

## The Effect of High Intensity Interval Training on STAT-3 and Angiopoietin-1 Gene Expression, and tie-2 Protein in Mice with Breast Cancer

**Ahmadian M:** Physical Education Department, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

**Azizbeigi K:** Physical Education Department, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

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

**Atashak S:** Physical Education Department, Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran

**Corresponding Author:** Kamal Azizbeigi, kazizbeigi@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** Angiogenesis has a great role in physiological development of tissues and tumors. Considering the key role of STAT-3 and angiopoietin-1-tie-2 in angiogenesis, this study aimed to investigate the effect of 10 weeks of high intensity interval exercise (HIIT) on STAT-3 and angiopoietin-1 gene expression, and tie-2 protein in mice with breast cancer.

**Methods:** After inducing cancer (subcutaneous injection of MC4-L2 on the right side of mice), twelve Balb/c mice (6-8 weeks, weight  $19 \pm 1.05$ ) were randomly assigned to HIIT (n=6) and non-active groups (n=6). HIIT sessions were performed five days a week for 10 weeks. Twenty-four hours after the last session of HIIT, the animals were sacrificed and the tumor tissue was isolated for measuring the expression of STAT-3 and angiopoietin-1 gene by qreal time PCR and measuring tie-2 protein by western blot method. Tumor volume changes were also assessed using a digital caliper every week.

**Results:** The results of this study showed a significant decrease in expression of STAT-3 and angiopoietin-1, and changes in tumor volume and tie-2 in the training group compared to the control group ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** It appears that high intensity interval exercise can reduce the rate of tumor progression through decreasing the expression of some angiogenesis promoters, and is an effective non-medical method for reducing tumor growth.

**Keywords:** Breast Cancer, High Intensity Interval Training, Angiogenesis, STAT-3, Angiopoietin-1 and tie-2

## تأثیر تمرینات تناوبی با شدت بالا بر بیان ژن STAT-3، آنژیوپویتین-۱ و میزان پروتئین tie-2 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان

مرتضی احمدیان: گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران  
 کمال عزیزیگی\*: گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران  
 مریم دلفان: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران  
 سیروان آتشک: گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد، مهاباد، ایران

### چکیده

**مقدمه:** آنژیوزنز نقش بسیار مهمی در رشد فیزیولوژیکی بافت‌ها و تومورها دارد. با توجه به نقش کلیدی STAT-3 و آنژیوپویتین-۱-2 در آنژیوزنز تومور، هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۱۰ هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن STAT-3، آنژیوپویتین-۱، میزان پروتئین tie-2 و میزان رشد تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

**روش بررسی:** ۱۲ سر موش آزمایشگاهی نژاد BALB/c (سن ۸-۶ هفته، وزن  $19 \pm 1/05$  گرم) پس از القا سرطان (تزریق MC4-L2 زیر پوستی به پهلو راست موش‌ها) به شکل تصادفی در گروه تمرینات تناوبی شدید ( $n=6$ ) و گروه بدون فعالیت ( $n=6$ ) قرار داده شدند. هر جلسه تمرین تناوبی شدید به صورت پنج روز در هفته و به مدت ۱۰ هفته اجرا شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینات تناوبی، حیوانات قربانی و بافت تومور جدا شد و بیان ژن STAT-3 و آنژیوپویتین-۱ به روش qreal time PCR و میزان پروتئین tie-2 به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. تغییرات حجم تومور نیز با استفاده از کالیپر دیجیتالی هر هفته مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق کاهش معناداری در بیان STAT-3 و آنژیوپویتین-۱ و میزان تغییرات حجم تومور و tie-2 در گروه تمرینات تناوبی با شدت نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی شدید از طریق کاهش بیان برخی از عوامل پیش‌برنده آنژیوزیز می‌تواند سرعت پیشرفت تومورها را کاهش دهد و یک روش غیردارویی موثری در جهت کاهش رشد تومورها مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، تمرین تناوبی شدید، آنژیوزنز، STAT-3، آنژیوپویتین-۱ و tie-2

\* نشانی نویسنده مسئول: سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه فیزیولوژی ورزشی، کمال عزیزیگی.

