



دوفصلنامه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی  
 سال یازدهم، جلد یازدهم، شماره ۱



## اثر مصرف عصاره گزنه و تمرینات هوازی بر بیان ژن VEGF و کاسپاز ۳ در موش های مبتلا به سرطان ملانوما

سیده فاطمه متولی<sup>۱</sup>، علیرضا براری<sup>۲\*</sup>، احمد عبدی<sup>۲</sup>، حسین عابد نطنزی<sup>۲</sup>

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۶

### چکیده

**هدف:** هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر مصرف عصاره گزنه و تمرینات هوازی بر بیان ژن VEGF و کاسپاز ۳ در موش های مبتلا به سرطان ملانوما بود.

**روش کار:** در این تحقیق ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ هشت هفته ای به صورت تصادفی به ۴ گروه شامل گروه های: کنترل، تمرین، عصاره و تمرین+عصاره تقسیم شدند. برنامه تمرین شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل بدون شیب و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه برای هفته اول بود و هر هفته یک متر بر دقیقه اضافه شد تا در هفته هشتم به ۲۲ متر بر دقیقه رسید. یک هفته پس از القا سرطان ملانوما، گروه تجربی میزان ۳۰ mg/kg/day عصاره اتانولی گیاه گزنه را به روش خوراکی و به مدت ۸ هفته مصرف کردند. برای اندازه گیری میزان بیان ژن VEGF و کاسپاز ۳ از روش RT PCR در خون استفاده شد.

**یافته ها:** تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد بیان ژن VEGF در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل روند کاهشی داشت؛ ولی به سطح معناداری نرسید ( $P=0/154$ ). همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ( $P=0/000$ ). همچنین آزمون تعقیبی نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه ترکیبی با سایر گروهها نیز تفاوت معناداری وجود دارد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که احتمال دارد مصرف عصاره گزنه از طریق مکانیسم های مختلف مانند فعالیت آنتی اکسیدانی، القاء آپوپتوز جلوگیری از رشد سلول و مهاجرت سلولها اثرات ضد سرطانی ایجاد کنند.

**واژگان کلیدی:** عصاره گزنه، آپوپتوز، آنژیوژنز، سرطان ملانوما

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، ۲. دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، ۳. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

\*نشانی الکترونیکی نویسنده مسئول: alireza54.barari@gmail.com

## مقدمه

در سراسر جهان افزایش قابل توجه سالانه میزان بروز ملانوم پوستی در چند دهه اخیر مشاهده شده است (۲). ملانوم یک سرطان بسیار تهاجمی است که میزان بروز آن به طور چشمگیری بیشتر از انواع دیگر سرطان در حال افزایش است (۲۹). ملانوما توموری است که در اثر تغییر شکل بدخیم ملانوسیت ها ایجاد می شود. ملانوسیت ها از تاج عصبی مشتق شده اند. در نتیجه ملانوماها، اگرچه معمولاً روی پوست ایجاد می شوند، اما می توانند در مکانهای دیگری که سلولهای تاج عصبی مهاجرت می کنند مانند دستگاه گوارش و مغز بوجود آیند (۳۵، ۳۰). میزان بروز جهانی ملانوم در طول سالها به طور پیوسته افزایش یافته است. در ایالات متحده تقریباً ۱۰۰۰۰۰ مورد جدید ملانوم مهاجم در سال ۲۰۲۱ تشخیص داده می شود و حدود ۷۰۰۰ نفر از این بیماران ملانوم بر اثر این بیماری جان خود را از دست خواهند داد (۲۲). محتمل ترین دلیل برای روند افزایشی در بروز ملانوم، افزایش آسیب ناشی از اشعه ماوراء بنفش (UV) ناشی از تابش طولانی مدت نور خورشید است که به شدت تابش اشعه ماوراء بنفش و رنگ پوست وابسته است (۲۷، ۲۲).

