

بررسی تاثیر تمرين‌های هوازی و مکمل سازی نانوذرات سلنيوم بر سطوح سايتوكاين‌های بافت کبد در موش‌های مبتلا به سرطان پستان با رده سلوالی 4T1

سودابه چکاچاک^۱، مهدیه ملانوری شمسی^۱، دکتر سارا صعودي^۲

(۱) گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، ۲) گروه اینمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دکتر مهدیه ملانوری شمسی؛
e-mail: molanouri@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: کبد به عنوان یکی از بافت‌های اصلی تاثیرپذیر از تغییرات ایمونولوژیک، از جمله فعالیت سايتوكاين‌ها، معرفی شده است. نشان داده شده است که استفاده از نانوذرات سلنيوم و فعالیت‌های ورزشی به صورت مجزا می‌توانند در کاهش حجم تومور و تقویت پاسخ‌های ایمونولوژی موثر باشند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر همزمان تمرين‌های ورزشی هوازی تناوبی و مکمل سازی نانوذرات سلنيوم بر سطوح سايتوكاين‌های بافت کبد در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود. **مواد و روش‌ها:** تعداد ۶۴ سر موش بالبسى به ۸ گروه مختلف پژوهشی تقسیم شدند. انجام تمرين تناوبی هوازی و مصرف خوراکی نانوذرات سلنيوم به مدت ۶ هفته پيش و پس از القاي سرطان در گروه‌های مربوطه اعمال شد. در پایان هفته ششم پس از القاي تومور، ميزان سايتوكاين‌های IL-6، IL-4، TNF- α و INF- γ در بافت کبد به روش الایزا اندازه‌گيری شد. **يافته‌ها:** کاهش معنی‌دار سايتوكاين‌های IL-6، IL-4 و TNF- α در بافت کبد در موش‌های سرطانی مشاهده شد ($P < 0.05$). تمرين تناوبی هوازی باعث افزایش معنی‌دار در سايتوكاين‌های IL-6 و TNF- α در بافت کبد شده ($P < 0.05$) و هم‌چنین، افزایش سايتوكاين ایترفرون گاما به دنبال استفاده از نانوذرات سلنيوم در بافت کبد مشاهده شد ($P < 0.05$). هم‌چنین نتایج پژوهش نشان‌دهنده کاهش حجم تومور به دنبال تمرين‌های ورزشی و استفاده از نانوذرات سلنيوم است. **نتیجه‌گیری:** براساس نتایج پژوهش حاضر تغییرات سايتوكاين‌ها در بافت کبد همزمان با کاهش حجم تومور است. این احتمال وجود دارد که استفاده از نانوذرات سلنيوم و تمرين‌های ورزشی از طریق تقویت پاسخ‌های سیستم ایمنی، به کاهش حجم تومور و تعدیل ميزان سايتوكاين‌ها در کبد کمک کرده باشد.

واژگان کلیدی: تمرين هوازی، نانوذرات سلنيوم، سايتوكاين، کبد، سرطان پستان، تومور 4T1

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۱۱ - دریافت اصلاحیه: ۹۶/۳/۱۶ - پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۱۹

برای درمان‌های مستقیم ضدسرطانی و هم‌چنین به عنوان تحويل‌دهنده داروهای پیشرفت‌هه استفاده می‌شود.^{۱-۳} نشان داده شده که استفاده از نانوذرات سلنيوم در موش‌های مبتلا به سرطان پستان باعث افزایش پاسخ‌های سیستم ایمنی و طول عمر موش‌های مبتلا و تعویق متاستاز در بافت‌هایی

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان و دومین علت مرگ و میرهای مرتبط با سرطان در میان زنان است.^{۱,۲} با ظهور روش‌های جدید پیشگیری و درمان، از تکنولوژی نانو

به عنوان یکی از عوامل موثر در وخیمتر شدن فرایند سرطان پستان می‌تواند در افزایش آدیپوکاین‌ها و اثرات التهابی آن‌ها در بافت‌هایی مانند کبد موثر باشد.^{۲۲،۲۳} از سوی دیگر پیشنهاد شده است که فعالیت‌های ورزشی به ویژه هوایی می‌توانند در تعديل وضعیت ایمنی بافت کبد در بیماری‌های متابولیک نقش موثری داشته باشند.^{۲۴}

با در نظر گرفتن اثرات ایمنی مشاهده شده در مورد نانوذرات سلنیوم در سرطان پستان، و اثرات تعديل‌کنندگی تمرین‌های ورزشی هوایی بر پاسخ‌های ایمنی، استفاده از تمرین‌های ورزشی در کنار نانوذرات سلنیوم می‌تواند در تعديل پاسخ‌های سایتوکاین‌ها در بافت کبد موثر باشد؛ بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات ترکیبی تمرینات تناوبی هوایی و استفاده از نانوذرات سلنیوم بر سایتوکاین‌های INF- γ , IL-6, TNF- α و IL-4 به عنوان شاخص‌های پاسخ‌های سیستم ایمنی در بافت کبد در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها

مدل‌های حیوانی

تعداد ۶۴ سر موش بالب سی (Balb/c) ماده (۳ تا ۵ هفته با میانگین وزن ۱۷ گرمی) از موسسه پاستور خریداری و به حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. موش‌ها در ابتدای پژوهش به ۸ گروه ۸ تایی تبدیل تقسیم شدند گروه‌ها شامل، سالم - کنترل (C)، تومور - کنترل (T)، سالم - تمرین شامل، سالم - کنترل (E)، سالم - نانوذرات سلنیوم (Se)، تومور - تمرین (ET)، سالم - نانوذرات سلنیوم (SeT)، سالم - تمرین - نانوذرات سلنیوم (SeET)، تومور - تومور - تمرین - نانوذرات سلنیوم (SeE) بودند. موش‌های گروه‌های تمرین و نانوذرات، نانوذرات سلنیوم بودند. موش‌های گروه‌های تمرین و نانوذرات، نانوذرات سلنیوم و تمرین تناوبی هوایی را به مدت ۶ هفته، پیش و پس از القای سرطان با تزریق سلول‌های ۴T1 دریافت کردند. کلیه اصول اخلاقی مربوط به کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی، زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس در این پژوهش رعایت شد.