نشانی الکترونیک: kazizbeigi@gmail.com

## مقدمه

خطر بروز سرطان پستان یکی از مهم‌ترین تهدید کننده‌های سلامتی زنان در جوامع امروزی به‌شمار می‌رود و با بیش از ۱/۳ میلیون مورد جدید ابتلا در هر سال، مهم‌ترین عامل مرگ ناشی از سرطان، در میان زنان سراسر جهان گزارش شده است (۱). پتانسیل نامحدود تکثیر، کاهش آپوپتوز، افزایش آنژیوژنز، تهاجم بافتی و متاستاز از عوامل پیشرفت سرطان می‌باشند (۲). عوامل بسیار زیادی ممکن است در تنظیم سرطان پستان نقش داشته باشند که از جمله می‌توان به آدیپوسایتوکان‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، چاقی و بافت چربی و سیستم ایمنی اشاره نمود (۳). در هر حال صرفه‌نظر از عوامل ایجادکننده این بیماری، توسعه و رشد سلول‌های سرطانی و در کل تومورها نیازمند تامین منابع کافی خون جهت برآورد نیازهای سوخت و سازی بافت می‌باشد و این امر تنها از ایجاد شبکه مویرگی جدید از طریق پدیده آنژیوژنز مقدور می‌باشد (۴). آنژیوژنز به فرایند تشکیل عروق خونی جدید از عروق پیشین گفته می‌شود. ایجاد رگ‌های خون‌رسان (آنژیوژنز) در درون تومورها برای رشد تومور و متاستاز ضروری است (۵) که موجب رشد فیزیولوژیکی و یا در شرایط بیماری مانند سرطان پستان موجب رشد تومور خواهد شد (۶). با وجود این آنژیوژنز توسط مسیرهای سیگنالینگ مولکولی ویژه‌ای تنظیم و متعادل می‌شود و عوامل محرک و مهارکننده زیادی از جمله تمرینات ورزشی ممکن است بر پدیده آنژیوژنز و نهایتاً رشد تومور و سرطان تاثیرگذار باشند (۷). در چند دهه اخیر پژوهش‌های انجام شده نشان داده است فعالیت ورزشی منظم با کاهش مرگ و میر در بین مبتلایان به سرطان همراه است، اگرچه مکانیسم‌های مولکولی درگیر در این ارتباط هنوز به طور کامل شناخته نشده است (۸-۱۰) و همچنین در طول دوره درمانی و بعد از آن، با بهبود عملکرد جسمی و کاهش احساس خستگی ناشی از سرطان همراه است (۱۱، ۱۲).

شواهد نشان می‌دهند مبدل سیگنال و فعال‌کننده نسخه‌برداری (STATs) به‌ویژه STAT-3 نقش مهمی را در آنژیوژنز تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی علاوه بر بقای سلول در تکثیر، تمایز و ژن‌های سرطانی بازی می‌کند (۱۳). گزارش شده است که STAT-3 به‌عنوان یک میانجی چند منظوره مهم، بسیاری از

جنبه‌های آنژیوژنز در سطح نسخه‌برداری تنظیم می‌کند (۱۴) به طوری که بیان STAT-3 و پیام‌رسانی مداوم آن در بیشتر موارد منجر به تنظیم افزایشی سیگنال‌های پیش آنژیوژنیک و رشد تومور می‌گردد (۱۵). Zhang و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان بیان IL-6 و STAT-3 در تومورهای اولیه در گروه مهاجم/متاستاتیک بیشتر از گروه غیر مهاجم / متاستاز بود و STAT-3 به‌عنوان یک هدف امیدوارکننده برای متوقف کردن در درمان سرطان پستان مورد توجه است (۱۳).

آنژیوپویتین-۱ به‌عنوان لیگاند محرک باعث فسفوریلاسیون رسپتور می‌گردد و تشکیل مویرگ‌ها را القا و از طریق میان‌کنش با سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های پشتیبان آنها را پایدار می‌کند. این لیگاند توسط سلول‌های فیبروبلاستی و سلول‌های حمایت‌کننده عروق همچنین توسط سلول‌های سرطانی بیان می‌شود (۱۶). Danza و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی که بیان آنژیوپویتین-۱، آنژیوپویتین-۲، Tie-2 و VEGF، اندازه‌گیری شده بود نتیجه گرفتند که بیماران با جهش‌های سرطان پستان سطوح بالاتری از آنژیوپویتین-۱، آنژیوپویتین-۲، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و mRNA در مقایسه با گروه بدون جهش‌های سرطان پستان داشتند (۱۷).

