

علوم زیستی ورزشی - تابستان ۱۳۹۷
دوره ۱۰، شماره ۲، ص: ۱۹۲ - ۱۷۷
تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۱۷

تأثیر یک دوره تمرین استقامتی اینتروال همراه با نانوذرات سلنیوم بر بیان فاکتورهای LC3 و mTOR در عضله EDL موش‌های مبتلا به سرطان پستان

کیا رنجبر^۱ - حمید آقا علی نژاد^{۲*} - شیرین شهبازی^۳ - مهدیه ملانوری شمسی^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۳. دانشیار گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۴. استادیار گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر یک دوره فعالیت ورزشی تناوبی همراه با نانوذرات سلنیوم بر بیان فاکتورهای اتوفاژی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود. بدین منظور ۶۴ سر موش بальب سی با دامنه سنی ۳ تا ۵ هفته به شکل تصادفی به گروه‌های کنترل، تمرین اینتروال، نانوذرات سلنیوم و تمرین اینتروال همراه با مصرف نانوذرات سلنیوم تقسیم شدند. قبل از سرطانی کردن، ۶ هفته تمرین به‌عنوان اثر پیشگیری‌کننده و آماده‌سازی بر روی موش‌ها اعمال شد و پس از آن برای القای سرطان از رده سلولی 4T1 و پروتکل تمرین تناوبی و مصرف نانوذرات سلنیوم پس از شش هفته القا انجام گرفت. یافته‌های تحقیق با استفاده از آزمون تحلیل واریانس سه‌سویه آنالیز شد. تأثیر سرطان بر بیان mTOR و تأثیر تمرین بر LC3 معنادار بود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر مصرف نانوذرات سلنیوم نتوانسته به‌تنهایی از اتروپی عضلانی ممانعت کند. با وجود این مصرف نانوذرات سلنیوم در کنار تمرینات ورزشی تا حد زیادی توانسته از اتروپی عضلانی جلوگیری کند. در نهایت براساس این نتایج سازگاری در ژن‌های اتوفاژی احتمالاً یک تقابل جبرانی برای تعدیل هموستاز بدن است.

واژه‌های کلیدی

اتوفاژی، تمرین استقامتی اینتروال، سرطان، نانوذرات سلنیوم.

مقدمه

بیماری سرطان با عوارض متعددی همراه است که موجبات کاهش کیفیت زندگی و کم‌حرکی را برای فرد بیمار به همراه دارد. یکی از ارگان‌های اصلی بدن که در این بیماری آسیب می‌بیند، عضلات اسکلتی است؛ عضلات اسکلتی که بزرگ‌ترین ارگان در بدن انسان است، شامل بیش از ۶۰۰ عضله مجزاست که منبع اصلی پروتئین است و حدود ۵۰ درصد از وزن بدن را در برمی‌گیرد. عضلات اسکلتی علاوه بر نقشی که در تأمین حرکت، قدرت و تنفس دارند، در فعالیت‌های دیگری همچون حفظ تعادل قامت و تنظیم دمای بدن نیز درگیرند. تحلیل بافت عضلانی بخشی از سندروم مخرب کاکسسی^۱ در بیماری سرطان است (۱،۲).

کاکسسی ناشی از سرطان^۲ به‌عنوان یک سندروم چندگانه شناخته شده که شامل از دست دادن وزن بدن به‌ویژه وزن عضلانی و تحلیل آن، ضعف، خستگی و کاهش معنادار اشتهاست (۱). کاکسسی می‌تواند علامت بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، اسیدوز متابولیک (ناشی از کاهش سنتز پروتئین و افزایش کاتابولیسم آن) و برخی بیماری‌های خودایمنی باشد (۱،۲،۳). در این سندروم فرد از نظر فیزیکی تا حدی ضعیف می‌شود که در اثر بی‌اشتهایی، تحلیل بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت عضلانی دچار بی‌حرکی می‌شود. سازوکارهای دقیق ایجاد کاکسسی در بیماری‌ها به‌خوبی مشخص نیست، ولی احتمالاً افزایش فشار اکسایشی، تولید سایتوکاین‌های التهابی از بافت‌های مختلفی از جمله تومور و همچنین بر هم خوردن سازوکارهای کنترل‌کننده هموستاز سلول مانند اتوفاژی^۳ و آپوپتوز^۴ می‌توانند نقش کلیدی در ایجاد این سندروم مخرب ایفا کنند (۱،۲،۳).

اتوفاژی به‌عنوان یک سازوکار کاتوبولیکی نقش مهمی در کنترل سنتز و لیز پروتئین‌ها دارد. فرایند اتوفاژی طی مراحل مختلف و ژن‌های متعددی از جمله Beclin-1, LC3, LAMP-2, mTOR, P62 و مجموعه ژن‌های دیگری موسوم به Atg به‌صورت مهاری یا تحریکی کنترل می‌شوند. عوامل مختلفی می‌توانند به بر هم زدن تعادل اتوفاژی منجر شوند که در این میان می‌توان به شرایط تغذیه‌ای، استرس‌های متابولیکی مانند فشارهای اکسایشی، میزان کالری مصرفی و شرایط پاتولوژیک مانند بیماری سرطان از طریق تأثیر بر شرایط متابولیکی اشاره کرد. بوتیا و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کردند که

