

## **Effects of 6 weeks' Endurance Training on Oncostatin-M in Muscle and Tumor Tissues in mice with Breast Cancer**

**Manzari Tavakoli Z:** Department of Physical Education, Islamic Azad University Kerman Branch, Kerman, Iran

**Amani Shalamzari S:** Department of Exercise Physiology, Physical Education Faculty, Kharzmi University, Tehran, Iran

**Kazemi A:** Department of Physical Education, Vali E Asr University, Rafsanjan, Iran

**Corresponding Author:** Sadegh Amani Shalamzari, Amani\_sadegh@khu.ac.ir

### **Abstract**

**Introduction:** Oncostatin-M (OSM) is a new myokine that released from contracting muscle and it can inhibit the growth of estrogen-dependent breast tumor. The aim of this study was to evaluate the effect of endurance training on OSM in muscle and tumor tissues in mice bearing breast cancer tumor.

**Methods:** After familiarization with the environment, breast cancer cells MC4-L2 were implanted to mice. They categorized into two groups, control (n=10) and training (n=10) groups. Training group performed progressive endurance training 5 day in a week for 6 weeks. Tumor volume, food intake and weight were measured weekly. Finally, the mice were sacrificed; tumor tissue was removed and immediately frozen and kept in  $-70^{\circ}\text{C}$ . Independent t-test and ANOVA with repeated measures were used to analyze the findings. Assay of OSM was performed by ELISA kit with code number csb- e04697m.

**Results:** Exercise training significantly decreased both the tumor volume and final weight of the tumor compared to non-exercising controls ( $p<0.05$ ). Also, exercising mice had greater, heart weight, and muscle weight than controls ( $p<0.05$ ). The results of T test show significant differences between the two groups of training and control in the OSM in the tumor ( $t=3.96$   $p=0.001$ ), in gastrocnemius muscle ( $t=13.4$ ,  $p=0.0001$ ), tumor weight ( $t=7.72$   $p=0.001$ ) and heart to body weight ratio ( $t= 4.54$   $p=0.001$ ).

**Conclusion:** According to reduction in tumor volume and tumor weight and change in OSM levels in the training group, it seems that this myokine has inhibitory effect on tumor growth. The result of heart to body weight ratio is indicative of the effectiveness of endurance training. So the moderate-intensity endurance exercise as an effective way is suggested to help treating estrogen receptor dependent breast cancer.

**Keywords:** Estrogen Receptor Dependent Breast Cancer, Endurance Training, Myokine.

فصلنامه بیماری‌های پستان ایران، سال نهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵: (۵۹ - ۵۰)

## اثر شش هفته تمرین استقامتی بر انکوستاتین-M بافت عضلانی و تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان

زهرا منظری توکلی: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی کرمان، ایران  
صادق امانی شلمزاری: گروه فیزیولوژی ورزش دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزش، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران  
عبدالرضا کاظمی: گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه ولی عصر، رفسنجان، ایران

### چکیده

**مقدمه:** انکوستاتین-M (OSM) مایوکاین جدیدی است که با انقباض عضلانی ترشح می‌شود و از رشد تومور پستان وابسته به استروژن بازدارندگی می‌کند. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات استقامتی بر پروتئین OSM در بافت تومور و بافت عضلانی موش‌های حامل سرطان پستان می‌باشد.

**روش بررسی:** پس از آشنا سازی با محیط، تومور سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن ناشی از سلول سرطانی MC4-L2 به ۱۶ سر موش بالغ سی پیوند زده شد و آنها به صورت تصادفی در دو گروه کنترل (۸ سر) و تمرین (۸ سر) قرار گرفتند. گروه تمرین به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هفته تمرینات استقامتی فزاینده را اجرا کردند. حجم تومور، غذای مصرفی و وزن موش‌ها به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. در پایان موش‌ها قربانی شدند، بافت تومور و بافت عضله دوقلو برداشته شد و در ازت مایع فریز و در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد. از آزمون t مستقل و آنوا با اندازه‌گیری مکرر برای تحلیل یافته‌های استفاده شد. سنجش OSM با استفاده از کیت الایزای با کد نامبر csb-e04697m صورت گرفت.

**یافته‌ها:** تمرین ورزشی موجب کاهش معنی‌داری در حجم تومور و وزن نهایی تومور گروه تجربی نسبت به گروه کنترل گردید ( $p=0/05$ ). همچنین، موش‌های تمرین کرده وزن قلب و عضله بیشتری داشتند ( $p=0/05$ ). نتایج آزمون T مستقل نیز اختلاف معنی‌دار بین دو گروه تمرین و کنترل را در میزان OSM درون تومور ( $t=3/96$ ،  $p=0/001$ )، درون عضله دوقلو ( $t=13/4$ ؛  $p=0/001$ )، وزن تومور ( $t=7/72$ ،  $p=0/001$ ) و نسبت قلب به وزن موش ( $t=4/54$ ،  $p=0/001$ ) نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به کاهش نسبت حجم تومور و وزن تومور و همچنین تغییرات OSM در گروه تمرین استقامتی به نظر می‌رسد این مایوکاین اثر بازدارنده در رشد تومور دارد. نسبت قلب به وزن موش‌ها حاکی از کارآمد بودن تمرینات استقامتی می‌باشد. لذا تمرینات استقامتی با شدت متوسط به عنوان روشی موثر برای کمک به درمان سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین استقامتی، سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن، مایوکاین.

