

Decreased Liver Tissue Wasting following High-Intensity Interval Training through Apoptosis Signaling Suppression in Breast Tumor-Bearing Female Mice

Ahmadabadi F^{1*}, Saghebjo M¹, Hoshyar R^{2,3}

¹Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

²Microbiology and Molecular Genetics Department, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

³Cellular Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Receive: 10/3/2020
Accepted: 23/5/2020

*Corresponding Author:
f.ahmadabadi@birjand.ac.ir

Ethics Approval:
Ir.bums.REC.1397.38

Abstract

Introduction: Cachexia is a cancer complication that is associated with increased weight loss. Apoptosis has been known as one of the tissue-wasting pathways that cause weight loss and multiple organ failure in cancer-related cachexia. Various factors, including exercise training, can be effective in the reduction of cancer cachexia. In the present study, the effect of four weeks of high-intensity interval training (HIIT) on some biochemical indices of apoptosis in the liver tissue of breast tumor-bearing mice was investigated.

Methods: In the present experimental study, female BALB/c mice were randomly divided into two cancerous groups (control and HIIT) following the induction of breast cancer by the injection of the 4T1 cell line and sham group (phosphate buffer saline injection). Each HIIT session included 6 intervals of 3 minutes and 20 seconds (80%-95% of VO₂max) with 1-min active recovery (30%-35% of VO₂max), performed for 4 weeks, 5 days per week.

Results: The level of caspase-3 showed a reduction in the HIIT group compared with the control group ($P < 0.01$). The results also demonstrated an increase in the level of Bcl-2 and Bcl-2 to Bax ratio in the HIIT group compared with the control group ($P = 0.01$).

Conclusion: Based on the results, it seems that HIIT can reduce liver tissue wasting associated with breast cancer by decreasing caspase-3 and increasing Bcl-2 to Bax ratio.

Keywords: High-Intensity Interval Training, Cell Death, Breast Cancer

کاهش تحلیل بافت کبد به دنبال تمرین تناوبی شدید از طریق سرکوب مسیر سیگنالی آپوپتوز در موش‌های ماده حامل تومور پستان

فرشته احمدآبادی^{۱*}، مرضیه ثاقب‌جو^۱، ریحانه هوشیار^{۲،۳}

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشگاه ایالتی میشیگان، آمریکا

^۳ مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

چکیده

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۳

* نویسنده مسئول:

f.ahmadabadi@birjand.ac.ir

مقدمه: کاشکسی یکی از عوارض سرطان می‌باشد که با افزایش از دست دادن وزن بدن همراه است. آپوپتوز به عنوان یکی از مسیرهای تحلیل بافتی در کاشکسی سرطان شناخته شده است که سبب کاهش وزن و تخریب بافت‌های مختلف بدن می‌شود. عوامل مختلفی از جمله تمرینات ورزشی می‌تواند بر کاهش کاشکسی ناشی از سرطان تأثیرگذار باشد. در پژوهش حاضر، اثر ۴ هفته تمرین تناوبی شدید بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی مسیر آپوپتوز در بافت کبد موش‌های ماده حامل تومور سرطان پستان بررسی شد.

روش بررسی: در مطالعه تجربی حاضر، موش‌های ماده BALB/c پس از تزریق سلول سرطانی 4T1 به صورت تصادفی به دو گروه سرطانی (کنترل و تمرین تناوبی شدید) و گروه شم (تزریق بافر فسفات نمکی) تقسیم شدند. هر جلسه HIIT شامل شش تناوب سه دقیقه و ۲۰ ثانیه‌ای دویدن روی نوارگردان (شدت ۹۵-۸۰٪ VO₂max) با یک دقیقه ریکاوری فعال بین تناوب‌ها (شدت ۳۵-۳۰ درصد VO₂max) و مجموع ۱۰ دقیقه گرم کردن و سرد کردن (شدت ۳۰-۴۰ درصد VO₂max) در ابتدا و انتهای هر جلسه بود که به مدت ۴ هفته با ۵ جلسه در هفته اجرا شد.

یافته‌ها: سطح پروتئین کاسپاز-۳ در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.01$). شاخص پیش آپوپتوزی Bax تفاوت معناداری را بین گروه‌ها نشان نداد ($P > 0.05$). همچنین نتایج افزایش معنادار سطح پروتئین Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax را در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P = 0.01$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از طریق کاهش شاخص آپوپتوزی کاسپاز-۳ و افزایش نسبت Bcl-2/Bax، تحلیل بافت کبد ناشی از سرطان پستان را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، مرگ سلولی، سرطان پستان