تمرین تناوبی هوایی

نوع تمرین، تناوبی و بر روی نوارگردان اجرا شد. تمرین اجرا شده و پروتکل طراحی شده براساس تجربیات و پژوهش‌های انجام شده در دانشگاه تربیت مدرس بود.^{۲۰} به صورت خلاصه، موش‌های گروه تمرین پس از ۱۰ دقیقه گرم

مانند کبد می‌شود.^۷ از سویی دیگر پژوهش‌ها نشان می‌دهند خطر سرطان پستان با انجام فعالیت بدنی، با شدت متوسط تا شدید، کاهش می‌یابد.^{۷-۱۰}

در میان اجزای مختلف دستگاه ایمنی، سایتوکاین‌ها از عوامل محظوظ این دستگاه هستند که با وجود ناشناخته ماندن سازوکارهای رهایش آن‌ها، در پاسخ به ورزش آزاد می‌شوند.^{۱۱} این‌می با واسطه‌ی سلولی به نیمرخ سایتوکاین-های رها شده از لنفوسيت‌های T کمکی نوع ۱ (Th1)^۱ اینترلوکین ۲، اينترفرون گاما (IFN- γ) و فاکتور نکروزدهنده (TNF- α) بستگی دارد. از سوی دیگر، سایتوکاین‌های ترشح شده از لنفوسيت‌های T نوع ۲ (Th2) شامل اینترلوکین ۴ (IL-4)، اینترلوکین ۵ و ۱۳ هستند که برای شروع ایمنی هومورال مانند تمایز لنفوسيت‌های B به سمت تولید آنتی‌بادی‌ها و واکنش‌های آلرژیک ضروری هستند.^{۱۱،۱۲} اختلال در عملکرد سیستم ایمنی در بیماران با مراحل پیشرفته سرطان مشاهده شده است و کاهش فعالیت لنفوسيت‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی به عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی مطرح است.^{۱۳-۱۵}

با توجه به این که هپاتوسیت‌ها به فعالیت سایتوکاین‌ها در فرایندهای مختلف فیزیولوژی و پاتولوژی حساس هستند کبد به عنوان یکی از اعضای اصلی فعالیت سایتوکاین‌ها معروفی شده است. به علاوه، سلول‌های پارانشیمی کبد، به ویژه سلول‌های کوپفر که ماکروفاژهای بافتی ساکن کبد هستند، قادر به ساخت انواع مختلف سایتوکاین‌ها هستند که ممکن است در بافت کبد یا بافت‌های دیگر اثرات ایمونولوژیکی داشته باشند. همچنین پیشنهاد شده است سایتوکاین‌ها در توسعه‌ی آسیب‌های حاد کبد، بازسازی و فیبروز کبد و همچنین در انتقال سلول‌های سرطانی (متاستاز) از سایر بافت‌ها به کبد و ایجاد سرطان کبد نقش داشته باشند.^{۱۶-۱۸} از سوی دیگر در مراحل پیشرفته سرطان، اثرات تحریکی و مهاری سیستم ایمنی به صورت هم‌زمان منجر به تغییرات سطوح جریان خونی برخی از سایتوکاین‌ها می‌شود که اثرات آن‌ها در برخی از بافت‌ها ممکن است منجر به سرکوب فعالیت ماکروفاژها شود.^{۱۹-۲۱} در مورد تاثیرات سرطان پستان و به ویژه در مراحل پیشرفته سرطان بر تغییرات سایتوکاین‌ها در بافت کبد مطالعات اندکی انجام شده است.^{۲۲} پیشنهاد شده است چاقی

^۱ حجم تومور معرفی شده توسط جونز و همکارانش (۲۰۱۰) [V=1/2(L²×W)] ^{۲۸} میزان آن تعیین شد.

تهیه نانوذرات سلنیوم

برای آماده کردن نانوذرات سلنیوم از روشی که در پژوهش‌های گذشته انجام شده بود، استفاده شد.^{۲۹,۳۰} به طور خلاصه محلول ۵/۲ میلی‌مولار دی‌اکسید سلنیوم آماده شد و به محلول ۵/۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک در حال میکس شدن روی استیرر (۳۰۰ دور در دقیقه) اضافه شد. ترکیب به دست آمده سانتریفیوژ شد و سه بار با استفاده از کاغذ صافی شستشو داده شد. محلول استوک نانوذرات سلنیوم آماده شد و به میزان ۲۰۰ میکرو‌لیتر برای هر موش استفاده شد. نانوذرات سلنیوم به مدت ۶ هفته پیش و پس از القای سرطان و یک روز در میان به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در سایز ۲۵۰ نانومتراز نانو ذرات سلنیوم Se NPs به موش‌های به صورت خوراکی داده شد.^{۳۱}

آماده کردن بافت و اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها

پس از پایان دوره‌ی مداخله تمرینی و استفاده از نانوذره سلنیوم موش‌های با ترکیبی از کتامین و زایلازین بیهوش شدند و لوب چپ بافت کبد جدا شد و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در زمان آزمایش بافت کبد از حالت انجماد خارج و در بافر لیز سرد RIPA^{۳۲} هموزن شد. سوپرناتانت جمع‌آوری شد و محتوای کلی پروتئین سوپرناتانت به وسیله روش بردفورد تعیین شد.^{۳۳} و سطوح سایتوکاین‌های IL-6، IL-4 و TNF- α و INF- γ به R&D وسیله روش الیزا و با استفاده از کیت‌های کمپانی آمریکا اندازه‌گیری شدند. حساسیت کیت‌ها برای سایتوکاین‌های TNF- α ، IL-6، IL-4 و INF- γ به ترتیب ۲، ۱/۶، ۱۰/۹ و ۳/۱۲ پیکو‌گرم بر میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون سنجی و برون سنجی به ترتیب ۳/۹ و ۷/۲ درصد برای TNF- α ، ۴/۷ و ۷/۵۳ برای IL-6، ۴/۷ و ۵/۲ برای IL-4 و ۸ و ۱۰ درصد برای INF- γ بود.

