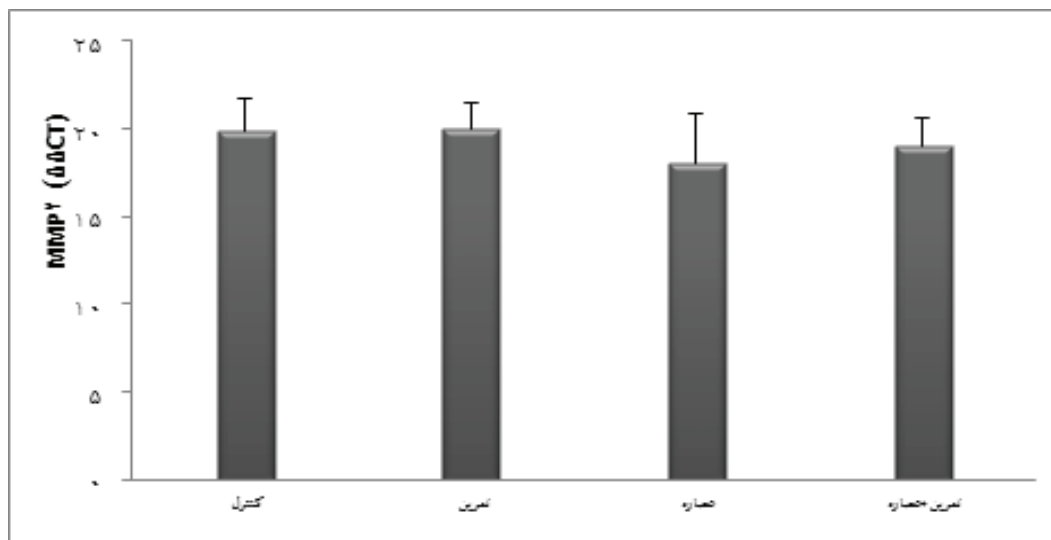
متغیر	گروه	
	FGF2	MMP2
کنترل	۱۸/۴۹±۰/۸۴	۱۹/۸۷±۱/۸۷
هوازی	۲۰/۹±۲/۶۸	۱۹/۹۹±۱/۵
گزنه	۱۸/۲۲±۰/۵۷	۱۸/۰۲±۲/۷۹
هوازی+گزنه	۱۸/۳±۱/۷۱	۱۹/۰۵±۱/۵۷

گروه تمرین هوازی در مقایسه با سایر گروه ها روند افزایشی داشت، ولی به سطح معناداری نرسید. همچنین مقادیر بیان ژن MMP2 و FGF2 در گروه های گزنه و ترکیبی روند کاهش غیر معناداری داشت (جدول ۳ و نمودار ۱) (جدول ۴ و نمودار ۲).

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد بیان ژن MMP2 و FGF2 در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل تفاوتی نداشت به ترتیب $p = 0.064$ و $p = 0.405$. هر چند مقادیر بیان ژن MMP2 و FGF2 در