مقدمه

شیوع سرطان پستان در سطوح بین‌المللی بالاست و امروزه مهم‌ترین عامل تهدید کننده سلامتی در زنان به‌شمار می‌رود، به‌طوری که در کشورهای غربی حدود یک سوم از کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد (۱). در ایران، احتمال بروز سرطان در هر ۱۰ تا ۱۵ زن وجود دارد، با این حال سن ابتلا به سرطان در ایران دست کم یک دهه کمتر از کشورهای توسعه یافته است (۲). کاشکسی مرتبط با سرطان^۱ یک الگوی منحصر به فرد از تومور می‌باشد که می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد پیشرونده، عوارض مربوط به درمان، کیفیت پایین زندگی و مرگ و میر شود (۳). کاشکسی به عنوان یک سندرم چندگانه، با عضله اسکلتی، بافت چربی، استخوان، کبد، سیستم عصبی و روده ارتباط نزدیکی دارد (۴). حدود ۳۰٪ از مرگ و میرهای ناشی از سرطان را می‌توان به کاشکسی نسبت داد (۵). اساس سازوکارهای مولکولی تحلیل بافت‌های مرتبط با سرطان، به طور کامل روشن نشده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کبد به‌عنوان ارگان مرکزی کنترل کننده متابولیسم، از بسیاری از تغییرات مورفولوژیکی و عملکردی در حین کاشکسی رنج می‌برد (۶، ۷). کبد نقش اساسی در متابولیسم، بیوسنتز، ایمنی، دفع و التهاب ناشی از سرطان دارد (۴). کبد طیف وسیعی از انواع مختلف سلول مانند هپاتوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال را دارا می‌باشد. با پیشرفت سرطان، سلول‌های کبدی الگوی سنتز پروتئین خود را تغییر می‌دهند و تعداد بیشتری از پروتئین‌های سنتز شده به‌عنوان پروتئین‌های فاز حاد آزاد می‌شوند. علاوه بر این، سنتز پروتئین‌های ساختاری در بیماران مبتلا به سرطان کاهش می‌یابد. بنابراین در سرطان، الگوهای متضاد متابولیسم پروتئین در کبد و عضله اسکلتی مشاهده می‌شود (۸). نشان داده شده است که افزایش گیرنده‌های مرگ در پاسخ به اختلال در عملکرد کبد، تغییر یافته و حساسیت سلول‌های کبدی را برای محرک‌های پیش آپوپتوزی افزایش می‌دهد، بنابراین باعث از بین رفتن بیش از حد سلول‌های کبدی و التهاب می‌شود (۹). از این‌رو، این داده‌ها حاکی از وجود تعامل بین کبد و تومور در طی پیشرفت کاشکسی سرطان است (۷). برای شناسایی درمان‌های بالقوه کاشکسی سرطان و توسعه روش‌های درمانی مؤثر، درک بهتر از سازوکارهای

پایه این سندرم حائز اهمیت می‌باشد (۱۰). آپوپتوز که با عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تعریف می‌شود، نقش مهمی در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و عملکردی دارد و در بسیاری از بافت‌های سالم و تومور مشاهده می‌شود. کاسپاز ۳، یکی از اجزای کلیدی در آپوپتوز، موجب فعال شدن مرحله نخست تجزیه شدن میوفیبریل‌ها می‌شود و سوبستراهای پروتئینی را برای مسیر یوبی کوئیتین پروتئوزوم (UPS) فراهم می‌کند (۱۱، ۱۲). همچنین از دیگر عوامل درگیر در فرآیند آپوپتوز، پروتئین‌های ضد آپوپتوزی خانواده Bcl-2 مانند Bcl-2 و Bcl-xL می‌باشند که از آزاد شدن فاکتورهای پیش آپوپتوزی از میتوکندری جلوگیری می‌کنند. برعکس، مولکول‌های پیش آپوپتوزی خانواده Bcl-2 مانند Bax و Bak، با باز کردن منافذ میتوکندریایی و آزادسازی مولکول‌های آپوپتوزی به داخل سیتوزول، آپوپتوز را سرعت می‌بخشند (۱۳). شواهد موجود نشان می‌دهد که حذف سریع سلول‌های ناخواسته، مانند سلول‌های پیر، آسیب دیده، جهش یافته ژنتیکی و یا سلول‌های آلوده به ویروس برای حفظ سلامت کبد حیاتی می‌باشد (۱۴). پیشنهاد شده است که تمرینات ورزشی می‌تواند یک رویکرد مؤثر برای درمان کاشکسی برای مقابله با تحلیل بافت و عضلات و بهبود کیفیت زندگی باشد (۱۵). گزارش شده است که انجام تمرینات ورزشی موجب تنظیم افزایشی پروتئین‌های ضد آپوپتوزی (Bcl-2 و Bcl-xL) و تنظیم کاهشی همزمان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی (AIF، Bak، Bad، Bax) و افزایش نسبت پروتئین‌های ضد آپوپتوزی به پیش آپوپتوزی در افراد سالم می‌شود (۱۶). نشان داده شده است که تمرینات تناوبی شدید (HIIT)^۲ می‌تواند موجب کاهش عوارض ناشی از سرطان گردد و به صورت ایمن در مبتلایان به سرطان پستان نیز استفاده شود (۱۷، ۱۸). تمرینات تناوبی شدید، تمریناتی با دوره‌های تکراری شدید و نسبتاً کوتاه با دوره‌های استراحت بین تکرارها هستند (۱۹). زیلینسکی^۴ و همکاران (۲۰۰۴)، گزارش دادند تمرینات ورزشی شدید در طولانی مدت باعث تأخیر در رشد تومور، کاهش تعداد سلول‌های التهابی و همچنین کاهش تعداد رگ‌های خونی بافت تومور شده است (۲۰). همچنین نتایج یک پژوهش نشان داد که تمرینات تناوبی شدید موجب کاهش حجم تومور در موش‌های حامل تومور سرطان پستان گردید

² Ubiquitin-proteasome system (ups)

³ High intensity interval training

⁴ Zielinski

¹ Cancer-associated cachexia (CAC)

کم کردن وزن غذای باقی مانده پس از ۲۴ ساعت از وزن غذای تهیه شده اندازه‌گیری شد. تمام آزمایشات حیوانی با دستورالعمل‌های استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی مطابقت داشت و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد Ir.bums.REC.1397.38 مورد تأیید قرار گرفت. موش‌های ماده BALB/c پس از تزریق سلول سرطانی و پیدایش تومور به صورت تصادفی به دو گروه سرطانی (کنترل و تمرین تناوبی شدید) و گروه شم (تزریق بافر فسفات نمکی) تقسیم شدند. لازم به ذکر است که در طی دوره مداخله، به ترتیب سه و یک موش در گروه‌های کنترل و تمرین تناوبی شدید تلف شدند و تمام موش‌های گروه شم در طی مراحل مطالعه زنده ماندند.

