

The protective effect of aerobic exercise on breast cancer by TGF β protein and Smad-3 and MMP2 gene in female mice

Moghaddam V., PhD Stedent¹, Peeri M., PhD², Azarbijany M.A., PhD³, Matin homaee H., PhD⁴

1. PhD student of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Professor of Exercise Physiology Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98 21 88562484, m.peeri@iauctb.ac.ir

3. Professor of Exercise Physiology Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

4. Associate Professor of Exercise Physiology Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: The aim of this study was to investigate the protective effect of aerobic exercise on breast cancer by TGF β protein and Smad-3 and MMP2 gene in female mice.

Material and method: Twenty-four female Balb/c mice were divided into control and exercise groups. Estrogen-receptor dependent breast cancer cells (MC4-L2) were injected into the subcutaneous area of the right flank of the mice. The exercise group performed endurance exercise five sessions per week at an intensity of 60% to 65% VO₂max for 10 weeks. Each session lasted 60 minutes. After appearance of the tumor, the length and width of the tumor were measured by a digital caliper once a week. Finally, the mice were sacrificed, tumor tissue was removed and immediately frozen and kept at -70° C. The level of TGF β protein was measured by western blot and expression of Smad and mmp2 genes in the samples was measured by Real Time PCR. Data were analyzed by t-test. P<0.05 was considered significant.

Results: The results showed that aerobic continuous training significantly increased mean expression of Smad-3 (p=0/033) and TGF- β protein mean concentration (P=0/000) in tumor tissue in the endurance group compared to those in the control group. Also, the results showed that aerobic training significantly decreased the mean expression of MMP-2 in tumor tissue in the endurance group compared to that in the control group (p=0/044).

Conclusion: According to the results, It seems that continuous aerobic training may be an effective intervention to reduce breast cancer progression.

Key words: Breast cancer, Aerobic continuous training, TGF β , Smad, MMP2.

Received: Jul 11, 2016 **Accepted:** Apr 16, 2017

اثر حفاظتی تمرین هوازی بر سرطان پستان بواسطه پروتئین TGF- β و ژن Smad-3 و MMP2 در موش های ماده

وحید مقدم^۱، مقصود پیری^۲، محمد علی آذربایجانی^۳، حسن متین همایی^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران. تلفن ثابت: ۸۸۵۶۲۴۴۴-۰۲۱

m.peeri@iauctb.ac.ir

۳. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

۴. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این تحقیق تعیین اثر حفاظتی تمرین هوازی بر سرطان پستان بواسطه پروتئین TGF- β و ژن Smad-3 و MMP2 در موش های ماده بود.

روش بررسی: تعداد ۲۴ سر موش ماده نژاد بالبسی پس از تیموری شدن بوسیله رده سلولی MC4-L2 در قالب دو گروه تمرین تداومی هوازی و کنترل در شرایط استاندارد مورد مطالعه قرار گرفتند. برنامه تمرین تداومی هوازی شامل ۶۰ دقیقه دویدن روی تردمیل با شدت ۶۵-۶۰ درصد VO₂max، پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته بود. حجم تومور به صورت هفتگی بوسیله کولیس و با استفاده از فرمول جونز محاسبه شد. میزان پروتئین TGF β به روش Western Blot و بیان ژن Smad و mmp2 در نمونه ها به روش Real Time PCR اندازه گیری شد. داده ها به روش تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD در سطح معنی داری $P < 0/05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین بیان Smad-3 در بافت تومور در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/033$). همچنین نتایج نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب کاهش معنادار میانگین بیان MMP-2 در بافت تومور در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/044$). علاوه بر این، نتایج نشان می دهد ده هفته تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین مقادیر پروتئین TGF- β در بافت تومور نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/000$).

نتیجه گیری: با توجه به یافته های تحقیق حاضر به نظر می رسد، تمرین استقامتی هوازی احتمالاً می تواند مداخله موثری برای کاهش پیشروی سرطان پستان باشد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، تمرین تداومی هوازی، TGF- β ، Smad-3، MMP2

وصول مقاله: ۹۵/۵/۲۳ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۸/۱۰ پذیرش: ۹۵/۸/۱۶

مقدمه

سرطان پستان، شایع ترین سرطان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه) در زنان محسوب می شود. پیشرفت سرطان به طور بسیار شدیدی بقاء بیمار را به خطر می اندازد و استراتژی های درمانی را با شکست مواجه می کند. سلول های سرطانی اپیتلیال، برای تهاجم باید به داخل بافت پایه نفوذ کنند و سد ماتریکس خارج سلولی را از بین ببرند. در این مرحله آنزیم های پروتئاز دارای نقش بسیار مهمی هستند که با هضم ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات آن باعث تسهیل متاستاز دادن سلول های سرطانی به بافت های دیگر می شوند (۱).

مشخص شده است که سلول های توموری نسبت به سلول های سالم میزان پروتئاز بیشتری تولید می کنند و ارتباط مثبت بین میزان تهاجم سلول ها و سطح پروتئاز آن ها هم در مدل های تومور آزمایشگاهی و هم در تومورهای بالینی انسانی ثابت شده است. نقش کلی پروتئازها و به خصوص ماتریکس متالوپروتئینازها^۱ (MMPs) در متاستاز و تهاجم سلول های توموری کاملاً اثبات شده و مشخص شده که این آنزیم ها با تسهیل شکستن اتصالات بافت پیوندی و هضم ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به این فرآیند کمک می کنند (۲). ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده های از آنزیم های پروتئولیک هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشاء پایه ایفای نقش می کنند و از این لحاظ در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت هستند. از بین این گروه ماتریکس متالوپروتئیناز-۲^۲ (MMP2) در بسیاری از سلول های نرمال و تغییر شکل یافته و برخی سلول های بدخیم تولید می شود که روی کلاژن های غشای پایه سلولی و کلاژن های داتوره شده و ژلاتینها، فیبرونکتین، الاستین، پروتئوگلیکان، لامینین و ... اثر می کند (۳). از طرفی فاکتور

