فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۲ ، شماره ۴۷ ،زمستان ۱۳۹۹ .صص ۱۰۴-۸۳

مقالهٔ پژوهشی

اثر تمرین تناوبی شدید و عصارهٔ زعفران بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با کاشکسی در عضلهٔ اسکلتی موش‌های مادهٔ حامل ردهٔ سلولی سرطان پستان

زینب نظام‌دوست[۱]، مرضیه ثاقب‌جو[۲]، ریحانه هوشیار[۳]، مهدی هدایتی[۴]، صابر صادقی طبس[۵]

۱. دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران (نویسندهٔ مسئول)
۳. دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران و دانشیار بیوشیمی، گروه میکروبیولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشگاه ایالتی میشیگان، آمریکا
۴. استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکدهٔ علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

مطالعات نشان می‌دهند که تمرین ورزشی و ترکیبات فعال زیستی زعفران می‌توانند باعث کاهش آپوپتوز و کاشکسی ناشی از سرطان شوند. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر چهار هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و مصرف عصارهٔ آبی زعفران (SAE) بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با کاشکسی (SIRT1، hTERT و p53) در عضلهٔ دوقلوی موش‌های حامل ردهٔ سلولی 4T1 سرطان پستان انجام شد؛ براین‌اساس، ۴۴ سر موش BALB/c ماده به‌طور تصادفی در گروه‌های تمرین تناوبی شدید (HIIT)، عصارهٔ آبی زعفران (SAE)، تمرین تناوبی شدید + عصارهٔ آبی زعفران (HIIT+SAE)، کنترل و شم قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسهٔ مداخله، عضلهٔ دوقلو با روش جراحی برای آنالیزهای بعدی برداشته شد. نتایج نشان داد بیان ژن SIRT1 در گروه HIIT به‌طور معناداری از گروه کنترل و HIIT+SAE بالاتر بود (به‌ترتیب P = 0.03 و P = 0.02). همچنین بیان ژن hTERT در گروه HIIT به‌طور معناداری از سایر گروه‌های مطالعه‌شده بالاتر بود (P < 0.05) و در گروه SAE به‌طور معناداری از گروه HIIT+SAE بالاتر بود (P = 0.01). علاوه‌براین،

1. Email: nezamdoost2004@yahoo.com
2. Email: m_saghebjoo@birjand.ac.ir
3. Email: reyhaneh.houshyar@gmail.com
4. Email: hedayati47@gmail.com
5. Email: saberst1993@gmail.com

بیان ژن p53 در گروه‌های HIIT و HIIT+SAE به‌طور معناداری از گروه SAE پایین‌تر بود (به‌ترتیب P = 0.003 و P = 0.004). براساس نتایج، به‌نظر می‌رسد HIIT احتمالاً نقش مثبتی در کاهش اثرات کاشکسی ناشی از سرطان با تنظیم بیان بالاتر ژن‌های SIRT1 و hTERT و بیان پایین‌تر ژن p53 دارد و می‌تواند در کاهش تحلیل عضلات ناشی از سرطان مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی شدید، عصاره آبی زعفران، سرطان پستان، کاشکسی، آپوپتوز.

مقدمه

سرطان با عوارض جانبی درخور توجهی مانند ازدست‌دادن تودۀ عضلانی همراه است که کاشکسی[1] نامیده می‌شود (۱). کاشکسی عضلانی نتیجۀ واکنش‌های بدن فرد سرطانی است که با افزایش آتروفی عضلات و تخریب عضلات اسکلتی، اختلال در میوژنز[2] و درنهایت مرگ همراه است. روند تحلیل عضلانی ناشی از سرطان از مسیرهای متعددی اتفاق می‌افتد و پیشنهاد شده است تغییر در بیان برخی ژن‌ها در این سازوکار دخیل است (۲).

سیرتوئین-یک (SIRT1)، یک هیستون داستیلاز[3] است که یک ژن مهم در تنظیم بازسازی عضلات اسکلتی شناخته شده است (۳). بیان SIRT1 در عضلات اسکلتی با افزایش بیان ژن زنجیرۀ سنگین میوزین[4] (MHC)، مهار بیان برخی ژن‌های مرتبط با آپوپتوز[5] مانند فاکتور رونویسی سرچنگالی[6] (FOXO1) و p53 و فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های رونویسی مربوط به طول عمر سلول، یک سازوکار برای جلوگیری از هدررفتن عضلات ایجاد می‌کند (۴). برخی از مسیرهای القاء بیان ژن SIRT1، می‌تواند موجب حفظ توده عضلانی شود (۵). گزارش شده است که بیان ژن SIRT1 با تغییرات رژیم غذایی و تمرین‌های ورزشی افزایش می‌یابد. این فرایند یک سازوکار محافظتی در برابر استرس تغذیه-ای یا اعمال بار اضافی به عضله است و احتمالاً بر حفظ توده عضلانی مؤثر است (۶). در این زمینه گارد[7] و همکاران (۷) بیان کرده‌اند که شش هفته تمرین تناوبی شدید[8] (HIIT) در موش‌های پیر، با افزایش محتوای پروتئین SIRT1 و برخی آنزیم‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی در عضلۀ اسکلتی، به حفظ تودۀ عضلانی و پیشگیری از پیری عضلانی منجر می‌شود.

1. Cachexia
2. Myogenesis
3. Histone Deacetylase
4. Myosin Heavy Chain
5. Apoptosis
6. Forkhead Box Protein O1
7. Gurd
8. High-Intensity Interval Training

تلومراز ترانس کریپتاز معکوس انسانی (hTERT)، زیرواحد فعال آنزیم تلومراز، ژن دیگری است که باعث مقاومت سلول در برابر آپوپتوز می‌شود (۸) و پیشنهاد شده است که سنجش بیان ژن hTERT می‌تواند یک روش جایگزین برای اندازه‌گیری فعالیت تلومراز باشد (۹). ازآنجاکه فعالیت تلومراز نقش مهمی در مهار آپوپتوز سلول‌ها دارد، می‌تواند موجب کاهش تنظیم بیان hTERT شود (۱۰). در این زمینه کودری-مائوروکس[1] و همکاران (۱۱) نشان دادند که بیان تلومراز در بیماران مبتلا به دیستروفی عضلانی می‌تواند تحلیل عضلانی ناشی از این بیماری را مهار کند. تمرین‌های ورزشی می‌توانند با تأثیر بر مسیرهای مولکولی متعدد موجب حفظ و نگهداری طول تلومر و افزایش بیان hTERT در عضلهٔ اسکلتی شوند (۱۲). لیو[2] و همکاران (۱۲) بیان کردند هشت هفته HIIT با حداکثر اکسیژن مصرفی (VO2max) موجب افزایش بیان mTERT و به‌دنبال آن افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدانی میتوکندری در سلول عضلانی موش‌های پیر می‌شود و می‌تواند از فرایند پیری عضلانی پیشگیری کند.

ژن سرکوبگر تومور p53 نیز به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ رونویسی شناخته شده است و بسیاری از سازوکارهای مرتبط با پایداری هومئوستاز سلولی، آپوپتوز و اتوفاژی[3] سلولی را کنترل می‌کند (۱۳). علاوه‌براین، p53 می‌تواند با بیان برخی از ژن‌ها مسیرهای تحلیل عضله را تنظیم کند. ماریموتو[4] و همکاران (۱۴) نشان دادند که p53 با تنظیم منفی رونویسی Mdm2/Akt به تجمع p53 منجر می‌شود و با القای آپوپتوز موجب تحلیل تودهٔ عضلانی می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که تمرین‌های ورزشی با کاهش بیان ژن p53 و متعاقب آن کاهش رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری، موجب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن[5] (ROS) در عضلهٔ اسکلتی می‌شوند و درنهایت از تخریب عضلات پیشگیری می‌کنند (۱۶، ۱۵). در این راستا کیو[6] و همکاران (۱۵) بیان کردند هشت هفته تمرین هوازی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو موجب سرکوب بیان ژن p53 و کاهش استرس اکسایشی در میتوکندری سلول عضلانی موش‌ها می‌شود؛ بااین‌حال، سازوکارهای مولکولی بیان ژن p53 در سلول عضلانی موش‌های سرطانی هنوز مشخص نشده است.

