







Research Article

## The Effect of Interval Training and *Urtica Dioica* Hydroalcoholic Extract on some Growth and Immune Factors in C57 Rats with Melanoma Cancer

Maryam Firoozi<sup>1</sup> , Alireza Barari<sup>2,\*</sup> , Asieh Abbassi Dalooi<sup>2</sup> , Hossein Abednatanzi<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Ph.D Student, Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>3</sup> Assistance Professor, Department of Sport Physiology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* **Corresponding author:** Alireza Barari, Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran. E-mail: [alireza54.barari@gmail.com](mailto:alireza54.barari@gmail.com)

DOI: [10.61186/cmja.13.4.44](https://doi.org/10.61186/cmja.13.4.44)

### How to Cite this Article:

Firoozi M, Barari A, Abbassi Dalooi A, Abednatanzi H. The Effect of Interval Training and *Urtica Dioica* Hydroalcoholic Extract on some Growth and Immune Factors in C57 Rats with Melanoma Cancer. *Complement Med J.* 2024;**13**(4):44-53. DOI: [10.52547/cmja-13045](https://doi.org/10.52547/cmja-13045)

Received: 10 Oct 2023

Accepted: 18 Jan 2024

### Keywords:

Melanoma Cancer  
Interval Training  
*Urtica Dioica*  
Growth and Immune Factors

© 2024 Arak University of Medical Sciences

### Abstract

**Introduction:** Introduction: Exercise interventions combined with medicinal plants are effective in preventing or reducing cancer symptoms and side effects caused by cancer treatment. The aim of this study was to investigate the effect of interval training and consumption of *Urtica dioica* hydroalcoholic extract on selected factors of immune and growth in C57BL/6 rats with melanoma cancer.

**Methods:** In this experimental study, 20 C57BL/6 rats were randomly divided into four groups include control (cancer), *Urtica dioica* (cancer), and *Urtica dioica* - interval training (cancer). Experimental groups received nettle extract of 30 mg daily per kilogram of body weight. The interval exercise program included running on a treadmill 60 minutes at a speed of 28 meters per minute, five days a week for six weeks. Levels of nucleotide exchange factor (Apg-2), heat shock protein 70 (HSP70), cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), programmed death protein-1 (PD-1), insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) of rats was measured by Real Time PCR method. The data were analyzed and analyzed by One -way variance analysis and the Toky's test at the  $P < 0.05$ .

**Results:** interval training led to significant increase in gene expression of APG2, CTLA4 and decrease in IGFBP2 ( $P < 0.001$ ). *Urtica dioica* extract led to significant decrease in IGFBP2 ( $P < 0.010$ ). interval training with *Urtica dioica* extract led to significant increase in gene expression of APG2 and decrease in IGFBP2 compared to the *Urtica dioica* group ( $P < 0.001$ ). There was no significant difference between the mean of PD-1 gene expression in different groups ( $P = 0.158$ ).

**Conclusions:** According to the results, interval training with *Urtica dioica* hydroalcoholic consumption has more advantages in regulating gene expression of some growth and immune factors in melanoma cancer than interval training and *Urtica dioica* consumption alone.

### INTRODUCTION

The incidence of various cancers is increasing, and cancer is the most deadly disease that threatens human life (1). In melanoma tumor biology, suppression of the normal immune response is crucial for the growth of malignant

melanoma, which inevitably leads to oncogenesis in melanocytes (3). Previous studies have shown that insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) can reduce IGF-induced tumorigenesis by binding to insulin-like growth factors (IGFs) (5,6). In human cells, heat

shock protein 110 is in charge of the cell protein control and regeneration system and is related to the survival of cancer cells and resistance to chemotherapy (9). Also, "immune checkpoint pathways" regulate the activation of T cells during an immune response, a process called environmental tolerance (10). Central to this process are the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and programmed death 1 (PD-1) immune checkpoint pathways. Exercise is an important non-pharmacological treatment that can be used to prevent and treat melanoma (14). In addition to sports activities, recent studies have reported the cytotoxic and anticancer properties of nettle, especially against colon, stomach, lung, prostate, and breast cancer (20, 21).

Since the identification of underlying molecular mechanisms of the protective effect of exercise on the reduction of cancer complications continues, the interventions combining exercise with medicinal plants to regulate the growth response and immune molecules are very important in this regard, so the present study aims to investigate the effect for the first time. Six weeks of intermittent exercise and nettle hydroalcoholic extract affect some growth and immune factors in C57 mice with melanoma cancer.

#### **METHODS**

In this experimental study, 20 C57BL/6 rats were randomly divided into four groups include control (cancer), *Urtica dioica* (cancer), and *Urtica dioica* - interval training (cancer). Experimental groups received nettle extract of 30 mg daily per kilogram of body weight. The interval exercise program included running on a treadmill 60 minutes at a speed of 28 meters per minute, five days a week for six weeks. Levels of nucleotide exchange factor (Apg-2), heat shock protein 70 (HSP70), cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), programmed death protein-1 (PD-1), insulin-like growth

factor-binding protein 2 (IGFBP2) of rats was measured by Real Time PCR method. The data were analyzed and analyzed by One -way variance analysis and the Toky's test at the  $p < 0.05$ .

#### **RESULTS**

Interval training led to significant increase in gene expression of APG2, CTLA4 and decrease in IGFBP2 ( $P < 0.001$ ). *Urtica dioica* extract led to significant decrease in IGFBP2 ( $P < 0.010$ ). interval training with *Urtica dioica* extract led to significant increase in gene expression of APG2 and decrease in IGFBP2 compared to the *Urtica dioica* group ( $P < 0.001$ ). There was no significant difference between the mean of PD-1 gene expression in different groups ( $P = 0.158$ ).

#### **CONCLUSION**

Among the effective mechanisms of sports exercises on immune factors and as a result inhibiting the growth of body temperature increase and the occurrence of oxidative stress during physical activities, which can be the cause of the increase of these indicators after sports exercises. The recruitment and redistribution of immune cells occurs through mechanisms including shear and adrenergic stress caused by blood flow.

Stinging nettle extract may exert biological anticancer activities through various mechanisms, including antioxidant and antimutagenic properties, induction or inhibition of key processes in cellular metabolism, and the ability to activate apoptotic pathways. Most anticancer drugs induce apoptosis as a primary mechanism to inhibit cell proliferation. It is possible that intermittent exercises in combination with nettle hydroalcoholic consumption may lead to more effective regulation of the gene expression of some growth and immune factors in melanoma cancer, but a definitive opinion requires more research in this field.