رده سلولی و کشت سلول: رده سلولی موشی 4T1 سلول‌های اپی‌تلیالی چسبیده هستند که از تومور خود به خود ایجاد شده در موش BALB/c مشتق شده است و به عنوان مدل مشابه سلول‌های سرطانی مرحله چهار سرطان سینه انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رده سلولی از دسته Her2- و ER/PR- یا Triple negative می‌باشند (۲۷، ۲۸). پس از تهیه رده سلولی 4T1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، سلول‌ها در فلاسک T75 در محیط کشت DMEM^۵ high glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۵٪ اسیدهای آمینه غیرضروری و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. پس از پر کردن ۹۰٪ سطح فلاسک به وسیله سلول‌ها، مایع رویی برداشته شد و پس از شستشو با بافر فسفات نمکی (PBS)،^۶ در مرحله بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵٪ از کف پلیت سلول‌ها جدا شده و پس از خنثی‌سازی آنزیم با محیط حاوی FBS ۱۰٪، کلیه محتویات فلاسک، داخل لوله فالكون ریخته شد و در دور ۱۲۰۰ به مدت ۳-۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، مایع رویی برداشته شده و پلاک سلولی در داخل محیط حاوی FBS ۱۰٪ حل گردید. برای القای تومور، پس از کشت سلول و شمارش آن، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس به موش‌های گروه تومور پس از بیهوشی با دوز مناسب کتامین و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم

(۲۱). سازگاری عضله اسکلتی، قلب و سایر بافت‌ها به تمرینات ورزشی از دلایل اصلی برای بهبود ظرفیت هوازی و کاهش خستگی در بیماران مبتلا به سرطان و بیماران قلبی تحت درمان می‌باشد، اگرچه که ممکن است عوامل دیگری نیز مشارکت نمایند (۲۲، ۲۳). نشان داده شده است که تمرینات تناوبی شدید می‌توانند در کاهش عوارض ناشی از سرطان پستان از جمله جلوگیری از تحلیل بافت عضله اسکلتی از طریق کاهش آپوپتوز در موش‌های مبتلا به کاشکسی سرطان مؤثر عمل نماید (۲۴). بر اساس این یافته، پیشنهاد شده است که شواهد بیشتری برای بررسی دقیق اثر تمرینات تناوبی شدید بر بافت‌های تحت نفوذ سرطان مورد نیاز است. امروزه اهمیت درمانی تمرینات ورزشی برای کنترل و یا کاهش عوارض جانبی ناشی از درمان سرطان اثبات شده است و مطالعات اخیر به دنبال تعیین مزایای تمرینات ورزشی منظم بر عوارض سرطان مانند کاشکسی سرطان و نقش آن بر سایر بافت‌ها هستند (۲۵). از این رو شفاف نمودن تأثیر تمرینات ورزشی منظم بر مکانیزم‌های زیربنایی در سرطان نه تنها ضروری و مهم به شمار می‌روند، بلکه در تعیین طراحی برنامه‌های کاربردی و پژوهش‌های بالینی نیز سودمند خواهند بود. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرینات تناوبی شدید بر آپوپتوز بافت کبد در موش‌های ماده حامل رده سلولی سرطان پستان 4T1 بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی می‌باشد. تعداد ۲۴ سر موش بآلب سی (BALB/c) با دامنه وزنی $16/96 \pm 2/47$ گرم و سن یک ماه از مؤسسه پاستور ایران تهران خریداری و به حیوان خانه دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل گردید. در پژوهش حاضر، حجم نمونه با توجه به تعداد نمونه در مقالات مشابه و در نظر گرفتن انحراف معیار حدود ۴ و توان ۰/۸۰، محاسبه گردید (۲۶). موش‌ها در گروه‌های چهار تایی، داخل قفس‌های پلی‌کربنات شفاف، در دمای محیطی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 25 ± 25 درصد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (۸ صبح، ۸ شب) در آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه بیرجند نگهداری شدند. آب مورد نیاز هر حیوان به صورت دسترسی آزاد در بطری‌های آب‌خوری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. حیوانات در طی مراحل تحقیق محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند. همچنین مصرف روزانه غذای مصرفی با

⁵ Cell line and cell culture

⁶ Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

⁷ Fetal bovine serum

⁸ Phosphate buffer saline

به ۱ میلی‌گرم)، یک میلیون سلول به صورت زیر پوستی به پهلو سمت چپ موش‌ها تزریق شد. لازم به ذکر است به موش‌های گروه شش محلول PBS تزریق گردید. تومور حدود ۱۰-۷ روز پس از تزریق در حیوانات قابل لمس بود.

پروتکل تمرین تناوبی شدید: یک هفته پس از ایجاد تومور، موش‌ها به مدت سه روز با دویدن بر روی نوارگردان (۱۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه) آشنا شدند (۲۹). سپس برنامه تمرین به مدت چهار هفته (پنج روز در هفته) اجرا شد. هر جلسه HIIT شامل ۳۵ دقیقه دویدن بر روی نوارگردان بود (شیب نوارگردان در تمام مراحل صفر درجه بود) که شامل پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰-۳۰ درصد VO_{2max} ، شش تناوب سه دقیقه و ۲۰ ثانیه‌ای با شدت ۹۵-۸۰ درصد VO_{2max} ، یک دقیقه ریکاوری فعال با شدت ۳۵-۳۰ درصد VO_{2max} بین هر تناوب و پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۴۰-۳۰ درصد VO_{2max} بود (۲۴، ۳۰).