ازآنجاکه کاشکسی یک سندرم چندعاملی است، درمان آن نیز باید چندوجهی باشد که می‌تواند شامل برنامه‌های غذایی، درمان‌های دارویی و تمرین‌های ورزشی شود (۱۸، ۱۷). امروزه اهمیت تمرین‌های ورزشی در پیشگیری و کاهش عوارض جانبی سرطان اثبات شده است و مطالعات اخیر بر تعیین اثر تمرین‌های ورزشی با حجم، شدت و دوره‌های متفاوت بر رشد تومور، متاستاز و کاشکسی عضلانی

1. Cudré-Mauroux
2. Liu
3. Autophagy
4. Morimoto
5. Reactive Oxygen Species
6. Qi

ناشی از سرطان متمرکز شده‌اند (۱۷). حفظ تودۀ عضلانی یک راهبرد مهم برای بیماران سرطانی است (۱۹) و تمرین‌های ورزشی به‌عنوان یک روش غیردارویی برای کاهش تحلیل تودۀ عضلانی و مهار کاتابولیسم پروتئین در سلول‌های عضلانی بیماران سرطانی مطرح است (۲۰). از طرفی شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهند بیماران سرطانی می‌توانند HIIT را به‌طور کاملاً مطمئن انجام دهند (۲۱). با توجه به اهمیت تأثیر شدت تمرین‌های ورزشی بر ریزمحیط توموری در بیماران مبتلا به سرطان، برخی مطالعات بیان کرده‌اند که HIIT با تأثیر بیشتر بر سازوکارهای اینتراتوموری می‌تواند به کندشدن رشد تومور یا القای مؤثرتر مسیرهای آپوپتوزی در بافت تومور موش‌های حامل سرطان پستان منجر شوند (۲۳، ۲۲). در همین راستا نتایج پژوهش احمدآبادی و همکاران (۲۲) نشان داد که چهار هفته تمرین HIIT با کاهش سطح برخی پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های عضلانی، در پیشگیری از کاشکسی عضله مؤثر است. علاوه‌براین چهار هفته HIIT با افزایش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور مانند p53 در بافت تومور، می‌تواند موجب کاهش سرعت رشد تومور در موش‌های حامل سرطان پستان شود (۲۳). همچنین بیان شده است که HIIT احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن‌های مرتبط با آتروفی نظیر MURF-1 و افزایش بیان ژن Myod می‌تواند در کنترل گلوکز خون و مهار آتروفی عضلانی در بیماران درگیرکاشکسی مؤثر باشد (۱۸). علاوه‌بر تأثیر تمرین‌های ورزشی و تغییر سبک زندگی، برخی مطالعات نشان داده‌اند که برخی گیاهان دارویی در مهار رشد تومور، تنظیم مثبت ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در بافت تومور و پیشگیری از کاشکسی عضلات در موش‌های حامل تومور، اثرات درمانی بالقوه‌ای دارند (۲۵، ۲۴). افزایش استرس اکسیداتیو، افزایش سطح ROS و تغییر بیان ژن‌های درگیر در کاشکسی ازجمله مهم‌ترین دلایل کاهش تودۀ عضلانی در افراد مبتلا به سرطان هستند (۲۶). با توجه به اینکه برخی از گیاهان دارویی اثرات آنتی‌اکسیدانی دارند، استفاده از این گیاهان برای کاهش سطح ROS و تغییر بیان ژن‌های درگیر در کاشکسی عضله در بیماران مبتلا به سرطان توصیه شده است (۲۶). زعفران (Crocus sativus L) به‌دلیل داشتن خواص ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی یک گیاه پیشگیری‌کننده از سرطان شناخته شده است (۲۷). کاروتنوئیدهای این گیاه مانند کروسین و کروستین می‌توانند تکثیر سلولی را مهار کنند و آپوپتوز را در سلول تومور فعال کنند؛ درحالی‌که در سلول‌های سالم این عوامل را کاهش می‌دهند (۲۸). اگرچه تأثیر زعفران بر سلول‌های توموری بررسی شده است (۲۸)، اثر آن بر بیان ژن‌های مرتبط با کاشکسی در سلول‌های عضلانی در شرایط ابتلا به سرطان همچنان مبهم است؛ بنابراین در مطالعۀ حاضر تأثیر HIIT و مکمل‌دهی عصارۀ آبی زعفران بر بیان ژن‌های SIRT1، hTERT و p53 در بافت عضلانی موش‌های حامل تومور سرطان پستان بررسی شده است.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی است و روی ۴۴ سر موش بالب‌سی (BALB/c) (میانگین وزنی ۱/۷۶ ± ۱۶/۱ گرم و سن چهار هفته) انجام شد که از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران (کرج) تهیه شدند. موش‌های مطالعه‌شده داخل قفس‌های پلی‌کربنات شفاف (هر چهارسر موش در یک قفس، در محیطی با رطوبت نسبی ۲ ± ۲۵ درصد، دمای ۲ ± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و سیکل شبانه‌روزی ۱۲:۱۲ ساعت) در آزمایشگاه علوم دامی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه بیرجند نگهداری شدند و پس از فرایند القای سرطان، به‌طور تصادفی در گروه‌های HIIT (تعداد = ۱۰)، SAE (تعداد = ۱۰)، HIIT + SAE (تعداد = ۱۰)، کنترل (تعداد = ۱۰) و شم (تعداد = ۴) قرار گرفتند. موش‌ها با غذای استاندارد جوندگان تولیدی شرکت جوانهٔ خراسان به‌صورت پلت تغذیه شدند. دسترسی حیوانات به آب و غذا در طول دورهٔ مطالعه آزاد بود و تمام اعمال انجام‌شده روی حیوانات طبق راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی اجرا شد. کد اخلاق (Ir.SSRC.REC.1398.067) نیز از کمیتهٔ اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی پژوهشگاه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی (تهران، ایران) دریافت شد. لازم است ذکر شود که در طول پژوهش از گروه HIIT یک‌سر، از گروه SAE دوسر، از گروه HIIT + SAE دوسر و از گروه کنترل سه‌سر موش تلف شدند و درنهایت تعداد موش‌ها تا پایان مطالعه به ۳۶ سر رسید.

برای ایجاد تومور از ردهٔ سلولی موشی 4T1 (سلول‌های اپی‌تلیالی چسبنده هستند و از تومور ایجادشده در موش BALB/c مشتق شده‌اند)، تهیه‌شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران) استفاده شد. پس از مقیدکردن موش، یک میلیون سلول به‌صورت زیرپوستی به پهلوی سمت چپ هر موش تزریق شد. تومور حدود یک هفته پس از تزریق در حیوانات لمس‌شدنی بود. در گروه کنترل هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد و به گروه شم نیز بافر فسفات نمکی[1] (PBS) تزریق شد. حجم تومور در پایان مداخله با اندازه‌گیری طول (بزرگ‌ترین بعد) و عرض (با ۹۰ درجه زاویه نسبت به طول) تومور توسط کولیس دیجیتال (شرکت لومبارد[2] کشور لهستان، حساسیت ۰/۰۱ میلی‌متر) با استفاده از فرمول ارائه‌شده توسط جنسن[3] و همکاران (۲۹) به‌صورت زیر محاسبه شد:

$V = 1/2\ (L \times W^2)$، L = طول تومور و W = عرض تومور

یک هفته پس از القای تومور، موش‌ها با چگونگی دویدن روی نوارگردان جوندگان (۱۲ کاناله، ساخت شرکت یارمند سیستم شمال، ایران) به‌مدت سه روز، ۱۰ دقیقه دویدن در روز با سرعت ۱۵-۱۰ متر

1. Phosphate Buffer Saline
2. Lombard
3. Jensen

در دقیقه آشنا شدند. سپس برنامهٔ تمرین به‌مدت چهار هفته، پنج روز در هفته برای گروه‌های تمرین اجرا شد. هر جلسهٔ تمرین به‌مدت ۳۵ دقیقه دویدن روی نوارگردان بود (شیب نوار گردان در تمام مراحل صفر درجه بود) که شامل سه بخش زیر بود که عبارت‌اند از:

۱- گرم‌کردن: به‌مدت پنج دقیقه با شدت ۴۰-۳۰ درصد $VO2_{Peak}$ انجام شد؛

۲- تمرین اصلی: شش تناوب سه‌دقیقه‌ای و ۲۰ ثانیه‌ای با شدت ۹۵-۸۰ درصد $VO2_{Peak}$ که با یک دقیقه برگشت به حالت اولیهٔ فعال با شدت ۳۵-۳۰ درصد $VO2_{Peak}$ از همدیگر جدا شدند؛

۳. سردکردن: به‌مدت پنج دقیقه با شدت ۴۰-۳۰ درصد $VO2_{Peak}$ انجام شد (جدول شمارهٔ یک) (۳۰، ۲۳، ۲۲).