## تأثیر شش هفته تمرینات تناوبی و عصاره هیدرو الکلی گزنه بر برخی عوامل رشد و ایمنی در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما

مریم فیروزی نیاکی<sup>۱</sup>، علیرضا براری<sup>۲\*</sup>، آسیه عباسی دلویی<sup>۲</sup>، حسین عابد نطنزی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: علیرضا براری، دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران. ایمیل:

[alireza54.barari@gmail.com](mailto:alireza54.barari@gmail.com)

DOI: 10.52547/cmja-13045

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۸	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۸	مقدمه: مداخلات ورزشی همراه با گیاهان دارویی در پیشگیری یا کاهش علائم سرطان و عوارض جانبی ناشی از درمان سرطان مؤثر است. هدف این پژوهش بررسی تأثیر شش هفته تمرینات تناوبی و عصاره هیدرو الکلی گزنه بر عوامل رشد و ایمنی در موش‌های C57BL/6 مبتلا به سرطان ملانوما بود.
واژگان کلیدی: سرطان ملانوما تمرین تناوبی عصاره گزنه عوامل رشدی شاخص‌های ایمنی	روش کار: در این تحقیق تجربی، ۲۰ سر موش C57BL/6 به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (سرطانی)، تمرین (سرطانی)، گزنه (سرطانی) و تمرین-گزنه (سرطانی) تقسیم شدند. یک هفته پس از القا سرطان ملانوما، گروه تجربی میزان ۳۰ mg/kg/day عصاره هیدرو الکلی گیاه گزنه را به روش خوراکی و به مدت هشت هفته مصرف کردند. برنامه تمرین تناوبی شامل دویدن روی تردمیل هر جلسه ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه، پنج روز هفته و به مدت شش هفته اجرا شد. میزان بیان ژن فاکتور تبادل نوکلئوتیدی (AP2)، آنتی ژن ۴ مرتبط با لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTLA-4)، پروتئین مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ (PD-1) و پروتئین ۲ متصل شونده به فاکتور رشد شبه‌انسولین (IGFBP2) موش‌ها به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها به روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.
تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.	یافته‌ها: تمرینات تناوبی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن CTLA4، AP2 و کاهش IGFBP2 شد ( $P < 0.01$ ). عصاره گزنه منجر به کاهش معنی‌دار IGFBP2 شد ( $P < 0.01$ ). تمرینات تناوبی همراه با عصاره گیاه گزنه منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن AP2 و کاهش IGFBP2 نسبت به گروه گزنه شد ( $P < 0.01$ ). بین میانگین بیان ژن PD-1 در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P = 0.158$ ).
	نتیجه گیری: با توجه به نتایج، تمرین تناوبی به همراه مصرف هیدرو الکلی گزنه نسبت به تمرین تناوبی و مصرف هیدرو الکلی گزنه به تنهایی مزایای بیشتری در جهت تنظیم بیان ژن برخی عوامل رشد و ایمنی در سرطان ملانوما به همراه دارد.

### مقدمه

بروز سرطان‌های مختلف رو به افزایش است و سرطان کشنده‌ترین بیماری تهدید کننده زندگی انسان است (۱). ملانوم بدخیم یکی از تهاجمی‌ترین انواع تومور بدخیم است که با تهاجم سریع و متاستاز مشخص می‌شود. میزان بروز ملانوم در چند سال گذشته به تدریج افزایش یافته است (۲). مطالعات نشان می‌دهند که احتمال ابتلا به سرطان در بیماران دچار نقص ایمنی بسیار بیشتر از آنهایی است که پاسخ ایمنی مناسب به بیماری دارند (۳، ۴). در نتیجه، ملانوم در جمعیتی با نقص ایمنی شایع‌تر است و نقص ایمنی به عنوان یک عامل خطر مهم برای تومورزایی شناخته می‌شود. عوامل ایمنی با تحریک سلول‌های استرومایی تومور برای تولید متالوپروتئینازهای ماتریکس و تخریب غشای پایه و استروما، نقش مهمی در متاستاز تومور ایفا می‌کنند (۱).

در بیولوژی تومور ملانوم، سرکوب پاسخ ایمنی معمولی برای رشد ملانوم بدخیم بسیار مهم است که به ناچار منجر به انکوژنز در ملانوسیت می‌شود (۳). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئین ۲ متصل شونده به فاکتور رشد شبه انسولین (IGFBP2) می‌تواند با اتصال به فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFs)، تومورزایی ناشی از IGF را کاهش دهد (۵، ۶). IGFBP2 متعلق به خانواده پروتئین‌های اتصال دهنده IGF است که شامل شش عضو (IGFBP1-6) با میل ترکیبی بالا به فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF1) و فاکتور رشد شبه انسولین-۲ (IGF2) است (۷). عملکرد جمعی چپرون‌های مولکولی نیز برای حفظ هموستاز سلولی که منجر به بقا می‌شود ضروری است (۸). در سلول‌های انسانی، پروتئین‌های شوک گرمایی ۷۰ و ۱۱۰ سیستم کنترل و بازسازی پروتئین سلولی را بر عهده دارند و با بقای

بار به بررسی تأثیر شش هفته تمرینات تناوبی و عصاره هیدرو الکلی گزنه بر برخی عوامل رشد و ایمنی در موش‌های CS7 مبتلا به سرطان ملانوما پیردازد.

## روش کار

پژوهش حاضر، یک مطالعه تجربی است. نمونه‌های پژوهش حاضر را ۲۰ سر موش CS7BL/6 از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه مرودشت شیراز تشکیل دادند که از لحاظ ژنتیکی مشابه با یکدیگر بودند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵٪ (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 (۵ سر در هر گروه) تعیین شد. حیوانات پس از ورود به محیط پژوهش و آشنایی دو هفته‌ای با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان، به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (سرطانی)، تمرین (سرطانی)، گزنه (سرطانی) و تمرین - گزنه (سرطانی) تقسیم شدند. حیوانات مورد آزمایش در این پژوهش در طی دوره آشنایی با محیط جدید و آشنایی با نوارگردان و همچنین دوره اجرای پروتکل در قالب گروه‌های ۵ سر موش در قفس‌های پلی کربنات شفاف با ابعاد ۱۵ × ۱۵ × ۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد و در دمای محیطی با ۱/۴ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت هوا ۴۴ ± ۵۵ درصد نگهداری شدند. در این تحقیق اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگه داری مناسب و عدم اجبار در تمرینات مد نظر قرار گرفت. همه آزمایشات بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینکی اجرا شد. معیار انتخاب به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش‌ها و قرار گرفتن در محدوده وزنی مورد نظر بود. معیار خروج از مطالعه عدم اجرای پروتکل تمرینی و مصرف نکردن مکمل، مؤنث بودن و آسیب حین اجرا تمرین بود.

