

## **Intratumoral Effects of Continuous Endurance Training and High Intensity Interval Training on Genes Expression of miR-21 and bcl-2 in Breast Cancer Bearing Female mice**

**Delphan M:** Exercise Physiology (Exercise Immunology), Department of Physical Education and Sport Sciences, Humanities Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Agha Alinejad H:** Exercise Physiology (Exercise Immunology), Department of Physical Education and Sport Sciences, Humanities Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Delfan M:** Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

**Dehghan S:** Department of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Hamid Agha Alinejad, Halinejad@modares.ac.ir

### **Abstract**

**Introduction:** Apoptosis and tumor growth are inhibited by intratumoral miR-21 via upregulation of bcl-2. Hence, the aim of the present study was determine the effects of continuous endurance training (ET) and high intensity interval training (HIIT) on intratumoral miR-21 and bcl-2 of breast cancer bearing female mice.

**Methods:** Eighteen female BALB/c mice after inducing breast cancer through MC4-L2 cell lines injection were randomly divided into three groups (n=6) including control, continuous endurance training (ET) and high intensity interval training (HIIT). Then, both experimental groups including ET (75 min/day, constant running speed corresponding to 60–65%) and HIIT (six intervals for 3 min and 20 seconds, 85-90%  $\dot{V}O_2$  peak, 90 second of active rest at 30-35%  $\dot{V}O_2$  peak separating intervals) performed exercise protocols at 15% inclination, five days a week for ten weeks. Tumor volume was measured and recorded by caliper every week. miR-21 and bcl-2 gene expression were determined by qReal-time PCR. Statistic data values also were measured by One-way ANOVA.

**Results:** The results of the present study showed that miR-21 gene expression was significantly reduced in both experimental groups compared to control group ( $p \leq 0.001$ ). While, bcl-2 gene expression had no significant change in comparison with control group ( $p \geq 0.05$ ). There was also observed a significant reduction in tumor volume of two experimental groups in comparison with control group. It should be noted that tumor volume reduction in HIIT was larger than ET.

**Conclusion:** HIIT is possibly more effective than ET in attenuating cancer cells progression via its intratumoral effects.

**Keywords:** High Intensity Interval Training, Continuous Endurance Training, miR-21, bcl-2, Breast Cancer.

## تأثیر اینتراتوموری تمرین استقامتی مداومی و تمرین پرشدت تناوبی بر بیان ژن‌های mir-21 و bcl2 در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

محمود دلفان: فیزیولوژی ورزش (ایمنولوژی ورزش)، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران  
حمید آقاعلی‌نژاد\*: فیزیولوژی ورزش (ایمنولوژی ورزش)، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران  
مریم دلفان: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران  
صدیقه دهقان: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد مرکز، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و رشد تومور بوسیله فرانتظیمی bcl-2 توسط miR-21 در بافت تومور مهار می‌شود. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر تعیین اثرات تمرینات استقامتی مداومی (ET) و پرشدت تناوبی (HIIT) بر بیان اینتراتوموری miR-21 و bcl2 در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود.

**روش بررسی:** ۱۸ سر موش ماده نژاد بلب سی پس از القاء سرطان به‌وسیله تزریق رده سلولی MC4-L2، به شکل تصادفی در سه گروه کنترل، تمرین استقامتی مداومی (ET) و تمرین تناوبی شدید (HIIT) تقسیم شدند. سپس دو گروه تجربی شامل گروه ET (۷۵ دقیقه در هر روز، دویدن با سرعت ثابت ۶۰٪ تا ۶۵٪ VO<sub>2</sub>peak) و گروه HIIT (شش تناوب ۳ دقیقه و ۲۰ ثانیه‌ای، ۸۵٪ تا ۹۰٪ VO<sub>2</sub>peak، و ۹۰ ثانیه استراحت فعال در بین هر تناوب با شدت ۳۰٪ تا ۳۵٪ VO<sub>2</sub>peak) تمرینات ورزشی را در شیب ۱۵٪ به صورت پنج روز در هفته و به مدت ده هفته اجرا کردند.

حجم تومور به صورت هفتگی توسط کالیپر اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. بیان ژن‌های miR-21 و bcl-2 به‌وسیله تکنیک qReal time - PCR تعیین شد. داده‌ها نیز با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن miR-21 در دو گروه تجربی به شکل معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0.001$ ). با این وجود اختلاف معناداری در بیان ژن bcl-2 در دو گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ( $p \geq 0.05$ ). همچنین کاهش معنادار حجم تومور در هر دو گروه تجربی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. لازم به ذکر است که کاهش حجم تومور در گروه تناوبی پر شدت بیشتر از گروه تمرین استقامتی مداومی بود.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً تمرینات تناوبی پرشدت در کند کردن سرعت رشد سلول‌های سرطان پستان از طریق تاثیرات اینتراتوموری، سودمندتر از تمرین استقامتی مداومی است.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی پرشدت، تمرین استقامتی مداومی، سرطان پستان، miR-21، bcl-2.