پروتکل ارزیابی توان هوازی موش‌ها: پروتکل ارزیابی توان هوازی هر هفته یک بار به منظور تعیین سرعت دویدن اجرا گردید. بدین صورت که بعد از پنج دقیقه گرم کردن با سرعت هشت متر در دقیقه، هر دو دقیقه یک بار به میزان یک متر در دقیقه، سرعت دویدن افزایش یافت (۲۹)، سرعتی به‌عنوان حداکثر سرعت بیشینه در نظر گرفته شد که موش‌ها بلافاصله پس از افزایش سرعت در نوارگردان، قادر به دویدن با یک سرعت ثابت نبودند (۳۱، ۳۲) و این سرعت به‌عنوان سرعت بیشینه در نظر گرفته شد. نشان داده شده است که ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و رسیدن به VO_{2max} در موش‌ها وجود دارد (۲۱). از طرفی مطالعات، VO_{2max} موش‌ها را از طریق تعیین سرعت بیشینه دویدن آنها به‌عنوان یک روش معتبر در تعیین VO_{2max} در این جوندگان عنوان کردند (۲۱، ۳۱، ۳۲). بر این اساس، در پژوهش حاضر، شدت‌ها با توجه به این سرعت به‌دست آمد و تنظیم گردید. لازم به ذکر است که سرعت حداکثر در هفته اول 35 m/min بود و در هفته دوم و سوم سرعت به 29 m/min افت پیدا کرد، اما در هفته چهارم سرعت به 30 m/min متر در دقیقه رسید.

بافت برداری، هوموژناسیون بافتی و نحوه سنجش متغیرهای بیوشیمیایی تحقیق: تمامی گروه‌ها، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین (پایان هفته چهارم) متعاقب ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه، با ترکیبی از کتامین^۱

۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شدند. پس از جراحی صورت گرفته، بافت کبد با لوازم جراحی مناسب (قیچی و پنس) برداشته شد و نمونه‌های بافتی بلافاصله در نیتروژن مایع (با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و ضمن انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای سنجش‌های بیوشیمیایی نگهداری گردید. لازم به ذکر است مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، پس از اتمام بافت برداری، لاشه حیوانات در محیطی مناسب و دور از دسترس حیوانات، منابع آبی (جاری)، سدها و سفره‌های زیرزمینی) و مناطق مسکونی دفن گردید.

به‌منظور هوموژنیزه کردن بافت، ابتدا به میزان ۰/۱ گرم از نمونه‌های جامد جدا شده که با ترازوی دیجیتال جادور^۹ تایوانی مدل SKY-600 (حساسیت اندازه‌گیری ۰/۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد، به داخل میکروتیوب منتقل گردید. پس از رساندن دمای نمونه‌ها به دمای اتاق، PBS (pH 7.4, 100mM) به عنوان بافر هوموژنیزه کننده به آن اضافه شد. سپس داخل هر میکروتیوب دو ساچمه قرار داده شد و توسط میکرو هوموژنایزر (ساخت کشور آلمان) به مدت ۵ دقیقه به روی درجه ۳۰، هوموژنیزه شد (در مجموع ۱۰۰ میلی‌گرم بافت به ازای یک میلی‌لیتر بافر PBS). برای جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها، PBS مورد استفاده حاوی کوکتل آنتی پروتئاز^{۱۰} بود (Problock Goldbio Inc., USA). در مرحله بعد، نمونه‌های بافت هوموژن شده، سانتریفیوژ شد (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و مایع رویی (سوپرناتانت‌ها) به دقت جمع‌آوری و الیکوت^{۱۱} شد و جهت تعیین محتوای پروتئین نمونه‌ها و سنجش متغیرهای بیوشیمیایی تحقیق در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در مرحله بعدی، سطح بافتی کاسپاز-۳ به روش رنگ‌سنجی شیمیایی با فرمت میکروپلیتی با استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش ساخت کمپانی زلبایو^{۱۲} آلمان (تهیه شده از شرکت پادگین طب، تهران، ایران) طبق دستورالعمل کمپانی سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت روش اندازه‌گیری برای شاخص کاسپاز-۳، ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌گرم و درصد تغییرات درون آزمونی ۶/۳٪ بود. سطح بافتی Bcl-2 (حساسیت ۰/۰۱ نانوگرم بر

^۹ Jadever

^۱ Anti-protease cocktail

^۱ Aliquot

^۱ ZellBio

به ۱ میلی‌گرم)، یک میلیون سلول به صورت زیر پوستی به پهلو سمت چپ موش‌ها تزریق شد. لازم به ذکر است به موش‌های گروه شش محلول PBS تزریق گردید. تومور حدود ۱۰-۷ روز پس از تزریق در حیوانات قابل لمس بود.

پروتکل تمرین تناوبی شدید: یک هفته پس از ایجاد تومور، موش‌ها به مدت سه روز با دویدن بر روی نوارگردان (۱۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه) آشنا شدند (۲۹). سپس برنامه تمرین به مدت چهار هفته (پنج روز در هفته) اجرا شد. هر جلسه HIIT شامل ۳۵ دقیقه دویدن بر روی نوارگردان بود (شیب نوارگردان در تمام مراحل صفر درجه بود) که شامل پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰-۳۰ درصد VO_{2max} ، شش تناوب سه دقیقه و ۲۰ ثانیه‌ای با شدت ۹۵-۸۰ درصد VO_{2max} ، یک دقیقه ریکاوری فعال با شدت ۳۵-۳۰ درصد VO_{2max} بین هر تناوب و پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۴۰-۳۰ درصد VO_{2max} بود (۲۴، ۳۰).