جدول ۱- مؤلفه‌های تمرین تناوبی شدید

Table 1- Components of High-Intensity Interval Training

Cool-down	Training protocol (6-intervals)		Warm-up	مؤلفه‌های تمرین تناوبی شدید Components of high-intensity interval training
	Low-intensity section	High-intensity section		
5	1	3:20	5	زمان (min) Time (min)
30-40	30-35	80-95	30-40	شدت ($\%VO2_{Peak}$) Intensity ($\%VO2_{Peak}$)
13-15	13-14	28-33	13-15	سرعت هفتهٔ اول (m/min) Speed in first week (m/min)
13-15	13-14	23-27	13-15	سرعت هفتهٔ دوم (m/min) Speed in second week (m/min)
13-15	13-14	23-27	13-15	سرعت هفتهٔ سوم (m/min) Speed in third week (m/min)
13-15	13-14	24-28	13-15	سرعت هفتهٔ چهارم (m/min) Speed in fourth week (m/min)

اکسیژن مصرفی اوج با سرعت بیشینه تعیین می‌شود. برای تعیین سرعت بیشینه، موش‌ها پس از پنج دقیقه گرم‌کردن روی نوارگردان، با سرعت هشت متر در دقیقه شروع به دویدن کردند و به ازای هر دو دقیقه، سرعت نوار گردان یک متر در دقیقه افزایش یافت، تا زمانی‌که موش‌ها قادر به دویدن با یک سرعت ثابت نبودند. این سرعت معادل با سرعت بیشینه و VO2peak درنظر گرفته شد (۳۱). لازم است ذکر شود که سرعت بیشینه (VO2peak) در ابتدای هر هفته از پروتکل چهارهفته‌ای اندازه‌گیری شد که در هفتهٔ اول ۳۵ متر در دقیقه، در هفته‌های دوم و سوم ۲۹ متر در دقیقه و در هفتهٔ چهارم ۳۰ متر در دقیقه به‌دست آمد.

برای تهیهٔ عصاره، کلالهٔ خشک زعفران خوراکی (Crocus Sativus L.) معروف به زعفران پوشالی (قائنات، استان خراسان جنوبی، ایران) خریداری شد و پس از پودرکردن برای عصاره‌گیری استفاده شد. برای تهیهٔ عصاره، ۳۰ گرم از پودر کلالهٔ خشک‌شده با ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و به‌مدت دو ساعت جوشانده شد. سپس مخلوط به‌وسیلهٔ کاغذ واتمن[1] شمارهٔ یک فیلتر شد و در دمای نزدیک به ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت حرارت داده شد و خشک شد (۲۸). برای تهیهٔ محلول روزانه، میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش از پودر آماده‌سازی‌شدهٔ زعفران در دو میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سه روز در هفته به‌مدت چهار هفته به موش‌ها گاواژ شد. ذکر این نکته ضروری است که میزان دوز مصرفی زعفران در این مطالعه، براساس مطالعهٔ داروشناسی انتخاب شد که پیش‌تر دربارهٔ این گیاه انجام شده بود (۳۲). براساس گزارش‌ها، زعفران در دوزهای متفاوت از ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مانع پیشرفت سرطان می‌شود (۳۳، ۲۸). گروه‌های کنترل و شم نیز محلول نرمال سالین را سه روز در هفته به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

وزن بدن موش‌ها از ابتدای هفتهٔ اول مداخله تا پایان هفتهٔ چهارم (انتهای مداخله) به‌صورت هفتگی به‌وسیلهٔ ترازوی دیجیتال (شرکت سارتریوس[2] کشور آلمان، حساسیت ۰/۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد.

پس از سپری‌شدن ۴۸ ساعت از آخرین جلسهٔ مداخله (پایان هفتهٔ چهارم) و بعد از ناشتایی شبانه (۱۲ ساعت)، تمامی گروه‌ها با ترکیبی از کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بی‌هوش شدند. سپس با جراحی انجام‌شده روی حیوان در شرایط کاملاً استریل، عضلهٔ دوقلو برداشته شد و نمونه‌های بافتی در ویال‌های RNAlater قرار گرفت و بلافاصله برای فریزکردن ناگهانی، در نیتروژن مایع (با دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد) گذاشته شد. نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی (مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکدهٔ علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان انجام‌دادن سنجش‌های بیوشیمیایی نگهداری شد.

در مرحلهٔ بعد، حدود ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از نمونهٔ بافتی برای استخراج RNA برداشت شد. استخراج RNA با استفاده از کیت BioFACT Total RNA Prep (کرهٔ جنوبی) طبق دستورالعمل ارائه‌شدهٔ کیت صورت گرفت. غلظت و کیفیت RNA تخلیص‌شده با استفاده از نانو دراپ اسپکتروفتومتر[3] ۱۰۰۰ تعیین شد. در مرحلهٔ بعد، سنتز cDNA از RNAهای تخلیص‌شده (۱µg) با کیفیت مناسب با استفاده از کیت BioFACT (کرهٔ جنوبی) و طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت و برای آنالیزهای بعدی در

1. No. 1 Whatman
2. Sartorius
3. Nano Drop Spectrophotometer

دمـای ۲۰- درجـۀ سانـتی‌گراد نگهداری شد. تعیین سطح بیان ژن با روش real-time PCR و به‌وسیلۀ دستگاه روتورژن[1] ۶۰۰۰ (سیدنی، استرالیا) انجام گرفت. برای تعیین بسط PCR از مستر سایبرگرین[2] BioFACT (کرۀ جنوبی) در حجم (µL) ۲۵ استفاده شد. مراحل انجام‌دادن کار به این صورت بود: پروفایل دمایی در مرحلۀ دناتورۀ اولیه ۹۵ درجۀ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه (۹۵ درجۀ سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجۀ سانتی‌گراد ۵۵ ثانیه و ۷۲ درجۀ سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه) انجام شد. تعیین کمیت real-time با اندازه‌گیری فلورسنس انجام شد. پس از به‌دست‌آوردن CT mean (میانگین CT ژن‌های SIRT1، hTERT و p53)، اعداد به‌دست‌آمده وارد برنامۀ نرم‌افزاری رست[3] نسخۀ ۲۰۰۹ شدند. لازم است ذکر شود که از بیان ژن GAPDH به‌عنوان ژن رفرانس درونی استفاده شد (جدول شمارۀ دو).

