مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۷/ ۲۴-۱۳

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرینات هوازی موش های صحرایی باردار نژاد اسپراگدولی بر بیان ژن *BRCA1* و *P53* در بافت پستان فرزندان ماده بالغ

ریحانه زرباف[۱]، مریم کوشکی جهرمی[۱*]، محمد صوفی آبادی[۲]، فرهاد دریانوش[۱]، امیر پیمانی[۳]

[۱]گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران؛ [۲]گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران؛ [۳]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: **دوران بارداری به‌عنوان بخش مهمی از زندگی زنان، از جوانب مختلف ازجمله فعالیت بدنی می تواند بر شاخص‌های مختلف سلامت نوزاد موثر باشد. یکی از بیماری‌های رایج و رو به گسترش زنان سرطان سینه است که *BRCA1* و *TP53* از شاخص‌های مرتبط با آن است. لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر تمرین هوازی در دوران بارداری در موش‌های صحرایی باردار بر بیان ژن *BRCA1* و *TP53* در بافت پستان فرزندان آنان انجام شد.**

روش بررسی: **با این هدف، ۲۰ سر رت ماده با نژاد اسپراگداولی به‌طور تصادفی به دو گروه تمرین (T) با وزن تقریبی (۸/۹±۲۲۱ گرم) و کنترل (C) (۱۲/۸±۲۲۳ گرم) تقسیم شدند. تمرین هوازی بارداری بلافاصله بعد از مشاهده پلاک واژنی- نشانگر بارداری- به مدت ۲۱ روز و ۵ جلسه در هفته با شدت متوسط انجام شد و حدود ۲ تا ۳ روز قبل از زایمان خاتمه یافت. بافتگیری از جفت های ٤، ٥ و ٦ بافت پستان بچه رت های سن ۸ هفتگی به‌منظور بررسی بیان ژن *BRCA1* و *P53* انجام شد. یافته ها به کمک نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک به‌منظور کنترل طبیعی بودن توزیع داده ها و آزمون t-test مستقل جهت مقایسه بین گروه ها مورد بررسی قرار گرفتند.**

یافته‌ها: **تمرین هوازی با شدت متوسط حین بارداری، موجب افزایش معنی‌دار mRNA ژن *BRCA1* شد (P=۰/۰۰۱)، ولی تأثیر معنی‌داری بر mRNA ژن *P53* نداشت (P=۰/٦۹).**

نتیجه‌گیری: **با توجه به تأثیر تمرین ورزشی دوران بارداری موش ها بر افزایش بیان ژن *BRCA1* در بچه‌های آنان و ارتباط این ژن با بروز سرطان سینه به نظر می رسد فعالیت در زمان بارداری می تواند احتمال ابتلا به سرطان پستان را در فرزندان کاهش دهد.**

واژه‌های کلیدی: **فعالیت هوازی، بارداری، *BRCA1*، سرطان پستان، فرزندان بالغ.**

مقدمه:

دوران بارداری از بخش های بسیار مهم زندگی زنان به حساب می آید که می‌تواند از جوانب مختلف ازجمله فعالیت بدنی بر سلامت نوزاد موثر باشد (۳-۱). تحقیقات نشان داده اند که می توان با تغذیه مطلوب و فعالیت زنان در دوران بارداری و قبل از آن از ابتلای نوزادان به بسیاری از بیماری های متابولیکی و قلبی- عروقی به میزان زیادی جلوگیری کرد (۵-۲). به نظر می رسد فعالیت بدنی می تواند در دوران بارداری بدون دخالت ترکیبات شیمیایی، موجب تغییرات بلندمدت در فنوتیپ و درنتیجه سلامت دوران جنینی و بزرگسالی شود (۴-۲). پژوهش‌های بسیاری کمی در زمینه تأثیر فعالیت مادر در بارداری بر روی سلامت فرزندان انجام شده است. Gaeini و همکاران بر روی تغییرات استئوژنیک و نیم رخ لیپیدی فرزندان در پی

***نویسنده مسئول:** شیراز- دانشگاه شیراز- گروه تربیت‌بدنی- تلفن: ۰۹۱۳٦۱۳٤٦٦٦، E-mail: koushkie53@yahoo.com*

فعالیت ورزشی ارادی مادر حین بارداری را مطالعه کردند (۶). همچنین بهبود هموستاز گلوکز و حساسیت به انسولین، بهبود عملکرد شناختی و جلوگیری از اختلال متابولیک در بچه رت ها در پی فعالیت ورزشی دوران بارداری نشان داده شده است (۴،۱۰-۷). برخی تحقیقات نیز نشان داده اند که فعالیت ورزشی در زمان بارداری بر شاخص های مختلف سلامت جنین، شامل رشد، استرس و وزن هنگام تولد، موثر است (۱۳-۱۱). همچنین مشاهده شده که فعالیت بدنی بر تعداد سلول‌های خونی بند ناف که در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شود، موثر می‌باشد (۱۰). Camarillo و همکاران نشان دادند که انجام فعالیت ورزشی اختیاری در دوران بارداری رت مادر، بر تومورزایی بافت پستان فرزندانشان که توسط MNU (N-Nitroso-N-methylurea) القا شده بود، تأثیر دارد (۱۴)؛ بنابراین به نظر می رسد، فعالیت بدنی مادر در زمان بارداری می تواند موجب تغییرات اپی ژنتیکی طولانی شود (۵-۲،۹،۱۴). هرچند هنوز به این سوال پاسخ داده نشده است که آیا فعالیت مادر در بارداری می تواند بر شاخص های مهم و مرتبط با سرطان پستان در زندگی آینده جنین موثر باشد.

