

Suppression of Autophagy-Related Gene Expression Following Chronic Endurance Training in Tumors of Breast Cancer-Bearing BALB/c Mice

Sara Behjati¹,
Rohollah Nikooie²,
Mohsen Aminaie³

¹ MSc in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

³ Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received January 6, 2020 Accepted April 19, 2021)

Abstract

Background and purpose: Autophagy is lysosomal degradation pathway that contributes to tumor development through metabolic support, especially at final stages. The purpose of this study was to evaluate the effect of 12 weeks endurance training on autophagy-related gene expression levels in tumors of breast cancer-bearing BALB/c mice.

Materials and methods: Twenty-two female BALB/c mice were randomly divided into control (n= 11) and experimental (n= 11) groups. Breast cancer was induced by injecting MC4-L2 cancer cells into the right dorsal mammary fat pad. The experimental group underwent training protocol for 12 weeks. Expression levels of autophagy-related genes were measured by real-time PCR and quantified by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Data analysis was done applying Student t-test.

Results: Endurance training led to significant decrease in tumor weight (P= 0.038) and volume (P= 0.043) in experimental group compared to the control group. Expression levels of *Beclin1* (11%), *Atg7* (53%), *p62* (37%), *gabara1* (76%), *LC3-I* (35%), and *LC3-II* (62%) in tumors of experimental group were lower compared to the controls. In addition, training protocol resulted in a decrease in *LC3-II/LC3-I* ratio (42%) and increase in *p62* expression level (157%) (all P< 0.05).

Conclusion: Endurance training-induced reduction in tumor weight and volume was coincided with substantial reduction in expression levels of autophagy-related genes. This may suggest that beneficial effects of endurance training in breast cancer, at least in part, could be mediated through suppression of autophagy process in solid tumors.

Keywords: autophagy, breast cancer, endurance training

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (200): 38-48 (Persian).

* **Corresponding Author: Rohollah Nikooie** - Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (E-mail: zfotoukian@gmail.com)

کاهش بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی متعاقب تمرین استقامتی مزمین در تومور موش های BALB/c مبتلا به سرطان پستان

سارا بهجتی^۱
روح اله نیکویی^۲
محسن امینایی^۳

چکیده

سابقه و هدف: اتوفاژی، سیستم تخریب لیزوزومی، با حمایت متابولیکی سبب توسعه تومور به خصوص در مراحل پایانی می شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر شاخص های اتوفاژی در تومور موش های Balb/c مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش ها: ۲۲ راس موش ماده نژاد BALB/c به طور تصادفی به دو گروه کنترل (n=۱۱) و تمرینی (n=۱۱) تقسیم شدند. سرطان از طریق تزریق سلول سرطانی MC4-L2 در پد چربی پهلوی راست پستان موش ایجاد و پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۱۲ هفته بر گروه تجربی اعمال شد. اندازه گیری بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی در تومور با استفاده از روش Real time-PCR انجام و به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی سازی شد. تفاوت های بین گروهی با آزمون student-t انجام گرفت.

یافته ها: اعمال ۱۲ هفته تمرین استقامتی، سبب کاهش معنی دار وزن (P=۰/۰۳۸) و حجم نسبی تومور (P=۰/۰۴۳) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد. در انتهای مطالعه، بیان ژن Beclin1 (۱۱ درصد)، Atg7 (۵۳ درصد)، p62 (۳۷ درصد)، gabarapl (۷۶ درصد)، LC3-I (۳۵ درصد) و LC3-II (۶۲ درصد) در تومور موش های تمرینی نسبت به گروه کنترل کم تر بود. همچنین اعمال پروتکل تمرینی منجر به کاهش ۴۲ درصدی نسبت LC3-II/LC3-I و افزایش ۱۵۷ درصدی p62 در تومور حیوانات گروه تمرین شد (P < ۰/۰۵).

استنتاج: هم راستا بودن کاهش وزن و حجم تومور ناشی از تمرین استقامتی با کاهش قابل توجه در بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی احتمالاً بیانگر این است که بخشی از اثرات مفید تمرین استقامتی در سرطان پستان از طریق تعدیل فرآیند اتوفاژی در تومور اتفاق می افتد.

واژه های کلیدی: اتوفاژی، تمرین استقامتی، سرطان پستان

مقدمه

تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک پیشرونده در سلول های سرطان پستان منجر می شود (۱).

سرطان پستان بیماری است که به واسطه مجموع عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می شود و به

E-mail: r_nikooie@uk.ac.ir

مؤلف مسئول: روح اله نیکویی - کرمان: میدان پژوهش، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۳. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۹/۱۰/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۱/۳۰

این بیماری به پنج گروه، لومینال A^۱ (گیرنده استروژن ER⁺)^۲، لومینال B^۳ ER⁺)، بیان بیش از حد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال ۲^۴ (HER2)، Normal breast-like و basal-like تقسیم می شود (۲). با وجود اینکه علت دقیق وقوع سرطان پستان مشخص نیست، لیکن عواملی نظیر تغییر در سطوح استروژن، جهش در ژن های خاص و تغییرات متابولیک ناشی از اتوفآژی تغییر یافته، عوامل کاندید هستند (۳،۱).