کردن در هر جلسه فواصل دو دقیقه‌ای با شدتی معادل ۷۰ درصد حداقل سرعت بیشنه حیوانات (Vm_{ax}) را پشت سر می‌گذاشتند که این فواصل ۲ دقیقه‌ای با ریکاوری فعال باشد ۵۰ درصد حداقل سرعت بیشنه دنبال می‌شد. سرعت برای تمام حیوانات در ۶ هفته اول پروتکل پژوهش و قبل از القای تومور از ۸ متر در دقیقه تا ۲۰ متر در دقیقه رسید و در ۶ هفته دوم بعد از القای تومور در گروه‌های سالم تا ۲۴ متر در دقیقه افزایش یافت و در گروه‌های توموری با توجه به کاهش توانایی دوین دین تا ۱۸ متر در دقیقه کاهش یافت. برنامه تمرین در دو هفته اول برای حیوانات ۸-۱۲ متر در دو هفته دوم ۱۲-۱۶ و در دو هفته سوم ۱۶-۲۰ متر در دقیقه در نظر گرفته شد. حیوانات سالم در ادامه برنامه تمرین در دو هفته چهارم با سرعت ۱۸-۲۲، دو هفته پنجم ۲۰-۲۴ و دو هفته ششم ۲۲-۲۴ متر در دقیقه تمرین کردند. سرعت برای گروه‌های توموری در دو هفته چهارم ۱۸-۲۲، دو هفته پنجم ۱۸-۲۰ و دو هفته ششم ۱۴-۱۸ متر در دقیقه در نظر گرفته شد. زمان تمرین در هر جلسه تمرین بین ۴۰-۵۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

آزمون بیشینه هر دو هفته یک بار با تعداد مشخصی از موش‌های توموری و سالم که در پروتکل اصلی پژوهش شرکت نمی‌کردند، اجرا می‌شد. این آزمون با سرعت ۶ متر بر دقیقه آغاز می‌شد و سرعت نوار گردان هر ۳ دقیقه ۳ متر بر دقیقه افزایش می‌یافت و تا زمان رسیدن حیوانات به واماندگی ادامه می‌یافت.^{۳۴,۳۵}

ایجاد تومور در حیوان

سلول‌های 4T1 به عنوان یکی از چند رده سلولی سرطان پستان از بانک سلولی انسنتیو پاستور تهران تهیه شدند و در شرایط مناسب محیط کشت PRMI کامل حاوی ۱۰ درصد FBS کشت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد نگهداری شدند تا تعداد مناسب حاصل شود. ۶ هفته پس از شروع پروتکل پژوهش تعداد ۱۰^۷ به صورت زیرجلدی به گروه‌های اختصاص داده شده به تومور تزریق شد. تومور حدود ۲ هفته پس از تزریق در حیوانات قابل لمس بود. حجم تومور در ۲ محور طولی و عرضی اندازه‌گیری شد. بزرگترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. هر دو روز یک بار طول و عرض تومور توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول محاسباتی

V16.0 استفاده شد و سطح معنی‌داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، تمرین تناوبی هوازی باعث کاهش حجم تومور شد ($P=0.05$). از سوی دیگر تاثیر نانوذرات سلنیوم بر حجم تومور نیز معنی‌دار بوده است ($P=0.05$) (جدول ۱). تصویر مربوط به حجم تومور در تصویر ۱ نشان داده شده است.

تحلیل آماری

کلیه اطلاعات به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارایه شده است. برای بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. از آزمون آماری تحلیل واریانس دو طرفه برای بررسی اندازه تومور و تحلیل واریانس سه طرفه برای بررسی نتایج مربوط سایتوکاین‌ها استفاده شد. از آزمون پیگیری آماری توکی برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS

جدول ۱- تغییرات حجم تومور در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه‌های پژوهش (mm ³)	T	ET	SeT	SeET	تمرین	ننانوذره	P اثر متقابل	P اثر	P اثر	P اثر	P اثر
۱۹۶/۷ \pm ۲۷۳۵/۷	۳۶۱/۲۴ \pm ۲۶۳۲/۷	۲۸۸/۴ \pm ۲۶۳۰/۷	۲۹۵/۱ \pm ۱۴۸۴/۷	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵					



a



b

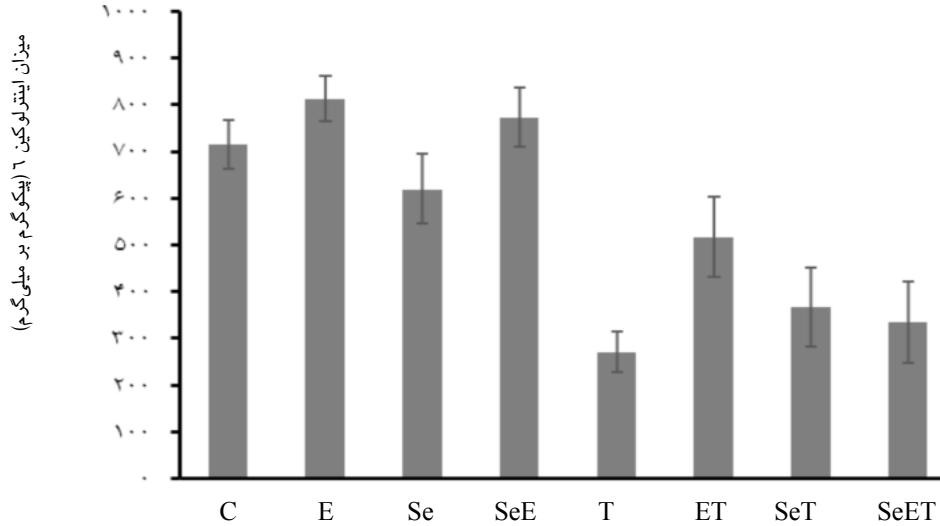
شکل ۱- تصاویر مربوط به تومور در دو موش مختلف در گروه‌های T و SeET (a) و (b)