یکی از موارد مهم در جلوگیری از ایجاد بیماری‌های ژنتیکی همچون سرطان پستان، فعال شدن ژن‌های مرتبط با پیشگیری می‌باشد. در این رابطه، آنتی آنکوژن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند. آنتی آنکوژن ها، به ژن‌هایی گفته می‌شوند که سلول را از تکثیر بیش از حد و درنتیجه ابتلای به سرطان بازمی‌دارند. از معروف ترین این ژن‌ها، ژن *BRCA1* (breast cancer susceptibility -1 early onset gene) و *TP53* (tumor protein 53) می‌باشد که به ترتیب مسئول کد کردن پروتئین *BRCA1* و *P53* در سلول‌ها هستند (۱۷-۱۵).

پروتئین *P53* از طریق چندین مکانیسم، عملکردهای ضد سرطانی دارد و باعث ثبات در ژنوم سلولی می‌شود (۱۷). بر اساس نتایج تحقیقات، تغییر در هموئوستاز طبیعی سلول، همچون آسیب DNA، شوک گرمایی، تغییرات pH، کمبود اکسیژن (Hypoxia)، شوک اسمزی و فشار اکسایشی باعث افزایش بیان ژن پروتئین *P53* می‌شود (۱۸،۱۹). از طرفی اختلال در عملکرد این ژن و به عبارتی جهش این ژن موجب افزایش بی رویه سلول‌ها و به زبان دیگر سرطان می شود (۱۷،۲۰). به نظر می‌رسد که فشار اکسایشی که در پی انجام فعالیت ورزشی افزایش می یابد، می تواند در میزان فعالیت پروتئین *P53* بسیار مهم باشد (۲۴-۲۱). از طرف دیگر *BRCA1*، به عنوان عضوی از خانواده ژنی سرکوب‌کننده تومور، ژن مستعد و مهم در ابتلا به سرطان پستان در طول زندگی به ویژه در سن قبل از یائسگی است (۱۵،۱۶). این ژن چندین عملکرد در سلول‌های طبیعی دارد که شامل نقش حیاتی در ترمیم DNA هومولوگ و مهار رشد غیر کنترل شده سلول می باشد (۱۵). لذا جهش موروثی در این ژن همراه با فقدان هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)، سلول ها را به بی ثباتی کروموزومی و تا حد زیادی افزایش احتمال به تغییر و توسعه سرطان مستعد می کند (۱۶). حاملان ژن جهش یافته *BRCA1* دارای تومورهایی هستند که سریع رشد کرده و از نظر گیرنده استروژن منفی هستند (۱۵،۲۵)، همچنین با توجه به بیولوژی *BRCA1* و ویژگی های آسیب شناسی سرطان پستان به نظر می رسد یکی از عملکردهای کلیدی این ژن، تنظیم سلول های بنیادی پستان باشد (۱۰). از آنجا که به نظر می رسد فعالیت بدنی می تواند موجب تغییرات هماتولوژیک متعددی ازجمله تغییر در تعداد سلول های بنیادی (SC) شود و همچنین با وجود تأثیر فعالیت ورزشی منظم بر بیان *BRCA1* و *P53* و تأکید بر ارتباط آن ها با رشد پستان و احتمال ابتلا به سرطان پستان، هنوز نقش این دو ژن در بحث اپی ژنتیک و تأثیر فعالیت مادر در زمان بارداری بر بیان دو ژن *BRCA1* و *P53* در فرزندان مشخص نشده است (۲۳،۱۰-۲۶،۲۰). لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر فعالیت هوازی مادر در دوران بارداری به عنوان مداخله ای ایمن و پیشگیری کننده از سرطان بر ژن‌های مهم مرتبط با سرطان پستان، *BRCA1* و *P53*، انجام شد.

روش بررسی:

این مطالعه از نوع تجربی و مداخله ای بود و موازین اخلاقی در نگهداری و انجام آزمایشات مطابق کد اخلاق این مطالعه (IR.QUMS.REC.1396.168) که توسط کمیته اخلاق دانشکده علوم پایه دانشگاه علوم پزشکی قزوین تأیید شده است، رعایت شد. ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگدولی با ۶ هفته سن و وزن تقریبی ۱۰/۸۵±۲۲۲ گرم، از محل تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مرکز انسیتو پاستور رازی خریداری و بعد از انتقال به حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی در دوره های ۱۲:۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا و درجه حرارت محیط ۱±۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. حیوانات بعد از رسیدن به وزن مطلوب برای بارداری (۸ هفته سن) به طور تصادفی به گروه های تمرین حین بارداری (T) و کنترل (C) تقسیم شدند، رت ها از ابتدا در قفس‌های بزرگ به صورت سه تایی نگهداری شدند و بعد از زایمان هر رت به همراه بچه هایش به یک قفس متوسط منتقل شدند.

