مجله پلاسما و نشانگرهای زیستی
شماره پیاپی ۶۷، دوره ۱۷، شماره ۳،تابستان۱۴۰۳، صفحه ۱ تا ۱۳
sanad.iau.ir/journal/qjaphd **ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵**

پاسخ بیان ژنβcateninو baxدر بافت کبد موش های مبتلا به سرطان ملانوما به یک دوره تمرینات استقامتی همراه با مصرف عصاره گزنه

جاوید اسماعیل پور[۱]، **علیرضا براری**[۲]،احمد عبدی[۳]، حسین عابد نطنزی[۴]

۱-دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی،گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، آمل.
۲-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، آمل. نویسنده مسئول alireza54.barari@gmail.com
۳-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، آمل.
۴-استادیار،گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۲/۱۸ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: هدف از تحقیق حاضر بررسیپاسخ بیان ژن βcatenin و bax در بافت کبد موش های مبتلا به سرطان ملانوما به یک دوره تمرینات هوازی همراه با مصرف عصاره گزنه بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ به صورت تصادفی به ۴ گروه شامل گروه‌های: 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 mg/kg/day ۳۰ عصاره اتانولی گیاه گزنه را به روش خوراکی و به مدت ۸ هفته مصرف کردند. برای اندازه گیری میزان بیان ژن βcatenin و bax از روش RT-PCR استفاده شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد بیان ژن Beta-catenin در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت؛ ولی به سطح معناداری نرسید (p=0.103). همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن BAX در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت(p=0.026).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می دهد که مصرف عصاره گزنه همراه با تمرینات هوازی از طریق کاهش سطوح BAX و افزایش بتا کاتنین در فعال سازی مسیر سیگنالی WNT/beta-catenin و آپوپتوز محرک ایمنی برای جلوگیری از رشد تومور و پیشرفت مرحله سرطان داشته باشد.

کلمات کلیدی: عصاره گزنه، آپوپتوز، مسیر سیگنالیWNT/beta-catenin، سرطان ملانوما.

مقدمه

ملانوم یک سرطان پوست بسیار تهاجمی است که میزان بروز آن در کشورهای غربی به طور چشمگیری در حال افزایش است. شناسایی مکانیسم مولکولی زیربنای تشکیل ملانوم از اهمیت ویژه ای برخوردار است؛ زیرا این سرطان پتانسیل متاستاتیک بالایی دارد و اغلب به درمان مقاوم است(۱). تغییرات اپی ژنتیکی و ژنتیکی هر دو در ملانوم نقش دارند. جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در مسیرهای سیگنالینگMAP-kinaseو Wnt/بتا-کاتنین و ژن‌های کدکننده تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی، مانند Ink4a، Arfو CDK4توصیف شده است(۲).شواهد اخیر نشان می دهد که ملانوم های پوستی ویژگی های مولکولی مشابهی به ویژه جهش های مشابه در ژن های محرک مانند BRAF، NRASو NF1دارند(۳). نشان داده شده است که این زمینه ژنتیکی در ملانوم منجر به افزایش فعال‌سازی مسیرMAPKو احتمالاً مسیرPI3K/mTORمی‌شود. در ملانوم پوست، مسیر دیگری - مسیرWnt- به طور گسترده مورد ارزیابی قرار گرفته است. این مسیر کاملاً تنظیم شده برای تمایز ملانوسیتی، تبدیل، فرار از پیری، تکثیر سلولی، مهاجرت و همچنین برای متاستاز حیاتی به نظر میرسد(۴).فعال سازی سازنده مسیر سیگنالینگWnt/بتا-کاتنین اغلب در ملانوم مشاهده می شود. با این حال، تنها جهش‌های نادری در ژن‌های کدکننده اجزای مختلف این مسیریافت شده است که معمولاً در سرطان‌های دیگر جهش می‌یابند، مانند آنهایی که Apcو بتا-کاتنین را کد می‌کنند(۵).سیگنال دهیWnt/بتا-کاتنین احتمالاً با تغییر در بیان ژن های کدکننده پروتئین هایی که مستقیماً در مسیر سیگنال دهی دخیل هستند یا با تنظیم این مسیر مرتبط هستند، فعال می شود. تعدادی از اجزای مسیرWnt/بتا-کاتنین شناسایی شده‌اند، اما عملکرد و تنظیم آن‌ها در اصل و نسب ملانوسیت کاملاً قابل درک نیست. در واقع، در بیشتر موارد، مطالعات مربوط به عملکردهای بیولوژیکی این اجزا در سلول‌های اپیتلیال، بیشتر در سرطان‌های روده بزرگ، پستان و هپاتوکارسینوما انجام شده است (۶). ملانوسیت ها سلول های اپیتلیال نیستند و اجزای مختلف مسیرWnt/بتا-کاتنین ممکن است در این نوع سلول عملکرد متفاوتی داشته باشند. تشریح مسیرWnt/بتا-کاتنین در ملانوم باید بینشی در مورد مکانیسم‌های مولکولی و سلولی خاص ملانوسیت درگیر در شروع و/یا پیشرفت ملانوم و نقش این مسیر در تبدیل بدخیم ملانوسیت‌ها فراهم کند(۷).مسیرWnt/بتا کاتنین به عنوان مسیر متعارف نیز شناخته می شود. پروتئین‌هایWntکه این مسیر را فعال می‌کنند، مجموعه‌ای از رویدادها را در سلول ایجاد می‌کنند که منجر به تثبیت مخزن سیتوپلاسمی آزاد بتا کاتنین و انتقال این پروتئین به هسته می‌شود، جایی که رونویسی ژن را تنظیممی‌کند(۸).در ملانوم پوست، تعامل با لیگاندهای مختلف، مسیرWntرا فعال می‌کند. این فرضیه وجود دارد که فعال سازی مسیرWnt، به ویژه از طریق کنترل MITFبا واسطه β-کاتنین، در اوایل رشد تومور رخ میدهد(۹) . بتا-کاتنین با تنظیم مثبت Brn-2تکثیر را افزایش می دهد و با کاهش p16امکان فرار از پیری را فراهم میکند(۱۰).نقش بیانβ-کاتنین در سرطان مورد بحث است، زیرا مشخص شده است که هم در عملکردهای جانبی و هم ضد تومور نقش دارد(۱۱). قبلاً شناخته شده بود که مسیرWntمی تواند با پیامد منفی و مثبت بیمار در چندین نوع تومور مرتبط باشد. این نقش دوگانه β-کاتنین را می‌توان با توجه به اینکه پروتئین‌های خاصی هم اثرات انکوژنیک و هم اثرات سرکوب‌کننده روی زیرمجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند توضیحداد(۱۲).بیان بیش از حد β-کاتنین در سلول های سرطانی ریه باعث ایجاد تومورهای ریه در موش نمی شود، در حالیکه بیان همزمان