اتوفآژی سیستم تخریب داخل سلولی است که اجزای زائد سیتوپلاسمی را جهت تجزیه به لیزوزوم ارائه می دهد (۴). این تجزیه لیزوزومی نه تنها مواد مغذی را برای حفظ عملکردهای حیاتی سلول در مواقع کمبود انرژی فراهم می کند، بلکه می تواند سلول را از اندامک های اضافی و زائد و یا آسیب دیده، پروتئین های فاقد عملکرد و میکروارگانیزم های مضر رهایی بخشد. سه نوع اتوفآژی وجود دارد که شامل ماکرو اتوفآژی (Macroautophagy)، میکرو اتوفآژی (Microautophagy) و اتوفآژی به واسطه چاپرون (Chaperone-mediated autophagy) (۵) می شود. ماکرو اتوفآژی که در این مقاله همان اتوفآژی نامیده می شود، در پاکسازی پروتئین ها و و اندامک های با عمر طولانی دخیل است. در طی فرآیند اتوفآژی، بخشی از سیتوپلاسم توسط غشای دولایه به نام فاگوسوم (Phagophore) یا ساختار پیش اتوفآژیومی که احتمالاً از شبکه آندوپلاسمی نشأت گرفته است، احاطه می شود (۴). در سطح ریز سلولی تشکیل فاگوسوم، با فعال شدن ژن های پروتئین های مرتبط با اتوفآژی در پستانداران^۵ (Atg) نظیر Atg9 و بیان ژن، فسفریلاسیون کمپلکس ULK^۶ (ULK1, FIP200^۷, Atg13) اتفاق می افتد که در نهایت به تشکیل فاگوسوم منجر می شود.

قدم بعدی طویل سازی فاگوسوم تشکیل شده توسط ژن های نظیر Atg7 و Atg10 و فرایند تکمیل بارگذاری لیپید در غشای تشکیل شده فاگوسوم، توسط زنجیره سبک مرتبط با میکروتوبول-^۳ LC3 (LC3-I و LC3-II) است، که در نهایت اتوفآژیوزوم (Autophagosome) را تشکیل می دهد که می تواند محتویات سیتوپلاسم را در خود احاطه کند (۶). اتوفآژیوزوم تشکیل شده با لیزوزوم های اسیدی ادغام شده و محتویات سیتوزولی موجود در اتوفآژیوزوم به واسطه آنزیم های هیدرولیتیک لیزوزوم تجزیه می شوند (۴). مهم ترین عوامل کنترل کننده اتوفآژی در سلول گرسنگی، فقدان هر نوع ماده مغذی ضروری، تخریب قابل توجه اسیدهای آمینه و تشکیل فنوتیپ اسیدی می باشند (۵).

نقش اتوفآژی در سرطان پستان دوگانه است به این معنی که در مراحل اولیه ایجاد تومور سبب جلوگیری از توسعه تومور می شود ولی بعد از تکامل تومور به گسترش هر چه بیش تر تومور کمک می کند (۷،۳). با این وجود، تغییر در تنظیم طبیعی اتوفآژی که معمولاً به سمت افزایش است، در سرطان پستان گزارش شده است. به عنوان مثال میزان تبدیل پروتئین Beclin1 و نسبت LC3II/LC3I در فیبروبلاست های مرتبط با سرطان (Cancer-associated Fibroblasts) که نقش مهمی در پیشرفت سرطان بدخیم دارند، بسیار بیش تر از مقدار آن در فیبروبلاست های طبیعی است (۸). همچنین بیان بالا Beclin1 که یکی از القا کننده های اتوفآژی است، در سرطان پستان انسان دیده شده است (۹). در مطالعه دیگر نشان داده شد که اتوفآژی می تواند باعث افزایش سطح سلول های بنیادین سرطانی در سرطان پستان شود و بالا بودن سطح برخی از Atg ها مانند Beclin1 و Atg4A، عاملی در پایداری سلول های بنیادین سرطانی در سرطان پستان می باشد (۱۰).

1. Luminal A
2. Oestrogen receptor
3. Luminal B
4. Epidermal growth factor receptor 2 overexpressing
5. Autophagy related proteins
6. Uncoordinated-51(unc-51)- like kinase 1
7. Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa

8. Microtubule-associated light chain-3

مطالعه ای دیگر بیانگر افزایش پروتئین *Beclin1*، *LC3-I* و *LC3-II* و نیز کاهش *P62* در سلول‌های تومور سرطان پستان می‌باشد (۳). آتوفازی افزایش یافته در سلول‌های سرطانی سبب تقویت تحمل استرس سلول می‌شود که سلول‌های تومور را قادر به زنده ماندن در شرایط نامطلوب می‌کند (۱۱). در واقع، سلول‌های سرطانی به علت تکثیر بی‌رویه سلولی، نیازهای متابولیکی بالایی دارند و تشدید شدن آتوفازی در سلول‌های تومور راهی برای تامین ATP و حفظ بیوسنتز سلولی و بقای این سلول‌های توموری است (۱۲). به عبارت دیگر زمانی که آنژیوژنز محدود تومور منجر به محرومیت سلول‌های تومور از مواد مغذی و هیپوکسی می‌شود، آتوفازی، سلول‌های تومور را حمایت متابولیکی و آن‌ها را زنده نگه می‌دارد (۷). بنابراین افزایش آتوفازی ممکن است رشد تومورهای جامد را ترویج دهد، در حالی که کاهش آن ممکن است یک روش موثر برای محدود کردن رشد تومور فراهم آورد. از دیرباز بین فعالیت استقامتی به واسطه اثرگذاری بر وضعیت متابولیک تومور و اثر مثبت آن بر کاهش حجم و رشد تومورهای سرطانی یکی از مداخلات موثر در زمینه درمان یا تعدیل سرطان پستان بوده است. تمرین استقامتی می‌تواند با تغییر در ترانسپورتهای لاکتات دهیدروژناز همزیستی متابولیکی بین سلول‌های اکسیژن دار و سلول‌های هیپوکسیک تومور را مختل و به توسعه کم‌تر تومور منجر شود (۲). همچنین شواهدی مبنی بر بهبود آنژیوژنز نقصان یافته در تومور به واسطه تمرین استقامتی وجود دارد که می‌تواند منجر به کاهش حجم تومور در حیوان شود (۱۳). با این وجود در زمینه اثر تمرین استقامتی بر اجزای آتوفازی در سرطان پستان شواهدی وجود ندارد، هرچند که اثرپذیری اجزای آتوفازی از تمرین استقامتی در تحقیقات قبلی گزارش شده است. به عنوان مثال، نرخ آتوفازی بیش‌تر (افزایش نسبت *LC3-II/LC3-I* و کاهش پروتئین *P62* که نشانگر نرخ بالاتر فرآیند آتوفازی است) و نیز بیان بیش‌تر اجزای درگیر در آتوفازی (نظیر

Atg7، *Atg6/Beclin1* و *Atg8/LC3*) در اثر انجام تمرین استقامتی گزارش شده است (۱۴). علاوه بر آن نشان داده شده که بیان ژن‌های *Beclin1* و *BNIP3* در پاسخ به ورزش فوق استقامتی کوتاه مدت، در عضله اسکلتی افزایش می‌یابد و میزان پروتئین *P62* هم در انسان و هم در حیوان در هنگام فعالیت استقامتی یا کاهش می‌یابد و یا بدون تغییر است (۱۵). همچنین انجام آتوفازی در حین تمرین جهت وقوع سازگاری‌های ناشی از تمرین در عضله اسکلتی ضروری است و حیواناتی که اجزای آتوفازی به‌طور مصنوعی در آن‌ها خاموش شده است هم عملکرد هوازی پایین‌تر در حین تمرین داشته‌اند و هم در پاسخ به تمرین سازگاری کم‌تری از خود نشان داده می‌دهند (۱۵). جمیع این تحقیقات مؤید تمرین‌پذیر بودن فرآیند آتوفازی، حداقل در سطح عضله اسکلتی، در انسان و حیوان است. با توجه به تاثیر مثبت تمرین استقامتی بر کنترل رشد و حجم تومور که عمدتاً به واسطه تعدیل متابولیک تومور اتفاق می‌افتد و با توجه به سهم چشمگیر فرآیند آتوفازی در کنترل متابولیسم تومور و اثرپذیری از تمرین استقامتی، این احتمال وجود دارد که تمرین استقامتی بتواند اجزای آتوفازی در تومور را تحت تاثیر خود قرار دهد، با این وجود در حال حاضر شواهدی دال بر این موضوع وجود ندارد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های مرتبط با آتوفازی در تومور موش‌های Balb/c مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها

حیوان و برنامه تمرینی

تعداد ۳۰ رأس موش ماده نژاد Balb/c در سن ۳-۴ هفتهگی از موسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی ایران تهیه و در شرایط هوایی آزمایشگاه تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی نگهداری شدند. موش‌ها با غذای مخصوص موش و آب، تغذیه و در طول انجام تحقیق دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. بعد از یک

هفته نگهداری و آشناسازی با محیط آزمایشگاه، القای سرطان پستان در حیوان به روش زیر انجام شد.

روش القای سرطان پستان

سرطان از طریق تزریق زیرپوستی سلول سرطانی MC4-L2 در پد چربی پهلوی راست پستان حیوان ایجاد شد. رده سلولی موردنظر از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و سلول‌ها در محیط RPMI-1640 10%، 1% penicilin/streptomycin و 10% fetal calf serum (FCS) کشت و تحت شرایط CO_2 5 درصد و O_2 95 درصد و دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. 100 میکرولیتر از محلول حاوی سلول‌های سرطانی MC4-L2، که شامل تعداد 1×10^5 سلول سرطانی بود، در ناحیه پستان موش تزریق شد (16). دو هفته بعد از تزریق، تومور با چشم قابل رؤیت بود و سه هفته پس از القا حجم تومور قابل اندازه‌گیری بود. 25 راس حیوان که عملیات ایجاد تومور در آن‌ها موفقیت آمیز بود، وارد مطالعه شدند. بر اساس حجم اولیه تومور در هفته سوم همسان سازی و به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل ($n=12$) و تمرینی ($n=13$) تقسیم شدند. در طی مطالعه دو موش از گروه تمرین و یک موش از گروه کنترل مردند و تجزیه و تحلیل نهایی داده‌ها روی 11 موش کنترل و 11 موش تمرینی انجام شد.