رشدی تغییر شکل دهنده بتا^۳ (TGF-) یکی از قوی ترین مهار کننده های طبیعی تکثیر سلول تومور است که دارای فعالیت آنکوژنیک نیز می باشد. اثرات اتوکراین و پاراکراین TGF- در سلول های تومور و محیط میکرو تومور هر دو تاثیرات مثبت و منفی بر روی توسعه سرطان را نشان می دهد. بر این اساس، مسیر سیگنالینگ TGF- به عنوان یک مسیر سرکوبگر تومور و پروموتور پیشرفت تومور و تهاجم در نظر گرفته شده است. در سلول های طبیعی اپیتلیال پستان و در مراحل ابتدایی پیشرفت سرطان، TGF- با خاصیت سرکوب کنندگی خود بر رشد تومور و از طریق مهار تکثیر سلولی به عنوان یک مهار کننده رشد عمل می کند. اما با پیشرفت سرطان عملکرد آنکوژنیک و الفا کنندگی تومور پیدا می کند و باعث افزایش پتانسیل تهاجم و متاستاز می گردد (۴). همانطور که بیان شد TGF- یک القا کننده بالقوه و بسیار مهم در پیشرفت سرطان است، این مسیر علامت دهی، فرآیند از طریق مسیرهای وابسته به Smad و غیر وابسته به Smad القا می کند. گیرنده های TGF- (R1, R2) کینازهای دو کاره هستند که هم فعالیت تیروزین کینازی دارند و هم فعالیت ترئونین/سیرین کینازی را نشان می دهند. پس از بستن کمپلکس هترودیمری گیرنده های TGF- R1, R2 یک آبشار علامت رسانی ایجاد می شود که با فسفریلاسیون وسیله R2 آغاز می شود و موجب اتوفسفریلاسیون سرین R1 می شود که در طی آن تعدادی از پروتئین های ویژه فسفریلاسیون (به ویژه خانواده عامل های رونویسی Smad) فعال می گردند. TGF- R1 موجب فعال شدن Smad های ۲ و ۳ می شود. Smad ها به یک Co-Smad به نام Smad4 متصل می شوند. کمپلکس های Smad 2/3 همراه با عامل های رونویسی فرعی می توانند ژن های دخیل در تمایز را فعال کنند (۵). در همین راستا در تحقیقی نشان داده شده است که تمرین مقاومتی

¹ - Matrix Metalloproteinases

² - Metalloproteinase-2

³ - Transforming Growth Factor

پیشرفت سرطان پستان را کاهش دهد. مطالعات نشان میدهند زنان فعال ۲۰ تا ۳۰ درصد کمتر از زنان غیرفعال به سرطان پستان مبتلا می شوند (۱۷). اگر چه سازوکارهای زیادی برای توضیح این کاهش وجود دارد اما شواهد کمی برای اثبات هر کدام وجود دارد. اثر متقابل تغییرات بیان ژن عوامل ضدتوموری و آنکوژنها با فعالیت ورزشی که در سرطان پستان نقش دارند، به خوبی مشخص نشده است. مطالعات جدید اثرات مفید دیدن روی تردمیل با شدت متوسط بر جلوگیری از پیشرفت تومور را نشان دادند فعالیت بدنی وضعیت زنان مبتلا به سرطان را کاهش می دهد اما سازوکارهای درگیر در مدل های حیوانی و انسانی به طور کامل شناخته نشده اند. با توجه به موارد یاد شده پژوهش حاضر تاثیر ۱۰ هفته تمرین استقامتی هوازی بر میزان پروتئین TGF- β و بیان ژن Smad2 و mmp2 در موش های مبتلا به سرطان پستان را مورد مطالعه قرارداد.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی است. جامعه آماری موش های ماده نژاد بالسی (۶-۸ هفته، وزن ۱۸ تا ۲۰ گرم، تهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور) مبتلا به تومور پستان بودند که از میان آنها تعداد ۲۴ سر موش صحرایی ماده به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. نمونه آماری این تحقیق، به روش نمونه گیری انتخابی هدفدار با توجه به شرایط وزنی و سنی انجام شد. سپس به صورت تصادفی ساده در دو گروه، با ۱۲ سر موش در هر گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (۱۲ سر موش) در هیچ گونه برنامه فعالیت ورزشی شرکت نکردند، ولی برای ایجاد شرایط کاملا یکسان پنج بار در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی حرکت قرار داده شدند. گروه ورزش استقامتی تداومی (۱۲ سر موش، لازم به ذکر است که یک سر موش، مداخله را به پایان نرساند) که به مدت ۱۰ هفته تمرین تداومی هوازی را انجام دادند. تمام حیوانات (غیر از مورد ذکر شده) سرعت و مدت

سطح Smad mRNA را افزایش می دهد. به طور کلی تحقیقات در رابطه با Smad و ارتباط آن فعالیت ورزشی در شرایط بیماری از جمله سرطان نیاز به بررسی بیشتری دارد (۶).

برخی مطالعات اثرات مثبت تمرین ورزشی در بهبود سرطان پستان را نشان دادند. در همین راستا دانی و همکاران (۲۰۱۴) کاهش در میزان MMPها متعاقب هشت هفته فعالیت ورزشی را گزارش کردند (۷). نتایج مطالعه لیت و همکاران (۲۰۱۳) نیز افزایش MMP2 پس از ۱۲ هفته تمرین مقاومتی در موش ها را نشان داد (۸). تحقیقات اندکی در زمینه تاثیر فعالیت ورزشی بر MMP2 صورت گرفته است، همچنین تاکنون تاثیر فعالیت هوازی بر MMP2 در آزمودنی های مبتلا به سرطان مورد بررسی قرار نگرفته است. در همین رابطه، با توجه به نقش های اساسی پروتئین TGF- β در ایجاد سازگاری های تمرینات ورزشی، تاثیر روش های تمرینی مختلف بر آن مورد توجه قرار گرفته است. تحقیقات نشان دادند که مقادیر بافتی TGF- β 1 در عضله دوقلو متعاقب تمرین تناوبی شدید در رت های نر نژاد ویستار افزایش می یابد (۹). همچنین فعالیت ورزشی شدید و ماندگار ساز سطح سرمی TGF- β را به طور قابل معنی داری افزایش می دهد (۱۰). با این حال، پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی تغییر معنی داری در سطح سرمی TGF- β مشاهده نشد (۱۱). در مجموع، هنوز مشخص نشده است که آیا تمرینات تداومی هوازی بر میزان پروتئین TGF- β آزمودنی های مبتلا به سرطان پستان تاثیر دارد. سطوح MMP2 متعاقب تمرین با افزایش (۱۳ و ۱۲) و کاهش (۱۴) همراه بود.