1. Cachexia
2. Cancer induced cachexia
3. Autophagy
4. Apoptosis

اتوفاژی ممکن است در شرایط استرسی و غیراسترسی اتفاق بیفتد. در شرایط استرسی مانند محرومیت غذایی، گرسنگی و کمبود اکسیژن اتوفاژی به وسیله آزاد کردن مواد انرژی‌زا در سلول به ادامه بقا در سلول منجر می‌شود. در وضعیت‌های استرسی همچون گرسنگی، مارکرهای اتوفاژی در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد (۴،۵). در خلال گرسنگی، پاسخ اتوفاژی ترجیحاً در عضلات تندانقباض اتفاق می‌افتد که علت آن وجود انتقال سیگنالینگ متفاوت در عضلات کند و تندانقباض است. در شرایط غیراسترسی اتوفاژی به حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده کمک می‌کند؛ با وجود این در وضعیت پاتولوژیک اتوفاژی معیوب در بیماری‌های مختلفی مانند بیماری قلبی، چاقی، دیابت، بیماری تخریب عصبی و سرطان وجود دارد. در سرطان اتوفاژی نقش دوگانه را بر عهده دارد که با مهار تجمع پروتئین‌های آسیب‌دیده از رشد تومور جلوگیری می‌کند و در طرف مقابل موجب ارتقای رشد تومور از طریق کمک به بقای سلول‌های آن می‌شود. عوامل بازدارنده رشد تومور اغلب به‌طور مثبت تنظیم اتوفاژها را به‌عهده دارند، درحالی‌که فراورده‌های آنکوژنی معمولاً مانع اتوفاژ می‌شوند. تغییر و اصلاح ژن‌های اصلی اتوفاژ با اثر بر پیشرفت سرطان همراه است؛ با این حال نقش اتوفاژ در سرطان به وضعیت سلول‌ها وابسته است و مانند شمشیر دولبه^۱ عمل می‌کند و می‌تواند توقف یا پیشرفت تومور را در پی داشته باشد (۴،۵،۶).

افزایش فشار اکسایشی از دلایل تحریک مسیرهای لیز پروتئین و برهم خوردن تعادل هموستازی با تأثیر بر میزان سازوکارهایی مانند اتوفاژی است. مصرف مواد ضد اکسایشی مانند سلنیوم می‌تواند نقش بسزایی در تعدیل رادیکال‌های آزاد و بهبود فشار اکسایشی داشته باشد. در سال‌های اخیر سلنیوم به دلیل خواص بیولوژیکی اعم از نقش ضد اکسایشی، تقویت سیستم ایمنی و ضدسرطانی که دارد، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۷). سلنیوم با جلوگیری از تبدیل سلول‌های سالم به سلول‌های سرطانی، ممانعت از فعال‌سازی ژن‌های سرطانی، کاهش التهاب نقش مهمی در تعدیل سازوکارهای مهارکننده مانند اتوفاژی در بافت‌های محیطی و تومور دارد. در مطالعات متعددی گزارش شده که استفاده از سلنیوم به شکل نانوذرات^۲ نقش چشمگیری در کاهش حجم تومور دارد. با این حال به دلیل نقش سم‌زایی نانوذرات کاهش حجم‌های مصرفی به‌ویژه در شرایط پاتولوژیکی مانند سرطان توصیه می‌شود (۸،۹،۱۰).

-
1. Double-edged Sword
 2. Nanoparticles

در مقابل تأثیرات سم‌زایی نانوذرات و توصیه به کاهش مصرف، استفاده از فعالیت ورزشی به‌عنوان راهبرد پیشگیرانه مؤثر و مطمئن که با سازوکارهای مختلفی از جمله دفاع ضداکسایشی، می‌تواند نقش بسزایی در طول دوره درمان داشته باشد، به‌طوری‌که فعالیت ورزشی با افزایش دفاع ضداکسایشی در بافت‌های محیطی از جمله عضلات در کنار استفاده از نانوذرات با دوز کم احتمالاً نقش مؤثری در حفظ توده عضلانی در بیماران سرطان دارد. با وجود این در بین پروتکل‌های ورزشی مختلف همراه با دامنه وسیعی از شدت‌های اعمال‌شده، همواره به تأکید بر تمرینات ورزشی با شدت متوسط برای بیماران سرطانی توصیه شده، که اگر با دوره‌های کاهش شدت فعالیت ورزشی همراه باشد، می‌تواند به کمک بازیافت ATP از کاهش ذخایر انرژی و مکانیسم‌های افزایش تجزیه پروتئین ناشی از ورزش به‌ویژه در عضلات اسکلتی جلوگیری کند (۱۱). همچنین براساس نتایج مطالعات مختلف فعالیت ورزشی چه در شرایط فیزیولوژیک و چه در شرایط پاتولوژیک نقش مؤثری در کنترل اتوفازی در عضلات اسکلتی بازی می‌کند (۱۱،۱۲). با توجه به مطالعات مذکور هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یک دوره تمرین استقامتی اینتروال بر بیان فاکتورهای LC3 و mTOR در عضله EDL موش‌های مبتلا به سرطان پستان بوده است.