جدول ۲- فهرست پرایمرهای مورد استفاده برای کمیت real-time PCR

Table 2- Sequencing of the Primers for Quantitative Real-Time PCR Reaction

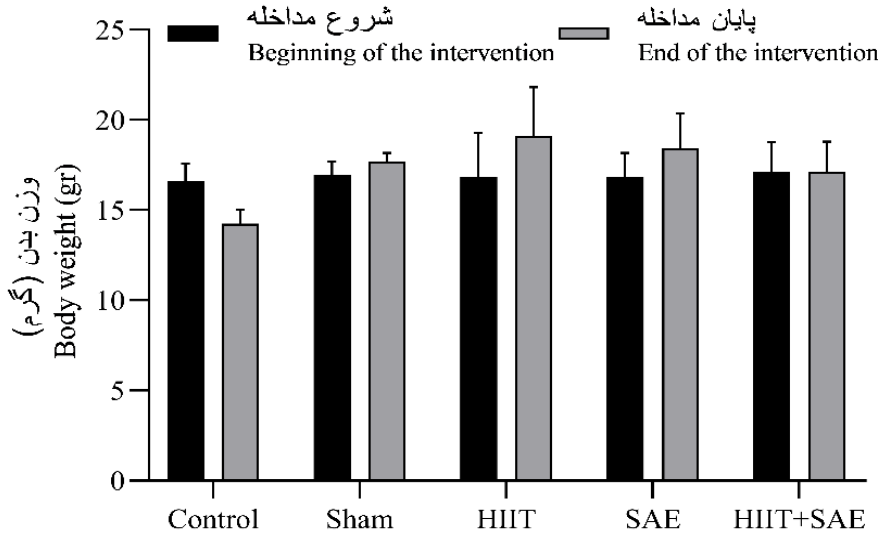
Reverse Sequence (5'← 3')	Forward Sequence (5'→ 3')	نام پرایمر Primer Name
GCCACTGTCACTGTTACTGC	TCCACGGTGCTGAGGTATAC	SIRT1
ACCTCCTCTTGTGACAGCTC	CGTTCCTGTTCTGGCTGATG	hTERT
ATGGTAAGGATAGGTCGGCG	GTACCTTATGAGCCACCCGA	p53

پس از جمع‌آوری داده‌های خام، ابتدا داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه Real time PCR که به‌صورت CT هستند، با استفاده از فرمول ΔΔ-2CT به عدد نهایی تبدیل شدند. در مرحلۀ بعد، طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. از آزمون آنالیز واریانس ترکیبی (mixed ANOVA)، ۵ * ۲ برای آنالیز داده‌های وزن بدن و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای تعیین اختلاف گروه‌ها در مقدار بیان ژن‌های مطالعه‌شده (SIRT1 ، hTERT و p53) و حجم تومور استفاده شد. همچنین از آزمون ضریب همبستگی پیرسون برای یافتن همبستگی احتمالی بیان ژن‌های مطالعه‌شده استفاده شد. تمام محاسبات آماری توسط نرم‌افزار اس.پی.اس.اس.[4] نسخۀ ۲۰ در سطح معناداری $P \leq 0.05$ انجام گرفت. همچنین نمودارها با نرم‌افزار گراف‌پد[5] نسخۀ ۸/۰۱ رسم شدند.

1. Rotor-Gene
2. SYBER Green Master Mix
3. REST
4. SPSS
5. GraphPad

نتایج

براساس نتایج، میانگین وزن بدن موش‌ها در هفتهٔ اول در مقایسه با میانگین وزن در هفته چهارم تفاوت معناداری را در گروه‌های پژوهش نشان نداد ($P > 0.05$)، (شکل شمارهٔ یک)؛ بااین‌حال وزن موش‌ها در گروه‌های HIIT و SAE پس از چهار هفته مداخله در مقایسه با هفتهٔ اول روند افزایشی را نشان داد (به‌ترتیب $P = 0.07$ و $P = 0.09$).



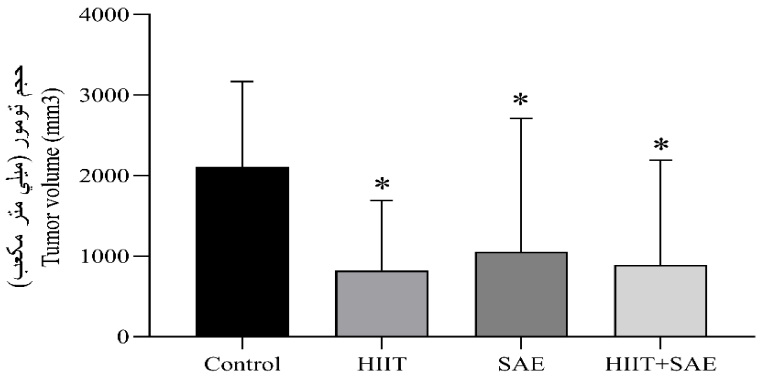
شکل ۱- تغییرات وزن بدن موش‌ها قبل و بعد از مداخله

Fig 1- Body Weight Changes Before and After the Intervention

HIIT: تمرین تناوبی شدید، SAE: عصارهٔ آبی زعفران

HIIT: High-Intensity Interval Training, SAE: Saffron Aqueous Extract

نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور در پایان مداخله نشان داد که در گروه‌های HIIT، SAE و HIIT + SAE، حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کوچک‌تر بود (به‌ترتیب $P = 0.003$، $P = 0.04$ و $P = 0.01$) (شکل شمارهٔ دو).



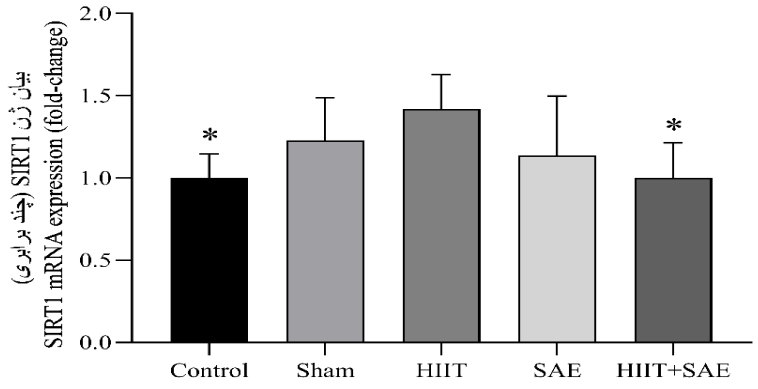
شکل ۱- حجم تومور در در پایان مداخله

Fig 2- Tumor Volume at the End of the Intervention

HIIT: تمرین تناوبی شدید، SAE: عصارهٔ آبی زعفران (*: تفاوت معنادار با گروه کنترل)

HIIT: High-Intensity Interval Training, SAE: Saffron Aqueous Extract (*: Significant Difference with the Control Group)

براساس نتایج، بیان نسبی ژن SIRT1 در گروه HIIT به‌طور معناداری از گروه‌های کنترل و HIIT+SAE بالاتر بود (به‌ترتیب $P = 0.03$ و $P = 0.02$)؛ درحالی‌که بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل شمارهٔ سه).



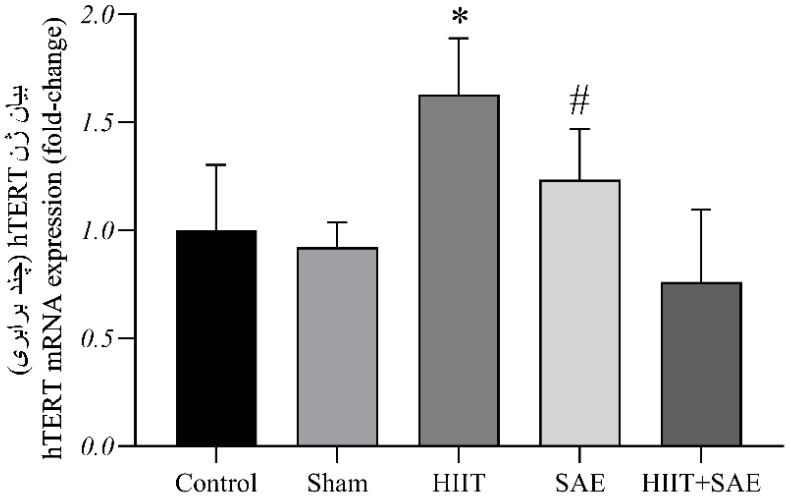
شکل ۳- بیان نسبی ژن SIRT1 در عضلهٔ دوقلوی موش‌ها

Fig 3- The Relative Gene Expression of SIRT1 in the Gastrocnemius Muscle of Mice

HIIT: تمرین تناوبی شدید، SAE: عصارهٔ آبی زعفران (*: تفاوت معنادار با گروه HIIT)

HIIT: High-Intensity Interval Training, SAE: Saffron Aqueous Extract (*: Significant Difference with the HIIT Group)

براساس نتایج، بیان نسبی ژن hTERT در گروه HIIT به‌طور معناداری از سایر گروه‌های مطالعه بالاتر بود ($P < 0.05$). همچنین بیان نسبی ژن hTERT در گروه SAE به‌طور معناداری از گروه HIIT + SAE بالاتر بود ($P = 0.01$)، اما در بیان نسبی ژن hTERT بین سایر گروه‌های مطالعه تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل شمارهٔ چهار).