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن MMP2 در گروههای مختلف

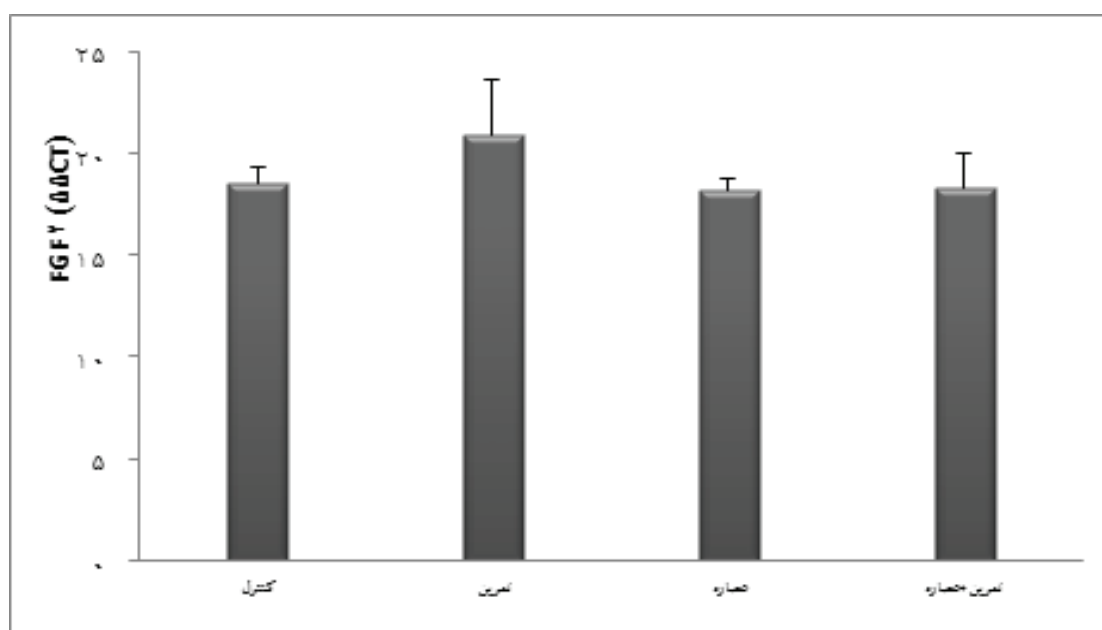
متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
بین گروه ها	۱۲/۴۱۵	۳	۴/۱۳۸		
درون گروه	۶۴/۱۸	۱۶	۴/۰۱۱	۱/۰۳۲	۰/۴۰۵
مجموع	۷۶/۵۹۵	۱۹			



نمودار ۱. تغییرات بیان ژن MMP2 در گروههای مختلف تحقیق

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن FGF2 در گروههای مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
بین گروه ها	۲۴/۸۳	۶	۸/۲۷۷		
درون گروه	۴۴/۸۵	۱۶	۲/۸۰۳	۲/۹۵۳	۰/۰۶۴
مجموع	۶۹/۶۸	۱۹			



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن FGF2 در گروههای مختلف تحقیق

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره گزنه و تهرینات هوازی بر سطح بیان ژن MMP2 و FGF2 در گروه‌های مختلف تأثیر معناداری ندارد. اگرچه افزایش غیرمعناداری در گروه تهرین مشاهده شد، ولی روند کاهشی در گروه های عصاره و ترکیبی محسوس‌تر بود؛ هر چند به سطح معناداری نرسید. امروزه درمان سرطان بیشتر از تومورهای اولیه روی بیماریهای متاستاتیک تمرکز دارد. اکنون ما می‌دانیم که گسترش تومور اولیه و متاستاز به اندامهای دور، بستگی به تشکیل رگهای خونی جدید دارد که باعث افزایش دسترسی اکسیژن و مواد مغذی به تومور می‌شوند. تومورهای جامد بزرگ شامل سلولهایی هستند که یک یا چند عامل آنژیوژنیک مانند فاکتور رشد فیبروبلاست پایه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی را آزاد می‌کنند. بهترین استراتژی برای مهار آنژیوژنز، به جای جلوگیری از تولید یک عامل آنژیوژنیک خاص از سلولهای توموری توانایی سلول اندوتلیال را برای شرکت در روند آنژیوژنز را متوقف می‌کند، زیرا انعطاف پذیری جمعیت سلولهای تومور به طور کلی منجر به گسترش سلولها و تولید فاکتورهای رگ زایی دیگر می‌شود (۱۶). اگر آنژیوژنز یک عامل مهم در پیشرفت تومور باشد، آنگاه مسدود کردن آنژیوژنز باید مانع پیشرفت سرطان شود. الزم به ذکر است که تومورهای بدخیم همزمان چندین فاکتور رگ‌زایی را ترشح می‌کنند. VEGF یک فاکتور رگ‌زایی است که به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. واضح است که اکثر مهارکننده‌های آنژیوژنز در حال حاضر در آزمایش‌های بالینی مسیر سیگنالینگ VEGF را هدف قرار می‌دهند. بسیاری از تومورها در ابتدا به درمان با هدف‌گیری VEGF تنها به دلیل فرار از تومور پاسخ می‌دهند. فرار از تومور به یک سلول توموری اشاره دارد که در پاسخ به مسدود شدن یک مسیر آنژیوژنیک باعث افزایش بیان عوامل متعدد آنژیوژنیک دیگر می‌شود. به عنوان مثال، تومورهایی که در معرض استراتژیهای ضد VEGF هستند، ممکن است FGF یا سایر عوامل آنژیوژنیک را تعدیل کنند (۱۷). آنژیوژنز بر پیش‌آگهی سرطانهای انسان تأثیر دارد. مطالعات متعددی همبستگی بین تولید عوامل آنژیوژنز و عود، متاستاز و پیش‌آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان را نشان می‌دهند. بیماران مبتلا به سرطان کلیه با سطح بالایی از فاکتور آنژیوژنیک bFGF نسبت به بیماران با سطح پایین bFGF در تومورهای اولیه، میزان بقای کمتری دارند. در نتیجه افزایش آنژیوژنز با توجه به تولید bFGF ممکن است منجر به افزایش پتانسیل متاستاتیک و در نتیجه کاهش بقای بیماران شود (۱۸). FGF ها