روش‌شناسی

این مطالعه تجربی است و با طرح پس‌آزمون با گروه‌های مختلف انجام گرفت. بدین‌منظور ۶۴ سر موش ماده نژاد بالب سی (Balb/C) با دامنه سنی ۳ تا ۵ هفته و میانگین وزن ۱۷ گرم از مؤسسه پاستور ایران تهیه شد و به حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت و در شرایط هوایی آزمایشگاه تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی - روشنایی نگهداری شد و پژوهش انجام گرفت. در ابتدای پژوهش و پس از یک هفته آشناسازی موش‌ها به شکل تصادفی به ۴ گروه ۱۶ تایی تقسیم شدند؛ شامل سالم - کنترل (CH)، سالم - تمرین (TH)، سالم - نانوذرات سلنیوم (SeH)، سالم - تمرین - نانوذرات سلنیوم (SeTH). پس از شش هفته تمرین نصف موش‌ها در هر گروه با تزریق رده سلولی 4T1 مبتلا به سرطان پستان شدند و چهار گروه دیگر شامل تومور - کنترل (CT)، تومور - تمرین (TT)، تومور - نانو ذرات سلنیوم (ST)، تومور - تمرین - نانو ذرات سلنیوم (SeTT) به مطالعه اضافه شد. پس از تزریق رده سلولی 4T1 فعالیت ورزشی به مدت ۶ هفته هر هفته ۵ جلسه همراه با استفاده از نانوذرات سلنیوم

به صورت یک روز در میان به مقدار ۱۰۰ میلی گرم در سایز ۲۵۰ نانومتر از نانوذرات سلنیوم Se NPs به موش‌های به شکل گاوآژ خوراکی داده شد.

برای تهیه نانوذرات سلنیوم لاکتوباسیلوس برویس در ۱۰۰ میلی لیتر از (MRS) مایع کشت شده بود (Merch، آلمان) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از یک شب انکوباتور، ۱ میلی لیتر از سلنیوم اکسید از استوک محلول (۲۰۰ mg/l) در ۱۰۰ میلی لیتر از کشت مایع لاکتوباسیلوس اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سلول‌ها از طریق سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شدند و پلیت حاصل سه بار با PBS شسته شد و برای استخراج نانوذرات سلنیوم استفاده شد. پلیت حاصل در نیتروژن مایع منجمد و هاون کوبی شد. نانوذرات سلنیوم از بقایای سلولی با سیستم استخراج آب الکل N-octy جدا شد. نانوذرات سلنیوم جدا شده در ۱۰۰ kv با میکروسکوپ انتقال الکترونی (TEM) EM- جدا شد. نانوذرات سلنیوم جدا شده در ۲۰۸ (EEL Ltd., Eindhoven) (208 هلند) برای ارزیابی اندازه مورد نظر بررسی شد. پتانسیل زتا از نانوذرات تلخیص شده با استفاده از Zetasizer (Malvern, UK) (MS 2000) تعیین شد. برای تعیین ترکیب عنصری از نانوذرات، انرژی پراکنده طیف اشعه ایکس (EDX) میکروآنالیز نیز انجام گرفت. در نهایت نانوذرات سلنیوم قرمز عنصری در (PBS) استریل به حالت سوسپانسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۹).

دو هفته پس از تزریق رده سلولی 4T1 اندازه و حجم تومور قابل رؤیت و اندازه‌گیری بود. اندازه‌گیری تومور هر دو روز یک بار با استفاده از کولیس دیجیتالی در دو بعد انجام گرفت که بیشترین طول اندازه‌گیری به عنوان طول تومور و اندازه‌گیری حاصله در زاویه ۹۰ درجه طول به عنوان عرض تومور در نظر گرفته شد و با استفاده از فرمول استاندارد $[V=1/2(L2 \times W)]$ حجم تومور محاسبه شد.

در این مطالعه پروتکل تمرین دویدن به صورت استقامتی تناوبی و بر روی نوار گردان بود که با مدل تمرینی آقاعلی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۴) و همچنین خوری و همکاران (۲۰۱۵) هم‌حجم‌سازی^۱ شده، انجام گرفت (۱۳، ۱۴، ۱۵). تمرین بعد از القای سرطان به صورت اینتروال هم‌حجم اعمال شد. شدت‌ها برای گروه‌های سالم و توموری متفاوت بود. شدت بدین صورت که در دو هفته اول پس از توموری شدن برای گروه‌های سالم با شدت ۱۸ متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۲۲ متر بر دقیقه (۴۴ دقیقه و ۵ بار در هفته) ادامه یافت و در گروه‌های توموری شدت از ۱۸ متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۲۲ متر بر دقیقه (۴۴ دقیقه و ۵ بار در هفته) ادامه یافت. دو هفته دوم پس از توموری شدن در گروه‌های سالم با شدت از ۲۰

1. Isovolumic

متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۲۴ متر بر دقیقه (۴۶ دقیقه و ۵ بار در هفته) و در گروه‌های توموری شدت از ۱۸ متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۲۰ متر بر دقیقه (۴۶ دقیقه و ۵ بار در هفته) ادامه پیدا کرد. دو هفته سوم پس از توموری شدن در گروه‌های سالم با شدت ۲۲ متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۲۴ متر بر دقیقه (۴۴ دقیقه و ۵ بار در هفته) ادامه پیدا کرد و در گروه‌های توموری با شدت ۱۴ متر بر دقیقه آغاز شد و تا ۱۸ متر بر دقیقه (۴۴ دقیقه و ۵ بار در هفته) ادامه یافت (۱۳، ۱۴، ۱۵).

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با ترکیب کتامین-رایلازین بی‌هوش شدند و در محیط کاملاً استریل استخراج بافت عضله EDL^۱ انجام گرفت، بافت مورد نظر به سرعت در مایع نیتروژن منجمد و برای انجام آزمایش‌های سلولی مولکولی در یخچال ۸۰- نگهداری شد. برای استخراج total RNA از عضله به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در ۴ C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰٫۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ C، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۰٫۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در ۲۰ μL آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه Eppendorff, Germany) سنجش شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ μg از RNA و کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Reverse Transcriptase انجام گرفت.