سرطان (P=0.01) بر این سایتوکاین در بافت کبد است. اثر نانوذرات سلنیوم و اثرات متقابل تمرین و نانوذرات سلنیوم در مورد این سایتوکاین نیز معنی‌دار نبوده است ($P>0.05$). در مورد این سایتوکاین نیز سرطان باعث کاهش و تمرین تناوبی هوازی باعث افزایش میزان آن در بافت کبد شد. نتایج پژوهش نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار سرطان بر میزان سایتوکاین IL-4 در بافت کبد بود (P=0.01)، اما تاثیر نانوذرات سلنیوم و تمرین بر این فاکتور معنی‌دار نبوده است (نمودار ۳). نمودار ۴ نتایج مربوط به تغییرات میزان ایترفرون گاما در گروه‌های مختلف پژوهش را نشان داده است. نتایج پژوهش نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار نانوذرات

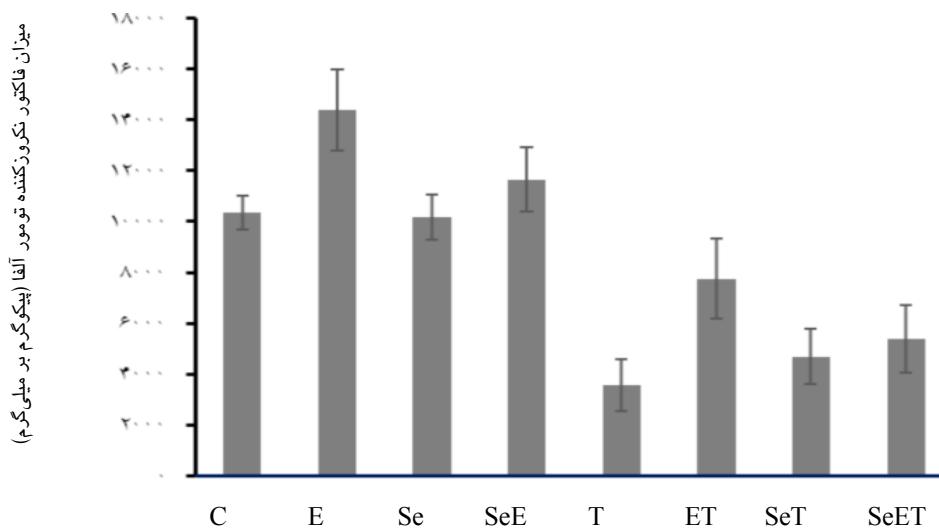
نمودار ۱ میزان سایتوکاین IL-6 بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش را نشان داده است. نتایج پژوهش نشان‌دهنده تاثیر سرطان بر میزان این سایتوکاین بود (P=0.001). همچنین تاثیر تمرین در مورد این عامل نیز معنی‌دار بود (P=0.02)، اما استفاده از نانوذرات سلنیوم و اثرات متقابل تمرین و نانوذرات سلنیوم معنی‌دار نبود (P>0.05). سرطان باعث کاهش و تمرین تناوبی هوازی باعث افزایش معنی‌دار میزان این عامل در بافت کبد شد. نمودار ۲ میزان پروتئین TNF- α در گروه‌های مختلف پژوهش در بافت کبد را نشان داده است. نتایج پژوهش نشان‌دهنده وجود تاثیر معنی‌دار تمرین (P=0.004) و

نیود. مصرف نانوذرات سلنیوم باعث افزایش معنی‌دار این عامل در بافت کبد شد.

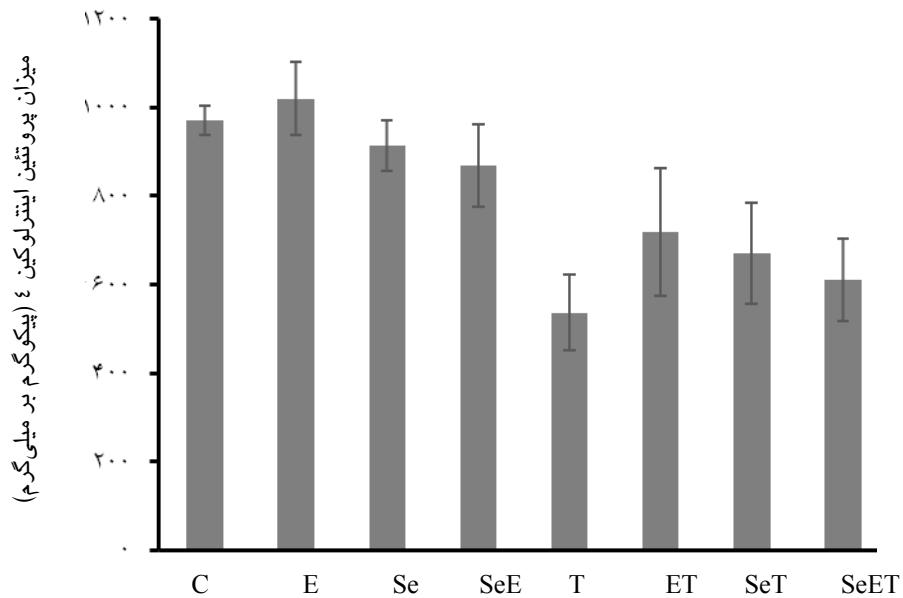
سلنیوم بر میزان این عامل در بافت کبد بود ($P=0.003$), اما تاثیر تمرينات ورزشی و سرطان در مورد این عامل معنی‌دار



