

اثر تمرینات استقامتی بر سطوح سایتوکاین های اینترلوکین ۶ و فاکتور رشد اپی تلایال عروق بافتی موش های مبتلا به سرطان پستان

صادق امانی شلمزاری^۱، حمید آقا علی نژاد^{۲*}، شعبان علی زاده^۳، عبدالرضا کاظمی^۱، محمد امین ساعی^۱، ندا مینایی^۴، فاطمه شکرالهی^۵

^۱دانشجوی فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ ^۲گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛

^۳گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ ^۴دانشجوی هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

^۵دانشجوی فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۴

چکیده:

زمینه و هدف: تمرینات ورزش پتانسیلی در جهت پیشگیری از سرطان پستان دارد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات پیشگیری و کمک درمانی تمرینات ورزشی بر سایتوکاین های درگیر در رگ زایی تومور سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مداخله ای ۵۰ سر موش بальب سی ماده به طور تصادفی در چهار گروه قرار گرفتند. پس از آشناسازی با محیط دو گروه از موش ها به مدت ۸ هفته تمرین استقامتی تداومی را انجام دادند و سپس سلول های سرطانی وابسته به استروژن (MC4-L2) به همه موش ها تزریق گردید. پس از آن یک گروه از موش های تمرین کرده و یک گروه از موش های تمرین نکرده به مدت ۶ هفته، ۵ روز در هفته تمرینات استقامتی را انجام دادند. حجم تومور به صورت هفتگی با کولیس دیجیتالی اندازه گیری شد. در پایان موش ها قربانی شدند و بافت تومور برداشته و سطوح سایتوکاین های اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور رشد اپی تلایال عروق (VEGF) با روش الیزا اندازه گیری شد.

یافته ها: بین گروه ها در میزان مقادیر IL-6 و VEGF و میزان رشد تومور تفاوت معناداری وجود داشت ($P < 0.001$). میانگین سطح سایتوکاین های IL-6، VEGF و میزان رشد تومور در گروه هایی که پس از سرطانی شدن تمرین استقامتی انجام می دادند نسبت به دو گروهی که فعالیت نمی کردند کمتر بود ($P < 0.05$). نتیجه گیری: با توجه به افت مقادیر IL-6 و VEGF در گروه هایی که قبل از سرطانی شدن و پس از سرطانی شدن تمرینات ورزشی را انجام دادند؛ می توان گفت که تمرینات ورزشی علاوه بر نقش پیشگیرانه بسیار موثر، دارای نقش درمانی در تومورهای وابسته به گیرنده استروژن نیز می باشند.

واژه های کلیدی: سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن، تمرینات استقامتی، اینترلوکین ۶، فاکتور رشد اندوتلیوم عروق.

مقدمه:

از هر ۱۰ زن ایرانی یک نفر احتمال ابتلا به این بیماری را خواهد داشت. در ایران برخلاف کشورهای غربی زنان در سنین پایین تر، در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به این بیماری هستند و این مسأله اهمیت تشخیص، بررسی و کنترل این بیماری

سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان در زنان است و در کشورهای غربی در حدود یک سوم از کل سرطان های زنان را تشکیل می دهد (۱). در ایران سرطان پستان یکی از مشکلات مهم سلامتی زنان است که متأسفانه در حال افزایش است و تقریباً

همکاران در پژوهش خود بر روی ۵۶ بیمار سرطانی گزارش کردند برنامه ورزشی طراحی شده در کاهش میزان استرس، اضطراب و افسردگی زنان مبتلا به سرطان پستان تحت شیمی درمانی موثر بوده است (۹). علاوه بر اثرات روانی تمرینات ورزش، فعالیت جسمانی منظم خطر انواع متفاوت سرطان های بدخیم مانند سرطان روده، پستان، پروستات، رحم و ریه را کاهش می دهد (۱۰). در بسیاری از پژوهش ها کاهش حجم تومور به دنبال فعالیت منظم ورزشی گزارش شده است. اما تاکنون مکانیسم های دقیق آن مشخص نشده است (۱۱-۱۳). Zielinski و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند تمرینات استقامتی چگالی ماکروفاژها و نوتروفیل های داخل توموری که در تولید سایتوکاین های رگ زا نقش دارند را به ویژه در مراحل اولیه رشد تومور کاهش می دهد و منجر به کاهش حجم تومور می شود (۱۱). Murphy و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش حجم تومور را در موش های سرطانی گروه تجربی که به مدت ۲۰ هفته تمرینات استقامتی انجام می دادند را مشاهده کردند و آن را به افت عوامل التهابی نسبت دادند (۱۲).

رگ زایی درون تومور و ازدیاد جریان خون درون تومور برای رشد تومور ضروری می باشد. رگ زایی تشکیل عروق جدید بوده که برای رشد تومور و متاستاز پیش شرط اساسی است. فرضیه ای بیان می دارد به هنگام انجام فعالیت بدنی، بین ریز محیط تومور و عضلات فعال در بهره مندی از توزیع خون، اکسیژن و مواد مغذی مجادله ای صورت می گیرد. از آنجا که جریان خون تومور کاهش می یابد و متعاقباً کم اکسیژنی در قسمت میانی تومور رخ می دهد، احتمال وقوع آپوپتوز در تومور افزایش می یابد (۱۴). تاکنون پژوهشی این موضوع را با بررسی فاکتورهای درگیر در رگ زایی بررسی نکرده است.

اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور رشد اپی تلیال عروق (VEGF) دو سایتوکاین مهمی هستند که در

را در کشور نشان می دهد (۲،۳). سرطان پستان چندین زیر نوع مولکولی اصلی دارد که در یک تقسیم بندی آن ها را به سرطان های وابسته و غیر وابسته به گیرنده استروژن طبقه بندی می نمایند. اکثر سرطان های پستان تومورهای اپی تلیالی هستند که از سلول های استر مجراها یا لوبول های پستان ناشی می شوند و اصطلاحاً گیرنده آلفای استروژن ($ER\alpha$) مثبت نامیده می شوند. استفاده از مدل های حیوانی برای فهم مکانیزم های مرتبط با فعالیت بدنی و سرطان مهم هستند زیرا مطالعات اپیدمیولوژیکی که روی نمونه های انسانی صورت می گیرد، اطلاعات جزئی در مورد آغاز، پیشرفت یا بهبود سرطان در ارتباط با ورزش را به ما نمی دهد (۴). رده سلولی MC4-L2 که ما در این پژوهش استفاده کردیم نیز رده سلولی موشی است که $ER\alpha$ مثبت می باشد (۵).

امروزه از تمرینات ورزش به عنوان عامل موثر در پیشگیری از بیماری های التهابی مزمن یاد می شود. تمرینات بدنی با شدت متوسط با تقویت سیستم ایمنی و رهایی مایوکاین ها نقش ویژه ای در پیشگیری از بروز بیماری های التهابی از جمله سرطان پستان دارد. ورزش باعث کاهش درصد چربی بدن، کاهش چاقی و افت التهاب سیستمی با درجه پایین می شود. از آنجا که هر کدام از این عوامل در پاتوژنز سرطان نقش دارند، بنابراین تمرینات ورزش پتانسیلی در پیشگیری از سرطان دارد (۶). گزارش شده که ۹-۱۹ درصد سرطان ها به علت بی تحرکی و ۳۰ درصد به علت چاقی است؛ لذا فعالیت بدنی و سبک زندگی فعالانه نقش موثری در پیشگیری از سرطان دارد و گزارش شده که می توان از ۵۰ درصد سرطان ها پیشگیری کرد (۷،۸).

در سال های اخیر، در کشورهای پیشرفته حوزه های جدیدی در رابطه با تمرینات ورزش شکل گرفته است که با رویکرد درمانی به ورزش نگاه می کنند. در این راستا توجه زیادی به اثرات روانی تمرینات ورزشی شده است به طور مثال آقابراری و

درمانی در بازداری از رشد تومور دارد و اینکه آیا تمرینات ورزشی قبل از وقوع سرطان نقشی در بازداری از رشد تومور با بررسی سایتوکاین های درگیر در رگ زایی دارد؟

روش بررسی:

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شده است. بدین منظور ۵۰ سر موش ماده بلب سی ۳ تا ۵ هفته با وزن ۱۵-۱۴ گرم از انیستیتو پاستور خریداری و به حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. پس از یک هفته آشناسازی با محیط (نور، دما و رطوبت)، موش ها به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه به مدت ۸ هفته تمرینات استقامتی را مطابق جدول شماره ۱ انجام دادند و گروه دیگر به زندگی خود ادامه دادند. پس از آن همه موش ها با تزریق سلول سرطانی شدند و پس از پیدایش تومور، نیمی از موش های تمرین کرده و نیمی از موش های تمرین نکرده تمرینات استقامتی را انجام دادند. با این توضیحات این پژوهش دارای ۴ گروه ورزش- تومور- ورزش (ETE)، ورزش- تومور- استراحت (ETR)، استراحت- تومور- ورزش (RTE) و استراحت- تومور- استراحت (RTR) می باشد. مرحله آشناسازی دو گروهی که ۸ هفته استراحت داشتند، در هفته هشتم پروتکل تمرین صورت گرفت. لازم ذکر است که از ۳۰ سر موشی که در ابتدا ۸ هفته تمرین کردند تنها ۱۴ موش به سرطان مبتلا شدند (۷ موش در گروه ورزش- تومور- ورزش و ۷ موش در گروه ورزش- تومور- استراحت) و مابقی سلول های سرطانی را نپذیرفتند (به علت ورزش یا عملکرد سیستم ایمنی) و از ۲۰ موش گروه هایی که در ابتدا استراحت کردند همگی سرطانی شدند و از این دو گروه ۲ موش برای تعیین ویژگی های تومور قربانی شدند.

ریز محیط تومور تولید می شوند و نقش موثری در رگ زایی درون تومور دارند. IL-6 سایتوکاینی پلیوتروفیک است که نقش پیش التهابی در ریز محیط تومور دارد و در رگ زایی و متاستاز نقش دارد (۱۵). تحقیقات نشان می دهند IL-6 با غلظت بالایی در سلول های سرطان پستان انسان وابسته به گیرنده استروژن (۱۶) و نمونه های توموری پستان تولید می شود (۱۷). گزارش شده سطوح سرمی IL-6 با مرحله بالینی و درجه وخامت تومور همبستگی دارد (۱۸). حتی در مطالعاتی که از سرم خون بیماران دچار متاستاز پستان به عمل آمد سطوح IL-6 به عنوان متغیر مستقل تشخیصی برای پیشرفت معرفی شد (۱۹). نقش مهم IL-6 در سرطان پستان تحریک فعالیت آروماتاز و تولید VEGF می باشد. IL-6 تولید مولکول های پیش رگ زایی مانند VEGF را تنظیم افزایشی می کند (۲۰). همچنین، IL-6 تبدیل پیش سازهای استروژن مانند استرون را به استروژن (استرادیول) تحریک می کند (۲۱، ۲۲). تاکنون پژوهشی اثر تمرینات استقامتی را بر IL-6 تومور پستان بررسی نکرده است.