## مقدمه

شواهد همه‌گیر شناسی ارتباط مثبتی بین فعالیت ورزشی و کاهش خطر سرطان پستان را گزارش کرده‌اند اما سازوکارها ناشناخته است (۱). به نظر می‌رسد سازوکارهای اثرات مثبت تمرینات ورزشی بر رشد سرطان پستان پیچیده و چند فاکتوری می‌باشد. شواهد جدید نشان می‌دهند یک یا چند ذره مترشح از عضلات فعال که مایوکاین نام دارند، اثرات بازدارنده فعالیت ورزشی بر تکثیر سلول سرطان پستان را میانجی‌گری می‌کنند و کاندید این اثر انکوستاتین-M (OSM) عضوی از سوپر خانواده اینترلوکین-6 (IL-6) می‌باشد (۲).

انکوستاتین-M یک گلیکوپروتئین ۲۲ کیلو دالتونی است (۳) که بوسیله مونوسیت‌های فعال شده، ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و سلول‌های عضلانی تولید می‌شود و التهاب، هماتوپوئز، رشد، تمایز و آنژیوژنز را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴). در سال‌های اخیر به نقش OSM در سرطان توجه ویژه شده است. تحقیقات نتایج ضد و نقیضی از نقش OSM در مهار یا رشد سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهند. به طوری که نشان داده شده OSM تکثیر تعدادی از رده‌های سلولی مشتق از تومورهای انسان از قبیل کارسینومای پستان، ملانوما و کارسینومای ریه را مهار می‌کند (۵). اما در پژوهش‌های اخیر، اثرات متضاد OSM نیز ذکر شده است به طوری که نقش OSM در افزایش تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی تخمدان و پروستات گزارش شده است (۶).

بلوک نمودن سیگنالینگ OSM با آنتی‌بادی ضد OSM القا فعالیت کاسپازی را تا ۵۱٪ در محیط کشت کاهش داد (۲). برای بررسی اینکه OSM یک مایوکاین است، بیان آن در در سایر بافت‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد بیان OSM در بافت چربی احشایی و زیر پوستی، کبد و طحال بدون تغییر ماند، در حالی که پس از شنا کردن در درشت نئی قدامی (۴ برابر)، دوقلو (۲ برابر و نعلی (۲ برابر) گردید. همچنین سطوح انکوستاتین سرمی تنها پس از فعالیت ورزشی افزایش چشمگیری داشت. لذا آنها نتیجه گرفتند OSM مایوکاینی است که اثر بازدارنده بر توسعه سرطان دارد (۲).

در رابطه با سرطان پستان گزارش شده OSM می‌تواند گیرنده استروژن آلفا را سرکوب کند و رشد چندین رده سلولی سرطان پستان از جمله MCF-7، MDA-

MB231 و H3922 را مهار کند (۷). گیرنده انکوستاتین همان گیرنده عمومی IL-6 یعنی gp130 است، لذا آبشار سیگنالی همانند IL-6 دارد و موجب فعال شده STAT3 و PI3K می‌شود (۸). فعال شدن STAT3 با القای آپوپتوز در تومور همراه است و از این رو از رشد تومور جلوگیری می‌کند (۹).

علاوه بر شواهدی که در رابطه با تاثیر روانی تمرینات ورزشی روی بیماران سرطان وجود دارد، امروزه در کشورهای در حال توسعه به تمرینات بدنی با رویکرد درمانی نگاه می‌کنند و محققان از آن به عنوان روش ساده و کم هزینه برای پیشگیری و بهبود بیماری‌های التهابی مزمن یاد می‌کنند فعالیت بدنی یک مداخله بی‌خطر در بهبود کیفیت زندگی افراد مبتلا به سرطان پذیرفته شده است. استفاده از مدل‌های حیوانی برای فهم مکانیزم‌های مرتبط با فعالیت بدنی و سرطان مهم هستند زیرا مطالعات اپیدمیولوژیکی که روی نمونه‌های انسانی صورت می‌گیرد، اطلاعات جزئی در مورد آغاز، پیشرفت یا بهبود سرطان در ارتباط با ورزش را به ما نمی‌دهد. داده‌های جدید کاهش حجم تومور به دنبال فعالیت منظم ورزشی را گزارش کرده‌اند (۱۰-۱۲) خوری و همکاران (۲۰۱۵) و عیسی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۶) کاهش حجم تومور به دنبال انجام ۶ هفته تمرینات اینتروال را به تعدیل وضعیت آپوپتوزی درون تومور به ویژه ریز RNAs و همین‌طور تغییر در بیان گیرنده استروژن به سبب افزایش بیان miR-206 نسبت دادند (۱۱، ۱۳). MiR-206 یکی از ذراتی است که عمدتاً از عضله ترشح می‌شود و نقش سرکوب‌کنندگی گیرنده استروژن را دارد و از این رو در بازداری از رشد سلول‌های سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن نقش دارد. لذا به نظر می‌رسد ذرات رها شده از عضله در بازداری از رشد تومور نقش داشته باشند.

