University of Birjand

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport Research Paper

Summer 2021, 9(18), 36-46

Received: Jul 28, 2018 Accepted: Mar 3, 2019

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport

The effect of 8 weeks of aerobic training on Apaf-1 and Caspase 3 gene expression in mice with breast cancer

Mohammad Mahdi Rafiei[1], Abbas Ali Gaeini[2], Mohammad Reza Kordi[3]*, Reza Nuri[4]

1. PhD Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Tehran, Kish International Campus, Kish, Iran.
2. Full Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Tehran, Kish International Campus, Kish, Iran.

Abstract

Background and Aim: Considering the key role of apoptosis and other factors in inflammation, growth and metastasis of tumor cells and also regulating effect of physical activity, the aim of this study was to investigate the effects of aerobic exercise on the expression of these factors in breast cancer and also on breast cancer tumors weight reduction in mice. **Materials and Methods:** Twenty female 3-weeks-old C ball mice with a mean weight of 17.10±0.10 g were randomly divided into experimental (aerobic exercise) and control groups. By subcutaneous injection of MC4-L2 cancer cells, both groups were diagnosed with cancer, and then the experimental group was trained for 8 weeks (5 sessions per week and each session lasted 14-20 minutes running at 55-70 percent of VO_{2max} on the treadmill with zero gradient. The exercises began at a speed of 14 m/min in the first week and finally reached to 20 m/min in the last two weeks. 48 hours after the last training session, the mice were sacrificed and their tumors tissue samples were removed and stored at -70 ° C and the level of gene expression of Apaf-1 and caspase 3 of tumor tissue were measured by Real Time-PCR. Data were analyzed by SPSS21 using independent sample t- test at the significant level of $p \leq 0.05$. **Results:** The results of independent sample t- test showed that tumor volume in the training group was significantly lower than the control group (p=0.001), moreover the levels of Apaf-1 (p=0.001) and caspase 3 (p=0.001) was also significantly higher than the control group. **Conclusion:** Due to the increased gene expression of Apaf-1 and caspase 3 following regular aerobic exercise with intensity of 55 to 70% VO_{2max}, it can be suggested that medium-intensity aerobic exercise can controls the growth of breast tumors in female Balb C mice.

Key words: Aerobic training, Apoptosis, Apaf-1, Caspase 3.

Cite this article:

Rafiei, M. M., Gaeini, A. A., Kordi, M. R., & Nuri, R. (2021). The effect of 8 weeks of aerobic training on Apaf-1 and Caspase 3 gene expression in mice with breast cancer. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 9***(18), 36-46.**

***Corrsponding Author, Address: Faculty of physical Education & Sport Sciences, University of Tehran, Tehran,Iran;**

E-mail: m.r.kordi@yahoo.com https://doi.org/ 10.22077/JPSBS.2019.1662.1424

نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش مقاله پژوهشی
تابستان ۱۴۰۰، دوره ۹، شماره ۱۸، ص ۴۶-۳۶
تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۲
نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش
دانشگاه بیرجند

تاثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن Apaf-1 و کاسپاز ۳ در موش‌های مبتلا به سرطان پستان

محمد مهدی رفیعی [۱]، عباسعلی گایینی [۲]، محمدرضا کردی [۳*]، رضا نوری [۴]

۱. دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، پردیس بین الملل کیش، کیش، ایران.
۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، پردیس بین الملل کیش دانشگاه تهران، کیش، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش کلیدی آپوپتوزیسیس در التهاب، رشد و متاستاز سلول‌های توموری و نقش تنظیم‌کنندگی فعالیت بدنی، هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر تمرین هوازی بر میزان بیان ژن این عوامل در سرطان پستان و اثر بر کاهش وزن تومور پستان در موش‌ها است. **روش تحقیق:** تعداد ۲۰ سر موش بالب C ماده ۳ تا ۵ هفته ای، با میانگین وزنی ۰/۱۰±۱۷/۱۰ گرم به صورت تصادفی به دو گروه تجربی (تمرین هوازی) و کنترل تقسیم شدند. با تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی L2-MC4، موش‌های هر دو گروه به سرطان مبتلا شدند و پس از آن، گروه تجربی به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته پروتکل تمرین هوازی مشتمل بر دویدن روی نوارگردان با شیب صفر درجه و شدت ۵۵ تا ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی را در طول زمان ۱۴ تا ۲۰ دقیقه در هر جلسه اجرا کردند. تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۴ متر بر دقیقه شروع شد و نهایتا در ۲ هفته آخر به ۲۰ متر بر دقیقه رسید. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش ها قربانی و نمونه‌های بافتی آن ها برداشته شد و در دمای ۷۰- درجه ذخیره شدند و میزان بیان ژن Apaf-1 و کاسپاز ۳ بافت تومور به روش Real time–PCR اندازه-گیری شد. داده ها با نرم افزار SPSS21 و آزمون t مستقل در سطح $p\geq ۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند. **یافته‌ها:** نتایج‌آزمون t مستقل نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، حجم تومور (p=۰/۰۰۱) در گروه تمرین هوازی به طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد؛ در حالی که بیان ژن Apaf-1 (p=۰/۰۰۱) و کاسپاز ۳ (p=۰/۰۰۱) پس از اجرای تمرین هوازی، به طورمعنی‌داری افزایش یافت. **نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش بیان ژن Apaf-1 و کاسپاز ۳ به دنبال تمرینات هوازی منظم با شدت ۵۵ تا ۷۰ درصد VO_{2max}، می‌توان گفت اجرای تمرین هوازی با شدت متوسط روند رشد تومور پستاندار در موش‌های بالب C ماده را کنترل می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تمرین‌هوازی، آپوپتوزیسیس، Apaf-1، کاسپاز ۳.