VEGF نیز سایتوکاین رگ زای قوی در بافت های سالم و تومور می باشد که تکثیر سلول اندوتلیال را تحریک می کند (۲۳). VEGF در سرطان پستان در مقایسه با بافت سالم پستان بیش بیان می شود و سطوح آن با تراکم ریز عروق رابطه دارد و به طور بارزی با درجه تومور و تهاجم سلول های سرطانی همبستگی دارد (۲۰، ۲۴). تاکنون پژوهشی اثر تمرینات استقامتی تداومی را بر VEGF بافت تومور بررسی نکرده است.

با توجه به اینکه پژوهش های انگشت شماری مکانیزم های مولکولی اثر تمرینات ورزش بر درمان سرطان را بررسی کرده اند در این پژوهش به دنبال بررسی این موضوع می باشیم که آیا فعالیت بدنی منظم از طریق تعدیل در رگ زایی درون تومور نقش

جدول شماره ۱: پروتکل تمرین ورزشی بر روی نوار گردان در گروه های مختلف

دوره تمرین	گروه ها	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)
مرحله آشنا سازی	دو گروه ورزشی	۶-۱۰	۲۰
قبل از سرطانی شدن	ورزش - تومور - ورزش	۱۴	۳۰
	ورزش - تومور - استراحت	۱۴	۳۰
دو هفته ی دوم	ورزش - تومور - ورزش	۱۶	۳۵
	ورزش - تومور - استراحت	۱۶	۳۵
دو هفته ی سوم	ورزش - تومور - ورزش	۱۸	۳۵
	ورزش - تومور - استراحت	۱۸	۳۵
دو هفته ی چهارم	ورزش - تومور - ورزش	۲۰	۴۰
	ورزش - تومور - استراحت	۲۰	۴۰
پس از سرطانی شدن	ورزش - تومور - ورزش	۱۴	۲۵
	استراحت - تومور - ورزش	۱۴	۲۵
دو هفته ی دوم	ورزش - تومور - ورزش	۱۶	۳۰
	استراحت - تومور - ورزش	۱۶	۳۰
دو هفته ی سوم	ورزش - تومور - ورزش	۱۸	۳۰
	استراحت - تومور - ورزش	۱۸	۳۰

در همه گروه ها مدت تمرین در هفته ۵ روز بود.

فلاکس را داخل لوله فالکون ریخته و آن را در دور ۱۲۰۰ به مدت ۳-۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده، در مرحله بعد مایع رویی را برداشته و پلاک سلولی را در داخل محیط حاوی FBS ۱۰٪ حل می نمائیم. 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 در هر میلی لیتر بافر PBS تهیه گردید. سپس به هر موش بآلب سی ماده پس از بی هوشی با دز مناسب کتامین و زایلوزین (۱۰ میلی گرم به ۱ میلی گرم)، یک میلیون سلول به صورت زیر جلدی به ناحیه بالای ران سمت راست تزریق گردید. در حدود ۱۰-۲۰ روز پس از تزریق سلول های سرطانی، تومور در ناحیه تزریق شده قابل لمس می باشد.

برای انجام کشت سلول، سلول کارسینوما ی مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (MC4-L2) برای اولین بار توسط این تیم تحقیقاتی از محققان دانشگاه بوینس آیرس آرژانتین (۵) خریداری شد و پس از تکثیر و تأیید آن جهت استفاده سایر محققین به موسسه ذخایر ژنتیکی ایران هدیه گردید. سلول های MC4-L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی سلین ۱۰۰ µg/ml، استراپتومايسن ۱۰۰ µg/ml و FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند. پس از پرکردن ۹۰ درصد سطح فلاسک به وسیله سلول ها، مایع رویی برداشت شده و پس از شستشو با PBS، در مرحله بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵ از کف پلیت سلول ها جدا شده و پس از خنثی سازی آنزیم با محیط حاوی FBS ۱۰٪، کلیه محتویات

حجم تومور در ۲ بعد اندازه گیری 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 اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول محاسباتی حجم تومور $[V=\pi/6 (w \times L^2)]$ میزان آن تعیین شد (۲۵). سپس عدد محاسباتی روز آخر تقسیم بر روز اول شد تا میزان نهایی حجم تومور برای عملیات بعدی در هر موش به دست آید. به منظور اندازه گیری سطوح متغیرها، پس از قربانی نمودن موش ها، بلافاصله بافت تومور برداشته شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکرور) حذف گردید و قسمت رویی تومور در نیتروژن مایع فریز گردید و در دمای ۷۰- نگهداری شد. در آزمایشگاه، میزان ۱۰۰ میلی گرم بافت تومور 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 (۱۰ دقیقه، ۱۵۰۰ g و ۴ درجه سلسیوس) قطعات بزرگ رسوب کردند و از سوپرناتانت رویی برای اندازه گیری پروتئین ها به روش برادفورد استفاده گردید. محلول لیزات حاوی NaCl، KCl، Na_2HPO_4 و PMSF بود که در ۹۵۰ ml آب مقطر دیونیزه حل کرده و پس از تنظیم pH

