پژوهش‌نامهٔ فیزیولوژی ورزشی کاربردی **مقاله پژوهشی**
سال هفدهم/ شماره سی و سوم/بهار و تابستان ۱۴۰۰

دریافت: ۹۹/۱۱/۳ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۲ ص ص: ۱۶۰-۱۴۹

تاثیر شش هفته تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان عوامل آنژیوژنزی P53 و SRF بافت تومور موش های ماده مبتلا به سرطان پستان

توران سلیمانی[۱]، رضا نوری[۲]، عباسعلی گائینی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان، یکی از دلایل مرگ و میر زنان است. آنژیوژنز نقش مهمی در توسعه و متاستاز تومور دارد. اثر تمرین-های ورزشی بر مهار یا کاهش فرایند آنژیوژنز در بافت تومور به‌طور کامل روشن نیست. لذا هدف پژوهش حاضر، بررسی آثارکمک درمانی تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان عوامل آنژیوژنزی P53 و SRF بافت تومور سرطان پستان در موش‌های آزمایشگاهی بود. **مواد و روشها:** ۱۶ سر موش بالب c به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل (sedentary-tumor) و تمرین تناوبی خیلی شدید- تومور (HIIT-Tumor) تقسیم شدند. بعد از آشنایی با محیط آزمایشگاه، سلول‌های سرطانی، زیر جلدی به موش‌ها تزریق شد. دو هفته بعد، از گروه تمرین آزمون ظرفیت ورزشی انجام و سپس، شش هفته، سه جلسه در هفته، با تناوب ۲ دقیقه دویدن ۲ دقیقه استراحت پروتکل انجام شد. ۴۸ساعت بعداز آخرین جلسه تمرین، موش‌ها بی‌هوش و قربانی و بافت تومور جدا شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها با نرم افزار جنکس نسخه ۶/۱ انجام شد ($P\leq0/01$). **یافته‌ها:** پژوهش حاضر نشان داد، تمرین HIIT موجب کاهش ۵/۲۷ برابری SRF و افزایش ۵/۹۷ برابری P53 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل شد. **نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد تمرین HIIT از راه‌کاهش SRF و افزایش P53 می‌تواند باعث سرکوب تومور و احتمالا"مانع از پیشرفت سرطان شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، آنژیوژنز، تمرین تناوبی خیلی شدید، P53، SRF

۱ دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه تهران پردیس بین المللی کیش، کیش، ایران
۲ استادیارگروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه تهران پردیس بین المللی کیش، کیش، ایران. نویسنده مسئول:nuri_r 7@ut.ac.ir
۳ استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

سرطان پستان، یکی از دلایل رایج مرگ و میر و شایع در زنان است. در سال ۲۰۱۷، بیش از ۲۵۰ هزار مورد جدید سرطان پستان در ایالات متحده تشخیص داده شد (۱). اغلب، روش های درمانی تومور عوارض جانبی زیان بار به همراه دارند (۲). یکی از روش های جایگزین برای درمان تومور، درمان از راه دستگاه عروقی و رگ زایی است. آنژیوژنز[۱] نقش مهمی در توسعه، پیشرفت ومتاستاز تومور جامد دارد (۳). آنژیوژنز فرایندی فیزیولوژیک است که در آن مویرگ های جدید خونی از عروق موجود تشکیل می شوند. در سال ۱۹۷۱، فولکمن[۲] در مقاله خود مهار عوامل آنژیوژنزی و راهبرد گرسنگی تومور را در درمان سرطان بررسی کرد (۵). زندگی یا مرگ یک سلول در شرایط هیپوکسی، از راه بیان و فعال شدن عوامل رونویسی تنظیم می شود. مهم ترین این عوامل رونویسی عبارتنداز: عوامل وابسته به هیپوکسی[۳](HIF) (۴)، عامل پاسخ سرمی[۴](SRF) (۷و۶) و پروتئین سرکوبگر تومور[۵] (P53) (۸). همانند HIF، در شرایط هیپوکسی خفیف، P53 به مقدار کمی بیان می شود، اما پیوسته با MDM2[۴] از راه یوبی کوئتینه[۵] شدن تجزیه می شود (۹). در استرس سلولی مانند هیپوکسی، مسیر ATM/ATR kinases فعال می شود و P53 در انتهای N خود فسفریله می شود. این فرآیند باعث اختلال در تعامل با MDM2 و بنابراین P53 تثبیت می گردد. پژوهش ها نشان داده اند P53، به احتمال زیاد، در محدوده ی هیپوکسی شدید تومور یا زمانی که رشد تومور با سایر انواع تنش های ژنتیکی همراه است، از راه مهار HIF مانع از آنژیوژنز می شود (۱۰). همچنین P53 باعث سرکوب چهار عامل مهم آنژیوژنزیVEGF[۶]، عامل رشد فیبروبلاستی پایه[۷](bFGF) و گیرنده آن[۸](bFGF-BP) و ژن[۹] COX-2 می‌شود (۴).