اعمال شد. جزئیات پروتکل تمرینی در جدول شماره 1 گزارش شده است. افزایش بار تمرینی در طول پروتکل تمرین از طریق افزایش خطی در سرعت و مدت زمان تمرین اعمال شد. به منظور وقوع سازگاری‌های تمرینی پایدار، متغیرهای تمرینی در سه هفته آخر پروتکل ثابت نگه داشته شد.

نحوه اندازه‌گیری حجم و وزن تومور

حجم تومور هر هفته یک بار با کالیبر میکرودیجیتال اندازه‌گیری شد و مشخصات ابعادی تومور شامل ارتفاع، طول، و عرض ثبت و برای اندازه‌گیری حجم استفاده شد. اندازه تومور با توجه به فرمول (عرض \times طول $\times \pi/6$) محاسبه شد که فرمولی استاندارد برای اندازه‌گیری تومور می‌باشد (17). حجم تومور در انتهای هفته سوم پس از القای سرطان پستان در تمامی موش‌ها به عنوان ملاک در نظر گرفته شد. حجم نهایی تومور در انتهای مطالعه بر حجم آن در هفته سوم تقسیم و تجزیه و تحلیل نهایی با مقادیر نسبی حجم تومور انجام شد. وزن نهایی تومور در روز تشریح حیوان بعد از در آوردن کامل تومور با ترازوی میکرودیجیتال اندازه‌گیری، بر وزن بدن تقسیم و مقادیر نسبی آن در تجزیه و تحلیل نهایی مورد استفاده قرار گرفت.

نحوه استخراج بافت

24 ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها به وسیله تزریق درون صفاقی یا intraperitoneal injection (ip) کتامین (90 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش شدند و تومور بلافاصله استخراج و در نیتروژن $-80^\circ C$ درجه سانتی گراد منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

پروتکل تمرینی

در ابتدای کار دوره آشناسازی دویدن روی نوار گردان به مدت 5 روز با سرعت 15 m/min و محدوده زمانی 15-20 دقیقه انجام شد. پروتکل اصلی تمرین شامل دویدن اجباری 5 روز در هفته، به مدت 30-60 دقیقه در هر جلسه به مدت 12 هفته بر گروه تجربی

جدول شماره 1: جزئیات پروتکل تمرینی اعمال شده در تحقیق

متغیر	آشناسازی (5 روز)	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم	هفته نهم	هفته دهم	هفته یازدهم	هفته دوازدهم
سرعت (متر/دقیقه)	15	15	17	17	18	20	20	22	22	22	22	22	22
زمان (دقیقه)	20-15	30	30	35	35	40	40	45	45	50	55	55	60

نحوه اندازه گیری بیان ژن

استخراج RNA

حدود ۵۰ میلی گرم از تومور با روش هاون کوبی در نیتروژن مایع پودر شد. جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در Isol RNA-Lysis reagent (5 prime, cat 2302700) هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۵ با Isol اولیه با کلروفورم مخلوط و محصول در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شد، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۵ با ایزوپروپانل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد. RNA حاوی Pellet در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNAs-Free حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه nono drop سنجیده و نسبت ۲۸۰ به ۲۶۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب در نظر گرفته شد.

سنتر cDNA

با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و با استفاده از کیت سنتر cDNA (cDNA synthesis kit) (MERCK و cat number: 11483188001) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پرایمر و آنزیم مورد استفاده به ترتیب Random hexamer و AMV Reverse transcripts بود.

Real time – PCR

در ابتدای کار میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه تعیین شد، به طوری که کمترین میزان دایمر در محصول PCR مشاهده شود. PCR-Real time با استفاده از (2x) Premix Ex Taq II و با استفاده از غلظت مناسب از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه، در جدول شماره ۲ گزارش شده است (۱۸). برنامه Real time-PCR شامل ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه ۹۵° به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸° به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. از ۱۸s به عنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت کمی سازی بیان نسبی ژنهای مورد نظر از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. جهت اطمینان از تکثیر تخصصی ژن از melting curve استفاده شد.

روش های آماری

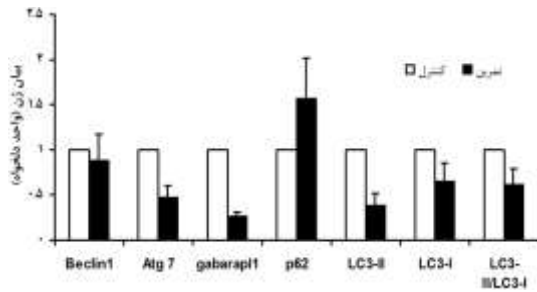
در بخش آمار توصیفی از شاخص های پراکنندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. میزان تغییرات بیان ژن ها نیز بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ سنجیده شد. در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. همسان بودن واریانس ها در مقایسات بین گروهی با آزمون F هارتلی سنجیده شد. جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه های تحقیقی از آزمون t-student استفاده شد. در تمامی مقایسات آماری سطح معنی داری $\alpha=0/05$ انتخاب شد.