رگ زایی یک فرایند بیولوژیکی است که یک مرحله مهم در پیشرفت تومور را نشان می دهد که در آن سلول ها از یک عروق به مرحله عروقی منتقل می شوند. سلولهای ملانوم به عنوان منبع چندین فاکتور رشد کلاسیک

رگ زایی از جمله فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور نفوذ پذیری عروقی (VPF)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF)، اینترلوکین ۸ (IL-8) و فاکتور رشد جفت (PIGF) هستند که همه این عوامل در فرآیند رگ زایی مهم و موثر هستند (۳۹). VEGF اغلب به عنوان یکی از مهمترین واسطه های رگ زایی در نظر گرفته می شود. سلولهای ملانوم VEGF را تولید کرده و به درون ماتریکس خارج سلولی ترشح می کنند (۴۱، ۱۴). VEGF با تعامل و تحریک خانواده گیرنده های تیروزین کیناز، گیرنده های (VEGFRs) VEGF به واسطه تعامل با خانواده غشایی متصل به آن، عمل می کنند (۲۸، ۴، ۹). از طرفی آپوپتوز که به عنوان مرگ برنامه ریزی شده سلولی نیز شناخته می شود، فرایندی با ویژگی های ریخت شناسی معمولی شامل کاهش اندازه سلول، تراکم سیتوپلاسم، دفع غشای پلاسمایی و تکه تکه شدن کروماتین است. وظایف اصلی آن در ارگانیسم ها حذف فیزیولوژیکی سلول های غیر طبیعی در طول توسعه و حفظ هموستاز بافت است (۳۳). بنابراین اختلال در تنظیم آپوپتوز در پاتوزن انواع بیماریها مانند سرطان، اختلالات عصبی، اختلالات قلبی عروقی و بیماریهای خود ایمنی دخیل است (۸). کاسپازها مولکولهای سیگنالینگ فعال را ایجاد می کنند که در آپوپتوز شرکت می کنند و بر اساس مکانیسم عمل آنها طبقه بندی می شوند که شامل کاسپازهای آغازگر (کاسپاز ۸- و کاسپاز ۹-) و کاسپازهای نابود

های مکانیکی و اکسیدانی را کاهش دهد (۳۲).

طیف گسترده ای از بیماریهای مزمن را می توان با استفاده از مولکولهای فعال زیستی غذا جلوگیری کرد (۲۶). تحقیقات مختلف نشان داد که مصرف مکمل های گیاهی باعث القاء مسیرهای آپوپتوزی می شوند که در سلول ها ی سرطان مهار شده اند (۲۴). تحقیقات زیادی نشان میدهند که خطر ابتلا به سرطان پستان و مرگ ناشی از بیشتر سرطانها در افرادی که فعالیت بدنی منظم دارند، نسبت به افراد غیرفعال کمتر است که احتمالاً با اثرات فعالیت فیزیکی بر توده بدنی، هورمونها و تعادل انرژی و عملکرد سیستم ایمنی مرتبط است. همچنین تحقیقات نشان می دهد ورزش منظم در دوره نوجوانی و بزرگسالی، به کاهش خطر سرطان کمک کند و در بین نجات یافتگان از سرطان، ورزش منظم میتواند عوارض جانبی درمان (پرتودرمانی و شیمی درمانی) را کاهش و احتمال زنده ماندن را افزایش دهد (۳۲، ۲۶، ۲۴). از جمله گیاهان دارویی می توان از گیاه گزنه نام برد که دارای تانن، موسیلاژ، نوعی ماده مومی، اسید فورمیک، یک فیتوسترین، نیترات پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن، نوعی گلوکوزید با اثر قرمزکننده پوست است (۱۱). در این میان فعالیتهای بیولوژیکی گزنه، به دلیل ایجاد یا مهار فرآیندهای کلیدی در متابولیسم سلولی و توانایی فعال کردن مسیرهای آپوپتوز، پژوهشی را در خصوص اثرات ضد سرطانی

کننده (کاسپاز-۳، کاسپاز-۶ و کاسپاز-۷) هستند (۲۳). کاسپاز-۳ یک کاسپاز موثر در مسیرهای آپوپتوز می باشد، یک پروآنزیم ۳۲ کیلو دالتونی غیر فعال که شاخه آسپاراتات آن شکسته می شود تا زیر واحد p12 و p17 ایجاد شود و آنزیم فعال کاسپاز-۳ را که مسئول تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در آپوپتوز است، تشکیل دهد (۱۰). شاخص آپوپتوز بیان پروتئین ناهنجر کاسپاز ۳ در بسیاری از سرطان ها مانند سرطان معده، کارسینوم سلولهای کبدی، سرطان پروستات، گلیوبلاستوما و سرطان سینه مورد مطالعه قرار گرفته است (۷، ۱۹). با این حال بیان آن در سرطان ملانوم گزارش نشده است.