به نظر می رسد هیپوکسی شدید علاوه بر، فعال کردن میسرهایی جهت سرکوب تومور، موجب فعال شدن SRF نیز می شود. از طرفی، SRF ژن هایی را تنظیم می کند که در پاسخ سلولی به محرک های میتوزی و استرس سلولی نقش دارند (۷). در شرایط کمبود اکسیژن، بیانSRF و فسفریله شدن آن افزایش می یابد. به علاوه، فعال شدن SRF تحت تاثیر HIF یا P53 قرار نمی گیرد (۷). نشان داده اند آنژیوژنز ناشی ازهیپوکسی، از مسیر-HIF VEGF-MAPK / Rho-SRF فعال می شود. (۱۱). افزایش پیام رسانی VEGF هنگام هیپوکسی، ریشه در فعال شدن HIF دارد، در حالی که هیپوکسی SRF را مستقل از HIF فعال می کند. SRF نه تنها از راه عوامل رشدی فعال می شود، بلکه باعث تحریک بیان عوامل رشدی نیز می گردد. همچنین، مولکول هایی که در فرایند احیای سایتو اسکلتی و بازآرایی عروق جدید ضروری اند، به شدت توسط SRF کنترل می شوند (۱۱). در مطالعه ای نشان داده اند بدون SRF حتی عامل قوی آنژیوژنزی VEGF نمی تواند آنژیوژنز را تحریک کند. بنابراین، SRF باید نامزد مناسبی برای ژن درمانی در سرطان باشد. با وجود این، واکنشSRF به کمبود اکسیژن به

[1] Angiogenesis
[2] Folkman
[3] Hypoxia Inducible Factors
[4] Tumor suppressor protein
[5] Serum response factor
[6] Mouse Double Minute2
[7] Ubiquitination
[8] Vascular endothelial growth factor
[9] Basic fibroblast growth factor
[10] BFGF -Binding protein
[11] Cyclooxygenas2

ندرت مطالعه شده است (۱۱). نقش آنژیوژنز و آپوپتوز در رشد و متاستاز سرطان موجب پژوهش های فراوانی معطوف به سازوکارهای تنظیمی و مفاهیم بالینی در مدیریت بیماران سرطانی شده است. از این رو، مصرف داروهای آپوپتوزی و ضد آنژیوژنزی با استفاده از روش‌های گوناگون از جمله فعالیت ورزشی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۲). مطالعات بالینی آثار فعالیت ورزشی بر بیماران مبتلا به سرطان پستان، برخی از مسیرهای درگیر را شناسایی کرده اند، اما تنوع در مراحل تومور، نوع و شدت تمرین ورزشی و ویژگی های بیماران مملو از عوامل مداخله گری است که شناسایی سازوکارهای زیست شناختی و مولکولی آثار فعالیت ورزشی بر پیشرفت تومور را پیچیده کرده است. در مطالعه ای که بر مدل موش های مبتلا به سرطان پستان MMTV-Wnt مبتنی بر حذف ژن P53 انجام شد، معلوم شده است فعالیت ورزشی تغییری در تومور ایجاد نمی کند که ممکن است به دلیل بازتاب سرطان‌زایی[1] بسیار قوی آغاز کنندهٔ جهش ژنتیکی در این مدل تومور باشد. علی رغم این تفاوت، مطالعات بسیاری نشان می دهند فعالیت ورزشی منظم، خطر ابتلا به سرطان و رشد تومور را کاهش می دهد و این تأثیر به نوع سرطان ارتباط ندارد. آثار مهار کننده رشد تومور، با چند ساز و کار گوناگون انجام می گیرد که ممکن است سهم مهار کنندگی هر ساز و کار در تأثیر تمرین ورزشی در انواع سرطان ها، متفاوت باشد. شناخت ساز و کارهای اساسی تأثیر تمرین های ورزشی در بافت تومور بسیار ضروری است. پژوهش ها نشان می دهند تمرین های ورزشی در کنترل پیشرفت سرطان از راه تأثیر مستقیم بر عوامل داخلی تومور (سرعت رشد، متاستاز، سوخت وساز و ایمنی زایی تومور) مؤثر هستند (۱۳). همچنین، تمرین های ورزشی از راه کاهش هیپوکسی توده اولیه می توانند ارتباط بین تومور اولیه وسایت های متاستاز دور را کاهش دهند (۱۴). شبکه های پیام رسانی درون توموری، بر اثر عوامل بیرونی گوناگون، بسیار سازگار پذیر و قابل تغییر هستند. این عوامل بیرونی مرتبط با فعالیت ورزشی عبارت است از: آثار غدد درون ریز (مانند هورمون های استرسی، مایوکاین های موجود در جریان خون) و عوامل فیزیکی (مانند تولید گرما، تنظیم pH، افزایش جریان خون، افزایش تنش برشی[2] یا بر بستر رگ ها و فعالیت دستگاه سمپاتیک). این عوامل فیزیولوژیکی می توانند باعث تنظیم رشد، متابولیسم، پتانسیل متاستاز و نیمرخ ایمنی تومور شوند. بیشترین نتیجه در مطالعات انجام شده دربارهٔ تأثیر فعالیت ورزشی بر سرطان، کاهش میزان رشد تومور است. این تأثیر مهاری در همهٔ سلول های سرطانی مورد بررسی دیده شده است (۱۳). هر چند فعالیت ورزشی به تنهایی قادر به ریشه کن کردن تومورها نیست، اما مطالعات نشان می دهند تمرین های ورزشی می توانند رشد تومور را تا ۶۷ درصد کاهش دهند (۱۳). تمرین های ورزشی موجب تغییر رخدادهای پیام رسانی مولکولی در سلول های تومور می شوند. مسیر پیام رسانی Hippo، یکی از مسیرهای مهم در تشکیل تومور است. پژوهش ها نشان داده اند این مسیر بر اثر فعالیت ورزشی و کاتکولامین ها مختل می شود. همچنین، نشان داده شده است تأثیر تمرین های ورزشی در سلول های سرطانی پستان، از راه یک ساز و کار وابسته به اپی نفرین، موجب غیر فعال شدن مسیر پیام رسانی Hippo/YAP می شود که تشکیل تومور و احتمال زنده ماندن سلول های تومور کاهش می یابد (۱۳). هر چند مطالعات بسیاری تاثیر فعالیت بدنی بر بیان عوامل اصلی آنژیوژنزی و عوامل اصلی آپوپتوزی مثل P53 را در بافت تومور بررسی کرده اند، اما با وجود اهمیت بسیار زیاد SRF در آنژیوژنز و آپوپتوز، تاکنون پژوهشی تأثیر فعالیت ورزشی را بر SRF و P53 در کنار هم در بافت تومور بررسی