با اصلاح سبک زندگی افزایش خطر بروز سرطان کاهش و همچنین وضعیت بیماران مبتلا بهبود می یابد. عوامل مختلفی از جمله فعالیت ورزشی منظم منجر به کاهش خطر بروز سرطان می شود. علاوه بر این، میان سبک زندگی و توسعه سرطان پستان، پروستات، مغز و کولون رابطه عکس وجود دارد (۱۵ و ۱۶). سبک زندگی فعال می تواند خطر

دویدن روی تردمیل را تحمل کردند و برنامه تمرین به طور کامل با موفقیت اجرا گردید (۱۸). کلیه اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (برابر پرتکل هلیسنگی ۲۰۰۶) و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. نمونه های مورد آزمایش در طی دوره یک هفته ای آشنایی با محیط آزمایشگاهی و آشنایی با نوارگردان و همچنین مراحل اجرای پروتکل در قالب گروه های پنج سر موش در قفس های پلی کربنات شفاف، در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵٪ و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. برای جذب ادرار و مدفوع نمونه ها و راحتی آن ها از تراشه و بریده های چوب استریل استفاده شد. هر روز نظافت قفس ها انجام شده و تراشه های چوب نیز تعویض می شد.

نحوه ایجاد تومور:

موشهای ماده نژاد بالبیسی که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده پس از کشت رده سلولی MC4-L2 و تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد یک میلیون سلول سوسپانسیون شده در بافر PBS به صورت زیر پوستی به پهلوئی راست موش ها تزریق گردید تا پس از طی ۸ تا ۱۲ روز تومور پستان پدیدار شود (۱۹).

پروتکل تمرین تداومی هوازی:

هر جلسه برنامه تمرین استقامتی تداومی شامل ۷۰ دقیقه دویدن روی تردمیل بود که مراحل آن عبارتند از: مرحله گرم کردن که شامل پنج دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰ تا ۴۰ درصد VO₂max بود، مرحله اصلی تمرین شامل ۶۰ دقیقه دویدن با شدت ۶۵-۶۰ درصد VO₂max بود همچنین پنج دقیقه سرد کردن با شدت ۳۰ تا ۴۰ درصد VO₂max در نظر گرفته شد.

مراحل نمونه گیری بافت و اندازه گیری پروتئین و بیان ژن: ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین [90 mg/kg] و زایلازین

۰/۷ گرم از پودر آگارز را در ۷۰ میلی لیتر بافر (IX) TAE به مدت ۳-۲ دقیقه در ماکروویو جوشانده می شود تا محلول کاملا یکدست و یکنواختی بدست آید. سپس ۳/۵ میکرولیتر DNA safe stain قبل از بستن ژل به آن اضافه می شود و محتویات ژل در ظرف مخصوص قالب گیری ژل (Tray) ریخته و شانه مخصوص داخل آن قرار داده می شود و منتظر ماندیم تا ژل کاملا شکل بگیرد.

پس از تهیه ژل، در داخل تانک مخصوص الکتروفورز قرار داده می شود و داخل تانک، بافر (1x) TAE ریخته می شود تا جایی که روی ژل و حتی مقداری بالاتر از سطح ژل را پوشاند. در نهایت شانه را به آرامی خارج و نمونه ها و مارکر وزن مولکولی در محل مخصوص نمونه بارگذاری (load) شده و جریان برقرار گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه انجام گرفت و در نهایت باندهای 28s و 18s در زیر نور فلورسانت با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده می شود.

سنتر cDNA برای ژن Smad و mmp2: در این مرحله به محصول واکنش DNase Treatment که حاوی ۱۱ میکرو لیتر RNA می باشد، یک میکرو لیتر راندوم پرایمر (random primer) افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C قرار گرفت. پس از اتمام زمان

ژل دو درصد انتقال داده شد و از نظر وجود و یا عدم وجود محصول بررسی شد (۲۱).

کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف:

برای کمی سازی مقادیر بیان ژن مورد نظر از فرمول 2^{-Ct} (۲) به توان منفی Ct استفاده شد. در این فرمول اندازه‌های لازم از طریق مراحل زیر به دست آمد و در فرمول قرار داده شد و مقادیر $fold\ change$ محاسبه شد.

$$Ct = Ct \text{ ژن هدف } - Ct \text{ (مرجع)}$$

$$Ct = Ct \text{ نمونه تجربی } - Ct \text{ (نمونه کنترل)}$$

2^{-Ct} = نسبت به گروه کنترل میزان تغییرات بیان ژن استخراج پروتئین تام سلولی به روش Western Blot:

در این مطالعه برای بررسی میزان پروتئین TGF- α و Actin ابتدا پروتئین‌های تام سلول‌ها استخراج شد. سلول‌ها با مقدار تقریبی $10^6 \times 10$ در هر فلاسک با سانتریفیوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه و دمای چهار درجه سانتیگراد) برداشت شده و با بافر فسفات-سالین سرد شستشو شد. سپس به هر رسوب سلولی با توجه به میزان سلول‌های ته نشین شده مقدار مشخصی از بافر لیز کننده سلول (حاوی ۱٪ NP-40، ۰/۵٪ SDS، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (۷/۴ pH)، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، پنج میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ درصد سدیم داکسی کولات، ۱۰۰ میلی‌مولار PMSF و مهارکننده پروتئاز و مهارکننده فسفاتاز) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هر پنج دقیقه نمونه‌ها ورتکس می‌شوند. پس از این مرحله نمونه‌های سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (۲۲).

پس از کسب اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌های وزنی با آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. سپس آزمون T مستقل برای تغییرات بین گروهی استفاده شد. تمام عملیات آماری پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و سطح معناداری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

انکوباسیون محصول واکنش بر روی یخ قرار گرفت و به هر میکروتیوب چهار میکرولیتر 5X Reaction Buffer، ۰/۵ میکرولیتر RiboLock Rnase Inhibitor $u/\mu l$ ، ۲ میکرولیتر dNTP Mix (۵۰ میکرولیتر RevertAid) اضافه می‌شود و در ترمو سایکلر Corbett قرار داده می‌شود. دما و زمان واکنش بر اساس کیت بدین شکل بود: $25^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، $50^{\circ}C$ به مدت یک ساعت، $85^{\circ}C$ به مدت پنج دقیقه و در نهایت محصول واکنش برای انجام واکنش‌های بعدی در $80^{\circ}C$ نگهداری می‌شود. ابتدا cDNA سنتز شده برای IGF-1R، IGF-1 با ۴۰ میکرولیتر RNase & DNase-free water رقیق شد ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از رقت‌ها به همراه ۷/۵ میکرولیتر Master Mix تولیدی ampliçon (دانمارک) و یک میکرولیتر از پرایمرها Forward و یک میکرولیتر از پرایمر backward در چهار میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز (Nuclease-free Water) برای رسیدن به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به خوبی حل و مخلوط شد. تمام واکنش‌ها به شکل دوتایی (دابلکیت) انجام شد. در نهایت میکروتیوب‌ها در محل مخصوص خود در دستگاه قرار داده شد و واکنش‌های تکثیر در طی ۴۰ سیکل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به شکل زیر انجام شد: $95^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه و $60^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه. لازم به ذکر است که دمای و زمان دناتوراسیون اولیه به ترتیب $95^{\circ}C$ و ۱۰ دقیقه بود. در نهایت منحنی استاندارد و تکثیر پرایمرها توسط نرم افزار موجود در سیستم آنالیز و رسم شد. واکنش تکثیر هر یک از ژن‌های مورد نظر در مطالعه نیز، همانطور که در بالا ذکر گردید انجام شد با این اختلاف که واکنش تکثیر فقط برای یک رقت از نمونه (رقت بهینه) الگو انجام شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر نیز واکنش qRT-PCR به همان ترتیب که گفته شد انجام گرفت. برای کنترل داخلی از ژن GAPDH استفاده شد و جهت کنترل کیفی محصول واکنش GAPDH مربوط به نمونه بر روی