تحقیقات مختلفی در زمینه تأثیر فعالیتهای و تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۷). امروزه فعالیت بدنی منظم به عنوان راهکاری در جهت ارتقاء سلامت بافتهای بدن و بهبود دستگاه دفاعی آنتی اکسیدانی مطرح بوده است. در این زمینه، تعدادی از پژوهشگران عنوان کردند که یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ۴۸ ساعت بعد از فعالیت می تواند موجب تسریع در فرآیند آپوپتوز شود (۴۰). این در حالی است که برخلاف فعالیت های حاد با شدت بالا، انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافتهای مختلف می شود. تمرین و فعالیت بدنی منظم می تواند خطر آسیب دیدگی، استرس اکسایشی و واکنشهای التهابی از آشفستگی

گزنه بر روی سرطان ملانوما انجام دادیم. پژوهش حاضر به دنبال پاسخ به این سوال است که هشت هفته مصرف عصاره گزنه و تمرینات هوازی چه تاثیری بر بیان ژن کاسپاز ۳ و VEGF در موش های مبتلا به سرطان ملانوما دارد؟

### روش پژوهش

در این تحقیق ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با میانگین وزن اولیه ۳۰۰-۳۵۰ گرم از انستیتو پاستور خریداری و به مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انتقال داده شدند. پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس هایی از جنس پلی کربنات شفاف به ابعاد  $۱۵ \times ۲۶/۵ \times ۴۲$ ، دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد، رطوبت  $5 \pm 55$  درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب نگهداری شدند. غذای حیوانات و آب بصورت آزاد و در اختیار تا پایان پروتکل در دسترس بود. حیوانات پس از ورود به محیط پژوهش و آشنایی دو هفته ای با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان، به صورت تصادفی به ۴ گروه ۱. کنترل (سرطانی) ۲- تمرین (سرطانی) ۳- گزنه (سرطانی) ۴- تمرین + گزنه (سرطانی) تقسیم شدند. تمرین ورزشی چهار روز بعد از شروع مکمل دهی به مدت هشت هفته، هفته ای ۵ جلسه بر روی تردمیل انجام شد. موش ها در گروه تمرین به منظور آشنا سازی با تردمیل یک هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر

دقیقه به مدت ۵ روز ورزش می کنند. از هفته دوم مرحله اضافه بار به مدت سه هفته تا پایان هفته چهارم اعمال می شود. مرحله اضافه بار بدین گونه می باشد که در هر روز تمرینی ۳ دقیقه به زمان فعالیت و یک متر بر دقیقه به بر سرعت تردمیل افزوده می شود، تا اینکه در پایان هفته چهارم سرعت تردمیل به ۲۲ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه فعالیت برسد. از هفته چهارم تا ششم به مدت سه هفته مرحله تثبیت با سرعت ۲۲ متر بر دقیقه و به مدت یک ساعت اجرا گردید. سلولهای B16F10 از انیستیتو پاستور ایران یکسان بودن نوع سلول با گونه ی موش مورد مطالعه انتخاب شدند. سلولها در محیط کشت M199 کشت داده شده اند 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 موش های موردنظر در روز مطالعه، ۱۰۶ سلول ملانوما به صورت زیر جلدی در پهلو ی چپ تزریق شد (۱). مقداری از ساقه و برگ گیاه گزنه که از منطقه بیلاقی نمارستاق شهرستان آمل تهیه گردید، پس از برش به قطعات کوچک جمع آوری و شستشو داده، سپس در هوای آزاد خشک گردید 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

خارج و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. جهت خون گیری آزمودنی‌ها 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. برای بررسی بیان ژنها از تکنیک Real time PCR توسط 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 buffer، ترکیب پرایمر forward و reverse، cDNA و آب تزریقی 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 mRNAs ژن GAPDH محاسبه گردید.