[1] Ancogenic
[2] Shear stress

نکرده است. از این رو، هدف پژوهش حاضر تأثیر شش هفته تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان P53 و SRF در بافت تومور موش های ماده مبتلا به سرطان پستان می باشد.

روش پژوهش

در پژوهش حاضر همه اصول اخلاقی پژوهش، طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب انستیتو پاستور ایران، رعایت شد. همچنین مجوز کد اخلاق از پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی- وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به شماره IR.SSRI.REC.1398.630 دریافت شد. این پژوهش از نوع توسعه ای و به‌روش تجربی انجام شد. در پژوهش حاضر، ۱۶ سر موش ماده بالب سی (۴ تا ۵ هفته ای با میانگین وزن ۲± ۲۰ گرم) از انستیتو پاستور خریداری و پس از انتقال به آزمایشگاه تصادفی به ۲ گروه Rest+Tumor وTumor+HIIT تقسیم شدند. هر گروه به تعداد ۸ سر موش در قفسه های پلکسی گلاس در محیطی با رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد، دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگه داری شدند. در دوره پژوهش آب و غذا به صورت آزاد در دسترس موش‌ها قرار داشت. پس از یک هفته آشنایی با محیط، سلول های سرطانی به موش ها تزریق شد و پروتکل تمرین تناوبی (۱۵) (جدول ۱)، دو هفته پس از تزریق آغاز گردید.

جدول ۱: پروتکل تمرین HIIT

دوره تمرین	جلسات تمرین	مدت تمرین هر جلسه (دقیقه)	مدت دویدن و استراحت در هر تناوب (دقیقه)	سرعت در تناوب اول هر جلسه (متر در دقیقه)	سرعت در سایر تناوب های هر جلسه (متردردقیقه)
هفته اول	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۱۵
هفته دوم	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۱۶
هفته سوم	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۱۷
هفته چهارم	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۱۸
هفته پنجم	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۱۹
هفته ششم	۳	۶۰	۲و۲	حداکثر *	۲۰

(*). حداکثر سرعت دویدن هر موش با اجرای "آزمون ظرفیت ورزشی" تعیین شده است (۱۵).

برای دستیابی به میزان معینی از سلول سرطانی، سلول MC4L2 در محیط آزمایشگاهی، در فلاسک T75 حاوی پنی سیلین 100 µg/ml، محیط کشت DMEM/F-12 و FBS 10 درصد کشت و برای شمارش سلول ها از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد (۱۶). سپس یک میلیون سلول به صورت زیر جلدی به پهلوی راست

