

## The Effect of Endurance Training on Tumor Tissue Levels of Caspase-3 and Caspase-9 in Mice with Breast Cancer

**Kazemi A:** Dept of Sport Sciences, Faculty of humanity and literature, Vali E ASR University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

**Mirzazadeh E:** Exercise Physiology Dept, Faculty of humanity and literature, Islamic Azad University, Kerman, Iran

**Corresponding Author:** Abdolreza Kazemi, a.kazemi@vru.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Today, cancer is the second leading cause of death, and breast cancer is the most common cancer, among women. The levels of apoptotic factors, such as caspases, decrease in tumor, leading to tumor growth. The present study investigated the effect of aerobic exercise on the regulation of caspase-3 and -9 in breast cancer.

**Methods:** After familiarization, 20 BALB/c mice received transplants of estrogen receptor-positive MC4-L2 tumor cell line to develop cancer. The animals were then randomized into two groups: control (n = 10) and exercise (n = 10). The exercise group performed incremental endurance training (at 18-22 m/s, equivalent to 55% to 70% of aerobic capacity in mice) for 6 weeks, 5 days per week, while the control group did not exercise. Tumor volume was measured in on a weekly basis with a digital caliper. At the end of the study, mice were sacrificed, and tumor tissues were removed and frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Tissue levels of caspase-3 and caspase-9 were measured using ELISA kits (catalogue number: SEA626Mu and E03C0551, respectively).

**Results:** The expression of caspase-3 ( $p = 0.001$ ) and caspase-9 ( $p = 0.013$ ), and the ratio of heart weight to body weight ( $p = 0.001$ ) were significantly greater in the exercise group than in controls. On the other hand, the exercise group had a significantly lower rate of tumor growth ( $p = 0.001$ ) and tumor weight ( $p = 0.001$ ) compared with the controls.

**Conclusion:** Aerobic exercise can increase the expression of caspase-3 and caspase-9 and reduce tumor growth rate and tumor weight in breast cancer. Therefore, it can be claimed that exercise training can reduce tumor volume, and thus improve the condition of the mice with cancer, by increasing the levels of apoptotic factors.

**Keywords:** Breast Cancer, Endurance Training, Caspase-3, Caspase-9

This study was approved by the Animal Ethics Committee of Sport Sciences Research Institute in 2016. The registration number was IR.SSRI.REC.1395.129.

## تأثیر یک دوره تمرین استقامتی بر میزان پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان

عبدالرضا کاظمی<sup>\*</sup>: گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج)، رفسنجان، ایران  
الهه میرزازاده: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

### چکیده

**مقدمه:** امروزه دومین عامل مرگ و میر در بین زنان، سرطان و شایع‌ترین آن سرطان پستان است. سطوح عوامل آپوپتوزیک از قبیل کاسپازها در تومور کاهش پیدا می‌کند که منجر به رشد تومور می‌شود. در این پژوهش، اثر تمرین استقامتی بر روند تنظیمی کاسپاز ۳ و ۹ در سرطان پستان، بررسی شده است.

**روش بررسی:** مطالعه حاضر از نوع تجربی است. پس از آشناسازی حیوان با محیط، تومور سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن ناشی از سلول سرطانی MC4-L2 به ۲۰ سر موش بальب سی پیوند زده شد و به صورت تصادفی در دو گروه کنترل (۱۰ سر) و تمرین (۱۰ سر) قرار گرفتند. گروه تمرین به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هفته تمرینات استقامتی فزاینده (سرعت ۱۸-۲۲ متر بر ثانیه معادل ۵۵ تا ۷۰٪ توان هوازی موش‌ها) را اجرا کردند و گروه کنترل در هیچ‌گونه فعالیتی شرکت داده نشدند. حجم تومور موش‌ها به صورت هفتگی با کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد. در پایان موش‌ها قربانی شدند، بافت تومور برداشته شد و در ازت مایع فریز و در دمای نگهداری شد. سنجش کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ به ترتیب با استفاده از کیت‌های الایزی با کدنامبر SEA626Mu و E03C0551 صورت گرفت.

**یافته‌ها:** در گروهی که پس از القای سرطانی، تمرین هوازی داشتند، در مقایسه با گروه کنترل، بیان کاسپاز ۳ ( $p=0/001$ ) و کاسپاز ۹ ( $p=0/013$ ) افزایش داشت. همچنین، نسبت قلب به وزن موش ( $p=0/001$ ) نیز افزایش معنادار داشت. از طرف دیگر، نسبت رشد تومور ( $p=0/001$ ) و وزن تومور ( $p=0/001$ ) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل کمتر بود. **نتیجه‌گیری:** تمرین هوازی با افزایش کاسپاز ۳ و ۹ و همچنین کاهش نسبت رشد تومور و وزن تومور سرطان پستان همراه بود. بنابراین می‌توان ادعا کرد که ورزش از طریق افزایش سطوح عوامل آپوپتوزیک می‌تواند در کاهش حجم تومور و در نتیجه بهبود وضعیت موش‌های مبتلا به سرطان سهیم باشد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، تمرین استقامتی، کاسپاز ۳، کاسپاز ۹

<sup>\*</sup> نشانی نویسنده مسئول: رفسنجان، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج)، عبدالرضا کاظمی.