حجم تومور در ۲ بعد اندازه گیری 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 اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول محاسباتی حجم تومور $[V=\pi/6 (w \times L^2)]$ میزان آن تعیین شد (۲۵). سپس عدد محاسباتی روز آخر تقسیم بر روز اول شد تا میزان نهایی حجم تومور برای عملیات بعدی در هر موش به دست آید. به منظور اندازه گیری سطوح متغیرها، پس از قربانی نمودن موش ها، بلافاصله بافت تومور برداشته شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکرور) حذف گردید و قسمت رویی تومور در نیتروژن مایع فریز گردید و در دمای ۷۰- نگهداری شد. در آزمایشگاه، میزان ۱۰۰ میلی گرم بافت تومور 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 (۱۰ دقیقه، ۱۵۰۰ g و ۴ درجه سلسیوس) قطعات بزرگ رسوب کردند و از سوپرناتانت رویی برای اندازه گیری پروتئین ها به روش برادفورد استفاده گردید. محلول لیزات حاوی NaCl، KCl، Na_2HPO_4 و PMSF بود که در ۹۵۰ ml آب مقطر دیونیزه حل کرده و پس از تنظیم pH

با اسید کلریدریک ۱ نرمال، محلول به حجم یک لیتر رسانده می شود. اندازه گیری و تعیین کمیت متغیرهای مورد سنجش با روش آزمایشگاهی الایزا بر اساس دستور العمل هر کیت صورت گرفت. برای اندازه گیری IL-6 از کیت الایزای ab100713 و برای اندازه گیری VEGF از کیت ab100752 ساخت شرکت abcam استفاده شد.

یافته ها:

برای انجام تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم افزار SPSS-16 و آزمون آماری One way ANOVA و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. از میانگین و انحراف استاندارد نیز برای گزارش مقادیر متغیرهای سنجیده شده استفاده گردید.

داده ها نشان می دهند پایین ترین مقادیر این دو سایتوکاین به میزان $38/5 \pm 75/1$ pg/ml برای IL-6 و $162/9 \pm 246/6$ pg/ml برای VEGF مربوط به گروه ورزش- تومور- ورزش می باشد و در مجموع گروه هایی که تمرینات استقامتی را پس از سرطانی شدن انجام می دادند، نسبت به دو گروه دیگر مقادیر IL-6 و VEGF پایین تری داشتند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: تأثیر تمرینات ورزشی قبل و پس از سرطانی شدن بر متغیرهای مورد بررسی

متغیرها	گروه های پژوهش	ورزش- تومور- ورزش	ورزش- تومور- استراحت	استراحت- تومور- ورزش	استراحت- تومور- استراحت
اینترلوکین ۶ (pg/ml)	۷۵/۱±۳۸/۵	۱۵۸/۳±۵۵/۳۵	۱۲۴/۷±۳۴/۱	۱۹۵/۸±۵۹/۷	
فاکتور رشد اپی تلیال عروق (pg/ml)	۲۴۶/۶±۱۶۲/۹	۷۶۸±۱۱۶/۹	۳۴۱/۵±۳۴/۹	۷۸۳/۳±۲۷۷/۸	
حجم تومور هفته اول	۰/۰۵۲±۰/۰۰۱	۰/۰۴۸±۰/۰۰۷	۰/۰۷۷±۰/۰۱۰	۰/۰۵۴±۰/۰۱۲	
حجم تومور هفته ششم (cm ²)	۰/۲۴±۰/۰۱۴	۰/۲۹۶±۰/۰۰۲	۰/۲۸±۰/۰۳۱	۰/۴۱۶±۰/۱۱	
حجم تومور هفته ششم تقسیم بر هفته اول	۴/۵۷±۰/۲۴	۶/۲۳±۰/۶۰	۳/۶۹±۰/۵۰	۷/۵۷±۱/۶۷	

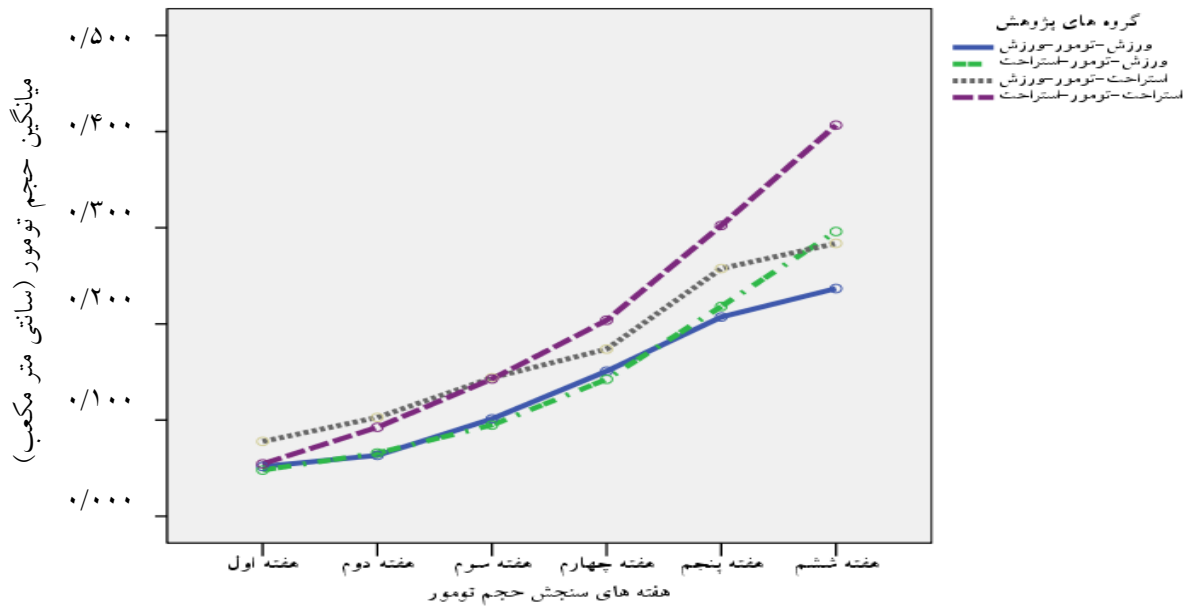
مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف استاندارد می باشد.