در هر حال هرچند پژوهشگران تاثیر تمرینات ورزشی را بر جنبه‌های مختلف رشد تومورها مورد بررسی قرار داده‌اند تحقیقات اندکی به بررسی تاثیر تمرینات تناوبی شدید پرداخته‌اند، با وجود این تحقیقات زیادی گزارش کرده‌اند که بسیاری از سازگاری‌های متابولیکی، قلبی-عروقی و عضلانی به مقدار زیادی وابسته به شدت تمرین می‌باشد (۱۸، ۱۹). با وجود این بیشتر پژوهش‌ها تاثیر تمرینات تناوبی شدید بر بیان STAT-3 و آنژیوپویتین-۱-2-1 tie در راستای تغییرات حجم تومور پستان کمتر مورد بررسی قرار داده‌اند. هر چند STAT-3 و آنژیوپویتین-۱-2-1 tie برای توسعه عروق و پدیده آنژیوژنز ضروری است و با وجود اهمیت این مولکول‌ها در پدیده آنژیوژنز خصوصاً در موارد پاتولوژیکی مانند سرطان‌ها، هنوز تاثیر تمرینات ورزشی به ویژه تمرینات تناوبی شدید بر بیان ژن STAT-3، آنژیوپویتین-۱ و میزان tie-2 و همسو با آن تغییرات حجم تومور مورد بررسی قرار نگرفته است. بر همین اساس با توجه به خلاء پژوهشی در مورد تاثیر تمرینات تناوبی شدید بر بیان ژن STAT-3،

تناوبی شدید ( $n=6$ ) و گروه کنترل بدون تمرینات تناوبی شدید ( $n=6$ ) قرار داده شدند. برای این منظور چون موش‌ها از لحاظ غذایی، اندازه وزن و سن ... همگن بودند و اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند برای هر سر موش یک شماره در نظر گرفته شد. سپس به قید قرعه شماره‌ها از داخل یک کیسه بیرون آورده شد و به ترتیب موش‌ها در گروه تمرینات تناوبی با شدت بالا و گروه کنترل قرار داده شدند. لازم به توضیح است بعد از بیرون کشیدن قرعه، قرعه مذکور مجدداً به داخل کیسه برگردانده می‌شد.

**سنجش توان هوازی:** ابتدا قبل از شروع دوره تمرینات لازم بود حداکثر توان هوازی حیوانات ارزیابی گردد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و  $VO_{2max}$  موش‌ها وجود دارد ( $r=0.98, p<0.005$ ) از این‌رو با توجه به سرعت بیشینه دویدن، میزان  $VO_{2max}$  موش‌ها بدست آمد. به این صورت ابتدا حیوانات به مدت پنج دقیقه بر روی نوار گردان با سرعت  $0.3\text{ m/s}$  یا  $1/8$  متر در دقیقه شروع به گرم کردن کردند. سپس سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک بار به میزان  $1/8$  متر در دقیقه افزایش می‌یافت. حداکثر سرعت بیشینه زمانی بود که موش‌ها حداقل  $1/3$  دقیقه نتوانند با یک سرعت ثابت بدونند و یا بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند ( $20$ ).

**تمرینات تناوبی شدید:** قبل از شروع پروتکل اصلی تمرینات تناوبی شدید لازم بود حیوانات با نوار گردان و دویدن بر روی آن آشنا شوند. به همین منظور به مدت شش جلسه در طول یک هفته حیوانات بر روی نوار گردان قرار داده شده و با سرعت کم شروع به دویدن می‌کردند. بعد از مرحله آشناسازی موش‌ها با نوارگردان، گروه تمرینات تناوبی شدید به مدت ۱۰ هفته تمرینات تناوبی شدید را انجام دادند به طوری‌که هر جلسه پروتکل تمرینات تناوبی شدید شامل ۳۵ دقیقه دویدن روی تردمیل بود که از پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰-۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، شش تناوب (سه دقیقه‌ای) و ۲۰ ثانیه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و یک دقیقه ریکوری با شدت ۳۵-۳۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بین هر تناوب) و نهایتاً پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۳۰-۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی تشکیل شده بود.

آنژیوپوپتین-۱ و میزان tie-2 به‌عنوان مکانیزم پیش برنده آنژیوژنز، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن STAT-3 و آنژیوپوپتین-۱-2 tie و میزان رشد حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود و به‌دنبال یافتن پاسخ این پرسش است که آیا تمرینات تناوبی شدید در موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌تواند حجم تومور و بیان ژن STAT-3 و آنژیوپوپتین-۱-2 tie را کاهش دهد یا خیر؟

## مواد و روش‌ها

**حیوانات مورد مطالعه:** تعداد ۱۲ سر موش ماده نژاد BALB/c با وزن تقریبی  $19 \pm 1.05$  گرم و محدوده سنی ۲ ماه از مرکز انسیتو پاستور ایران تهیه شدند و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه منتقل شده و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی با درجه دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵٪ در چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته تا زمان کامل آزمایشات و دوره تمرینات ورزشی نگهداری شدند. تمامی حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی داشتند. لازم به ذکر است کلیه اصول اخلاقی تحقیق حاضر مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت گردید و طرح تحقیق و کلیه مراحل آن توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مطالعه گردید و تأیید شد.