β-کاتنین و ژن انکو KRASمنجر به تومورهای ریه و ملانوم میشود(۱۳).در طول چند دهه گذشته، توجه بر روی درک اساس مولکولی سرطان زایی متمرکز شده است. مطالعات نشان داد که عوامل و مکانیسم های متعددی در کنترل سرطان نقش دارند. یکی از این مکانیسم ها آپوپتوز است. آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولییک تنظیم کننده کلیدی کنترل رشد فیزیولوژیکی و هموستاز بافتی است. مرگ سلولی، عمدتاً توسط آپوپتوز، نقش مهمی در تنظیم تشکیل تومور دارد و همچنین پاسخ درمانی را تعیین میکند(۱۴).مسیر آپوپتوز یکی از مسیرهای سیگنالینگ حیاتی با خانواده های مختلف ژنی و پروتئینی است که به عوامل آپوپتوز متعددی مانند کمبود فاکتورهای رشد، اتصال لیگاندFasو شیمی درمانی پاسخ میدهد(۱۵). در مسیر آپوپتوز، اعضای ضد و پرو آپوپتوز، از جمله خانواده Bcl-2(B-celllymphoma 2; Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1, A1)، نقش مهمی به عنوان ضد آپوپتوز در کنترل آپوپتوز و اعضایپرو آپوپتوز(BAX, BAK, BOK) دارند.ارتباط بین فعال‌سازی مسیر-Wnt/β catenin و القای آپوپتوز از طریق مسیرهای بیرونی و درونی، شامل بیان بیش از حد Bcl-2 Associated X(Bax)، کاسپازهای ۸، ۹ ،۳، Bcl-2 و Sox-1نیز مشاهده شده است(۱۶).ارتباط بین مسیرWnt/β-کاتنین و فرآیندهای سلولی مانند آپوپتوز و تکثیر را می توان با این واقعیت نشان داد که مهار و بیان بیش از حد β-کاتنین به ترتیب در چندین مدل موش و در رده های سلولی پستانداران باعث ترویج آپوپتوز و مهار تکثیر میشود(۱۵).پروتئین پرو آپوپتوتیکBAXمرگ سلولی را از طریق مشارکت در اختلال در میتوکندری کنترل می کند و بیان آن توسط ژن P53سرکوبگر تومور تنظیم می شود. تنظیم مثبت BAXباعث افزایش باز شدن کانال آنیون وابسته به ولتاژ میتوکندری می شود که منجر به از دست دادن پتانسیل غشاء با آزاد شدن سیتوکرومc میشود(۱۷).