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

طول قطعه تکثیر شده	Reverse primer	Forward primer	ژن
۱۰۸	TTGGCCAATAAGATGGGTCTGAA	TGTCAGGGACTCCAGATACGAGTG	Beclin1
۹۲	TCCTGTCAAGCAGTATCC	TCCTCCTTGGCTTTGTCTC	P62
۸۴	TGTGAGCCTGGCATTGATAA	TCACTCATGTCCCAGATCTCA	Atg7
۵۲	AGAAGGCTCCTAAAGCCAGG	GTCCTCAGGTCTCAGGTGGA	Gabarap11
۱۱۴	TTACACCCATATCAGATTCTTG	ATTCCAACCTGTCCCTCA	LC3-I
۹۸	AGGTGTACGAGAGCGAGAAGGAC	TACTGAGAGCGTAGGTGACATCCG	LC3-II
۵۴	GTTGGTTTCGGAAGTGGGC	GTCGGCATCGTTATGGTGC	18s

یافته ها

۱۵٪ درصدی P62 در تومور حیوانات گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل گردید ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: میانگین بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی در انتهای مطالعه در گروه های کنترل ($n=11$) و گروه تمرین ($n=11$)

بحث

مطالعه حاضر با هدف سنجش تاثیر ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر شاخص های اتوفاژی در تومور موش های Balb/c مبتلا به سرطان پستان به انجام رسید. مهم ترین یافته مطالعه حاضر این بود که تمرین استقامتی بلند مدت می تواند منجر به کاهش وزن و حجم تومور در گروه های تمرینی نسبت به گروه کنترل شود. این نتایج با تغییرات قابل توجه در بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی (به استثنای *Beclin1*) در تومور حیوانات تمرینی همراه بود که می تواند مؤید این نکته باشد که بخشی از اثرات مفید تمرین استقامتی در سرطان پستان از طریق تغییر در اجزای اتوفاژی تومور اتفاق می افتد.

در مطالعه حاضر جهت القای سرطان پستان از رده سلولی MC4-L2 استفاده گردید. دو دلیل مهم برای انتخاب این رده سلولی وجود داشت. در وهله اول این رده سلولی توانایی ترشح استروژن و پروژسترون را داراست و می تواند باعث ایجاد سرطان پستان از نوع وابسته به استروژن شود (۱۹). از آنجایی که تحقیقات متعدد نشان داده اند که اثر تمرین استقامتی بر سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن است و بیش ترین تاثیرات مثبت تمرین در سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن مشاهده می شود (۱۳)، لذا سرطان ایجاد شده با این رده

اطلاعات مربوط به وزن بدن و ویژگی های تومور در انتهای مطالعه در جدول شماره ۳ گزارش شده است. بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی تفاوت معنی داری بین وزن بدن در گروه کنترل و تمرینی مشاهده نشد. اعمال ۱۲ هفته تمرین استقامتی، سبب کاهش معنی دار وزن نسبی تومور در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل شد ($P=0.038$). میانگین حجم تومور در ابتدای مطالعه در گروه تمرینی 202 ± 47 میلی متر مکعب بود و در انتهای تمرین به 273 ± 130.9 رسید که نسبت به مقادیر ابتدایی آن اختلاف معنی دار داشت ($P=0.000$). حجم نسبی تومور در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری پایین تر بود ($P=0.043$). شاخص جرم قلب (Cardiac Mass Index) نیز بین گروه های تحقیق مقایسه شد. نتایج حاکی از افزایش معنی دار این شاخص در گروه تمرینی در مقایسه با گروه کنترل بود ($P=0.032$) (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: مقادیر وزن بدن، وزن تومور در گروه های تحقیق

متغیر	کنترل ($n=11$)	تمرینی ($n=11$)
وزن نسبی تومور (میلی گرم / گرم وزن بدن)*	342 ± 143	264 ± 54
حجم تومور*	83 ± 19	67 ± 14
وزن قلب به وزن بدن (میلی گرم / گرم)*	61 ± 0.4	68 ± 0.4

وزن قلب و وزن تومور بر وزن بدن و حجم تومور در انتهای مطالعه بر حجم تومور در انتهای هفته سوم تقسیم شده اند. داده ها انحراف میانگین \pm استاندارد هستند. * اختلاف معنی دار بین گروه های تحقیق ($P < 0.05$).

اعمال پروتکل تمرین استقامتی باعث تغییرات قابل توجه و در عین حال متفاوت در بیان ژن پروتئین های مرتبط با اتوفاژی در تومور حیوانات گروه تمرین نسبت به گروه کنترل شد (نمودار شماره ۱). بدین صورت که بیان ژن *Beclin1* (۱۱ درصد)، *Atg7* (۵۳ درصد)، *gabarapl* (۷۶ درصد)، *LC3-I* (۳۵ درصد) و *LC3-II* (۶۲ درصد) در تومور موش های تمرینی نسبت به گروه کنترل پایین تر بود. همچنین اعمال پروتکل تمرینی منجر به کاهش ۴۲ درصدی نسبت *LC3-II/LC3-I* و افزایش