## الفا سلول‌های سرطانی، ایجاد تومور پستان و

**گروه‌بندی حیوانات:** قبل از شروع دوره تمرینات تناوبی شدید لازم بود موش‌ها سرطانی شوند. بر همین اساس سلول‌های MC4L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی‌سیلین  $100\text{ mg/ml}$ ، استرپتومایسین  $100\text{ mg/ml}$  و FBS 10% کشت داده شدند. پس از کشت رده سلولی MC4-L2 در محیط کشت و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد یک میلیون سلول سوسپانسیون شده در بافر PBS به صورت زیر پوستی به پهلو راست موش‌ها تزریق شد به طوری‌که پس از طی ۸-۱۲ روز تومور پستان پدیدار گردید. سپس یک هفته پس از ایجاد تومور پستان، موش‌ها به شکل تصادفی در دو گروه شش‌تایی شامل موش‌های سرطانی گروه تمرینات

هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در هر جلسه بر روی نوارگردان بی حرکت قرار داده شدند. پروتکل تمرینات تناوبی شدید در جدول ۱ ارائه شده است.

لازم به ذکر است در طول دوره پژوهش گروه کنترل هیچ گونه برنامه تمرینی ورزشی نداشتند. البته برای ایجاد شرایط کاملا یکسان حیوانات گروه کنترل پنج جلسه در

جدول ۱: پروتکل تمرینات تناوبی شدید بر روی نوارگردان

| دوره تمرین               | سرعت (درصد vo2max) | مدت تمرین (دقیقه) | جلسه در هفته |
|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| گرم کردن                 | ۳۰-۴۰              | ۵                 | ۵            |
| تمرین اصلی<br>(شش تناوب) | ۸۵-۹۰              | ۳/۲۰              | ۵            |
| ریکاوری بین<br>هر تناوب  | ۳۰-۳۵              | ۱                 | ۵            |
| سرد کردن                 | ۳۰-۴۰              | ۵                 | ۵            |

در گروه تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل برای ژن STAT-3 با ژن مرجع GAPDH، با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد.

همچنین هر هفته حجم تومور با استفاده از کالیپر دیجیتال (Thermo Fisher Scientific, CAT NO 14-648-17, USA) در دو بعد اندازه گیری می گردید. بزرگ ترین بعد تومور به عنوان طول تومور و بعد دیگر (با زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض تومور در نظر گرفته شده و اندازه گیری می شد. لازم به ذکر است حجم تومور با فرمول  $\pi/6 \times \text{طول} \times \text{عرض}$  (فرمول استاندارد برای محاسبه حجم تومور در مدل های موش سرطان پستان) محاسبه می گردید (۲۱). نتایج بر حسب میلی متر مکعب بیان گردید.

**وسترن بلات:** برای سنجش میزان پروتئین Tie-2 از روش وسترن بلات استفاده شد، برای تبدیل تصاویر وسترن بلات به داده های کمی از نرم افزار imagej استفاده شد. ابتدا مقادیر مساوی از پروتئین توسط تکنیک الکتروفورز ژل پلی آکرل آمید جداسازی شد. بعد از مرحله الکتروفورز، پروتئین های ژل به کاغذ PVDF منتقل شده و کاغذ در محلول بلاکینگ برای ۱ ساعت قرار گرفت. سپس کاغذ یک شب در آنتی بادی اولیه (Abcam, USA) در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شده و در روز دوم ۳ بار با محلول TBST شستشو داده و کاغذ با آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بعد از این مرحله کاغذها با کیت ECL پوشانده و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر شد. در مرحله بعد بلاتها

### PCR – Real Time و کمی سازی میزان بیان

#### STAT-3 و آنژیوپوپیتین-۱ و تغییرات حجم تومور:

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی هوش شده سپس بافت تومور بلافاصله استخراج و در نیتروژن -۸۰ منجمد نگهداری شد. در آزمایشگاه حدود ۵۰-۱۰۰ میلی گرم بافت تومور به همراه ۷۰۰ لاندا تراپزول در لوله هموزن دستی ریخته شد و بافت هموزن گردید. سپس مایع رویی برای استخراج RNA به لوله جدید منتقل شد. استخراج RNA به وسیله کیت miRNeasy Mini Kit و طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. سپس برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. قبل از سنتز cDNA برای اطمینان از عدم وجود DNA در نمونه استخراج شده DNAs treatment انجام شد. برای سنتز cDNA ژن STAT-3 و آنژیوپوپیتین-۱ از کیت (Transcript first strand cDNA synthesis kit) و طبق دستورالعمل کیت و از طریق روش PCR و با استفاده از دستگاه (Rotor Gene 6000 Real-Time PCR) استفاده شد. برنامه Real-Time برای بررسی میزان بیان STAT-3 و آنژیوپوپیتین-۱ براساس SYBR Green Real-Time (Ampliqon، دانمارک) و شامل یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه انجام شد. تغییرات بیان