پروتکل ارزیابی توان هوازی موش‌ها: پروتکل ارزیابی توان هوازی هر هفته یک بار به منظور تعیین سرعت دویدن اجرا گردید. بدین صورت که بعد از پنج دقیقه گرم کردن با سرعت هشت متر در دقیقه، هر دو دقیقه یک بار به میزان یک متر در دقیقه، سرعت دویدن افزایش یافت (۲۹)، سرعتی به‌عنوان حداکثر سرعت بیشینه در نظر گرفته شد که موش‌ها بلافاصله پس از افزایش سرعت در نوارگردان، قادر به دویدن با یک سرعت ثابت نبودند (۳۱، ۳۲) و این سرعت به‌عنوان سرعت بیشینه در نظر گرفته شد. نشان داده شده است که ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و رسیدن به VO_{2max} در موش‌ها وجود دارد (۲۱). از طرفی مطالعات، VO_{2max} موش‌ها را از طریق تعیین سرعت بیشینه دویدن آنها به‌عنوان یک روش معتبر در تعیین VO_{2max} در این جوندگان عنوان کردند (۲۱، ۳۱، ۳۲). بر این اساس، در پژوهش حاضر، شدت‌ها با توجه به این سرعت به‌دست آمد و تنظیم گردید. لازم به ذکر است که سرعت حداکثر در هفته اول 35 m/min بود و در هفته دوم و سوم سرعت به 29 m/min افت پیدا کرد، اما در هفته چهارم سرعت به 30 m/min متر در دقیقه رسید.

بافت برداری، هوموژناسیون بافتی و نحوه سنجش متغیرهای بیوشیمیایی تحقیق: تمامی گروه‌ها، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین (پایان هفته چهارم) متعاقب ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه، با ترکیبی از کتامین^۱

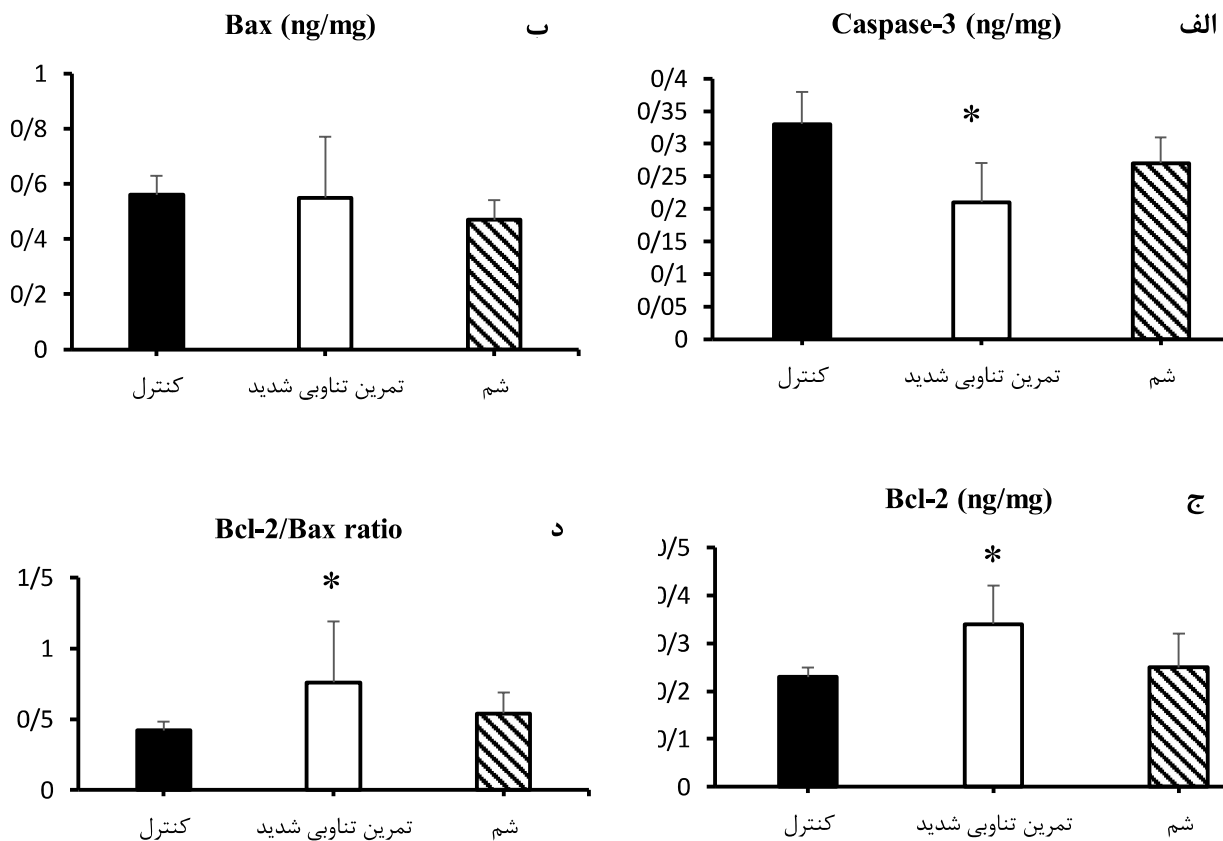
مصرفی در مدت ۴ هفته به عنوان عامل مخدوش‌گر از آزمون کواریانس نیز استفاده گردید. تمام محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و در سطح معناداری $P \leq 0/05$ انجام گرفت. جهت رسم نمودارها از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که سطح پروتئین کاسپاز-۳ در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0/01$). سطح پروتئین کاسپاز-۳ بین گروه کنترل-شم و گروه تمرین تناوبی شدید-شم تفاوت معناداری را نشان نداد (مقدار P به ترتیب، $0/09$ و $0/06$) (نمودار ۱. الف). سطح پروتئین Bax گروه‌های تحقیق متعاقب ۴ هفته تمرین تناوبی شدید تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > 0/05$) (نمودار ۱. ب). همچنین نتایج افزایش معنادار سطح پروتئین Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax (Bcl-2/Bax) را در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P = 0/01$) (نمودار ۱. ج و د).