موش ها تزریق شد. قبل از تزریق سلول‌های سرطانی موش‌ها با تزریق ترکیب زایلازین۲ درصد و کتامین ۵ درصد بی هوش شدند. گروه ها به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین تناوبی) با کتامین و زایلازین بی هوش شدند و بافت تومور آن‌ها جدا شد و در داخل پلیت حاوی PBS استریل قرار گرفت. پس از جداسازی عروق خونی و بافت چربی اطراف تومور و قسمت مرکزی نکروز شده آن، تومور به کمک قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگه داری شد. یک سی سی ترایزول به ۱۰۰ میلی گرم بافت تومور در لوله هموژن دستی اضافه شد و بافت هموژن گردید. سپس، مایع رویی برای استخراج RNA به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شد. مراحل استخراج RNA بر اساس پروتکل ترایزول ساخت شرکت Invitrogen کشور آمریکا انجام شد. سپس برای رونویسی RNA به cDNA طبق دستور العمل کیت سنتز cDNA شرکت BioBasic کشور کانادا میزان بیان عوامل مورد نظر سنجیده شد. مراحل REAL TIME-PCR بر اساس دستورالعمل SYBER-Green شرکت BioBasic کشور کانادا انجام شد. از ژن ACT-B به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. پرایمر های استفاده شده در جدول ۲ آمده است. به منظور کمی سازی مقادیر بیان ژن، ΔCt ژن در هر نمونه از تفریق CT ژن مربوطه از CT ژن ACT-b (به عنوان ژن رفرنس) محاسبه شد. سپس، برای محاسبه $\Delta\Delta Ct$، ΔCt گروه کنترل (گروه تومور) از ΔCt های به دست آمده کم شد (شکل۱). پس از آن از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ جهت محاسبه Fold Change (به مفهوم چند برابر بیان شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) استفاده شد (شکل۲ و جدول ۳).

جدول۲: توالی پرایمرهای ژن‌ها

کد دسترسی	دمای اتصال در واکنش	طول قطعه	آغازگر برگشت	آغازگر رفت	نام ژن
XM_006533157.3	57	191	CGCGGATCTTGAGGGTGAAATA	TGAGGTTCGTGTTTGTGCCT	P53
XM_006523957.3	56	146	TCACACACGTATTCACTCGGAC	TGCTGTGTGATTGTGGCCTT	SRF
XM_034057.1	58	87	TCATCCATGGCGAACTGGTG	CTGTCGAGTCGCGTCCAC	ACT-B

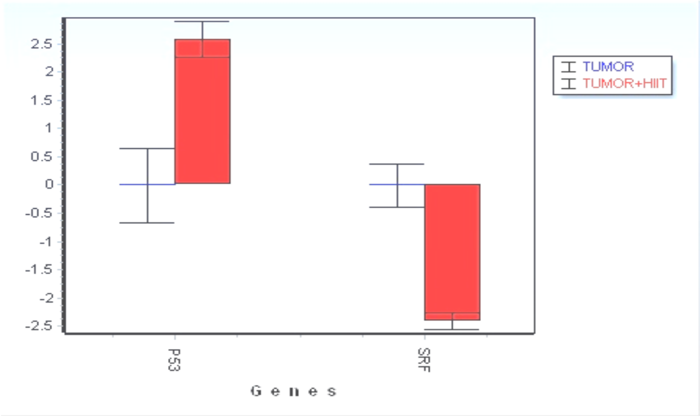
روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

پس از بررسی داده های تغییرات چند برابری توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف، معلوم شد توزیع داده ها غیر طبیعی است، لذا از آزمون ناپارامتریک من ویتنی استفاده شد (مقدار P در جدول ۳). مراحل تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار جنکس نسخه ۶/۱ انجام شد. سطح معناداری ۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

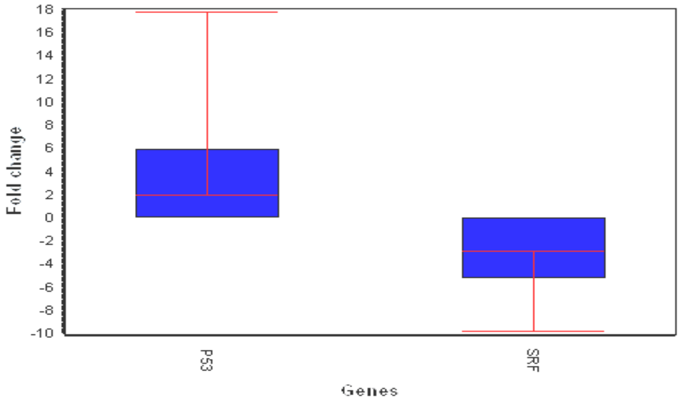
یافته‌ها

داده های پژوهش حاضر نشان داد تمرین تناوبی خیلی شدید موجب افزایش معنادار بیان P53 و کاهش معنادار بیان SRF در بافت تومور موش های مبتلا به سرطان پستان می شود. همانطور که در جدول ۳ دیده می شود

تمرین درگروه HIIT باعث افزایش ۵/۹۷ برابری بیان ژن P53 (p<۰/۰۱) و کاهش ۵/۲۷ برابری بیان ژن SRF (p<۰/۰۱) در مقایسه با گروه Tumor شده است (جدول ۳، شکل ۲). نرم افزار Genex نسخه ۶/۱ (اختصاصی تجزیه و تحلیل داده های Real Time-PCR)، تغییرات چند برابری (Fold Change) را محاسبه و به صورت مقیاس خطی نشان می دهد.