*نویسنده مسئول، آدرس: تهران، خیابان کارگر شمالی، دانشگاه تهران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی؛
پست الکترونیک: m.r.kordi@yahoo.com
https://doi.org/ 10.22077/JPSBS.2019.1662.1424

مقدمه

سرطان‌پستان یکی از بیماری‌های رایج زنان در سراسر جهان می‌باشد. احتمال بروز سرطان پستان، در صورت وجود سابقه فامیلی به‌خصوص اقوام نزدیک مانند مادر، خواهر یا دختر؛ در سن پیش از یائسگی زیاد می‌باشد (جردن[1] ، ۲۰۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که مسیرهای مولکولی مختلفی از جمله مسیرهای التهابی و آپوپتوزیس[2] در ایجاد سرطان دخالت دارند (ونکاتادری[3] و دیگران، ۲۰۱۶). آپوپتوزیس یک نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده است که برای حفظ تعادل فیزیولوژیکی بین مرگ و رشد سلول ضروری بوده و می‌تواند توسط شاخص‌هایی مثل فعالیت کاسپازها، تراکم کروماتین، رهایی عوامل آپوپتوژنیک[5] و تورم غشاء؛ شناسایی شود (گرین[6]، ۲۰۱۷). تدابیر گوناگونی در سرطان شناسی بالینی مثل شیمی درمانی، اشعه گاما و ایمونوتراپی استفاده شده است. این تدابیر با فعالیت مسیرهای هدایت سیگنال آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی ارتباط دارند (جانسون[7] و دیگران، ۲۰۱۳). آپوپتوزیس می‌تواند از محرک‌های برون سلولی و درون سلولی آغاز شده و به فعالیت هماهنگ خانواده سیستئین پروتئاز[8] که کاسپاز نام دارد، منجر می‌شود. در حدود ۱۴ کاسپاز در سیستم‌های پستانداران فعالیت دارند (جانستون و دیگران، ۲۰۰۲). پس از فعال شدن کاسپازهای ۳، ۶ و ۷، تقسیم ویژه بسیاری از پروتئین‌های کلیدی از قبیل پلی پلیمراز، مهار کننده کاسپاز فعال کننده[9]، فودرین آلفا و بتا[10]، و گیرنده عامل رشد اپیدرمال[11] را کاتالیز می‌کنند (کریس و یوان[12]، ۱۹۹۸). تقسیم این پروتئین‌ها به تورم غشاء، تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA منجر می‌شود؛ تغییراتی که آن ها را نشانه‌های آپوپتوزیس می‌دانند (کونگ[13]و دیگران، ۲۰۱۶). فلاوپروتئین میتوکندریایی، عامل القاکننده آپوپتوزیس[14] (AIF) نیز می‌تواند موجب آپوپتوزیس به روش مستقل از کاسپازها در پاسخ به یک محرک آپوپتوزیس معین شود (کاندی[15]و دیگران، ۲۰۰۲). با وجود این، کاسپاز ۳ به عنوان عامل آپوپتوزیس مطرح شده است و نقش محوری در گسترش دستگاه عصبی مرکزی دارد. هر گونه تغییر ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی در سلول‌های تحت آپوپتوزیس می‌تواند به توسعه سرطان منجرشود (گلوشاکاوا[16] و دیگران، ۲۰۱۸).

ژن Apaf-1 در واقع یک پروتئین سیتوپلاسمی را کُدگذاری می‌کندکه یکی از درگاه‌های اصلی و مهم شبکه تنظیم مرگ سلولی است. با اتصال سیتوکروم C و دی‌اکسی‌آدنوزین تری فسفات[17]، این پروتئین یک اُلیگومر آپوپتوزیس تشکیل می‌دهد که پروکاسپاز ۹[18] را می‌شکند و آن را به شکل بالغ و فعال شده کاسپاز ۹ تبدیل می‌کند. اعتقاد بر آن است که بیان Apaf-1 در پاسخ تحریکی بافت‌ها به مرگ سلولی آپوپتوزی وابسته به p53، کاهش می‌یابد (هو[19] و دیگران، ۲۰۱۴). با توجه به نقش محوری کاسپازها در فرآیند آپوپتوزیس، می‌توان این‌گونه بیان نمود که بدن ما به چندین ساز و کار جهت مراقبت در برابر رشد سرطان، به‌ویژه از طریق کاسپازها مجهز شده است (گرین، ۲۰۱۷).