نشانی الکترونیک: a.kazemi@vru.ac.ir

## مقدمه

سرطان یکی از مشکلات اصلی سلامت در سراسر جهان و یکی از مهم‌ترین علت مرگ و میر و بیماری در کودکان و بزرگسالان به شمار می‌رود. سرطان در انواع مختلفی بروز می‌کند و بالغ بر ۲۰۰ بیماری را شامل می‌شود (۱). سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان است و امروزه مهم‌ترین عامل تهدید کننده سلامتی در زنان است و در کشورهای غربی حدود یک سوم از کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد. بر اساس آمارهای ایران، در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد اما سن بروز سرطان پستان در زنان ایران دست کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است (۲). عوامل گوناگون می‌تواند از طریق تحریک، جلوگیری از فعال‌سازی و تکثیر یا تمایز سلول‌های هدف اعمال شود. انواع مختلف پروتئین‌ها نقش‌های گوناگونی را در شروع یا تکثیر سرطان ایفا می‌کنند و می‌توانند از یک طرف زمینه را برای بروز و حتی تکثیر و متاستاز سرطان فراهم بکنند و از طرف دیگر از طریق آثار ضد التهابی و ضد توموری، از پیشرفت و توسعه سرطان جلوگیری کنند (۳).

مرگ سلولی از دو طریق ایجاد می‌شود: نکروز و آپوپتوز (۴). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یک فرآیند ضروری است که طی تکامل، هموستاز و بیماری رخ می‌دهد. بر خلاف نکروز یا سایر اشکال مرگ سلولی که از هم گسیختگی سلولی اتفاق می‌افتد، آپوپتوز شکل ایمنولوژیکی خاموش مرگ سلولی است که به موجب آن سلول‌ها به سرعت فاگوسیته می‌شوند و بدون آغاز فرآیند التهابی پاک می‌شوند<sup>۱</sup>. در واقع آپوپتوز شکل تنظیم شده ژنتیکی مرگ سلولی است که نقش مهمی را در حذف کردن سلول‌های آلوده، آسیب‌دیده یا سایر سلول‌های ناخواسته از بدن ایفا می‌کند. با درک این که نقص در آپوپتوز می‌تواند در بروز بیماری‌هایی از قبیل سرطان ایفای نقش کند، علاقه به کنترل آپوپتوز به صورت تصاعدی در بین محققان بررسی کننده سرطان رو به افزایش است (۶). کاسپازها اجراکنندگان<sup>۲</sup> اصلی آپوپتوز هستند. تا به امروز دو مسیر پیام‌رسانی عمده آپوپتوز

مشخص شده‌اند. نخست، مسیر وابسته به میتوکندری، که به نشانه‌های خارج سلولی و عوامل داخلی از قبیل آسیب DNA پاسخ می‌دهد. دومین مسیر آپوپتیک به وسیله اعضای خانواده بزرگ گیرنده‌های مرگ به واسطه فعال‌سازی کاسپاز-۸ تحریک می‌شود (۷). اکثر داروهای ضد سرطان، آپوپتوز را از مسیر میتوکندریایی تحریک می‌کنند (۴). کاسپازها، پروتئازهای هستند که به عنوان آغاز کننده‌ها و اجراکننده‌های ضروری فرآیند آپوپتیک ایفای نقش می‌کنند. به صورت کلاسیک، آبشار کاسپازی به وسیله شکستن<sup>۳</sup> کاسپازهای به اصطلاح آغازگر (کاسپاز-۲، کاسپاز-۸، کاسپاز-۹ و کاسپاز-۱۰) به احتمال زیاد به واسطه اتوپروتولیز آغاز می‌شود. کاسپازهای آغازگر به نوبه خود، کاسپازهای اجراکننده (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) را شکسته و فعال می‌کنند که به فرآیند آپوپتوز منجر می‌گردد (۸). کاسپاز-۳ یکی از مهم‌ترین پروتئازهای اجراکننده در مسیر شناخته شده آپوپتوز می‌باشد. کاسپاز-۳ تا زمانی که کاسپازهای آغازگر به وسیله پروتولیز مستقیم فعالش می‌کنند، به صورت خاموش باقی می‌ماند. کاسپاز-۳ فعال شده، مهارکننده DNase فعال کننده کاسپاز را می‌شکند و به مرگ سلولی منجر می‌شود. فعال شدن کاسپاز-۳ در شرایط هیپوکسیک در چندین گونه سلول از قبیل میوسیت‌های بطنی، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های سنگ‌فرشی کارسینومای ریه نشان داده شده است (۹). کمبود و تنظیم کاهشی کاسپاز-۳ با کارسینوژن پستان همراه است که نشان می‌دهد کاسپاز-۳ می‌تواند یک بیومارکر در پیشگیری و درمان سرطان باشد. در این راستا نشان داده شده است که کاسپاز-۳ عملکردی برای رادیوتراپی و شیمی‌درمانی مؤثر ضروری است (۱۰). از طرف دیگر کاسپاز-۹ نقش مهمی در آغاز کردن آبشار آپوپتوز میتوکندریایی (داخلی) دارد (۸). اهمیت کاسپاز-۹ از این نظر است که پیام‌رسانی بالادست کاسپاز-۳ می‌باشد و به وسیله Apaf-1/سیتوکروم c تحریک و توسط فرآورده انکوژن Akt مهار می‌شود (۱۱). در راستای اهمیت نقش کاسپازهای ۳ و ۹ گزارش شده است که در پاسخ به درمان توسط بربرین، کاسپازهای تقسیم شده ۸، ۹ و ۳ در رده سلولی SCC-4 افزایش پیدا می‌کند. به علاوه افزایش در کاسپاز-۹ تقسیم شده سبب فعال‌سازی بعدی در کاسپاز-۳ می‌شود (۱۲). علی‌رغم نقش مهمی که

<sup>1</sup> Cleared<sup>2</sup> Executioners<sup>3</sup> Cleavage

پیدایش تومور سرطانی، موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تومور- ورزش (TE) و تومور-استراحت (TR) تقسیم شدند. ساعت اجرای تمرینات برای گروه تمرین ثابت بود و پروتکل ورزشی به غیر از روزهای دوشنبه و جمعه در سایر روزهای هفته از ساعت ۸ صبح تا ۱۰ صبح انجام شد. گروه تومور- ورزش (TE)<sup>۵</sup> پس از ابتلای به سرطان مطابق جدول ۱ به فعالیت پرداختند. گروه تومور- استراحت<sup>۶</sup> (TR) هیچ‌گونه فعالیت ورزشی نداشتند و تا پایان پروتکل به زندگی طبیعی خود ادامه دادند. در هر کدام از گروه‌ها ۲ سر موش تا پایان پروتکل تمرین تلف شد که در آنالیز نیز حذف شدند.

کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در انجام پژوهش حاضر رعایت شد و پژوهش حاضر دارای کد اخلاق: IR.SSRI.REC.1395.129 می‌باشد.

**پروتکل تمرین:** گروه تجربی به مدت ۶ هفته در تمرین استقامتی فزاینده شرکت داده شدند. تمرینات در هفته اول تمرین با سرعت ۱۸ متر در دقیقه شروع و در نهایت در دو هفته آخر به ۲۲ متر در دقیقه رسید (۵۵-۷۰٪ توان هوازی موش‌ها). برای تعیین توان هوازی موش‌ها در ابتدا آزمون ارزیابی توان هوازی انجام شد. پروتکل تعیین توان هوازی بدین صورت بود: بعد از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۰/۳ متر بر ثانیه (۱/۸ متر در دقیقه)، سرعت نوارگردان هر ۳ دقیقه یک بار افزایش یافت، حداکثر سرعت پیشینه زمانی است که موش‌ها نتوانند با یک سرعت ثابت بدونند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند. سپس تمرینات با ۵۵٪ توان هوازی شروع و تا ۷۰٪ ادامه پیدا کرد. ۵۵٪ توان هوازی موش‌ها برابر با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه و ۷۰٪ آن برابر با ۲۲ متر در دقیقه بود (جدول ۱).

**نحوه ایجاد تومور:** توموری که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت از نوع آدنوکارسینومای موشی بود که به وسیله تزریق سلول‌های سرطانی به صورت زیر جلدی در موش‌ها ایجاد شد. در ابتدا سلول‌های مورد نظر در محیط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به میزان معینی از سلول کشت داده شدند و بعد از آن که تعداد سلول به اندازه مورد نیاز رسید، پس از شمارش تعداد سلول به هر موش به میزان یک میلیون سلول تزریق شد.

کاسپازهای ۹ و ۳ در آپوپتوز سلولی دارند، تا کنون پژوهشی یافت نشد که تغییرات این کاسپازها را در پاسخ به تمرینات ورزشی بررسی کرده باشد. اما احتمالاً ورزش نقش کمک درمانی از طریق افزایش عوامل آپوپتوزیک و در نتیجه کاهش حجم تومور ایفا می‌کند (۲۲). با وجود این، برخی اثر مکمل‌ها و داروهای مختلف را بر تغییرات این کاسپازها بررسی کرده‌اند. برای مثال در پژوهشی اثر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه را بر بیان ژن کاسپاز-۳ در رده سلولی MCF7 سرطان پستان بررسی کردند که نتایج، افزایش بیان کاسپاز-۳ و در نتیجه افزایش آپوپتوز را نشان داد (۱۳). پس با توجه به این که بیان کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ با فعال‌سازی آبشار آپوپتوزی همراه است (۱۴) و از طرفی علی‌رغم نقش اثبات شده تمرینات ورزشی در کاهش رشد تومور (۱۵) هنوز سازوکار این اثرگذاری مشخص نشده است، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ۶ هفته تمرینات استقامتی بر سطوح کاسپازهای ۳ و ۹ در بافت تومور و عضله موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود.

## مواد و روش‌ها

روش تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی بود. تعداد ۲۰ سر موش بальب سی ماده (۵ تا ۶ هفته‌ای، میانگین توده بدنی ۱۶-۱۵ گرم) از موسسه پاستور خریداری شد و به حیوان‌خانه منتقل شد. در هر قفس ۳ الی ۴ موش قرار داده شد و در آزمایشگاه حیوانات در اتاقی به ابعاد ۱/۶۰ در ۲/۲۰ متر نگهداری شدند. برای تطابق فیزیولوژیک موش‌ها، دوره ۱۲ ساعته تاریکی روشنایی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) رعایت شد. دمای اتاق نیز بین ۲۲-۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۵٪ حفظ شد. غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود که به شکل آزاد و در اختیار<sup>۴</sup> تا پایان پروتکل در دسترس موش‌ها قرار گرفت. قفس‌هایی که برای نگهداری موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ و در ۴۳ سانتی‌متر بودند. همه موش‌ها به مدت ۱ هفته با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و نحوه دویدن روی نوارگردان آشنا شدند، سپس با تزریق سلول‌های MC4-L2، سرطانی شدند و پس از ۱۰ روز با

<sup>5</sup>Tumor-Exercise

<sup>6</sup> Tumor-Rest

<sup>4</sup>ad Libitum

جدول ۱: پروتکل تمرین هوازی برای گروه تمرین

دوره تمرین	سرعت تمرین (متر بردقیقه)	زمان کل تمرین (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحله آشنا سازی	۱۰-۱۲	۳۰	۵
دو هفته‌ی اول	۱۸	۶۰	۵
دو هفته‌ی دوم	۲۰	۷۰	۵
دو هفته‌ی سوم	۲۲	۷۵	۵

پروتکل به گونه‌ای بود که وزن گروه تمرین تقریباً ثابت باقی ماند و وزن گروه کنترل افزایش یافت.

### وزن تومور و وزن قلب و نسبت وزن قلب به وزن

بدن: در جدول ۲ مقادیر وزن تومور و وزن قلب موش‌ها در هفته آخر پس از کشتار ارایه شده است. وزن قلب در گروه تمرین  $0.115 \pm 0.018$  گرم و در گروه کنترل  $0.115 \pm 0.018$  گرم و وزن بدن در گروه تمرین  $0.52 \pm 0.11$  گرم و در گروه کنترل  $0.52 \pm 0.11$  گرم بود. در نتیجه نسبت وزن قلب به وزن بدن در گروه تمرین  $0.0091 \pm 0.0007$  و در گروه کنترل  $0.0056 \pm 0.0005$  بود (جدول ۲).