به منظور اندازه‌گیری سطوح بیان mTOR و LC3 از روش کمی Real time-PCR استفاده شد (USA Applied Biosystems). طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های mTOR و LC3 در بانک ژنی NCBI، با استفاده از نرم‌افزار Oligo و توسط شرکت ماکروژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

1. Extensor digitorum longus

جدول ۱. توالی پرایمر و دما

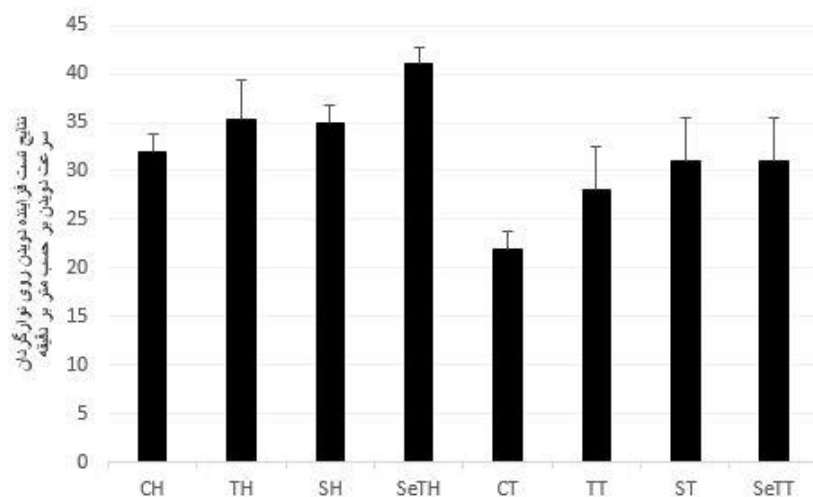
دما	توالی پرایمر	ژن
۷۷/۱۰	F: GCGACCAGCACCCCAGTAAG R: GTTGACCAGCAGGAAGAAGGC	LC3
۸۲/۶۲	F: TCGCAAGAACCTCAGCATCCAG R: CGTCAGGTGGTCATAGTCAGGAG	mTOR
۸۲/۰۲	F: GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC R: GTGCCGTTGAATTTGCCGTG	GAPDH

یافته‌های مطالعه حاضر به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه شده است. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از تست Shapiro-Wilk استفاده شد. همچنین برای بررسی تأثیر متغیرهای مستقل از آزمون تحلیل واریانس سه‌سویه با سطح معناداری $P < 0.05$ و تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

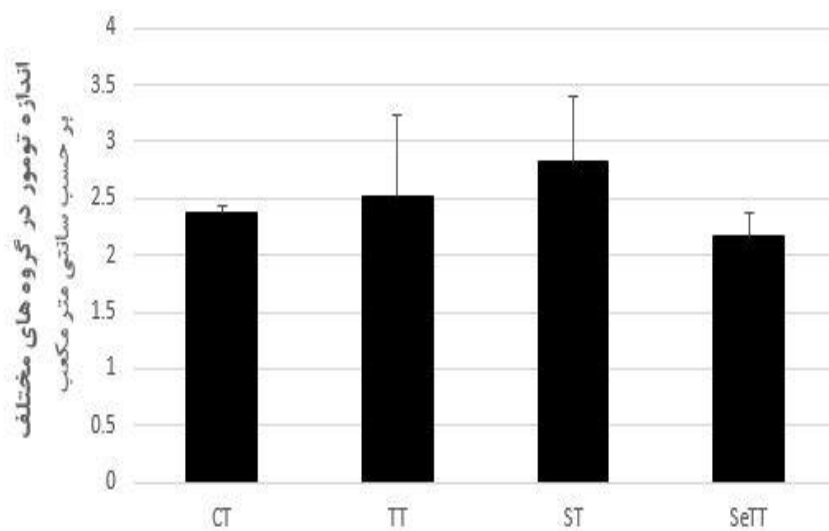
یافته‌ها

نتایج تست فزاینده دوییدن روی نوار گردان در هفته‌های پایانی پژوهش در نمودار ۱ نشان‌دهنده تأثیر معنادار هر سه فاکتور تمرین، نانوذرات سلنیوم و سرطان بر حداکثر سرعت دوییدن (V_{max}) در گروه‌های مختلف است ($P < 0.05$)؛ با وجود این ترکیب هیچ کدام از عوامل بر نتایج تست فزاینده دوییدن روی نوار گردان معنادار نبوده است.

براساس نتایج این مطالعه (نمودار ۲) یک دوره تمرین استقامتی تناوبی همراه با مصرف سلنیوم به کاهش حجم تومور منجر شده است. به علاوه تأثیر فعالیت ورزشی و نانوذرات نیز معنادار است ($P < 0.05$). نتایج پژوهش در مورد وزن بدن بدون تومور نشان‌دهنده تأثیر نانوذرات سلنیوم بر وزن بدن بدون تومور بوده ($P < 0.01$). نانوذرات سلنیوم سبب کاهش وزن بدن بدون تومور نیز شده است. تمرین توانسته است تا حدی وزن بدن را حفظ کند و سرطان نیز وزن را کم کرده، اما این تغییرات معنادار نبوده است (نمودار ۳).



