

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان ژن TGF- β سایتوکاین القاکننده فرایند گذر از اپی تلیالی به مزانشیمی، حجم تومور و کاشکسی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان (یک مطالعه تجربی)

سمیرا غلامیان^۱، سیدرضا عطارزاده حسینی^۲، امیر رشیدلمیر^۳، حمید آقاعلی نژاد^۴، محمد شریعت‌زاده^۵

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۴/۱۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: بسیاری از مرگ‌ومیرهای مبتلایان به سرطان ناشی از متاستاز است و فرایند درگیر در متاستاز انتقال از حالت اپی تلیالی به مزانشیمی است؛ بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان بیومارکر مزانشیمی TGF- β ، کاشکسی و حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش کار: تعداد ۳۲ موش ماده نژاد بلبسی به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی ورزش تومور ورزش، استراحت تومور استراحت، استراحت تومور ورزش و گروه ورزش تومور استراحت تقسیم شدند. ۶ هفته قبل و ۴ هفته بعد از پیدایش تومور، تمرین تناوبی اجرا شد. تمام موش‌ها از طریق تزریق زیرجلدی از رده سلولی 4T-1 سرطانی شدند. برای بررسی بیان ژن TGF- β از روش Real-Time PCR استفاده شد. تست‌های وزنه و صفحه معکوس برای برآورد عملکرد عضلانی از موش‌ها گرفته شد. داده‌ها با روش آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) تجزیه و تحلیل شدند. **یافته‌ها:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن TGF- β بافت تومور در گروه تمرین تومور تمرین نسبت به گروه استراحت تومور استراحت کاهش معنی‌داری داشت ($p=0.005$). همچنین، کاهش معنی‌دار حجم تومور در هر دو گروه تمرینی (RTE و ETE) نسبت به گروه کنترل (RTR) مشاهده شد ($p=0.001$). نتایج تست‌های عملکردی نشان‌دهنده کاهش عملکرد عضلانی در اثر سرطان بوده است ($P=0.003$) و تمرین تناوبی توانسته بود عملکرد عضلانی را در سرطان حفظ کند ($P=0.045$).

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج پژوهش حاضر، یک دوره تمرین تناوبی با کاهش رشد حجم تومور و کاهش بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی همراه با افزایش قدرت عملکردی، می‌تواند علاوه بر نقش پیشگیرانه نقش کمک درمانی در سرطان پستان داشته باشد و از کاشکسی سرطان جلوگیری کند. **کلیدواژه‌ها:** سرطان پستان، گذر از اپی تلیالی به مزانشیمی، TGF- β ، تمرین تناوبی، حجم تومور، کاشکسی

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره ششم، ص ۵۱۲-۵۰۲، شهریور ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشگاه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۹۸۹۱۲۲۹۱۴۸۵۷+

Email: shariatzade221@yahoo.com

مقدمه

وارد شوند و در آنجا تشکیل تومور ثانویه شوند. یکی از مراحل حیاتی در آبخار متاستاز، فرایند انتقال از حالت اپی تلیالی به حالت مزانشیمی یا همان Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) است. مطالعات نشان داده‌اند که EMT با متاستاز و پیشرفت سرطان مرتبط است (۳، ۴). EMT فرایندی است که سلول‌ها طی انتقال از فنوتیپ اپی تلیالی به فنوتیپ مزانشیمی، با

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است و متاستاز، اصلی‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از این سرطان می‌باشد (۱، ۲). متاستاز رخداد زیستی پویا و چندگانه‌ای است که موفقیت در این فرایند مستلزم آن است که سلول‌های سرطانی توانایی جدا شدن از سلول‌های مجاور را داشته باشند؛ و سرانجام به بافت‌های مزانشیمی

^۱دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی (بیوشیمی و متابولیسم)، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۴دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۵استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی (نویسنده مسئول)