در جدول ۳ مقادیر غلظت کاسپاز-۳ و -۹ بافت تومور موش‌ها در پایان پروتکل تمرین در دو گروه پژوهش ارایه شده است، تغییرات هر دو طبق جدول ۴ معنی‌دار بود. نسبت رشد تومور: در شکل ۲ روند رشد تومور در دو گروه پژوهش ارایه شده است. نتایج آزمون T نشان داد روند رشد تومور (نسبت هفته ششم به هفته اول) در گروه کنترل شیب بالاتری نسبت به گروه تمرین دارد ( $p=0.001$ ). از آزمون t مستقل برای بررسی تغییرات کاسپاز ۹ و ۳ در پس آزمون استفاده شد. نتایج این آزمون در جدول ۴ ارایه شده است. با توجه به ارزش P به دست آمده، ۶ هفته تمرین هوازی بر سطوح کاسپاز ۳ و ۹ بافت تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان تأثیر دارد و موجب افزایش معنی‌دار آن دو می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که به دنبال ۶ هفته تمرینات استقامتی، مقادیر کاسپاز-۳ و ۹ در بافت تومور و عضله گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری افزایش پیدا می‌کند که این افزایش در کاسپاز-۳ و ۹ با کاهش معنادار حجم تومور در گروه تمرین کرده، همراه بود.

قبل از تزریق سلول‌های سرطانی، موش‌ها به وسیله تزریق ترکیب زایلازین و کتامین به صورت زیر جلدی بی‌هوش شدند و سپس سلول‌های سرطانی به صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق گردید.

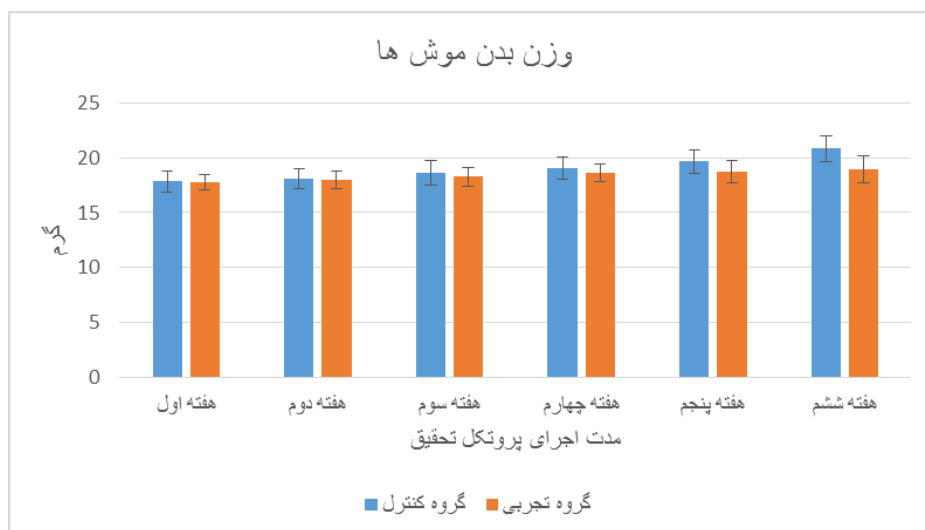
**اندازه‌گیری حجم تومور:** حجم تومور در ۲ بعد اندازه‌گیری شد. بزرگترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور در نظر گرفته شد و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. به دنبال پیوند و پیدایش تومور، هر دو روز یک بار طول و عرض تومور توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری گردید و با استفاده از فرمول محاسباتی حجم تومور  $V=1/2(L^2 \times W)$  میزان حجم تومور در هر چهار گروه اندازه‌گیری شد.

**نسبت وزن قلب به وزن موش‌ها:** از نسبت وزن قلب به وزن موش به منظور بررسی اثربخشی فیزیولوژیک تمرین هوازی به کار گرفته شد (۲۸). وزن موش‌ها هر هفته و وزن قلب موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال بلافاصله پس از کشتن موش‌ها، سنجیده شد.

**روش آماری:** تمام یافته‌ها با میانگین و انحراف استاندارد گزارش شد. ابتدا با استفاده از آمار توصیفی به تشریح و توصیف داده‌ها پرداخته و سپس از آزمون T به بررسی تغییرات کاسپاز ۳ و ۹ و همچنین نسبت رشد تومور در دو گروه کنترل و تمرین استفاده شد. برای تعیین نحوه توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. همچنین برای بررسی آزمون فرضیه‌ها و تصمیم‌گیری درمورد پذیرش و یا رد فرضیه‌ها، سطح معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در نظر گرفته شد. کلیه روش‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت.

### یافته‌ها

**وزن موش‌ها:** در شکل ۱ وزن موش‌های دو گروه به تفکیک در هر هفته ارایه شده است. در شروع مطالعه وزن موش‌ها در دو گروه تقریباً برابر بود. تغییرات وزن تا پایان



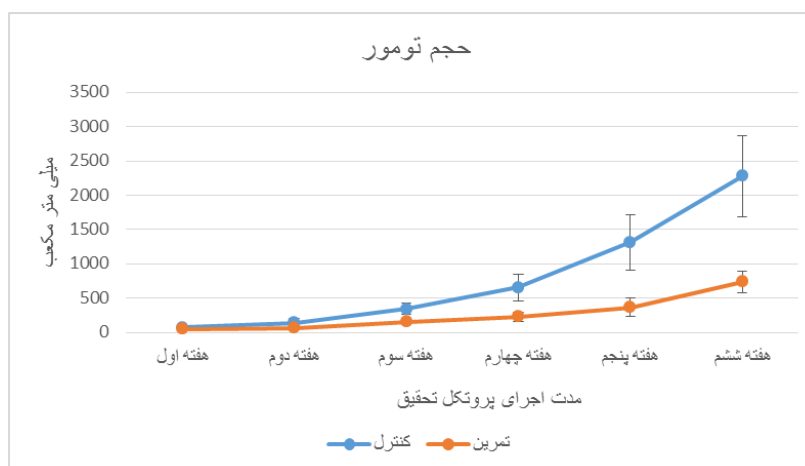
شکل ۱: مقایسه وزن موش های دو گروه طی اجرای پژوهش