فعالیت منظم به طور معکوسی با مرگ و میر بدنبال تشخیص سرطان پستان رابطه دارد، با این وجود، مکانیزم‌های مولکولی این تعامل بخوبی تشریح نشده است. با توجه به اینکه فعالیت بدنی منظم موجب ترشح مایوکاین‌ها و به ویژه OSM از عضلات فعال می‌گردد و با توجه به تاثیر این مایوکاین در مهار رشد سلول‌های سرطانی در محیط کشت و عدم وجود تحقیق کافی که اثرات تمرینات هوازی را بر سطوح این مایوکاین در بافت عضلانی و بافت توموری سنجیده باشد، این سوال در ذهن

موش‌ها تزریق گردید و پس از ۱۰ روز پروتکل تمرین آغاز شد.

**پروتکل تمرین:** در ابتدا موش‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه استراحت-تومور یا گروه کنترل (CT) شامل ۱۰ سر موش بود که هیچ‌گونه فعالیتی و تداخلی تا زمان قربانی کردن حیوان انجام نمی‌دادند و گروه تومور-ورزش یا گروه تمرین (ET) که به مدت ۶ هفته، ۵ روز در هفته و با شدت متوسط تمرینات استقامتی را انجام می‌دادند. به موش‌ها جهت انجام تمرین هیچ‌گونه شوک الکتریکی وارد نشد. با تحریک دم موش‌ها یا ضربه به بالای قفسه ترمایل موش‌های برای دوییدن تحریک می‌شدند. در انتهای هفته آشنا سازی آزمون تعیین توان هوازی بیشینه موش‌ها به عمل آمد (۱۴). این آزمون بدین صورت بود که بعد از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰-۱۲ متر بر دقیقه، سرعت نوار گردان هر سه دقیقه یک بار از سرعت ۱۲ متر بر دقیقه افزایش یافت، حداکثر سرعت بیشینه زمانی محاسبه گردید که موش‌ها قادر نبودند در آن سرعت بدونند (۱۵)، سرعت بیشینه به دست آمده برابر با  $1/5 \pm 33$  متر بر دقیقه بود. سپس تمرینات با ۵۵٪ توان هوازی شروع و تا ۷۰٪ ادامه پیدا کرد. پروتکل تمرین بدین صورت اجر شد: دو هفته اول تمرین به مدت ۵۰ دقیقه با شدت ۵۵٪ توان هوازی بیشینه (سرعت ۱۸ متر بر دقیقه)، ۲ هفته دوم به مدت ۶۰ دقیقه با شدت ۶۵٪ توان هوازی بیشینه (۲۰ متر بر دقیقه) و ۲ هفته آخر به مدت ۷۰ دقیقه با شدت ۷۰٪ توان هوازی بیشینه (۲۲ متر بر دقیقه). شدت تمرین در نظر گرفته شده معادل ۵۵-۷۰ درصد توان هوازی موش‌ها بود، زیرا در پژوهش آلمیدا و همکاران (۲۰۰۹) بر روی موش‌های مبتلا به سرطان پستان نشان داده شد که شدت متوسط ۵۰٪ باعث کاهش حجم تومور می‌شود و شدت‌های بالاتر از ۸۰٪ با افزایش حجم تومور همراه بود (۱۶).

**اندازه‌گیری حجم تومور و وزن تومور و غذای مصرفی:** همه حیوانات در ابتدا و به صورت هفتگی با استفاده از ترازو وزن شدند. حجم تومور در ۲ بعد اندازه‌گیری شد. بزرگترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور در نظر گرفته شد و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. پس از پیدایش تومور، هر هفته یک بار طول و عرض تومور توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد و یا استفاده از فرمول محاسباتی

محقق تداعی شد که آیا تمرینات هوازی می‌تواند سطوح OSM در بافت تومور و همین طور بافت عضلانی را تغییر دهد؟