شکل ۱: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (-ΔΔCt) متغیرهای پژوهش



شکل۲: نسبت بیان متغیرها در گروه HIIT نسبت به گروه Tumor; (Fold Change)

بحث و بررسی

یافته های پژوهش حاضر نشان می دهد شش هفته تمرین HIIT باعث افزایش معنادار بیان P53 و کاهش معنادار SRF در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شد. این نتایج حاکی از آثار مثبت تمرین HIIT در بافت تومور است. در کل، درک کامل فرایند رگ زایی ممکن است

به شناسایی روش های درمانی جدید برای بیماران مبتلا به سرطان منجر شود. پژوهش های زیادی نشان می-دهند فعالیت ورزشی به خوبی می‌تواند باعث مهار رشد تومور شود. اگر چه بیشتر پژوهش‌ها تأثیر تمرین‌های استقامتی را بر بافت تومور بررسی کرده‌اند، اما پژوهش‌های کمی در مورد تأثیر تمرین تناوبی بر بافت تومور انجام شده است. نتایج پژوهش حاضر در مورد افزایش بیان P53 تحت تأثیر تمرین ورزشی با پژوهش لیونگ و همکارانش (۲۰۰۴) (۱۷)، یو و همکارانش (۲۰۱۶) (۱۸)، هیگنیس و همکارانش (۲۰۱۴) (۱۹)، اصغری رکابدار (۲۰۱۸) (۲۰)، شیروانی و همکارانش (۲۰۱۸) (۲۱) و مرادپور و همکاران (۲۰۱۶) (۲۲) همسو و با پژوهش افضل پور و همکارانش (۲۰۱۶) (۲۳) و دشتیان و همکارانش (۲۰۱۷) (۲۴). ناهمسو بود که ممکن است به دلیل متفاوت بودن نوع تمرین و شدت آن با پژوهش حاضر یا خطای احتمالی در انجام پژوهش‌ها باشد. در پژوهش حاضر علاوه بر فعال شدن P53 بر اثر هیپوکسی وفعال شدن ساز وکارهای مهار هیپوکسی توسط P53، افزایش جریان خون بر اثر تمرین ورزشی و تنش برشی موجب افزایش بیان P53 شده است (۲۵). مطالعات نشان داده‌اند عروق تومور از نظر ساختاری و عملکردی تفاوت زیادی با عروق طبیعی دارند و تأثیر تمرین ورزشی بر عروق تومور مشابه با تأثیر تمرین بر عروق طبیعی نیست (۲۵). برخی تغییرات سرم ناشی از تمرین‌های ورزشی منظم که ممکن است بر رشد و آپوپتوز سلول های تومور تأثیر گذارند عبارتند از: کاهش انسولین، استرادیول، تستوسترون آزاد و عامل رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-I) و پروتئین پیوندی به عامل رشد شبه انسولینی ۱ (IGFBP-1)[1] است. از بین این عوامل، کاهش IGF-I سرم مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر رشد تومور به نظر می‌رسد (۱۷). نتایج حاصل از پژوهش لیونگ و همکارانش (۲۰۰۴) که با پژوهش حاضر در مورد افزایش P53 همسو است، نشان می دهند فعالیت ورزشی منظم، با شدت متوسط تا شدید، محور IGF را در داخل بدن تغییر می‌دهد و IGF-I سرم را کاهش می‌دهد، در حالی‌کهIGFBP-1 را افزایش می دهد (افزایش این پروتئین باعث کاهش IGF-I سرم می-شود). این تغییرات در شرایط آزمایشگاهی به افزایش پروتئین P53 در سلول‌های تومور پروستات منجر می شود (۱۷). نقش P53 در مهار آنژیوژنز بررسی شده‌است. مهار آنژیوژنز از سوی P53 از راه مهار دستگاه القایی هیپوکسی (HIF)، مهار رونویسی ژن های عوامل پیش آنژیوژنزی و افزایش رونویسی ژن های عوامل مهار کننده های آنژیوژنزی انجام می شود (۴). در پاسخ به هیپوکسی در سلول های تومور، مقدار HIF1α افزایش می یابد. HIF1α موجب بیان بسیاری از ژن هایی می شود که برای سازگاری با هیپوکسی مورد نیاز هستند، مانند VEGF که تنظیم کننده اصلی آنژیوژنز است و هدف اکثر داروهای ضد آنژیوژنزی است (۴). از سویی، نشان داده شده است، P53 مستقیماً فعالیت HIF1α را مهار می کند (۴). بنابراین P53 با اتصال به HIF1α و غیرفعال کردن آن، مانع پاسخ سلول های تومور به هیپوکسی و تحریک رگ زایی می شود. همچنین، مطالعات نشان داده اند P53، رونویسی دو عامل VEGF و bFGF را که مهم ترین عامل رگ زایی در تومورها هستند، مستقیما" سرکوب می کند (۴). P53، سیکلو اکسیژناز -۲ (COX-2) را هم سرکوب می کند. COX-2 اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین H2 تبدیل می کند. پروستاگلاندین نیز به نوبه خود می تواند به انواع مولکول های پیش التهابی به نام پروستانوئیدها تبدیل شود. پروستانوئیدها، واسطه ای در تولید عوامل پیش آنژیوژنزی و تحریک رشد تومور هستند. P53 از راه مهار مستقیم رونویسی این مولکول های پیش آنژیوژنزی، می تواند پیام هایی را که موجب تقسیم سلول های اندوتلیال و تشکیل عروق خونی می شوند، محدود کند (۴). همچنین، مطالعات نشان می دهند، برخی از قدرتمندترین مهارکننده های آنژیوژنزی درون زا تحت کنترل P53 قرار دارند. یکی از اصلی ترین مهار