\* نشانی نویسنده مسئول دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه فیزیولوژی ورزش، حمید آقاعلی‌نژاد.

نشانی الکترونیک: Halinejad@modares.ac.ir

## مقدمه

سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان و یکی از عوامل کلیدی مرگ و میر در زنان به شمار می‌رود، از هر سه زن، یک نفر در طول زندگی مبتلا به سرطان پستان می‌شود. خوشبختانه نرخ مرگ و میر این نوع سرطان در ۵ سال اخیر نه تنها کاهش یافته بلکه نرخ نسبی بقاء زنان مبتلا به این نوع سرطان بین ۷۷٪ تا ۹۹٪ افزایش یافته است (۱). با این حال، نرخ شیوع این نوع سرطان در این مدت ثابت مانده است (۱).

miR-21 به عنوان یک عامل ریز محیط مهم به هنگام رشد تومور پستان به شکل چشمگیری فراتنظیم و بیش بیان می‌شود و عواملی را مورد هدف قرار می‌دهد که القاگر رشد و توسعه تومور می‌باشند (۲). این ریز RNA به عنوان یک آنکوژن، از عوامل کلیدی مهار آپوپتوز و در نتیجه رشد بی‌رویه تومور است. Bcl2 به عنوان یکی از ژن‌های هدف miR-21 درگیر در آپوپتوز به شمار می‌رود که بیش بیانی آن باعث افزایش رشد و توسعه سرطان می‌شود (۲، ۳).

عوامل متعددی برای کاهش نرخ ابتلا به سرطان و یا کاهش رشد و توسعه آن به عنوان استراتژی پیشگیری و یا مکمل درمانی در این نوع بیماری پیشنهاد شده است (۴). از بارزترین این عوامل، رژیم غذایی و تعادل انرژی به واسطه فعالیت بدنی (نسبت انرژی مصرفی به انرژی دریافتی در طول فعالیت روزانه بدنی) در بدن است. فعالیت بدنی منظم به عنوان سنگ بنای پیشگیری از بروز بیماری‌ها و مکمل بسیار ایده‌آل در حین درمان در مراکز کلینیکی متعدد به شمار می‌رود (۵) که به طور قابل توجهی در تعادل انرژی تاثیرگذار است. علی‌رغم اینکه مطالعات دهه گذشته تا کنون به روشنی تعیین نکرده است که آیا می‌توان از ورزش به عنوان یک روش درمانی مکمل و کمکی به محض تشخیص سرطان، استفاده کرد (۶)، اما تمرینات ورزشی سازمان یافته یک استراتژی درمانی مکمل، ایمن و قابل تحمل است که با ایجاد روند بهبودی قابل توجه در طیف گسترده‌ای از عوارض مرتبط با سرطان از جمله خستگی، ظرفیت انجام ورزش، و کیفیت جسمانی زندگی بیماران مبتلا به سرطان در ارتباط است (۷، ۸). امروزه اهمیت درمانی تمرینات ورزشی برای کنترل و یا کاهش عوارض جانبی ناشی از درمان سرطان اثبات شده است، و مطالعات اخیر به دنبال

تعیین مزایای فعالیت منظم بدنی بر عوارض سرطان مانند رشد سرطان و یا متاستاز آن است (۵). از این رو شفاف نمودن تاثیر ورزش منظم بر مکانیزم‌های زیربنایی و اینتراتوموری موثر در رشد و پیشرفت سرطان نه تنها ضروری و مهم به شمار می‌روند، بلکه در تعیین طراحی برنامه‌های کاربردی و پژوهش‌های بالینی نیز سودمند خواهند بود؛ در همین راستا هدف از پژوهش حاضر نه تنها بررسی اثر تمرینات استقامتی و HIIT بر بیان ژن‌های miR-21 و bcl2 در تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود، بلکه به مقایسه تاثیرات این دو نوع پروتکل ورزشی بر ژن‌های اینتراتوموری مذکور نیز پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی و نمونه‌گیری بصورت تصادفی ساده انجام گرفت. ۱۸ سر موش آزمایشگاهی نژاد بالبیسی (۴-۵ هفته، وزن ۱۳ تا ۱۵ گرم، تهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور) در قفس‌های جداگانه ساخته شده از جنس پلی‌اتیلن شفاف و در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد؛ رطوبت ۴۰-۵۰٪، سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. آب و غذای حیوانات (پلت استاندارد) به صورت آزادانه در کل دوره پژوهش در اختیار موش‌ها قرار گرفت. کلیه اصول اخلاقی پژوهش مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس انجام گرفت.