## مواد و روش‌ها

**کشت سلول:** کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (ER+) MC4-L2 از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری شد. سلول‌های MC4-L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی سلین  $100 \mu\text{g/ml}$ ، استراتپوتامیسن  $100 \mu\text{g/ml}$  و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. پس از پرکردن ۹۰٪ سطح فلاسک بوسیله سلول‌ها، مایع رویی برداشته شده و پس از شستشو با PBS، در مرحله بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵٪ از کف پلیت سلول‌ها جدا شده و پس از خنثی‌سازی آنزیم با محیط حاوی ۱۰٪ FBS، کلیه محتویات فلاسک را داخل لوله فالكون ریخته و آن را در دور ۱۲۰۰ به مدت ۳-۵ دقیقه سانتیفریوژ کرده، در مرحله بعد مایع روئی را برداشته و پلاک سلولی را در داخل محیط حاوی ۱۰٪ FBS حل می‌نماییم. سپس برای تعیین زنده مانده و شمارش سلولی به ترتیب از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد. برای القای تومور، پس از کشت سلول و شمارش آن، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه گردید. موش‌ها در ابتدا با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلوزین که به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد بی‌هوش شدند و سپس یک میلیون سلول به صورت زیر جلدی به ناحیه بالای ران سمت راست تزریق گردید. در حدود دو هفته پس از تزریق سلول‌های سرطانی، تومور در ناحیه تزریق شده قابل لمس می‌باشد.

**آزمودنی‌ها:** پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام می‌شود. تعداد ۲۰ سر موش ماده Balb/c ۶ تا ۸ هفته‌ای با وزن ۱۵-۱۴ گرم از انیستیتو پاستور خریداری شد و به اتاق حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. دوره ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی برای تطابق فیزیولوژیک موش‌ها رعایت گردید. همچنین، دمای اتاق بین درجه ۲۲-۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۵٪ حفظ شد. پس از یک هفته آشناسازی با محیط و تمرین بر روی نوار گردان، سلول‌های سرطانی به

صورت هفتگی اندازه‌گیری شد و نتایج آن در نمودار ۱ ارایه شده است.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود اختلافی بین دو گروه در وزن بدن دیده نمی‌شود، در واقع نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر عدم اختلاف بین دو گروه را در وزن بدن موش‌ها ( $F=1/92$ ,  $p=0/72$ ) و حجم غذای مصرفی ( $F=1/45$ ,  $p=0/83$ ) نشان داد. در انتهای پروتکل تحقیق، وزن تومور و وزن قلب بلافاصله با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و نتایج آن در جدول ۱ نمایش داده شده است. نتایج آزمون  $t$  مستقل حاکی از اختلاف معنی‌دار دو گروه تجربی و کنترل در وزن تومور ( $p=0/001$ ) و وزن قلب ( $p=0/001$ ) می‌باشد. از شاخص نسبت وزن قلب به وزن بدن برای کارایی تمرین استفاده شد. نتایج آزمون  $t$  مستقل نیز حاکی از اختلاف معنی‌دار دو گروه تجربی و کنترل در نسبت قلب به وزن موش ( $t=4/54$ ,  $p=0/001$ ) می‌باشد.

**حجم تومور:** حجم تومور با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و نتایج در نمودار ۲ ترسیم شده است. روند کاهش رشد تومور در گروه تجربی کاملاً نمایان می‌باشد. نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر حاکی از اختلاف معنی‌دار بین دو گروه می‌باشد ( $F=48/5$ ,  $p=0/001$ ). روند اختلاف از هفته سوم به بعد نمایان می‌گردد. در این زمان شیب رشد تومور در گروه کنترل روند سریع‌تری پیدا کرده است، در حالی که در گروه تجربی با شیب کندتری افزایش می‌یابد.

**سطوح انکوستاتین-M:** سطوح OSM در بافت عضله دوقلو و تومور با استفاده از روش الیزا اندازه‌گیری شد و نتایج آن در نمودار ۳ ارایه شده است. نتایج آزمون  $t$  مستقل حاکی از اختلاف معنی‌دار سطوح OSM در هر دو بافت عضله دوقلو ( $t=13/4$ ;  $p=0/001$ ) و بافت تومور ( $t=3/96$ ,  $p=0/001$ ) بین دو گروه تجربی و کنترل می‌باشد.

**ارتباط انکوستاتین-M با نسبت رشد تومور:** نسبت رشد تومور با تقسیم نمودن حجم تومور هفته آخر بر هفته اول به دست می‌آید. ضریب همبستگی پیرسون بین نسبت رشد تومور با سطوح OSM در بافت تومور  $r=-0/709$  ( $p=0/002$ ) و در بافت عضله دوقلو  $r=-0/603$  ( $p=0/013$ ) به دست آمد. بنابراین، محرز است که ارتباط منفی بین سطوح OSM با رشد تومور وجود دارد.