گیاهان منابع بسیار مفید مولکول های زیست فعال بوده و هستند. بسیاری از این مولکول ها دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد جهش زا، ضد سرطان زا یا سم زدایی سرطان هستند که آنها را به عنوان کاندیدهای موثر شیمیایی در برابر بسیاری از انواع سرطان ها تبدیل میکند(۱۸).اینفیتوکمیکال‌های رژیمی طبیعی در بسیاری از انواع سرطان از جمله ملانوما مؤثر هستند و اثرات ضد تکثیر، ضد تهاجمی و ضد متاستاتیک را ایجاد کرده‌اند که اغلب با توانایی آنها در هدف قرار دادن PI3K/Akt/mTOR و سایر مسیرهای سیگنال دهی درگیر در سرطان زایی ملانوم (ملانوموژنز)مرتبط است. گزنه با نام علمیUrtica dioica گیاهی است علفی و و دارای پاهای منشعب و ساقه مستقیم و برگهای ازکرک پوشیده شده است(۱۹). مطالعات اثر مهاری تکثیر سلولی را بر روی سلول های سرطانی پروستات توسط عصاره های آبی و اتانولی گیاهگزنه نشان داده است. همچنین گزارشی به اثرات ضد سرطانی این گیاه در برابر سرطان مری اشاره کرده است(۲۰). گیاه گزنه دارای ترکیبات فنل آنتی اکسیدانی هستند که ممکن است نقش مهمی در پیشگیری از سرطان داشته باشند. در مطالعه‌ای، اثر ضد تکثیری عصاره ریشه گزنه بر سلول‌های سرطان پروستات انسانی ثابت شده است(۲۱). از طرف دیگر فعالیت بدنی می تواند میزان عود سرطان را کاهش دهد و کیفیت زندگی بیماران سرطانی را بهبود بخشد(۲۲). در سال‌های اخیر، روش‌های ورزشی سنتی مانند تای چی ارتباط نزدیکی با عملکرد ایمنی انسان و بهبود سلامت انسان نشان داده‌اند(۲۳). مطالعات بیشتری بر روی عملکردهای ورزش در تنظیم تومورها متمرکز شده‌اند، اما مکانیسم‌های دقیق به طور کامل درک نشده‌اند(۲۴).با توجه به نقش فعالیت بدنی منظم در ارتقا

سلامت بافت های بدن و بهبود مکانیسم دفاعی و همچنین گرایش روزافزون استفاده از فراورده های طبیعی به دلیل ایجاد یا مهار فرآیندهای کلیدی در متابولیسم سلولی و توانایی فعال کردن مسیرهای سیگنالی مرتبط ، پژوهش حاضر پاسخ بیان ژن beta-catenin و BAXدر بافت کبد موش های مبتلا به سرطان ملانوما به یک دوره تمرینات هوازی همراه با مصرف عصاره گزنه را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روشها:

در این تحقیق ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با میانگین وزن اولیه ۳۰۰-۳۵۰گرماز انستیتو پاستور خریداری و به مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انتقال داده شدند. کد اخلاق این تحقیق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تایید و به شماره IR.IAU.M.REC.1399.008می باشد. پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس هایی از جنس پلی کربنات شفاف به ابعاد ۱۵ × ۲۶/۵ × ۴۲ ، دمای ۲ ± ۲۲ درجهسانتیگراد،رطوبت ۵ ± ۵۵ درصدوچرخهروشناییبهتاریکی ۱۲:۱۲ باتهویه 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 شش هفته، هفتهای ۵ جلسه بر روی تردمیل انجام شد. موشها 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 ۲۸ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه فعالیت برسد. از هفته چهارم تا ششم به مدت سه هفته مرحله تثبت با سرعت ۲۸ متربر دقیقه و به مدت یک ساعت ادامه خواهد یافت.

سلولهای B16F10از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. اینسلولها به دلیل یکسان بودن نوع سلول با گونهی موش موردمطالعه انتخاب شدند. سلولها در محیط کشتM199 کشت داده شده اند و 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،۱۰۶سلول ملانوما بهصورت زیر جلدی در پهلوی چپ تزریقشد(۲۵).

مقداری از ساقه و برگ گیاه گزنه را پس از برش به قطعات کوچک جمع آوری و شستشو داده، سپس در هوای آزاد خشک کرده و با دستگاه به صورت پودر درامد. سپس ۶۰ گرم پودر گیاه گزنه را داخل یک بشر ۲/۵ لیتری قرار داده و ۲ لیتر آب مقطر را به ان اضافه کرده و بشر را روی هیتر مخصوص (مدل MR3001 K، شرکت Heidolphl 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 Heiodolf آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و فشار خلا mbar۶۵ و دور ۲۰ rpm قرار داده شد. برای تهیه محلول، عصاره آبی گیاه گزنه را در آب مقطر حل کرده و برای انکه کاملا حل شود و محلولی رقیق و صاف بدست آید ان را داخل لوله فالکون و روی ورتکس قرار دادیم به نحوی که محلول بدست امده 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 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 نمونه-گیری انجام شد. موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰mg/kg) و زایلوزین (۵.۳g/kg) بیهوش و به منظور خون گیری از محفظه 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 بهمراه ۱ ژن کنترل یا رفرانس GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) طراحی شد و برای سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد (جدول۱). برای PCR از 2x master mix buffer، ترکیب پرایمر forward و reverse، cDNA و آب تزریقی استفاده شد. ترکیب حاصله به میزان ۱۰ مایکرولیتر 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.