[1] Insulin like growth factor-binding protein-1

کننده آنژیوژنزی، Tsp-1 است که بیان آن از سوی P53 کنترل می‌شود. Tsp-1 از راه چند ساز و کار، از جمله اتصال به یک گیرنده سطح سلولی موجود در سلول های اندوتلیالی به نام CD36، باعث مهار آنژیوژنز می شود. بیان Tsp-1 از سوی P53، می تواند مسیر آنژیوژنز را کاملاً معکوس کند و تومورها را به حالت غیر فعال در آورد (۴). بنابراین، افزایش P53 با کاهش آنژیوژنز تومور می تواند باعث کاهش رشد تومور شود. از طرفی پژوهش‌ها نشان داده‌است که بیان P53 در شرایط فشار برشی افزایش می‌یابد (۲۵). هرچند نحوه ی اثرگذاری فشار برشی و سازوکار آن بر بیان P53 هنوز مبهم است و نیازمند تحقیق و بررسی های گسترده تر می باشد، اما در پژوهش حاضر نشان داده‌شد تمرین تناوبی خیلی شدید باعث افزایش بیان P53 شده است که ممکن است دلیل آن افزایش جریان خون و افزایش فشار برشی در اثر فعالیت ورزشی باشد. همچنین در پژوهش حاضر بررسی مسیرهای هومورنی (انسولین، تستوسترون آزاد، استروژن محورIGF .....) و تأثیر فعالیت ورزشی به علت کمبود منابع مالی انجام نشد.

همچنین، در پژوهش حاضر، تأثیر شش هفته تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان SRF بافت تومور موش های ماده مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. هیچ پژوهشی در پیشینه یافت نشد که تأثیر تمرین ورزشی را بر بیان SRF در بیماران سرطانی و یا آزمودنی‌های سالم بررسی کرده‌باشد. براساس بررسی های انجام شده در موتورهای جستجوگر، به نظر می رسد پژوهش حاضر نخستین پژوهشی است که تأثیر تمرین ورزشی را بر این عامل می‌سنجد که همین مقایسه یافته های این مطالعه را با دیگران دشوار می سازد.

در اندوتلیوم عروق تومور در معرض هیپوکسی، جریان خون ضعیف و تنش برشی کم است. یکی از پاسخ های سلول‌ها و بافت‌ها در شرایط هیپوکسی، القای عوامل رگ زایی و رشد است که به ایجاد و توسعه رگ‌های خونی جدید منجر می شود (۲۶). هیپوکسی، هم بیان و هم فسفوریلاسیون عامل پاسخ سرمی (SRF) را افزایش می دهد (۲۷). یکی از پاسخ‌های سلول ها و بافت ها در شرایط هیپوکسی، القای فاکتورهای رگ زایی و رشد است که منجر به ایجاد و توسعه رگ های خونی جدید می شود (۲۵). SRF برای آنژیوژنز ناشی از هیپوکسی ضروری است. کمبود SRF نه تنها تاثیر منفی بر روی ژن های مسئول اتصال و چسبندگی سلول‌های اندوتلیال می‌شود، بلکه عوامل مهار کننده فاکتورهای آنژیوژنیک مانند VEGF و آنژیوپوئیتین-۱ و -۲ را سرکوب می‌کند (۱۱). همچنین SRF سلول‌های اندوتلیال را در مقابل آپوپتوز ناشی از هیپوکسی محافظت می‌کند (۲۸). مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی، می‌تواند از طریق توزیع مجدد برون ده قلبی تاثیر مستقیمی بر ریز محیط تومور داشته باشد. در هنگام فعالیت بدنی، جریان خون به عضلات اسکلتی فعال به منظور رفع نیازهای متابولیسم، به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و جریان خون عضلات غیر فعال و اندام های احشایی از طریق انقباض عروقی، کم می شود. در این فرآیند، با آن که انتظار نمی‌رود، جریان خون تومور، هم افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که بر روی موش های مبتلا به سرطان پروستات، انجام گرفت مشخص شد، در زمان تمرین، جریان خون تومور در حدود ۲۰۰٪ در مقایسه با گروه غیر فعال، افزایش می‌یابد و باعث کاهش ۵۰ درصدی هیپوکسی در عروق تومور می‌گردد. پژوهشگران عنوان کردند که این رخداد، به علت کاهش همزمان تون میوژنیک و کاهش فعالیت گیرنده های مربوط به انقباض عروق رخ می دهد (۲۹). در نتیجه ممکن است علت کاهش SRF در پژوهش حاضر نیز کاهش هیپوکسی در عروق تومور به علت افزایش جریان خون در هنگام تمرین ورزشی باشد. از طرفی پژوهش ها نشان دادند که در عروق تومور فشار برشی نسبت به عروق بافت طبیعی، کمتر است. مشخص شده‌است که،