یافته‌ها

همچنین نتایج نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب کاهش معنادار میانگین بیان MMP-2 در بافت تومور در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/044$). (نمودار ۲). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد ده هفته تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین مقادیر پروتئین TGF- β در بافت تومور این گروه نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/000$) (نمودار ۳).

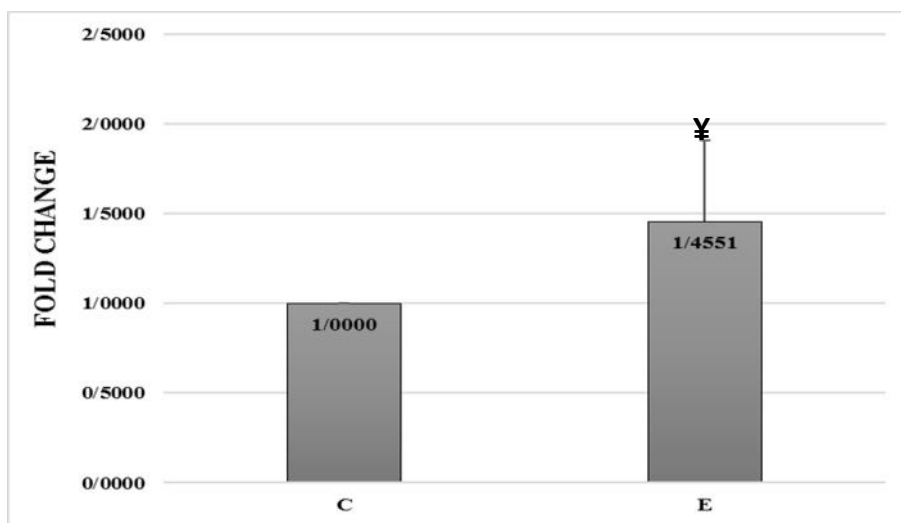
در جدول ۱ مقادیر میانگین و انحراف معیار حجم تومور در گروه های پژوهش به تفکیک هفته نشان داده شده است. همچنین در جدول ۲ مقادیر میانگین و انحراف معیار بیان ژن MMP-2، Smad-3 در گروه های پژوهش آمده است. نتایج نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین بیان Smad-3 در بافت تومور در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل شد ($P=0/033$) (نمودار ۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار حجم تومور (واحد حجم تومور میلی متر مکعب) در گروه‌های مختلف

هفته	گروه تمرین استقامتی هوازی	کنترل
اول	۱۱۲/۰۴±۱۹/۷۸	۱۰۸/۳۸±۲۴/۳۹
دوم	۱۷۴/۱۱±۳۰/۳۴	۱۵۹/۶۷±۲۶/۱۳
سوم	۲۲۱/۸۲±۳۲/۹۷	۲۳۹/۳۷±۲۹/۹۸
چهارم	۲۸۴/۶۴±۲۷/۴۲	۳۷۹/۱۹±۴۳/۲۲
پنجم	۳۷۷/۶۴±۴۲/۸۹	۴۷۸/۰۹±۳۵/۷۰
ششم	۴۷۹/۵۳±۴۴/۶۳	۶۶۷/۴۶±۵۲/۲۱
هفتم	۶۵۲/۱۶±۷۳/۲۲	۷۸۹/۸۶±۳۹/۱۰
هشتم	۸۴۸/۲۳±۸۰/۳۶	۹۹۷/۳۸±۷۱/۰۹
نهم	۱۰۷۰/۸۰±۱۲۲/۷۳	۱۱۵۱/۳۱±۹۴/۷۵
دهم	۱۱۵۸/۰۰±۱۳۴/۴۰	۱۳۱۴/۹۰±۱۲۵/۲۷

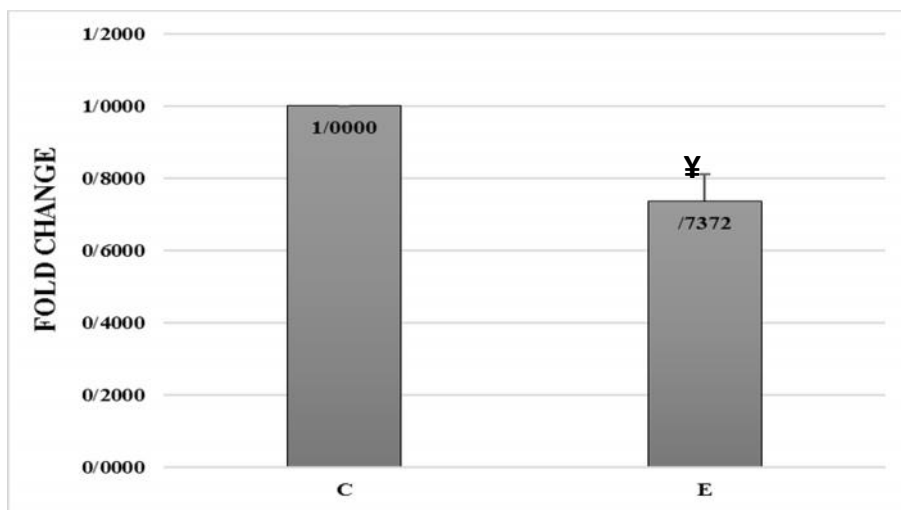
جدول ۲. مقادیر میانگین و انحراف معیار بیان ژن MMP-2، Smad-3 در گروه‌های پژوهش

متغیر	گروه کنترل (تعداد=۱۲)	تمرین هوازی (تعداد=۱۱)
Smad-3 (mRNA expression levels)	۱	۱/۴۵۵±۰/۴۵۱
MMP-2 (mRNA expression levels)	۱	۰/۷۳۷±۰/۲۷۹