(۱۸). با وجود بررسی‌های انجام شده در زمینه تأثیر تمرین ورزشی بر فرایند EMT، پژوهش‌های بسیار کمی درباره نقش تمرینات ورزشی در بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی در سرطان انجام شده است. در این راستا، ژانگ^۱ و همکاران بعد از ۹ هفته تمرین شنا با شدت متوسط (۸ دقیقه در روز) کاهش بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی را در موش‌های مبتلا به سرطان کبد مشاهده کردند. آن‌ها با تأکید بر سیستم عصبی بیان کردند که فعالیت ورزشی شنا با شدت متوسط باعث افزایش دوپامین^۲ می‌شود که در پی آن، گیرنده دوپامین^۳ (که دارای فعالیت ضدتوموری است) فعال می‌شود که سطح سرمی و بیان ژن TGF- β کاهش می‌یابد در نتیجه آن سرکوب متاستاز در موش‌های مبتلا به سرطان کبد می‌شود (۱۹). انجام تمرینات تناوبی اثرهایی مفید مانند افزایش ظرفیت هوازی، استقامت، کاهش وزن و عملکرد متابولیک قلب برای افراد مبتلا به سرطان پستان دارد (۲۰). اما تاکنون اثر تمرین تناوبی به‌عنوان یک روش تمرینی در سازوکارهای سلولی-مولکولی و نحوه اثرها بر مسیرهای سیگنالی مؤثر در EMT و جلوگیری از کاشکسی عضلانی، رشد تومور کم برر سی شده یا برر سی نشده است. افزون بر این، اغلب داروهای در دسترس برای درمان سرطان به علت تک هدف بودن، سمی بودن زیاد، هزینه بسیار زیاد، اطمینان نداشتن از برگشت دوباره توده سرطانی و برگشت مهار رشد و چسبندگی سلولی ممکن است در درمان کارایی چندانی نداشته باشند؛ بنابراین، تمرینات تناوبی می‌توانند روشی مناسب برای پیشگیری از سرطان و در مراحل بعد، بخشی مهم و حیاتی از فرایند درمان این بیماری باشند. مطالعه EMT به دلیل پیچیدگی گستردگی دشوار است و با چالش‌هایی همراه است؛ اما دستاوردهای نسبی پژوهش‌ها و سرعت خیره‌کننده آن‌ها این نوید را می‌دهد که مطالعه جزئیات مولکولی این فرایند در الگوهای موشی سرطانی از محورهای اصلی پژوهش‌های آینده خواهد بود؛ بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان mRNA مارکرهای مزانشیمی TGF- β ، حجم تومور، کاشکسی عضلانی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و تجربی بود که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. جامعه آماری تحقیق حاضر را کلیه موش‌های بالغ سی از ستیتو یا ستور ایران تشکیل می‌دادند که از

تهاجم و تحرک بیشتر تغییر می‌کنند. سلول‌های اپی‌تلیالی در یک واحد مجتمع سازمان‌دهی می‌شوند و با ازدست‌دادن پروتئین‌های اتصال سلولی، عناصر اسکلت سلولی و به دست آوردن جنبش، کادهرین‌های مزانشیمی به سلول‌های مزانشیمال تبدیل می‌شوند (۵). مراحل EMT با یک سری از عوامل رونویسی تنظیم می‌شود که از جمله آن‌ها TGF- β است (۶).

فاکتور تغییر-دهنده-رشد بتا (TGF- β) یک مولکول پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون می‌باشد (۷ و ۸). این فاکتور دارای ۳ ایزوفرم (۱، ۲، ۳) بوده و از طریق دو رسپتور غشایی ۱ و ۲ (TR) پیام خود را به داخل سلول می‌رساند (۹) که مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی این فاکتور توسط مولکول‌های Smad سهیل شده و پیام مربوطه نهایتاً به هسته سلول رسیده و منجر به تغییرات سی در تنظیم-سیم در سطح رونویسی DNA می‌گردد (۱۰، ۱۱). همچنین TGF- β رفتارهای گوناگون سلول شامل تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. مسیر سیگنالینگ TGF- β رشد سلول‌های تومور را مهار می‌کند و شناخته شده است که در طی مراحل اولیه کار سینوزنژ مانند سرکوبگر تومور عمل می‌کند. بنابراین، TGF- β یک القاکننده بالقوه و بسیار مهم EMT در پیشرفت سرطان است (۱۲، ۱۳). این مسیر علامت‌دهی، فرایند EMT را از طریق مسیرهای وابسته به Smad و غیر وابسته به Smad القا می‌کند. نتیجه این رخدادها، افزایش بیان در مهارکننده‌های رونویسی مانند پروتئین‌های Snail، Twist، Slug و واسطه‌های تومور به جلو می‌برد، تا مسیرهای علامت‌دهی ضدآپوپتوزی به کار افتد (۱۴). کاشکسی به‌عنوان یک سندرم متابولیکی پیچیده شامل از دست رفتن توده عضلانی یا بدون کاهش توده چربی بدن می‌باشد. بی‌اشتهایی التهاب، مقاومت به انسولین و افزایش شکسته شدن پروتئین‌های بدن با این تحلیل عضلانی مرتبط بوده است (۱۵). کاشکسی سرطان یکی از شدیدترین شکل آتروفی عضلانی است و با افزایش مرگومیر ارتباط دارد (۱۶). شمار زیادی از بیماران با سرطان پیشرفته از دست دادن غیر اختیاری وزن را تجربه می‌کنند. کاشکسی سرطان اغلب با بی‌اشتهایی همراه است و به کاهش عملکرد فیزیکی و آشفته‌گی روانی منجر می‌شود (۱۷). ورزش باعث کاهش درصد چربی بدن، کاهش چاقی و افت التهاب سیستمی با درجه پایین می‌شود. هر کدام از این عوامل در پاتوزنژ سرطان نقش دارند؛ بنابراین، تمرینات ورزشی پتانسیل پیشگیری از سرطان را دارند