## یافته‌ها

یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد که بین دو گروه تمرینات تناوبی شدید و گروه کنترل در میزان بیان ژن STAT-3 ( $p=0/001$ ) و بیان ژن آنژیوپوئین-1 ( $p=0/007$ ) و میزان پروتئین tie-2 ( $p=0/000$ ) اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲ و شکل ۱). همچنین مشاهده شد نسبت حجم تومور در هفته دهم نسبت به هفته اول در گروه تمرینات تناوبی شدید در مقایسه با گروه کنترل به شکل معناداری کمتر بود به طوری که این نسبت در گروه تمرین تناوبی شدید ۸/۴۷۶ برابر شده بود در حالی که در گروه کنترل به میزان ۱۲/۱۳ برابر بوده است (جدول ۳).

در بافر استریپینگ شستشو داده شده و آنتی‌بادی Tie 2 به روی کاغذ اضافه شده و دوباره با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شد، سپس توسط فیلم رادیولوژی ظاهر شد، باندهای بدست آمده در نهایت توسط برنامه ImageJ دانسیتومتری گردید.

**روش‌های آماری:** ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لئون بررسی شد. بعد از مشخص شدن طبیعی بودن توزیع داده‌ها جهت تعیین اختلاف میانگین‌های متغیرهای مورد مطالعه از آزمون آماری تی مستقل استفاده شد. تمامی تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت. سطح معنی‌داری نیز  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

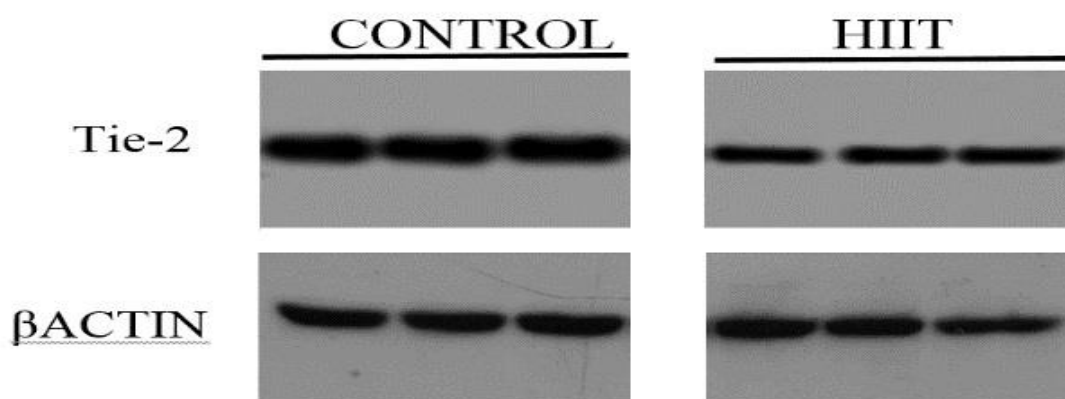
جدول ۲: مقادیر بیان ژن آنژیوپوئین او STAT-3 و همچنین مقادیر پروتئین tie-2 در گروه‌های پژوهش

| متغیر               | گروه | کنترل | تناوبی شدید | p      |
|---------------------|------|-------|-------------|--------|
| STAT-3              |      | ۱     | ۰/۵۹۵±۰/۲۴۸ | ۰/۰۰۱  |
| آنژیوپوئین ۱        |      | ۱     | ۰/۵۵۰±۰/۱۷۶ | ۰/۰۰۷  |
| مقدار پروتئین tie-2 |      | ۱     | ۰/۵۶۰±۰/۰۳۵ | ۰/۰۰۰۱ |

\* سطح معنی‌داری ( $p \leq 0/05$ ) در نظر گرفته شده است

جدول ۳: تغییرات حجم تومور موش‌ها در هفته اول و دهم

| حجم تومور (سانتی‌متر مکعب) | هفته اول  | هفته دهم   | نسبت (هفته دهم به هفته اول) |
|----------------------------|-----------|------------|-----------------------------|
| تمرینات تناوبی شدید        | ۰/۰۶±۰/۰۱ | ۰/۵۰۸±۰/۰۲ | ۸/۴۷۶                       |
| کنترل                      | ۰/۰۵±۰/۰۲ | ۰/۶۰۶±۰/۰۳ | ۱۲/۱۳۲                      |