به مدت یک هفته قبل از بارداری موش‌ها به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه با دستگاه تردمیل آشنا شدند (۹). سه روز انتهای هفته تعداد سه موش ماده برای جفت گیری در کنار دو موش نر قرار گرفتند. روز مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان روز اول بارداری در نظر گرفته شد و بلافاصله موش‌های باردار وارد پروتکل تمرین هوازی به مدت ۲۱ روز شدند. در انتها نیز با توجه به شرایط ظاهری موش ها، دو تا سه روز قبل از زایمان از پروتکل خارج شدند تا آماده زایمان شوند (۹). به طور میانگین از هر مادر حدود ۱۰ موش متولد شد که به دلایل مختلف ازجمله خورده شدن بچه ها توسط مادرشان یا مرده به دنیا آمدن تعدادی از بچه ها، درنهایت در هر گروه ۶ نوزاد باقی ماند. ابتدای هر هفته وزن رت ها و غذای مصرفی آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم (A&D EK5100i Japan) کنترل می شد. بعد از ۲۱ روز (PND=۲۱) نوزادان از شیر گرفته و بچه های نر و ماده هر مادر از هم جدا شدند و تا ۸ هفتگی (PND=۵۶) مراقبت شدند. سپس با ترکیبی از (۵۰-۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته) Ketamine و (۵-۳ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته) Xylazine و بی هوش شده و سه جفت انتهایی بافت پستان آن‌ها (جفت ۴، ۵ و ۶) در شرایط استریل جدا شد و داخل میکرو تیوپ‌های RNS/DNS free و سپس داخل تانک نیتروژن مایع قرار گرفت و برای آزمایشات بعدی به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند (۲۷).

برنامه فعالیت هوازی فزاینده حین بارداری رت ها بر روی تردمیل و بدون شیب اجرا شد. شدت تمرین متوسط (۳۰٪ تا ۴۰٪ VO_2max) در نظر گرفته شد، به این صورت که به مدت تقریبی ۲۱ روز، ۵ روز در هفته و روزانه یک جلسه انجام شد (۲۸). در ابتدای هر جلسه موش‌ها به مدت ۳ دقیقه و با سرعت ۸ متر بر دقیقه به‌منظور گرم کردن و در انتهای هر جلسه نیز به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۸ متر بر دقیقه به‌منظور سرد کردن، بر روی تردمیل دویدند. پروتکل اصلی تمرین نیز طبق جدول شماره ۱، هفته اول با سرعت ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه شروع شد و در هفته سوم به ۱۲ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه رسیدند (۹) (جدول شماره ۱). به‌منظور جلوگیری از اعمال فشار ناگهانی ابتدای هر هفته به مقدار یک متر در دقیقه به‌سرعت و هر دو تا سه روز نیز به مقدار دو تا سه دقیقه به زمان اضافه می شد. در تمام دوران تمرین سعی بر این بود که هیچگونه استرسی به رت های باردار وارد نشود و حیوانات تنها با تیمار دم تحریک به دویدن شوند (۹).

جدول شماره ۱: پروتکل اجرا شده در زمان بارداری

هفته اول بارداری	هفته دوم بارداری	هفته سوم بارداری
مدت زمان تمرین= ۱۰دقیقه	مدت زمان تمرین= ۲۰دقیقه	مدت زمان تمرین= ۳۰ دقیقه
سرعت تردمیل= ۱۰ متر بر دقیقه	سرعت تردمیل= ۱۱ متر بر دقیقه	سرعت تردمیل= ۱۲ متر بر دقیقه

اطلاعات مربوط به‌توالی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از بانک اطلاعاتی Primer3 و NCBI و جستجوی بهترین پرایمر فروارد و ریورس، سپس ارزیابی کیفیت و اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده با استفاده از پرایمر بلاست و درنهایت بررسی احتمال تشکیل دایمر توسط نرم‌افزار ژن رانر انجام شد. بعد از طراحی پرایمر، ژن‌های مورد مطالعه از روش Real-Time PCR برای بررسی بیان ژن استفاده شد، بافت های جداشده برای بررسی بیان ژن های *P53* و *BRCA1*، با استفاده از محلول کیازول (۱ میلی لیتر) (ترایزول ساخت شرکت کیاژن) (Cat # ۷۹۳۰۶) و به‌صورت دستی هموژن شدند. سپس طبق دستورالعمل شرکت کیاژن و با شستشو توسط کیازول (ترکیب فنولی)، RNA کل از بافت های هموژن شده استخراج گردید. به‌منظور بررسی درجه خلوص RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (NaoDrop 200030 Thermo scientific) استفاده شد و مشخص شد که A260/A280 نزدیک به ۲ می باشد.