رشد تومور دارد. نتایج نشان می دهد میزان رشد تومور بین گروه ها تفاوت معنادار دارد ($P=0/0001$) و این اختلاف معنادار بین گروه هایی که پس از القای تومور تمرینات استقامتی را انجام می دادند با دو گروه دیگر بود. نحوه رشد تومور بین گروه ها در طول اجرای پروتکل تحقیق نشان داد. رشد تومور در همه گروه ها در حال افزایش یافتن می باشد؛ اما میزان رشد در گروه ETE و RTE شیب کمتری دارد. حجم تومور در گروه RTE بالاتر از ETR می باشد. البته باید به این نکته توجه داشته باشیم که میانگین حجم تومور که در ابتدا در گروه ها ایجاد شد در گروه RTE بالاتر از دیگر گروه ها بود؛ اما میزان رشد آن کمتر از دو گروه RTR و ETR بوده است (نمودار شماره ۱). همچنین ضریب همبستگی قوی بین میزان رشد تومور و سطوح IL-6 ($P=0/0001$)، VEGF ($r=0/729$) و ($P=0/01$)، $r=0/45$ مشاهده شد.

آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد بین گروه ها در میزان مقادیر IL-6 ($P=0/0001$) و VEGF ($P=0/0001$) تفاوت معناداری وجود دارد (جدول شماره ۳). در واقع پروتکل تمرینات ورزشی توانسته بین گروه ها در مقادیر استراحتی شاخص های مورد سنجش تفاوت ایجاد کند. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین گروه ETE با دو گروهی که پس از سرطانی شدن استراحت می کردند (RTR و ETR). در متغیرهای پژوهش تفاوت معناداری وجود دارد (جدول شماره ۳). همچنین این تفاوت میان دو گروه RTE و RTR نیز مشاهده شد که این نتایج حاکی از اثرات درمانی تمرینات استقامتی دارند. جالب توجه بود که تفاوت معناداری بین دو گروه RTE و ETR ($P=0/002$) در متغیر VEGF دیده شد؛ اما در مورد IL-6 این اختلاف دیده نشد که تا حدودی بیانگر اثرات پیشگیرانه تمرینات استقامتی در جلوگیری از

جدول شماره ۲: تأثیر نتایج آزمون آنوای یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی متغیر های مورد بررسی در گروه های مختلف

P	آزمون تعقیبی توکی		آزمون آنوای یک طرفه		متغیرها
	گروه	گروه	P	F	
0/0001	استراحت- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			اینترلوکین ۶
0/022	ورزش- تومور- استراحت		0/001	8/16	
0/021	استراحت- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			
0/0001	ورزش- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			فاکتور رشد اپی تلیال عروق
0/0001	ورزش- تومور- استراحت		0/0001	14/72	
0/001	استراحت- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			
0/001	ورزش- تومور- استراحت				حجم تومور
0/0001	استراحت- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			
0/001	ورزش- تومور- استراحت		0/0001	25/6	
0/0001	استراحت- تومور- استراحت	ورزش- تومور- ورزش			
0/029	ورزش- تومور- استراحت				



نمودار شماره ۱: تغییرات حجم تومور در گروه های مختلف

بحث:

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات استقامتی بر سایتوکاین های درگیر در رگ زایی درون تومور بوده است. به این امید که آیا ورزش اثری درمانی بر سرطان پستان دارد و اینکه تمرینات استقامتی قبل از سرطانی شدن تأثیری بر مقاومت بدن در برابر سرطانی شدن دارد. نتایج نشان داد سطوح سایتوکاین های IL-6 و VEGF پس از تمرینات استقامتی در گروه هایی که ورزش انجام دادند نسبت به گروه هایی که هیچگونه فعالیتی نداشتند اختلاف معنادار دارد و سطوح این سایتوکاین ها در گروه های ورزشی پایین تر می باشد.