شکل ۱: تغییرات مقادیر پروتئین tie-2 در گروه‌های پژوهش

## بحث

در پژوهش حاضر تاثیر تمرینات تناوبی شدید بر تغییرات حجم تومور و میزان بیان ژن STAT-3 و آنژیوپویتین-1 و میزان پروتئین tie-2 به عنوان برخی از عوامل ملکولی موثر در آنژیوژنز در موش‌های مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های تحقیق نشان دادند که تمرینات تناوبی شدید توانسته بود با کاهش فاکتورهای پروآنژیوژنز نهایتاً موجب کاهش آنژیوژنز و کاهش حجم تومور شود که این نتایج از نظر پزشکی دارای اهمیت است. بزرگ شدن تومور به تدارک مواد مغذی و فاکتورهای تروفیک بستگی دارد. در این راستا رگ‌زایی از فاکتورهای پیش نیاز برای رشد مستمر و گسترش تومور می‌باشد. بررسی‌های مختلف کاهش حجم تومور به دنبال انجام تمرین‌های ورزشی منظم را گزارش کرده‌اند (۲۲، ۲۳). با توجه به این‌که Lynch و همکاران (۲۰۱۱) بیش از ۷۰ پژوهش در رابطه با فعالیت ورزشی و سرطان پستان را آنالیز کردند، براین اساس آنها گزارش دادند فعالیت ورزشی با شدت بالا در کاهش خطر ابتلا به سرطان پستان موثرتر عمل می‌کند (۲۴). همچنین شواهد نشان می‌دهند که تمرین ورزشی با شدت بالا احتمالاً در کنترل مارکرهای مرتبط با کاهش خطر ابتلا به سرطان پستان، بهتر و موثرتر می‌باشد (۲۵). با وجود این آنژیوژنز دارای مسیرهای سیگنالینگ پیچیده‌ای است و عوامل زیادی در آن دخیل هستند (۲۷). در هر حال با اینکه تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر تمرین ورزشی بر بسیاری از عوامل مرتبط با آنژیوژنز صورت گرفته است؛ تاثیر تمرین تناوبی بر بیان ژن STAT-3، آنژیوپویتین-1، میزان tie-2 و حجم تومور کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر STAT-3 تحت تاثیر تمرینات تناوبی شدید قرار گرفت و به‌طور معنی‌داری در گروه تمرینات تناوبی شدید در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت و میزان این کاهش در گروه تناوبی شدید ۴۱٪ بود. در شرایط پاتولوژیکی و در افراد سرطانی بدون انجام تمرینات ورزشی نشان داده شده است که بیان STAT-3 در ۷۰٪ انواع سرطان‌ها به‌صورت ناخواسته افزایش می‌یابد و تومور رشد می‌کند (۱۵). STAT-3 با کنترل عوامل آنژیوژنیک (VEGF, FGF, HIF1 $\alpha$ ) و همچنین فاکتورهای پیش برنده تهاجم بافتی و متاستاز منجر به رشد تومور می‌شود (۲۸). Niu و

همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند افزایش بیان ژن STAT-3 با القای بیان VEGF منجر به افزایش آنژیوژنز تومور می‌شود. آنها همچنین گزارش دادند مهار ژن STAT-3 با کاهش سطوح VEGF منجر به کاهش آنژیوژنز تومور و مهار رشد تومور می‌شود (۲۹). بنابراین به نظر می‌رسد احتمالاً کاهش میزان بیان STAT-3 در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل می‌تواند از دلایل کاهش سرعت رشد حجم تومور در گروه تمرین تناوبی نسبت به گروه کنترل باشد. همچنین در این پژوهش آنژیوپویتین-1 نیز تحت تاثیر تمرینات تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت به‌طوری‌که میزان این کاهش در گروه تناوبی شدید ۴۵٪ بود. همچنین میزان پروتئین tie-2 نیز در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر همسو با نتایج بسیاری از پژوهش‌های پیشین است که نشان می‌دهند تمرینات ورزشی منظم با کاهش فاکتورهای آنژیوژنیک در مبتلایان به سرطان پستان همراه است (۱۳، ۳۰). آنژیوژنز از مشخصه‌های پیشرفت سرطان است که مدت‌هاست که به عنوان هدف درمانی در نظر گرفته شده است و از آنجایی که مجموعه Tie-2/Ang-1 از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی آنژیوژنز تومور است (۳۱). بنابراین به نظر می‌رسد کاهش میزان بیان آنژیوپویتین-1-tie-2 منجر به مهار و اختلال در عملکرد مسیر پیام‌رسانی Tie-2/Ang-1 در بافت تومور موش‌های سرطانی در گروه تمرینی شده است و در نتیجه احتمالاً این مهار از دلایل کاهش سرعت رشد حجم تومور در گروه‌های تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل شده است.