## القاء سرطان ملانوما

در تحقیق حاضر رده‌های سلولی سرطان‌های ملانومای موشی (B16F10) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. این سلولها به دلیل یکسان بودن نوع سلول با گونه‌ی موش مورد مطالعه انتخاب شدند. سلول‌ها در محیط کشت Medium 199 کشت داده شده‌اند و زمانی که تراکم سلولی به ۸۰ درصد رسید، برای تزریق به موش آماده شدند. تعداد سلول‌های زنده قبل از تزریق با رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد. به موش‌های مورد نظر در روز مطالعه، ۱۰۶ سلول به صورت زیر جلدی در پهلو چپ تزریق شد. لازم به ذکر است که رده سلولی سرطان و پروتکل تزریق قبلاً برای ایجاد این نوع سرطان مشخص است و ثابت شده و رشد تومور هم این مسئله را ثابت می‌کند (۲۲).

## نحوه مصرف عصاره هیدرو الکلی گزنه

مقداری از ساقه و برگ گیاه گزنه از منطقه ییلاقی نمارستان شهرستان آما تهیه گردید، پس از برش به قطعات کوچک جمع آوری و شستشو داده، سپس در هوای آزاد خشک کرده و با دستگاه به صورت پودر درآمد. سپس ۶۰ گرم پودر گیاه گزنه را داخل یک بشر ۲/۵ لیتری قرار داده و ۲ لیتر آب مقطر را به آن اضافه کرده و بشر را روی هیتر مخصوص

سلول‌های سرطانی و مقاومت در برابر شیمی درمانی مرتبط می‌باشند (۹). همچنین "مسیرهای بازرسی ایمنی"، فعال شدن سلول‌های T را در طول یک پاسخ ایمنی تنظیم می‌کند، فرآیندی که تحمل محیطی نامیده می‌شود (۱۰). محور اصلی این فرآیند، آنتی ژن ۴ مرتبط با لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTLA-4) و مسیرهای بازرسی ایمنی مرگ برنامه ریزی شده ۱ (PD-1) است. تصور می‌شود مسیرهای CTLA-4 و PD-1 در مراحل مختلف یک پاسخ ایمنی عمل می‌کنند. CTLA-4 به عنوان "رهبر" مهارکننده‌های بازرسی ایمنی در نظر گرفته می‌شود، زیرا سلول‌های T خود واکنشی را در مرحله اولیه فعال سازی سلول‌های T بکر، به طور معمول در غدد لنفاوی متوقف می‌کند (۱۰). مسیر PD-1 نیز سلول‌های T فعال را در یک پاسخ ایمنی به ویژه در بافت‌های محیطی، تنظیم می‌کند (۱۱).

پیشرفت‌های بزرگی در درک پاتوژنز ملانوم حاصل شده است که منجر به بهبود نتایج درمان بیماری از جمله درمان‌های هدفمند شده است. مطالعات بالینی نشان داده‌اند که ورزش برخی از عوارض جانبی مرتبط با درمان سرطان را بهبود می‌بخشد (۱۲، ۱۳). فعالیت ورزشی یک درمان مهم غیر دارویی است که می‌تواند برای پیشگیری و درمان ملانوم استفاده شود (۱۴). فعالیت ورزشی بیان نشانگرهای ایست بازرسی ایمنی را افزایش می‌دهد و بنابراین، می‌تواند یک عامل ارگذار برای درمان مهار ایست بازرسی ایمنی باشد. در تحقیقی مشاهده شد دویدن روی چرخ دوار باعث افزایش بیان مولکول‌های بازرسی ایمنی (PD-1) در موش‌های CS7BL/6 حامل تومور B16 شد (۱۵). با این حال، در مطالعه دیگری هشت هفته تمرین ترکیبی (مقاومتی هوازی) سطوح سرمی پروتئین‌های اتصال دهنده به فاکتور رشد شبه انسولین ۳ (IGFBP-3) در مردان مبتلا به سرطان پروستات را در گروه تجربی افزایش داد (۱۶).

علاوه بر فعالیت‌های ورزشی، استفاده از برخی گیاهان و ترکیبات آنها به عنوان داروهای ضد سرطانی بالقوه که فعالیت مستقیمی بر روی سلولهای بدخیم داشته باشند نیز در این راستا مفید می‌باشد (۱۷). گیاهان غنی از فلاونوئید موجب تقویت سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی می‌شوند (۱۸). U. dioica رایج‌ترین گونه از خانواده Urticaceae است که معمولاً به نام گزنه شناخته می‌شود و یکی از گیاهان دارویی بسیار مورد مطالعه در سراسر جهان است. گیاه گزنه محتوای فلاونوئیدها و ترکیبات زیست فعالی است که رشد تومور را مهار کرده و پتانسیل ایمنی ذاتی سلولی را افزایش می‌دهد (۱۹). مطالعات اخیراً خواص سیتوتوکسیک و ضد سرطانی گزنه به ویژه در برابر سرطان روده بزرگ، معده، ریه، پروستات و سینه را گزارش کرده‌اند (۲۰، ۲۱). نشان داده شده است که عصاره متانولی برگ گیاه گزنه رشد سلولی در رده‌های سلولی سرطان ریه انسان مهار می‌کند (۲۰).

با توجه به عوارض سرطان درمان‌هایی که در حال حاضر برای آن در نظر گرفته می‌شوند، هزینه‌های بالای درمان‌های مرسوم و افزایش بروز سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، پیشبرد رویکردهای جدیدتر با کارایی بالاتر ضروری به نظر می‌رسد تا شدت بیماری کاهش یابد. از آنجایی که شناسایی مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی محافظ اثر ورزش بر کاهش عوارض سرطان ادامه دارد مداخلات ترکیبی ورزش با گیاهان دارویی برای تنظیم پاسخ رشد و مولکول‌های ایمنی در این راستا بسیار مهم می‌باشد، بنابراین مطالعه حاضر قصد دارد برای اولین

و در تانک اذت ۸۰- درجه فریز شد. سپس بافت‌ها برای نگهداری به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان اجرای پروتکل آزمایشگاهی مورد نظر نگهداری شد. برای بررسی بیان ژن‌ها از تکنیک Real time PCR توسط دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia) با تعداد ۴۰ سیکل استفاده شد. پرایمر ژن‌ها برای سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت کبد با استفاده از تیزاول، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد.

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A260 \times \epsilon \times d / 1000$$

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. 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 BZW1 محاسبه گردید (جدول ۱). پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۱۰ ثانیه، و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۱۰ ثانیه‌ای در حرارت ۶۰° بود. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

(مدل MR3001 K، شرکت Heidolph آلمان) را حرارت ملایم قرار داده شد. پس از جوشاندن با کاغذ صافی جوشانده موردنظر تصفیه شد. عصاره گیری داخل دستگاه تقطیر در خلأ دوار روتاری (Laboratory 4003 ساخت شرکت Heidolph آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و فشار خلأ ۶۵ mbar و دور ۲۰ rpm قرار داده شد. برای تهیه محلول، عصاره 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 (۲۳).