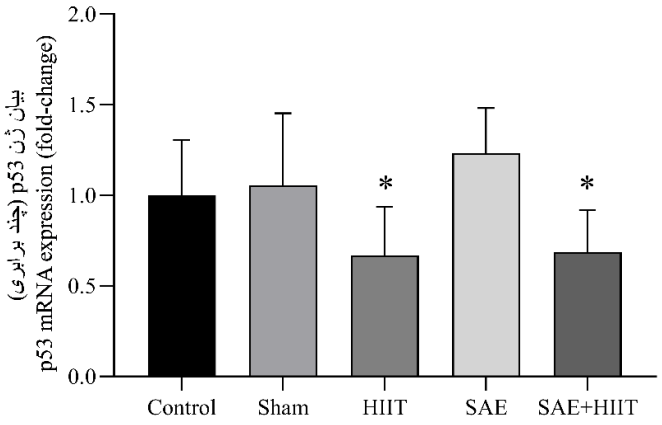
شکل ۴- بیان نسبی ژن hTERT در عضلهٔ دوقلوی موش‌ها

Fig 4- The Relative Gene Expression of hTERT in the Gastrocnemius Muscle of Mice

HIIT: تمرین تناوبی شدید، SAE: عصارهٔ آبی زعفران (*: تفاوت معنادار با سایر گروه‌ها، #: تفاوت معنادار با گروه SAE + HIIT)

HIIT: High-Intensity Interval Training, SAE: Saffron Aqueous Extract (*: Significant Difference with the Other Groups, # Significant Difference with the SAE+HIIT Group)

ازسوی‌دیگر، نتایج نشان داد که بین میزان تغییرات بیان نسبی ژن p53 در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم تفاوت معنادار وجود ندارد ($P > 0.05$)؛ بااین‌حال میزان تغییرات بیان نسبی ژن p53 در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل حدود ۳۳ درصد کاهش یافت ($P = 0.17$). بیان نسبی ژن p53 در گروه‌های HIIT و HIIT + SAE نیز به‌طور معناداری از گروه SAE پایین‌تر بود (به‌ترتیب $P = 0.003$ و $P = 0.004$) (شکل شمارهٔ پنج).



شکل ۵- بیان نسبی ژن p53 در عضلهٔ دوقلوی موش‌ها

Fig 5- The Relative Gene Expression of p53 in the Gastrocnemius Muscle of Mice

HIIT: تمرین تناوبی شدید، SAE: عصارهٔ آبی زعفران (*: تفاوت معنادار با گروه SAE)

HIIT: High-Intensity Interval Training, SAE: Saffron Aqueous Extract (*: Significant Difference with the HIIT Group)

نتایج آزمون تحلیل همبستگی بیان نسبی ژن‌های مطالعه‌شده نشان داد که بین میزان بیان ژن‌های SIRT1 و hTERT همبستگی معنادار مثبت وجود دارد ($r = 0.47, P = 0.01$)، اما بین میزان بیان سایر ژن‌ها همبستگی معنادار مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول شمارهٔ سه).

جدول ۳- همبستگی بین بیان نسبی ژن‌ها

Table 3- Correlation between Relative Genes Expression

p53 mRNA	hTERT mRNA	SIRT1 mRNA	متغیر Variable	
0.85	0.01*	-	مقدار P P-Value	بیان ژن SIRT1 SIRT1 mRNA
0.03	0.47	-	ضریب همبستگی پیرسون Pearson's Correlation Value	
0.99	-	0.01*	مقدار P P-Value	بیان ژن hTERT hTERT mRNA
-0.001	-	0.47	ضریب همبستگی پیرسون Pearson's Correlation Value	
-	0.99	0.85	مقدار P P-Value	بیان ژن p53 p53 mRNA
-	-0.001	0.03	ضریب همبستگی پیرسون Pearson's Correlation Value	

*: Significant Difference

بحث و نتیجه‌گیری

کاشکسی ناشی از سرطان نقش مهمی در مرگ‌ومیر بیماران سرطانی دارد، اما سازوکار بیان ژن‌های مرتبط با این بیماری نامشخص است (۳۴). در پژوهش حاضر این فرضیه مطرح شد که تمرین تناوبی شدید، مکمل‌دهی عصارهٔ آبی زعفران و ترکیب تمرین و عصاره آبی زعفران می‌توانند بیان برخی از ژن‌های مرتبط با کاشکسی در عضلهٔ دوقلوی موش‌های مبتلا به سرطان پستان را تغییر دهند. بیان ژن SIRT1 در عضلهٔ دوقلو در گروه HIIT به‌طور معناداری از گروه‌های کنترل وHIIT + SAE بالاتر بود. علاوه‌براین، بیان ژن hTERT در گروه HIIT به‌طور معناداری از گروه‌های کنترل، شم، SAE و SAE + HIIT بالاتر بود و در گروه SAE به‌طور معناداری از گروه HIIT + SAE بالاتر بود. همچنین بیان ژن p53 در گروه‌های HIIT و HIIT + SAE به‌طور معناداری از گروه SAE پایین‌تر بود و در گروه HIIT حدود ۳۳ درصد کاهش در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که HIIT می‌تواند القاکنندهٔ بالقوهٔ بیان برخی ژن‌های کاهش‌دهندهٔ کاشکسی در عضلهٔ دوقلوی موش‌های مبتلا به سرطان پستان باشد؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد این تمرین‌ها در کاهش تحلیل تودهٔ عضلانی نقش دارند.

یکی از مهم‌ترین عوارض کاشکسی ناشی از سرطان کاهش وزن بدن است که به دلایل گوناگونی ازجمله تغییر در ترکیب بدن اتفاق می‌افتد (۲۲). براساس نتایج این پژوهش، وزن بدن در گروه HIIT حدود ۱۱ درصد در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود. تغییر بیان ژن‌های مرتبط با تحلیل عضلانی، کاهش تخریب و افزایش فعالیت مسیرهای مرتبط با سنتز پروتئین، افزایش تودهٔ خالص بدن و کاهش التهاب و استرس اکسایشی، ازجمله عواملی‌اند که احتمالاً در حفظ وزن بدن متعاقب چهار هفته تمرین HIIT در مطالعهٔ حاضر مؤثرند (۲۲)؛ بنابراین براساس نتایج مطالعهٔ حاضر، به‌نظر می‌رسد HIIT می‌تواند به‌عنوان مداخلهٔ موثری در کاهش عوارضی ازجمله کاهش وزن در کاشکسی ناشی از سرطان مطرح باشد.

ژن SIRT1 با کنترل عوامل مختلف رونویسی ژن‌ها، یک ژن محافظت‌کننده در برابر تخریب عضلات اسکلتی شناخته شده است (۳۵). نتایج پژوهش حاضر بیان بالاتر ژن SIRT1 بعد از چهار هفته HIIT را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. سازوکارهای دقیق تأثیر SIRT1 بر پیشگیری از تحلیل عضلات اسکلتی هنوز مشخص نیست و مسیرهای متعددی در این زمینه پیشنهاد شده است (۳۶). افزایش بیان ژن SIRT1 در سلول‌های عضلانی به‌واسطهٔ مهار برخی از ژن‌های مرتبط با آپوپتوز مانند FOXO1 و p53 مانع ازدست‌دادن تودهٔ عضلانی می‌شود (۴)؛ بااین‌حال تأثیر تمرین‌های ورزشی بر بیان ژن SIRT1 در سلول‌های عضلانی بیماران مبتلا به سرطان به‌خوبی شناخته نشده است، اما گزارش شده است که تمرین‌های ورزشی، فعالیت SIRT1 را در عضلات اسکلتی افراد سالم به‌طور چشمگیری