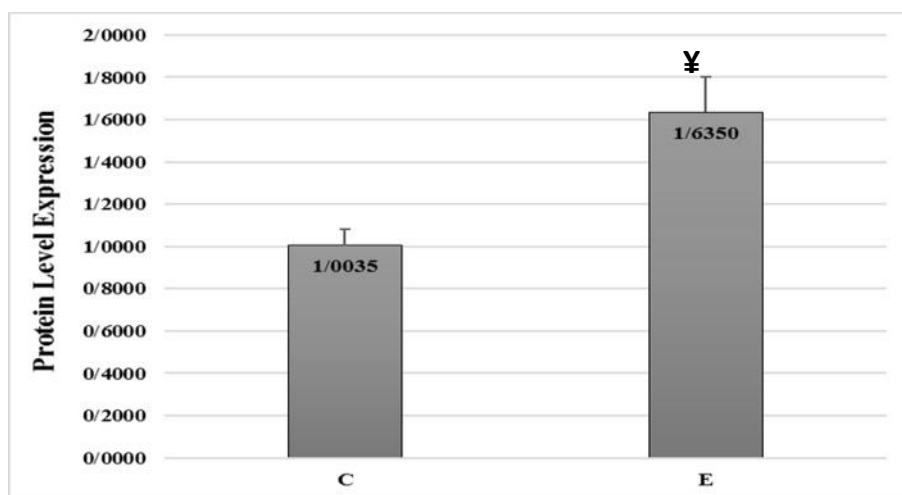
* افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$)

نمودار ۱: تغییرات بیان Smad-3 پس از دوره مداخله



* کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$)

نمودار ۲: تغییرات بیان MMP-2 پس از دوره مداخله



¥ افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$)

نمودار ۳: مقادیر پروتئین TGF- β پس از دوره مداخله

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب کاهش معنادار میانگین بیان MMP-2 در بافت تومور شده است. سرطان سینه شایع ترین نوع بدخیمی و مهمترین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان سراسر دنیاست، به طوری که بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ زنان محسوب می شود (۲۳). تحقیقات اخیر نشان داده اند باتوجه به اینکه درمانهای رایج از جمله جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و هورمون درمانی، فقط در نیمی از سرطان ها مؤثر بوده است شاید بتوان فعالیت ورزشی را به عنوان یک درمان مکمل و عامل مهم و اساسی جهت بازتوانی بسیاری از بیماری های مزمن از جمله سرطان به شمار آورد (۲۴). مطالعات نشان داده اند که فعالیت ورزشی با شدت متوسط سبب کاهش میزان مرگ و میر ناشی از انواع سرطان از جمله سرطان سینه می شود (۲۵). از جمله بررسی های ساده جهت تشخیص زودهنگام و پیش آگهی بیماران مطرح شده، می توان به برخی بیومارکرها اشاره داشت که در ایجاد سرطان، شدت و پاسخ به درمان نقش اساسی و متفاوتی ایفاء می کنند. از جمله این شاخص های اثرگذار MMPها هستند که در تومورهای انواع بافت ها

اندازه گیری شده اند (۲۶). تحقیقات نشان داده اند تاثیر پذیری MMP-2 به تمرینات ورزشی محتمل است. در همین راستا برخی تحقیقات کاهش MMP-2 به دنبال فعالیت ورزشی را گزارش کرده اند. همخوان با یافته های تحقیق حاضر، صیدانلو و فرزادنگی نتیجه گرفتند که فعالیت بدنی منظم (تمرین پیلاتس به مدت هشت هفته، هر هفته سه جلسه و هر جلسه ۶۰ دقیقه) در زنان دارای اضافه وزن میزان ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ را به طور معنی داری کاهش می دهد. نتایج آنها نشان داد تمرینات پیلاتس تاثیر مثبتی بر ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ در زنان دارای اضافه وزن داشت (۱۴). همچنین پوسا و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه ای نشان دادند که شش هفته فعالیت بدنی اختیاری سطح سرمی MMP-2 در موش های صحرایی نر را کاهش می دهد (۱۵).

تغییرات به وجود آمده در میزان سرم MMPs ناشی از تغییرات به وجود آمده MMPs در بافت ها است. TIMPs و 2 ماکروگلوبولین و TSP-1 مهمترین بازدارنده های MMPs هستند (۲۷). رولمن و همکاران نشان دادند که میزان mRNA MMPs بلافاصله بعد از ورزش افزایش یافت آنها بیان کردند که ممکن است این

فاکتورها باعث کاهش MMP-2 در پاسخ به ورزش باشند (۲۲). ۲ ماکروگلوبولین بزرگترین آنتی پروتئاز سرمی است که توسط ماکروفازها و فیبروبلاست های کبدی ساخته شده و تقریباً روی تمام پروتئینازها، بدون توجه به طبقه آن ها، تأثیر می گذارد. ۲ ماکروگلوبولین فقط به MMPs فعال متصل می شود (۲۸). فرگوسن و همکاران افزایش در سطوح ۲ ماکروگلوبولین را متعاقب یک وهله فعالیت ورزشی مشاهده کردند (۲۹). همچنین TSP-1 از طریق اتصال به زیموژن های MMP-2 مانع از فعال شدن MMP-2 می شود. بنابراین TSP-1 باعث کاهش سطح فعالیت MMP-2 می شود. تحقیقات نشان داده اند که میزان TSP-1 در پاسخ به فعالیت بدنی افزایش می یابد (۳۰). از طرفی دیگر گیرنده های گلیکوپروتئینی بنام اینتگرین، عامل اتصال لیگاندهای ماتریکس خارج سلولی و ساختار های ستیواسکلتال هستند. تحقیقات نشان داده است MMPs توانایی اتصال به این نوع گیرنده ها را دارد؛ در نتیجه اتصال MMP-2 به گیرنده های اینتگرینی نیز می تواند یکی از عوامل کاهش MMP-2 باشد (۳۱).