جدول ۲: وزن قلب، وزن تومور و نسبت وزن قلب به وزن بدن موش ها به تفکیک دو گروه

وزن قلب (گرم)	وزن تومور (گرم)	نسبت وزن قلب به وزن بدن	
$0.0901 \pm 0.0115$	$2.74 \pm 0.52$	$0.0435 \pm 0.0056$	گروه کنترل
$0.115 \pm 0.018$	$1.11 \pm 0.52$	$0.0607 \pm 0.0091$	گروه تمرین
( $p=0.001$ )	( $p=0.001$ )	( $p=0.001$ )	آزمون t

جدول ۳: مقادیر غلظت کاسپاز-۳ و -۹ در گروه های مختلف پژوهش (نانوگرم بر میلی لیتر)

تعداد	کاسپاز-۳ بافت تومور	کاسپاز-۹ بافت تومور	گروه ها
	(میانگین و انحراف استاندارد)	(میانگین و انحراف استاندارد)	
۸	$7.8 + 1.41$	$8.17 \pm 3.3$	کنترل
۸	$14.44 \pm 1.08$	$11.75 \pm 1.32$	تمرین



شکل ۲: روند رشد تومور در دو گروه، نسبت رشد تومور (هفته ششم به هفته اول) ( $p=0.001$ )

جدول ۴: نتایج آزمون t مستقل برای مقایسه سطوح کاسپاز-۳ و ۹ در دو گروه

آزمون لون	آماره t	ارزش P آزمون t	
			ارزش P آزمون لون
کاسپاز-۳	۰/۷۶۱	۱۰/۵	*۰/۰۰۱
کاسپاز-۹	۰/۲۶۹	۲/۸۴	*۰/۰۱۳

\* تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها ( $P \leq 0.05$ )

در پژوهشی دیگر بر روی نمونه‌های تومور پستان انسان، مشاهده شد که حدود ۷۵٪ از نمونه‌های تومور پستان فاقد رونویسی کاسپاز-۳ و بیان پروتئین کاسپاز-۳ بودند. در عین حال نمونه‌های باقی مانده نیز کاهش قابل ملاحظه بیان کاسپاز-۳ را نشان دادند. جالب این که کاهش مشابه در بیان کاسپاز-۳ در بافت‌های مجاور بافت تومور افراد مبتلا به سرطان پستان که به لحاظ ریخت‌شناسی طبیعی بودند، مشاهده گردید. این نتایج نشان داد که کاهش بیان کاسپاز-۳ می‌تواند نشان دهنده یک سازوکار مهم از بقا و مقاومت در برابر شیمی‌درمانی در سلول‌های سرطانی پستان باشد (۶). در رابطه با سرطان معده نیز گزارش شده است که سطوح بیان کاسپاز-۳ در بافت معده بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با مخاط معد طبیعی، پایین‌تر است (۲۰).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، ۶ هفته تمرین هوازی بر سطوح کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ تأثیر دارد و موجب افزایش معنی‌دار آن می‌شود و میزان غلظت کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد. پژوهشی که اثر تمرین ورزشی بر سطوح کاسپازهای در بافت تومور و سرم موش‌های مبتلا به سرطان را بررسی کند یافت نشد. با این وجود برخی مطالعات که اثر تمرین استقامتی بر دیگر شاخص‌های آپوپتوز را، بررسی کرده‌اند (۲۱-۲۳) پژوهش‌ها نشان می‌دهند IFN- $\gamma$  بسته به سرطانی (IRF-2) دارد. IFN- $\gamma$  مسئول افزایش MHC II در لکوسیت‌ها می‌باشد و از این طریق نقش حمایتی در سرطان دارد. IFN- $\gamma$  با تنظیم افزایشی برخی از کاسپازها در مرگ سلولی و آپتوز درون تومور نقش مؤثری دارد و البته فعالیت ضد آنژیوژنزی دارد، از طرف دیگر IFN- $\gamma$  متصل به IRF-2 اثرات آنکوژنیک دارد (۲۱). این تحقیق همسو با تحقیق حاضر می‌باشد. فاکتور IFN- $\gamma$  در مرگ سلولی و آپوپتوز درون تومور نقش مؤثر داشته که در تحقیق حاضر فاکتورهای کاسپاز ۳ و ۹ نیز فاکتورهای مؤثر در فرایند آپوپتوز می‌باشد.