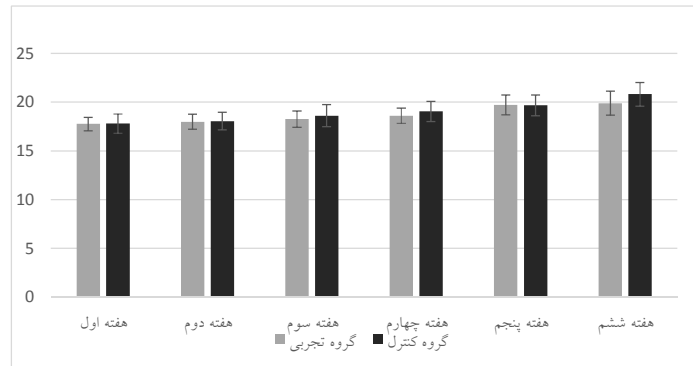
حجم تومور  $V = \pi/6 \times (w \times L^2)$  میزان آن تعیین شد (۱۷). با استفاده از کتامین و زایلوزین موش‌های بی‌هوش شد. پس از کشتار موش‌ها، بلافاصله بافت تومور برداشته شد و وزن آن با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. تغذیه حیوانات با استفاده از غذای طبیعی موش صورت گرفت. میزان غذای حیوانات در دو گروه اندازه‌گیری می‌شد. به این ترتیب که غذایی که در اوایل هفته به قفس موش‌ها ریخته می‌شد ابتدا وزن می‌شد و در روز تعویض نیز دوباره اندازه‌گیری می‌شد و میزان غذای مصرفی دو گروه ثبت می‌شد.

**اندازه‌گیری وزن قلب و عضله دوقلو:** پس از کشتار موش‌ها، بلافاصله قلب و عضله دوقلو برداشته شد و وزن آنها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. وزن قلب بلافاصله پس از خروج خون باقی‌مانده در آن اندازه‌گیری شد. نسبت وزن قلب به وزن بدن به عنوان شاخص کارایی تمرین در نظر گرفته می‌شود (۱۶). نسبت وزن قلب به وزن بدن موش‌ها با تقسیم وزن قلب بر وزن بدن محاسبه گردید.

**اندازه‌گیری انکوستاتین-M:** پس از قربانی نمودن موش‌ها، بلافاصله بافت تومور و بافت عضله دوقلو برداشته شد و در نیتروژن مایع فریز گردید و در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. در آزمایشگاه، میزان  $100$  میلی‌گرم بافت در ظرف هموژنایزر حاوی محلول لیزات قرار داده شدند تا بافت کاملاً خرد شده و سپس سوسپانسیون رویی در میکروتیوب جدید منتقل شد و با سانتریفیوژ ( $10$  دقیقه،  $g$   $1500$  و  $4$  درجه سلسیوس) قطعات بزرگ رسوب کردند و از سوپرناتانت رویی برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها به روش برادفورد استفاده گردید. محلول لیزات حاوی  $\text{KCl}$ ،  $\text{NaCl}$ ،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و  $\text{PMSF}$  بود که در  $950$  ml آب مقطر دیونیزه حل کرده و پس از تنظیم pH ( $7/7-2/4$ ) با سود یا اسید کلریدریک  $1$  نرمال، محلول به حجم یک لیتر رسانده می‌شود. سنجش OSM با استفاده از کیت الایزای با کدنامبر  $\text{csb-e04697m}$  صورت گرفت.

## یافته‌ها

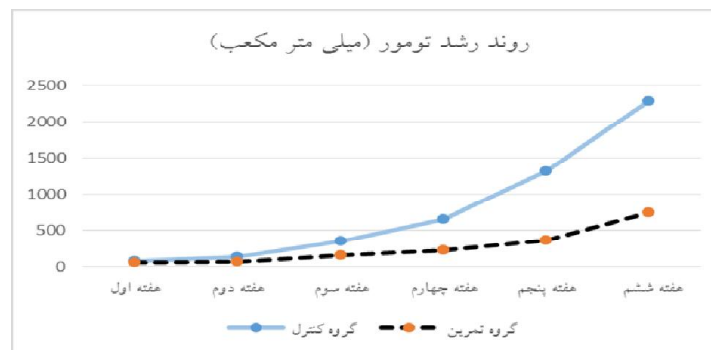
غذای مصرفی، وزن موش، وزن قلب، وزن تومور و نسبت وزن قلب به وزن بدن: وزن بدن موش‌ها به



نمودار ۱: وزن موش‌های دو گروه طی اجرای پروتکل تحقیق (گرم)

جدول ۱: وزن قلب، وزن عضله دوقلو و تومور موش‌ها بلافاصله پس از کشتار (میلی‌گرم)

وزن قلب	وزن عضله دوقلو	وزن تومور	
$0.125 \pm 0.015^*$	$0.068 \pm 0.005^*$	$1.12 \pm 0.35^*$	گروه تجربی
$0.087 \pm 0.005$	$0.035 \pm 0.009$	$2.85 \pm 0.55$	گروه کنترل
$p=0.001$ $t=6/43$	$p=0.001$ $t=6/32$	$p=0.001$ $t=7/72$	نتایج آزمون t مستقل

\*اختلاف معنی‌دار دو گروه در سطح  $p=0.05$ 

نمودار ۲: روند رشد تومور در دو گروه



نمودار ۳: سطوح انکوستاتین-M بافت تومور و عضله دوقلو

\* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

مثبتی بین OSM در بافت عضله و بافت تومور مشاهده شد ( $r=0.792$ ،  $p=0.001$ ).