سایتوکاین هایی مانند IL-6 و IL-8 طیف گسترده ای از مسیرهای انتقال سیگنالی را فعال می کنند که منجر به تنظیم فرآیند رگ زایی می شود. پژوهش ها نشان می دهند این سایتوکاین ها منجر به فعالسازی مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B، JNK، ERK و P38 کیناز می شوند (۲۶) که نهایتاً سلول های اندوتلیال عروق را تحریک می کنند تا VEGF تولید کنند. VEGF نه تنها یک میتوزن قوی برای سلول های اندوتلیال عروق است بلکه فاکتور نفوذپذیری عروقی است که موجب تولید مستمر فیبرین و فیبرونکتین برای

تولید ماتریکس بافتی می شود (۲۷). در پژوهش حاضر مشاهده کردیم گروه هایی که پس از القای تومور تمرینات استقامتی را انجام می دهند، سطوح IL-6 و VEGF بافت تومور آن ها نسبت به گروه هایی که تمرین انجام نمی دهند کاهش معنادار می یابد. فعالیت استقامتی منظم موجب کاهش سطوح سایتوکاین های پیش التهابی مانند IL-6 در بافت تومور می شود و از آنجا که این سایتوکاین نقش موثری در تولید VEGF از طریق تحریک بیان HIF- α دارد (۲۴) و افت این سایتوکاین در گروه هایی که فعالیت ورزشی دارند به این معنی است که شاید فعالیت بدنی منظم از طریق سرکوبی تولید سایتوکاین های پیش التهابی موجب کاهش رگ زایی در تومور شود. این نتایج با میزان رشد تومور نیز همخوانی دارد، یعنی میزان رشد تومور در گروه هایی ورزشی پایین تر است.

پژوهش های مختلف نشان دادند کاهش حجم تومور به دنبال انجام تمرینات منظم ورزشی روی می دهد (۱۱، ۲۸، ۲۹). در پژوهش حاضر نیز کاهش حجم تومور و افت میزان رشد تومور در گروه های ورزشی نیز مشاهده شد. در پژوهشی هم راستا با پژوهش حاضر،

Murphy و همکاران کاهش حجم تومور را پس از ۲۰ هفته تمرین در موش های سرطانی گزارش کردند که آن را به کاهش سایتوکاین های التهابی مانند IL-6 و MCP-1 درون سرم نسبت دادند و ارتباط مستقیمی بین سایتوکاین های التهابی و حجم تومور گزارش کردند (۱۲). در پژوهش حاضر نیز کاهش حجم تومور در گروه های ورزشی مشاهده شد و با توجه به ارتباط قوی مشاهده شده بین سطوح IL-6 و حجم تومور ($r=0.729$)، کاهش حجم تومور در گروه های ورزشی را به افت عوامل التهابی درون تومور نسبت می دهیم و از این بابت یافته های پژوهش حاضر نسبت به پژوهش Murphy و همکاران در توجیه رابطه بین سایتوکاین های التهابی با تغییرات حجم تومور قابل توجیه تر است، چون به نظر می رسد سطوح موضعی سایتوکاین ها در ریز محیط تومور نسبت به سطوح در گردش و سیستمیک آن ها تأثیر بیشتری در تغییرات رشد تومور داشته باشد. از آنجا که رگ زایی اساس رشد تومور می باشد و با دانستن کاهش سطوح مارکرهای رگ زا در این پژوهش، به نظر می رسد که کاهش رگ زایی درون تومور با انجام تمرینات منظم استقامتی موجب کاهش حجم تومور در این گروه ها گردیده است. از آنجا که سرکوبی بیان IL-6 (۳۰) و VEGF (۳۱) در درون بافت تومور هدف درمانی برای جلوگیری از رشد تومور می باشد؛ لذا با توجه به این که فعالیت منظم ورزشی این قابلیت را دارد می توان ادعا نمود که تمرینات منظم ورزشی در بازداری از رشد تومور حداقل در سرطان های وابسته به گیرنده استروژن نقش درمانی نیز دارد.

در پژوهشی دیگر Zielinski و همکاران نشان دادند فعالیت استقامتی بر رشد تومور با اثرگذاری بر ریز محیط تومور اثرگذار است و منجر به تأخیر در رشد تومور می شود. پژوهشگران بر این باورند با اجرای ورزش منظم استقامتی چگالی ماکروفاژها و نوتروفیل های داخل توموری به ویژه در مرحله اول رشد تومور کاهش می یابد وجود عوامل التهابی نظیر ماکروفاژها و

نوتروفیل ها در داخل تومور دو نقش متفاوت را بازی می کند. از یک سو، توانایی انهدام سلول های توموری را دارند و از سوی دیگر با تولید فاکتورهای رشدی و مویرگ زایی موجب تسریع رشد و تکثیر تومور می شوند (۱۱). اگرچه کاهش این عوامل التهابی اندازه های تومور را تغییر نمی دهند، رشد و از همه مهم تر میزان رشد تومور را به تأخیر می اندازد. در پژوهش حاضر مقادیر و تعداد سلول های ایمنی درون تومور سنجیده نشد اما به توجه به اینکه منبع اصلی سایتوکاین های التهابی درون تومور به ویژه IL-6 سنجیده شده در این پژوهش سلول های ایمنی می باشند و از آنجا که سطوح این سایتوکاین در درون تومور کاهش یافته است، تا حدودی کاهش این سایتوکاین درون تومور را می توان به تعدیل سطوح سلول های ایمنی درون تومور نسبت داد. IL-6 رشد تومور را به وسیله تنظیم افزایشی پروتئین های آنژیوژنیک و آنتی آپوپتوتیک در سلول های توموری افزایش می دهد. در سرطان های وابسته به گیرنده استروژن، استروژن، استروژن پس از اتصال به گیرنده اش موجب فعالسازی NF- κ B می شود و این فاکتور رونویسی موجب افزایش بیان IL-6 می شود. IL-6 علاوه بر تحریک تولید VEGF که موجب رگ زایی درون تومور می شود، از طریق مسیر IL-6/STAT3 موجب سرکوبی پروتئین تنظیم مرگ برنامه ریزی شده سلول-۴ (PDCD4) و تروپومیوزن-۱ (TMP-1) و افزایش تولید پروتئین ضدآپوپتوز لئفوما سلول B (BCL2) می شود (۲۶)؛ لذا این سایتوکاین نقش موثری در فعالیت ضدآپوپتوزی درون سلول های توموری دارد. پژوهش حاضر نشان داد فعالیت ورزشی موجب کاهش سطوح IL-6 درون تومور در گروه های ETE و RTE می شود؛ لذا تمرینات ورزشی این توانایی را دارد که از رگ زایی و فعالیت ضدآپوپتوزی درون تومور بازداری کند.