گزارش شده است که کاسپاز-۳ برای آپوپتوز ناشی از کافئین در رده سلولی کارسینومای پستان MCF7 ضروری است و فرض بر این است که یکی از دلایل فنوتیپ مقاوم در برابر رادیوتراپی این سلول‌ها، تخلیه عملکردی ژن کاسپاز-۳ (CASP-3) می‌باشد (۱۶). از نظر این که شکل فعال کاسپاز-۹، پروکاسپاز-۳ را می‌شکند و شکل فعال کاسپاز-۳ را ایجاد می‌کند، می‌تواند در آپوپتوز حایز اهمیت باشد. در راستای اهمیت این دو کاسپاز در آپوپتوز سلول‌های سرطانی مشاهده شده است که درمان توسط Sanguinarine، فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ را حدود ۶ تا ۷ برابر افزایش می‌دهد. در واقع این کاسپازها در سلول‌های HT-29 کولون انسان بعد از درمان با Sanguinarine فعال می‌شوند که نشان می‌دهد Sanguinarine، آپوپتوز را به وسیله مسیر وابسته به کاسپاز در این رده سلولی تحریک می‌کند (۱۷). همچنین چندین مطالعه نشان داده‌اند که فعال‌سازی کاسپاز-۳ برای القای آپوپتوز در پاسخ به داروهای شیمی‌درمانی از قبیل تاکسان و دوکسوروبیسین ضروری است. از آن جا که کاسپاز-۳ تنظیم کننده کلیدی آپوپتوز است و با میزان آپوپتوز در سرطان پستان مرتبط است، می‌تواند به عنوان یک مارکر مهم برای پیش‌بینی کردن پاسخ یا مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی در نظر گرفته شود (۱۸). از طرف دیگر، افشار جعفری و همکاران (۱۵-۲۰) نشان دادند تمرین ورزشی سبب کاهش پروتئین پیش آپوپتوزی در عضله قلبی در موش‌های سالم می‌شود. تغییر در نسبت Bax/Bcl-2 برای القای آپوپتوز ضروری است و این نسبت معین می‌کند که سلول در معرض آپوپتوز قرار گیرد یا نه. تغییر در نسبت Bax/Bcl-2 باعث رهایش سیتوکروم c از میتوکندری به درون سیتوزول می‌شود. سپس سیتوکروم c سیتوزولی به Apaf-1 متصل می‌شود و منجر به فعال‌سازی کاسپاز-۳ و PARP می‌شود که حاکی از نقش مهم کاسپازها در آپوپتوز است (۱۹).

آپوپتوز بوده و موجب فعال شدن کاسپاز-۳ یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست می‌شود که فاکتورهای مؤثر در فرایند آپوپتوز هستند. تمرین ورزشی بر بیان این فاکتورها اثر افزایشی داشته است. این پروتکل‌ها روی موش‌های مبتلا به سرطان انجام شد (۲۴).

۶ هفته تمرین هوازی بر نسبت رشد تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان تأثیر دارد و به کاهش در روند رشد حجم تومور در گروه تمرین منجر شد. روند رشد تومور در گروه کنترل شیب بالاتری نسبت به گروه تمرین دارد.

زیلینسکی و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند تمرین استقامتی در موش‌های بالغ سی موجب کاهش رشد تومور و چگالی عروقی از طریق کاهش تجمع نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در بافت تومور می‌شود (۲۵). همچنین مورفی و همکاران (۲۰۱۱)، کاهش ۷۰ درصدی تعداد تومور و میزان کمتر MCP-1 و IL-8 را در پی تمرین در موش‌ها نشان دادند. تعداد تومور قابل لمس در گروه ورزشی در حدود ۷۰٪ کاهش یافت و همچنین حجم تومور، میزان MCP-1 و IL-8 پلاسما و وزن طحال کمتر گردید. این داده‌ها پشتیبانی قوی برای اثر سودمند ورزش در کاهش تومور و اثر ضد التهابی در موش مبتلا به سرطان پستان را نشان می‌دهند (۲۶). علاوه بر این، جونز و همکاران (۲۰۱۰) مهار قابل توجه روند متاستاز تومور و بهبود اثر درمان‌های سرطان مؤثر بود را پس از تمرین هوازی نشان دادند (۲۷). امانی و همکاران (۲۰۱۴) نیز ادعا کردند با توجه به افت مقادیر VEGF و IL-6 در گروه سرطان که قبل از سرطانی شدن و پس از سرطانی شدن تمرینات ورزشی را انجام دادند؛ می‌توان گفت که تمرینات ورزشی علاوه بر نقش پیشگیرانه بسیار موثر، دارای نقش کمک درمانی در تومورهای وابسته به گیرنده استروژن نیز می‌باشند (۲۸). سلماسی و فرد و همکاران (۱۳۹۴) نیز تعدیل سطوح سایتوکاینی بافت تومور در نتیجه تمرینات استقامتی را مطرح کردند. به طوری که افزایش سایتوکاین‌های ضد رگ‌زایی مانند IL-2 از عوامل مؤثر در کاهش حجم تومور گروه ورزشی است. لذا با توجه به این اثرات مثبت، می‌توان از تمرینات ورزشی به عنوان روش کمک درمانی در کنار دیگر روش‌ها استفاده کرد (۲۹). به نظر می‌رسد در این پژوهش، کاهش حجم تومور مشاهده شده در موش‌های بالغ سی، به دنبال تمرینات

خوری و همکاران (۲۰۱۵) نقش مثبت پروتکل ورزشی بر وزن تومور پستان در موش را از طریق مهار مسیر اساسی آپوپتوزی miR-21 نشان دادند. ۶ هفته تمرین تناوبی موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۲). دو ژن کاسپاز ۹ و ۳، نقش بارزی در بازداری از آپوپتوز سلول‌های سرطانی دارند. نتایج تحقیق خوری و همکاران (۲۰۱۵) همسو با تحقیق حاضر است، زیرا رابطه نزدیکی بین bcl2 و کاسپازهای وجود دارد و کاسپازهای فاکتورهای نهایی در آپوپتوز می‌باشند.

مهار تقسیم Bcl-2 ممکن است به بیشتر فعال شدن کاسپازها پایین دست و در افزایش آبشار کاسپاز همکاری کند. افزایش جهش مقاوم در برابر تقسیم Bcl-2 برای حفاظت از بازگیری اینترلوکین-۳ و آپوپتوز مکرر ناشی از ویروس می‌باشد. بنابراین تقسیم Bcl-2 توسط کاسپازها از مرگ سلولی اجتناب ناپذیر ممکن است، مراقبت کند (۲۳). Bcl-2 یک تنظیم کننده برنامه فعال سازی کاسپاز مستقل از سیتوکروم c, Apaf-1, کاسپاز-۹، آپوپتوزوم می‌باشد که به نظر می‌رسد برای تقویت سریع تر نسبت به آغاز آبشار کاسپاز است (۸). وقتی عوامل بالا دستی کاسپازها تعدیل گردند، مسلماً بیان و تولید کاسپازها که فاکتورهای نهایی آپوپتوز هستند نیز دستخوش تغییر قرار می‌گیرند. لذا تغییر سطوح کاسپازها با فعالیت استقامتی، پذیرفتنی می‌باشد.