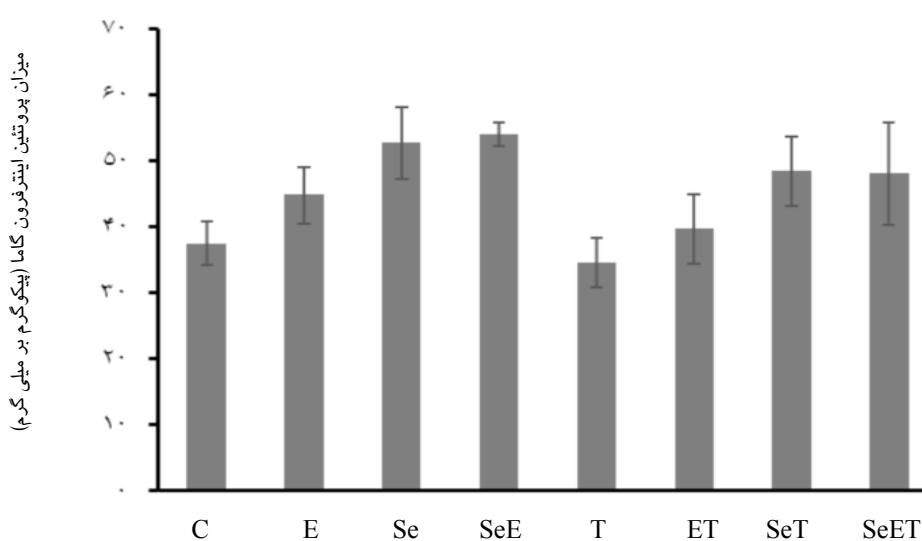
نمودار ۱- میزان سایتوکاین IL-6 بافت کبد در گروههای مختلف پژوهش؛ سالم - کنترل (C)، تومور- کنترل (T)، سالم - تمرين (E)، تومور- تمرين (ET)، سالم - نانو ذرات سلنیوم (Se)، تومور- نانو ذرات سلنیوم (SeE)، سالم - تمرين - نانو ذرات سلنیوم (SeE)، تومور- تمرين - نانو ذرات سلنیوم (SeET). اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شده‌اند.



نمودار ۲- میزان سایتوکاین TNF- α بافت کبد در گروههای مختلف پژوهش؛ سالم - کنترل (C)، تومور- کنترل (T)، سالم - تمرين (E)، تومور- تمرين (ET)، سالم - نانو ذرات سلنیوم (Se)، تومور- نانو ذرات سلنیوم (SeE)، سالم - تمرين - نانو ذرات سلنیوم (SeE)، تومور - تمرين - نانو ذرات سلنیوم (SeET). اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شده‌اند.



نمودار ۳- میزان سایتوکاین ۴-IL بافت کبد در گروههای مختلف پژوهش؛ سالم - کنترل (C)، تومور - کنترل (T)، سالم - تمرین (E)، تومور- تمرین (ET)، سالم - نانو ذرات سلنیوم (Se)، تومور- نانو ذرات سلنیوم (SeT)، سالم - تمرین - نانو ذرات سلنیوم (SeE)، تومور- تمرین - نانو ذرات سلنیوم (SeET). اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شده‌اند.



نمودار ۴- میزان سایتوکاین ۷-INF بافت کبد در گروههای مختلف پژوهش؛ سالم - کنترل (C)، تومور- کنترل (T)، سالم - تمرین (E)، تومور- تمرین (ET)، سالم - نانو ذرات سلنیوم (Se)، تومور- نانو ذرات سلنیوم (SeT)، سالم - تمرین - نانو ذرات سلنیوم (SeE)، تومور- تمرین - نانو ذرات سلنیوم (SeET). اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شده‌اند.

سایتوکاین های INF-γ، IL-6 و TNF-α در بافت کبد مورد سنجش قرار گرفت. نتایج پژوهش نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار میزان سایتوکاین های INF-γ، IL-6 و TNF-α در بافت کبد به دنبال سرطان بوده، اما تمرین باعث افزایش میزان سایتوکاین های IL-6 و TNF-α در بافت کبد شد. همچنین نانوذرات سلنیوم توانست باعث افزایش میزان

بحث

پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر تمرین‌های تنفسی هوازی به همراه نانوذرات سلنیوم بر میزان سایتوکاین‌های بافت کبد در موش‌های مبتلا به تومور سرطان پستان انجام شد. به منظور بررسی پاسخ‌های سایتوکالینی میزان پروتئین

تومور سرطان پستان ناشی از نقص عملکرد ایمنی در بافت کبد باشد.

از سوی دیگر، پیشنهاد شده است که در مراحل نهایی سرطان، استرس متابولیک شدیدی به کبد از طریق تخلیه گلیکوژن و تغییر بیان ژن‌های متابولیک ایجاد می‌شود.^{۴۱} این استرس متابولیکی در افزایش وزن کبد نیز موثر است^{۴۲} و این تغییرات هم‌زمان با ایجاد شرایط کاچکسی است. نتایج مطالعات ما نشان‌دهنده ایجاد شرایط کاچکسی در موش‌های توموری مدل 4T1 است.^{۴۳} همچنین ترکیب تمرین تنابی هوایی و استفاده از نانوذرات سلنیوم توانسته است در کنترل این شرایط موثر باشد.^{۴۴} با در نظر گرفتن ارتباط بین وضعیت کاچکسی و شاخص‌های متابولیکی به ویژه در کبد و با توجه به کاهش حجم تومور در اثر تمرین‌های ورزشی و استفاده از نانوذرات سلنیوم این امکان وجود دارد که این مداخلات توانسته‌اند وضعیت متابولیکی کبد را نیز بهبود دهند.