سلولی، می‌تواند مدل مناسبی برای مطالعه اثرات تمرینی بر سرطان پستان باشد. دوم اینکه معمولاً در سرطان ایجاد شده به واسطه این رده سلولی متاستاز با تاخیر چند ماهه شروع می‌شود و شدت آن نیز در مقایسه با سرطان‌های ناشی از رده سلولی دیگر مثل NT4 کم‌تر می‌باشد (۲۰) و این خصیصه اجازه اعمال پروتکل تمرینی بلند مدت (در تحقیق حاضر سه ماهه) را برای محققان مطالعه حاضر فراهم می‌کند. با وجود این که رده سلولی MC4-L2 در این مطالعه استفاده شد و احتمال وقوع متاستاز زود هنگام با توجه به مطالعات پیشین کم‌تر بود (۲۰)، لیکن بهتر می‌بود که وقوع متاستاز در طول مطالعه مورد بررسی قرار می‌گرفت، که این مهم در این تحقیق میسر نشد و عدم کنترل متاستاز از محدودیت‌های مطالعه حاضر محسوب می‌شود.

اعمال پروتکل تمرینی استقامتی به مدت ۱۲ هفته باعث کاهش معنی‌دار حجم و وزن نسبی تومور در حیوانات تمرینی نسبت به گروه کنترل شد. به دلیل اینکه تمامی اندازه‌گیری‌های مطالعه حاضر بر روی بافت تومور انجام شد که مستقیماً درگیر در انجام تمرین نمی‌باشد، جهت اطمینان از اثر بخش بودن تمرین اعمال شده، شاخص جرم قلب بین گروه‌های تحقیق مقایسه شد. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار این شاخص در گروه تمرینی در مقایسه با گروه کنترل بود که تاییدی بر اثربخش بودن تمرین اعمال شده در تحقیق حاضر می‌باشد. مکانیسم‌هایی که تمرین استقامتی می‌تواند به واسطه آن‌ها بر حجم و وزن تومور اثر مثبت بگذارد، متعدد هستند، لیکن اهم آن‌ها را می‌توان در تغییر بر فنوتیپ متابولیکی تومور به سمت اکسیداسیون هوازی (۲)، کاهش شرایط هیپوکسی تومور (۲۱)، بهبود وضعیت آنژیوژنز تومور (۱۳) و کاهش التهاب تومور (۲۲) جستجو نمود.

در کنار عوامل فوق در مطالعه حاضر، فرضیه‌ای توسعه پیدا کرد که احتمالاً بخشی از اثرات مفید تمرین استقامتی بر سرطان پستان می‌تواند ناشی از تغییرات

احتمالی ناشی از تمرین در اجزای آتوفازی و نرخ انجام این فرآیند در تومور حیوان باشد. نتایج حاکی از اثرگذاری قابل توجه تمرین بر اجزای آتوفازی تومور حداقل در سطح نسخه برداری بود. هرچند شواهدی بر اثرگذاری تمرین استقامتی بر آتوفازی پایه و عوامل درگیر در آتوفازی در سایر بافت‌ها نظیر عضله اسکلتی وجود دارد (۱۵)، اما مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که اثر تمرین استقامتی بر اجزای آتوفازی در تومور را گزارش می‌نماید. به عنوان مثال، در مطالعات پیشین نشان داده‌اند که انجام تمرینات استقامتی با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آتوفازی نظیر *Beclin1* و *P62* و همچنین افزایش نسبت *LC3-II/LC3-I* همراه می‌باشد و نتیجه‌گیری کرده‌اند که تغییرات آتوفازی برای سازگاری‌های ناشی از تمرین استقامتی، یک فاکتور ضروری به حساب می‌آید (۱۵، ۲۳). یافته‌های پیشین بیانگر این مهم بودند که بیوژنر میتوکندری و آتوفازی دو مسیر اصلی برای بازسازی عضله اسکلتی شناخته می‌شوند، چرا که کیفیت میتوکندری عضله به دو عامل بیوژنر و میتوفازی (تخریب ناشی از آتوفازی خاص میتوکندری) بستگی دارد. لذا بر اساس مطالعات پیشین این احتمال وجود دارد که این دو مسیر در طول سازگاری‌های تمرینی با همکاری هم تنظیم می‌گردند زیرا براساس شواهد سیستم آتوفازی، قبل یا همزمان با تغییرات میتوکندری در عضله اسکلتی که در معرض فعالیت انقباضی مزمن است، سازگار می‌شود (۲۴). در کنار این شواهد، نتایج مطالعه حاضر کاهش ناشی از اعمال تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های مرتبط با آتوفازی را به اثبات رساند که نتیجه‌ای حائز اهمیت است، چرا که تحقیقات پیشین بالا بودن سطوح برخی از پروتئین‌های مرتبط با آتوفازی نظیر *LC3-I*، *LC3-II* و *Beclin1* که القاکننده آتوفازی می‌باشند را در سلول‌های سرطانی پستان انسان گزارش کرده‌اند (۹، ۷، ۳). نقش آتوفازی در تومور زایی و پاسخ به درمان با توجه به مراحل مختلف رشد سرطان متفاوت است. در مراحل اولیه رشد سرطان، آتوفازی می‌تواند به