طی دهه گذشته، فعالیت ورزشی به عنوان یک روش پیش‌گیرانه و کمک درمانی موثر برای حفظ و بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان پستان معرفی شده است (هایس[20] و دیگران، ۲۰۱۷). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که به دنبال تشخیص سرطان پستان، تمرین هوازی می تواند با کاهش عوارض سرطان و در نهایت، با کاهش مرگ بیماران همراه باشد. چنین اظهار گردیده که فعالیت بدنی بسته به شدت فعالیت، می‌تواند باعث تسریع و یا جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان در جوندگان شود (انوشه و دیگران، ۲۰۱۴). از طرف دیگر، بسیاری از مطالعات کاهش حجم و وزن تومور را بعد از یک دوره فعالیت ورزشی هوازی نشان داده‌اند که از دلایل این کاهش، عدم فعالیت عوامل آنژیوژنیک و کاهش التهاب ناشی از فعالیت ورزشی را می‌توان نام برد (عبدالله و دیگران، ۲۰۱۳؛ گوه[21] و دیگران، ۲۰۱۳). مطالعات مکانیسم‌های متفاوتی را برای چگونگی تاثیر تمرین ورزشی بر آپوپتوزیس در بیماران مبتلا به سرطان ارائه نموده‌اند. در واقع می توان گفت فعالیت ورزشی واسطه‌گرهای درون سلولی ضروری مانند آپوپتوزیس، آنژیوژنزیس[22] و التهاب را فعال می‌کند (خوری[23] و دیگران، ۲۰۱۵).

مطالعات نشان داده‌اند که تمرین ورزشی بعد از تشخیص سرطان پستان یا کولون، به طور معنی‌داری نسبت مرگ مرتبط با سرطان را کاهش می‌دهد (کورنیا[24] و دیگران، ۲۰۰۷؛ سویگرز[25] و دیگران، ۲۰۱۷). پاتل و دیگران

1. Jordan
2. Apoptosis
3. Venkatadri
4. Caspases
5. Apoptogenic
6. Green
7. Johnsson
8. Cysteine protease
9. DNase
10. Fodrin-α & β
11. Epidermal growth factor receptor
12. Cryns & Yuan
13. Kong
14. Apoptotic protease activating factor 1
15. Candé
16. Glushakova
17. Deoxyadenosine triphosphate
18. Procaspase 9
19. Hu
20. Hayes
21. Goh
22. Angiogenesis
23. Khori
24. Courneya
25. Sweegers

(۲۰۰۴) بیان کرده‌اند که محدودیت کالریک، دارای اثرات مفید بر سرطان‌زایی می‌باشد (خوری و دیگران، ۲۰۱۵). هم‌چنین گزارش شده که کاهش کالریک همراه با افزایش هزینه انرژی، سبب کاهش رشد تومور پستان می گردد (کلبرت[1] و دیگران، ۲۰۰۹). بنابراین، افزایش هزینه انرژی می‌تواند وزن بدن را کاهش داده و بر رشد تومور اثر بگذارد. بسیاری از تغییرات ژنتیکی مشاهده شده در سرطان پستان، به علت عدم تعادل در اعضای پرو-آپوپتوزیس و ضد آپوپتوزیس خانواده Bcl-2[2] می‌باشد. بیان بیش از حد Bax[3] نیز مرگ سلولی را توسعه می‌دهد، اما Bcl-2 به عنوان سرکوب کننده آپوپتوزیس عمل می‌کند (شریفی[4] و دیگران، ۲۰۱۵). بنابر این نسبت این دو عامل به همدیگر می تواند یک شاخص مهم در آپوپتوزیس در نظر گرفته شود. گزارش ها حاکی از آن است که فعالیت ورزشی موجب کاهش در نسبت Bax/Bcl-2 به عنوان شاخص کاهش میل سلول آپوپتوزیس هدف، برای درمان سرطان می‌شود (خوری و دیگران، ۲۰۱۵). از این رو می‌توان گفت فعالیت ورزشی می‌تواند با اعمال تغییراتی مانند افزایش اکسیدان‌ها، تغییرات هورمونی و آنژیوژنزی در بیماران مبتلا به سرطان پستان؛ فعال شدن آپوپتوزیس را تحت تاثیر قرار دهد.

بر اساس مطالب گفته شده، مطالعه در مورد تاثیر تمرین هوازی با شدت پایین تا متوسط که برای بیماران سرطانی هم مناسب بوده و درعین حال، با مصرف مناسب انرژی نیز همراه باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به نقش کلیدی آپوپتوزیس و عوامل دیگر در التهاب، رشد و فرآیند متاستاز سلول‌های توموری؛ و تاثیر احتمالی که تمرینات هوازی می توانند بر میزان بیان این عوامل داشته باشند؛ و همچنین با فرض که این گونه تمرینات، پتانسیل تاثیر بر تعدیل وزن تومورهای سرطانی را دارند؛ بررسی تاثیر تمرینات هوازی بر بیان عوامل Apaf-1 و کاسپاز ۳ در نمونه های سرطانی ضروری به نظر می‌رسد. لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی اجرای ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان Apaf-1 و کاسپاز ۳ در موش‌های مبتلا به سرطان پستان به اجرا در آمد.