ارتباط منفی نیز بین وزن تومور با سطوح OSM در بافت تومور ( $r=-0.76$ ،  $p=0.001$ ) و در بافت عضله دوقلو ( $r=-0.879$ ،  $p=0.001$ ) به دست آمد. ارتباط مستقیمی و

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد پس از ۶ هفته تمرینات استقامتی روند رشد تومور در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کندتر می‌گردد و این روند کاهش یافته رشد تومور با افزایش سطوح OSM در بافت عضله دوقلو و بافت تومور همسو می‌باشد ( $p=0/001$ ). با توجه به ارتباط معکوسی که بین حجم تومور و مقادیر OSM مشاهده شد، این یافته‌ها اثرات ضد توموری OSM را تایید می‌کنند. نسبت وزن قلب به وزن بدن موش‌ها حاکی از تاثیردار بودن تمرینات استقامتی اجرا شده می‌باشد و لذا تغییرات ایجاد شده قابل استناد به تمرینات استقامتی می‌باشند.

نسبت وزن قلب به وزن بدن موش‌ها که شاخص کارایی تمرین است (۱۶) در گروه تمرین اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت. در واقع تمرین استقامتی با شدت متوسط توانسته اثرات خود را بر ساختارهای تمرین پذیر مانند قلب بگذارد و می‌توان گفت تمرین استقامتی با شدت متوسط در موش‌های حامل تومور موثر بوده است و تغییرات ایجاد شده در سطوح OSM در بافت تومور و بافت عضلانی و همین‌طور تغییر در وزن بدن قابل استناد به تمرین استقامتی می‌باشند. یکی از سازگاری‌های مهم تمرین استقامتی، هایپرتروفی برون‌گرای قلب می‌باشد. از آنجا که وزن قلب در اوایل دوره اندازه‌گیری نشده است و تنها در پایان اجرای پروتکل بعد از کشتار اندازه‌گیری شده است، می‌توان بیان داشت که یا تمرین موجب هایپرتروفی برون‌گرای قلب شده و یا حداقل از آتروفی آن جلوگیری کرده است، چیزی که در گروه کنترل مخالف آن رخ داده است.

در سال‌های اخیر برخی تحقیقات کاهش حجم تومور را بدنبال اجرای فعالیت ورزشی منظم گزارش کرده‌اند (۱۸-۲۰). در پژوهش حاضر مشاهده شده ۶ هفته تمرین استقامتی فزاینده موجب کند شدن رشد تومور در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل گردید که با توجه به رابطه متضاد OSM با حجم تومور، آن را به افزایش تولید مایوکاین OSM نسبت می‌دهیم. در حقیقت، از هفته سوم تمرین روند کند رشد تومور در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل مشهود می‌باشد و از این هفته تا هفته ششم اختلاف حجم تومور بین دو گروه مشهود می‌باشد. ریز محیط تومور حاوی سلول‌های مختلفی می‌باشد که در