میلی‌گرم و درصد تغییرات درون آزمونی $0/6/9$ و Bax (حساسیت $0/02$ نانوگرم بر میلی‌گرم و درصد تغییرات درون آزمونی $0/6/2$) نیز به روش رنگ‌سنجی شیمیایی با فرمت میکروپلیتی با استفاده از کیت تحقیقاتی مخصوص موش ساخت کمپانی زلبایو آلمان (تهیه شده از شرکت پادگین طب، تهران، ایران) طبق دستورالعمل کمپانی سازنده اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است، پروتئین تام نمونه‌ها با کیت اندازه‌گیری پروتئین به روش بردفورد (Bradford) (محصول کمپانی زلبایو، کشور آلمان) اندازه‌گیری گردید و غلظت متغیرها بر اساس نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: پس از به‌دست آمدن داده‌های خام، به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها، از آزمون لون استفاده شد. پس از مشخص شدن طبیعی بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. همچنین به منظور کنترل مقدار غذای



نمودار ۱: مقایسه میانگین شاخص‌های آپوپتوزی (الف) کاسپاز-۳، (ب) Bax (ج) Bcl-2 و (د) نسبت Bcl-2/Bax در گروه‌های پژوهش
* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ($P \leq 0/05$).

که تمرینات تناوبی شدید به اندازه تمرینات تداومی بر سطوح پیش و ضد آپوپتوزی بافت قلب موش‌های مبتلا به بیماری کرونری قلبی تأثیر می‌گذارد (۳۷). آنها کاهش سطح پروتئین کاسپاز-۳ را به دنبال هشت هفته تمرینات تداومی و تناوبی نشان دادند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش سطح پروتئین Bcl-2 در بافت کبد گردید. این در حالی است که سطح پروتئین Bax به دنبال ۴ هفته تمرین تناوبی شدید تفاوت معناداری را نشان نداد. بسیاری از تغییرات ژنتیکی مشاهده شده در سرطان سینه منجر به عدم تعادل در شاخص‌های پیش و ضد آپوپتوزی اعضای خانواده Bcl-2 می‌شود. بیان بیش از حد Bax باعث افزایش مرگ سلول و Bcl-2 به عنوان یک مهارکننده آپوپتوز عمل می‌کند (۳۸). همسو با نتایج پژوهش حاضر، کیم^۱ و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند که دویدن بر روی نوارگردان (۵ روز در هفته به مدت ۳۰ دقیقه برای ۶ هفته) موجب سرکوب بیان ژن Bax و افزایش سطح Bcl-2 در موش‌های مبتلا به دیابت گردید (۳۷). اثرات ضد آپوپتوزی تمرینات ورزشی از طریق مهار Bax و افزایش Bcl-2 به خوبی نشان داده شده است (۳۹، ۴۰). تمرین ورزشی به طور قابل توجهی باعث افزایش mRNA شاخص ضد آپوپتوزی Bcl-2 در بافت نخاع موش‌های دارای آسیب نخاعی شد و این افزایش سطح mRNA پروتئین Bcl-2 با کاهش بیان کاسپاز-۹ و ۷ همراه بود (۴۰). در مطالعه دیگری، تمرینات ورزشی هوازی به طور معناداری میزان مرگ سلولی نکروزی و آپوپتوزی را در نورون‌های هیپوکامپ موش‌های دیابتی کاهش داد (۴۱). در پژوهش حاضر، افزایش سطح پروتئین Bcl-2 و کاهش کاسپاز-۳ بافت کبد در موش‌های حامل تومور سرطان پستان به دنبال چهار هفته تمرین تناوبی شدید مشاهده شد که ممکن است در جلوگیری از بروز تحلیل بافت کبد موش‌ها به واسطه آپوپتوز احتمالی موثر باشد.

افزایش نسبت Bax به Bcl-2 (Bax/Bcl-2) در سلول سرطانی به عنوان یک شاخص قابل قبول از گرایش کلی سلول به انجام آپوپتوز و هدف درمانی ضد سرطان است (۳۸). نتایج مطالعه حاضر افزایش معنادار نسبت Bcl-2/Bax بافت کبد را در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت

بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود نداشت ($P > 0.05$). همچنین پس از کنترل میزان کل مصرف مواد غذایی طی ۴ هفته مداخله به عنوان عامل مخدوش‌گر، یافته‌های شاخص‌های آپوپتوزی بدون تغییر باقی ماند.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که به دنبال چهار هفته تمرین تناوبی شدید، سطح پروتئین کاسپاز-۳ در بافت کبد موش‌های تمرین کرده مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری کاهش یافت. کاشکسی سرطان با افزایش از دست دادن وزن بدن، بی‌اشتهایی، کم‌خونی و نقص ایمنی همراه است. پاتوفیزیولوژی کاشکسی چند منظوره می‌باشد و توسط آزادسازی سایتوکاین‌ها از تومور به برخی از ارگان‌های میزبان از جمله کبد، عضله و بافت آدیپوز میانجی می‌شود (۳۳). اخیراً، برخی مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی می‌توانند تغییرات متابولیکی و ساختاری را در بافت آدیپوز، عضله و سلول‌های کبدی ایجاد کنند که در افزایش هر چه بیشتر التهاب و تخریب متابولیکی در کاشکسی سرطان مشارکت می‌کنند (۳۴، ۳۵).