### پروتکل تمرین تناوبی

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 کردند. از هفته دوم مرحله اضافه بار به مدت سه هفته تا پایان هفته چهارم اعمال شد. مرحله اضافه بار بدین گونه بود که در هر روز تمرینی ۳ دقیقه به زمان فعالیت و یک متر بر دقیقه به بر سرعت تردمیل افزوده شد تا اینکه در پایان هفته چهارم سرعت تردمیل به ۲۸ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه فعالیت برسد. از هفته چهارم تا ششم به مدت سه هفته مرحله ثابت با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه و به مدت یک ساعت ادامه یافت (۲۴). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا)، رت‌های مورد مطالعه در هر گروه با تزریق درون صفاقی کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) از شرکت مهامکس بیهوش شدند و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. بافت کبد برداشته شده

جدول ۱. الگوی پرایمر IGFBP2, PD-1, CTLA-4, APG2

Genes	Forward Primers	Reverse Primers	Length	Tm
APG2	GGCAAAAGTGAAGACCAGCA	GCGTCATCCGTTCCCTTCTC	20	58.97
CTLA-4	TTGACACGGGACTGTACCTC	ATAAATCTGCGTCCCCTTGC	20	59.04
IGFBP2	TGATGACGACCACTCTGAGG	AGCTCCTTCATGCCTGACTT	20	58.82
PD-1	AGCAAGGACGACACTCTGAA	GCTCTGGTGTCTTCTCTCGT	20	58.96
BZW1	AACAGATGTCCTGGTGAT	TTCCGATGACAACTGGCTCT	20	59.02

وجود دارد (F=637/42 و P=0/001). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه کنترل با گروه گزنه (P=۰/۱۰۱) و بین گروه تمرین - گزنه با گروه تمرین (P=۰/۸۰۵) تفاوت معناداری وجود ندارد اما بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار ۱). یافته دیگر تحقیق نشان داد بین میانگین تغییرات بیان ژن CTLA-4 در گروه‌های مختلف تفاوت وجود دارد (F=230/8 و P=0/001). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه کنترل با گروه گزنه (P=۰/۷۱۱)، گروه گزنه با گروه تمرین - گزنه (P=۰/۲۸۳) و بین گروه تمرین - گزنه با گروه تمرین (P=۰/۳۶۰) تفاوت معناداری وجود ندارد اما بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار ۲). نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات PD-1 در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری ندارد (F=923/1 و P=0/158) (نمودار ۳).

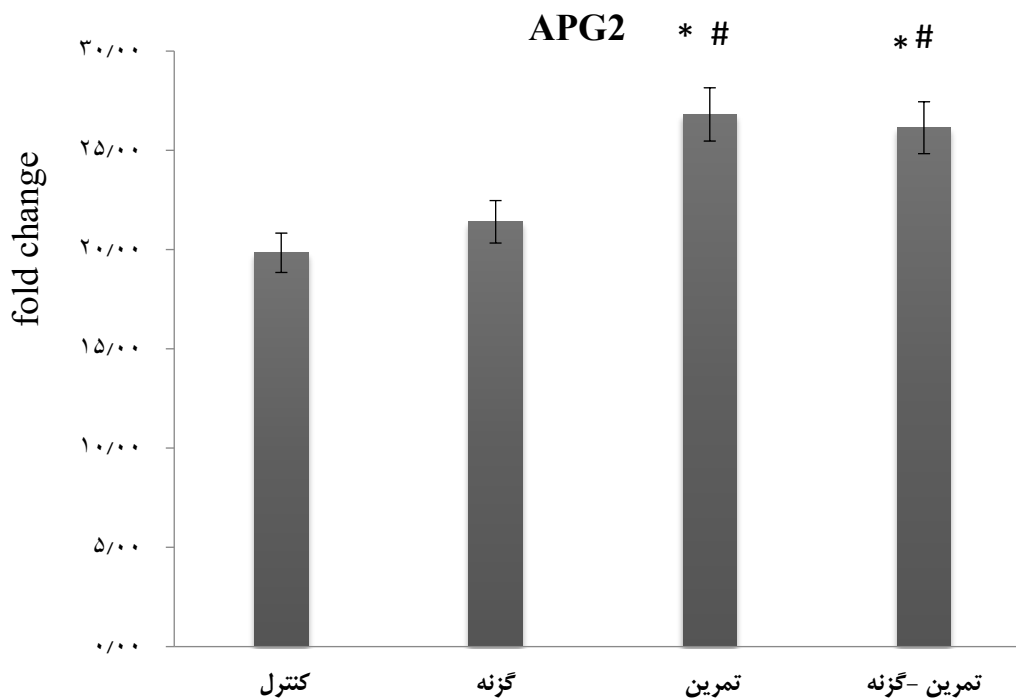
برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. بعد از این که طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید، جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای تحقیق از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی داری در همه موارد (α) ≤ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم افزارهای SPSS با ویراست ۲۶ و Excel به اجرا در آمد.

### یافته‌ها

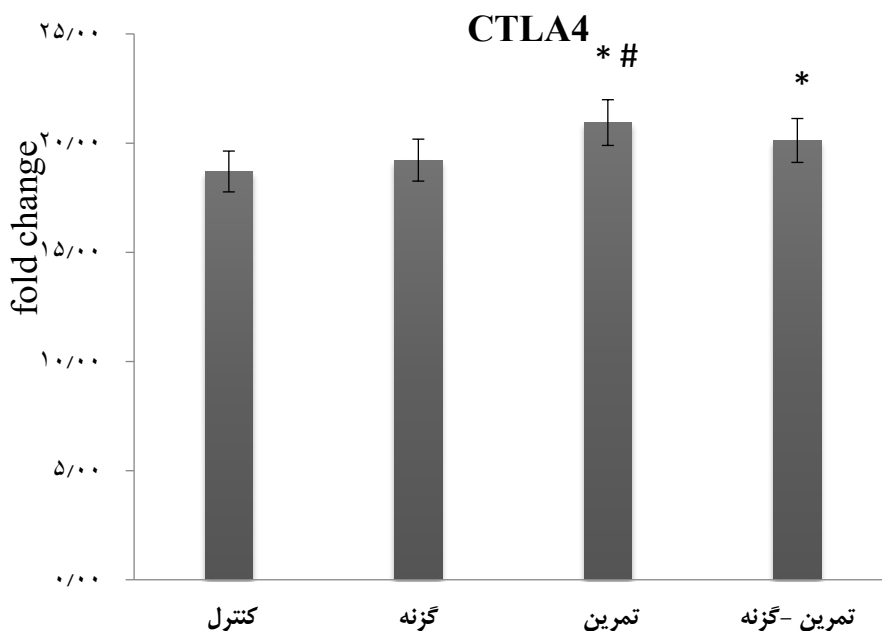
نتایج نشان داد توزیع داده‌ها در تمام گروه‌ها نرمال می‌باشد. بنابراین از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه جهت مقایسه متغیرها در گروه‌های مختلف استفاده شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد بین میانگین تغییرات بیان ژن APG2 در گروه‌های مختلف تفاوت

تفاوت معناداری وجود ندارد اما بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار ۴).