Heidolph آلمان) را حرارت ملایم قرار داده شد. پس از جوشاندن با کاغذ صافی جوشانده موردنظر تصفیه شد. عصاره گیری داخل دستگاه تقطیر در خلا دوار روتاری (Laboratory 4003 ساخت شرکت Heidolph آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و فشار خلا ۶۵ mbar و دور ۲۰ rpm 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 فالکون 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. گروه‌های تجربی عصاره گزنه را به مدت ۸ هفته و به مقدار ۳۰ میلی گرم روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه فعالیت استقامتی نمونه‌گیری انجام شد. موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلوزین (۵,۳g/kg) بیهوش و به منظور خون گیری از محفظه

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

Gene	Forward	Reverse
VEGF	5'- ACCTCCACCATGCCAAGT-3'	5'-TAGTTCCTCCGAAACCTGA-3'
Casp3	5'-GTGGAAGTACGATGATATGGC-3'	5'-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3'

## روش آماری

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک و بررسی تجانس واریانس ها از آزمون لوین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی داری هر یک از متغیرهای تحقیق، بین گروههای مختلف از روش آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت مشاهده تفاوت معنی دار آماری از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین سطح معنی داری برای تمام محاسبات  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

داده‌های 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 VEGF در گروه های مختلف مورد مطالعه نشان می دهد که کمترین غلظت VEGF در گروه ترکیبی و بیشترین سطوح آن در گروه کنترل مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می دهد که کمترین غلظت CASPASE 3 در گروه کنترل و بیشترین سطوح آن در گروه تمرین-عصاره مشاهده شد.

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مربوط به متغیرهای تحقیق

گروه‌ها	VEGF (ng/L)	CASPASE 3 (µg/ml)
کنترل	۱۶/۰ ± ۲۲/۵۶	۱۷/۰ ± ۰۴/۲۸
تمرین	۱۵/۳ ± ۲۱/۳۴	۱۷/۰ ± ۸۳/۶۶
عصاره	۱۲/۳ ± ۵۱/۸۱	۱۸/۱ ± ۴۵/۶۶
تمرین+عصاره	۱۲/۳ ± ۰۱/۹۷	۲۲/۰ ± ۶۴/۴۸

تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ( $p=0.001$ ). همچنین آزمون تعقیبی نشان داد که بیان ژن caspase 3 بین گروه ترکیبی با سایر گروهها نیز تفاوت معناداری وجود دارد (جدول ۴ و شکل ۱).

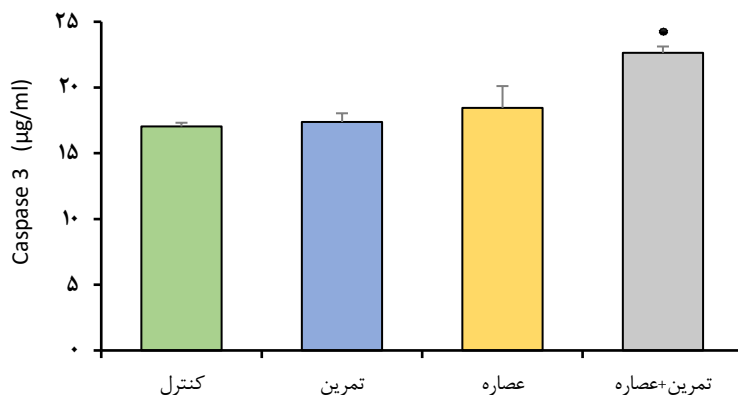
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد بیان ژن VEGF در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل روند کاهشی داشت؛ ولی به سطح معنی داری نرسید ( $p=0.154$ ) (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن caspase 3 در گروه‌های

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

متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	سطح معناداری
VEGF (ng/L)	بین گروه ها	۳	۲۰/۹۳۶	۰/۱۵۴
	درون گروه	۱۶	۱۰/۴۵۷	
	مجموع	۱۹	۲۳۰/۱۲۶	

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن Caspase 3 در گروه‌های مختلف

