

بررسی تأثیر استرس بی حرکتی و سرما بر رشد سلول‌های سرطانی فیبروسارکومای WEHI-164 در موش Balb/c

دکتر هدایت الله شیرزاد^۱، محبوبه یوسفی^۲، ثریا قاسمی^۱، مریم شیرزاد^۳، سیف الله برجیان بروجنی^۴،
دکتر محمود رفیعیان^{۳*}

^۱ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
^۲ کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه پیام نور اصفهان
^۳ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
^۴ گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: استرس به تدریج سیستم ایمنی را تضعیف و بدن را مستعد ابتلا به انواع بیماری‌ها می‌کند و ممکن است باعث رشد سلول‌های سرطانی شود. در این مطالعه، تأثیر استرس‌های سرما و بی حرکتی بر رشد سلول‌های بدخیم در موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه مداخله‌ای، ۳ گروه ده تایی موش Balb/c به منظور بررسی تأثیر استرس‌های سرما و بی حرکتی بر رشد سرطان، سلول‌های توموری فیبروسارکوما دریافت نمودند. گروه یک هر روز به مدت ۲ ساعت با استرس سرما و گروه دو با استرس بی حرکتی مواجه شدند. گروه سه به عنوان گروه شاهد با استرس مواجه نشدند. اندازه توده سرطانی سه گروه هر دو روز یک بار به وسیله کولیس ورنیه اندازه‌گیری و پس از محاسبه مساحت تومور بر حسب میلی‌متر مربع در گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. **یافته‌ها:** میانگین اندازه تومور در گروه‌های تحت استرس بیشتر از موش‌های گروه شاهد بود ($p < 0.05$)، به طوری که ۱۴ روز پس از تزریق سلول‌های سرطانی اندازه تومور در گروه تحت استرس سرما 31.99 ± 2.61 ، در گروه تحت استرس بی حرکتی 37.13 ± 3.51 و در گروه شاهد 18.15 ± 3.09 میلی‌متر مربع بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استرس سرما و بی حرکتی ممکن است رشد سرطان را تشدید کند، لذا باید به بیماران توصیه نمود از استرس اجتناب نمایند.

واژگان کلیدی: استرس، سرطان، سیستم ایمنی، سرما، بی حرکتی.

مقدمه

بروز استعداد ابتلا به انواع سرطان‌ها می‌گردد. استرس به عنوان یک عامل سرکوب کننده سیستم ایمنی مطرح شده است. لذا احتمال رشد سلول‌های سرطانی متعاقب بروز استرس وجود دارد. تحقیقات نشان داده است که افرادی که دچار برخی از انواع استرس هستند، خطر ابتلا به سرطان پستان در آنها بیشتر است (۱).

تحقیقات نشان داده است که سیستم ایمنی در کنترل و بهبود سرطان موثر است، بالعکس تضعیف سیستم ایمنی منجر به

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی،
دکتر محمود رفیعیان (e-mail: rafieian@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲

را در تومور افزایش می‌دهد و ماکروفاژها ترشح مواد رگساز را تحریک می‌کنند (۶). پس می‌توان نتیجه گرفت که استرس بایستی سبب افزایش رشد تومور گردد. لذا در این مطالعه، تأثیر استرس سرما و بی‌حرکتی بر رشد سلول‌های فیبروسارکوما WEHI-164 در موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه مداخله‌ای، ۳۰ موش Balb/c از جنس ماده با ۸ هفته سن از انستیتوی رازی ایران خریداری شده و به منظور بررسی تأثیر استرس سرما و بی‌حرکتی بر رشد تومور در سه گروه ۱۰ تایی قرار گرفتند. حیوانات در حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و در شرایط یکسان طبیعی آب و غذا (پلیت استاندارد تهیه شده از شرکت رازی) قرار داده شدند. تمامی شرایط دیگر نگهداری موش‌ها یکسان و در طول بررسی بدون تغییر باقی ماند. سلول‌های فیبروسارکوما WEHI-164 (تومور ایجاد شده توسط تری متیل کلانترون در موش Balb/C) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد در محیط کشت سلولی Dulbecco's modification of eagles medium (DMEM) تکثیر گردیدند. در موش‌های گروه‌های اول اثر استرس سرما و در موش‌های گروه دوم اثر بی‌حرکتی بر رشد سلول‌های سرطانی (گروه‌های مورد) بررسی شد. گروه سوم دارای تومور و بدون استرس بودند و به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. به هر یک از موش‌ها تعداد 5×10^5 سلول WEHI-164 در زیر پوست ناحیه سینه تزریق گردید (۱۱). موش‌های گروه اول (مورد) هر روز به مدت ۲ ساعت تحت استرس سرما (۱۲) از طریق نگهداری در یخچال در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد (ضمن تامین هوای کافی برای حیوان) و موش‌های گروه دوم (مورد) به همان مدت تحت استرس بی-حرکتی از طریق محدود کردن حیوان در لوله‌های فالکونی ۵۰ میلی‌لیتری با ایجاد سوراخ به منظور امکان دسترسی حیوان به هوای آزاد قرار گرفتند (۱۳). تومورهای موش‌های تمام گروه‌ها هر دو روز یک بار توسط کولیس ورنیه اندازه‌گیری شدند و مساحت تومورها توسط فرمول زیر (۱۱) محاسبه و اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA دو طرفه با یکدیگر مقایسه شدند.