روش تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که در دو گروه آزمایش و کنترل با توزیع تصادفی به اجرا درآمد. تعداد ۲۰ سرموش بالب C[5] ماده ۳ تا ۵ هفته‌ای، با میانگین وزنی ۱۷/۱ ±۰/۱ گرم از موسسه پاستور خریداری و پس از آشنا سازی با محیط آزمایشگاه، در شرایط کنترل دمایی شده (۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد) تحت چرخه خواب و بیداری ۱۲ ساعته (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و بدون هیچ‌گونه محدودیت، در قفس‌های پلی اتیلن نگهداری شدند. سپس موش‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه تجربی تمرین هوازی و کنترل تقسیم گردیدند. با تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی MC4-L2 ، موش‌های هر دو گروه به سرطان مبتلا شدند و پس از آن، گروه تمرین هوازی برنامه تمرینی را بر طبق جدول ۱ اجرا کرد. موش‌های گروه کنترل به زندگی طبیعی خود ادامه دادند و در پایان برنامه تمرینی تعداد ۱۶ سر موش (هر دو گروه کنترل و تمرین، دو موش افت آزمودنی داشت)، برای سنجش متغیرهای پژوهشی مطابق با اصول اخلاقی کشته شدند. همچنین کد اخلاق پژوهشی از پژوهشگاه تربیت بدنی با شماره Ir.ssri.rec.1395.129 اخذ گردید.

برنامه تمرین هوازی: موش‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات، به مدت ۳ روز برای سازگاری با محیط و کاهش استرس نسبت به محیط جدید، تحت مراقبت قرار گرفتند. موش های گروه تمرینی در دو هفته اول، به مدت ۷ تا ۱۰ روز برای آشناسازی با اجرای برنامه تمرینی ورزشی، به فعالیت واداشته شدند. برای عملیاتی کردن برنامه تمرین، همزمان برنامه به شکل مقدماتی اجرا شد. گروه تمرین، پس از ایجاد سرطان، تمرینات را به مدت ۸ هفته ادامه دادند. تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۴ متر بر دقیقه شروع شد و در نهایت، در دو هفته آخر به سرعت ۲۰ متر بر دقیقه رسید. این سرعت معادل ۵۵ تا ۷۰ درصد VO_{2max} بود. به علاوه، تمرین هوازی هفته‌ای ۵ جلسه و هر جلسه ۱۴ تا ۲۰ دقیقه به صورت بر روی دستگاه نوارگردان به اجرا درآمد. جزئیات برنامه تمرینی در جدول ۱ آورده شده است. به منظور شبیه سازی شرایط تمرینی و استرس ناشی از آن گروه کنترل در بازه زمانی تمرین، موش‌ها ۳ بار در هفته و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه نوارگردان با سرعت ۲

1. Colbert
2. B-cell lymphoma 2
3. BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
4. Sharifi
5. C Rat Balb

متر بر دقیقه قرارگرفتند. از این نوع تمرین هوازی به این دلیل استفاده شد که به راحتی شدت و مدت تمرین تحت کنترل پژوهش‌گر می‌باشد. شدت‌های تمرینی به کار گرفته شده در مطالعه حاضر از تحقیق آلواردو[1] و دیگران (۲۰۱۷) اقتباس گردیده است.

جدول ۱. جزئیات برنامه تمرین هوازی در مراحل آشنا سازی و دوره ۸ هفته ای تمرین

دوره تمرین	سرعت (متر / دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار
مرحله آشناسازی (دو هفته)	۱۰-۱۲	۳۰	۵
دو هفته اول	۱۴	۳۰	۵
دو هفته دوم	۱۶	۳۵	۵
دو هفته سوم	۱۸	۴۰	۵
دو هفته چهارم	۲۰	۴۵	۵

کشت سلول: سلول‌های کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها در فلاسک T75[2] در محیط DMEM/F-12 یا 15 میلی مول بافر HEPEST، گلوتامین[3]، پنیسیلین[4] ۱۰۰ میلی گرم درمول، استراپتومایسین[5] ۱۰۰میلی گرم در مول و FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند. پس از پر شدن ۹۰ درصد سطح فلاکس به وسیله سلول‌ها، مایع رویی برداشته شد و پس از شستشو با PBS، در مرحله بعد با آنزیم تریپسین[6] ۲۵ درصد کف پلیت سلول‌ها جدا شده و پس از خنثی سازی آنزیم با محیط حاوی FBS، همه محتویات فلاکس داخل لوله فالکون ریخته شد و در دور ۱۲۰۰ در دقیقه به‌مدت ۳-۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، مایع رویی برداشته شد و پلاکس لولی در داخل محیط حاوی FBS حل گردید. برای شمارش سلولی از تریپان بلو[7] استفاده شد (شریفی و دیگران، ۲۰۱۵).

ایجاد تومور: ابتدا سلول‌های مورد نظر در محیط آزمایشگاهی کشت داده شدند. بعد از این که تعداد سلول به اندازه مورد نیاز رسید، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس موش ها با ترکیبی از کتامین (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و سپس، یک میلیون سلول به‌صورت زیرجلدی به ناحیه بالای ران سمت راست آنان تزریق گردید. در حدود ۱۰ الی ۱۴ روز تومور در محل تزریق قابل لمس بود. پس از پیدایش تومور، هر هفته طول (L) و عرض (W) تومور اندازه‌گیری شد و حجم تومور (V) با معادله ($V=\pi\div6(L2\times W)$) محاسبه گردید (جونز و دیگران، ۲۰۰۹).