**القاء تومور:** پس از تهیه رده سلولی MC4-L2 از مرکز ذخایر ژنتیک، سلول‌ها در فلاسک T75 در محیط کشت DMEM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES استریلومایسین ۱۰۰µg/ml، گلوتامین، FBS ۱۰٪ و پنی سیلین ۱۰۰µg/ml کشت داده شد و پس از طی چندین مرحله پاساژ سلولی، و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد یک میلیون سلول سوسپانسیون شده در بافر PBS به صورت زیر پوستی به پهلو موش‌ها تزریق شد که پس از طی شدن ۹ الی ۱۲ روز تومور پستان به صورت قابل لمس با دست، پدیدار شد.

**گروه‌های مورد پژوهش:** یک هفته پس از ایجاد تومور، ۱۸ سر موش به شکل تصادفی به سه گروه ۶ تایی: کنترل، استقامتی تداومی، HIIT تقسیم شدند، در طول این یک

اثبات شده است که ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و رسیدن به  $VO_{2max}$  در موش‌ها وجود دارد ( $r = 0.005$ ,  $p < 0.98$ ). از طرفی همین مطالعات، برآورد کردن  $VO_{2max}$  موش‌ها از طریق تعیین سرعت بیشینه دویدن آنها را به عنوان یک روش معتبر در تعیین  $VO_{2max}$  در این نوع جوندگان ذکر کرده اند (۱۱، ۱۲). بر این اساس، در پژوهش حاضر شدت‌ها با توجه به این سرعت بدست آمده و تنظیم شدند. به نحوی که استفاده از این روش در تعیین شدت پروتکل‌ها مانع از نادیده گرفته شدن خستگی ناشی از سرطان و توانایی موش‌های مبتلا به سرطان در انجام فعالیت ورزشی شد. چرا که توان هوازی موش‌ها بر اساس توانایی آنها در انجام فعالیت ورزشی در نظر گرفته شد.

**اندازه‌گیری حجم تومور:** پس از پیدایش تومور در محل تزریق سلول‌های سرطانی، حجم تومور به صورت هفتگی به وسیله کولیس در دو بعد طول [L] (بزرگترین بعد تومور) و عرض [W] (بعد عرضی با ۹۰ درجه زاویه نسبت به طول) اندازه‌گیری شد. سپس برای اندازه‌گیری حجم تومور از فرمول جنسن و همکاران (۲۰۰۸)  $V = 1/2(L^2 \times W)$  استفاده گردید (۱۳).

**هموژنایز بافت تومور:** ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین (90mg/kg) و زایلازین (10mg/kg) بی‌هوش شده، بافت تومور بلافاصله استخراج و در نیتروژن مایع نگهداری شده و سپس بافت‌ها تا موقع تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

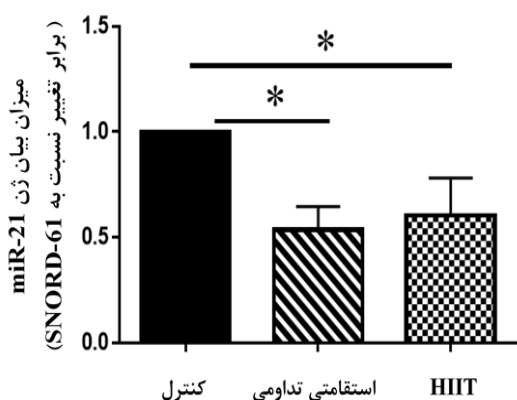
**استخراج RNA و microRNA و سنتز cDNA:** استخراج RNA و microRNA به وسیله کیت (50) miRNeasy Mini Kit ساخت شرکت Qiagen (آلمان) و طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برای تمامی نمونه‌های استخراج شده بین ۱/۸ تا ۲ بود، سپس برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. قبل از سنتز cDNA برای اطمینان از عدم وجود DNA در نمونه استخراج شده، DNAs treatment انجام شد.