وحید ذوالقدری و همکاران

خانواده‌ای از ۲۲ پروتئین هستند که توسط سلول‌های بنیادی ترشح می‌شوند و به میوسیت‌های قلبی و سلول‌های اندوتلیال عروقی آسیب می‌رسانند. FGF نشان داده است که باعث تحریک سلول‌های اندوتلیال، تکثیر، مهاجرت، مورفوژنز و بقا، تخریب ماتریس خارج سلولی با تحریک ترشح پروتئازها، مانند فعال کننده پلاسمینوژن و متالوپروتئینازها و بلوغ عروق می‌شود (۱۹). علاوه بر رگ زایی، FGF-2 در محافظت از قلب نقش دارد و تمایز غیر میوسیت‌های قلبی را به کاردیومیوسیت‌های عملکردی تنظیم می‌کند. فعالیت رگ‌زایی FGF ها از طریق اتصال به گیرنده‌های سطح سلول، از جمله تیروزین کیناز FGFRs، اینترگرین‌ها و پروتئوگلیکان سولفات هپارین، از طریق مسیر Ras/MAP-kinase رخ می‌دهد. علاوه بر این فعالیت FGF-2 تا حدی غیرمستقیم است، زیرا فرآیند رگ‌زایی با اثرات هم‌افزایی با مولکول‌های مختلف مرتبط با ماتریس خارج سلولی، مانند VEGF ها و سیتوکین‌ها و کموکاین‌های التهابی تعدیل می‌شود (۲۰).

در تحقیق حاضر سطوح MMP2 در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها بالاتر بود. گودزالسکا و همکاران در پژوهشی به بررسی سطوح بیان ژن متالوپروتئیناز ماتریکس در سلولهای سرطانی پرداختند. نتایج نشان داد که سطوح MMP2 در سلول‌های سرطانی بیان افزایشی داشت که با نتایج تحقیق حاضر همسو است (۲۱). سطوح بیان ژن MMP2 در گروه‌های عصاره گزنه و ترکیبی (گزنه و تهرین هوازی) روند کاهشی داشت. یافته‌ها نشان می‌دهد که شاید MMP2 را بتوان به عنوان عوامل پیش‌آگهی سلول‌های سرطانی استفاده کرد. گیگانتی و همکاران در پژوهشی به بررسی فعالیت جسمانی بر سطوح MMP2 و MMP9 در افراد مبتلا به سرطان پستان پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح MMP2 سرم توسط فعالیت جسمانی تعدیل می‌شود (۲۲). MMP‌های در گردش در تجزیه ECM در سرطان‌زایی و بیماریهای قلبی عروقی نقش دارند. MMP ها فعال‌سازی فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها و رگ‌زایی را تعدیل می‌کنند و سازگاری فیزیولوژیکی با ورزش را تسهیل می‌کنند (۲۳). با این حال، سطوح بالای استرس مکانیکی، مانند تحریک ناشی از تهرینات فیزیکی زیاد، ممکن است تولید موضعی MMP ها را در ماهیچه‌های اسکلتی فعال کند. رولمن و همکاران (۲۴) گزارش کردند که یک جلسه تهرین باعث فعال شدن MMP-9 شده و باعث افزایش قابل توجه غلظت سرمی MMP-9 می‌شود. کادوگلو و همکاران (۲۵) نشان دادند که ورزش سطح سرمی MMP-9 را کاهش می‌دهد،