از دیدگاهی دیگر، سرطان پستان قادر است به بافت‌های استخوان، ریه‌ها، کبد و مغز از طریق جریان خون متاستاز دهد. کبد به عنوان یک بخش متاستاتیک برای تومورهای سرطانی جامد است و به عنوان سومین بخش درگیر به دنبال سرطان پستان مطرح است.^{۴۵} نشان داده شده است به دنبال متاستاز کبد و عدم درمان آن عمر تقریبی این بیماران بین ۴ تا ۸ ماه خواهد بود.^{۴۶} پیشنهاد شده است ریزمحیط کبد در فرایند متاستاز این بافت موثر است. به نظر می‌رسد بررسی و تقویت ریزمحیط کبد برای اثرات موثر درمان‌های سرطان پستان برای مهار و جلوگیری از متاستاز این بافت موثر استند.^{۴۷} تغییرات ایمونولوژی مشاهده شده در بافت کبد، از جمله تغییرات سایتوکاین‌ها می‌توانند از مکانیسم‌های پیشنهادی برای تسريع و ایجاد متاستاز در بافت کبد باشند. در مطالعه‌ی حاضر استفاده از تمرین‌های ورزشی هوایی و نانوذرات سلنیوم توانسته است باعث تغییرات پاسخ سایتوکاینی شود که احتمال تقویت کنندگی بافت کبد را نشان می‌دهد. هر چند در مورد اثرات این تغییرات بر متاستاز بافت کبد نمی‌توانیم با توجه به این اطلاعات محدود اظهار نظر دقیقی داشته باشیم.

تمرین‌های ورزشی این‌تروال توانسته است باعث افزایش میزان سایتوکاین‌های IL-6 و TNF- α در بافت کبد به دنبال القای

سایتوکاین‌۷ INF در بافت کبد شود. این تغییرات هم‌زمان با اثرات معنی‌دار و کاهش‌دهنده‌ی حجم تومور در اثر تمرین‌های تنابی و استفاده از نانوذرات سلنیوم در گروه‌های توموری بود.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان‌دهنده‌ی کاهش حجم تومور در اثر تمرین تنابی هوایی و استفاده از نانوذرات سلنیوم بود. در مورد اثرات تمرین‌های ورزشی بر تغییرات حجم تومور نتایج ضد و نقیضی وجود دارد. زیلینسکی و همکارانش^۱ کاهش و تأخیر رشد تومور در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد پس از ۴ هفته تمرین استقامتی را به کاهش چگالی سلول‌های ایمنی در تومور نسبت دادند.^{۴۸} مطالعه امانی شلمزاری و همکارانش نیز نشان‌دهنده‌ی کاهش حجم تومور و رگزایی در تومور در اثر تمرین‌های هوایی بود.^{۴۹} با این حال نتایج برخی از مطالعات نیز نشان‌دهنده‌ی عدم تاثیر تمرین‌های ورزشی بر تغییرات حجم تومور هستند.^{۵۰} همچنین پیشنهاد شده است استفاده از مقادیر بالای نانوذرات سلنیوم و در بیشتر روزهای هفته باعث کاهش حجم تومور می‌شود.^{۶۰} این تاثیرات بدون در نظر گرفتن اثرات جانبی احتمالی در مورد این نانوذره بود. بررسی مطالعات مختلف نشان می‌دهد نوع تومور و مرحله سرطان می‌توانند عوامل مهمی در تغییرات ایجاد شده در وضعیت سرطان در نمونه‌های حیوانی به دنبال استفاده از تمرینات ورزشی یا مکمل‌ها باشند.

در مطالعه‌ی حاضر کاهش میزان سایتوکاین‌های IL-4 و IL-6 و TNF- α به دنبال القای تومور 4T1 مشاهده شده است. رده‌ی سلولی 4T1 برای بررسی مراحل نهایی سرطان پستان همواره مورد توجه بوده است.^{۵۱} پژوهش انجام شده توسط پروکپچک و همکارانشⁱⁱ کاهش بیان برخی از سایتوکاین‌های بافت کبد مانند IL-4 را در مراحل نهایی سرطان نشان داد.^{۵۲} به نظر می‌رسد کبد یکی از بازیگران اصلی سرطان در مراحل نهایی سرطان مشاهده شده است.^{۵۳} با وجود این به نظر می‌رسد نقص عملکرد ایمنی ذاتی و اکتسابی هم‌زمان در این شرایط ایجاد می‌شود و پیشنهاد می‌شود با وجود ورود بیشتر ماکروفازها به بافت فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد.^{۵۴} این احتمال وجود دارد کاهش بیان سایتوکاین‌های IL-4، IL-6 و TNF- α به دنبال تزریق

i - Zielinski et al (2004)

ii- Prokopchuk et al (2016)

یکی از مکانیسم‌هایی که سلنیوم می‌تواند به پیشگیری از سرطان کمک نماید در واقع اثر غیرمستقیم این عنصر بر تقویت سیستم ایمنی است. در این رابطه شاید بتوان سلنیوم و به ویژه فرم نانو ذره آن را به عنوان یک ترکیب ارجواني در جهت تقویت عملکرد کلیه سلول‌های سیستم ایمنی مطرح کرد.^{۶۰-۶۱} در نتایج چندین مطالعه نشان داده‌اند که نانوذرات سلنیوم می‌توانند در جهت افزایش عملکرد سیستم ایمنی موثر باشد.^{۳۱} تغییرات سایتوکاین- γ -INF در بافت کبد می‌تواند در راستای این تغییرات در سیستم ایمنی و اثرپذیری سلول‌های Th1 باشد.

پژوهش حاضر در جهت بررسی میزان سایتوکاین‌های TNF- α , IL-6, IL-4 و INF- γ در بافت کبد به دنبال استفاده همزمان از تمرین‌های تناؤبی هوایی و نانوذرات سلنیوم در مدل موش سرطانی انجام شد. نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده کاهش سایتوکاین‌های کبد به دنبال سرطان است. مهار عملکرد سیستم ایمنی و تغییرات متابولیکی در مراحل نهایی سرطان می‌تواند در تغییرات این سایتوکاین‌ها در بافت کبد به دنبال سرطان موثر باشد. تمرین‌های ایترووال هوایی توانسته است در افزایش سطوح TNF- α و IL-6 در بافت کبد موثر باشد. اثرات احتمالی فعالیت‌های ورزشی در تنظیم و فعالسازی سایتوکاین‌ها می‌تواند عاملی در تغییرات این دو سایتوکاین به دنبال فعالیت ورزشی باشد. همچنین تغییرات مشاهده شده در سایتوکاین- γ -INF می‌تواند تاییدی دیگری بر اثرات تقویت‌کننده ایمونولوژی نانوذرات سلنیوم باشد. به نظر می‌رسد با توجه به تاثیرات ایمنی و آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سلنیوم در سرطان پستان استفاده از فعالیت ورزشی با در نظر گرفتن اثرات اجوانی احتمالی آن می‌تواند در تعديل پاسخ‌های سیستم ایمنی در بافت کبد موثر باشد.