برای سنتز cDNA ژن bcl2 از کیت Transcriptor first strand cDNA synthesis kit تهیه شده از شرکت roche (آلمان) و سنتز cDNA برای miR-21

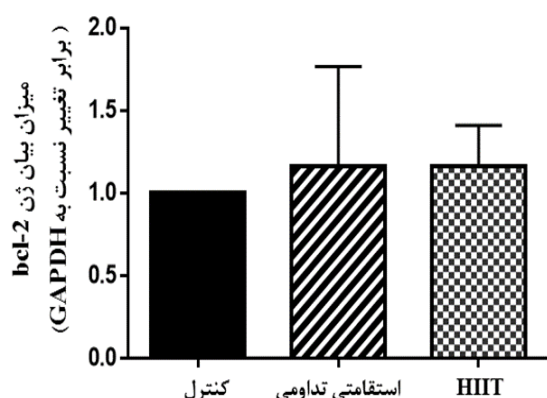
هفته موش‌ها با دویدن بر روی تردمیل نیز آشنا شدند (ابتدا پیلوت پروتکل‌ها بر روی پنج سر موش انجام شد). سپس به مدت ده هفته و در هر هفته پنج روز پروتکل تمرین برای گروه‌های تمرینی اجرا شد. هر جلسه برنامه تمرین استقامتی تداومی دویدن روی تردمیل به مدت ۷۵ دقیقه بود که شامل پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰٪ تا ۴۰٪  $VO_{2peak}$  ۶۵ دقیقه دویدن با شدت ۶۵٪-۶۰٪  $VO_{2peak}$  و پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۳۰٪ تا ۴۰٪  $VO_{2peak}$  بود. برای گروه HIIT نیز در همین مدت برنامه تمرین تناوبی شدید اجرا شد، هر جلسه تمرین ۳۷/۵ دقیقه دویدن روی تردمیل بود که شامل پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰٪-۴۰٪  $VO_{2peak}$  شش تناوب (سه دقیقه و ۲۰ ثانیه‌ای با شدت ۸۵٪ تا ۹۰٪  $VO_{2peak}$ ، ۹۰ ثانیه ریکاوری فعال با شدت ۳۰٪ تا ۳۵٪  $VO_{2peak}$  بین هر تناوب و پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۴۰٪-۵۰٪  $VO_{2peak}$  بود. تمرینات به کار گرفته در پژوهش حاضر نه تنها همانند دیگر کارهای پژوهشی انجام گرفته محقق ساخت (۹) بوده و بر اساس پایه‌های کاربردی در تمرینات استقامتی و تناوبی پر شدت طراحی شده است (۱۰)، بلکه مورد تایید و تصویب کمیته علمی علم تمرین مطالعات بالینی و حیوانی دانشگاه تربیت مدرس نیز قرار گرفته است. از مزایای این پروتکل‌ها، در نظر گرفتن خستگی ناشی از سرطان و توانایی موش‌های مبتلا به سرطان در انجام تمرین ورزشی با توجه به توان هوازی آنها بود که در مبحث بعدی به آن اشاره شده است.

**پروتکل برای ارزیابی توان هوازی موش‌ها:** پروتکل ارزیابی توان هوازی هر هفته یک بار در ۵ هفته اول و هر دو هفته یک بار در ۵ هفته دوم اجرا شد، بدین صورت که بعد از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۶m/min با شیب ۱۵ درجه سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک بار به میزان ۲m/min افزایش می‌یافت، سرعتی به عنوان حداکثر سرعت بیشینه در نظر گرفته می‌شد که موش‌ها بلافاصله پس از افزایش سرعت در تردمیل، نمی‌توانستند با یک سرعت ثابت بدونند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند (۱۱، ۱۲) و این سرعت به عنوان سرعت بیشینه در نظر گرفته می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سرعت بیشینه با غلظت لاکتات بالاتر از ۶ میلی مول در لیتر و نسبت تنفسی  $VCO_2/VO_2$ ، معادل ۱/۵ (یک و نیم) است (۱۱، ۱۲). بر همین اساس

شده است، هر چند بین دو گروه اختلاف معناداری مشاهده نشد ( $p=0/605$ ) (شکل شماره یک)؛ تغییرات میزان بیان ژن Bcl-2 بین گروه های پژوهش از لحاظ آماری معنادار نبود ( $F=0/367$ ,  $p=0/699$ ) (شکل شماره ۲). همچنین نتایج نشان داد نسبت افزایش حجم تومور در هفته دهم نسبت به هفته اول به طور معنی داری در دو گروه تمرینی در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ( $F=6/332$ ,  $p=0/000$ )، همچنین این کاهش در گروه HIIT نسبت به گروه استقامتی، به شکل معناداری بیشتر بوده است ( $p=0/001$ )؛ به گونه ای که در گروه HIIT حجم تومور در هفته دهم، رشد  $8/47$  برابری به نسبت هفته اول داشت ولی در گروه استقامتی تداومی این نسبت  $10/336$  برابر و در گروه کنترل رشد حجم تومور به نسبت هفته اول  $12/132$  برابر بود (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۱: میزان بیان ژن miR-21 (معناداری نسبت به گروه کنترل)



شکل شماره ۲: میزان بیان ژن bcl-2 (معناداری نسبت به گروه کنترل)

از کیت miScript II RT Kit تهیه شده از شرکت Qiagen (آلمان) و طبق دستورالعمل کیت های مذکور استفاده شد.