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

Gene	Forward	Reverse
Beta-catenin	CACAAGCAGAGTGCTGAAGGTG	GATTCCTGAGAGTCCAAAGACAG
BAX	ATG GAC GGG TCC GGG GAG	ATC CAG CCC AAC AGC CGC

توصیف کمی داده هابااستفاده ازشاخصهای پراکندگی مرکزی ازقبیل میانگین وانحراف استانداردانجام شدوجهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها ازآزمون شاپیرو ویلک وبررسی تجانس واریانس هاازآزمون لوین استفاده شد. همچنین برای بررسی تغییرات معنی داری هریک ازمتغیرهای تحقیق،بین گروههای مختلفازروشآنالیزواریانس 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 $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

نتایج :

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 Beta-cateninو BAXدر گروه های مختلف مورد مطالعه نشان می دهد که کمترین غلظت Beta-cateninدر گروه کنترل و بیشترین سطوح آن در گروه ترکیبی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می دهد که کمترین غلظت BAXدر گروه ترکیبیو بیشترین سطوح آن در گروه کنترل مشاهده شد.

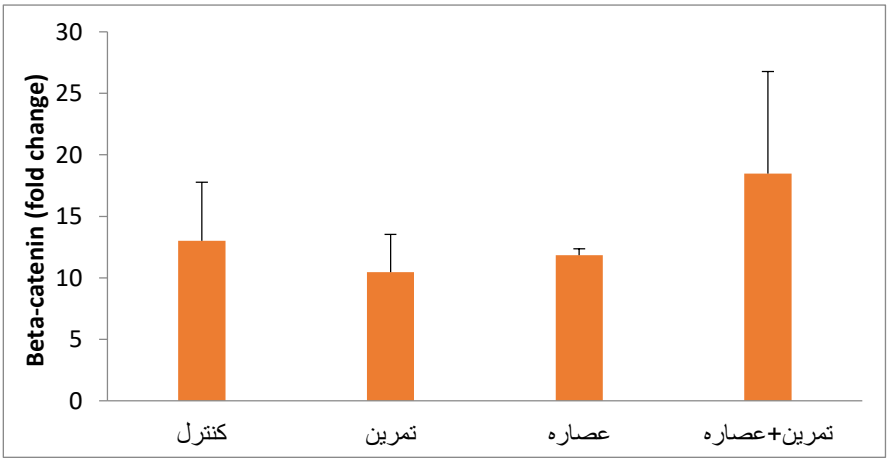
جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مربوط به متغیرهای تحقیق

متغیر / گروه	Beta-catenin	BAX
کنترل	۱۳/۰۰±۴/۷۷	۴/۳۹±۰/۶۵
تمرین	۱۰/۴۶±۳/۰۸	۴/۱۷±۰/۶۱
عصاره	۱۱/۸۵±۰/۵	۳/۸±۰/۷۶
تمرین+عصاره	۱۸/۴۸±۸/۲۹	۲/۹۴±۰/۷۹

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد بیان ژن Beta-cateninدر گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت؛ ولی به سطح معناداری نرسید($p=0.103$)(جدول ۳- نمودار ۱). همچنین نتایج نشان داد که بیان ژن BAXدر گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت($p=0.026$). همچنین آزمون تعقیبی نشان داد که بیان ژنBAXبین گروه ترکیبی با سایر گروهها نیز تفاوت معناداری وجود دارد(جدول ۴ - نمودار ۲).

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن Beta-cateninدر گروههای مختلف