اما سطح MMP-2 را در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 کاهش نمی‌دهد. مطالعات اضافی عملکرد گردش MMP-2 و MMP-9 را در بیماران BC بررسی کرده است. نتایج نشان داد افزایش بیان و فعالیت MMP-9 در تومورهای بدخیم و افزایش فعالیت MMP-2 در تومورهای بدخیم که بیان گیرنده استروژن بالا را نشان می‌دهند. این مطالعات نشان می‌دهد که سطح سرمی MMP-2 یا 9- ممکن است نشانگرهای مفیدی برای مرحله‌بندی و پیش‌آگهی باشد (۲۶). قبلاً نشان داده شده بود که تمرینات استقامتی غلظت MMP-9 و تمرینات هوازی باعث کاهش سطح پلاسمایی MMP-2 در افراد دارای شرایط پاتولوژیک می‌شود (۲۷). اورسو و همکاران (۲۸) مشاهده کردند که تغییرات در سطح سرمی MMP-2 و 9- به رژیم‌های مختلف تمرینی وابسته است. مطالعه قبلی ما در مورد ورزش در بیماران به درک اثرات تعدیل کننده ورزش بر تنظیم MP-2 و MMP-9 کمک کرد. نشان داده شد که سایتوکاین‌های مشتق شده از ماهیچه‌ها پس از یک برنامه تمرینی آزاد می‌شوند، در حالی که استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (۲۹). تغییرات در سطح سرمی MMP ممکن است تأثیر ورزش بر تولید مولکول‌های التهابی را منعکس کند. این فرضیه وجود دارد که ورزش باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود که ممکن است بر شرایط التهابی تأثیر گذاشته و متعاقباً غلظت سرمی MMP را تغییر دهد. اثرات مختلف ورزش مشاهده شده بر سطح سرمی MMP-2 و 9- ممکن است با پاسخ‌های متفاوت وابسته به دوز به فعالیت بدنی مرتبط باشد (30). از طرفی آنزیمهای انعقادی در فعال شدن MMP-2 نقش دارند، به عنوان مثال، پلاسمینوژن اوروکیناز، پلاسمینوژن را به پلاسمین تبدیل می‌کند، که باعث رشد و رگ‌زایی تومور می‌شود، ECM و غشای پایه را تخریب می‌کند و pro-MMP ها را فعال می‌کند (۳۱). MMP ها و فعال کننده‌های پلاسمینوژن اوروکیناز در تهاجم تومور و متاستاز نقش دارند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MMP-2 در گروه کنترل سرطانی افزایش دارد. این نتایج ممکن است به دلیل افزایش بیان فعال کننده پلاسمینوژن اوروکیناز باشد، زیرا نشان داده شده است که ورزش فعالیت فیبرینولیتیک پلاسمینوژن را افزایش می‌دهد. علاوه بر این ورزش جامع با افزایش بیان فعال کننده پلاسمینوژن در پلاسمینوژن همراه است و ترومبین و پلاسمین