لطف نقش کاتابولیکی که دارد با تخریب یا بازیافت اجزای سلول، یک واکنش محافظتی در برابر سلول سرطانی نشان دهد و با تسهیل پیری بیولوژیکی تومورزایی را سرکوب کند. اما بعد از آنکه تومور ایجاد شد، سلول های سرطانی می توانند به واسطه اتوفآژی تقویت شده، از خود در برابر فشارهای متابولیکی و درمانی استفاده کنند (۲۵). در واقع در مراحل ابتدایی توسعه تومور، فرآیند اتوفآژی می تواند به عنوان مسیر کنترل کننده رشد سلول، از شروع و توسعه تومور جلوگیری کند، لیکن بعد از توسعه یافتن و تثبیت شدن تومور می تواند عاملی برای زنده ماندن و رشد سلول های تومور شود (۲۶). نکته مهم دیگر اثرگذاری متفاوت تمرین استقامتی بر اجزای مختلف اتوفآژی تومور بود. تمرین استقامتی بر بیان ژن *Beclin1* تقریباً بدون تاثیر، ولی بر سایر ژن های مرتبط اثر کاهشی قابل توجه داشت.

Beclin1 در مراحل آغازین تشکیل اتوفآگوزوم (مرحله Nucleation) نقش دارد و یک جزء ضروری برای آغاز فرآیند اتوفآژی است. در حالی که سایر ژن های اندازه گیری شده در تحقیق حاضر در مراحل پایانی اتوفآژی درگیر هستند (۶،۴). عدم تاثیر پذیری *Beclin1* از تمرین استقامتی در کنار تغییرات کاهشی سایر ژن ها می تواند موکد این نکته باشد که تمرین استقامتی بر مراحل آغازین اتوفآژی بی تاثیر است، لیکن می تواند با کاهش سایر عوامل نظیر *gabap11* و *Atg7* از ادامه انجام فرآیند اتوفآژی در تومور جلوگیری نماید.

نتیجه مهم دیگر در مطالعه حاضر این بود که در بین ژن های تاثیرپذیر نیز اثر تمرین استقامتی متفاوت بود، به گونه ای که بیشترین میزان کاهش در بیان *gabap11* نسبت به سایر ژن ها مشاهده گردید. *Gabap11* در بلوغ نهایی اتوفآگوزوم نقش دارد و این عمل را با همکاری *Atg7* انجام می دهد (۴). مطالعاتی که از خاموش کردن ژن *gabap11* استفاده کرده اند، کاهش در جریان اتوفآژی و تعداد لیزوزوم ها را در رده سلولی MDA-MB-436 گزارش کرده اند (۲۷). مشاهده

بیشترین کاهش در بیان ژن *gabap11* می تواند این نکته را گوشزد نماید که تغییرات ناشی از تمرین استقامتی در فرآیند اتوفآژی در نهایت می تواند به تغییر فنوتیپ متابولیکی تومور به سمت بیش تر اکسیداتیو بودن منجر شود. هر چند در تحقیق حاضر فنوتیپ متابولیکی تومور مورد بررسی قرار نگرفت، لیکن تحقیقات پیشین نشان داده اند که کاهش *gabap11* در سلول های سرطانی منجر به تغییرات بیوانرژتیک از قبیل افزایش نرخ مصرف اکسیژن پایه، افزایش ATP درون سلولی و گلوکوتایون کل (total glutathion) سلول می شود (۲۷). شیفت اکسیداتیو سلول های توموری مسئله بسیار با اهمیت در زمینه گسترش تومور است. چرا که یکی از دلایل مهم توسعه تومور فنوتیپ اسیدی محیط تومور است که در نتیجه اتکای بیش تر به مسیر گلیکولیز بی هوازی اتفاق می افتد (۲).

نتیجه نهایی کاهش در بیان ژن های *gabap11* و *Atg7* در تومور موش های تمرین کرده با افزایش قابل توجه در بیان ژن های *P62* و کاهش نسبت *LC3-II/LC3-I* و *LC3-II* همراه بود. این نتیجه نشان دهنده کاهش نرخ انجام اتوفآژی در تومور موش های تمرین کرده می باشد. مطالعات متعددی از شاخص *LC3-II/LC3-I* و سنجش بیان *P62* برای سنجش نرخ انجام فرآیند اتوفآژی استفاده کرده اند (۳۰-۲۸). به دلیل این که در انتهای فرآیند اتوفآژی *LC3-I* به کمک برخی از پروتئین های مرتبط با اتوفآژی لیبیده می شود و به *LC3-II* تبدیل می گردد، لذا میزان *LC3-II* با تعداد اتوفآگوزوم ها در ارتباط است. همچنین *P62* نیز فاکتوری تنظیم گر در فرآیند اتوفآژی است که در انتهای فرآیند اتوفآژی تجزیه می شود. لذا کاهش این فاکتور نیز دلیلی بر افزایش فرآیند اتوفآژی است. بنابراین تغییرات مشاهده شده در این فاکتورها در تومور موش های تمرینی بیانگر کاهش نرخ اتوفآژی در گروه تمرینی تحقیق حاضر می باشد. با این وجود ذکر این نکته حائز اهمیت است که اندازه گیری های مطالعه حاضر تنها در سطح نسخه برداری انجام شد، در صورتی که جهت اظهار نظر

حیوانات تمرینی همراه است. نتایج می‌تواند مؤید این مهم باشد که بخشی از اثرات مفید تمرین استقامتی در بیماری سرطان پستان می‌تواند ناشی از تغییر در اجزای آتوفاژی تومور باشد.