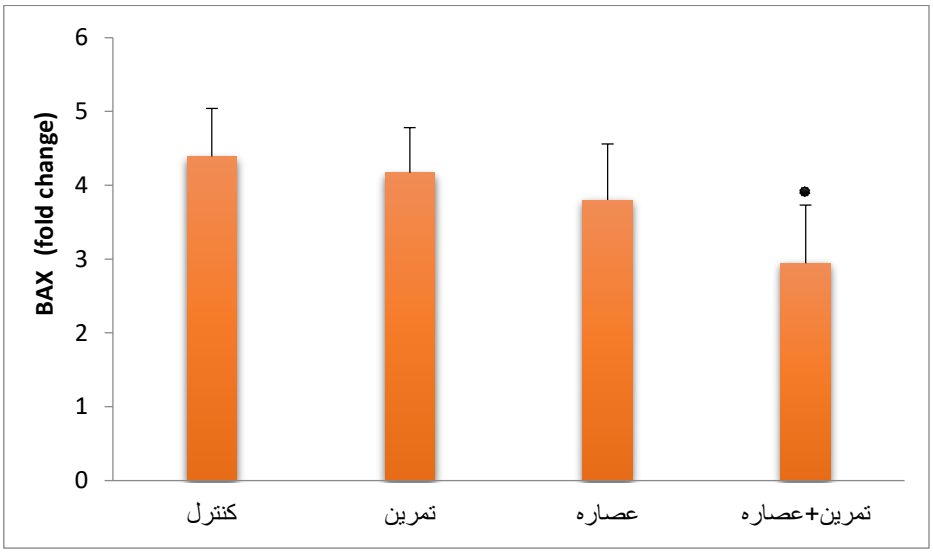
متغیر		مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
Beta-catenin	بین گروه ها	۱۸۴/۹۶۶	۳	۶۱/۶۵۵	۲/۴۳۲	۰/ ۱۰۳
	درون گروه	۴۰۵/۵۷۵	۱۶	۲۵/۳۴۸		
	مجموع	۵۹۰/۵۴۰	۱۹			



نمودار ۱. تغییرات بیان ژن Beta-cateninدر گروههای مختلف تحقیق

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

متغیر		مجموع مجذورات	درجات آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری
BAX	بین گروه ها	۶/۱۱	۶	۲/۰۳۷	۴/۰۲۲	۰/ ۰۲۶*
	درون گروه	۸/۱۰۲	۱۶	۰/۵۰۶		
	مجموع	۱۴/۲۱۳	۱۹			



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن BAXدر گروههای مختلف تحقیق

تفاوت معنادار با گروه کنترل

بحث

ملانوم بدخیمیک سرطان پوست بسیار تهاجمی است که میزان بروز آن در کشورهای غربی به طور چشمگیری در حال افزایش است. شناسایی مکانیسم مولکولی زیربنای تشکیل ملانوم از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا این سرطان پتانسیل متاستاتیک بالایی دارد و اغلب به درمان مقاوم است. جهش‌ها در پروتئین‌های دخیل در مسیرهای سیگنالینگMAP-kinase و Wnt/beta-catenin و در ژن‌های کدکننده تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولیمعرفی شده اند. اثرات مفید ورزش با کاهش سطح سرمیتنظیم کننده های منفی سیگنالینگWnt(DKK1وSFRP1) همراه است.کیم و همکاران(۲۰۱۷) در پژوهشی تاثیر تمرینات ورزشی را بر تنظیم کننده های منفی مسیر سیگنالی WNT/beta-catenin در بازماندگان سرطان سینه مورد ارزیابی قرار دادند. سطوح تنظیم کننده های منفی مسیر سیگنالی WNT/beta-catenin بعد از ۱۲ هفته تمرین به طور معناداری کاهش یافت(۲۶). مطالعات قبلی نشان داد که سطح سرمیDKK1به عنوان تنظیم کننده منفی مسیر سیگنالیWnt در سرطان سینه با درجه تومور و متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است. علاوه بر این، سطح DKK1 در