تخریب شده توسط ورزش قبلاً در افراد سالم که به مدت طولانی‌تری ورزش می‌کردند، مشخص شد (۳۳). تمرینات بدنی طولانی مدت با تغییرات متعدد در هموستاز خون همراه است و سطوح بالاتری از آمادگی هوازی با افزایش فعالیت فیبرینولیتیک همراه است، در حالی که فعال شدن MMP-2 توسط مهار کننده‌های پلاسمین مهار می‌شود (۳۴). اینتگرین‌های فعال بیان MMPها را تقویت می‌کنند که ماتریس خارج سلولی را تخریب می‌کند تا محصولات تخریب شده‌ای مانند کلاژن و فیبرونکتین تولید کند. این محصولات به عنوان لیگاند برای اینتگرین‌های متعدد عمل می‌کنند که اثرات آنها را روی رگ‌زایی و تهاجم تومورها تقویت می‌کند. فیبریل کلاژن تخریب شده توسط MMP-1 و MMP-2 به عنوان یکلیگاند برای اینتگرین $\alpha v \beta 3$ عمل می‌کند، در حالی که فیبرونکتین به عنوان یک لیگاند برای اینتگرین $\alpha 5 \beta 1$ ، در مرحله رشد ملانوم عمل می‌کند (۳۵). اتصال این لیگاندها به اینتگرین‌های مربوطه آشارهای سیگنالینگ مورد نیاز برای تبدیل بدخیم ملانوسیتها را فعال می‌کند و بیان MMP را در این سلولها تحریک می‌کند، در نتیجه تهاجم آنها را افزایش داده و باعث هضم ماتریس بیشتر می‌شود. مطالعات بر روی مدل‌های موش نشان داده است که آنها هر دو عامل آنژیوژنز تومور ناشی از VEGF و عامل رشد فیروبلست (FGF) 2- را تعدیل می‌کنند (۳۶). مهارکننده‌های MMP به عنوان تک‌درمانی یا در ترکیب با شیمی‌درمانی نتایج امیدوارکننده‌ای از جمله حداقل عوارض جانبی را در مدل‌های پیش‌بالینی ملانوم به همراه داشت. در واقع، MMPها دارای دو نقش ضد رگ‌زایی و ضد حساسیت‌زایی هستند که به پیچیدگی هدف قرار دادن آنها با یک درمان موثر می‌افزاید (۳۷).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که احتمال دارد گزینه فعالیت آنژیوژنیک و میزان فاکتور پیش‌آگهی سرطان را در موش‌های مبتلا به سرطان ملانوما کاهش دهد.

سپاسگزاری

به این وسیله از زحمات‌های دکتر حسین عابد نطنزی که در اجرای این کار گروهی با ما همکاری نمودند تشکر می‌نماییم.

References

- Jena J, Ranjan R, Ranjan P, Sarangi MK. A Study on Natural Anticancer Plants. *Int J PharmaceutChem Sci*. 2012 Jan; 1(1): 365-8.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA CANCER J CLIN*. 2015 Jan; 65(1):5- 29 <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Esther E, Salina MT. A new understanding in the epidmiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer*. 2010; 10 (11): 1811-23 <https://doi.org/10.1586/era.10.170>
- David A. Kirchar DA, Mark R, et al. Melanoma brain metastasis mechanisms models and medicine. *J MolSci*. 2016; 17 (7): 1-29 <https://doi.org/10.3390/ijms17091468>
- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003; 3(7): 643-51 <https://doi.org/10.2174/1566524033479465>
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22(4): 201-207 [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X)
- Rajabi M, Mousa SA. The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines*. 2017; 5(2): 34 <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020034>
- Na H-K, Oliynyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1229: 176-83 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06105.x>
- Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol*. 2004; 96: 2249-56 <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01210.2003>
- Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, et al. *Cytokine* 2011; 55: 274-9. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.007>
- Pedersen BK. Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. *Brain Behav Immun*. 2011; 25: 811-6 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.010>
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5:a008656 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4:330-349.. <https://doi.org/10.18632/aging.100459>
- Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. *APJCP*. 2003 Jul; 4(4): 281-8
- Flanagan L, Meyer M, Fay J, Curry S, Bacon O, Duessmann H, John K, Boland KC, McNamara DA, Kay EW, Bantel H, Schulze-Bergkamen H, Prehn JH. Low levels of caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell Death Dis*. 2016; 7:e2087 <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.7>
- Taghizadeh E, Jahangiri S, Rostami D, Taheri F, Renani P, Taghizadeh H, et al. Role of E6 and E7 Human Papillomavirus Proteins in Molecular Pathogenesis of Cervical Cancer. *Current protein & peptide science*. 2019 <https://doi.org/10.2174/1389203720666190618101441>
- Lee J-W, Yang DH, Park S, Han H-K, Park J-W, Kim BY, et al. Trichostatin A resistance is facilitated by HIF1 α acetylation in HeLa human cervical cancer cells under normoxic conditions. *Oncotarget*. 2018; 9(2): 2035 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23327>
- Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resistance Updates*. 2010; 13(1- 2):16-28 <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.12.001>
- Tanaka M, Yonemitsu Y, Higashi Y, Murohara T. Eds.; Fibroblast growth factor in extremities. In *Therapeutic Angiogenesis*. Springer Singapore. 2017; pp: 145-158 https://doi.org/10.1007/978-981-10-2744-4_10
- Shoeibi S, Mozdziaik P, Mohammadi S. Important signals regulating coronary artery angiogenesis. *Microvasc Res*. 2018; 117: 1-9 <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2017.12.002>
- Goździalska A, Wojas-Pelc A, Drąg J, Brzewski P, Jaśkiewicz J, Pastuszczyk M. (). Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal-cell carcinoma. *Molecular biology reports*. 2016; 43(10) : 1027-1033 <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4040-9>
- Giganti MG, Tresoldi I, Sorge R, Melchiorri G, Triossi T, Masuelli L, et al. Physical exercise modulates the level of serum MMP-2 and MMP-9 in patients with breast cancer. *Oncology letters*. 2016; 12(3): 2119-2126 <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4887>