Gavin و همکاران (۲۰۰۷) طی بررسی آنژیوژنز در بافت عضله اسکلتی نسبت به تمرین‌های هوازی در آزمودنی‌های مسن و جوان، (۸ نفر مسن و شش جوان) گزارش دادند که چگالی مویرگی افزایش یافته و بین پاسخ آنژیوژنزی نسبت به تمرینات هوازی بین افراد جوان و مسن تفاوتی وجود ندارد (۳۲). به نظر می‌رسد در حالت انجام تمرینات ورزشی شرایط موجود ممکن است موجب این اختلافات شده باشد چرا که در تحقیق حاضر آنژیوژنز در شرایط پاتولوژیکی مهار شد (کاهش فاکتورهای پروآنژیوژنز) و این می‌تواند در جهت بهبود شرایط باشد در حالی‌که در تحقیق گاوین و همکاران آنژیوژنز فیزیولوژیکی بوده و در

این نتایج مثبت نشان می‌دهد که ممکن است فرایندهایی مثل کاهش خون رسانی به سلول‌های توموری ممکن است در کاهش رشد تومور دخیل باشند. البته با توجه به اینکه عوامل موثر در فرایند آنژیوژنز زیاد بوده و فاکتورهای دیگری نیز ممکن است در این فرایند تاثیر داشته باشند با اطمینان کامل نمی‌توان اختلاف حجم تومور را در دو گروه تجربی و کنترل صرفا ناشی از متغیرهای تحقیق حاضر دانست و بهتر بود فاکتورها و مکانیزم‌های درگیر در فرایند آنژیوژنز دیگری نیز مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند تا نتایج تحقیق حاضر به صورت واضح‌تر تفسیر گردد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه، تشکیل سیستم عروقی جدید لازمه متابولیزم و رشد تومور است نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد تمرینات تناوبی شدید با کاهش فاکتورهای پرو آنژیوژنیک و متعاقب آن، سرکوب مسیره‌های پیام رسانی فرایند آنژیوژنز، منجر به کاهش رشد حجم تومور در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد، بنابراین با توجه به نتایج پژوهش حاضر و با عنایت به تاثیر تمرینات تناوبی شدید بر کاهش حجم تومور و کاهش بیان STAT-3، بیان آنژیوپوپیتین-1 و میزان tie-2 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان، به نظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید می‌تواند با کاهش عوامل موثر بر پیشرفت آنژیوژنز تومور، مداخله غیردارویی موثری بر کاهش سرعت رشد تومور باشد.

### تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مسئول محترم و همچنین همکاران گرامی بخش آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تربیت مدرس و آزمایشگاه علوم پزشکی ایران که زمینه انجام پژوهش حاضر را فراهم کردند تشکر و قدرانی می‌شود.

جهت سازگاری در تامین اکسیژن و مواد غذایی برای عضلات فعال می‌باشد. با عنایت به این نتایج به نظر می‌رسد که احتمالا فرایند های آنژیوژنز در شرایط پاتولوژیک و فیزیولوژیکی دارای مکانیزم‌های متفاوتی باشند (۲۳). در پژوهش حاضر حجم تومور در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد و نسبت تغییرات حجم تومور در هفته دهم نسبت به هفته اول در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود؛ به طوری که میزان رشد و تومور در هفته دهم نسبت به هفته اول در گروه تجربی ۸/۴۷۶ برابر بود در حالی که این نسبت در گروه کنترل ۱۲/۱۳ برابر بود. که این نتایج خود در کنار کاهش بیان ژن STAT-3 و آنژیوپوپیتین-1-2-tie به طور ضمنی نشان‌دهنده تاثیر مثبت تمرینات تناوبی شدید بر فرایند آنژیوژنز در موش‌های مبتلا به سرطان پستان است. همچنین هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، Bacurau و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند اجرای تمرین HIIT منجر به افزایش عملکرد سیستم ایمنی و کاهش قابل توجه حجم تومور در رت‌های حامل تومور می‌شود (۳۳). Zhou و همکاران (۲۰۰۹) نیز، مشاهده کردند فعالیت هوازی با شدت متوسط (هر جلسه یک ساعت، پنج روز در هفته) منجر به کاهش تراکم عروقی در تومور پستانی رت‌های تمرین کرده نسبت به گروه کنترل شد، آنها همچنین گزارش دادند میزان بیان VEGF در گروه تمرینی کاهش قابل توجهی داشت (۳). در تحقیق حاضر تمرینات تناوبی شدید باعث کاهش عوامل آنژیوژنیک STAT-3 و آنژیوپوپیتین-1-2-tie شده و همسو با آن حجم تومور را کاهش داد. لازم به ذکر است که تحقیقات در زمینه تغییرات بیان ژن STAT-3 و آنژیوپوپیتین-1-2-tie و همچنین حجم تومور در نمونه‌های توموری و مبتلا به سرطان در شرایط پاتولوژیکی نسبت تمرینات ورزشی به ویژه تمرینات شدید و تناوبی بسیار محدود بوده و به همین دلیل تفسیر نتایج را در این زمینه مشکل می‌سازد.