متغیر	مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	معنی داری
caspase 3 (µg/ml)	بین گروه ها	۶	۳۱/۳۴۱	* ۰/۰۰۱
	درون گروه	۱۶	۰/۸۸۴	
	مجموع	۱۹	۱۰۸/۱۷۱	



شکل ۱. تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های مختلف تحقیق

\* تفاوت معنی دار با گروه‌های کنترل، تمرین و عصاره

بحث

سرطان زایی پوست می شود (۱۳). علاوه بر این چندین مطالعه اخیر اثرات مستقیم VEGF را روی کراتینوسیت ها و سلول های تومور پوست نشان داده اند. این مطالعات نشان داده است که علاوه بر افزایش رگ زایی، VEGF ممکن است با تغییر در بقا و تکثیر کراتینوسیت ها و سلول های توموری به صورت اتوکراین، سرطان زایی پوست را تقویت کند. علاوه بر این سلولهای ایمنی مانند ماکروفاژها می توانند مستقیماً به VEGF پاسخ دهند و مطالعات اخیر نشان می دهد که VEGF ماکروفاژها را برای تومورهای پوستی جذب می کند (۴۲). گزنه دارای تانن، موسیلاژ، نوعی ماده مومی، اسید فورمیک، یک فیتوسترین، نیترات پتاسیم و کلسیم، ترکیبات آهن و نوعی گلوکوزید است. مخصوصاً پلی فنول های موجود در سرطان و ظرفیت آنتی اکسیدانی بالای آن از آسیب سلولی محافظت می کند (۳۷، ۴۲). در تحقیق حاضر سطوح VEGF بعد از ۸ هفته فعالیت ورزشی روند کاهشی نشان داد، هر چند که به سطح معناداری نرسید. تسایی و همکاران در پژوهشی به بررسی تاثیر تمرینات ورزشی بر سطوح فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در موشهای دارای تومور پرداختند. سطح VEGF سرم در بین گروه های تحقیق تفاوت معناداری را نشان نداد (۳۷). در پژوهش آذر و همکاران تاثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر سطح فاکتورهای آنژیوژنز بر روی زنان بی تحرک

تحقیق حاضر نشان داد که مصرف عصاره گزنه و تمرینات هوازی موجب کاهش سطح VEGF در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل شد؛ ولی به سطح معناداری نرسید. سرطان پوست شایع ترین سرطان در بین همه سرطان ها است، با فراوانی فزاینده ای در سه دهه گذشته که شامل کارسینوم سلول های پایه (BCC)، سرطان سلول سنگفرشی (SCC) و ملانوم است. اگرچه ملانوم تنها ۱ درصد از کل سرطان های پوست را تشکیل می دهد، اما مسئول بیشتر مرگ و میرهای ناشی از سرطان پوست است. ملانوما پرخطرترین و خطرناک ترین انواع سرطان پوست است که از سلولهای تغییر شکل دهنده رنگدانه های پوست و ملانوسیت ها ایجاد می شود. چندین مطالعه تأیید کرده اند که سطح VEGF در سلول های توموری در مقایسه با سلول های طبیعی اپیدرمال افزایش یافته است. گروسبی و همکاران نشان دادند که سرطان ملانوما موجب افزایش مقادیر VEGF در موش های مدل ملانوم یووال<sup>۱</sup> شد (۶). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یک عامل قوی آنژیوژنیک است و اکثر مطالعات نقش مهمی برای VEGF در سرطان پوست عنوان کرده اند (۲۵). VEGF موش های تراریخته و شرطی مشمول پروتکل های سرطان زایی پوست مانند مدل سرطان زایی شیمیایی دو مرحله ای، ثابت کرده است که VEGF از طریق القای آنژیوژنز باعث