مطالعات محدودی نیز عدم تغییر یا افزایش این متغیر را نشان داده اند از جمله مکی و همکاران که گزارش کردند ده کیلومتر دویدن در جاده و داخل آب تاثیری بر MMP-2 مردان جوان نداشت (۳۲). همچنین نظری و همکاران نیز مشاهده کردند که فعالیت تناوبی شدید تاثیر معنی داری بر میزان MMP-2 سرمی در دختران جوان غیر فعال ندارد (۳۳). دانزینگ و همکاران نیز نشان دادند که میزان MMP-2 در پاسخ به ورزش تغییری نمی کند (۳۴). علت اختلاف نتایج این تحقیق با مطالعه دانزینگ می تواند مربوط به شدت و مدت فعالیت باشد. هر زیرا آنها از پروتکل وامانده ساز فزاینده کوتاه مدت (کمتر از ۲۰ دقیقه) استفاده کرده بودند و عدم تغییر MMP-2 را گزارش کردند. در حالی که در تحقیق حاضر از تمرین استقامتی استفاده شد. امیرساسان و همکاران در پاسخ به

یک جلسه فعالیت هوازی درمانده ساز (پروتکل بروس) در افراد تمرین کرده و افراد بدون تحرک، افزایش معنی دار سطوح MMP-2 را گزارش کردند (۱۳). اختلاف پژوهش امیرساسان با پژوهش حاضر در پروتکل تمرینی می باشد. آزمون بروس، دارای شش مرحله سه دقیقه ای می باشد که در هر مرحله علاوه بر سرعت، درصد شیب نیز افزایش می یابد و این روند تا رسیدن فرد به واماندگی ادامه دارد. بنابراین دلیل این اختلاف ممکن است به علل شدت بیشتر آسیب به خصوص آسیب بیشتر میوفیبریل های عضلات درگیر در فعالیت به هنگام دویدن در شیب باشد که می تواند موجب تغییرات بیشتر در سطوح سرمی MMPs در پژوهش امیرساسان و همکاران شده باشد، در حالی که در پژوهش حاضر تمرینات هوازی با شدت متوسط اجرا شد. هم چنین در پژوهش سوهر و همکاران نیز پس از رکاب زنی به شکل تناوبی و با شدت بالا ۱۰ تناوب سه دقیقه ای رکاب زنی با شدت ۸۵ درصد افزایش معنی داری در سطوح سرمی MMP-2 گزارش شد (۳۵). نتایج پژوهش سوهر نیز با پژوهش حاضر متناقض است و به نظر می رسد تداوم تکرارها و تناوب زیاد نیز در این زمینه تاثیرگذار بوده و موجب اختلاف در نتایج شده است. با توجه به روش های به کار گرفته شده در این مطالعات مانند نوع تمرین، آزمودنی ها و همچنین روش نمونه گیری (بیوپسی عضلانی) با پژوهش حاضر اختلاف چشم گیری دارد. بر همین اساس تفاوت در نتایج قابل تصور است.

از طرفی، با وجود تعداد تحقیقات زیادی (۳۸-۳۶) که در مورد پیدا کردن مارکرهایی برای ردیابی وضعیت تومورها منتشر شده به نظر می رسد که هنوز بحث ها و جدالهای محققان بر سر این موضوع ادامه دارد و آن ها هنوز به یک اتفاق واحد در مورد چنین مارکرهایی نرسیده اند و باید به ترکیبی از چند مارکر توجه شود تا حساسیت و ویژگی این موضوع را افزایش دهد (۳۹). نتایج تحقیق حاضر نشان می- دهد تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین مقادیر پروتئین TGF- در بافت تومور شده است. بر

متعاقب تمرین شدید وضعیت اکسیدان/آنتی اکسیدان عضله تغییر می‌کند، با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی TGF-1 احتمالاً یکی از دلایل افزایش TGF-1 متعاقب تمرین حمایت از وضعیت آنتی اکسیدانی باشد. دلیل مهم‌تر دیگر، وقوع هایپوکسی سلولی ناشی از انجام تمرین HIT است. انجام این تمرینات با هایپوکسی شدید در سلول‌های عضلانی همراه است که منجر به افزایش بیان HIF-1 (Hypoxia-induced Factor 1-) می‌شود. این فاکتور در سلولها در پاسخ به هایپوکسی افزایش می‌یابد و اعمال بیولوژیک متعددی را واسطه‌گری می‌کند. تحقیقات پیشین افزایش بیان TGF-1 تحت تأثیر افزایش بیان HIF-1 گزارش کرده‌اند (۴۰) که می‌تواند HIF-1 را به عنوان فاکتوری مؤثر بر تنظیم مثبت بیان TGF-1 بعد از تمرینات شدید مطرح نماید. در حمایت از این احتمال، افزایش در محتوای TGF-1 mRNA بلافاصله بعد از تمرین استقامتی در تحقیقات قبلی گزارش شده است (۴۱). همچنین TGF-1 یک پروتئین چند کاره است که به عنوان یک سایتوکین ضد التهابی نیز عمل می‌کند (۴۲) و با توجه به این که فعالیت ورزشی شدید تخریب تارها و پاسخ های التهابی را به همراه دارد، دلیل دیگر افزایش بیان TGF-1 می‌تواند ناشی از التهاب بافتی عضله متعاقب با تمرین شدید باشد.

مطالعات قبلی ثابت کرده‌اند که تمرین مقاومتی نیز در افزایش سطوح سرمی TGF-1 در بزرگسالان سالم مؤثر است. گراینگر و همکاران نشان دادند که تمرین مقاومتی رونویسی TGF-1 را در عضله اسکلتی بیماران با دیابت نوع ۲ افزایش می‌دهد (۴۳). همچنین طبق مطالعه ی تورا و همکاران ترکیب برنامه ی ورزشی هوازی و قدرتی غلظت TGF-1 را افزایش داد که نشان از اثر شدید ضد التهابی این تمرین دارد (۴۴). در مطالعه حاضر نیز ده هفته تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین مقادیر پروتئین TGF-1 در بافت تومور این گروه نسبت به گروه

اساس بررسی های انجام شده این اولین مطالعه ای است که مقادیر TGF-1 متعاقب تمرین تناوبی و استقامتی در شرایط سرطان سینه را گزارش می نماید. میزان پروتئین TGF-1 متعاقب تمرین تناوبی و استقامتی افزایش معنی داری داشت. این نتایج همراستا با نتایج تحقیقاتی بود که افزایش سطوح TGF-1 بعد از فعالیت حاد و طولانی مدت را گزارش کرده‌اند (۱۱). تحقیقات نشان داده‌اند که الگوی تغییرات بیان TGF-1 در سطح سرمی، بافت و عضله کاملاً متفاوت است که مؤید این نکته است که سطوح سرمی TGF-1 تحت تأثیر بیان این پروتئین در عضله و بافت نیست. به عبارت دیگر عضلات و بافت‌ها سهمی در تعیین سطوح سرمی TGF-1 ندارند و بیان آن در عضله اسکلتی تنها اثرات فیزیولوژیک موضعی در این بافت ایجاد می‌نماید. منبع احتمالی افزایش سطوح سرمی TGF-1 سلول‌های صاف دیواره عروق و هم چنین سلول‌های تک هسته ای خون گزارش شده است. همچنین در تحقیقات پیشین افزایش بیان TGF-1 در بافت‌های مختلف متعاقب تمرین حاد گزارش گردیده است (۳۷). عامل دیگر افزایش سطوح لاکتات خون و عضلات است که جزء لاینفک تمرینات تناوبی شدید است. اثرات مثبت لاکتات در افزایش بیان TGF-1 در مایع مغزی نخاعی در تحقیقات پیشین گزارش شده است (۳۸). با افزایش سطوح لاکتات خون و عضلات در حین تمرینات HIT، این سوبسترا می‌تواند به راحتی از سد خونی مغزی عبور و سبب افزایش لاکتات درون مغز شود و موجبات افزایش بیان TGF-1 را فراهم آورد که نتیجه نهایی این فرایند افزایش بیان TGF-1 در خون و بافت خواهد بود.