در مرحله بعد، سنتز cDNA از روی RNA های استخراج شده با استفاده از دستورالعمل کیت Aid First Strand Revert cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific) (Cat # K1622)، انجام شد. سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ژن‌های *BRCA1* و *TP53* به روش quantitative Real-time PCR و با استفاده از ژن کنترل GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) مورد بررسی قرار گرفتند (۲۹). جفت بازهای موجود در پرایمرهای استفاده‌شده به‌صورت زیر بودند:

BRCA1: FW5' - GAGGTTCTGAATGAGGACGC -3';
Template 763 …..C.....782
Rv5' - ACAACTGGACACTGAGACTGT-3'
Template 883 863
اکسژن نامبر: XM_008768092.2
طول محصول: ۱۲۱
دمای ذوب: ۸۰/۳۶
P53: FW5' - CCAAGAAGGACCAGTCTAC -3';
Template 2043 .....G.....2061
Rv5'- GAGGCAGTCAGTCTGAGTC -3'
Template 2120 .....T.....2102
اکسژن نامبر: XM_006246595.3
طول محصول: ۷۸
دمای ذوب: ۸۶/۱۷
GAPDH: FW5' - CATACTCAGCACCAGCATCACC -3';
Template 340 319
Rv5' - AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG -3'
Template 220 241
اکسژن نامبر: XM_017593963.1
طول محصول: ۱۲۱
دمای ذوب: ۸۳/۰۴

فرایند تکثیر شامل یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه جهت واسرشتگی اولیه cDNA ساخته شده و ۴۰ چرخه دومرحله‌ای برای هر چرخه Real-Time PCR می‌باشد که به‌صورت

۹۵ درجه برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه تنظیم شدند. نسبت بیان ژن های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle) و با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ مورد ارزیابی قرار گرفتند (۳۰). کارایی پرایمرها بعد از تهیه رقت‌های ۱ به ۱۰ از ژن‌ها و با استفاده از منحنی استاندارد، همانگونه که در فرمول مشخص شده است، ۲ ارزیابی شد.

یافته‌ها:

ابتدای هر هفته در طول زمان انجام پروتکل، وزن رت های مادر و بچه ها توسط ترازوی دیجیتال (مدل A&D EK5100i Japan) اندازه‌گیری شد. در جدول زیر وزن رت های مادر در ابتدای پروتکل هم‌زمان با جفت‌گیری (اولین اندازه گیری) و در انتهای پروتکل (هفته سوم تمرین) و همچنین وزن بچه ها بلافاصله بعد از تولد و در هفته هشتم زندگی مشخص شده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: وزن مربوط به رت های مادر و فرزند

وزن رت های باردار	گروه	اولین اندازه گیری	آخرین اندازه گیری
رت های مادر	تمرین	۲۲۳/۷±۷/۳۶	۳۱۵±۱۲/۶۷
	کنترل	۲۱۹±۳/۲	۲۶٤±٤/۷۸
رت های بچه	تمرین	۵/۵±۰/۱۵	۱۵۵/۸±۰/۷٤
	کنترل	٦/۵±۰/۱۹	۱۸۱/۵±۰/٤۱

در ابتدا، جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو- ویلک (Shapiro-wilk) استفاده شد (جدول شماره ۳). عدم معنی داری این آزمون نشان داد، نحوه توزیع داده ها در هر دو گروه طبیعی است؛ بنابراین برای بررسی مقدار بیان ژن های *BRCA1* و *P53* از آزمون های آماری پارامتریک و t-test مستقل استفاده شد.

جدول شماره ۳: بررسی نورمالیتی یافته ها

ژن ها	گروه ها	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
BRCA1	تمرین	۰/۹۸	٤	۰/۹۰
	کنترل	۰/۹۲	٦	۰/٤۸
P53	تمرین	۰/۹۵	٤	۰/۷۱
	کنترل	۰/۹٤	٦	۰/٦۸

با توجه به عدم معنی داری آزمون لیون (leven test)، در خصوص ژن *P53* (P=۰/۲۹) از آزمون t مستقل با فرض تساوی واریانس ها و با در نظر گرفتن عدم تساوی واریانس ها در خصوص ژن *BRCA1* (P=۰/۰۰۳) از آزمون t مستقل با در نظر گرفتن عدم تساوی واریانس‌ها استفاده شد (جدول شماره ۴).