1. murine model of uveal melanoma



برخی از آنها حاوی محمولات طبیعی فعال و ترکیبات ضد سرطانی، از جمله پلی فنول ها به عنوان فلاونوئیدها و تانن هستند (۳۵). بسیاری از ترکیبات فیتوشیمیایی که به طور معمول در گیاهان بیوسنتز شده و تجمع یافته اند، اقدامات پیشگیرانه شیمی درمانی را نشان داده اند و چندین داروی ضد سرطان از جمله پودوفیلوتوکسین ها، کامپتوتوکسین ها و تاکسان ها، از ترکیبات گیاهی به وجود می آیند و با موفقیت برای درمان ضد سرطان استفاده می شوند (۳). در موش ها درمان با عصاره متانولی گزنه، به احتمال زیاد به دلیل افزایش مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی افزایش یافته است. فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و محتوای گلوتاتیون (GSH) افزایش یافته است. این فعالیتها ممکن است به محتوای فلاونوئید گزنه نسبت داده شود (۳۱). یکی از علائم بارز سرطان، مقاومت در برابر آپوپتوز است، که نشان می دهد القای آپوپتوز در سلول های سرطانی یک مکانیسم مهم ضد سرطان است (۱۲). در سال های اخیر برخی از مطالعات نشان می دهند که فعال سازی کاسپازها، و به ویژه Casp-3، می تواند مستقل از آپوپتوز تأثیر داشته باشد که حتی می تواند تأثیرات معکوس بر مرگ سلولی داشته باشد (۱۶). لی و همکاران مطالعه ای را برای بررسی اثر تمرین ورزشی بر شاخصهای آپوپتوزیس انجام دادند. نتایج مطالعه بیانگر پایین بودن سطوح کاسپاز سه و نه و  $\alpha$ -TNF در عضلات قلبی گروه تمرین نسبت به دو

مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمرین منظم موجب افزایش معنادار سطوح VEGF در مقایسه با پیش آزمون شده است که با نتایج تحقیق حاضر ناهمسو می باشد (۲۱). البته در تحقیق حاضر آزمودنی های حیوانی با مدل سرطان ملانوم مورد بررسی قرار گرفت که می تواند علت تفاوت با تحقیق آذر و همکاران باشد. مسعود زاده و همکاران (۱۳۹۷) در پژوهشی به بررسی اثر عصاره آلورا و تمرینات استقامتی شنا بر سطح VEGF در موش های مبتلا به سرطان سینه پرداختند. نتایج نشان داد که تمرینات استقامتی موجب کاهش معنادار سطوح VEGF شد که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد (۳۶). به طور کلی VEGF واسطه مهم سازگاری آنژیوژنیک با تمرینات مکرر هستند و برای افزایش تراکم مویرگی بافت در پاسخ به سیگنال های هیپوکسیک و التهابی عمل می کنند (۳۸). تحقیقات مختلف نشان داد که تمرینات هوازی در تولید سایتوکاین های رگ زا موثر است و همچنین تمرینات بدنی هوازی سبب کاهش رشد تومور گردید و مصرف عصاره گزنه نیز سبب افزایش اثر ضد التهابی و کاهش حجم التهاب گردید (۳۸، ۱۵، ۳). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف عصاره گزنه و تمرینات استقامتی بر سطح Caspase3 در موشهای مبتلا به سرطان ملانوما در گروههای مختلف افزایش معناداری دارد. گیاهان ممکن است منبع امیدوار کننده ای برای درمان ضد سرطان، به عنوان مکمل جایگزین باشند، زیرا

ترکیبات پلی فنلی هستند که قادرند از طریق مکانیسم های مختلف مانند فعالیت آنتی اکسیدانی، القاء آپوپتوز، جلوگیری از رشد سلول و مهاجرت سلولها، اثرات ضد سرطانی را ایجاد کنند. همچنین مصرف عصاره گزنه همراه با تمرینات هوازی از طریق افزایش بیشتر سطوح کاسپاز ۳ در گروه ترکیبی، حاکی از آن است که اثر تعاملی عصاره و تمرین نقش موثری در القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی داشته است.

در نهایت از زحمات دکتر عابد نطنزی که در زمینه اجرا و هماهنگی این کار تحقیقی با ما همکاری نمودند تشکر می نمایم. ضمناً هزینه های این کار تحقیقی به صورت کامل برعهده دانشجویان دکتری می باشد و تعارض منافعی در این زمینه وجود ندارد. کد اخلاق این کار تحقیقاتی در دانشگاه اسلامی واحد مرودشت وبه شماره IR.IAU.M.REC.1399.008 ثبت گردید.