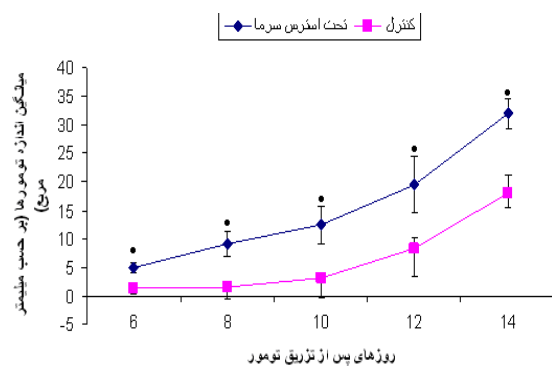
$$\text{میانگین مساحت تومور (mm}^2\text{)} = \pi / 4 \times (\text{قطر}^2 + \text{قطر} \times 2)$$

(قطر ۱ از بالا به پایین تومور و قطر ۲ از چپ به راست تومور در نظر گرفته شدند).

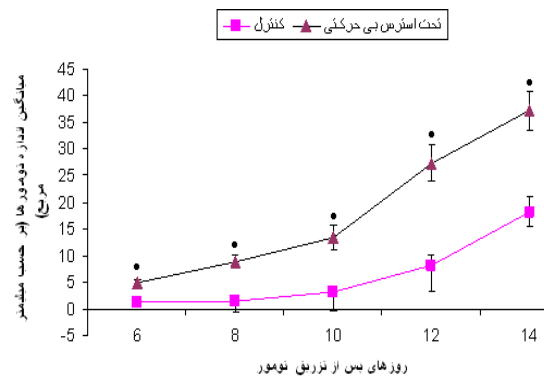
اعصاب به صورت مستقیم یا غیرمستقیم عمل سلول‌های سیستم دفاعی بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و مغز از طریق مسیرهایی از جمله کنترل جریان خون، حرارت، اکسیژن رسانی و یا تولید هورمون‌های هایپرتروفیک بر سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارد. استرس نیز از طریق تداخل سیستم عصبی مرکزی و یا از طریق راه‌های عصب-هورمون بر سیستم دفاعی اثر می‌گذارد. به عنوان مثال، ترشح کاته‌کولامین‌ها، کورتیزول و پرولاکتین از هیپوفیز که با تغییراتی در سیستم ایمنی همراه هستند، در مواجهه با استرس دچار تغییر می‌شوند. سیستم ایمنی با دو مکانیسم هومورال و سلولی، بدن را در مقابل بیماری‌های عفونی و تومورها محافظت می‌کنند. هر دو مکانیسم به وسیله استرسورها تحت تأثیر قرار می‌گیرند و افزایش کورتیزول باعث مهار سیستم ایمنی می‌شود (۴-۲). در بسیاری از بدخیمی‌های حیوانات و در بعضی از سرطان‌های انسانی، لنفوسیت‌های اختصاصی که قادر به نابود کردن سلول‌های تومورال هستند، دیده شده است (۵،۶). در موش‌های nude که به علت فقدان سلول‌های T عملکردی دچار نقص ایمنی هستند، شیوع بالایی از لوسمی و لنفوم وجود دارد. از طرفی، مشخص شده است که شدت علائم افسردگی با کاهش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و کاهش سلول‌های T سایتوتوکسیک همراه است. سلول‌های NK انواع متعددی از سلول‌های توموری را می‌کشد و با استفاده از پرفورین سوراخی در غشای سلول توموری ایجاد و با ترشح آنزیم‌هایی آپوپتوزیس را تحریک می‌کنند (۵،۷). درصد سلول‌های CTLs، تعداد و فعالیت سلول‌های NK و همچنین تعداد کل لنفوسیت‌ها و لکوسیت‌ها در بیماران مبتلا به افسردگی مازور شدیداً کاهش می‌یابد (۶،۸). احساس دل‌تنگی و تنهایی نیز موجب کاهش فعالیت سلول‌های NK می‌گردد (۹). اختلالات بدخیم‌هنگامی روی می‌دهند که نارسایی سیستم ایمنی برای انهدام سلول‌های سرطانی قبل از استقرار آنها در بدن به وجود آمده باشد، به طوری که بیماران دارای نقص سیستم ایمنی به مراتب بیش از سایرین به بدخیمی‌های مختلف دچار می‌شوند (۶). مطالعات بر روی افراد تحت استرس نشان داده‌اند که زن و مردهایی که همسرانشان به شدت بیمار بوده‌اند، پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها کاهش یافته است. به علاوه بررسی روی گروهی از مردان که همسرانشان در اثر سرطان سینه در حال مرگ بودند نشان داد که قبل از فوت، بلافاصله بعد از فوت و یک دوره ۴ تا ۱۴ ماه پس از فوت همسرانشان، پاسخ تکثیری سلول T سرکوب یافته و به واقع از دست دادن همسر ارتباط دارد (۱۰). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ نیز نشان داده شد که استرس، تعداد ماکروفاژها