سپاسگزاری

از تمامی همکارانی که در انجام فرایندهای مختلف مقاله با کد اخلاق IR.KMU.REC.1399.525 ما را یاری کردند، تشکر بعمل می‌آید.

بهتر در نرخ آتوفاژی، سنجش در سطح ترجمه بالاخص در فاکتورهای نظیر *P62* و *LC3-II/LC3-I* و همچنین ردیابی آتوفاگوزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی نیز ضروری به نظر می‌رسد، که انجام این مهم در مطالعه حاضر میسر نشد. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین استقامتی بلندمدت منجر به کاهش وزن و حجم تومور در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه کنترل می‌شود. این نتایج با تغییرات قابل توجه در بیان ژن‌های مرتبط با آتوفاژی (به استثنای *Beclin1*) در تومور

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1): 11-30.
2. 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. *J Physiol* 2015; 593(Pt 12): 2635-2648.
3. Chen H.-Y, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prevention Research* 2011; 4(7): 973-983.
4. Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, et al. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/Src signaling in triple negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144(3): 415-430.
5. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90(4): 1383-1435.
6. Wagner KU. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling? *Breast Cancer Res* 2004; 6(1): 31-38.
7. Zhou Y, Rucker III EB, Zhou BP. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 2018; 48(1): 60-74.
8. Aqbi HF, Tyutyunyk-Massey L, Keim RC, Butler SE, Thekkudan T, Joshi S, et al. Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy. *Oncotarget* 2018; 9(31): 22113-22122.
9. Zhu J, Cai Y, Xu K, Ren X, Sun J, Lu S, et al. Beclin1 overexpression suppresses tumor cell proliferation and survival via an autophagy dependent pathway in human synovial sarcoma cells. *Oncol Rep* 2018; 40(4): 1927-1936.
10. Han Y, Fan S, Qin T, Yang J, Sun Y, Lu Y, et al. Role of autophagy in breast cancer and breast cancer stem cells. *International Journal of Oncology* 2018; 52(4): 1057-1070.
11. Fu Y, Huang Z, Hong L, Lu J-H, Feng D, Yin X-M, et al. Targeting ATG4 in Cancer Therapy. *Cancers* 2019; 11(5): 649.
12. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA, et al. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics* 2011; 10(9): 1533.
13. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S,

- Agostinis P, Vandenabeele P, et al. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012; 22(1): 43-61.
14. Nasiri M, Peeri M, Matinhomaei H. Endurance Training Attenuates Angiogenesis Following Breast Cancer by Regulation of MiR-126 and MiR-296 in Breast Cancer Bearing Mice. *Int J Cancer Manag* 2017; 10(6): e8067.
 15. Lira VA, Okutsu M, Zhang Mei, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 2013; 27(10): 4184-4193.
 16. Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. *Physiol Rep* 2018; 6(7): e13651.
 17. Othman F, Motalleb G, Lam Tsuey Peng S, Rahmat A, Fakurazi S, Pei Pei C. Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Induces Apoptosis in 4T1 Breast Cancer BALB/c Mice. *Cell J* 2011; 13(2): 107-116.
 18. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia S, Keir S, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* 2010; 108: 343-348.
 19. Kang Y-A, Sanalkumar R, O'geen H, Linnemann AK, Chang CJ, Bouhassira EE, et al. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2012; 32(1): 226-239.
 20. Lanari C, Lüthy 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.
 21. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 2011; 13(4): 1-7.
 22. Buss LA, Dachs GU. Voluntary exercise slows breast tumor establishment and reduces tumor hypoxia in ApoE^{-/-} mice. *Journal of Applied Physiology* 2018; 124(4): 938-949.
 23. He C, Sumpter R, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy* 2012; 8(10): 1548-1551.
 24. Kim Y, Hood DA. Regulation of the autophagy system during chronic contractile activity-induced muscle adaptations. *Physiological Reports* 2017; 5(14): e13307.
 25. Zarzynska JM. The importance of autophagy regulation in breast cancer development and treatment. *BioMed Research International* 2014; 2014.
 26. Hojman P. Exercise protects from cancer through regulation of immune function and inflammation. *Biochemical Society Transactions* 2017; 45(4): 905-911.
 27. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer* 2020; 19(1): 12.
 28. Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bôle-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, et al. The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* 2014; 10(6): 986-1003.
 29. Jiang X, Huang Y, Liang X, Jiang F, He Y, Li T, et al. Metastatic prostate cancer-associated P62 inhibits autophagy flux and promotes epithelial to mesenchymal transition by sustaining the level of HDAC6. *Prostate* 2018; 78(6): 426-434.
 30. Huang Z, Fang W, Liu W, Wang L, Liu B, Liu S, et al. Aspirin induces Beclin-1-dependent autophagy of human hepatocellular carcinoma cell. *Eur J Pharmacol* 2018; 823: 58-64.