گروه دیگر بود (۱۸). کاسپازها<sup>۱۵</sup> جزء خانوادهٔ سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می نمایند. به دنبال فعال شدن، این آنزیم ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک از جمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و... ایجاد می نمایند. بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است (۲۰). فعال شدن کاسپاز به میزان زیادی، مختص آپوپتوز است و تعیین فعالیت کاسپازها برای تمایز بین نکروز و آپوپتوز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر نقش و اهمیت کاسپازها در فرایند آپوپتوز، کاسپازها در فرایند تکامل، تمایز و التهاب نیز دخالت دارند (۳۴).

### نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در بین مولکولهای فعال زیستی گزنه، فلاونوئیدها منابع

1. Amjadi F, Javanmard SH, Zarkesh-Esfahani H, Khazaei M, Narimani M. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 21
2. ander Leest RJ, Zoutendijk J, Nijsten T, Mooi WJ, van der Rhee JI, de Vries E, et al. Increasing time trends of thin melanomas in The Netherlands: What are the explanations of recent accelerations? *European journal of cancer.* 2015;51(18):2833-41.
3. Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 2005, 78, 431-441.

4. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* (2002) 200(6):581–97.
5. Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fagnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *European journal of cancer*. 2009;45(17):3054–63.
6. Crosby, M. B., Yang, H., Gao, W., Zhang, L., & Grossniklaus, H. E. (2011). Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with number and location of micrometastases in a murine model of uveal melanoma. *The British journal of ophthalmology*, 95(1), 112–117.
7. dynia G, Grund K, Eckert A, Bock BC, Funke B, MacherGoeppinger S, Sieber S, Herold-Mende C, Wiestler B, Wiestler OD, Roth W. Basal caspase activity promotes migration and invasiveness in glioblastoma cells. *Mol Cancer Res*. 2007; 5:1232-1240.
8. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4:330-349.
9. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)* (1999) 77(7):527–43.
10. 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.
11. Hamilton H, Hall G. *Virginia Native Plants*. King George, Virginia: Black Cat Press; 2005 Mar. 500 p.
12. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
13. Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiyi, K., Brown, L. F., & Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *The Journal of experimental medicine*, 201(7), 1089–1099.
14. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* (2002) 161(1):125–34.
15. Kandaswami, C.; Kanadaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P.P.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 2005, 19, 895–909.
16. Kim, J. S., Ha, J. Y., Yang, S. J., & Son, J. H. (2018). A Novel Non-Apoptotic Role of Procaspase-3 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis Activators. *Journal of cellular biochemistry*, 119(1), 347–357.

17. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol* 2008; 102(5):515-524.
18. Lee, S. D., Shyu, W. C., Cheng, I. S., Kuo, C. H., Chan, Y. S., Lin, Y. M., Tasi, C. Y., Tsai, C. H., Ho, T. J., & Huang, C. Y. (2013). Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 23(6), 566–573.
19. Liu YR, Sun B, Zhao XL, Gu Q, Liu ZY, Dong XY, Che N, Mo J. Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res*. 2013; 23:243-253.
20. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immun Methods* 2002; 265:97-110.
21. Masoudzade G, Barari A, Amini S. Synergistic Effect of Aloe vera Extract and Aerobic Training on Tumor Weight and Volume and Levels of Interleukin 6 and Vascular Endothelial Growth Factor in Mice with Breast Cancer. *ijbd*. 2019; 11 (4) :17-27-
22. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. "Epidemiology of Melanoma". In: WH Ward and JM Farma, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU: Codon Publications (2017). The Authors.
23. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013.
24. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*. 1996 Sep;102(1):17-36.24
25. Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2002). Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 70(9-10), 486–497.
26. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1990 Sep;29(4):273-300.
27. Rawson RV, Johansson PA, Hayward NK, Waddell N, Patch AM, Lo S, et al. Unexpected UVR and non-UVR mutation burden in some acral and cutaneous melanomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2017;97(2):130–45. 10.
28. Robert EG, Hunt JD. Lipid messengers as targets for antiangiogenic therapy. *Curr Pharm Des* (2001) 7(16):1615–26.
29. Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1), 10–29.
30. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* (2021) 70(1):7–33.
31. Ozkol, H.; Musa, D.; Tuluçe, Y.; Koyuncu, I.; Asadi-Samani, M.; Rafieian-Kopaei, M.; Lorigooini, Z.; Shirzad, H. Ameliorative influence of *Urtica dioica*