افزایش می‌دهند (۳۷). ژن SIRT1 به‌عنوان یک فعال‌کنندهٔ بالادست پروتئین کیناز فعال‌شده توسط AMP[1] (AMPK) شناخته شده است. تمرین‌های ورزشی با افزایش بیان ژن SIRT1 و به‌دنبال آن فعال‌سازی AMPK، با تنظیم مثبت LKB1/AKT در سلول عضلانی موجب تغییر وضعیت متابولیک سلولی و افزایش طول عمر سلول‌های عضلانی می‌شوند. از طرفی فعال‌سازی SIRT1 از طریق تمرین‌های ورزشی باعث افزایش بیوژنز میتوکندریایی به‌واسطهٔ تنظیم مثبت فاکتور رونویسی PGC-1α[2] می‌شود. بیان ژن PGC-1α نیز موجب افزایش فسفوریلاسیون اکسایشی، سرکوب مسیرهای التهابی و کنترل مسیرهای مرتبط با وضعیت متابولیک در عضلات می‌شود (۳۷). تمرین ورزشی حاد نیز با افزایش فعالیت SIRT1 موجب جابه‌جایی فاکتور هسته‌ای κB[3] (NF-κB) از هسته می‌شود و با آزادسازی زیرواحدهای P50/P65 از مجموعهٔ NF-κB باعث پیشگیری از پیری سلول عضلانی می‌شود (۳۸، ۳۷، ۴). با توجه به افزایش بیان ژن SIRT1 به‌دنبال HIIT در مطالعهٔ حاضر و نقش محافظت‌کنندهٔ این ژن در پیشگیری از تحلیل عضلات، می‌توان بیان کرد که HIIT با تحریک القای بیان این ژن موجب کاهش عوارض ناشی از سرطان مانند کاشکسی می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند تمرین ورزشی به‌عنوان یک استرس خارجی با انتقال hTERT به‌عنوان زیرواحد کاتالیزوری تلومراز از هسته به میتوکندری، موجب تولیدنشدن ROS می‌شود و با افزایش فعالیت زنجیرهٔ تنفسی، نقش محافظتی از سلول در مقابل آسیب اکسایشی انجام می‌دهد (۳۹، ۱۲). در پژوهش حاضر بیان نسبی ژن hTERT در گروه HIIT افزایش یافت. در این زمینه گیلانی و همکاران (۳۹) بیان کرده‌اند که تمرین‌های هوازی موجب افزایش بیان ژن hTERT، کاهش آپوپتوز سلولی، کاهش فشار اکسایشی و افزایش تقسیم سلولی در سلول‌های عضلهٔ قلب موش‌ها می‌شوند. لیو و همکاران (۱۲) گزارش کرده‌اند که HIIT بیان ژن تلومراز را در عضلهٔ اسکلتی در موش‌های مسن افزایش می‌دهد. همچنین با توجه به مشاهدهٔ همبستگی مثبت معنادار ژن‌های SIRT1 و hTERT به‌دنبال HIIT در مطالعهٔ حاضر، به‌نظر می‌رسد بیان بالاتر ژن hTERT با فعال‌کردن سایر عوامل تنظیم‌کننده ازجمله بیان ژن SIRT1 در سلول‌ها، از طریق مهار آپوپتوز موجب مهار تحلیل عضلانی ناشی از سرطان می‌شود (۸). ازسوی‌دیگر، فعالیت تلومراز با تنظیم بیان ژن hTERT در عضلهٔ اسکلتی می‌تواند سلول‌های ماهواره‌ای را که موجب تکثیر سلول عضله می‌شوند، فعال کند (۴۰)؛ ازاین‌رو، توجه به عوامل تأثیرگذار بر تنظیم مثبت بیان ژن hTERT می‌تواند به‌عنوان یک سازوکار غیردارویی برای کاهش عوارض ناشی از بیماری‌های تحلیل عضلانی ازجمله کاشکسی مدنظر قرار گیرد.

ژن p53 یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که با فعال‌سازی آپوپتوز موجب ممانعت از تکثیر و ترمیم

1. AMP-Activated Protein Kinase
2. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
3. Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells

سلول‌های عضلانی و تسریع مرگ سلولی می‌شود (۱۴، ۱۳). تمرین‌های ورزشی یک تنظیم‌کنندهٔ بالقوه برای القا و تنظیم بیان ژن p53 در عضلات اسکلتی هستند (۱۵). در مطالعهٔ حاضر بیان ژن p53 در گروه‌های HIIT و SAE + HIIT در مقایسه با گروه SAE به‌طور معناداری پایین‌تر بود و در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل تمایل به کاهش نشان داد. به‌نظر می‌رسد فشار اکسایشی که متعاقب انجام‌دادن تمرین‌های ورزشی افزایش می‌یابد، می‌تواند در میزان فعالیت پروتئین p53 مؤثر باشد (۱۴). کیو و همکاران (۱۵) بیان کرده‌اند که HIIT بیان ژن p53 در عضلات اسکلتی را کاهش می‌دهد. همچنین تنظیم بیان ژن p53 با افزایش فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای می‌تواند موجب کاهش تحلیل عضلات در موش‌ها شود. از طرفی گزارش شده است که فشار اکسایشی ناشی از تمرین شدید با افزایش بیان ژن p53 موجب استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری، افزایش فعالیت پروتئینJNK[1] و مهار Bcl-2 می‌شود. همچنین افزایش فعالیت پروتئین JNK با رهایش عوامل پیش‌آپوپتوزی AIF و سیتوکروم C به داخل سلول موجب فعال‌کردن آبشار کاسپازی و درنهایت افزایش پیام‌رسانی آپوپتوز در سلول می‌شود (۴۱). با توجه به سازوکارها و مسیرهای ژنی متفاوت القای آپوپتوز از طریق تنظیم مثبت یا منفی ژن p53 متعاقب تمرین‌های ورزشی، انجام‌شدن مطالعات بیشتری را به‌منظور روشن‌شدن سازوکارهای درگیر در بیان این ژن در سلول‌های عضلانی افراد سرطانی طلب می‌کند (۱۶).

ترکیب تمرین‌های ورزشی و استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با تأثیر بر مسیرهای متعدد بیان ژن مانع از بروز علائم کاشکسی ناشی از سرطان شود (۴۲). نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که ترکیب HIIT و SAE موجب کاهش بیان ژن SIRT1 و hTERT در عضلهٔ دوقلوی موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود. ملانوری و همکاران (۴۲) گزارش کردند که ترکیب تمرین تناوبی هوازی و استفاده از مکمل آنتی‌اکسیدانی سلنیوم می‌تواند از بروز کاشکسی ناشی از سرطان پستان جلوگیری کند. آن‌ها بیان کردند که مکمل سلنیوم بروز علائم کاشکسی را در عضلهٔ دوقلوی موش‌های سرطانی تسریع می‌کند؛ درحالی‌که تمرین ورزشی با افزایش نسبت سطح پروتئین IL-10 /TNF-α، به‌عنوان یک شاخص ضدالتهابی و افزایش بیان ژن IL-15 در عضلات اسکلتی، مانع از تحلیل عضلانی موش‌های حامل تومور می‌شود؛ بااین‌حال ترکیب تمرین‌های ورزشی و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی از طریق کاهش علائم کاشکسی می‌تواند راهبرد مؤثری برای جلوگیری از تحلیل عضلات در سرطان پستان باشد. با توجه به اینکه سازوکارهای متعددی در مسیر بروز کاشکسی ناشی از سرطان مؤثر است، انجام‌دادن مطالعات بیشتری به‌منظور شناسایی نقش دقیق تمرین‌های ورزشی و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در تحلیل عضلات نیاز است.