گردش به طور مداوم در طول متاستازهای استخوانی در بیماران مبتلا به سرطان سینه افزایش میبابد(۲۷).در حال حاضر، مکانیسم تنظیم پیشرفت تومور توسط مهارکننده‌هایWnt به وضوح درک نشده است. با این حال پیشنهاد شده است که کاهش یا حذف β-کاتنین در سلول های مشتق شده از میلوئید باعث سرکوب سیستم ایمنی و رشد سلول های تومور میشود(۲۸). افزایش سطح سرمیDKK1، یک مهارکننده مسیرWnt-β-catenin، در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس، معده، کبد، ریه، مری و پستان گزارش شده است(۲۹). علاوه بر این، سطوح بالایDKK1 در گردش با پیش آگهی ضعیف در سرطان های مختلف مرتبط است(۳۰). دامیکو و همکاران نشان دادند که درمان ضد DKK1 بیانβ-کاتنین را در سلول های سرکوبگر مشتق از میلوئید افزایش داد و پیشنهاد کردند که کاهش فعالیتDKK1 با خنثی سازی، سلول هایT را به محل تومور جذب کرده و رشد تومور را کاهش می دهد. هر چند در تحقیق حاضر سطوح DKK1اندازه گیری نشده است، اما افزایش سطوح بتا-کاتینین در گروه ترکیبی می تواند از طریق کاهش احتمالی در سطوحDKK1 به مبارزه با پیشرفت سرطان کمک کند(۳۱).تنها دو مطالعه تأثیر ورزش را بر سطح بیانDKK1 نشان داده اند. در یک مطالعه روی انسان، کاهش سطح سرمی3 DKK1 روز پس از تکمیلیک ماراتن فوق العاده (۲۴۶ کیلومتر) در مقایسه با سطح DKK1 قبل و بلافاصله پس از مسابقه در افراد سالم مشاهده شد(۳۲). در یکمطالعه تجربی بر روی حیوانات، موش‌های کم‌تحرک سطوح بیان بالاتری از DKK1 را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند(۳۳). بیانBeta-catenin همچنین در افراد ورزش‌شده و مدل‌های حیوانی افزایشمی‌یابد(۳۴). علاوه بر این، گزارش شده است که افزایش پروتئین‌های-Beta catenin رشد سلول‌هایT موثر، فعال‌سازی سلول‌هایT تنظیمی و بلوغ سلول‌های دندریتیک را تنظیممی‌کند(۳۵). علاوه بر این، گاتینونی و همکاران. پیشنهاد کرد که سیگنال دهی متعارف Beta-catenin باعث تحریک تکثیر سلول هایT و B نابالغ میشود(۳۶). بنابراینفعال شدن سیگنال‌دهیBeta-catenin در سلول‌های ایمنی با ورزش ممکن است پاسخ ایمنی سرطان را تحریک کند که منجر به سرکوب تومور می‌شود. علاوه بر این، در تحقیق کائو دین و همکاران مشاهده شد که ورزش برای افزایش تعداد CD4+/CD8+ و بهبود عملکرد سیستم ایمنیموثراست(۳۷). فرضیه ما نشان می دهد که کاهش مهارکننده Beta-catenin با تمرین می تواند اثرات محرک ایمنی برای جلوگیری از رشد تومور و پیشرفت مرحله سرطان داشته باشد.محصولات طبیعی از گیاهان دارویی هنوز یکی از بهترین مخازن برای عوامل جدید با فعالیت های دارویی هستند. جستجو برای شناساییک ترکیب طبیعی ادامه دارد که به طور انتخابی نه تنها توانایی مسدود کردن یا مهار شروع سرطان‌زایی را دارد، بلکه می‌تواند با ایجاد آپوپتوز و توقف رشد در سلول‌های سرطانی بدون اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های طبیعی، مراحل پیشرفت سرطان را معکوس کند(۳۸).در مطالعه حاضر تاثیر مصرف مکمل عصاره گزنه بر روی مسیر سیگنالی بتا – کاتینین و همچنین فاکتور پیش آپوپتوزیBAXمورد بررسی قرار گرفته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح BAXو بتا-کاتنین به ترتیب در گروه های ترکیبی روند کاهشی و افزایشی داشته است. مطالعات اخیر نشان می دهد که بیشتر سرطان ها به دلیل اختلال در عملکرد بسیاری از ژن های کد کننده پروتئین های ضد آپوپتوز، فاکتورهای رشد، گیرنده های فاکتور رشد، فاکتورهای رونویسی و سرکوبگرهای تومور ایجاد می شوند. این ژن ها اهداف درمان سرطان را تشکیل میدهند(۳۹). این احتمال وجود دارد کهعصاره گزنه باعث افزایش بیانBAXو کاهش احتمالی

بیانBCL-2و کاهش قابل توجهی در نسبتBax/Bcl-2 شدکه به عنوان نیروی محرکه آپوپتوز در نظر گرفته می شود. اینیافته‌ها دخالت مسیر ذاتی مرگ سلولی را تایید می‌کنند و نشان می‌دهند که آپوپتوز ناشی از تمرین و یا عصاره می‌تواند وابسته به P53 باشد، زیرا بیانBAX در طول آپوپتوز وابسته به P53 تنظیممی‌شود (۴۰). بنابراین القای آپوپتوز وابسته به P53 توسط عصاره گزنه و یا تمرین احتما دارد پتانسیل خوبی برای درمان این نوع سرطان باشد. برعکس اکثر کارسینوم‌های سلول سنگفرشی دارایP53 جهش‌یافتهحذف شده‌اند (۴۱)، بنابراین القای آن ممکن است قادر به افزایش آپوپتوز در داخل بدن نباشد مگر اینکه با اندازه‌گیری پروتئین‌های پرو و ضدآپوپتوزتایید شود. جالب توجه است، کاهش قابل توجهی را در p53 و Bax با افزایشاحتمالی سطح پروتئینBcl-2 در سلول هایسرطانی پس از تمرین و یا مصرف عصاره گزنه نشان داد، که نشان می دهد عصاره گزنه و یا تمرین ممکن است کاندید مناسبی برای درمان کارسینوم سلول باشد(۴۲).