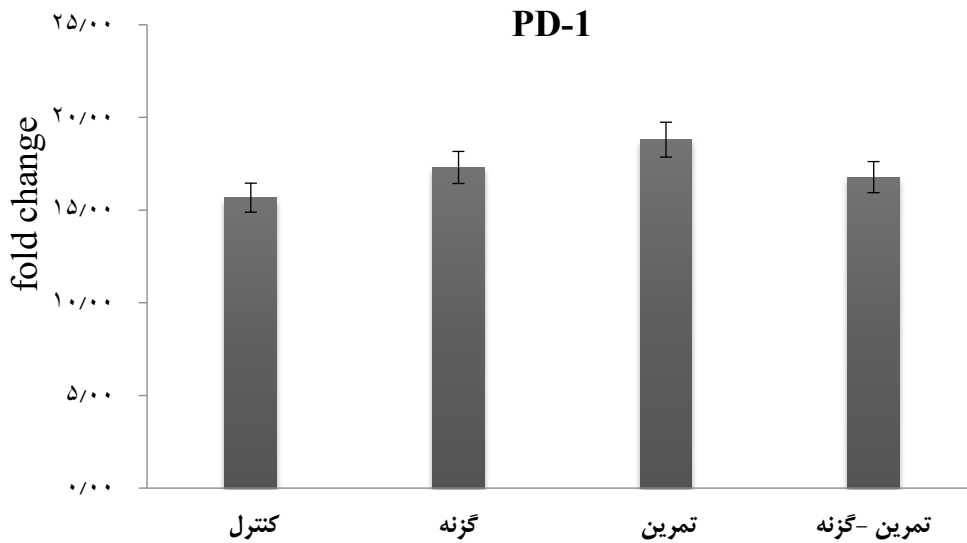
نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات بیان ژن IGFBP2 در گروه‌های مختلف تفاوت وجود دارد ( $F=889/39$  و  $P=0/001$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه تمرین و تمرین - گزنه ( $P=0/142$ )



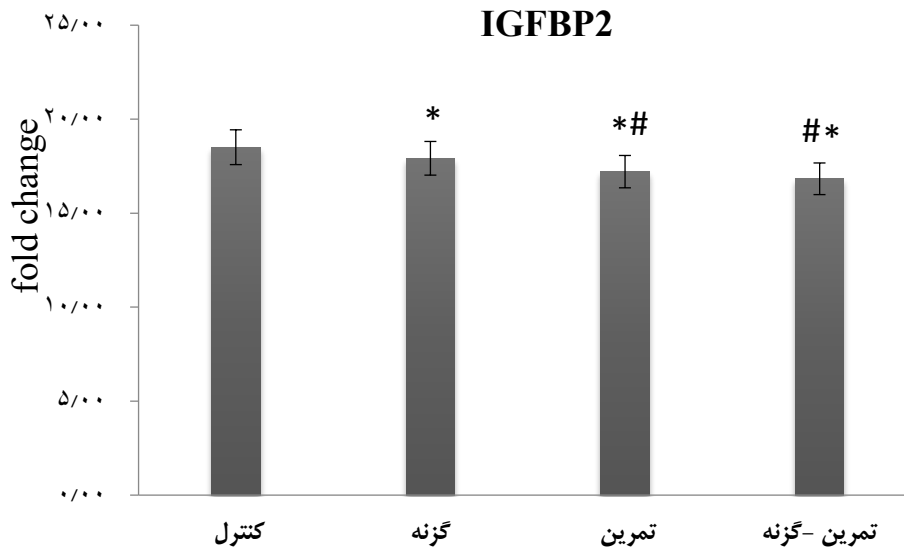
نمودار ۱. تغییرات میانگین APG2 در گروه‌های مختلف تحقیق  
\*تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل؛ # تفاوت معنی دار نسبت به گروه گزنه ( $P<0/05$ ).



نمودار ۲. تغییرات میانگین CTLA4 در گروه‌های مختلف تحقیق  
\*تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل؛ # تفاوت معنی دار نسبت به گروه گزنه ( $P<0/05$ ).



نمودار ۳. تغییرات میانگین PD-1 در گروه‌های مختلف تحقیق



نمودار ۴. تغییرات میانگین IGFBP2 در گروه‌های مختلف تحقیق  
#تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل؛ \*تفاوت معنی دار نسبت به گروه گزنه ( $P < 0.05$ ).

می‌رسد که از جمله مکانیزم‌های اثرگذار تمرین‌های ورزشی بر عوامل ایمنی و در نتیجه مهار رشد افزایش درجه حرارت بدن و بروز استرس اکسایشی در طول اجرای فعالیت‌های بدنی باشد که می‌تواند عامل افزایش این نشانگرها به دنبال تمرین‌های ورزشی باشد. در حقیقت به دلیل اینکه تمرین با شدت بالا به عنوان یک وضعیت استرس زا در نظر گرفته می‌شود، پروتئین‌های شوک حرارتی فعال و میزان بیان آن‌ها افزایش می‌یابد که این امر نقش حیاتی این پروتئین‌های اساسی را در از بین بردن یا تضعیف استرس نشان می‌دهد (۲۹، ۳۰). مخالف با نتایج مطالعه ما، صالحیان و همکاران روی موش‌های مبتلا به سرطان سینه، HSP70 در گروه تمرین تناوبی پس از هفت هفته کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود (۳۱). تفاوت در میزان پروتئین شوک گرمایی در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت‌های مربوط به سطوح پایه این نشانگرها و انواع مختلف سرطان، همچنین شدت و مدت تمرین باشد.

### بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد تمرینات تناوبی منجر به افزایش معنی دار بیان ژن CTLA4، APG2 و کاهش معنی دار بیان ژن IGFBP2 در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما شد. اگرچه تمرینات تناوبی بر میزان بیان ژن PD-1 در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما تأثیر معنی داری نداشت. یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج مطالعات ونربرگ و همکاران (۲۰۲۰) و اوگاتا و همکاران (۲۰۰۸) روی پروتئین‌های شوک گرمایی همخوان می‌باشد (۲۵، ۲۶). Hsp110 در ملانوم بیش از حد بیان می‌شود (۲۷). شواهد نشان می‌دهد که تمرین منظم می‌تواند تأثیر مثبتی بر عوامل ایمنی و در نتیجه مهار رشد تومور داشته باشد. در همین زمینه پدرس و همکاران (۲۰۱۶) مشاهده کردند که ورزش رشد ملانوما را کاهش می‌دهد (۲۸). به نظر

طوری که با ۳۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطان پروستات انسانی پس از قرار گرفتن در معرض ۵ روز با غلظت ۱ گرم در میلی لیتر عصاره گزنه مشخص شد (۴۱). علاوه بر این، اسکوپلیتین یک کورمارین مشتق شده توسط یک مسیر بیوسنتز شناخته شده است که دارای خواص ضد التهابی است (۴۲) و گزارش شده است که باعث القای اثرات ضد رشد در رده سلولی PC3 سرطان پروستات می‌شود (۴۳). اخیراً، دابروسکا و همکاران اثرات عصاره متانولی برگ گیاه گزنه بر رده‌های سلولی سرطان ریه انسان را بررسی کردند. قرار گرفتن در معرض عصاره متانولی برگ گیاه گزنه، با ۴۷/۵ و ۵۲/۳ گرم در میلی لیتر رشد سلولی را مهار کرد (۲۰). عصاره گیاه گزنه ممکن است فعالیت‌های ضد سرطانی بیولوژیکی را از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد جهش زا، القا یا مهار فرآیندهای کلیدی در متابولیسم سلولی و توانایی فعال کردن مسیرهای آپوپتوز اعمال کند. اکثر داروهای ضد سرطان آپوپتوز را به عنوان یک مکانیسم اولیه برای مهار تکثیر سلولی القا می‌کنند (۱۷). محتمل‌ترین توضیح برای اثر ضد سرطانی قابل توجه گیاه گزنه محتوای فلاونوئیدها و سایر مولکول‌های شناخته شده و/یا مواد هنوز ناشناخته آن است. در میان مواد غذایی فعال زیستی مولکول‌های عصاره گیاه گزنه فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی هستند که از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، القای آپوپتوز، مهار رشد سلولی و مهاجرت سلولی قادر به القای ضد سرطان هستند (۱۷). با این حال، اثرات مشاهده شده می‌تواند توسط چندین مولکول و احتمالاً مولکول‌هایی ایجاد شود که هنوز شناسایی نشده‌اند. بنابراین مطالعات بیشتری برای بررسی اجزای زیست فعال گزنه و نحوه عملکرد آنها مورد نیاز است. علاوه بر این، یافته‌های مطالعه ما نشان می‌دهد که تمرینات تناوبی همراه با مصرف هیدرو الکلی گزنه به طور معنی داری منجر به کاهش بیشتر بیان ژن IGFBP2 و افزایش بیشتر بیان ژن APG2 نسبت به گروه گزنه در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما شد با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که میزان پاسخ گویی این عوامل به مداخله تمرینات تناوبی همراه با مصرف هیدرو الکلی گزنه بیشتر است هر چند توضیح این رخداد مشخص نیست. با این حال، بیان ژن CTLA4 و PD-1 در گروه تمرینات تناوبی همراه با مصرف هیدرو الکلی گزنه نسبت به گروه گزنه و تمرین در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما تفاوت معنی داری نداشت. بنابراین ممکن است تمرینات تناوبی در ترکیب با مصرف هیدرو الکلی گزنه ممکن است منجر به تنظیم موثرتر بیان ژن برخی عوامل رشد و ایمنی در سرطان ملانوما شود ولی اظهار نظر قطعی نیازمند پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد. با توجه به اینکه تحقیق حاضر به مدت شش هفته انجام گرفته احتمالاً مدت مصرف هیدرو الکلی گزنه در نتایج به دست آمده تاثیرگذار بوده است از آنجایی که بسیاری از مداخلات دارویی گیاهی و درمانی به همراه تمرین جهت اعمال تأثیر معنی دار بر عوارض و پیامدهای ناشی از سرطان نیاز به دوره طولانی‌تری دارند. همچنین میزان دوز مصرف هیدرو الکلی گزنه در مطالعه حاضر ۳۰ میلی گرم روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بوده است این احتمال وجود دارد که با تغییر میزان دوز مصرف بتوان به نتایج متفاوتی دست یافت. نقطه قوت اصلی مطالعه حاضر، مقایسه اثربخشی چندین مداخله برای شناسایی بهترین مداخله است. رویکرد فعلی در نتیجه منجر به تصمیم‌گیری‌های آگاهانه‌تر می‌شود. یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر را می‌توان تعداد

شواهد نشان می‌دهد که بیان بالا و نابجای IGFBP2 ممکن است به عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص و پیش‌آگهی بیماران و همچنین به عنوان یک هدف درمانی بالقوه برای مدیریت درمان بالینی در بیماران مبتلا به بیماری بدخیم عمل کند (۶). چندین مکانیسم بیولوژیکی می‌تواند اثرات ورزش در تعدیل سیستم‌های IGFBP را توضیح دهد. به طور گسترده‌ای شناخته شده است که ورزش پتانسیل کاهش مقاومت به انسولین و افزایش در دسترس بودن گلوکز کبد و عضلات را به دلیل به مسیرهای سیگنالینگ انسولین، بهبود در میرگی تراکم منجر به تحویل بهتر گلوکز عضلانی، افزایش در ناقل پروتئین گلوکز و تأثیر بر mRNA دارد (۳۲). این شرایط باعث کاهش غلظت انسولین به دلیل غلظت کمتر IGFs از طریق تغییرات با واسطه انسولین در غلظت IGFBP می‌شود (۳۳). نشان داده شده است که IGFBP به تغییرات در مسیرهای متابولیکی وابسته است (۳۴). از این رو، به نظر می‌رسد که تمرینات ورزشی تغییرات محسوسی در این پروتئین ایجاد کند. پروتئین CTLA-4 به طور اساسی توسط Tregs بیان می‌شود. یکی از مکانیسم‌هایی که به موجب آن Tregs تصور می‌شود سلول‌های T کمک‌کننده را کنترل می‌کند. CTLA-4 با کاهش غیرمستقیم سیگنال دهی از طریق گیرنده CD28 تحریک کننده، سرکوب سیستم ایمنی را واسطه می‌کند (۳۵). شبکه‌های سیگنال دهی داخل تومور توسط عواملی خارجی متعدد قابل تغییر و تعدیل شده هستند که می‌تواند تحت تأثیر ورزش قرار گیرد، مانند افزایش در جریان خون، تنش برشی، تنظیم pH، تولید گرما و فعال سازی سمپاتیک و اثرات غدد درون ریز (به عنوان مثال، هورمون‌های استرس، مایوکاین‌ها و آگوزوم‌های گردش خون) (۳۶). فراخوان و بازتوزیع سلول‌های ایمنی از طریق مکانیسم‌هایی شامل استرس برشی و آدرنرژیک ناشی از جریان خون رخ می‌دهد (۳۷). به نظر می‌رسد ورزش از طریق تأثیر بر این فرآیندها به تنظیم بیان ژن CTLA-4 کمک می‌کند. تنظیم پروتئین مرگ برنامه ریزی شده ۱ (PD-1) نیز یکی از عوامل ایمنی است که در سرطان بسیار مورد توجه است. بیان بالای PD-L1 با بهبود بقای کلی در بیماران ملانوما همراه بوده است (۳۸). در توضیح تغییرات PD-1 در پاسخ به تمرین، بیان شده است که عوامل تحریک شده توسط تمرین مانند اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) می‌تواند بیان PD-L1 در سلول‌های تومور را القا کند (۱۵). اینترفرون گاما ترشح شده به نوبه خود هر دو سلول‌های تومور و نفوذ سلول‌های ایمنی برای القای بیان را تحریک می‌کند (۳۹). بای و همکاران نشان دادند که دودین چرخ اختیاری باعث افزایش بیان مولکول‌های بازرسی ایمنی (PD-1) در موش‌های حامل تومور B16 شد و رشد تومور را ۷۲٪ کاهش می‌دهد (۱۵).