یافته‌ها

نتایج بررسی نشان داد که استرس سرما به طور معنی داری رشد تومور را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده است ($p < 0.05$). این اختلاف از روز ششم معنی دار بود، به طوری که ۱۴ روز پس از تزریق سلول سرطانی، اندازه تومور در گروه تحت استرس سرما $18/15 \pm 3/09$ میلی متر مربع بود (نمودار ۱). نتایج همچنین نشان داد که استرس بی حرکتی به طور معنی داری رشد تومور را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است ($p < 0.05$). این اختلاف نیز از روز ششم معنی دار بود و ۱۴ روز پس از تزریق سلول سرطانی، اندازه تومور در گروه تحت استرس بی حرکتی $37/13 \pm 3/51$ میلی متر مربع و در گروه شاهد $18/15 \pm 3/09$ میلی متر مربع بود (نمودار ۲).



نمودار ۱- اثر استرس سرما بر رشد سلول‌های توموری WEHI-164. استرس سرما به طور معنی داری رشد تومور را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده است ($p < 0.05$).



نمودار ۲- اثر استرس بی حرکتی بر رشد سلول‌های توموری WEHI-164. استرس بی حرکتی به طور معنی داری رشد تومور را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده است ($p < 0.05$).

نژاد Balb/c مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میانگین رشد توده سرطانی در موش‌های گروه‌های تحت تأثیر استرس‌های سرما و بی حرکتی به طور معنی داری بیشتر از موش‌های گروه شاهد بود. مطالعات نشان داده‌اند که بیان mRNA فاکتور آزادکننده کورتیکوتروپین در هسته‌های پارانتیکولار موش، بعد از گرفتن قرار گرفتن موش‌ها در استرس سرمای حاد (شش ساعت) و استرس سرمای مزمن (سی ساعت) به طور معنی داری افزایش می‌یابد (۱۴). همچنین مشخص شده است که استرس‌های مختلف در جانور تحت استرس، توانایی بالا بردن هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین را دارند و این هورمون نیز باعث بالا بردن آزادسازی آدرنوکورتیکوتروپین هورمون می‌شود. همچنین بیان mRNA وازوپرسین و ساخت آن در زیر بخش هسته‌های پارانتیکولار هنگام استرس بی حرکتی بالا می‌رود (۱۵). در مطالعه حاضر، اثر استرس‌های سرما و بی حرکتی بر رشد سلول‌های بدخیم (فیرو سارکوما WEHI-164) بررسی شد. در واقع این استرس‌ها احتمالاً باعث افزایش عوامل دخیل در رشد سرطان مثل افزایش هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین، وازوپرسین، آدرنوکورتیکوتروپین هورمون شده‌اند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که موش‌ها و رت‌هایی که در معرض استرس قرار گرفته‌اند، احتمال بیشتری برای پیشرفت عفونت‌های ویروسی و تومورها را نسبت به جانورانی که غیراسترسی بودند داشته‌اند (۱۶،۷). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در موش‌های مبتلا به سرطان ریه، با ایجاد استرس محدودیت حرکتی، اثرات درمانی داروهای ضد توموری سیتوتوکسیک کاهش می‌یابد (۱۷،۱۸). اندازه‌گیری سطح هورمون‌های مترشح در استرس مثل هورمون‌های آزادکننده کورتیکوتروپین و وازوپرسین می‌توانست بر غنای نتیجه تحقیق بیافزاید، ولی متأسفانه بنا به دلایلی از جمله کمبود بودجه میسر نگردید که پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌های آینده مورد توجه قرار گیرد. با توجه به مطالب فوق و نظر به اینکه استرس می‌تواند باعث تضعیف سیستم ایمنی شود و تضعیف سیستم ایمنی می‌تواند منجر به تشدید رشد سلول‌های سرطانی گردد، لذا احتمالاً رشد سلول‌های سرطانی در گروه‌های تحت تأثیر استرس بی حرکتی و یا سرما ناشی از تأثیر منفی استرس روی سیستم ایمنی حیوان بوده است.