نحوه اندازه گیری بیان ژن Apaf-1 و کاسپاز ۳: پس از قربانی شدن موش ها بافت تومور آن ها جدا گردید و قسمت نکروز شده[8] آن حذف شد. قسمت رویی تومور بلافاصله در ازت مایع فریز گردید و در دمای ۷۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در آزمایشگاه ۱۰۰-۵۰ میلی گرم بافت تومور به همراه یک سیسیترایزول[9] در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. سپس سوسپانسیون رویی حاصل جهت استخراج RNA به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، تا اجزاء بزرگ‌تر رسوب نمایند. برای بررسی بیان ژن‌های Apaf-1 و کاسپاز ۳ در هر گروه تحت بررسی، از تکنیک Real Time PCR[10] استفاده شد. مراحل استخراج RNA از سلول‌های رده L2-MC4 سرطان سینه تام بر اساس دستورالعمل با استفاده از ترایزول[11] به طور دقیق اجرا شد. پس از اضافه نمودن ترایزول، انکوبه نمودن در دمای ۷۰- درجه به مدت یک شبانه روز انجام شد. نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- نگهداری شدند و سپس مراحل بعدی استخراج به ترتیب انجام گردید.

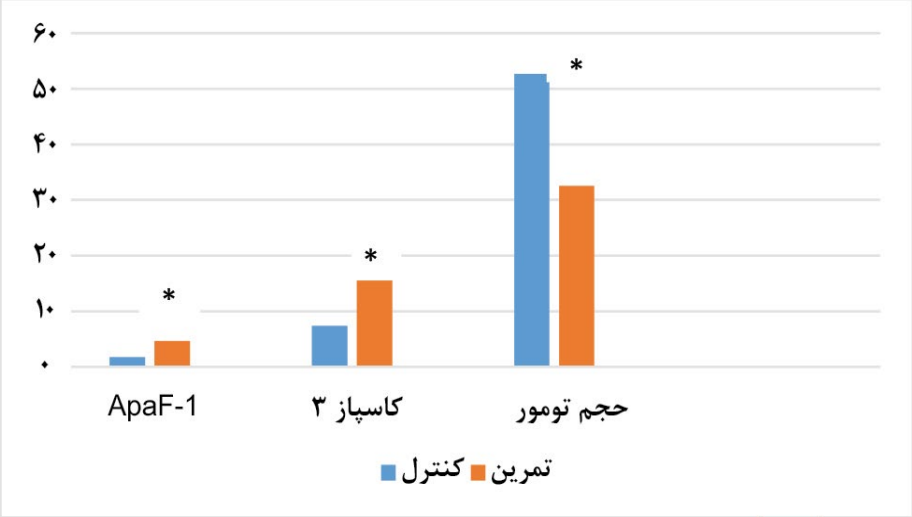
1. Alvarado
2. Flask T75
3. Glutamine
4. Penicillin
5. Streptomycin
6. Trypsin enzyme
7. Trypan blue
8. Necrosis
9. Cicittrizol
10. Real-time polymerase chain reaction
11. Trizol

برای ساخت cDNA مربوط به Apaf-1 و کاسپاز ۳، کیت استراتاژن[1] مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدای کار، میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به‌طور جداگانه تعیین گردید. برنامه Real time PCR بر روی دستگاه لایت سایکلر[2] مدل RG-3000 Corbett Research برای ژن کاسپاز ۳ در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۵ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه اجرا شد. برای Apaf-1 شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه اجرا شد. از GAPDH[3] به عنوان ژن کنترل کاسپاز ۳ و از U۶ به عنوان ژن کنترل Apaf-1 استفاده گردید. برای بررسی اختصاصی، محلول تکثیر شد و منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real time PCR، داده‌های خام به‌صورت Ct[4] از دستگاه استخراج شد. در انتها، برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده، از روش مقایسه میزان تغییرات سطح Ct با میزان آن در نمونه کنترل ($\Delta\Delta Ct$) استفاده گردید و برای هرنمونه، ۳ تکرار بیولوژیک و ۲ تکرار تکنیکی منظور گردید.

روش‌های آماری: برای بررسی طبیعی بودن توزیع متغیرهای وابسته از آزمون شاپیرو - ویلک[5] استفاده شد و با توجه به تایید توزیع داده‌ها در هر دو گروه شرکت کننده؛ پیش فرض استفاده از آزمون‌های پارامتریک پذیرفته شد. از این رو، از روش آماری آزمون t مستقل برای مقایسه بیان ژن‌های Apaf-1 و کاسپاز ۳ و همچنین حجم تومور در دو گروه تمرین و کنترل استفاده شد. کلیه محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ به اجرا درآمد.

یافته‌ها

تغییرات حجم تومور و کاسپاز ۳ و Apaf-1 در شکل ۱ آورده شده است. نتایج آزمون t مستقل نشان داد که پس از ۸ هفته تمرین هوازی، بیان Apaf-1 ($p=۰/۰۰۱$) و کاسپاز ۳ ($p=۰/۰۰۱$) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، به طور معنی دار افزایش یافته است. از طرف دیگر، نتایج آزمون t مستقل کاهش معنی دار ($p=۰/۰۰۱$) در حجم تومور را در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل نشان داد.



شکل ۱. مقایسه شاخص های حجم تومور و بیان ژن کاسپاز ۳ و Apaf-1 در گروه های تحقیق؛ *نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح $p<۰/۰۵$.