دلیل افزایش TGF-1 نامشخص است لیکن استرس اکسیداتیو و هایپوکسی ناشی از تمرین دو مکانیسم احتمالی هستند (۱۷). مطالعات نشان دادند با افزایش بیان NADPH اکسیداز و کاهش بیان سوپراکسیددیسموتاز، بیان TGF-1 در عضله قلبی و کلیه افزایش می‌یابد (۳۹). به دلیل اینکه

افزایش در بیان Smad-3 / TGF- در اثر انجام تمرین استقامتی می تواند اثر مهاری این مسیر را افزایش داده و از تمایز سلولی و رشد سلولی تومور جلوگیری نماید. متأسفانه روش تحقیق حاضر به گونه ای نیست که بتوان راجع به این عامل اظهار نظر قطعی کرد و انجام تحقیقات دیگر با کنترل همزمان این چند فاکتور به محققان بعدی پیشنهاد می شود. همچنین افزایش مشاهده شده در بیان TGF- و Smad-3 در تحقیق حاضر به دنبال اعمال تمرین استقامتی هوازی، با در نظر گرفتن نقش این فاکتور ها در منع تمایز سلولی و مهار رشد سلول های تومور از اهمیت خاصی برخوردار است. سلول ها و بافتها در بدن تابع شرایط محیطی خود هستند و لذا به نظر می رسد که با انجام تمرین استقامتی هوازی، سلولهای عضله در پاسخ به حجم تمرین دریافتی و در جهت تطابق با تمرین اعمال شده با افزایش بیان و میزان پروتئین به تمرین پاسخگو باشند.

نتیجه گیری

با توجه به یافته های تحقیق حاضر مشخص شد که تمرین استقامتی هوازی موجب کاهش معنادار میانگین بیان MMP-2 همچنین افزایش معنادار میانگین مقادیر پروتئین TGF- و Smad-3 در بافت می شود. با این وجود، با توجه به مطالعات اندک انجام شده در این رابطه، تحقیق روی ارتباط بین فعالیت ورزشی، سرطان پستان و بیان فاکتورهای التهابی به وضوح نیاز به توضیح بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری تربیت بدنی، گرایش فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد تهران مرکز می باشد. بدینوسیله از استاد راهنما و اساتید مشاور که بنده را در انجام این پژوهش یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

کنترل شده است. با این وجود برخی تحقیقات کاهش سطوح سرمی TGF- بر اثر تمرین را گزارش کرده اند؛ به طوری که خدیوی بروجنی و همکاران سطوح سرمی TGF- بر اثر تمرین را گزارش کرده اند (۱۰). هر چند این کاهش به شکل معنی داری نبود، اما شاید دلیل کاهش آن، نوع تمرین باشد. چون تمرین ها از نوع محرک هیپرتروفی بود، اما TGF- مخالف آن عمل می کند و آتروفی را تحریک می کند در نتیجه سطح سرمی آن کاهش یافته است. همچنین در تحقیقی نیز نشان داده شده است که ۸ هفته تمرین شنا منجر به تغییری در سطوح TGF- در رت های سالم نشد (۴۵). پروتکل تمرینی در تحقیق فوق، با در نظر گرفتن القا شرایط دیابت، به مدت ۵ دقیقه شنا در هفته اول شروع و تا ۳۰ دقیقه در هفته سوم افزایش یافت، سپس به مدت ۸ هفته ادامه یافت. به نظر میرسد که برنامه تمرینی فوق سبب القا سازگاریهای کافی و در نتیجه تغییر در شاخصهای فوق در بافت قلبی موشهای سالم نشد که این موضوع احتمالاً به کافی نبودن شدت و همچنین مدت تمرین و یا تنظیم نرمال این شاخصها در بافت قلبی رت های سالم در مقایسه با رت های دیابتی مربوط شود.

علاوه بر این، نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد تمرین استقامتی هوازی موجب افزایش معنادار میانگین بیان Smad-3 در بافت تومور در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل شده است. تحقیقات نشان داده اند که مسیر سیگنالینگ TGF- با تحریکات Smad2 و Smad3 آغاز می شود و در نهایت تحت تاثیر Smad4 توسط گیرنده های سرین - ترئونین کیناز متصل به غشای سلولی فسفریله و فعال می شود (۴۶). این پروتئین به صورت ترکیبات همسان یا غیر همسان با دیگر اعضای خانواده Smad وارد هسته شده و فرایند منع تمایز سلولی و مهار رشد سلولی را انجام می دهند (۴۷). هدف عمده Smad-3 / TGF- منع فرایند تکثیر و رشد سلولی است (۴۸). لذا