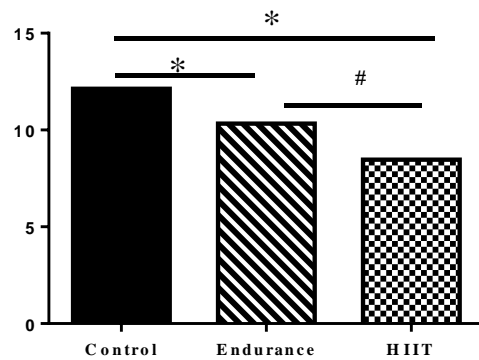
**Real time – PCR: qReal time PCR** با استفاده از دستگاه (Rotrogene 6000, Corbet) انجام شد. برنامه qReal time برای بررسی میزان بیان bcl2 گروه های ورزشی نسبت به گروه کنترل بر اساس SYBER- Green از شرکت ampliion (دانمارک) و شامل: یک چرخه با  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن  $40^{\circ}\text{C}$  چرخه با  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه و  $60^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه انجام شد. برنامه real time برای miR-21 بر اساس miScript SYBR Green PCR Kit از شرکت Qiagen (آلمان) و شامل: یک چرخه با  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن  $40^{\circ}\text{C}$  چرخه با  $94^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه،  $55^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و  $70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. تغییرات بیان در هر یک از گروه های ورزشی نسبت به گروه کنترل برای ژن bcl2 (نیکازیست ژن) با ژن خانه داری GAPDH (نیکازیست ژن) و برای miR-21 با ژن خانه داری Snord 61 (Qiagen) با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  محاسبه شد.

**روش آماری:** تمامی داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد توصیف شده اند، به منظور تعیین طبیعی بودن داده ها از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس ها با آزمون Leven سنجدیده شد. جهت تعیین تفاوت بین گروهی متغیرها در ۳ گروه از آزمون آماری One Way ANOVA و تعیین سطح معناداری از آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ در سطح معناداری  $p<0.05$  و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Prism نسخه ۶ انجام گرفت.

## یافته ها

نتایج پژوهش حاضر که در جدول یک ارائه شده است، نشان داد که در هر دو گروه تمرینی میزان بیان miR-21 نسبت به گروه کنترل به شکل معناداری کاهش یافته است ( $F=25/769$ ,  $p=0/001$ ) به طوری که در گروه استقامتی تداومی  $0/535$  و در گروه HIIT  $0/603$  برابر

(۴۶/۵٪ و ۳۹/۷٪ به ترتیب در گروه استقامتی تداومی و تناوبی پرشدت) و کند کردن حجم رشد تومور در تمرین تناوبی پرشدت (۸/۴۷۶) و تمرین تداومی استقامتی (۱۰/۳۳۶) نسبت به گروه کنترل (۱۲/۱۳۲) است، بلکه گویای تاثیرات تمرین ورزشی به عنوان یک مکمل درمانی در کاهش بیان miR-21 در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌باشد، به گونه‌ای که تمرین ورزشی احتمالاً به عنوان یک عامل الحاقی و کمک درمانی در کند کردن رشد تومور از طریق مسیر ریز RNA ها (۱۹) از جمله miR-21 (۱۵) و دیگر مکانیزم‌ها (۲۰) می‌تواند موثر واقع شود. اما علی‌رغم اینکه در پژوهش حاضر و پژوهش گذشته (۱۵) نوع موش‌ها و رده سلولی سرطانی مشابه (MC4-L2) در القاء تومور مورد استفاده قرار گرفت، نتایج پژوهش حاضر در مورد بیان ژن bcl-2 (بدون تغییر معنادار) همسو با نتایج پژوهش گذشته (کاهش ۷۹٪) نبود. احتمالاً علت این اختلاف نتیجه به علت نوع پروتکل‌های ورزشی (مدت و شدت) بکار رفته باشد (۲۱). در پژوهش گذشته مدت زمان انجام پروتکل ورزشی ۵ هفته بوده در صورتی‌که در پژوهش حاضر ۱۰ هفته تمرینات ورزشی انجام گرفت. از این‌رو همچنین احتمال دارد نتایج حاضر در بیان ژن bcl-2 گویای تاثیرپذیری متفاوت سرطان از تمرینات ورزشی در درجه‌های مختلف رشد و توسعه هیستولوژیکی باشد (۲۱). با این وجود، miR-21 که به عنوان یک آنکوژن در القاء و فعال‌سازی رشد تومور به شمار می‌رود نه تنها از طریق تاثیر بر bcl-2 (۲، ۳، ۲۲) و مکانیزم‌های فرو دست از جمله فعالیت کاسپازها در فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و آپوپتوز سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کند، بلکه مسیرهای متعدد دیگری از جمله NF-kB و VE-cadherin (۲۲)، TPM1، REK (۱۴) و PTEN (۱۴)، را فعال یا غیر فعال می‌کند که در رشد و توسعه تومور نقش دارند (۲). با توجه به نتایج حاضر، تمرین ورزشی احتمالاً با تحت تاثیر قرار دادن miR-21 می‌تواند در فرآیند درمان به عنوان یک اهرم و مکمل موثر در کند کردن رشد تومور در نظر گرفته شود. اطلاعات حاضر از دلایل عدم تغییر معنادار bcl-2 بر اثر تمرینات ورزشی در حوزه سرطان پستان محدود می‌باشد، لذا جهت روشن شدن این موضوع انجام مطالعات بیشتر ضروری است. با این‌حال به نظر می‌رسد بیان bcl-2 در سطوح پروتئینی