یکی از مشاهده جالب ما در این پژوهش این بود که حجم تومور در گروه RTE بزرگ تر از گروه ETR بود، با توجه به اینکه گفته می شود تمرینات

موش ها به سرطان پستان مبتلا شدند (۳۰ موش ۸ هفته تمرین کردند که تنها ۱۳ موش به سرطان مبتلا شدند). همچنین، پس از بروز سرطان مقادیر IL-6 و VEGF در گروه ETE نسبت به RTE و گروه ETR نسبت به RTR کمتر بود. احتمالاً محیط التهابی که با بالاتر بودن سطوح سایتوکاین ها التهابی مشخص می شود زمینه مستعد برای رشد اولیه تومور را فراهم می آورد و ورزش از طریق کاهش سطوح سایتوکاین های پیش-التهابی زمینه مستعد برای رشد تومور را از بین می برد. جالب توجه نیز این نکته بود که میزان و شیب رشد تومور در ۲-۳ هفته اول پس از القای تومور در دو گروه ETR و ETE پایین تر از دو گروه دیگر بود؛ اما در گروه ETR به علت اینکه بی تمرینی روی می دهد، پس از هفته سوم میزان رشد به یک باره افزایش می یابد. مسلماً پایین تر بودن میزان رشد و رد تومور در بسیاری از موش هایی که قبل از القای تومور تمرینات ورزشی را انجام می دهند حاکی از اثر قوی پیشگیری ورزش در بروز سرطان دارد.

نتیجه گیری:

داده های این پژوهش تمرینات استقامتی با شدت متوسط را در کاهش سطوح سایتوکاین های التهابی و رگ زار درون تومور و متعاقباً کاهش حجم تومور موثر می داند و با توجه به داده ها می توان ادعا نمود تمرینات ورزشی علاوه بر نقش پیشگیرانه نقش کمک درمانی در سرطان های وابسته به گیرنده استروژن دارند.

تشکر و قدردانی:

داده های پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری دو تن از دانشجویان دکتری فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس می باشد.

استقامتی نقش درمانی دارند به نظر تعارضی بین این نکته و حجم تومور در این گروه (RTE) وجود دارد. برای این مطلب دو دلیل وجود دارد: اول اینکه میزان رشد در این گروه پایین تر بود یعنی حجم تومور اولیه این گروه بزرگ تر از گروه ETR بود و این خود نقش ورزش در بازداری و شکل گیری تومور در این دو گروه را نشان می دهد. بدین معنی که گروه هایی که از قبل تمرین ورزشی را انجام می دادند به هنگام شکل گیری تومور، تومورهای کوچکتری داشتند. اما پس از انجام تمرینات ورزشی مشخص است که میزان رشد تومور در گروه RTE کمتر شده است. نکته دیگر به مشاهدات ما از تومور بر می گردد. قسمت مرکزی تومور معمولاً به علت نرسیدن خون و اکسیژن دچار نکروز می گردد. ما مشاهده کردیم که قسمت مرکزی یا نکروزی تومور در این گروه بسیار بزرگ تر از دیگر گروه ها بود و به نظر می رسد تمرینات استقامتی موجب افزایش استرس نکروزی در درون تومور می شود. این نظریه که بین عضلات فعال و بافت تومور در دریافت حجم خون و مواد مغذی رقابت به وجود می آید و در این مجادله گردش خون به سمت عضلات فعال سوق می یابد درست می باشد و احتمالاً بافت توموری با دریافت حجم خون کمتر و متعاقباً اکسیژن و مواد مغذی کمتر (مواد مغذی و تروفیک فاکتورها در عضلات فعال مصرف می شوند) استرس نکروزی و آپوپتوزی بیشتری را متحمل می شود.

تمرینات ورزشی نقش موثری در پیشگیری از بروز بیماری های متابولیکی و التهابی دارند و در این نکته تقریباً همه پژوهشگران هم راستا می باشند. مسلماً فعالیت بدنی از طریق تولید مایوکاین های مختلف از بافت عضلانی نقش موثری در سلامتی بدن و سایر ارگان ها دارد (۳۲). در پژوهش حاضر نیز نتایج نشان داد اجرای تمرینات استقامتی قبل از القای سرطان در موش ها نقش پیشگیری دارد، به طوری که در ابتدا و پس از تزریق سلول های سرطانی کمتر از نیمی از

منابع:

1. Kruk J, Aboul-Enein HY. Psychological stress and the risk of breast cancer: a case-control study. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28(6): 399-408.
2. Ebrahimi M, Vahdaninia M, Montazeri A. Risk factors for breast cancer in Iran: a case-control study. *Breast Cancer Res: BCR.* 2002; 4(5): R10.
3. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public health.* 2000; 114(2): 143-5.
4. Hoffman-Goetz L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(11): 1828-33.
5. Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res.* 2001; 61(1): 293-302.
6. LEE I-M. Physical Activity and Cancer Prevention-Data from Epidemiologic Studies. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(11): 1823-7.
7. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2010; 46(14): 2593-604.
8. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer lett.* 2010; 293(2): 133.
9. Aghabarari M, Ahmadi F, Agha AH, Mohammadi E, Hajizadeh E. Effect of designed exercise program on stress, anxiety and depression in women with breast cancer receiving chemotherapy. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2008; 9(4): 26-35
10. Na HK, Oliynyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1229: 176-83.
11. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol.* 2004; 96(6): 2249-56.
12. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux TL, McClellan JL, Steiner JL, Carmichael MD, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine.* 2011; 55(2): 274-9.
13. Jones LW, Antonelli J, Masko EM, Broadwater G, Lascola CD, Fels D, et al. Exercise modulation of the host-tumor interaction in an orthotopic model of murine prostate cancer. *J Appl Physiol.* 2012; 113(2): 263-72.
14. Thompson HJ, Jiang W, Zhu Z. Candidate mechanisms accounting for effects of physical activity on breast carcinogenesis. *IUBMB Life.* 2009; 61(9): 895-901.
15. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer.* 2007; 110(9): 1911-28.
16. Sullivan NJ. Interleukin-6 in the breast tumor microenvironment. in: gunduz m, gunduz e, editors. *breast cancer - focusing tumor microenvironment, stem cells and metastasis: InTech;* 2011: 584.
17. Honma S, Shimodaira K, Shimizu Y, Tsuchiya N, Saito H, Yanaihara T, et al. The influence of inflammatory cytokines on estrogen production and cell proliferation in human breast cancer cells. *Endocr J.* 2002; 49(3): 371-7.
18. Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2003; 103(5): 642-6.
19. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, et al. An analysis of serum interleukin-6 levels to predict benefits of medroxyprogesterone acetate in advanced or recurrent breast cancer. *Oncology.* 2000; 59(2): 166-73.
20. Longatto Filho A, Lopes JM, Schmitt FC. Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol.* 2010; 2010.
21. Purohit A, Newman SP, Reed MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002; 4(2): 65-9.

22. Dethlefsen C, Hojfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 138(3): 657-64.
23. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(8): 1782-90.
24. Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(7): 2353-8.
25. 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.
26. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009; 139(4): 693-706.
27. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357(9255): 539-45.
28. Jones LW, Eves ND, Courneya KS, Chiu BK, Baracos VE, Hanson J, et al. Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(18): 6695-8.
29. Hoffman-Goetz L, May KM, Arumugam Y. Exercise training and mouse mammary tumour metastasis. *Anticancer Res.* 1994; 14(6B): 2627-31.
30. Paul-Pletzer K. Tocilizumab: blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. *Drugs Today (Barc).* 2006; 42(9): 559-76.
31. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, Weytjens R, Vermeulen PB, Dirix LY. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer.* 2002;2(4):311-5.
32. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011; 214(Pt 2): 337-46.

The effect of endurance training on the level of tissue IL-6 and VEGF in mice with breast cancer

Amani-Shalamzari S¹, Aghaalinejad H^{2*}, Alizadeh SH³, Kazemi AR¹, Saei MA¹,
Minayi N⁴, Shokrolahi F⁵

¹Student of Physical Education & Sport Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran;

²Physical Education & Sport Sciences Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran;

³Hematology Dept., Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; ⁴Student of Hematology Dept., Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IR. Iran; ⁵Student of Physical Education & Sport Sciences, Islamic Azad University, Tehran branch, Tehran, I.R. Iran.

Received: 26/Jun/2013 Accepted: 26/Oct/2013

Background and aims: The sport exercises include a potential to prevent breast cancer. The aim of this study was assessing the prophylactic effect and adjuvant therapy of exercise on cytokines involved in angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer.

Methods: Thirty- two female Balb/C mice were randomly assigned in 4 groups. After orientation in the environment, two groups of mice performed continuous endurance exercise for 8 weeks, and then estrogen-dependent MC4L2 cancer cells were injected to them. After that, one group of each of trained and non-trained mice performed endurance exercise 5 days per week for 6 weeks. Tumor volume was measured by a digital caliper weekly. Finally, the mice were sacrificed; tumor tissue was removed. Tumor sample was homogenized and the level of IL-6 and VEGF were measured using ELISA.

Results: There was a significant difference in the level of IL-6 and VEGF among the groups and tumor growth ($p < 0.001$). The level mean of IL-6 and VEGF cytokines and tumor growth in groups performing endurance exercise after malignancy (RTE and ETE) was lower than groups not performing (ETR and RTR), ($P < 0.05$).

Conclusion: Due to reduction of the level of these cytokines in groups doing exercise before and after malignancy, exercise training is presumed to have adjuvant therapy in estrogen-receptor dependent tumors in addition to very effective prophylactic role.

Keywords: Estrogen receptor dependent cancer, Endurance training, IL-6, VEGF.

Cite this article as: Amani-Shalamzari S, Aghaalinejad H, Alizadeh SH, Kazemi AR, Saei MA, Minayi N, et al. The effect of endurance training on the level of tissue IL-6 and VEGF in mice with breast cancer. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(2): 10-21.

***Corresponding author:**

Physical Education & Sport Sciences Dept., Tarbiat Modares University, Tel:0098218882001,
E-mail: ahaalinejad@gmail.com