قدردانی و تشکر

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد و همکاری مراکز

بحث

در این مطالعه تأثیر استرس‌های سرما و بی حرکتی بر رشد سلول‌های بدخیم فیروسارکوما WEHI - 164 در موش‌های

سرکار خانم فاطمه دریس و آقای مهرداد شهبانی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تحقیقات گیاهان دارویی و سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. محققین مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه پرسنل این مراکز اعلام می‌دارند. نویسندگان همچنین از

REFERENCES

1. Lutgendorf SK, Soad AK, Antoni MH. Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4094-99.
2. Pruetz SB. Stress and immune system. *Pathophysiology* 2003; 9: 133-135.
3. Glaser R, Janice K, Glaser K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Immunol* 2005; 5: 243-351.
4. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003; 2: 444-48.
5. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 617-25.
6. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *Leukoc Biol* 2001; 70: 478-90.
7. Raulat DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nature Rev Immunol* 2009; 9: 568-80.
8. Schleifer I. Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *JAMA* 1983; 241: 250-377.
9. Segerstrom S, Miller G. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 2004; 130: 601-30.
10. Steplewski Z, Vogel W, Ehya H, Poropatich G, Smith J. Effects of restraint stress on inoculated tumor growth and immune response in rats. *Cancer Res* 1985; 45: 5128-33.
11. Shirzad H, Burton R C, Smart YC, Raffeian-kopaei M, Shirzad M. Natural cytotoxicity of NC-2+ cells against the growth and metastasis of WEHI-164 fibrosarcoma. *Scand J Immunol* 2011; 73: 85-90.
12. Cichon M, Chadzin Ska M, Ksiaz EA, Konarzewski M. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc R Soc Lond B* 2002; 269: 1493-97.
13. Karel P, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Rev* 2001; 22: 502-54.
14. Zoeller RT, Kabeer N, Albers HE. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 1990; 127: 2955-62.
15. Bartanusz V, Aubry JM, Jezova D, Baffi J, Kiss JZ. Up-regulation of vasopressin mRNA in paraventricular hypophysiotrophic neurons after acute immobilization stress. *Neuroendocrinology* 1993; 58: 625-29.
16. Miller AH. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatr Clin North* 1998; 21: 443-63.
17. Zorzet S, Perissin L, Rapozzi V, Giraldi T. Restraint stress reduces the antitumor efficacy of cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Brain Behav Immun* 1998; 12: 23-33.
18. Garssen B. Psychological factors and cancer development: evidence after 30 years of research. *Clin Psychol Rev* 2004; 24: 315-38.