شکل شماره ۳: نسبت رشد و توسعه تومور در هفته دهم به هفته اول در سه گروه مورد پژوهش (معناداری نسبت به گروه کنترل)، (# معناداری نسبت به گروه استقامتی)

جدول شماره ۱: نتایج بیان ژن‌ها گروه‌های پژوهش

ژن	گروه‌ها	میانگین میزان بیان	خطای استاندارد
miR-21	استقامتی تداومی	۰/۵۳۵	۰/۱۱۰
	HIIT	۰/۶۰۳	۰/۱۷۵
Bcl-2	استقامتی تداومی	۱/۱۶۲	۰/۶۰۴
	HIIT	۱/۱۶۲	۰/۲۵۰

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد در هر دو گروه تمرینی میزان بیان ژن miR-21 کاهش یافته است، اما میزان بیان bcl-2، یکی از ژن‌های هدف آن (۳، ۱۴)، در دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. با این وجود کاهش نسبی رشد تومور در هر دو پروتکل ورزشی نسبت به گروه کنترل مشهود بود، همچنین این کاهش رشد حجم تومور در گروه تمرینی تناوبی پرشدت (۸/۴۷۶) نسبت به تمرین استقامتی تداومی (۱۰/۳۳۶) بیشتر بود. مطالعات نشان داده‌اند که ۵ (۱۵)، ۶ (۱۶-۱۸) و یا ۸ هفته (۱۹) تمرینات ورزشی نه تنها باعث کاهش معنادار حجم تومور شدند، بلکه باعث کاهش بیان miR-21 (به مقدار ۷۱٪) و کاهش بیان پروتئین bcl-2 (به مقدار ۷۹٪) در موش‌های گروه ورزشی مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با هم‌تایان غیر فعال‌شان شد (۱۵). پژوهش حاضر نه تنها موکد نتایج پژوهش‌های گذشته در مورد کاهش بیان miR-21

بود به شکلی که خستگی ناشی از سرطان در این پژوهش بر روند فعالیت و تحرک این موش‌ها نادیده گرفته نشد. بر این اساس، این گونه مطالعات حیوانی (استفاده از سلول‌های سرطانی با رشد کند و پروتکل‌های ورزشی مذکور) جهت تکمیل مطالعات کلینیکی و بالینی و تسهیل رویکرد انتقالی نتایج مطالعات حیوانی به مطالعات انسانی امکانپذیرتر و کارآمدتر است (۵). از نقاط ضعف این پژوهش، عدم اندازه‌گیری ژن *bcl-2* در سطوح پروتئینی بود که می‌توانست نتایج دقیق‌تری از تاثیر تمرینات ورزشی بر ژن پایین دست *miR-21* در بافت تومور ارایه دهد. این نقطه ضعف پژوهشی پیشنهادی به مطالعات آینده به منظور اندازه‌گیری این ژن‌ها در سطوح پروتئینی است.