1. Stratagene
2. Light cycler Machine
3. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
4. Threshold cycle
5. Shapiro-Wilk

جدول ۲. توصیف و مقایسه میزان بیان Apaf-1 و کاسپاز ۳ و میزان حجم تومور در گروه تمرین هوازی و کنترل

گروه	تعداد	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف استاندار	سطح معنی داری آزمون t مستقل
اطلاعات مربوط به شاخص Apaf-1						
گروه کنترل	۱۰	۰/۶۸	۱/۸۷	۱ /۰۰	۰/۵۱	۰/۰۰۱*
گروه تجربی	۱۰	۲/۶۰	۳/۰۰	۲/۸	۰/۶۳	
اطلاعات مربوط به شاخص کاسپاز ۳						
گروه	تعداد	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف استاندار	
گروه کنترل	۱۰	۵/۵۴	۸/۲۳۱	۷/۳۳	۰/۹۵	۰/۰۰۱*
گروه تجربی	۱۰	۱۳/۰۱	۱۸/۸۷	۱۶/۹۰	۱۶/۹۸	
اطلاعات مربوط به شاخص حجم تومور						
گروه	تعداد	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف استاندار	
گروه کنترل	۱۰	۴۰/۹۱	۶۸/۰۷	۵۲/۷۱	۱۳۵/۸۲	۰/۰۰۱*
گروه تجربی	۱۰	۲۹/۰۶	۴۱/۹۱	۳۲/۴۸	۵۹/۸۴	

*نشانه تفاوت معنی دار بین دو گروه در سطح p<۰/۰۵.

بحث

بر اساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، ۸ هفته تمرین هوازی موجب افزایش بیان ژن Apaf-1 و کاسپاز ۳ و کاهش حجم تومور در موش های مبتلا به سرطان پستان شد. نتایج پژوهش حاضر در باره تاثیر تمرین هوازی بر کاهش حجم تومور سرطانی به طور کلی با نتایج حاصل از پژوهش های داگلاس[1] و دیگران (۲۰۱۳) که بیان کرده‌اند فعالیت بدنی باعث کاهش رشد تومور می‌شود و دستگاه ایمنی را به سوی پاسخ ضد تومور سلول‌های T کمکی نوع ۱[2] (Th1) هدایت می کند (داگلاس و دیگران، ۲۰۱۳) همسو است. ملیندا[3] و دیگران (۲۰۰۷) نیز نشان داده اند که ۶ هفته تمرین هوازی، ۵ روز در هفته و هر جلسه یک ساعت با ۵۰% حداکثر ظرفیت؛ باعث کاهش حجم و وزن تومور می شود (ملیندا و دیگران، ۲۰۰۷). فرناندز- سیلوا[4] و دیگران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر ۱۰ هفته تمرین منظم هوازی شنا بر آپوپتوزیس در موش های نر، مهار آپوپتوزیس را پس از تمرین گزارش کرده اند. از طرف دیگر، پارکو[5] و دیگران (۲۰۰۴) با بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین منظم با شدت کم (۵ روز در هفته) در عضله قلبی و اسکلتی موش ها، افزایش Bcl-2 و کاهش Bax و Apaf-1 و همچنین عدم تغییر معنادار کاسپاز ۳ را نشان داده اند که با نتایج ما همسو نیست. این ناهمسویی‌ها را می‌توان به تفاوت در مدت زمان و طول دوره تمرین و همچنین وضعیت سلامت و جنسیت آزمودنی ها نسبت داد؛ به طوری در بعضی مطالعات از جمله تحقیق حاضر موش های ماده مبتلا به سرطان پستان استفاده شده است؛ در حالی که آزمودنی ها در هر دو پژوهش فرناندز و دیگران (۲۰۱۲) و پارکو و دیگران (۲۰۰۴)، موش های نر و سالم بوده اند. به علاوه، در مطالعه فرناندز و دیگران (۲۰۱۲) طول دوره تمرین ۱۰ هفته بوده و موش ها به جای دویدن هوازی روی نوارگردان، تمرین هوازی شنا انجام داده اند در حالی که پارکو و دیگران مداخله ۸ هفته ای داشته اند. طول دوره تمرین طولانی تر، احتمالا موجب سازگاری بیشتری می شود.

نتایج پژوهش حاضر در باره تاثیر تمرین هوازی به ویژه در کاهش عوامل منتخب آپوپتوزیس در مبتلایان به

1. Douglas
2. T helper type 1
3. Melinda
4. Fernandes- Silva
5. Parco

سرطان پستان با نتایج حاصل از پژوهش امانی شلمزاری و دیگران (۲۰۱۴) که بیان کرده اند ۶ هفته تمرین هوازی موجب کاهش عوامل التهابی در تومور می شود و با افت بیان Bcl-2 و افزایش آپوپتوزیس همراه است؛ همسو می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد تمرین هوازی موجب کاهش سلول‌های سرطانی از مسیر آپوپتوزیس می‌شود، به‌گونه‌ای که در اثر سازگاری با ۸ هفته تمرین هوازی، عوامل بالادستی معینی فعال شده و باعث تخریب غشا میتوکندری و آزاد شدن مولکول‌های آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c در داخل سیتوزول می‌شوند. فعالیت سیتوکروم c کاسپاز های ۳ و ۹ را فعال کرده که در نهایت افزایش جریان آپوپتوزیس را به همراه دارد (مورن[1]، ۲۰۰۴).