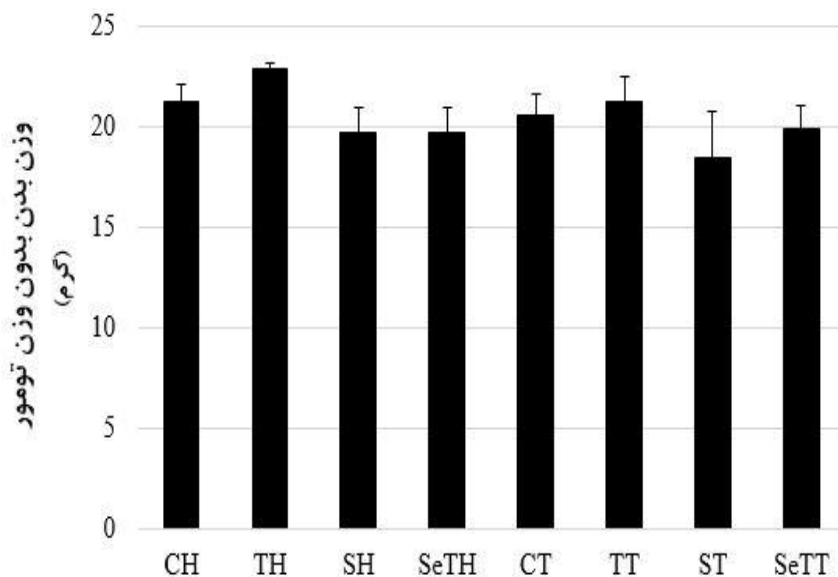
نمودار ۱. نتایج تست فزاینده دوییدن روی نوار گردان در گروه‌های مختلف (میانگین \pm انحراف استاندارد)



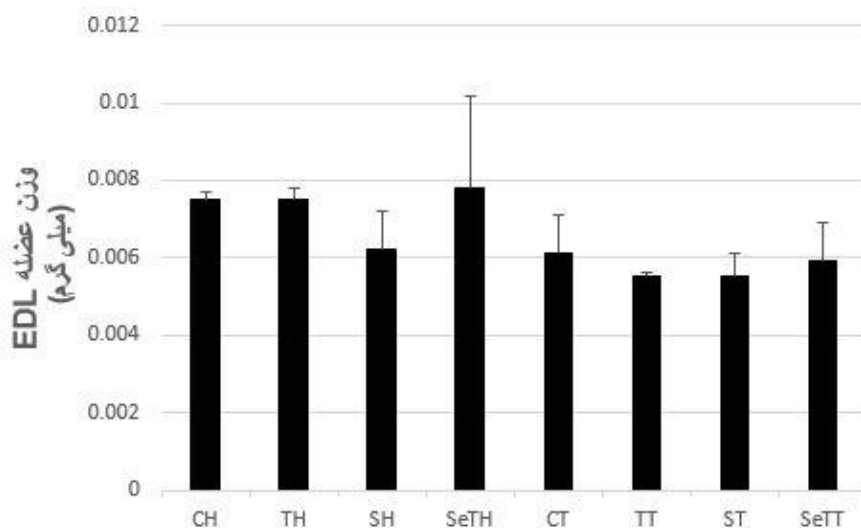
نمودار ۲. تغییرات اندازه تومور در گروه‌های مختلف پژوهش (میانگین \pm انحراف استاندارد)

نمودار ۴ نشان‌دهنده تغییرات وزن عضله بازکننده طویل انگشتان (EDL) است. یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که سرطان تأثیر معناداری بر وزن عضله EDL دارد ($P < 0.05$)، تمرین و نانوذرات سلنیوم

نتوانسته‌اند تغییری در فرایند آتروفی عضلانی ایجاد کنند؛ هرچند گروه تمرین-نانوذره-سرطان در جهت حفظ توده عضلانی بوده است.

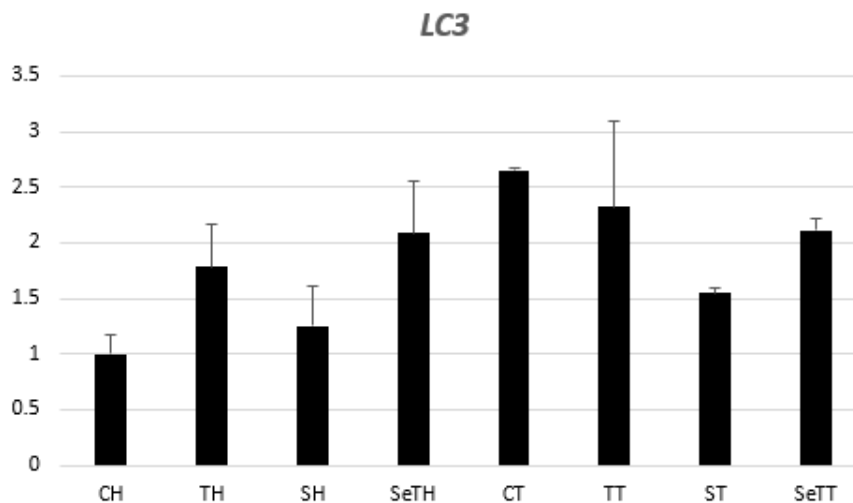


نمودار ۳. تغییرات وزن بدن بدون وزن تومور در گروه‌های مختلف (میانگین \pm انحراف استاندارد)

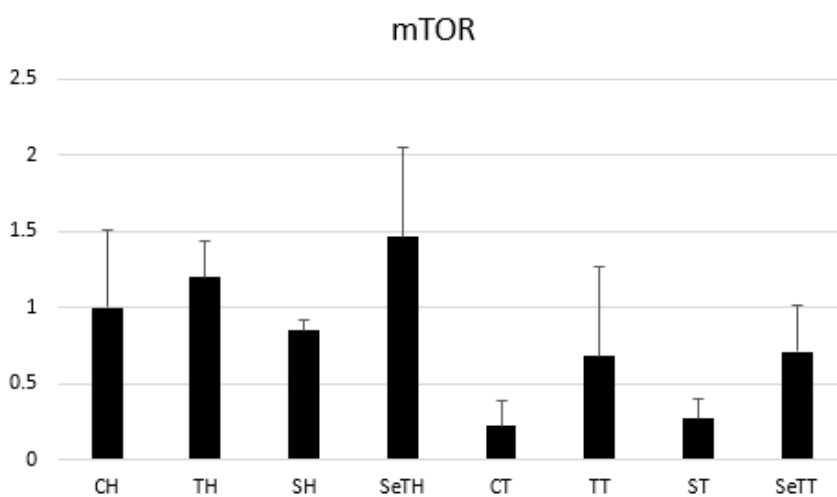


نمودار ۴. مقایسه وزن عضله EDL در گروه‌های مختلف (میانگین \pm انحراف استاندارد)