همچنین نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که مصرف هیدرو الکلی گزنه منجر به کاهش معنی دار IGFBP2 در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما شد. اگرچه مصرف هیدرو الکلی گزنه بر میزان بیان ژن APG2، CTLA4 و PD-1 در موش‌های C57 مبتلا به سرطان ملانوما تأثیر معنی داری نداشت. گزنه مواد مغذی و اجزای زیست فعال را برای حیوانات فراهم می‌کند که از فعالیت ضد میکروبی، تقویت سیستم ایمنی و کاهش استرس حمایت می‌کند (۴۰). اثرات عصاره گیاه گزنه در زنده ماندن سلول به روشی وابسته به دوز و زمان است. در همین زمینه نشان داده شده است که عصاره متانولی گیاه گزنه با کاهش رشد سلول‌های سرطان پروستات انسانی وابسته به دوز و زمان است به



این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی است که با تأیید کمیته اخلاق با شماره IR.IAU.AMOL.REC.1402.030 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله املی اجرا گردید.

### حامی مالی

پژوهش حاضر بدون بهره گیری از منابع مالی هر سازمان و نهادی به انجام رسیده است.

### سهم نویسندگان

همه نویسندگان در مشارکت برای تکمیل این مقاله سهم یکسانی دارند.

### تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع در اجرای این پژوهش وجود نداشته است.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

کم نمونه‌ها در تحقیق حاضر نام برد لذا مطالعه‌ای مشابه با اندازه گیری این شاخص‌های در تعداد نمونه‌های بالا پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به ارتباط رشد تومور با واسطه‌های التهابی، پیشنهاد می‌شود این واسطه‌های التهابی در نمونه‌های با سرطان ملانوما نیز بررسی شود.

### نتیجه گیری

به طور خلاصه، یافته‌های این مطالعه نشان داد که تمرینات تناوبی به همراه مصرف هیدرو الکلی گزنه نسبت به تمرینات تناوبی و مصرف هیدرو الکلی گزنه به تنهایی مزایای بیشتری در جهت تنظیم بیان ژن برخی عوامل رشد و ایمنی در سرطان ملانوما به همراه دارد. بنابراین احتمالاً تمرینات تناوبی به همراه مصرف هیدرو الکلی گزنه جهت تنظیم بیان ژن عوامل رشد و ایمنی در سرطان ملانوما در نمونه‌های حیوانی مفید باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که این نوع مداخله به منظور بهره بردن از مزایای احتمالی آن در سرطان ملانوما مورد توجه قرار گیرد.

### ملاحظات اخلاقی

## References

- Huang P, Chang S, Jiang X, Su J, Dong C, Liu X. RNA interference targeting CD147 inhibits the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of thyroid carcinoma cells by down-regulating glycolysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):309-318.
- Kim T, Yoon S, Shin DE, Lee SC, Oh J, Lee SY, et al. Incidence and Survival Rates of Cutaneous Melanoma in South Korea Using Nationwide Health Insurance Claims Data. *Cancer Res Treat*. 2022;54(3):937-949. doi: 10.4143/crt.2021.871 pmid: 34607396
- Ilham S, Willis C, Kim K, Chung KC, Wood BM, Tan MS, et al. Cancer incidence in immunocompromised patients: a single-center cohort study. *BMC Cancer*. 2023;23(1):33. doi: 10.1186/s12885-022-10497-4 pmid: 36624408
- Han SH, Yoo SG, Do Han K, La Y, Kwon DE, Lee KH. The Incidence and Effect of Cytomegalovirus Disease on Mortality in Transplant Recipients and General Population: Real-world Nationwide Cohort Data. *Int J Med Sci*. 2021;18(14):3333-3341. doi: 10.7150/ijms.62621 pmid: 34400903
- Zhang B, Hong CQ, Luo YH, Wei LF, Luo Y, Peng YH, et al. Prognostic value of IGFBP2 in various cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2022;11(16):3035-3047. doi: 10.1002/cam4.4680 pmid: 35546443
- Wei LF, Weng XF, Huang XC, Peng YH, Guo HP, Xu YW. IGFBP2 in cancer: Pathological role and clinical significance (Review). *Oncol Rep*. 2021;45(2):427-438. doi: 10.3892/or.2020.7892 pmid: 33416173
- Pickard A, McCance DJ. IGF-Binding Protein 2 - Oncogene or Tumor Suppressor? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:25. doi: 10.3389/fendo.2015.00025 pmid: 25774149
- Jayaraj GG, Hipp MS, Hartl FU. Functional Modules of the Proteostasis Network. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2020;12(1). doi: 10.1101/cshperspect.a033951 pmid: 30833457
- Kimura A, Ogata K, Altan B, Yokobori T, Ide M, Mochiki E, et al. Nuclear heat shock protein 110 expression is associated with poor prognosis and chemotherapy resistance in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(14):18415-18423. doi: 10.18632/oncotarget.7821 pmid: 26943774
- Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008;224:166-182. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x pmid: 18759926
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331 pmid: 18173375
- Friedenreich CM, Stone CR, Cheung WY, Hayes SC. Physical Activity and Mortality in Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2020;4(1):pkz080. doi: 10.1093/jncics/pkz080 pmid: 32337494
- Yang L, Morielli AR, Heer E, Kirkham AA, Cheung WY, Usmani N, et al. Effects of Exercise on Cancer Treatment Efficacy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. *Cancer Res*. 2021;81(19):4889-4895. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1258 pmid: 34215623
- Crosby BJ, Lopez P, Galvao DA, Newton RU, Taaffe DR, Meniawy TM, et al. Associations of Physical Activity and Exercise with Health-related Outcomes in Patients with Melanoma During and After Treatment: A Systematic Review. *Integr Cancer Ther*. 2021;20:15347354211040757. doi: 10.1177/15347354211040757 pmid: 34412527
- Bay ML, Unterrainer N, Stagaard R, Pedersen KS, Schauer T, Staffeldt MM, et al. Voluntary wheel running can lead to modulation of immune checkpoint molecule expression. *Acta Oncol*. 2020;59(12):1447-1454. doi: 10.1080/0284186X.2020.1817550 pmid: 32935602
- Jafari A, Arazi H, Ghadian A, Hesrak K. The Impact of Combined (aerobic-resistance) Training on Serum Levels of IGF-I and IGFBP-3 in Men with Prostate Cancer. *J Adv Med Biomed Res*. 2019;27(122):35-41. doi: 10.30699/jams.27.122.35
- Esposito S, Bianco A, Russo R, Di Maro A, Isernia C, Pedone PV. Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. *Molecules*. 2019;24(15). doi: 10.3390/molecules24152753 pmid: 31362429
- Catoni CH, Schaefer HM, Peters A. Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. *Funct Ecol*. 2008;22:644-654. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01400.x
- Avci G, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E, Kucukkurt I. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):418-423. doi: 10.1016/j.jep.2006.03.032 pmid: 16713156
- D'Abrosca B, Ciaramella V, Graziani V, Papaccio F, Della Corte CM, Potenza N, et al. *Urtica dioica* L. inhibits proliferation and enhances cisplatin cytotoxicity in NSCLC cells via Endoplasmic Reticulum-stress mediated apoptosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):4986. doi: 10.1038/s41598-019-41372-1 pmid: 30899059
- Kocasli S, Demircan Z. Herbal Product Use by the Cancer Patients in Both the Pre and Post Surgery Periods and during Chemotherapy. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017;14(2):325-333. doi: 10.21010/ajtcam.v14i2.34 pmid: 28573249