پرخونی و فشار برشی زیاد و خلاف آن، جریان خون کم و فشار برشی اندک (شرایط عروق تومور) از طریق فعال کردن عوامل بیوشیمیایی و مکانیکی، منجر به تحریک آنژیوژنز می‌شود و در نتیجه هر دو انتهای مخالف دامنه فشار برشی، آنژیوژنز را فعال می‌کنند. فعال سازی کانال‌های حساس به کشش و کانال های کاتیونی در سلول-های اندوتلیال، در معرض فشار برشی اثبات شده‌است. اگرچه هنوز مکانیزمی که منجر به فعالسازی این کانال‌ها توسط فشار برشی می‌شود، ناشناخته‌است. (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اجرای فعالیت تناوبی خیلی شدید، بعنوان یک استراتژی غیرداروییِ"احتمالا"از طریق کاهش بیان SRF و افزایش بیان P53 روند آنژیوژنز بافت تومور را مختل و مانع از پیشرفت سرطان پستان می شود. در کل به نظر می رسد تمرین ورزشی ذکر شده می تواند راهکار مناسبی برای پیشگیری از پیشرفت سریع بافت تومور سرطان پستان و بهبود نسبی آن باشد، زیرا می تواند با کاهش و افزایش دو فاکتور بیان شده احتمالاروند پیشرفت حجم تومور را کُند و کمک به جلوگیری از متاستاز زود هنگام شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی با گرایش قلب- عروق و تنفس دانشگاه تهران پردیس بین المللی کیش می باشد، بدین وسیله از زحمات و حمایت های بی دریغ اساتید بزرگوار و دوستان محترمی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، سپاسگزارم.

منابع

1. Waks A, Winer E, 2019, Breast Cancer Treatment, JAMA,321(3), 288.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM , Ahmedin J, 2016, Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 25(1), 16-27.
3. Hanahan D, Weinberg RA, 2011, Hallmarks of cancer, the next generation, Cell, 144(5), 646-674.
4. Teodoro J, Evans S, Green M, 2007, Inhibition of tumor angiogenesis by p53, a new role for the guardian of the genome, Journal of Molecular Medicine. 85(11), 1175-1186.
5. Folkman J, 1971.Tumor angiogenesis, therapeutic implications, N Engl J Med, 285(21), 1182-1186.
6. Brown GC, Borutaite V, 2012. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells, Mitochondrion, 12(1), 1-4.
7. Chai J, 2011, Gastric ulcer healing - Role of serum response factor, In: Chai J, editor, Peptic Ulcer Disease, Rijeka, Croatia, InTech, p, 143-164.
8. Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T, 2001, Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia, Oncogene, 20(41), 5779-5788.
9. Yang Y, Li C-CH, Weissman AM, 2004, Regulating the p53 system through ubiquitination, Oncogene, 23(11), 2096-2106.
10. Kaluzova M, Kaluz S, Lerman M, Stanbridge E, 2004, DNA Damage Is a Prerequisite for p53-Mediated Proteasomal Degradation of HIF-1 in Hypoxic Cells and Downregulation of the Hypoxia Marker Carbonic Anhydrase IX, Molecular and Cellular Biology, 24(13), 5757-5766.
11. Chai J, Jones MK, Tarnawski AS, 2004, Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis, The FASEB Journal, 18(11),1264-1266.
12. Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K, 2009, The role of angiogenesis in solid tumours, an overview, Eur J Intern Med, 20(7), 663-671.
13. Hojman P, Gehl J, Christensen JF, Pedersen BK, 2017, Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment, Cell Metab .
14. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW, 2017, Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment, Nat Rev Cance, 17(10), 620-632.
15. Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, Kemp BE , Fullerton MD, Steinberg GR, 2015, High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity, Molecular metabolism, 4(12), 903-915.
16. Amani Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Kashani Khatib Z, Kazemi A, Saei MA, 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, IJBMS, 17(4), 231-236[Persion.]
17. Leung PS, Aronson WJ, Ngo TH, Golding LA, Barnard RJ, 2004, Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro, J Appl Physiol, 96(2), 450-454.