توجه به اثر افزایشی تمرین ورزشی هوازی بر بیان Mir-206 و اثر کاهشی بر بیان ERα و کاهش سطوح استرادیول پلاسما در موش‌های مبتلا به سرطان پستان، تمرین هوازی، این حلقه تنظیمی را به سمت کاهش تکثیر سلولی پیش می‌برد و می‌تواند به عنوان سازوکار نوین در بیان اثرات مثبت و کمک درمانی فعالیت ورزشی بر سرطان پستان در نظر گرفته شود (۲۴). این تحقیقات همسو با تحقیق حاضر بود، مطالعه روی فاکتور mir-206 انجام گرفته که تمرین ورزشی بر بیان این فاکتور اثر افزایشی داشته، Mir-206 به طور غیرمستقیم FOXO3 و اهداف رونویسی مستقیم آن یعنی BIM را تحریک می‌کند. FOXO3 و اهداف آن از عوامل رونویسی مؤثر در فرایند آپوپتوز هستند و بنابراین پتانسیل Mir-206 در آپوپتوز سلول تومور نقش دارد. که در تحقیق حاضر نیز که مطالعه بر روی فاکتورهای کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد کاسپاز-۹ یک کاسپاز آغازگر در مسیر میتوکندریایی



هوازی تا حدودی به علت افت عوامل التهابی مانند IL-6 و افزایش let-7a است. در همین راستا یافته‌های عیسی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۶) از تأثیر تمرین ورزشی بر کاهش رشد تومور در سرطان‌های مدل موشی حمایت کرده و می‌توان تا حدودی این نتایج را به خواص ضدالتهابی تمرین ورزشی نسبت داد (۲۰). علاوه بر این، کاظمی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند IL-17 که نقشی مؤثری در متابولیزم و رگ‌زایی داد در نتیجه ورزش به موازات کاهش حجم تومور است، کاهش می‌یابد. همچنین افزایش در سطح IFN- $\gamma$  حاکی از تعدیل سایتوکاینی به وسیله تمرین در ریزمحیط تومور در راستای القای ایمنی سلولی ضد تومور است که نقش حمایتی تمرین در تحریک ایمنی ضد تومور را، نشان می‌دهند (۳۰). با توجه به اثر افزایشی تمرین ورزشی هوازی بر بیان Mir-206 و اثر کاهشی بر بیان ER $\alpha$  و کاهش سطوح استرادیول پلازما در موش‌های مبتلا به سرطان پستان، تمرین هوازی، این حلقه تنظیمی را به سمت کاهش تکثیر سلولی پیش می‌برد و می‌تواند به عنوان سازوکار نوین در بیان اثرات مثبت و کمک درمانی فعالیت ورزشی بر سرطان پستان در نظر گرفته شود (۲۴). بنابراین در یک جمع‌بندی و با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت تمرینات استقامتی نقش مؤثری در بازداری از رشد تومور در سرطان‌های وابسته به استروژن دارد.

در مجموع بیشتر پژوهش‌هایی که از مدت زمان بیش از ۶ هفته تمرین استفاده کرده‌اند، کاهش حجم تومور را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد فعالیت منظم ورزشی از طریق سازوکارهای گوناگون می‌تواند سبب کند شدن رشد تومور شود. در حال حاضر سازوکار دقیق آن به درستی مشخص نیست اما با توجه به تحقیقات ذکر شده به نظر می‌رسد، ترشح مایوکاین‌ها، افت عوامل التهابی درون تومور، افت عوامل رگ‌زایی درون تومور و افزایش بیان عوامل درگیر در آپوپتوز از سازوکارها احتمالی باشد. در پژوهش حاضر نیز افزایش سطوح کاسپازهای ۳ و ۹ احتمالاً سبب کاهش رشد حجم تومور شده است. احتمالاً یکی دیگر از اثرات مثبت تمرینات استقامتی علاوه بر اثرات مولکولی ذکر شده برکاسپاز ۳ و ۹، جلوگیری از آتروفی عضلانی مرتبط با سرطان است. تحقیقات دیگر نیز این تغییرات کاهش وزن و حجم تومور را در پی تمرینات ورزشی نشان دادند (۳۱).

یکی از نتایج جالب دیگر در پژوهش حاضر معنی‌داری تفاوت بین نسبت وزن قلب به وزن بدن موش‌های گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل بود. این شاخص نشان دهنده کارایی تمرین است. در واقع تمرین استقامتی با شدت متوسط توانسته اثرات خود را بر ساختارهای تمرین‌پذیر مانند قلب نشان دهد و می‌توان ادعا کرد تمرین استقامتی با شدت متوسط در موش‌های حامل تومور مؤثر بوده است و تغییرات ایجاد شده در سطوح کاسپازهای ۳ و ۹، در بافت تومور و همچنین تغییر در وزن بدن قابل استناد به تمرین استقامتی می‌باشند. یکی از سازگاری‌های مهم تمرین استقامتی، هایپرتروفی برون‌گرای قلب می‌باشد. کاشکسی موجب کاهش توده عضلانی و توده چربی و همین‌طور کاهش توده قلب می‌گردد. از آن جا که وزن قلب در اوایل دوره اندازه‌گیری نشده است و تنها در پایان اجرای پروتکل بعد از کشتار اندازه‌گیری شده است، می‌توان بیان داشت که یا تمرین موجب هایپرتروفی برون‌گرای قلب شده و یا حداقل از آتروفی آن جلوگیری کرده است، چیزی که در گروه کنترل مخالف آن رخ داده است. در کل، نسبت وزن قلب به وزن بدن موش شاخص مناسب کارایی تمرین و نشان دهنده جلوگیری از اثرات کاشکسی سرطان با تمرینات استقامتی می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تمرینات استقامتی از طریق تعدیل وضعیتی آپوپتوزی (تعدیل بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹) در کاهش رشد تومور درگیر باشد. لذا انجام تمرینات استقامتی با شدت متوسط (با توجه به تغییرات معنی‌دار نسبت وزن قلب به وزن موش‌ها، کارآمد بودن تمرینات استقامتی، استنباط شد) برای کمک به درمان سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن، پیشنهاد می‌شود.

### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. در پایان نویسندگان مراتب سپاس از تمام آزمودنی‌هایی که ما را در انجام این پژوهش همراهی نمودند را اعلام می‌کنند. شناسه کمیته اخلاق: IR.SSRI.REC.1395.129 می‌باشد.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

## References

1. Jehn CF, Flath B, Strux A, Krebs M, Possinger K, Pezzutto A, Lüftner D. Influence of age, performance status, cancer activity, and IL-6 on anxiety and depression in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136(3):789-94.
2. Norii Daloi MR, Tabarestani S. Molecular Genetics. Diagnosis and treatment of breast cancer, review. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2010; 17(2):74-87.
3. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Hum Immunol* 2006; 67(1-2):13-21.
4. Chien SY1, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF, Tsou MF, et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28(8): 493-503.
5. Creagh EM. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends Immunol* 2014; 35(12): 631-40.
6. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002; 21(57): 8843-51.
7. Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Eaves AM, et al. Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3- and caspase-9-dependent pathways in K562 leukemia cells: An in vitro study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2010; 71(16): 384-97.
8. Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Pathol* 2012; 43(2): 229-37.
9. Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62(7): 2013-8.
10. Yang S, Zhou Q, Yang XC. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(6): 903-11.
11. Li Y, Liu J, Liu X, Xing K, Wang Y, Li F, Yao L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Appl Biochem Biotechnol* 2006; 135(3): 181-92.
12. Ho YT, Lu CC, Yang JS, Chiang JH, Li TC, Ip SW, Hsia TC, et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29(10): 4063-70.
13. Moshtaghi Fateme, Esmaeilzadeh Bahabadi Sedighe, Mazaheri Mahta, Najafi Shahla, Dahmardeh Ghalenoo Fateme. Increasing caspase3 gene expression in mcf7 breast cancer cell line by nigella sativa hydro alcoholic extract. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016; 24: 1-11.
14. Morales-Cano D, Calviño E, Rubio V, Herráez A, Sancho P, Tejedor MC, Díez JC. Apoptosis induced by paclitaxel via Bcl-2, Bax and caspases 3 and 9 activation in NB4 human leukaemia

- cells is not modulated by ERK inhibition. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65: 1101-8.
15. Shalamzari SA, Hamid Agha-Alinejad, Shaban Alizadeh, Shirin Shahbazi, Zahra Kashani Khatib, AbdolReza Kazemi, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 231-58.
  16. Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* 2004; 64: 7065-72.
  17. Lee JS, Jung WK, Jeong MH, Yoon TR, Kim HK. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway. *Int J Toxicol* 2012; 31: 70-7. O'Donovan N, O'Donovan N1, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 738-42.
  18. Afshar Jafari,1 Hassan Pourrazi,1, Saeid Nikookheslat, and Behzad Baradaran. Effect of Exercise Training on Bcl-2 and Bax Gene Expression in the Rat Heart. *Gene Cell Tissue*. 2015; 1;182:258-66.
  19. Sun, Chen XY, Liu J, Cheng XX, Wang XW, Kong QY, et al. Differential caspase-3 expression in noncancerous, premalignant and cancer tissues of stomach and its clinical implication. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 168-73.
  20. Kim PK, Armstrong M, Liu Y, Yan P, Bucher B, Zuckerbraun BS, et al. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004; 23: 1125-35.
  21. Khorri V, Shalamzari SA, Isanejad A, Alizadeh AM, Alizadeh S, Khodayari S, et al. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. *European journal of pharmacology* 2015; 765: 179-87.
  22. Isanejad A1, Alizadeh AM2, Amani Shalamzari S3, Khodayari H4, Khodayari S4, Khorri V5, Khojastehnjad N6. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life Sci* 2016; 15: 30-40.
  23. Mirakhori Z, Kordi M, Alizadeh SH, Gaieni AA, et al. The investigation of the Preventive and Therapeutic Therapy Assistance on the Growth Rate of the Tumor, E2 and expression of 206-miR and ERα tumor tissue of breast cancer. *Journal of Applied exercise Physiology* 2016; 11: 87-98.
  24. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96: 2249-56.
  25. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. *Cytokine* 2011; 55: 274-9.
  26. 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. *Journal of Applied Physiology* 2010; 108: 343-8.
  27. Amani-Shalamzari S, Agha-Alinejad 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: 10-21.
  28. Salmasifard Amir Hesam, Hamid Agha Ali Nejad, Alireza Rahimi. Effect of Endurance Training on Tumor Tissue IL-2 Cytokine Levels in Breast Cancer Bearing Mice. *IJBD* 1394; 8: 34-41.
  29. Kazemi AR, Agha Alinejad H, Rasul Eslami, Ehsan P, Baghaie R, Dabaghzadeh R, Ghanbarzadeh M. Investigating the Effect of Endurance Training on Tumor Level of IL-8 and Serum Level of IL-17 in Female Mice with Breast Cancer. *Journal*

- of Fasa University of Medical Sciences  
2015; 5:347-55.
30. Pettan-Brewer C, Goh J, Ladiges  
WC. An immunohistochemical approach  
for monitoring effects of exercise  
on tumor stromal cells in an old mice.  
Pathobiol Aging Age Relat Dis. 2014 Aug  
11;4.