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که مصرف عصاره گزنه همراه با تمرینات هوازی از طریق کاهش سطوح BAX و افزایش بتا کاتنین در فعال سازی مسیر سیگنالی WNT/beta-catenin و آپوپتوز محرک ایمنی برای جلوگیری از رشد تومور و پیشرفت مرحله سرطان داشته باشد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

تشکر و قدردانی : در نهایت از همکاری دانشگاه بقیه الله و آقای دکتر حسین عابد نطنزی که در اجرای این کار تحقیقاتی با ما همکاری نمودند تشکر می نماییم.

فهرست منابع

1. Wang B, Tian T, Kalland KH, Ke X, Qu Y. Targeting Wnt/β-catenin signaling for cancer immunotherapy. Trends in pharmacological sciences. 2018 Jul 1;39(7):648-58.

2. Galluzzi L, Spranger S, Fuchs E, López-Soto A. WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. Trends Cell Biol. 2019;29:44–65.
doi: 10.1016/j.tcb.2018.08.005.

3. Scholz SL, Cosgarea I, Süßkind D, Murali R, Möller I, Reis H, et al. NF1 mutations in conjunctival melanoma. Br J Cancer. 2018 May;118(9):1243–7.

4. Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, et al. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. J Biol Chem. 2007 Jun;282(23):17259–71.

5. Roel Nusse H.C. Wnt/b-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. Cell. 2017;169:985–999.
doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

6. Alok A, Lei Z, Jagannathan NS, Kaur S, Harmston N, Rozen SG, Tucker-Kellogg L, Virshup DM. Wnt proteins synergize to activate β-catenin signaling. Journal of cell science. 2017 May 1;130(9):1532-44.

7. De A. Wnt/ca^{2+} signaling pathway: A brief overview. Acta Biochim. Biophys. Sin. 2011;43:745–756.

8. Stolz A, Neufeld K, Ertych N, Bastians H. Wnt-mediated protein

stabilization ensures proper mitotic microtubule assembly and chromosome segregation. EMBO Rep. 2015;16:490–499. doi: 10.15252/embr.201439410.

9. O'Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. Pigment Cell Melanoma Res. 2009 Dec;22(6):724–39.

10. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. Genes Dev. 2007 Nov;21(22):2923–35.

11. Anastas J.N, Moon R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat. Rev. Cancer. 2013;13:11–26. doi: 10.1038/nrc3419.

12. Chen EY, DeRan MT, Ignatius MS, Grandinetti KB, Clagg R, McCarthy KM, Lobbardi RM, Brockmann J, Keller C, Wu X. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/β-catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014;111:5349–5354.

13. Pacheco-Pinedo E.C, Durham AC, Stewart K M, Goss AM, Lu MM, Demayo FJ, Morrisey EE. Wnt/β-catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium. J. Clin. Investig. 2011;121:1935–1945.

14. Fulda S, Debatin K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene. 2006;25:4798–4811.

15. Trisciuoglio D, Del Bufalo D. New insights into the roles of antiapoptotic members of the Bcl-2 family in melanoma progression and therapy. Drug Discov Today. 2021;S1359- 6446(21)00059-3.

16. Rubio C., Mendoza C., Trejo C., Custodio V, Rubio-Osornio M, Hernández L, González E, Paz C. Activation of the Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cerebellum of Kindled Rats. Cerebellum. 2019;18:750–760.

17. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. Biochim Biophys Acta Bioenergy. 2006;1757:639–647.

18. Karikas G. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. J BUON. 2010;15:627–638.

19. Joshi, BC, Mukhija, M, Kalia, AN. Pharmacognostical review of Urtica dioica L. IJGP. 2014;8:201–209.

20. Durak, I, Biri, H, Devrim, E, Sözen, S, Avcı, A. Aqueous extract of Urtica dioica makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. Cancer Biol Ther. 2004;3:855–857.

21. Konrad, L, Müller, HH, Lenz, C, Laubinger, H, Aumüller, G, Lichius, JJ. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (Urtica dioica) extract. Planta Med. 2000;66:44–47.

22. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu M.A, Allen C, Al-Raddadi, R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele T.A, Barac A, Bensenor

I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chitheer A, Choi J.Y,Cowie B .The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies (2017). JAMA oncology, 3(12), 1683–1691.

23. Kenfield S.A, Batista J.L, Jahn, J. L, Downer M. K, Van Blarigan E.L, Sesso H.D, Giovannucci E.L, Stampfer M.J and Chan J.M.(2015). Development and Application of a Lifestyle Score for Prevention of Lethal Prostate Cancer. Journal of the National Cancer Institute, 108(3),djv329.

24. Keimling M, Behrens G, Schmid D, Jochem C and Leitzmann M.F.(2014). The association between physical activity and bladder cancer: systematic review and meta-analysis. British journal of cancer, 110(7), 1862–1870.