1. C-Jun N-Terminal Kinases

ازطرف‌دیگر نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که مکمل‌دهی عصارهٔ آبی زعفران در گروه عصاره موجب بیان بالاتر ژن p53 در مقایسه با گروه‌های تمرین و ترکیب تمرین و عصاره، همچنین بیان بالاتر ژن hTERT در مقایسه با گروه ترکیبی تمرین و عصاره شد. در این زمینه یاناگیهارا[1] و همکاران (۴۳) نشان دادند که ایزوفلاونوئید استخراج‌شده از سویا به‌عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش پیشرفت کاشکسی در موش‌های حامل تومور سرطان معده و پانکراس انسانی می‌شود. آن‌ها بیان کردند که ایزوفلاونوئیدها می‌توانند باعث کاهش کاشکسی و ازدست‌دادن وزن ناشی از سرطان شوند؛ اگرچه سازوکارهای زیادی ازجمله تغییر در بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل مرتبط با آپوپتوز در میتوکندری، کاهش سطح ROS و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی در سلول دربارهٔ اثرات محافظتی مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابل آپوپتوز مطرح شده است، همچنان ابهام‌های زیادی در این زمینه وجود دارد (۴۳). درمجموع انجام‌دادن مطالعات بیشتری لازم است تا نقش مکمل‌دهی زعفران در بیان ژن‌های مؤثر در کاشکسی ناشی از سرطان به‌طور دقیق مشخص شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش بیان ژن SIRT1 و hTERT متعاقب HIIT می‌تواند یک سازوکار پیشنهادی برای مهار تحلیل عضلانی ناشی از سرطان در موش‌های حامل ردهٔ سلولی 4T1 سرطان پستان باشد (۴۴). علاوه‌براین، افزایش بیان ژن SIRT1 و کاهش بیان ژن p53 می‌تواند از کاشکسی ناشی از سرطان پیشگیری کند (۴۵)؛ بااین‌حال برای تعیین نقش سازوکارهای ژنی مؤثر در تحلیل عضلات متعاقب مصرف مکمل زعفران و سایر مکمل‌ها و داروها، انجام‌دادن مطالعات بیشتری نیاز است. همچنین بررسی اثرات سایر تمرین‌های ورزشی با حجم و دوره‌های متفاوت لازم است تا مسیرهای پیام‌رسانی که به‌دنبال انجام‌شدن تمرین‌های ورزشی در عضلات اسکلتی بیماران سرطانی ایجاد می‌شود، بهتر شناخته و درک شوند.

براساس نتایج مطالعهٔ حاضر، به‌نظر می‌رسد بخشی از اثرات مثبت HIIT بر پیشگیری از تحلیل تودهٔ عضلانی از طریق افزایش بیان ژن SIRT1 در بافت عضلانی اتفاق می‌افتد. تاکنون در مطالعات، اثر مکمل‌دهی زعفران بر بیان ژن‌های مرتبط با کاشکسی ناشی از سرطان در سلول‌های عضلانی بررسی نشده است و مدت زمان مکمل‌دهی عصارهٔ زعفران در مطالعهٔ حاضر نیز چهار هفته انتخاب شد و تغییری در بیان ژن‌های مطالعه‌شده مشاهده نشد؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تأثیر دوره‌های طولانی‌تر مکمل‌دهی عصارهٔ زعفران به‌منظور بررسی بیان ژن‌های درگیر در کاشکسی سلول‌های عضلانی در شرایط ابتلا به سرطان بررسی شود. همچنین با توجه به کوچک‌تربودن حجم تومور متعاقب HIIT، SAE و HIIT + SAE در هفتهٔ پایانی مداخله در مقایسه با گروه کنترل و نیز تغییرات احتمالی در سازوکار بیان ژن‌های ترشح‌شده از تومور که در کاشکسی درگیرند، این امر

1. Yanagihara

اظهارنظر قطعی دربارهٔ نحوهٔ تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به مسیرهای آپوپتوزی در سلول‌های عضلانی موش‌های مبتلا به سرطان پستان را با مشکل مواجه می‌کند و به انجام‌دادن پژوهش‌های بیشتری در این زمینه نیاز است.

پیام مقاله: براساس نتایج مطالعهٔ حاضر، به‌نظر می‌رسد HIIT احتمالاً در کاهش اثرات کاشکسی ناشی از سرطان از طریق تنظیم بالاتر بیان ژن‌های SIRT1 و hTERT همراه با بیان پایین‌تر ژن p53، نقش مثبت و مؤثری دارد و می‌تواند در کاهش تحلیل عضلات ناشی از سرطان در موش‌های حامل ردهٔ سلولی 4T1 سرطان پستان مؤثر باشد.

منابع

1. Mijwel S, Backman M, Bolam KA, Jervaeus A, Sundberg CJ, Margolin S, et al. Adding high-intensity interval training to conventional training modalities: optimizing health-related outcomes during chemotherapy for breast cancer: the OptiTrain randomized controlled trial. Breast Cancer Res Treat. 2018;168(1):79-93.
2. Narasimhan A, Greiner R, Bathe OF, Baracos V, Damaraju S. Differentially expressed alternatively spliced genes in skeletal muscle from cancer patients with cachexia. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018;9(1):60-70.
3. Myers MJ, Shepherd DL, Durr AJ, Stanton DS, Mohamed JS, Hollander JM, et al. The role of SIRT1 in skeletal muscle function and repair of older mice. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2019;10(4):929-49.
4. Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. J Biol Chem. 2013;288(42):30515-26.
5. Simão AL, Afonso MB, Rodrigues PM, Gama-Carvalho M, Machado MV, Cortez-Pinto H, et al. Skeletal muscle miR-34a/SIRT1: AMPK axis is activated in experimental and human non-alcoholic steatohepatitis. J Mol Med. 2019;97(8):1113-26.
6. Cross WL, Roby MA, Deschenes MR, Harris MB. Myocardial SIRT1 expression following endurance and resistance exercise training in young and old rats. The FASEB J. 2008;22(S1):753.1.
7. Gurd BJ, Perry CGR, Heigenhauser GJF, Spriet LL, Bonen A. High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. Appl Physiol Nutr Metab. 2010;35(3):350-7.
8. Crea F, Sarti D, Falciani F, Al-Rubeai M. Over-expression of hTERT in CHO K1 results in decreased apoptosis and reduced serum dependency. J Biotechnol. 2006;121(2):109-23.
9. Kim W, Ludlow AT, Min J, Robin JD, Stadler G, Mender I, et al. Regulation of the human telomerase gene TERT by telomere position effect—over long distances (TPE-OLD): implications for aging and cancer. PLOS Biol. 2016;14(12):e2000016.

10. Chilton WL, Marques FZ, West J, Kannourakis G, Berzins SP, O'Brien BJ, et al. Acute exercise leads to regulation of telomere-associated genes and microRNA expression in immune cells. PLOS One. 2014;9(4):e92088.
11. Cudré-Mauroux C, Occhiodoro T, König S, Salmon P, Bernheim L, Trono D. Lentivector-mediated transfer of bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. Hum Gene Ther. 2003;14(16):1525-33.
12. Liu Y, Su H, Jiang Z, Wen T, Shao JJEBR. Effect of HIIT on mitochondrial telomerase of skeletal muscle in aged rats. Exercise Biochemistry Review. 2018;1(3):1.
13. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. Nat Rev Cancer. 2009;9:749-58
14. Morimoto Y, Kureishi Bando Y, Shigeta T, Monji A, Murohara T. Atorvastatin prevents ischemic limb loss in type 2 diabetes: Role of p53. J Atheroscler Thromb. 2010;1011240321.
15. Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Free Radic Biol Med. 2011;50(7):794-800.
16. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. J Appl Physiol. 2011;110(6):1638-45.
17. Di Girolamo FG, Guadagni M, Fiotti N, Situlin R, Biolo G. Contraction and nutrition interaction promotes anabolism in cachectic muscle. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2019;22(1):60-7.
18. Soleymani Z, Peeri M. Comparision the effect of high intensity interval training and continuous endurance training on expression of MYOD in Soleus muscle of diabetic rats. Physiology of Sport and Physical Activity.2016;18:1417-23. (In Persian).
19. Jung H-W, Kim JW, Kim J-Y, Kim S-W, Yang HK, Lee JW, et al. Effect of muscle mass on toxicity and survival in patients with colon cancer undergoing adjuvant chemotherapy. Support Care Cancer. 2015;23(3):687-94.
20. Ballarò R, Beltrà M, De Lucia S, Pin F, Ranjbar K, Hulmi JJ, et al. Moderate exercise in mice improves cancer plus chemotherapy-induced muscle wasting and mitochondrial alterations. The FASEB Journal. 2019;33(4):5482-94.
21. Mugele H, Freitag N, Wilhelmi J, Yang Y, Cheng S, Bloch W, et al. High-intensity interval training in the therapy and aftercare of cancer patients: a systematic review with meta-analysis. J Cancer Surviv. 2019;13(2):205-23.
22. Ahmadabadi F, Saghebjoo M, Huang CJ, 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. Appl Physiol Nutr Metab. 2020;45(5):555-63.
23. Nezamdoost Z, Saghebjoo M, Hoshyar R, Hedayati M, Keska A. High-intensity training and saffron: effects on breast cancer-related gene expression. Med Sci Sport Exer. 2020: 52(7):1470-76.