- L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Drug Chem. Toxicol.* 2012, 35, 251–257.
32. Papathanasiou JV, Ilieva EM, Nikolov FP. Exercise training modes in rehabilitation of patients with chronic heart failure. *Folia Med (Plovdiv)* 2012;54:22-28.
  33. Perez-Garijo A, Steller H. Spreading the word: nonautonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development.* 2015; 142:3253-3262.
  34. Sadowski-Debbing K, Coy J, Mier W, Hug H, Loss M. Caspases – Their Role in Apoptosis and Other Physiological Processes as Revealed by Knockout Studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2002; 50: 19-34.
  35. Tarhini A, Atzinger C, Gupte-Singh K, Johnson C, Macahilig C, Rao S. Treatment patterns and outcomes for patients with unresectable stage III and metastatic melanoma in the USA. *J Comp Eff Res.* 2019 May;8(7):461-473.
  36. Tolouei Azar J, Ravasi A, Soori R, Akbarnejad A, Hemati Nafar M. The Effect of 8 Weeks Aerobic Training on Angiogenesis (VEGF) and Angiostatic (ES) Factors In Sedentary Women. *Stud Med Sci.* 2017; 27 (12):1032-1040
  37. Tsai, M. S., Kuo, M. L., Chang, C. C., & Wu, Y. T. (2013). The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 13(5), 307–313.
  38. Wagner PD. The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *Biochem Soc Trans.* 2011;39:1556.
  39. Wanebo HJ, Argiris A, Bergsland E, Agarwala S, Rugo H. Targeting growth factors and angiogenesis; using small molecules in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* (2006) 25(2):279–92.
  40. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 2012; 318(11):1213-1220.
  41. Yu JL, Rak JW, Klement G, Kerbel RS. Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res* (2002) 62(6):1838–46-
  42. Zhu, J. W., Wu, X. J., Luo, D., Lu, Z. F., Cai, S. Q., & Zheng, M. (2012). Activation of VEGFR-2 signaling in response to moderate dose of ultraviolet B promotes survival of normal human keratinocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(1), 246–256.



## Metabolism and Exercise A bioannual journal

Vol 11, Number 1, 2021



### The effect of nettle extract and aerobic training on the gene expression of VEGF and caspase 3 in mice with melanoma

Motavalli S F<sup>1</sup>, Barari A<sup>2\*</sup>, Abdi A<sup>2</sup>, Abed Natanzi H<sup>3</sup>

Received: 18/10/2021

Accepted: 12/7/2022

Published: 1/8/2022

#### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to evaluate the effect of nettle extract consumption and aerobic exercise on VEGF and caspase 3 gene expression in mice with melanoma.

**Method:** In this study, 20 adult male rats with age of 8 week were randomly divided into 4 groups including: control, exercise, extract and exercise + extract. The training program consisted of 30 minutes of running on a treadmill without a slope at a speed of 16 m/min for the first week, and one meter per minute was added every week until it reached 22 meters per minute in the eighth week. One week after melanoma induction, the experimental group consumed 30 mg /kg /day of nettle ethanol extract orally for 8 weeks. RT PCR in blood was used to measure the expression of VEGF and caspase 3 genes.

**Results:** Data analysis showed that VEGF gene expression was decreased in experimental groups compared to the control group; But did not reach a significant level ( $p = 0.154$ ). The results also showed that caspase 3 gene expression was significantly increased in the experimental groups compared to the control group ( $p = 0.000$ ). Post hoc test also showed that caspase 3 gene expression was significantly different between the combination group and other groups.

**Conclusion:** The results showed that consumption of nettle extract may have anti-cancer effects through various mechanisms such as antioxidant activity, induction of apoptosis inhibition of cell growth and cell migration.

**Keywords:** Nettle extract, Apoptosis, Angiogenesis, Melanoma cancer.

1. PHD student in Exercise Physiology, 2. Associated Professor, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, 3. Assistant Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch

\*Email: alireza54.barari@gmail.com