همان‌طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌کنید، تأثیر تمرین بر بیان ژن LC3 در عضله EDL معنادار گزارش شده است ($P < 0.05$). به علاوه همان‌طور که در نمودار ۶ نیز مشاهده می‌شود تأثیر سرطان بر بیان ژن mTOR در عضله EDL معنادار گزارش شده است ($P < 0.05$).



نمودار ۵. میزان بیان ژن LC3 در گروه‌های مختلف پژوهش (میانگین \pm خطای استاندارد)



نمودار ۶. میزان بیان ژن mTOR در گروه‌های مختلف پژوهش (میانگین \pm خطای استاندارد)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش در مورد وزن بدن بدون تومور نشان‌دهنده تأثیر نانوذرات سلنیوم بر وزن بدن بدون تومور بوده ($P < 0/01$)، نانوذرات سلنیوم موجب کاهش وزن بدن بدون تومور نیز شده است. تمرین توانسته تا حدی وزن بدن را حفظ کند و سرطان نیز وزن را کم کرده، اما این تغییرات معنادار نبوده است. همچنین فعالیت ورزشی، سرطان و نانوذرات سلنیوم هر کدام جداگانه اثر معناداری بر مقادیر حداکثر سرعت دویدن روی نوار گردان داشته است. فعالیت ورزشی توانسته همراه با مصرف نانوذرات سلنیوم با تعدیل پاسخ‌های مولکولی همچون اتوفاژی به حفظ بافت عضلانی کمک کند، با این حال تنها اثر فعالیت ورزشی بر بیان LC3 و همچنین اثر سرطان بر بیان ژن mTOR معنادار گزارش شده است.

تنظیم تعادل بین سنتز و تجزیه پروتئین‌های عضلانی نقش برجسته‌ای در رشد یا مهار حجم عضلانی دارد، که این سازوکار توسط شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالینگ از جمله اتوفاژی و مسیر یوبیکوتین کنترل می‌شود. این مسیرهای تنظیم‌کننده چرخه پروتئینی توسط عوامل مختلفی که در پیوستاری از فاکتورهای پاتولوژیک تا عوامل فیزیولوژیکی تأثیر می‌پذیرد، کنترل می‌شوند. بیماری سرطان به‌عنوان یک عامل پاتولوژیک از طریق افزایش التهاب، تولید عوامل ایجادکننده کآچکسی از طریق تومور مانند TNF- α به تجزیه پروتئین‌های عضلانی منجر می‌شوند و با مکانیسم‌های گفت‌وگوی بین‌بافتی ۱ شرایطی را فراهم می‌کنند که موجب از دست دادن حجم زیادی از عضلات اسکلتی می‌شود (۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی از طریق تعدیل مکانیسم‌های تنظیم‌کننده اتوفاژی LC3 و mTOR توانسته به حفظ بافت عضلانی کمک کند. همچنین فعالیت ورزشی از طریق افزایش آمادگی بدنی تا حد زیادی به تأثیرات مخرب کآچکسی بر توده عضلانی و شرایط مخربی که به کاهش فاکتورهای عملکردی منجر می‌شوند، جلوگیری کند.

با وجود تشخیص نقش چشمگیر فعالیت ورزشی به‌عنوان یک معجون دارویی ۲ در مقابله با کآچکسی و تحلیل بافت عضلانی ناشی از سرطان، در رابطه با سازگاری‌های مولکولی ناشی از ورزش در درمان کآچکسی شواهد علمی اندکی وجود دارد. چندین مطالعه نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی با تنظیم سازوکارهای کنترل‌کننده رشد پروتئین‌های عضله مانند اتوفاژی، مسیر یوبیکوتین و غیره در شرایط طبیعی و پاتولوژیک می‌تواند نقش مؤثری در مقابله با کآچکسی داشته باشد. همواره استفاده از

1. Inter-tissue crosstalk
2. Poly-pill

فعالیت ورزشی با شدت مطمئن و متوسط برای بیماران سرطانی توصیه شده است. با وجود این به دلیل تأثیر پروتکل‌های مختلف ورزشی بر روی تنظیم تعادل پروتئینی برای جلوگیری از تحلیل بافت عضلانی ناشی از کاسکسی ابهامات زیادی در این زمینه وجود دارد. در بین پروتکل‌های ورزشی متعدد، تمرینات تناوبی با شدت متوسط احتمالاً راهکار مناسبی برای غلبه بر بخش لیز پروتئینی ناشی از تمرینات استقامتی مداوم باشد (۷).