### نتیجه‌گیری

تمرینات ورزشی تداومی استقامتی و تناوبی پرشدت به عنوان یک روش کمک درمانی، احتمالاً از طریق تاثیر بر *miR-21* اینتراتوموری روند رشد و توسعه سرطان پستان در موش‌های مبتلا به سرطان پستان را کند می‌کند. ترسیم سازوکارهای دقیق و تصویری کلی از تاثیرات اینتراتوموری هر دو نوع پروتکل ورزشی بخصوص تمرین تناوبی پرشدت نیاز به مطالعات بیشتر دارد. با این وجود، نتایج حاصله از پژوهش حاضر در خصوص تمرین تناوبی پر شدت مبنی بر تاثیرات بیشترش بروی سرعت رشد و توسعه حجم تومور با توجه به در نظر گرفتن توانایی موش‌های مبتلا به سرطان پستان به انجام فعالیت ورزشی و نادیده نگرفتن عوارض ناشی از سرطان از جمله خستگی بر اساس توان هوازی آنها، این نوع تمرین را به عنوان یک مکمل درمانی موثرتر در کاهش رشد سرطان پستان نسبت به تمرین تداومی استقامتی پیشنهاد می‌کند.

اطلاعات دقیق‌تری از تغییرات درون توموری ناشی از ورزش بروی این ژن پایین دست *miR-21* نمایان سازد. از آنجایی که تاثیرات هر دو نوع تمرین ورزشی بر بیان *miR-21* (به مقدار  $46/5\%$  در تمرین استقامتی تداومی و به مقدار  $39/7\%$  در تمرین تناوبی پرشدت) معنادار بود، ولی کاهش رشد نسبی تومور در هفته دهم نسبت به هفته اول در گروه تمرینی تناوبی پرشدت ( $8/476$ ) نسبت به استقامتی تداومی ( $10/336$ ) بیشتر بود. احتمالاً تمرین تناوبی پرشدت با تاثیر موثرتر بر مجموعه ساز و کارهای متعدد اینتراتوموری (۱۷، ۱۹) باعث کند کردن بیشتر رشد تومور و یا القاء موثرتر مسیرهای آپوپتوزی در درون تومور می‌شود. با این وجود، ورزش نمی‌تواند به عنوان یک روش درمانی مجزا و مستقل مورد استفاده قرار گیرد، بلکه تنها می‌تواند به عنوان یک مکمل در کنار درمان در نظر گرفته شود. (۵) از این رو نتایج این پژوهش می‌تواند به پیشینه پژوهش‌هایی که در این زمینه به درک کامل تاثیرات مکانیزمی درون توموری ورزش دست نیافته اند، اضافه شود و مسیر مطالعات آینده را در مورد تاثیرات اینتراتومورالی ورزش در ریز محیط تومور هموارتر سازد. امروزه استفاده از تمرینات ورزشی استقامتی (۲۴-۲۷) و تمرینات تناوبی پر شدت (۲۸-۳۱) همراه با دیگر درمان‌ها در مطالعات بالینی و اپیدمیولوژی مرتبط با سرطان نه تنها در حال افزایش است، بلکه مطالعات حیوانی با ایجاد یک تصویر کلی در تاثیرات اینتراتوموری ورزش جهت تکمیل مطالعات کلینیکی و بالینی به منظور تسهیل و بهینه سازی پروتکل‌های ورزشی کاربردی‌تر و کارآمدتر راه را هموار می‌سازند (۵). از نقاط قوت پژوهش پژوهش حاضر، استفاده از رده سلولی سرطان پستان *MCL-2* بود که به کندی رشد می‌کند، همچنین نه تنها تمرینات ورزشی به مدت ۱۰ هفته انجام گرفت بلکه پروتکل ورزشی به کار گرفته در این پژوهش بر اساس توانایی موش‌های مبتلا به سرطان پستان در انجام فعالیت‌های ورزشی طراحی شده

### References

1. Alegre MM, Knowles MH, Robison RA, O'Neill KL. Mechanics behind breast cancer prevention - focus on obesity, exercise and dietary fat. Asian Pacific

journal of cancer prevention : APJCP 2013; 14(4):2207-12.

2. Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. Chinese journal of cancer 2011; 30(6):371-80.

3. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26(19):2799-803.
4. Himbert C, Delphan M, Scherer D, Bowers LW, Hursting S, Ulrich CM. Signals from the Adipose Microenvironment and the Obesity-Cancer Link-A Systematic Review. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* 2017; 10(9):494-506.
5. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: a translational perspective. *Brain, behavior, and immunity* 2013; 30(1):S75-87.
6. Jones LW, Peppercom J, Scott JM, Battaglini C. Exercise therapy in the management of solid tumors. *Current treatment options in oncology* 2010; 11(1-2): 45-58.
7. Jones LW, Liang Y, Pituskin EN, Battaglini CL, Scott JM, Hornsby WE, et al. Effect of exercise training on peak oxygen consumption in patients with cancer: a meta-analysis. *The oncologist* 2011; 16(1):112-20.
8. Speck RM, Courneya KS, Masse LC, Duval S, Schmitz KH. An update of controlled physical activity trials in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of cancer survivorship : research and practice* 2010; 4(2):87-100.
9. Riggs CE, Michaelides MA, Parpa KM, Smith-Blair NJ. The effects of aerobic interval training on the left ventricular morphology and function of VLCAD-deficient mice. *European journal of applied physiology* 2010; 110(5): 915-23.
10. Laursen PB, Jenkins DG. The scientific basis for high-intensity interval training. *Sports Medicine* 2002; 32(1):53-73.
11. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2007; 14(6):753-60.
12. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *Journal of strength and conditioning research* 2007; 21(3): 751-6.
13. Jensen MM, Jorgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC medical imaging* 2008; 8:16.
14. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer* 2011; 30(6):371.
15. Khori V, Amani Shalamzari S, 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.
16. Aghaalinejad 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.
17. Manzari Tavakoli Z, Amani Shalamzari S, Kazemi A. Effects of 6 weeks' Endurance Training on Oncostatin-M in Muscle and Tumor Tissues in mice with Breast Cancer. *Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases* 2017; 9(4):50-9.
18. Shiri Y, Agha-Alinejad H, Gharakhanlou R, Amani Shalamzari S, Saei MA. Effect of six weeks endurance training on tumor tissue IL-10 cytokine levels in breast cancer bearing mice. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2014; 16(3):205-10.
19. Mirakhori Z, Kordi MR, Gaeini Aa, Alizadeh S, Anoosheh L, Amani Shalamzari S, et al. The Effect of Aerobic Training on Plasma Estradiol and mir-206 and ER $\alpha$  Expression in mice with Breast Cancer. *Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases* 2015; 7(4):23-32.

20. Aveseh M, Nikooie R, Aminaie M. Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. *The Journal of physiology* 2015; 593(12):2635-48.
21. Pedersen L, Christensen JF, Hojman P. Effects of exercise on tumor physiology and metabolism. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 2015; 21(2):111-6.
22. Chao J, Guo Y, Li P, Chao L. Role of Kallistatin Treatment in Aging and Cancer by Modulating miR-34a and miR-21 Expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017; 2017.
23. Yang Y, Guo J-X, Shao Z-Q. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 2017; 10(1):87-91.
24. Henke C, Cabri J, Fricke L, Pankow W, Kandilakis G, Feyer P, et al. Strength and endurance training in the treatment of lung cancer patients in stages IIIA/IIIB/IV. *Supportive Care in Cancer* 2014; 22(1):95-101.
25. Cuesta-Vargas AI, Carabantes F, Caracuel Z, Conejo I, Alba E. Effectiveness of an individualized program of muscular strength and endurance with aerobic training for improving germ cell cancer-related fatigue in men undergoing chemotherapy: EFICATEST study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016; 17(1):8.
26. Hvid T, Lindegaard B, Winding K, Iversen P, Brasso K, Solomon TP, et al. Effect of a 2-year home-based endurance training intervention on physiological function and PSA doubling time in prostate cancer patients. *Cancer Causes & Control* 2016; 27(2):165-74.
27. Kazemi A, Kalantari Khandani B, Ashraf Ganjoei A. The Effect of 8 Weeks Endurance Training on Serum Levels of IL-10 and IL-8, and White Blood Cell Count in Women with Breast Cancer. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2016; 6(2):194-201.
28. Schulz SVW, Laszlo R, Otto S, Prokopchuk D, Schumann U, Ebner F, et al. Feasibility and effects of a combined adjuvant high-intensity interval/strength training in breast cancer patients: a single-center pilot study. *Disability and Rehabilitation* 2017: 1-8.
29. Schmitt J, Lindner N, Reuss-Borst M, Holmberg HC, Sperlich B. A 3-week multimodal intervention involving high-intensity interval training in female cancer survivors: a randomized controlled trial. *Physiological reports* 2016; 4(3).
30. Licker M, Karenovics W, Diaper J, Fresard I, Triponez F, Ellenberger C, et al. Short-Term Preoperative High-Intensity Interval Training in Patients Awaiting Lung Cancer Surgery: A Randomized Controlled Trial. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2017; 12(2):323-33.
31. Baguley BJ, Skinner TL, Leveritt MD, Wright OR. Nutrition therapy with high intensity interval training to improve prostate cancer-related fatigue in men on androgen deprivation therapy: a study protocol. *BMC cancer* 2017; 17(1):1.