i-Galun et al (2002)

تومور سرطان پستان شود. گالن^۱ و همکارانش پیشنهاد کردند که برخی از سایتوکاین‌ها از جمله IL-6 و TNF- α با فعالسازی مکانیسم‌های سیگنالینگ از جمله STAT3 می‌توانند در بازسازی بافت کبد موثر باشند.^{۱۷} به اثرات تقویت کننده سیستم ایمنی در اثر تمرین‌های ورزشی در برخی از مطالعات اشاره شده است.^{۴۸-۵۱} این احتمال وجود دارد که تقویت عملکرد ایمنی باعث افزایش فعالیت سلول‌های ایمنی ساکن در بافت کبد شود. از سوی دیگر، بافت کبد به عنوان تامین‌کننده سوخت مورد نیاز در هنگام فعالیت‌های ورزشی مطرح است. در برخی از مطالعات به گفتگوی متقابل بافت کبد و عضله اسکلتی در جریان فعالیت‌های ورزشی و در دوره‌های ریکاوری برای تامین سوخت عضلانی اشاره شده است.^{۵۲} پیشنهاد شده است که مایوکاین‌هایی نظیر IL-6 در این فرایند نقش دارند.^{۵۳} افزایش سایتوکاین‌هایی بافت کبد به دنبال فعالیت ورزشی می‌تواند نشان‌دهنده تحريكات و استرس ایجاد شده به بافت کبد برای تامین سوخت مورد نیاز برای فعالیت ورزشی در عضله اسکلتی باشد.

افزایش سطوح INF- γ به دنبال استفاده از نانوذرات سلنیوم در بافت کبد در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد. پیشنهاد شده است سلنیوم با مکانیسم‌های متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، افزایش خنثی‌سازی عوامل سرطان‌زا، افزایش عملکرد سیستم ایمنی، تعديل تکثیر سلولی، مهار تهاجم سلولی و رگزایی تومورها نقش محافظتی خود را در مراحل مختلف سرطان ایفا می‌کند.^{۵۴} با این حال، با توجه به پتانسیل بالای نانوذرات در علوم مختلف که باعث بروز ویژگی‌های جدید و گوناگون در مورد آن‌ها می‌شود، و همچنین در نظر گرفتن این که نانوذرات سلنیوم از نظر بیولوژی از سمیت کمتری برخوردار هستند، می‌توان از این ویژگی نانوذرات برای مقاصد مختلف زیستی استفاده کرد.

References

1. Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, Vanderpuye V, Eniu A, Kotha SR, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet* 2017; 389: 847-60.
2. Tanaka T, Decuzzi P, Cristofanilli M, Sakamoto JH, Tasciotti E, Robertson FM, et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices* 2009; 11: 49-63.
3. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010; 15: 842-50.
4. Zhang J, Wang X, Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicol Sci* 2007; 101: 22-31.
5. Ip C, Birringer M, Block E, Kotrebai M, Tyson JF, Uden PC, et al. Chemical speciation influences compa-