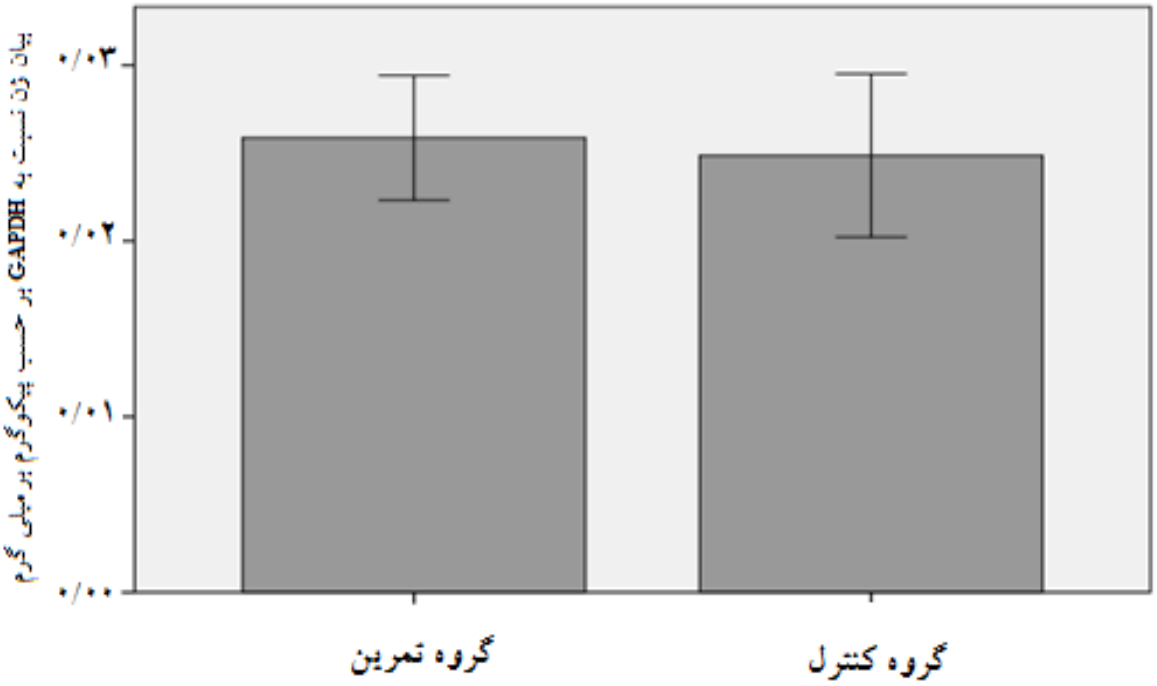
جدول شماره ۴: آزمون لیون برای ژن های *P53* و *BRCA1*

ژن ها	F	Sig.	T	df
BRCA1	۱۷/۱۸	۰/۰۰۳	۷/۸	٤
P53	۱/۲۷	۰/۲۹	۰/٤۱	۸

نتایج تحقیق نشان داد که میانگین مقادیر mRNA *P53* در بافت پستان فرزندان گروه تمرین حین بارداری برابر با ۰/۰۲۶±۰/۰۰۲۲ پیکوگرم بر میلی لیتر و بیشتر از میانگین گروه کنترل ۰/۰۲۵±۰/۰۰۴۴ پیکوگرم بر میلی لیتر است ولی این افزایش معنی دار نیست (P=۰/۶۹) (نمودار شماره ۱) (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵: مقایسه mRNA دو ژن ***BRCA1*** و ***P53*** در بافت پستان دو گروه کنترل و تمرین

متغیر	گروه	میانگین ± انحراف معیار	T	df	P
P53	تمرین	۰/۰۲۶±۰/۰۰۲۲	۰/٤۱۳	۸	۰/٦۹
	کنترل	۰/۰۲۵±۰/۰٤٤			
BRCA1	تمرین	۰/۰٦٦±۰/۰۲	۷/۷۸۰	٤	۰/۰۰۱*
	کنترل	۰/۰۰۲۵±۰/۰۰۰۵			



نمودار شماره ۱: تفاوت mRNA *P53* در بین گروه کنترل (۰/۰۰۲۵±۰/۰۰٤٤) و تمرین (۰/۰۲٦±۰/۰۰۲۲) (پیکوگرم بر میلی لیتر)

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد و سطح معنی داری نیز معادل P<۰/۰۵ می باشد.

نتایج با سطح معنی داری P<۰/۰۱ نشان داد که مقادیر mRNA *BRCA1* در بافت پستان فرزندان گروه تمرین حین بارداری ۰/۰۶۶±۰/۰۲ پیکوگرم بر میلی لیتر، به‌طور معنی داری بیشتر از ۰/۰۰۲۵±۰/۰۰۰۵ پیکوگرم بر میلی لیتر در گروه کنترل است (P=۰/۰۰۱) (جدول شماره ۳). لذا به نظر می رسد فعالیت با شدت متوسط حین بارداری می تواند بیان ژن *BRCA1* را به‌طور معنی داری افزایش دهد (نمودار شماره ۲).

نمودار شماره ۲: تفاوت معنی دار mRNA *BRCA1* در بین گروه کنترل (۰/۰۰۰۵±۰/۰۰۲۵) و تمرین (۰/۰۲±۰/۰۶۶)

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد و سطح معنی داری نیز معادل P<۰/۰۵ می باشد.

بحث:

پژوهش حاضر به دنبال بررسی تغییرات بیان ژن های مرتبط با سرطان پستان در بافت پستان فرزندان رت های مادر فعال، نشان داد که یک دوره فعالیت هوازی با شدت متوسط در دوران بارداری موجب افزایش معنی دار بیان *BRCA1* و تمایل به افزایش بیان *P53* (عدم معنی داری) در بافت پستان فرزندان خواهد شد. تاکنون مطالعه ای یافت نشده است که به بررسی تأثیر فعالیت بارداری بر بیان *BRCA1* و *P53* پرداخته باشد ولی در خصوص تأثیر فعالیت در زمان غیر بارداری بر این ژن ها مطالعات محدودی موجود است. مشاهده شده است که احتمالاً فعالیت بدنی حین بزرگسالی می تواند به طور معنی داری رشد سرطان پستان را در زنان حامل ژن جهش یافته *BRCA1*، کاهش دهد (۳۱). افزایش معنی دار ژن *BRCA1*، *P53* و گیرنده استروژن β، همچنین کاهش معنی دار ER-α در غده پستانی نیز بعد از ۲۰ روز انجام تردمیل توسط رت های ۱۴ روزه مشاهده شده است (۲۰). همچنین نشان داده شده است که سطح سرمی پروتئین *P53* بلافاصله بعد از تمرین مقاومتی، به طور معنی داری افزایش یافته است (۳۲). Qi و همکاران نیز نشان دادند، فعالیت ورزشی باعث کاهش فشار اکسایشی و همچنین کاهش محتوای پروتئین *P53* در عضلات اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌شود (۲۱).

اخیراً تأثیر عدم تحرک مادر در بارداری و به علاوه انتقال مواد غذایی مصرفی مضر مادر در این دوران از بند ناف به جنین، بر احتمال ایجاد التهاب و مقاومت به انسولین و افزایش اسید چرب آزاد، تجمع ماکروفاژها، تری گلیسیرید و کلسترول در بند ناف و درنتیجه پلاسمای جنین، مورد بررسی قرارگرفته و با توجه به ارتباط این عوامل با بروز سرطان می‌توان پیش بینی کرد که فعالیت بدنی مادر در دوران بارداری بر بروز سرطان نقش دارد (۳،۴،۱۰،۷،۳۳،۳۴).

در مطالعه ای که ارتباط بین فاکتورهای مهارکننده توموری *BRCA1* و *P53* در کودکی، میانسالی و بعد از

یائسگی و فعالیت بدنی مادر را بررسی نمود، ارتباط معنی‌داری بین فعالیت بدنی مادر در دوران بارداری و تغییر این فاکتورها در بند ناف نوزاد مشاهده شد (۲۰)، البته تحقیق مذکور به شکل توصیفی بود که رابطه هرگونه فعالیت بدنی بدون لحاظ نمودن نوع یا شدت فعالیت بررسی شده بود، در حالی که در تحقیق حاضر تأثیر فعالیت ورزشی مشخص در دوران بارداری بر شاخص های مذکور در بافت سینه به طور جنین به طور مستقیم بررسی گردید. Camarillo و همکاران، تأثیر کاهشی انجام فعالیت ورزشی اختیاری را در دوران بارداری رت مادر، بر تومورزایی بافت پستان فرزندانشان که توسط MNU القا شده بود، نشان دادند (۱۴). تأثیر فعالیت بدنی مادر در دوران بارداری بر سایر شاخص‌ها نیز به طور محدود بررسی شده است. به طور مثال، Gaeini و همکاران تأثیر فعالیت استقامتی قبل از بارداری و فعالیت اختیاری (Wheel) هنگام بارداری را بر فاکتورهای متابولیکی سرم موش (Mice) و همچنین بر باز جذب و تراکم استخوان نوزادان آنان بررسی کردند. آنان مشاهده کردند، ژن‌های OPG، $RunX_2$ در نوزاد مادران تمرین کرده افزایش بیان RANKL و استئوکلسین کاهش بیان داشتند و این به معنی تأثیر تمرین بارداری بر پاسخ‌های استئوژنیک می باشد (۶). نتیجه این تحقیق می‌تواند از بابت انتقال تأثیر فعالیت بدنی مادر در دوران بارداری برافزایش بیان دو ژن *BRCA1* در نوزاد که در تحقیق حاضر مشاهده شد همخوانی داشته باشد.

در تحقیق حاضر افزایش *P53* معنی‌دار نبود و دلیل احتمالی عدم معنی داری این افزایش در پژوهش حاضر می تواند مربوط به شدید نبودن پروتکل تمرین در زمان بارداری باشد. کم شدت بودن تمرین ورزشی در تحقیق حاضر می تواند با تولید کمتر ROS در تحقیق حاضر همراه بوده باشد و با توجه به ارتباط *P53* با ROS می تواند موجب عدم معنی‌داری نتایج این ژن در تحقیق حاضر شده باشد (۳۵). همچنین در پژوهش مرادپور و دریانوش نشان داده شده است که فعالیت ورزشی تداومی زیر بیشینه برخلاف فعالیت ورزشی تناوبی شدید، نمی تواند سطح پروتئین *P53* سرم خون را در موش های صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی به صورت معنی داری افزایش دهد. به بیان دیگر، پروتکل تمرینی نقش مهمی در تعیین میزان *P53* دارد و با توجه به زیر بیشینه بودن برنامه تمرینی در تحقیق حاضر، نتایج حاصل قابل توجیه است (۲۳). از طرف دیگر احتمالاً آستانه تحریک *BRCA1* کمتر از *P53* می باشد و پروتکل تمرینی حاضر توانسته موجب افزایش این ژن مهاری شود، البته انجام مطالعات بیشتر برای تأیید این مطالب لازم است. همچنین با توجه به ارتباط بین این دو ژن و گیرنده های استروژنی و فاکتور رشدی شبه انسولین که در چندین پژوهش همراه باهم مورد بررسی قرار گرفته‌اند، بررسی IGF-1 (insulin growth factor 1) و ER-α در تحقیقات آینده تکمیل‌کننده این مطالعه خواهد بود (۲۰،۲۴،۲۶).