پیشنهاد شده است که دو مسیر UPS و آپوپتوز در کاشکسی سرطان نقش مهمی دارند (۱۰). در یک پژوهش، افزایش Bax و کاسپاز-۳ و کاهش معنادار سطح Bcl-XL را در عضله دو قلوی موش‌های مبتلا به کاشکسی سرطان نشان داده شده است (۱۰). همچنین یوشیدا^۱ و همکاران گزارش دادند که آپوپتوز از طریق Bax نقش مهمی در تحلیل عضلانی همراه با پیشرفت تومور بدخیم دارد (۳۶). بر اساس جستجوی صورت گرفته توسط محققین مطالعه حاضر، این اولین گزارش از نقش تمرینات ورزشی تناوبی شدید بر شاخص‌های آپوپتوزی در بافت کبد موش‌های سرطانی می‌باشد. پیش از این نشان داده شده است که تمرینات تداومی به میزان قابل توجهی آپوپتوز را در بافت قلب و کبد موش‌های مبتلا به بیماری کرونری و دیابتی کاهش می‌دهد، که نشان‌دهنده اثر قابل توجه تمرینات ورزشی بر این مسیر مولکولی می‌باشد (۳۷). با این حال، لو^۴ و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند

^۱Yoshida

^۵ Lu

^۱ Kim

تحلیل بافت کبد ناشی از سرطان پستان از این مسیر مؤثر واقع شود. اگرچه تمرینات تناوبی شدید در زمینه پیشگیری و مکمل درمان در بیماری‌های مختلف برای چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته است، اما همچنان به‌عنوان یک پروتکل ورزشی استاندارد برای کسب نتایج درمانی مطلوب مورد بحث باقی مانده است.

همچنین تنوع رژیم‌های ورزشی مورد استفاده در مطالعات قبلی، باعث می‌شود تا نتیجه‌گیری نهایی دشوار شود. بنابراین، انجام مطالعات بعدی جهت درک بهتر تعاملات پیچیده دارویی، تغذیه‌ای و تمرینات ورزشی در بیماران مبتلا به کاشکسی سرطان ضروری می‌باشد. در پژوهش حاضر، یکی از مسیرهای مولکولی تحلیل بافتی ناشی از سرطان مورد بررسی قرار گرفت، لذا مطالعات بیشتر همراه با انجام آسیب‌شناسی بافتی جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر مورد نیاز می‌باشد.

تعارض منافع

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

به گروه کنترل نشان داد. مکانیسم‌های احتمالی سنتز پروتئین توسط تمرین ورزشی در طول پیشرفت کاشکسی ممکن است شامل کاهش هر دوی التهاب و استرس اکسیداتیو باشد (۴۲، ۴۳). در این پژوهش نتایج نشان داد که تمرینات تناوبی شدید می‌تواند تحلیل بافت کبد را با کاهش شاخص‌های پیش آپوپتوزی و افزایش نسبت Bcl-2/Bax کاهش دهد. با این حال، مسیر مولکولی استرس اکسیداتیو در این پژوهش مورد بررسی قرار نگرفت که یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد که تنظیم‌کننده‌های مسیر میتوکندری وابسته به کاسپاز (مانند، Bax، Bcl-2) بیشتر به HIIT حساسیت نشان می‌دهند. اما یکی دیگر از محدودیت‌های پژوهش حاضر، عدم بررسی مسیر آپوپتوزی مستقل از کاسپاز (مانند عامل القا کننده آپوپتوز (AIF)¹⁶) بود. بنابراین، مطالعات بیشتری برای بررسی نشانگرهای مستقل از کاسپاز برای تعیین نقش تمرینات تناوبی شدید در این مسیر نیز مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که تمرینات تناوبی شدید از طریق مهار مسیر مولکولی آپوپتوز می‌تواند در پیشگیری از

References

- DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2014;64(1):52-62.
- Kazemi A, Mirza-zade E. The effect of endurance training on tumor tissue levels of caspase-3 and caspase-9 in mice with breast cancer. Iranian Quarterly Journal of Breast Disease. 2018;11(3):32-43.
- Sun X, Feng X, Wu X, Lu Y, Chen K, Ye Y. Fat wasting is damaging: role of adipose tissue in cancer-associated cachexia. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020;8: 33.
- Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. Nature Reviews Endocrinology. 2019;15(1):9-20.
- von Haehling S, Anker SD. Cachexia as major underestimated unmet medical need: facts and numbers. International Journal of Cardiology. 2012; 161(3):121-3.
- Gonçalves DC, Lira FS, Yamashita AS, Carnevali Junior LC, Eder R, Laviano A, et al. Liver lipid metabolism disruption in cancer cachexia is aggravated by cla supplementation - induced inflammation. Clinical Nutrition. 2019; 38(5):2219-30.
- Martignoni ME, Dimitriu C, Bachmann J, Krakowski-Rosen H, Ketterer K, Kinscherf R, et al. Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. Oncology Reports. 2009;21(2):363-9.
- Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. Nature Reviews Cancer. 2014; 14(11):754.