23. Carmeli E, Haimovitch TG, Nemcovsky CE. Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6: 96-102 <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.107>
24. Rullman E, Olsson K, Wagsater D, Gustafsson T. Circulating MMP-9 during exercise in humans. *Eur J ApplPhysiol.* 2013; 113: 1249-1255 <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2545-z>
25. Kadoglou NP, Vrabas IS, Sailer N, Kapelouzou A, Fotiadis G, Noussios G, et al. Exercise ameliorates serum MMP-9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2010; 36: 144-151 <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2009.11.004>
26. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: Correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med.* 2006; Vol 10: 499-510 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00415.x>
27. Koskinen SO, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikkala V, Mäkinen TT, Oksa J, et al. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand J Med Sci Sports.* 2001; 11: 9-15 <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2001.011001009.x>
28. Urso ML, Pierce JR, Alemany JA, Harman EA, Nindl B. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *Eur J ApplPhysiol.* 2009; 106: 655-663 <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1063-0>
29. Tresoldi I, Foti C, Masuelli L, Frajese GV, Rossi P, Modesti A, et al. Effects of dragon boat training on cytokine production and oxidative stress in breast cancer patients. A pilot study. *Open J Immunol.* 2014; 4: 22-29 <https://doi.org/10.4236/oji.2014.41004>
30. NascimentoDda C, DuriganRde C, Tibana RA, Durigan JL, Navalta JW and Prestes J: The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. *Sports Med.* 2015; 45: 269-278 <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0265-8>
31. Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Down-regulation of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinases and up-regulation of their inhibitors by a novel nutrient mixture in human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145. *Oncol Rep.* 2011; 26: 1407-1413
32. Booth NA, Walker E, Maughan R and Bennett B. Plasminogen activator in normal subjects after exercise and venous occlusion: t-PA circulates as complexes with C1-inhibitor and PAI-1. *Blood.* 1987; 69: 1600-1604 <https://doi.org/10.1182/blood.V69.6.1600.1600> <https://doi.org/10.1182/blood.V69.6.1600.bloodjournal6961600>
33. Small M, Simpson I, McGhie I, Douglas JT, Lowe GD, Forbes CD. The effect of exercise on thrombin and plasmin generation in middle-aged men. *Haemostasis.* 1987; 17: 371-376 <https://doi.org/10.1159/000215772>
34. Francis RM, Romeyn CL, Coughlin AM, Nagelkirk PR, Womack CJ and Lemmer JT. Age and aerobic training status effects on plasma and skeletal muscle tPA and PAI-1. *Eur J ApplPhysiol.* 2014; 114: 1229-1238 <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2857-2>
35. Seftor RE. Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha(v)beta3 integrin expression. *Am J Pathol.* 1998;153:1347-51 [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65719-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65719-7)
36. Geissinger E, Weisser C, Fischer P, et al. Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptoticsignalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res.* 2002; 62: 4820-8
37. Pavlaki M, Zucker S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22: 177-203 <https://doi.org/10.1023/A:1023047431869>