25. Lei MJ, Dong Y, Sun CX and Zhang XH: Resveratrol inhibits proliferation, promotes differentiation and melanogenesis in HT-144 melanoma cells through inhibition of MEK/ERK kinase pathway. Microb Pathog 111: 410-413, 2017.

26. Kim TH, Chang JS, Park KS, Park J, Kim N, Lee JI and Kong I.D. (2017). Effects of exercise training on circulating levels of Dickkpof-1 and secreted frizzled-related protein-1 in breast cancer survivors: A pilot single-blind randomized controlled trial. PloS one, 12(2), e0171771.

27. Voorzanger-Rousselot N, Journe F, Doriath V, Body JJ, Garnero P. Assessment of circulating Dickkopf-1 with a new two-site immunoassay in healthy subjects and women with breast cancer and bone metastases. Calcif Tissue Int. 2009;84: 348–354.

28. apietto AH, Kim S, Sanford DE, Linehan DC, Hikida M, Kumosaki T, et al. Down-regulation of PLCgamma2-beta-catenin pathway promotes activation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in cancer. J Exp Med. 2013;210: 2257–2271.

29. Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, et al. Dikkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. Cancer Res. 2007;67: 2517–2525

30. Liu Y, Tang W, Xie L, Wang J, Deng Y, Peng Q, et al. Prognostic significance of dickkopf-1 overexpression in solid tumors: a meta-analysis. Tumour Biol. 2014;35: 3145–3154. D'Amico L, Mahajan S, Capietto AH, Yang Z, Zamani A, Ricci B, et al.

31. Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer. J Exp Med. 2016;213: 827–840.

32. Kerschan-Schindl K, Thalmann MM, Weiss E, Tsironi M, Foger-Samwald U, Meinhart J, et al. Changes in serum levels of myokines and Wnt-antagonists after an ultramarathon race. PLoS One. 2015;10: e0132478 10.1371/journal.pone.0132478

33. Bayod S, Mennella I, Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Escorihuela RM, Camins A, et al. Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus. Brain Res. 2014;1543: 38–48.

34. Spillane M, Schwarz N, Willoughby DS. Upper-body resistance exercise augments vastus lateralis androgen receptor-DNA binding and canonical Wnt/beta-

catenin signaling compared to lower-body resistance exercise in resistance-trained men without an acute increase in serum testosterone. Steroids. 2015;98: 63–71.

35. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nat Rev Immunol. 2008;8: 581–593.

36. Gattinoni L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 2010;16: 4695–4701.

37. Cao Dinh H, Beyer I, Mets T, Onyema OO, Njemini R, Renmans W, De Waele M, Jochmans K, Vander Meeren S, Bautmans I. Effects of physical exercise on markers of cellular immunosenescence: a systematic review. Calcified tissue international. 2017 Feb;100:193-215.

38. Ramadan MA, Shawkey AE, Rabeh MA and Abdellatif AO. (2019). Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment in vitro. Cytotechnology, 71(1), 461–473.

39. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis. 2009;30:1073–1081.

40. Takahashi R, Markovic SN, Scrable HJ. Dominant effects of Δ40p53 on p53 function and melanoma cell fate. J Invest Dermatol. 2014;134:791–800.

41. Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G. p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. Br J Cancer. 1995;71:826.

42. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. Biomed Res Int. 2014;2014:150845.

.

Journal of Plasma & Biomarkers
Volume17 , Issue 3, Number 67, Pages 1-13
sanad.iau.ir/journal/qjaphd **ISSN: 9880-1735**

Response of beta-cateninand baxgene expression in liver tissue of mice with melanoma cancer to a course of aerobic exercise with consumption of nettle extract

Javid esmaeelpour[1], **Alireza Barari[2]**, ahmad abdi [3],hosein abednatanzi[4]

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. Corresponding Author: alireza54.barari@gmail.com
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

Received:2023.05.08 **Accepted: 2023.09.16**

Abstract

Background & Aim: The aim of this study was to investigate the response of beta-cateninand bax gene expression in liver tissue of mice with melanoma to a period of aerobic exercise with nettle extract.

Materials and methods: In this study, 20 adult male rats 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 meters per minute 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 ethanolic extract orally for 8 weeks. RT PCR was used to measure the expression of beta-cateninand baxgenes.

Results: Data analysis showed that Beta-catenin gene expression was increased in the experimental groups compared to the control group; But did not reach a significant level ($p = 0.103$). The results also showed that BAX gene expression was significantly reduced in the experimental groups compared to the control group ($p = 0.026$).

Conclusion: The results show that consumption of nettle extract along with aerobic exercise by reducing BAX levels and increasing beta-catenin in activating the WNT / beta-catenin signal pathway and apoptosis has an immune stimulus to prevent tumor growth and cancer progression.

Keywords: Nettle extract, Apoptosis, WNT/beta-catenin pathway, Melanoma cancer