### References

1. Wang J, Yang M, Li Y, Han B. The Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Breast Cancer. *Drug Dev Res* 2015; 76(7): 368-74.
2. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19(53):6102-14.

3. Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ. Energetics and mammary carcinogenesis: effects of moderate-intensity running and energy intake on cellular processes and molecular mechanisms in rats. *J Appl Physiol* 2009; 106: 911-8.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
5. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 14: 407.
6. Thompson HJ, Jiang W, Zhu Z. Candidate mechanisms accounting for effects of physical activity on breast carcinogenesis. *IUBMB life* 2009; 61(9): 895-901.
7. Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive Angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis* 2014; 17(3): 499-509.
8. Irwin ML, Smith AW, McTiernan A, Ballard-Barbash R, Cronin K, Gilliland FD, et al. Influence of pre- and postdiagnosis physical activity on mortality in breast cancer survivors: the health, eating, activity, and lifestyle study. *J Clin Oncol* 2008; 20:3958-64.
9. Holick CN, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Titus-Ernstoff L, Bersch AJ, Stampfer MJ, Baron JA, Egan KM, Willett WC. Physical activity and survival after diagnosis of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(2): 379-86.
10. Holmes MD, Chen WY, Feskanich D, Kroenke CH, Colditz GA. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. *JAMA.* 2005; 293(20):2479-86.
11. Schmitz KH, Courneya KS, Matthews C, Demark-Wahnefried W, Galvão DA, Pinto BM, et al. American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(7):1409-26.
12. McNeely ML, Campbell KL, Rowe BH, Klassen TP, Mackey JR, Courneya KS. Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 2006; 175(1): 34-41.
13. Zhang LJ, Liu W, Gao YM, Qin YJ, Wu RD. The expression of IL-6 and STAT3 might predict progression and unfavorable prognosis in Wilms' tumor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 435(3):408-13.
14. Chen Z, Han ZC. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev* 2008; 28(2):185-200.
15. Staton CA, Hoh L, Baldwin A, Shaw L, Globe J, Cross SS, Reed MW, Brown NJ. Angiopoietins 1 and 2 and Tie-2 receptor expression in human ductal breast disease. *Histopathology* 2011; 59(2):256-63.
16. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol* 2012; 124(6):763-75.
17. Danza K, Pilato B, Lacalamita R, Addati T, Giotta F, Bruno A, Paradiso A, Tommasi S. Angiogenetic axis angiopoietins/Tie2 and VEGF in familial breast cancer. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(8): 824-30.
18. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(17):11205-10.
19. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6):653-60.
20. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, Pithon-Curi TC. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 2007; 21(3):751-6.
21. 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. *J Appl Physiol* 2010; 108(2): 343-8.
22. Gustafsson T, Rundqvist H, Norrbom J, Rullman E, Jansson E, Sundberg CJ. The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 103(3):1012-20.

23. Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 83(9):1154-60.
24. Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2011; 186:13-42.
25. Friedenreich CM, MacLaughlin S, Neilson HK, Stanczyk FZ, Yasui Y, Duha A, et al. Study design and methods for the Breast Cancer and Exercise Trial in Alberta (BETA). *BMC Cancer* 2014; 14: 919-934.
26. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137(3):869-82.
27. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):359-71.
28. Singh D, Upadhyay G, Srivastava RK, Shankar S. Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1):13-27.
29. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21(13):2000-8.
30. Tsai MS, Kuo ML, Chang CC, Wu YT. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. *Cancer Biomark* 2013; 13(5):307-13.
31. DeBusk LM, Chen Y, Nishishita T, Chen J, Thomas JW, Lin PC. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9):2461-71.
32. Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(9):1-13.
33. Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, Moraes MR, Pontes FL Jr, Pesquero JL, Araújo RC, Bacurau RF. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(10):1289-99.