از طرفی با توجه به تأثیر مهاری *BRCA1* برگیرنده استروژن، احتمالاً پروتکل تمرین حاضر در دوران بارداری از طریق کاهش ER-α یعنی کاهش تکثیر و در حقیقت از طریق افزایش نسبت ER-β به ER-α در لوبول ها و لوله ها یعنی افزایش تمایز، منجر به کاهش تعداد TED های (Terminal end buds) موجود در غدد پستانی موش‌هایی که مادرانشان در معرض تمرین تردمیل قرار گرفته بودند، شود و احتمال ابتلا به تومور پستانی در فرزندانی که مادرانشان تمرین کرده اند را نیز کاهش دهد (۲۰).

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج تحقیق حاضر تمرین ورزشی موش ها در دوران بارداری موجب افزایش معنی دار mRNA *BRCA1* و تمایل به افزایش mRNA *P53* (افزایش غیر معنی‌دار) در بافت پستان نوزادان موش ها می شود و به طور کلی نشان می دهد که تمرین ورزشی مادر در دوران بارداری می تواند احتمال ابتلا به سرطان پستان کودکان در آینده را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش بر گفته از طرح تحقیقاتی از دانشگاه علوم پزشکی قزوین می باشد که در تاریخ ۲۶ تیر ۱۳۹۶، با کد ۸۰۷ تصویب شده است. در این راستا از تمام عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش همیاری کردند کمال تشکر را داریم. از جناب آقای دکتر پیمان، معاون پژوهشی و دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین، جناب آقای دکتر رجایی و دکتر فروغی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین و خانم اعظم عبداله پور دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی که شرایط تسهیل انجام این پروژه را فراهم کردند بسیار سپاسگزاریم.

منابع:

1. Eclarinal JD, Zhu S, Baker MS, Piyarathna DB, Coarfa C, Fiorotto ML, et al. Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. FASEB J. 2016; 30(7): 2541-8.

2. Laker RC, Wlodek ME, Connelly JJ, Yan Z. Epigenetic origins of metabolic disease: The impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. Food Sci Hum Well. 2013; 2(1): 1-11.

3. Zhang J, Zhou X, Yuan H, Niu Y, Di F, Fu L. Paternal lifestyle influence susceptibility to high-fat diet-induced metabolic disorders among male offspring of C57BL/6 mice. Int J Clin Exp Med. 2017; 10(1): 1715-24.

4. Mathias PC, Elmhiri G, de Oliveira JC, Delayre-Orthez C, Barella LF, Tofolo LP, et al. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. Eur J Nutr. 2014; 53(3): 711-22.

5. Chung E, Joiner HE, Skelton T, Looten KD, Manczak M, Reddy PH. Maternal exercise upregulates mitochondrial gene expression and increases enzyme activity of fetal mouse hearts. Physiol Rep. 2017; 5(5): e13184.

6. Gaeini AA, Shafiei Neek L, Choobineh S, Baghaban Eslaminejad M, Satarifard S, Sayahpour FA, et al. Preconception endurance training with voluntary exercise during pregnancy positively influences on remodeling markers in female offspring bone. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016; 29(22): 3634-40.

7. Stanford KI, Takahashi H, So K, Alves-Wagner AB, Prince NB, Lehnig AC, et al. Maternal exercise improves glucose tolerance in female offspring. Diabetes. 2017; 66(8): 2124-36.

8. Carter LG, Qi NR, De Cabo R, Pearson KJ. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. Med Sci Sports Exerc. 2013; 45(5): 832-40.

9. Gomes da Silva S, De Almeida AA, Fernandes J, Lopim GM, Cabral FR, Scerni DA, et al. Maternal exercise during pregnancy increases BDNF levels and cell numbers in the hippocampal formation but not in the cerebral cortex of adult rat offspring. PloS one. 2016; 11(1): e0147200.

10. Onoyama S, Qiu L, Low HP, Chang CI, Strohsnitter WC, Norwitz ER, et al. Prenatal maternal physical activity and stem cells in umbilical cord blood. Med Sci Sports Exerc. 2016; 48(1): 82-9.

11. Rosa BV, Firth EC, Blair HT, Vickers MH, Morel PC. Voluntary exercise in pregnant rats positively influences fetal growth without initiating a maternal physiological stress response. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011; 300(5): R1134-41.

12. Ferraro ZM, Gaudet L, Adamo KB. The potential impact of physical activity during pregnancy on maternal and neonatal outcomes. Obstet Gynecol Surv. 2012; 67(2): 99-110.