22. 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**(1):21. doi: 10.1186/1756-9966-30-21 pmid: 21338489
23. Hodroj MH, Al Bast NAH, Taleb RI, Borjac J, Rizk S. Nettle Tea Inhibits Growth of Acute Myeloid Leukemia Cells In Vitro by Promoting Apoptosis. *Nutrients.* 2020;**12**(9). doi: 10.3390/nu12092629 pmid: 32872275
24. Zolghadri V, Barari A, Abbasi dalooi A, Abed natanzi H. The effect of consumption nettle extract and aerobic training on MMP2 and FGF2 gene expression in mice with melanoma. *IJCA.* 2021;**2**(3):11-20.
25. Wennerberg E, Lhuillier C, Rybstein MD, Dannenberg K, Rudqvist NP, Koelwyn GJ, et al. Exercise reduces immune suppression and breast cancer progression in a preclinical model. *Oncotarget.* 2020;**11**(4):452-461. doi: 10.18632/oncotarget.27464 pmid: 32064049
26. Ogata T, Oishi Y, Higashida K, Higuchi M, Muraoka I. Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;**296**(5):R1557-1563. doi: 10.1152/ajpregu.90911.2008 pmid: 19244585
27. Lang BJ, Guerrero-Gimenez ME, Prince TL, Ackerman A, Bonorino C, Calderwood SK. Heat Shock Proteins Are Essential Components in Transformation and Tumor Progression: Cancer Cell Intrinsic Pathways and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2019;**20**(18). doi: 10.3390/ijms20184507 pmid: 31514477
28. Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, Lauenborg B, Nookaew I, Hansen RH, et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. *Cell Metab.* 2016;**23**(3):554-562. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.011 pmid: 26895752
29. Tehrani zadeh TFM, Darzabi T, Hejazi K, Nasery H. Effects of Aerobic Training on HSP70, Liver Enzymes and Insulin Resistance index in Elderly Women with Non-Alcoholic Fatty Liver in Bojnourd, Iran. *Nurs Vulnerable J.* 2018;**4**(13):1-18.
30. Abdollahzadeh Soreshjani S, Ashrafzadeh M. Effects of exercise on testosterone level, heat shock protein, and fertility potential. *Rev Clinic Med.* 2018;**5**(4):141-145.
31. Salehian O, Soori R, Mohammadhassan Z, Ravasi AA. The Effect of Interval Training on Tumor Volume in Mice with Breast Cancer. *Knowledge Health.* 2014;**8**(4):144-149.
32. Ivy JL, Zderic TW, Fogt DL. Prevention and treatment on non-insulindependent diabetes mellitus. *Exerc Sport Sci Rev.* 1999;**27**(40):1-35. doi: 10.1249/00003677-199900270-00003
33. Meneses-Echávez JF, Ramírez-Vélez R, Gonzalez-Jimenez E, Sanchez-Perez MJ, Molina-Montes E. Physical activity and Insulin-like growth factors in breast cancer survivors: A metaanalysis. *Eur J Surg Oncol.* 2014;**40**(11):S65. doi: 10.1016/j.ejso.2014.08.141
34. Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Arciero PJ, Dohi K, Kellogg MD, et al. Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2001;**90**(4):1319-1326. doi: 10.1152/jappl.2001.90.4.1319 pmid: 11247930
35. Chan DV, Gibson HM, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Mi QS, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun.* 2014;**15**(1):25-32. doi: 10.1038/gene.2013.57 pmid: 24173147
36. Dos Santos CMM, Diniz VLS, Bachi ALL, Dos Santos de Oliveira LC, Ghazal T, Passos MEP, et al. Moderate physical exercise improves lymphocyte function in melanoma-bearing mice on a high-fat diet. *Nutr Metab (Lond).* 2019;**16**:63. doi: 10.1186/s12986-019-0394-z pmid: 31528182
37. Idorn M, Hojman P. Exercise-Dependent Regulation of NK Cells in Cancer Protection. *Trends Mol Med.* 2016;**22**(7):565-577. doi: 10.1016/j.molmed.2016.05.007 pmid: 27262760
38. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;**4**(127):127ra137. doi: 10.1126/scitranslmed.3003689 pmid: 22461641
39. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018;**48**(3):434-452. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014 pmid: 29562194
40. Wang RJ, Li DF, Bourne S, Wang RJ, Li DF. Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problems in the year 2000? Presented at the Alltech's 14th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry, Nicholasville, KY, USA, 1998. 273-292 p.
41. Konrad L, Muller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumuller G, Lichius JJ. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* 2000;**66**(1):44-47. doi: 10.1055/s-2000-11117 pmid: 10705733
42. Ding Z, Dai Y, Hao H, Pan R, Yao X, Wang Z. Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying mechanisms. *Pharm Biol.* 2008;**46**:854-860. doi: 10.1080/13880200802367155
43. Liu Y, Steinacker JM. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: Pathological significance. *Front Biosci.* 2001;**6**:12-25. doi: 10.2741/A590