¹⁶ Apoptosis-inducing factor

9. Van der Kallen CJ, Van Greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis*. 2009;14(12):1424.
10. Wang Q, Li C, Peng X, Kang Q, Deng D, Zhang L, et al. Combined treatment of carfilzomib and z-VAD-fmk inhibits skeletal proteolysis and apoptosis and ameliorates cancer cachexia. *Medical Oncology*. 2015;32(4):100.
11. Johns N, Stephens N, Fearon K. Muscle wasting in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013; 45(10): 2215-29.
12. Wing SS, Lecker SH, Jagoe RT. Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011;48(2):49-70.
13. Hasselgren P-O, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Annals of Surgery*. 2001;233(1):9.
14. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005;54(7):1024-33.
15. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2015;6(3):197-207.
16. Chaudhry K, Rogers R, Guo M, Lai Q, Goel G, Liebelt B, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke. *Neuroscience Letters*. 2010;474(2):109-14.
17. Mijwel S, Backman M, Bolam KA, Olofsson E, Norrbom J, Bergh J, et al. Highly favorable physiological responses to concurrent resistance and high-intensity interval training during chemotherapy: the OptiTrain breast cancer trial. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2018; 169(1):93-103.
18. Schmitt J, Lindner N, Reuss Borst M, Holmberg HC, Sperlich B. A 3 week multimodal intervention involving high intensity interval training in female cancer survivors: a randomized controlled trial. *Physiological Reports*. 2016;4(3).
19. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low volume, high intensity interval training in health and disease. *The Journal of Physiology*. 2012; 590(5): 1077-84.
20. 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(6):2249-56.
21. Delphan M, Agha Alinejad H, Delfan M, Dehghan S. Intratumoral effects of continuous endurance training and high intensity interval training on genes expression of mir-21 and bcl-2 in breast cancer bearing female mice. *Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases [Persian]*. 2017;10(2):49-57.
22. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(2):2374-82.
23. Toohey K, Pumpa K, McKune A, Cooke J, DuBose KD, Yip D, et al. Does low volume high-intensity interval training elicit superior benefits to continuous low to moderate-intensity training in cancer survivors? *World Journal of Clinical Oncology*. 2018;9(1):1.
24. Ahmadabadi F, Saghebjo M, Huang C-J, Saffari I, Zardast M. The effects of high-intensity interval training and saffron aqueous extract supplementation on alterations of body weight and apoptotic indices in skeletal muscle of 4T1 breast cancer-bearing mice with cachexia. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2020; 45 (5):555-63.
25. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: a translational perspective. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013; 30:S75-S87.
26. Röhrig B, du Prel J-B, Wachtlin D, Kwiecien R, Blettner M. Sample size calculation in clinical trials: part 13 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2010;107(31-32):552.
27. Pulaski BA, Ostrand Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*. 2000;39(1):20-22.
28. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012;12(1):120.
29. Barra NG, Fan IY, Gillen JB, Chew M, Marcinko K, Steinberg GR, et al. High intensity interval training increases natural killer cell number and function in obese breast cancer-challenged mice and obese women. *Journal of Cancer Prevention*. 2017;22(4):260.
30. Moghaddam V, Peeri M, Azarbayjani MA, Matin Homae H. Comparison of protective effect of two types of aerobic and intermittent

- effect of two types of aerobic and intermittent training on breast cancer by TGF β protein and Smad-3 gene and MMP2 in female mice. *Hormozgan Medical Journal*. 2017;21: 53-64.
31. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):753-60.
32. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2007; 21(3): 751.
33. Fonseca GWPd, Farkas J, Dora E, von Haehling S, Lainscak M. Cancer Cachexia and Related Metabolic Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2321.
34. Cvan Trobec K, Kerec Kos M, Trontelj J, Grabnar I, Tschirner A, Palus S, et al. Influence of cancer cachexia on drug liver metabolism and renal elimination in rats. *Journal Of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2015;6(1):45-52.
35. Gonçalves DC, Lira FS, Yamashita AS, Junior LCC, Eder R, Laviano A, et al. Liver lipid metabolism disruption in cancer cachexia is aggravated by cla supplementation-induced inflammation. *Clinical Nutrition*. 2019; 38(5): 2219-30.
36. Yoshida H, Ishiko O, Sumi T, Honda K, Hirai K, Ogita S. Expression of Apoptosis Regulatory Proteins in the Skeletal Muscle of Tumorbearing Rabbits. *Cancer Science*. 2001; 92(6):631-7.
37. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*. 2013;7(6):1745-50.
38. Khori 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.
39. Kim D-H, Ko I-G, Kim B-K, Kim T-W, Kim S-E, Shin M-S, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. *Physiology & Behavior*. 2010; 101(5): 660-5.
40. Liu G, Keeler BE, Zhukareva V, Houlé JD. Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*. 2010; 226(1):200-6.
41. Shamsaei N, Abdi H, Shamsi M. The Effect of a Continuous Training on Necrosis and Apoptosis Changes in the Hippocampus of Diabetic Rats. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2017; 25(1):1-11.
42. Gould DW, Lahart I, Carmichael AR, Koutedakis Y, Metsios GS. Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2013;4(2):111-24.
43. Lustgarten MS, Jang YC, Liu Y, Qi W, Qin Y, Dahia PL, et al. MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. *Aging Cell*. 2011; 10(3):493-505.