رشد تومور نقش دارند. این سلول‌ها با تولید فاکتورها و پپتیدهای رشدی و رگ‌زایی موجبات رشد و گسترش تومور را فراهم می‌آورند (۲۱). پژوهش‌هایی که تاکنون صورت گرفته است نتایج متناقضی داشته‌اند، بیشتر پژوهش‌های اخیر کاهش حجم تومور را گزارش کرده‌اند. مورفی و همکاران (۲۰۱۱) کاهش حجم تومور را پس از ۲۰ هفته تمرین در موش‌های سرطانی گزارش کردند. آنها گزارش کردند در هفته‌های ۱۸ الی ۲۰ پروتکل تمرین میزان رشد تومور منفی شده بود. آنها سطوح سرمی IL-6 و MCP-1 را سنجیدند و کاهش حجم تومور را به افت عوامل التهابی سرمی نسبت دادند. در تحقیقات داخل کشور نیز کاهش حجم تومور با تمرینات استقامتی با شدت متوسط به مدت ۶ هفته گزارش شده است (۲۲-۲۴). این تحقیقات کاهش حجم تومور را به افت چگالی سایتوکاین‌های مغذی رشد تومور در بافت تومور (۲۳)، به افت mir-155 و ژن‌های التهابی پایین دست التهابی (۲۵)، به ترشح mir-206 از عضله و سرکوبی مسیر گیرنده استروژن (۱۱، ۲۴) و به افزایش بیان mir-21 و ژن‌های درگیر در آپوپتوز سلولی (۱۳) نسبت داده‌اند. در پژوهش حاضر نیز ما کاهش حجم تومور را مشاهده کردیم و آن را به تولید مایوکاین OSM نسبت دادیم. در پژوهش حاضر افزایش سطوح OSM در بافت عضله و تومور در پی انجام تمرینات استقامتی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که با توجه به ارتباط معکوسی که بین حجم تومور و مقادیر OSM مشاهده شد، این یافته‌ها اثرات ضد توموری OSM را تایید می‌کند. در تایید این یافته‌ها تحقیقات دیگر نشان داده‌اند درمان با OSM موجب مهار رشد سلول‌های چندین تومور جامد از جمله سرطان پستان و گلیوما گردید (۴). اسپنس<sup>۱</sup> و همکارانش (۲۰۰۰) نیز دریافتند که OSM تکثیر سلول‌های H3922، یک رده سلولی سرطان پستان مشتق از کارسینومای مجرای را کاهش می‌دهد (۲۶). در پژوهش دیگری، چن و همکارانش (۲۰۰۶) ثابت کردند که OSM تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند (۲۷). هرچند برخلاف این پژوهشگران، برخی دیگر نشان داده‌اند که القای OSM باعث افزایش پتانسیل متاستاتیک سلول‌های کارسینومای پستان در انسان می‌گردد (۲۸).

<sup>1</sup> Spence

در پژوهشی دیگر هوجمان و همکاران (۲۰۱۱) سلول‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژن MCF7 را در سرم تمرین کرده انسان انکوبه کردند و مشاهده کردند که رشد تومور متوقف گردید (۲). با توجه به اینکه بر اساس این مطالعه مشخص شد که OSM یک مایوکاین است و با انقباض عضلانی افزایش می‌یابد، افزایش تولید OSM در بافت عضله دوقلو پذیرفتنی است که مقادیر آن وارد سرم شده و از طریق خون به بافت تومور منتقل می‌شود و موجبات کند شدن رشد تومور را فراهم می‌آورد.

در مجموع، به نظر می‌رسد انجام تمرینات ورزشی اثرات کمک درمانی در روند درمان سرطان‌های پستان وابسته به گیرنده استروژن را دارد. سازوکار انجام این کار نیاز به تحقیقات زیادی دارد اما نتایج این تحقیق نیز تنظیم افزایشی OSM به عنوان یک مایوکاین مترشح از عضله را به عنوان یک راهکار درمانی در مهار سرطان وابسته به گیرنده استروژن را پیشنهاد می‌دهد.

OSM مایوکاینی است که منشا اصلی آن بافت عضلانی است و به هنگام انقباض عضلانی تولید آن افزایش می‌یابد. OSM با اتصال به گیرنده‌اش و فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی زیر دست موجب کاهش رشد تومور می‌گردد. برخی پژوهشگران بازاری از رشد تومور را به نقش انکوستانین در تنظیم افزایش بازدارنده‌های متالوپروتئازها نسبت داده‌اند. اویانگ (Ouyang) و همکارانش (۲۰۰۶) عنوان کردند که OSM می‌تواند رشد چندین رده سلولی را مهار کند. OSM باعث تنظیم افزایشی بازدارنده بافتی متالوپروتئیناز-۱ (Tissue Inhibitor of -TIMP-1 Metalloproteinases) می‌شود.

از آنجایی که تعادل متالوپروتئینازها (MMPs) و بازدارنده متالوپروتئازها مترشح از سلول‌های تومور برای تخریب کلاژن طی فرآیند متاستاز سلول‌های تومور ضروری است، بنابراین عنوان شده است که OSM می‌تواند متاستاز سرطان را مهار کند (۲۹).

## References

1. Tehard B, Friedenreich CM, Oppert J-M, Clavel-Chapelon F. Effect of physical activity on women at increased risk of breast cancer: results from the E3N cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2006;15(1):57-64.
2. Hojman P, Dethlefsen C, Brandt C, Hansen J, Pedersen L, Pedersen BK. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2011; 301(3):E504-E10.
3. Liu J, Spence MJ, Zhang YL, Jiang Y, Liu YE, Shi YE. Transcriptional suppression of synuclein  $\gamma$  (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast cancer research and treatment* 2000; 62(2): 99-107.
4. Lee MJ, Heo SC, Shin SH, Kwon YW, Do EK, Suh D-S, et al. Oncostatin M promotes mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth through a paracrine mechanism involving periostin and TGFBI. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013; 45(8): 1869-77.
5. Li Q, Zhu J, Sun F, Liu L, Liu X, Yue Y. Oncostatin M promotes proliferation of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3. *International journal of molecular medicine* 2011; 28(1):101.
6. Bolin C, Tawara K, Sutherland C, Redshaw J, Aranda P, Moselhy J, et al. Oncostatin m promotes mammary tumor metastasis to bone and osteolytic bone degradation. *Genes & cancer* 2012; 3(2): 117-30.
7. Li C, Ahlborn TE, Tokita K, Boxer LM, Noda A, Liu J. The critical role of the PE21 element in oncostatin M-mediated transcriptional repression of the p53 tumor suppressor gene in breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(57).
8. Heinrich PC, Behrmann I, Serge H, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type

- cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*. 2003;374(1):1-20.
۹. کاظمی عبدالرضا، آقاعلی‌نژاد حمید، علیزاده شعبان، شهبازی شیرین امانی شلمزاری صادق، مهدیان رضا. اثر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان miR-155. STAT3 و میزان پروتئین IL-6 توموری موش‌های مبتلا به سرطان پستان. *مجله علوم پزشکی کرمان* ۱۳۹۳؛ ۲۲(۱): ۴۲-۵۲.
10. Kelly SA, Zhao L, Jung K-C, Hua K, Threadgill DW, Kim Y, et al. Prevention of tumorigenesis in mice by exercise is dependent on strain background and timing relative to carcinogen exposure. *Scientific Reports* 2017; 7:43086.
11. Isanejad A, Alizadeh AM, Shalamzari SA, Khodayari H, Khodayari S, Khorri V, et al. Micro RNA-206, let-7a and micro RNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life sciences* 2016; 151:30-40.
12. Goh J, Tsai J, Bammler TK, Farin FM, Endicott E, Ladiges WC. Exercise training in transgenic mice is associated with attenuation of early breast cancer growth in a dose-dependent manner. *PLoS One* 2013; 8(11): e80123.
13. Khorri V, Shalamzari SA, Isanejad A, Alizadeh AM, Alizadeh S, Khodayari S, et al. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. *European journal of pharmacology* 2015; 765: 179-87.
14. Hayes J, Chappell M. Individual consistency of maximal oxygen consumption in deer mice. *Functional Ecology* 1990; 495-503.
15. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2007; 14(6):753-60.
16. Almeida PWM, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CEM, Dias-Peixoto MF, Russo RC, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. *Journal of Applied Physiology*. 2009; 261 (1):100-107
17. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology* 2010; 108(2): 343-8.
18. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. *Cytokine* 2011; 55(2): 274-9.
19. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96(6):2249-56.
20. Shamsi MM, Chekachak S, Soudi S, Quinn L, Rangbar K, Chenari J, et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine* 2017; 90:100-8.
21. Balkwill FR, Mantovani A, editors. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology* 2012; Elsevier.
۲۲. امانی شلمزاری صادق، آقا علی‌نژاد حمید، علیزاده شعبان، کاظمی عبدالرضا، ساعی محمد امین و همکاران. اثر تمرینات استقامتی بر سطوح سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶ و فاکتور رشد اپی تلیال عروق بافتی موش‌های مبتلا به سرطان پستان. *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد* ۲۰۱۴؛ ۱۶(۲): ۱۰-۲۱.
۲۳. آقاعلی نژاد حمید، ساعی محمد امین، مهدوی مهدی، امانی شلمزاری صادق، کاظمی عبدالرضا، پیرایش مرجان. تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر سطوح برخی سایتوکاین‌های ریزمحیط تومور در موش‌های ماده مبتلا به تومور پستان. *نشریه علوم زیستی ورزشی* ۲۰۱۵؛ ۴(۴): ۴۸۳-۹۶.
۲۴. میرآخوری زهرا، کردی محمدرضا، علیزاده شعبان، گایینی عباسعی، و همکاران. بررسی اثر پیشگیرانه و کمک درمانی تمرین هوازی بر نسبت رشد تومور، E2 و بیان miR-206 و ER $\alpha$  بافت تومور سرطان پستان.

پژوهشنامه فیزیولوژی ورزشی کاربردی ۲۰۱۶؛  
۹۸-۸۷:(۲۲)۱۱

25. Aghaalienejad H. The Effect of endurance training on mir155 expression and SOCS1 gene expression of tumor in female Mice with Breast Cancer. *Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases* 2014; 6(4):7-14.
26. Spence MJ, Vestal RE, Ma Y, Streiff R, Liu J. Oncostatin M suppresses EGF-mediated protein tyrosine phosphorylation in breast cancer cells. *Cytokine* 2000; 12(7):922-33.
27. Chen SH, Gillespie GY, Benveniste EN. Divergent effects of oncostatin M on astroglia cells: influence on cell proliferation, invasion, and expression of matrix metalloproteinases. *Glia* 2006; 53(2):191-200.
28. Jorcyk CL, Holzer RG, Ryan RE. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 2006; 33(6):323-36.
29. Ouyang L, SHEN Ly, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomedical Research* 2006; 27(4):197-202.