- rative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 4452.
6. Yazdi MH, Mahdavi M, Setayesh N, Esfandyar M, Shahverdi AR. Selenium nanoparticle-enriched Lactobacillus brevis causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *Daru* 2013; 21: 33.
 7. Cleary MP, Grossmann ME. Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 2009; 150: 42-537.
 8. Mandelblatt JS, Luta G, Kwan ML, Makgoeng SB, Ergas IJ, Roh JM, et al. Associations of physical activity with quality of life and functional ability in breast cancer patients during active adjuvant treatment: the Pathways Study. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 521-9.
 9. Lee IM. Physical activity and cancer prevention-data from epidemiologic studies. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 1823-7.
 10. Dosemeci M, Hayes RB, Vetter R, Hoover RN, Tucker M, Engin K, et al. Occupational physical activity, socio-economic status, and risks of 15 cancer sites in Turkey. *Cancer Causes Control* 1993; 4: 313-21.
 11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Sh. Cellular and Molecular Immunology. 8th edition; Philadelphia: Elsevier, 2015.
 12. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 2000; 12; 321: 424.
 13. Balch CM, Tilden AB, Dougherty PA, Cloud GA, Abo T. Heterogeneity of natural killer lymphocyte abnormalities in colon cancer patients. *Surgery* 1984; 95: 63-70.
 14. Dillman RO, Koziol JA, Zavanelli MI, Beauregard JC, Halliburton BL, Glassy MC, et al. Immunoincompetence in cancer patients. Assessment by in vitro stimulation tests and quantification of lymphocyte subpopulations. *Cancer* 1984; 53: 1484-91.
 15. Goto S, Sato M, Kaneko R, Itoh M, Sato S, Takeuchi S. Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 435-42.
 16. Kong X, Horiguchi N, Mori M, Gao B. Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. *Front Physiol* 2012; 3: 69.
 17. Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta* 2002; 11: 345-58.
 18. Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, et al. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* 2001; 7: 517-28.
 19. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-44.
 20. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-99.
 21. Zitvogel L, Tanchot C, Granier C, Tartour E. Following up tumorspecific regulatory T cells in cancer patients. *Oncoimmunology* 2013; 2: e25444.
 22. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res* 2015; 35: 1-16.
 23. Cai D. NFκappaB-mediated metabolic inflammation in peripheral tissues versus central nervous system. *Cell Cycle* 2009; 8: 2542-8.
 24. Kwak MS, Kim D, Chung GE, Kim W, Kim JS. The preventive effect of sustained physical activity on incident nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2016.
 25. Amani Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Kashani Khatib Z, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 231-58.
 26. Conner JD, Wolden-Hanson T, Quinn LS. Assessment of murine exercise endurance without the use of a shock grid: an alternative to forced exercise. *J Vis Exp* 2014; 14: e51846.
 27. Quinn LS, Anderson BG, Conner JD, Wolden-Hanson T. IL-15 overexpression promotes endurance, oxidative energy metabolism, and muscle PPARδ, SIRT1, PGC-1α, and PGC-1β expression in male mice. *Endocrinology* 2013; 154: 232-45.
 28. Jones LW1, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* 2010; 108: 343-8.
 29. Kojouri GA, Sadeghian S, Mohebbi A, Mokhber Dezfooli MR. The effects of oral consumption of selenium nanoparticles on chemotactic and respiratory burst activities of neutrophils in comparison with sodium selenite in sheep. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146:160-6.
 30. Zhang SY, Zhang J, Wang HY, Chen HY. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides. *Materials Letters* 2004; 58: 2590-4.
 31. Yazdi MH, Mahdavi M, Faghfouri E, Faramarzi MA, Sepehrizadeh Z, Hassan ZM, et al. Th1 Immune Response Induction by Biogenic Selenium Nanoparticles in Mice with Breast Cancer: Preliminary Vaccine Model. *Iranian Journal of Biotechnology* 2015; 13: 1-9.
 32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
 33. Lee C. Protein extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol* 2007; 362: 385-9.
 34. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J of Appl Physiol* 2004; 96: 2249-56.
 35. Woods JA, Davis JM, Kohut ML, Ghaffar A, Mayer EP, Pate RR. Effects of exercise on the immune response to cancer. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26: 1109.
 36. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 228.
 37. Prokopchuk O, Steinacker JM, Nitsche U, Otto S, Bachmann J, Schubert EC, et al. IL-4 mRNA Is Downregulated in the Liver of Pancreatic Cancer Patients Suffering from Cachexia. *Nutr Cancer* 2017; 69: 84-91.
 38. Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Nonmuscle Tissues Contribution to Cancer Cachexia. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 182872.
 39. Bachmann J, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. Cachexia in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: impact on survival and outcome. *Nutr Cancer* 2013; 65: 827-33.
 40. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 315-22.
 41. Narsale AA, Enos RT, Puppa MJ, Chatterjee S, Murphy EA, Fayad R, et al. Liver inflammation and metabolic signaling in ApcMin/+ mice: the role of cachexia progression. *PLoS One* 2015; 19: e0119888.
 42. Dumas JF, Goupille C, Julianne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, et al. Efficiency of oxidative phosph-

- orylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J Hepatol* 2011; 54: 320-7.
43. Molanouri Shamsi M, Chekachak S, Soudi S, Quinn LS, Rangbar K, Chenari J, et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- α ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine* 2016; 90: 100-8.
44. Hess KR, Varadhanachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, et al. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 2006; 106: 1624-33.
45. Adam R, Aloia T, Krissat J, Bralet MP, Paule B, Giacchetti S, et al. Is liver resection justified for patients with hepatic metastases from breast cancer? *Ann Surg* 2006; 244: 897-907.
46. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8: 98-101.
47. Price JE, Naito S, Fidler IJ. Growth in an organ micro-environment as a selective process in metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1988; 6: 91-102.
48. Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, et al. A lymphokine, provisionally design-ated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 4935-9.
49. Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, Akama T, Tanabe K, Nishijima T, et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev* 2008; 14: 24-37.
50. Ogawa K, Oka J, Yamakawa J, and Higuchi M. Habitual exercise did not affect the balance of type 1 and type 2 cytokines in elderly people. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 951-6.
51. Drela N, Kozdron E, Szczypiorski P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC Geriatrics* 2004; 4: 8.
52. Pedersen L, Hojman P. Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines. *Adipocyte* 2012; 1: 164-7.
53. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; 88: 1379-406.
54. Zeng H, Combs GF Jr. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 1-7.

Original Article

Assessment of Aerobic Training with Selenium Nanoparticles Supplementation Effects on Cytokines Levels of Liver Tissue in 4T1 Breast Cancer Mice

Chekachak S¹, Molanouri Shamsi M¹, Soudi S²

¹Department of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Humanities, & ²Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, I.R. Iran

e-mail: molanouri@modares.ac.ir

Received: 08/01/2017 Accepted: 06/06/2017

Abstract

Introduction: The liver is known as a tissue highly sensitive to immunological changes such as cytokines activity. It has been shown that using selenium nanoparticle supplementation and exercise training separately can effectively decrease tumor volume and improve immune responses. The aim of this study was to examine the effects of aerobic interval training and supplementation of selenium nanoparticles on protein expression of cytokines in liver tissue in mice with breast cancer. **Materials and Methods:** Sixty-four Balbc mice were divided into eight groups. Experimental groups received aerobic interval training and selenium nanoparticles supplementation orally for 6 weeks, before and after cancer induction. At the end of the sixth week, after tumor injection, proteins levels of IL-6, IL-4, TNF- α and INF- γ were measured in liver tissue by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results:** Results of the current study showed that IL-6, TNF- α and IL-4 protein levels decreased in liver tissue of the breast cancer tumor ($P<0.05$). Aerobic interval training caused significant increase in IL-6 and TNF- α protein levels in liver tissue ($P<0.05$). Increase in INF- γ cytokine levels in liver tissue was also observed, following selenium nanoparticle supplementation ($P<0.05$). Results also showed that tumor volume decreased following exercise training and administration of selenium nanoparticles administration. **Conclusion:** Cytokines changes in liver tissue occurred in conjunction with decrease in tumor volume. It is possible that simultaneously using selenium nanoparticles and exercise training with immune system reinforcement could help in reducing tumor volume and modulating cytokine levels in liver.

Keywords: Aerobic Training, Selenium Nano-particles, Cytokine, Liver, Breast Cancer, 4T1 Tumor