18. Miao Yu , King B, Ewert E , Xiaoyu Su , Mardiyati N, Zhao Z, Wang W, 2016, Exercise Activates p53 and Negatively Regulates IGF-1 Pathway in Epidermis within a Skin Cancer Model. PLoS One, 11(8), e0160939.
19. Higgins KA, Park D, Lee GY, Curran WJ, Deng X, 2014, Exercise-induced lung cancer regression: mechanistic findings from a mouse model, Cancer, 120(21), 3302-3310.
20. Asghari Rakabdarkolaee M, Barari A, Abdi A, K Hasrak K, 2018,The Effec of Eight-Week Concurrent Training on Aerobic Capacity and Serum Level of P53 Tumor Suppressor Protein in Prostate Cancer Patients: A Clinical Trial, JRUMS, 17 (8), 731-744 [Persion].
21. Shirvani H, Isanejad A, Rahimi M, Bazgir B , Alizadeh AM, 2018, Changes in monocarboxylate transporter 1 and P53 gene expression by aerobic interval training in the experimental colon carcinoma of mouse, JT UM, 76(5), 313-320 [Persion].
22. Moradpour p, Daryanoosh F, Dashtiyan A A, Taghi M, Jamhiri I, 2017, Impact of 6 weeks of intensiveintermittent training with taking vitamin E on P53 changes in blood serum levels and visceral adipose tissue in Sprague-Dawley rats, Sport Science, Vol,10 No,Suppl, 1 pp ,98-103[Persion].
23. Afzalpour ME, Tanideh N, Sepehrimanesh M, Dashtiyan AA, 2016,The effect of intense intermittent training with and without taking vitamin E on mRNA expression of p53/PTEN tumor suppressing genes in prostate glads of male rats, I J M R & H S, 5 (11), 521-528.
24. Dashtiyan AA , Afzalpour MA, Tanideh N, Sepehrimanesh M, The comparison of The effect of vitamin E on the expression of P53/PTEN of prodtate gland of male rats in two groups of intensive continuous and intermittent exercise training. JFUMS, 2017; 7(3), 406-415,[Persion].
25. Lin K, Hsu PP, Chen BP , Yuan S, Usami S, Shyy JY, Li YS, Chien S, 2000, Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress, PNASUSA, 97(17), 9385-9389.
26. Rudnicki M, Faine L A, Dehne N, Namgaladze D, Ferderbar S, Weinlich R, Amarante-Mendes G P, Yan CYI, Krieger JE, Brüne B, Abdalla D S P, 2011, Hypoxia inducible factor-dependent regulation of angiogenesis by nitro-fatty acids, Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology, 31(6), 1360-1367.
27. Salvado MD, Alfranca A, Haeggström JZ, Redondo JM, 2012, Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2, Trends Mol Med, 18(4), 233-243.
28. Martinou JC, Youle R J, 2011, Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics, Developmental Cell, 21(1), 92-101.
29. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW, 2017, Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment, Nat Rev Cancer, 17(10), 620-632 .
30. Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R, 2014, Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium, Microcirculation, 21(4), 290-300.

The effect of six weeks of high intense intermittent training on the expression of P53 and SRF angiogenesis factors in tumor tissue of female mice with breast cancer

Tooran Soleimani[1], Reza Nuri[1*], Abbasali Gaeini[2].

1 Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran Kish International Campus, Kish, Iran
2 Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

***Corresponding author**: nuri_r 7@ut.ac.ir

Abstract

Background and Purpose: Breast cancer causes death in women. Angiogenesis plays role in tumor development and metastasis. The effect of exercise on tumor tissue angiogenesis is not fully understood. Therefore, the aim of this study was to investigate the therapeutic effects of high intense intermittent exercise on the expression of angiogenesis factors, in breast cancer tumor tissue of laboratory mice.

Methodology: Sixteen C-balb mice were randomly divided into two groups of control (Sedentary-tumor) and high intense intermittent training-tumor (HIIT-Tumor). After getting acquainted with the laboratory environment, mice were hypodermically infused by tumor cells. After two weeks, exercise capacity test was performed on training group. Then, a six weeks exercise protocol, three sessions per week, with two minutes running and two minutes of rest, was performed. 48 hours after the last training session, the mice were anesthetized and the tumor tissues were isolated. Gene expression was analysed by Genex Software, version 6.1 (P≤0/01).

Results: This study showed that HIIT training decreased SRF by 5.27 times and increased P53 by 5.97 times in the training group, compared to the control group.

Conclusion: It seems that HIIT training, by decreasing SRF and increasing P53 can suppress the tumor and possibly prevent cancer progression.

Key words: Breast cancer, Angiogenesis, SRF, P53, HIIT