13. Clapp JF. Exercise in pregnancy: a brief clinical review. Fetal Matern Med Rev. 1990; 2(1): 89-101.
14. Camarillo IG, Clah L, Zheng W, Zhou X, Larrick B, Blaize N, et al. Maternal exercise during pregnancy reduces risk of mammary tumorigenesis in rat offspring. Eur J Cancer Prev. 2014; 23(6): 502-5.
15. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of *BRCA1* and *BRCA2* and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene. 2006; 25(43): 5864-74.
16. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of *BRCA1* and *BRCA2*. Nature. 2000; 408(6811): 429-32.
17. Arizti P, Fang L, Park I, Yin Y, Solomon E, Ouchi T, et al. Tumor suppressor *P53* is required to modulate *BRCA1* expression. Mol Cell Biol. 2000; 20(20): 7450-9.
18. Han ES, Muller FL, Perez VI, Qi W, Liang H, Xi L, et al. The *in vivo* gene expression signature of oxidative stress. Physiol Genomics. 2008; 34(1): 112-26.
19. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. *P53* regulates mitochondrial respiration. Science. 2006; 312(5780): 1650-3.
20. Wang M, Yu B, Westerlind K, Strange R, Khan G, Patil D, et al. Prepubertal physical activity up-regulates estrogen receptor beta, *BRCA1* and *P53* mRNA expression in the rat mammary gland. Breast Cancer Res Treat. 2009; 115(1): 213-20.
21. Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases *P53* protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Free Radic Biol Med. 2011; 50(7): 794-800.
22. Bartlett JD, Hwa Joo C, Jeong TS, Louhelainen J, Cochran AJ, Gibala MJ, et al. Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1alpha mRNA, AMPK, *P38*, and *P53* phosphorylation in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 2012; 112(7): 1135-43.
23. Moradpour P, Daryanoosh F, The effect of intermittent and continuous exercise with vitamin E supplement on the serum level of *P53* in male Sprague Dawley rats [Thesis]. Shiraz: Shiraz University; 2016.
24. Sengupta S, Wasylyk B. Physiological and pathological consequences of the interactions of the *P53* tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1024: 54-71.
25. Berstein LM. Endocrinology of the wild and mutant *BRCA1* gene and types of hormonal carcinogenesis. Future Oncol. 2008; 4(1): 23-39.
26. Werner H, Bruchim I. IGF-1 and *BRCA1* signalling pathways in familial cancer. Lancet Oncol. 2012; 13(12): e537-44.
27. Ghanbari-Niaki A, Khabazian BM, Hossaini-Kakhak SA, Rahbarizadeh F, Hedayati M. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 361(4): 841-6.
28. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2007; 14(6): 753-60.
29. Jemiolo B, Trappe S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(3): 1043-50.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.
31. King M-C, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. Science. 2003; 302(5645): 643-6.

32. Sharafi H, Rahimi R. The effect of resistance exercise on *P53*, caspase-9, and caspase-3 in trained and untrained men. J Strength Cond Res. 2012; 26(4): 1142-8.
33. Wang H, Hertlein E, Bakkar N, Sun H, Acharyya S, Wang J, et al. NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. Mol Cell Biol. 2007; 27(12): 4374-87.
34. Ardite E, Barbera JA, Roca J, Fernandez-Checa JC. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C_2C_{12} cells through sustained NF-kappaB activation. Am J Pathol. 2004; 165(3): 719-28.
35. Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. Free Radic Biol Med. 2008; 44(2): 160-8.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(5): 13-24. **Original article**

The effects of aerobic exercise in Sprague Dawley pregnant rats on *BRCA1* and *P53* gene expression of adult offspring breast tissue

Zarbaf R[1], Koushki Jahromi M[1*], Sofiabadi M[2], Daryanoosh F[1], Peymani A[3]
[1]Sport Sciences Dept., Shiraz University, Shiraz, I.R. Iran; [2]Physiology Dept., Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R. Iran; [4]Microbiology Dept., Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R. Iran.
Received: 12/Sep/2017 Accepted: 16/Dec/2017

Background and aims: Pregnancy is an important period in women life regarding different aspects including physical activity which may be effective on various health indices of offspring. One of the common and expanding women diseases is breast cancer and two of its related indices are *BRCA1* and *P53*. Thus, the aim of present study was estimating the effect of aerobic training during pregnancy in pregnant rats on the expression of *BRCA1* and *P53* genes of their offspring's breast tissue.
Methods: 20 female Sprague Dawley rats were randomly divided into two groups of exercise during pregnancy (T) (221±9.9) and control (C) (223.8±12.8). The aerobic exercise training was performed immediately after observation of the vaginal plaque of approving pregnancy for 21 days and 5 sessions per week with moderate intensity. About 2 to 3 days before delivery, their training program was terminated. Tissue sampling of Pairs 4, 5, and 6 of breast tissues in 8 weeks offspring rats was performed to evaluate the expression of *BRCA1* and *P53* gene. Data was analyzed using SPSS software and statistical tests of Shapiro-Wilk to control the distribution of data, and independent t-test for comparisons of between groups.
Results: Aerobic training with moderate intensity during pregnancy increased significantly mRNA of the *BRCA1* gene (P=0.001), but there was no significant change in mRNA of the *P53* (P=0.69).
Conclusion: Considering the effect of exercise during pregnancy on increasing *BRCA1* gene expression in their offspring's and association of the gene with breast, it seems that moderate exercise during pregnancy can reduce the risk of breast cancer in children.

Keywords: **Aerobic activity, pregnancy, *BRCA1*, Breast cancer, Adult offspring.**

Cite this article as: Zarbaf R, Koushki Jahromi M, Sofiabadi M, Daryanoosh F, Peymani A. The effects of aerobic exercise in Sprague Dawley pregnant rats on *BRCA1* and *P53* gene expression of adult offspring breast tissue. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(5): 13-24.

[*]**Corresponding author:**
Exercise Physiology Dept., Shiraz University, Shiraz, I.R. Iran. Tel: 00989136134666, E-mail: koushkie53@yahoo.com