عدم هماهنگی میزان اکسیژن دریافتی و اکسیژن مورد نیاز بافت ها به خصوص در عضلات فعال و از سوی دیگر، بروز فرآیند کاهش جریان خون موضعی و سپس برقراری مجدد گردش جریان خون بافتی؛ می‌تواند باعث تولید انواع اکسیژن های فعال شود. افزایش مصرف اکسیژن و افزایش تهویه ریوی و متابولیسم ناشی از جلسات تمرین هوازی احتمالا خود عامل دیگری در افزایش تولید ROS[2] می باشد که از راه اکسایش بازهای پورین[3] و پیریمیدین[4] و مخصوصا گوانین[5] به DNA[6] صدمه می زند و باعث آپوپتوزیس سلول های سرطانی می شود. همچنین مقدار چشم گیر اکسیدان‌های ایجاد شده بر اثر تمرین نیز می‌تواند سبب تخریب DNA شده و مستقیما آپوپتوزیس را تحریک کند (فانیوف[7] و دیگران، ۲۰۰۰). همچنین این احتمال وجود دارد که در پاسخ به فشار اکسایشی ناشی از تمرین، جابه جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری در اثر فعال شدن C-JNK[8] سیتوزلی افزایش می یابد، به طوری که JNK در حضور محرک های استرس سلولی فسفریله شده و باعث مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود. بدین ترتیب پروتئین Bax اجازه جابه جایی به سمت میتوکندری را پیدا می کند. پروتئین JNK در داخل میتوکندری، در باز شدن mtPTP[9] دخالت می کند و موجب رهایش عوامل پیش آپوپتوزیسی مانند عامل القاکننده آپوپتوزیس[10](AIF) و سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌شود. به محض رهایش و ورود به سیتوزول، AIF مستقیما و یا از طریق آبشار کاسپازی شامل کاسپاز ۹ و نهایتا کاسپاز ۳، موجب قطعه قطعه شدن DNA می شود (ونیشتین[11] و دیگران، ۲۰۱۱). از طرفی، سیتوکروم c رها شده در اثر ROS در جریان تمرین هوازی باعث الیگومرشدن Apaf-1 شده و به عنوان عامل همراه به عامل فعال کننده آپوپتوزیس-۱ که در حالت عادی در سلول به صورت بی اثر و غیر فعال حضور دارد و در فرآیند آپوپتوزیس با رهایی سیتوکروم c از میتوکندری فعال می شود، متصل شده و داکسی آدنوزین تری فسفات یا dATP[12] را تشکیل می دهد. بدین ترتیب پروکاسپاز ۹ فعال شده و باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و سرانجام کاسپاز ۳ می گردد و در جهت به راه انداختن مسیر آپوپتوزیس عمل می کند؛ فرآیندی که با خرد کردن و در نهایت فاگوسیتوز سلول های سرطانی، باعث کاهش حجم تومور می شود (مورن، ۲۰۰۴).

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر دال بر آن است که ۸ هشت هفته تمرین هوازی منظم می‌تواند نقش مؤثری در افزایش فعالیت Apaf-1 و کاسپاز ۳ داشته و از این طریق، موجب کاهش روند رشد تومور پستان در موش‌ها شود. از آنجا که افزایش فعالیت آپوپتوزیسی در بافت تومور از جمله اهداف درمانی در کاهش و یا متوقف کردن رشد تومور است، می‌توان فرض کرد که فعالیت ورزشی منظم در مدل‌های آزمایشی موش‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژن، نقش درمانی داشته باشد. در کل، یافته‌های بدست آمده در کنار نتایج سایر مطالعات، مؤید نقش مطلوب تمرینات هوازی با شدت ۵۵ تا ۷۰ درصد VO_{2max} در کنترل Apaf-1 و کاسپاز و در نهایت حجم تومور سرطانی است؛ با این حال برای اظهار نظر قطعی در این زمینه، تحقیق بیشتر با بررسی سایر مسیرها و دیگر عوامل مسیر آپوپتوزیس؛ ضروری بنظر می رسد.

تضاد منافع

تعارض منافعی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

از دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران به دلیل حمایت مالی و از دانشگاه تربیت مدرس به خاطر همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق، تقدیر می‌شود.

1. Mooren
2. Reactive oxygen species
3. Purine
4. Pyrimidine
5. Guanine
6. Deoxyribo nucleic acid
7. Phanuef
8. Jun-N-terminal kinase
9. Mitochondrial permeability transition pore
10 Apoptosis inducing factor
11. Valastyan
12. Deoxyadenosine triphosphate

منابع

Abdalla, D. R., Murta, E. F., & Michelin, M. A. (2013). The influence of physical activity on the profile of immune response cells and cytokine synthesis in mice with experimental breast tumors induced by 7, 12-dimethylbenzanthracene. *European Journal of Cancer Prevention, 22***(3), 251-258.**

Ambros, V. (2004). The functions of animal microrna.s *Nature, 431***(7006), 350.**

Amani - Shalamzari, S., Agha-Alinejad, H., Alizadeh, S., Shahbazi, S., Khatib, Z. K., Kazemi, A., ... & Minayi, N. (2014). The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 17***(4), 231.**

Anoosheh, L., Kordi, M. R., Gaeini, A., Mahdian, R., Mirakhori, Z., Amani, S. S., & Amini, A. (2014). The effects of aerobic training on microrna let-7a expression and levels of tumor tissue il-6 in mice with breast cancer. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease, 7***(3), 12-19.**