یکی از یافته‌های مهم این تحقیق تأثیر ورزش و نانوذرات سلنیوم بر کنترل رشد تومور و کاهش اندازه آن است که احتمالاً فعالیت ورزشی از طریق سازگاری‌های مولکولی مانند اتوفاژی و آپوپتوز و سرکوب فاکتورهای رشدی از جمله عوامل مرتبط با آنژیوژنز در تومور به کاهش رشد تومور منجر شده است. در این زمینه بالیت و همکاران (۲۰۱۱) کاهش بیان انتقال‌دهنده‌های لاکتات (MCTs) ۱ را یکی از عوامل کاهش تغذیه تومور دانسته‌اند (۱۶). از سوی دیگر ماتیو همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که اتوفاژی از طریق سرکوب ژن P62 به مهار رشد تومور منجر شده است (۱۷). خوری و همکاران نیز افزایش آپوپتوز را از دلایل سرکوب رشد تومور دانستند. از سوی دیگر، یزدی و همکاران نشان دادند که مصرف نانوذرات سلنیوم از طریق تقویت سیستم ایمنی به افزایش بقای عمر ۲ موش‌های مبتلا به سرطان پستان منجر شده است؛ که احتمالاً جلوگیری از رشد تومور از عوامل تأثیرگذار در افزایش طول عمر موش‌ها بوده است (۱۵).

با توجه به بررسی تأثیر نانوذرات سلنیوم بر وزن بدون تومور، نشان داده شد که مصرف نانوذرات سلنیوم به کاهش وزن بدن منجر می‌شود، با وجود این انجام تمرینات ورزشی توانسته تا حدی وزن بدن بدون تومور را حفظ کند. در مقابل سرطان به کاهش وزن بدن بدون تومور منجر شده است. اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنادار نبوده است. نتایج تحلیل مقایسه وزن عضله EDL نشان می‌دهد که سرطان به کاهش وزن عضلانی منجر شده، اگرچه گروه سرطانی که تحت مداخله تمرین ورزشی و مصرف نانوذرات سلنیوم قرار گرفته، توانسته تا حدودی وزن عضلانی را حفظ کند. تأثیر نانوذرات سلنیوم بر بیان فاکتورهای مولکولی تنظیم‌کننده اتوفاژی (mTOR و LC3) معنادار نبوده است، با این حال اثر تمرین و سرطان به‌طور جداگانه بر میزان بیان ژن LC3 و mTOR معنادار گزارش شده است. در این زمینه نتایج مطالعه کی و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که مصرف مواد آنتی‌اکسیدان از طریق کاهش

1. Monocarboxylate transporters
2. Survival rate

گونه‌های اکسیژن واکنشی ۱ (ROS) به مهار استرس اکسایشی و کاهش بیان فاکتورهای اتوفژی در موش‌های جوان نسبت به گروه کنترل منجر می‌شود. از سوی دیگر، در مطالعه پنا و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده شد کاهش اتوفژی به تحلیل بافت عضلانی موش‌های سرطانی کمک می‌کند (۱۸،۱۹،۲۰). لیرا و همکاران (۲۰۱۳) افزایش اتوفژی پس از یک دوره تمرین در موش‌های سالم را به‌عنوان سازگاری مهم در عضلات موش‌های تمرین‌کرده ذکر کردند (۲۰،۲۱،۲۲). از سوی دیگر، در مطالعه هام و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که مصرف آمینواسید گلیسین در گروه تجربی به کاهش آتروفی، اتوفژی و فاکتورهای مرتبط به تحلیل بافت عضلانی مانند Atrogin و Murf منجر می‌شود (۳،۲۳). بنابراین با توجه به نقش فعالیت ورزشی به‌عنوان یک اجزای درمانی در کنار مصرف نانوذرات سلنیوم در این مطالعه احتمالاً توانسته با تعدیل بیان فاکتورهای اتوفژی، بهبود وزن بدن و کاهش اندازه تومور نقش مؤثری در حفظ توده عضلانی و وزن کلی بدن بدون در نظر گرفتن وزن تومور در گروه تجربی ورزش-نانوذرات که سلنیوم دریافت کرده‌اند، داشته باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تست فزاینده دویدن، می‌توان گفت که تأثیر هر سه فاکتور تمرین ورزشی، سرطان و نانوذرات سلنیوم بر حداکثر سرعت دویدن معنادار بوده، با اینکه ترکیب این متغیرها معنادار نبوده است؛ با وجود این بیشترین سرعت مربوط به گروه سالمی بود که هم تمرینات ورزشی و هم نانوذرات سلنیوم را دریافت کرده بود. فعالیت ورزشی در کنار نانوذرات سلنیوم توانسته به بهبود استرس اکسایشی منجر شود و با تعدیل میزان اتوفژی احتمالاً توانسته از تحلیل بافت عضلانی تا حدود زیادی جلوگیری نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که یک دوره فعالیت ورزشی تناوبی به کاهش حجم تومور و بهبود بیان فاکتورهای تنظیم‌کننده اتوفژی منجر شده که این تغییرات احتمالاً از طریق سازگاری‌های مولکولی شامل بیان LC3 و mTOR مشخص شده است. با این حال مقایسه پروتکل‌های تمرینی، سنجش میزان پروتئین‌های کنترل‌کننده از طریق تست‌های آزمایشگاهی مانند الیزا و وسترن بلات،

استفاده از نانوذرات آمینواسیدهایی که می‌توانند در حجم عضلانی به‌ویژه در طول دوره سرطان نقش بسزایی داشته باشند، می‌تواند در مطالعات بعدی قابل بررسی باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از رساله دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی مصوب دانشکده علوم انسانی دانشگاه تربیت مدرس است. بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم گروه و معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. در ضمن نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نیست.