Reference

1. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9: 208-21.
2. Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, Sawicka J, Miranda C, Mayers I, et al. Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: regulation by nitric oxide. *Cancer Res* 2001; 61:376- 82.
3. Koskinen SO, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikkala V, Mäkinen TT, Oksa J, et al. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running". *Scand J Med Sci Sports*. 2001; 11:9-15.
4. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-29.
5. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- family signalling. *Nature*. 2003; 425:577-584.
6. Santos AR, Neves MT Jr, Gualano B, Laurentino GC, Lancha AH Jr, Ugrinowitsch C, Lima FR, Aoki MS. Blood flow restricted resistance training attenuates myostatin gene expression in a patient with inclusion body myositis. *Biol Sport*. 2014; 31:121-4.
7. Donley DA, Fournier SB, Reger BL, DeVallance E, Bonner DE, Olfert IM, Frisbee JC, Chantler PD. Aerobic exercise training reduces arterial stiffness in metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 2014; 116: 1396-404.
8. Leite RD, Durigan Rde C, de Souza Lino AD, de Souza Campos MV, Souza Md, Selistrede Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism* 2013; 62: 1477-84.
9. Sajadian S, Nikooie R. TGF- 1 protein Expression in the Skeletal Muscle Following High Interval Training and its Relationship with Intramuscular Triglycerides Oxidation. *Journal of Sport in Biomotor Sciences* 2015; 6: 45-54.
10. Khadivi Borujeny Alireza, Mohammad Marandi, Shaghayegh Haghjooy Javanmard, Hamid Rajabi, Zahra Khadivi Burojeny, Mahdi Khorshidi Behzadi. Effect of Eight Weeks of Resistance Training on Some Signaling Factors Affecting on the Satellite Cells in Wistar Rats. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; 30:1-8.
11. Czarkow Paczek B, Bartłomiejczyk I, Przybylski J. The serum levels of growth factors: POGF, TGF-BETA and VEGF are increased after strenuous physical exercise. *Journal Physiology and Pharmacology*. 2006; 57:189-197.
12. Souza Markus VC, Richard DL, Lino Anderson DS, Rita V, Celene FB, Heloisa S, et al. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *CLINICS* 2014; 69:265-270
13. Amirsasan R, Mirshafiei A, Gaeini AA, Ravaasi AA, Letafatkar A, Saadat F, et al. Effects of Exhaustive Aerobic Exercise on Matrix Metaloproteases. Activity in Athletes and Non-Athletes *World Journal of Sport Sciences* 2011; 4: 185-191.
14. Seidanloo F, Farzanegi P. Changes in Matrix Metallo-proteinases 2, 9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 to Synchronized Exercise Training and Celery, as an Herbal Supplement, in Overweight Women. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2016); 1: 107-118.
15. Pósa A, Renáta S, Krisztina K, Zoltán B, Zita S, Anett C, et al. Cardioprotective Effects of Voluntary Exercise in a Rat Model: Role of Matrix Metalloproteinase-2. 2015; 876805- 9.

16. Montaruli A, Patrini P, Roveda E, Carandente F. Physical activity and breast cancer. *Sport Sci Health* 2012; 8:1-13.
17. Lee IM. Physical activity and cancer prevention-data from epidemiologic studies. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003; 35: 1823-7.
18. Alaei H, Moloudi R, Sarkaki AR. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodyw Mov Ther.* 2008; 12:72-5.
19. Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer research* 2001; 61: 293-302.
20. 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. *J Appl Physiol* 2010; 108: 343-8.
21. Kambiz Hassanzadeh, Mehrnoush Nikzaban, Mohammad Raman Moloudi, Esmael Izadpanah. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Jun; 18: 549-554.
22. Rahimmi A, Khosrobakhsh F, Izadpanah E, Moloudi MR, Hassanzadeh K. N-acetylcysteine prevents rotenone-induced Parkinson's disease in rat: An investigation into the interaction of parkin and Drp1 proteins. *Brain Res Bull.* 2015; 113:34-40.
23. Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clin Biochem* 2001; 34:347-52.
24. Kacha AK, Fallarino F, Markiewicz MA, Gajewski TF. Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165:6024-8.
25. Banfi G, Dolci A, Verna R, Corsi MM. Exercise raises serum heatshock protein 70 (Hsp70) levels. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:1445-6.
26. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-78.
27. Marsha A. Moses, the Regulation of Revascularization by Matrix Metalloproteinase and Their Inhibitors. *Stem Cells* 15 (1997) 180-189.
28. Borth. W, Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 1992; 6: 3345-3353.
29. Ferguson EW, Bernier LI, Banta GR, Effect of exercise and conditioning on clotting and fibrinolytic activity in men. *J Appl Physiol* 1987; 14:116-1421.
30. Olfert IM, Breen EC, Gavin TP. Temporal mRNA thrombospondin-1 response in skeletal muscle exposed to acute and chronic exercise. *Growth Factors* 2006; 24:253-259.
31. Steve S, Kessler T, Joel G, Dale LB, David AC. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha 3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *PNAS* 2001; 6: 119-124.
32. Mackey AL, Donnelly AE, Swanton A, Murray F, Turpeenniemi-Hujanen T. The effects of impact and non-impact exercise on circulating markers of collagen remodelling in humans. *Sports Sci* 2006; 24: 843-8.
33. Nazari M, Kordi M R, Choobineh S. The Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) on Gelatinase-A (MMP-2) Serum Levels and Muscle Damage Indices in Young Sedentary Girls. *Arak University of Medical Sciences Journal.* 2015; 18:78-86
34. Danzig V, Blanka M, Petr K, Levels of circulating biomarkers at Rest and after exercise in coronary artery disease patients. *Physiological research*, 2010; 15:1374-1379.

35. Suhr F, Brixius K, de Marées M, Bölck B, Kleinöder H, Achtzehn S, et al. Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *Journal of applied physiology*. 2007; 103:474-83.
36. Lumachi F, Brandes AA, Boccagni P, Polistina F, Favia G, D'Amico DF. Long-term follow-up study in breast cancer patients using serum tumor markers CEA and CA 15-3. *Anticancer Res* 1999; 19:4485-90.
37. Kimsa M, Strzalka-Mrozik B, Kimsa M, Gola J, Kochanska-Dziurawicz A, Zebrowska A, et al. Expression pattern of the transforming growth factor signaling genes in human peripheral blood mononuclear cells after exercise-inflammatory aspects. *American Journal of Human Biology* 2012; 24:859-862.
38. Yamada H, Iwaki Y, Kitaoka R, Fujitani M, Shibakusa T, Fujikawa T. Blood Lactate Functions as a Signal for Enhancing Fatty Acid Metabolism during Exercise via TGF- β in the Brain. *J Nutr Sci Vitaminol* 2012; 58: 88-95.
39. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. *Am J Nephrol* 2008; 28: 548-554
40. George DJ, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor and kidney cancer. *J Med* 2003; 349: 419-4.
41. Czarkowska B, Zendzian M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor- β 1 generation in rat skeletal and heart muscle. *J physiol pharmacol* 2007; 60:157-62.
42. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, et al. Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 25766-73.
43. Grainger DJ. Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 399-404.
44. Touvra AM, Volaklis KA, Spassis AT, Zois CE, Douda HD, Kotsa K, et al. Combined strength and aerobic training increases transforming growth factor- β 1 in patients with type 2 diabetes. *Hormones (Athens)* 2011; 10: 125-30.
45. Habibian M, Khosravi M. The Effect of 8 weeks regular swimming exercise on the cardiac levels of matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor- β 1 in diabetic rats. *ijdd*. 2016; 15 :67-74
46. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369.
47. Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:225-229
48. Braga M, Bhasin S, Jasuja R, Pervin S, Singh R. Testosterone inhibits transforming growth factor- β signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: Potential role of follistatin in mediating testosterone action. *Mol Cell Endocrinol* March, 2012; 350: 39-52.