Alvarado, A., Gil da Costa, R. M., Faustino‐Rocha, A. I., Ferreira, R., Lopes, C., Oliveira, P. A., & Colaço, B. (2017). Effects of exercise training on breast cancer metastasis in a rat model. *International Journal of Experimental Pathology, 98***(1), 40-46.**

Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): A novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie, 84***(2-3), 215-222.**

Colbert, L. H., Westerlind, K. C., Perkins, S. N., Haines, D. C., Berrigan, D., Donehower, L. A., & Hursting, S. D. (2009). Exercise effects on tumorigenesis in a p53-deficient mouse model of breast cancer. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 41***(8), 1597.**

Courneya, K. S., Segal, R. J., Mackey, J. R., Gelmon, K., Reid, R. D., Friedenreich, C. M., & Lane, K. (2007). Effects of aerobic and resistance exercise in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: A multicenter randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology, 25***(28), 4396-4404.**

Cryns, V., & Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes & Development, 12***(11), 1551-1570.**

Fernandes-Silva, M. M., Carvalho, V. O., Guimarães, G. V., Bacal, F., & Bocchi, E. A. (2012). Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 98***(5), 459-466.**

Glushakova, O. Y., Glushakov, A. O., Borlongan, C. V., Valadka, A. B., Hayes, R. L., & Glushakov, A. V. (2018). Role of caspase-3-mediated apoptosis in chronic caspase-3-cleaved tau accumulation and blood–brain barrier damage in the corpus callosum after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma, 35***(1), 157-173.**

Goh, J., Tsai, J., Bammler, T. K., Farin, F. M., Endicott, E., & Ladiges, W. C. (2013). Exercise training in transgenic mice is associated with attenuation of early breast cancer growth in a dose-dependent manner. *PLoS One, 8***(11), e80123.**

Green, D. R. (2017). Cancer and apoptosis: Who is built to last? *Cancer Cell, 31***(1), 2-4.**

Haraguchi, M., Torii, S., Matsuzawa, S. I., Xie, Z., Kitada, S., Krajewski, S., ... & Reed, J. C. (2000). Apoptotic protease activating factor 1 (1-Apaf)–independent cell death suppression by bcl-2. *Journal of Experimental Medicine, 191***(10), 1709-1720.**

Hayes, S. C., Steele, M. L., Spence, R. R., Gordon, L., Battistutta, D., Bashford, J., ... & Eakin, E. (2018). Exercise following breast cancer: exploratory survival analyses of two randomised, controlled trials. *Breast Cancer Research and Treatment, 167***(2), 505-514.**

Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z., Yan, C., He, T., ... & Shi, Y. (2014). Molecular determinants of caspase-9 activation by the 1-Apaf apoptosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 111***(46), 16254-16261.**

Johnsson, A., Johnsson, A., & Johansson, K. (2013). Physical activity during and after adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Physiotherapy, 99***(3), 221-227.**

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell, 108***(2), 153-164.**

Jones, L. W., Viglianti, B. L., Tashjian, J. A., Kothadia, S. M., Keir, S. T., Freedland, S. J.,& Herndon, J. E. (2009). Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology, 108***(2), 343-348.**

Jordan, V. C. (2015). The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer. *Endocrine-Related Cancer, 22***(1), R1-R31.**

Khori, V., Shalamzari, S. A., Isanejad, A., Alizadeh, A. M., Alizadeh, S., Khodayari, S., & Sohanaki, H. (2015). Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of mir-21. *European Journal of Pharmacology, 765***, 179-187.**

Kong, G. M., Tao, W. H., Diao, Y. L., Fang, P. H., Wang, J. J., Bo, P., & Qian, F. (2016). Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World Journal of Gastroenterology, 22***(11), 31**

Mooren, F., & Völker, K. (2004). Molecular and Cellular Exercise Physiology. 7Editon. Human Kinetics, 451.

Irwin, M. L., Aiello, E. J., McTiernan, A., Bernstein, L., Gilliland, F. D., Baumgartner, R. N., ... & Ballard-Barbash, R. (2007). Physical activity, body mass index and mammographic density in postmenopausal breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 25***(9), 1-13.**

Siu, P. M., Bryner, R. W., Martyn, J. K., & Alway, S. E. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *The FASEB Journal, 18***(10), 1150-1152.**

Phaneuf, S., & Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 33***(3), 393-396.**

Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2017). 1-Apaf : Regulation and function in cell death. Biochimie, 135, 111-125. Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2015). Doxorubicin changes bax/bcl-xl ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 5***(3), 351.**

Sweegers, M. G., Altenburg, T. M., Chinapaw, M. J., Kalter, J., Verdonck-de Leeuw, I. M., Courneya, K. S., ... & Buffart, L. M. (2018). Which exercise prescriptions improve quality of life and physical function in patients with cancer during and following treatment? A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Sports Medicine, 52***(8), 505-513.**

Vainshtein, A., Kazak, L., & Hood, D. A. (2011). Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *Journal of Applied Physiology, 110***(6), 1638-1645.**

Venkatadri, R., Muni, T., Iyer, A. K. V., Yakisich, J. S., & Azad, N. (2016). Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death & Disease, 7***(2), e2104-e2104.**