منابع و مأخذ

1. Lenk, K., Schuler, G., & Adams, V. (2010). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 1(1), 9-21.
2. Lira, V. A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N. P., Laker, R. C., Breen, D. S.,... & Yan, Z. (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *The FASEB Journal*, 27(10), 4184-4193.
3. Ham, D. J., Murphy, K. T., Chee, A., Lynch, G. S., & Koopman, R. (2014). Glycine administration attenuates skeletal muscle wasting in a mouse model of cancer cachexia. *Clinical Nutrition*, 33(3), 448-458.
4. Bianco, R., Garofalo, S., Rosa, R., Damiano, V., Gelardi, T., Daniele, G.,... & Tortora, G. (2008). Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *British journal of cancer*, 98(5), 923-930.
5. Bhutia, S. K., Dash, R., Das, S. K., Azab, B., Su, Z. Z., Lee, S. G.,... & Sarkar, D. (2010). Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24. *Cancer research*, 70(9), 3667-3676.
6. Ogata, T., Oishi, Y., Higuchi, M., & Muraoka, I. (2010). Fasting-related autophagic response in slow-and fast-twitch skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(1), 136-140.
7. Tolkovsky, A. M. (2010). Autophagy thwarts muscle disease. *Nature medicine*, 16(11), 1188-1190.
8. Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., & Li, P. (2010). Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe*, 16(4), 380-386.

9. Yazdi, M. H., Mahdavi, M., Varastehmoradi, B., Faramarzi, M. A., & Shahverdi, A. R. (2012). The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biological trace element research*, 149(1), 22-28.
10. Zhang, J., Wang, X., & Xu, T. (2008). Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological sciences*, 101(1), 22-31.
11. Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M.,... & Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell metabolism*, 10(6), 507-515.
12. Mousavi, S. M., Montazeri, A., Mohagheghi, M. A., Jarrahi, A. M., Harirchi, I., Najafi, M., & Ebrahimi, M. (2007). Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *The breast journal*, 13(4), 383-391.
13. Agha-Alinejad H, Haftchenari S, Matin Homae H. [Effect of a Period of Endurance Training on Serum Il-8 Concentration and Tumor Volume in Breast Cancer Bearing Mice (In Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2014 May 15;16(1):26-32.
14. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1994 Sep 21;86(18):1403-8.
15. Khor, V., Shalamzari, S. A., Isanejad, A., Alizadeh, A. M., Alizadeh, S., Khodayari, S.,... & Khaniki, M. (2015). Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. *European journal of pharmacology*, 765, 179-187.
16. Balliet RM, Capparelli C, Guido C, Pestell TG, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Pestell RG, Howell A, Sotgia F. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: understanding the aging and cancer connection. *Cell cycle*. 2011 Dec 1;10(23):4065-73.
17. Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K.,... & White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & development*, 21(11), 1367-1381.
18. Penna, F., Costamagna, D., Pin, F., Camperi, A., Fanzani, A., Chiarotto, E. M.,... & Costelli, P. (2013). Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *The American journal of pathology*, 182(4), 1367-1378.
19. He, C., Sumpter, Jr, R., & Levine, B. (2012). Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*, 8(10), 1548-1551.
20. Laviano, A., Meguid, M. M., Inui, A., Muscaritoli, M., & Rossi-Fanelli, F. (2005). Therapy insight: cancer anorexia-cachexia syndrome—when all you can eat is yourself. *Nature clinical practice Oncology*, 2(3), 158-165.

-
21. Qi, Z., He, Q., Ji, L., & Ding, S. (2014). Antioxidant supplement inhibits skeletal muscle constitutive autophagy rather than fasting-induced autophagy in mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
 22. Shiri Y, Agha-Alinejad H, Gharakhanlou R, Amani Shalamzari S, Saei MA. [Effect of six weeks endurance training on tumor tissue IL-10 cytokine levels in breast cancer bearing mice (In Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2014 Sep 15;16(3):205-10.
 23. Tarricone, R., Ricca, G., Nyanzi-Wakholi, B., & Medina-Lara, A. (2015). Impact of cancer anorexia-cachexia syndrome on health-related quality of life and resource utilisation: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.

The effect of interval training and selenium nanoparticles on mTOR and LC3 mRNA expression in mice bearing breast cancer

Kia Ranjbar¹- Hamid Agh-Alinejad^{*2}- Shirin Shahbazi³- Mahdiah Molanori Shamsi⁴

1. PhD of exercise Physiology, faculty of human science, University of Tarbiat modares, Tehran, Iran 2. associate professor of exercise Physiology, faculty of human science, University of Tarbiat modares, Tehran, Iran 3. associate professor of medical genetics, faculty of medical science, University of Tarbiat modares, Tehran, Iran 4. assistance professor of exercise Physiology, faculty of human science, University of Tarbiat modares, Tehran, Iran

(Receive:2016/7/1;Accept:2016/12/7)

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of aerobic interval training and the purported antioxidant treatment, selenium nanoparticle supplementation on the expression of autophagy in 4T1 breast cancer-bearing mice with cachexia. 3-5 weeks old Balb/c mice were initially assigned to control, interval training, selenium nanoparticles and interval training-selenium nanoparticles (n = 15-16/group). After 6 weeks of training, half of each group was injected with 4T1 tumor cells, followed by 6 additional weeks of training. Finally, the mice were sacrificed, tissues were removed and were quantified using the Real-time PCR method. The effect of exercise training on the expression of LC3 and the effect of cancer on mTOR is significant. Combination of interval training and selenium nanoparticles maintained skeletal muscle function in cancer (P<0.05). finally, the adaptation of autophagic genes against physiological and pathologic stresses can be considered to be a counterbalance in body effort to modify these conditions and to bring the body to physiological homeostasis.

Keywords

Autophagy, Cancer, Interval exercise training, Selinume nanoparticles.

* Corresponding Author: Email: halinejad@modares.ac.ir; Tel.: +989124946181