24. Buetler TM, Renard M, Offord EA, Schneider H, Ruegg UT. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. Am J Clin Nutr. 2002;75(4):749-53.
25. Velázquez KT, Enos RT, Narsale AA, Puppa MJ, Davis JM, Murphy EA, et al. Quercetin supplementation attenuates the progression of cancer cachexia in cpcMin/+mice. J Nutr. 2014;144(6):868-75.
26. Ábrigo J, Elorza AA, Riedel CA, Vilos C, Simon F, Cabrera D, et al. Role of oxidative stress as key regulator of muscle wasting during cachexia. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:2063179.
27. Moradzadeh M, Kalani MR, Avan A. The antileukemic effects of saffron (Crocus sativus L.) and its related molecular targets: A mini review. J Cell Biochem. 2019;120(4):4732-8.
28. Arzi L, Farahi A, Jafarzadeh N, Riazi G, Sadeghizadeh M, Hoshyar R. Inhibitory effect of crocin on metastasis of triple-negative breast cancer by interfering with wnt/β-catenin pathway in murine model. DNA Cell Biol. 2018;37(12):1068-75.
29. Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjær A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18FFDG-microPET or external caliper. BMC Med Imaging. 2008;8(1):1-9.
30. 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 Iran. J Breast Dis. 2017;10(2):49-57.
31. Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, Kemp BE, Fullerton MD, Steinberg GR. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. Mol Metab. 2015;4(12):903-15.
32. Moallem SA, Afshar M, Etemad L, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Evaluation of teratogenic effects of crocin and safranal, active ingredients of saffron, in mice. Toxicol Ind Health. 2016 Feb;32(2):285-91.
33. Bathaie SZ, Hoshyar R, Miri H, Sadeghizadeh MJB, Biology C. Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. Biochem. Cell Biol. 2013;91(6):397-403.
34. Montero-Bullon J-F, Melo T, Ferreira R, Padrão AI, Oliveira PA, Domingues MRM, et al. Exercise training counteracts urothelial carcinoma-induced alterations in skeletal muscle mitochondria phospholipidome in an animal model. Sci Rep. 2019;9(1):13423.
35. Chalkiadaki A, Igarashi M, Nasamu AS, Knezevic J, Guarente L. Muscle-specific SIRT1 gain-of-function increases slow-twitch fibers and ameliorates pathophysiology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. Plos Genet. 2014;10(7):e1004490.
36. Zschoernig B, Mahlknecht U. SIRTUIN 1: Regulating the regulator. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(2):251-5.

37. Chen W-K, Tsai Y-L, Shibu MA, Shen C-Y, Chang-Lee SN, Chen R-J, et al. Exercise training augments Sirt1-signaling and attenuates cardiac inflammation in D-galactose induced-aging rats. Aging. 2018;10(12):4166-74.
38. Huang C-C, Wang T, Tung Y-T, Lin W-T. Effect of exercise training on skeletal muscle SIRT1 and PGC-1α expression levels in rats of different age. Int J Med Sci. 2016;13(4):260-70.
39. 39. Ghilani A, Kaeni AA, Nouri R. Effect of aerobic exercise training and ozone therapy on TRF2 sequences and TERT gene expressions in the heart tissue of rats with osteoarthritis. Studies in Medical Sciences, 2020;31(3):169-77.(In Persian)
40. Ludlow AT, Witkowski S, Marshall MR, Wang J, Lima LCJ, Guth LM, et al. Chronic exercise modifies age-related telomere dynamics in a tissue-specific fashion. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012;67(9):911-26.
41. Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. J Physiol. 2005;565(1):309-23.
42. Molanouri Shamsi M, Chekachak S, Soudi S, Quinn LS, Ranjbar K, Chenari J, et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF-α ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. Cytokine. 2017; 90:100-8.
43. Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Morimoto C, Morita Y, et al. Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers. Nutr Cancer. 2013;65(4):578-89.
44. Kala R, Shah HN, Martin SL, Tollefsbol TOJBC. Epigenetic-based combinatorial resveratrol and pterostilbene alters DNA damage response by affecting SIRT1 and DNMT enzyme expression, including SIRT1-dependent γ-H2AX and telomerase regulation in triple-negative breast cancer. BMC Cancer. 2015;15(1):672.
45. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, et al. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. Sci Signaling. 2014;7(351):ra106.

استناد به مقاله

نظام‌دوست زینب، ثاقب‌جو مرضیه، هوشیار ریحانه، هدایتی مهدی، صادقی طبس صابر. اثر تمرین تناوبی شدید و عصارۀ زعفران بر بیان برخی ژن‌های مرتبط با کاشکسی در عضلۀ اسکلتی موش‌های مادۀ حامل ردۀ سلولی سرطان پستان. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۹؛ ۱۲(۴۸): ۱۰۴-۸۳. شناسۀ دیجیتال: 10.22089/spj.2021.9254.2057

Nezam Doost Z, Saghebjoo M, Hoshyar R, Hedayati M, Sadeghi-Tabas S. The Effect of High-Intensity Interval Training and Saffron Extract on the Expression of Some Cachexia-Related Genes in the Skeletal Muscle of Female Mice Carrying Breast Cancer Cell Line. Sport Physiology. Winter 2021; 12 (48): 83-104. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2021.9254.2057

The Effect of High-Intensity Interval Training and Saffron Extract on the Expression of Some Cachexia-Related Genes in the Skeletal Muscle of Female Mice Carrying Breast Cancer Cell Line

Z. Nezam Doost[1], M. Saghebjoo[2], R. Hoshyar[3], M. Hedayati[4], S. Sadeghi-Tabas[5]

1. Ph. D. in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran
2. Professor of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran (Corresponding Author)
3. Associate Professor of Biochemistry, Cellular Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran & Associate Professor of Biochemistry, Microbiology and Molecular Genetics Department, Michigan State University, East Lansing, MI, USA
4. Professor of Biochemistry, Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Ph. D. Student in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

Received: 2020/08/01 **Accepted: 2021/01/13**

Abstract

Studies show that exercise training and bioactive component of saffron can reduce apoptosis and cachexia caused by cancer. The present study aimed to investigate the effects of four weeks of high-intensity interval training (HIIT) and consumption of saffron aqueous extract (SAE) on the expression of some cachexia-related genes (SIRT1, hTERT, and p53) in the gastrocnemius muscle of mice carrying 4T1 breast cancer cell line. For this purpose, 44 female BALB/c mice were randomly divided into HIIT, SAE, HIIT + SAE, control and sham groups. Following 48h of the last intervention session, mice were euthanized, and the gastrocnemius muscle removed for further analyses. The results showed that the expression of the SIRT-1 gene in the HIIT group was significantly higher than the control and SAE + HIIT groups (P=0.03 and P=0.02, respectively). Also, the gene expression of hTERT in the HIIT group was significantly higher than the other groups (P<0.05) and in the SAE group was significantly higher than the SAE + HIIT group (P=0.01). Furthermore, the gene expression of p53 in the HIIT and SAE + HIIT groups

1. Email: nezamdoost2004@yahoo.com
2. Email: m_saghebjoo@birjand.ac.ir
3. Email: reyhaneh.houshyar@gmail.com
4. Email: hedayati47@gmail.com
5. Email: saberst1993@gmail.com

was lower than the SAE group (P=0.003 and P=0.004, respectively). Based on the results, it seems that HIIT has a positive role in reducing cancer-induced cachexia by regulating higher expression of SIRT1 and hTERT and lower expression of p53 and may be effective in reducing cancer-induced muscle wasting.

Keywords: High-Intensity Interval Training, Saffron Aqueous Extract, Breast Cancer, Cachexia, Apoptosis.