³ Dopamine Receptor 2

¹ Zhang

² Dopamine

بین آن‌ها تعداد ۳۲ سر موش بلب سسی ماده (۳ تا ۵ هفته با میانگین وزن 1 ± 17 گرم) از موسسه پاستور خریداری و به حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در اتاقی به ابعاد $1,60$ در $2,20$ متر در شرایط کنترل نور (۱۲ ساعت رو شنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع رو شنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (22 ± 3 سلسیوس) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد ۶ سر موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتیمتر قرار گرفتند، به طوری که در دسترسی به آب و غذای استاندارد، محدودیتی نداشته باشند. غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود و دسترس به آب و غذا آزاد بود. چون موش‌ها از لحاظ غذایی، اندازه وزن و سن و... همگن بودند برای هر سر موش یک شماره در نظر گرفته شد. سپس به قید قرعه شماره‌ها از داخل یک کیسه بیرون آورده شد و به ترتیب موش‌ها به شکل تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: ورزش تومور ورزش (ETE) (۸ سر)، استراحت تومور استراحت (RTR) (۸ سر)، استراحت تومور ورزش (RTE) (۸ سر)، و گروه ورزش تومور استراحت (ETR) (۸ سر). قرار داده شدند. گروه RTR به زندگی معمولی خود در قفس ادامه دادند. گروه ETR به مدت ۶ هفته پیش از پیدایش تومور، گروه RTE به مدت ۴ هفته پس از پیدایش تومور، گروه ETE به مدت ۶ هفته پیش از پیدایش و ۴ هفته پس از پیدایش تومور، پروتکل تمرینی جدول ۱ را اجرا کردند. لازم به توضیح است که تمامی مراحل پژوهش بر اساس آیین نامه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه فردوسی (IR.MUM.FUM.REC.1397.038) و انستیتو پاستور ایران انجام گرفت. پروتکل تمرینی این تحقیق شامل یک دوره آماده سازی و دوره تمرینی اصلی بود که به صورت تناوبی و براساس پروتکل رنجبر و همکاران (۲۱) اجرا شد. یکی از محدودیت‌های تحقیق نبود دستگاه DEXA برای اندازه‌گیری دقیق ترکیب بدن موش‌ها بود.

کشت سلول:

تومور مورد مطالعه از رده سلولی 4T-1 و از طریق تزریق زیرجلدی سلول ایجاد شد. رده سلولی توموری موش (4T-1) یکی از چند رده سلولی سرطان پستان است که توانایی متاستاز مؤثر به نواحی را دارد که در سرطان پستان انسانی آلوده می‌شوند. 4T-1 که از تومور خودبه‌خود ایجاد شده در موش BALB/c مشتق شده است، توانایی متاستاز به چندین ارگان را مانند ریه، کبد، مغز و

استخوان دارد که در سرطان پستان درگیر می‌شوند (۲۲). در این پژوهش، سلول 4T-1 در فلاسک T75 در محیط DMEDM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلو تآمین، پنی‌سیلین ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ، استرپتومایسین ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و FBS ۱۰ درصد کشت داده شد. پس از آنکه سلول‌ها به اندازه مورد نیاز در محیط آزمایشگاه کشت داده شدند، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه گردید. به هر موش یک میلیون سلول به صورت زیرجلدی و متمرکز به ناحیه بالای ران تزریق شد. در حدود ۱۰ روز پس از تزریق، تومور در ناحیه تزریق قابل تشخیص بود. حجم تومور در ۲ محور طولی و عرضی اندازه‌گیری شد. بزرگ‌ترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) تومور در نظر گرفته شد و با استفاده از فرمول حجم تومور جونز^۴ و همکاران (۲۳) به صورت $V = \frac{1}{2} L \times W$ میزان آن تعیین شد. برای تعیین نسبت رشد حجم تومور، در گروه‌های مختلف حجم تومور هفته چهارم به هفته اول تقسیم شد.

تست‌های عملکردی:

در ابتدای آغاز کار و انتهای دوره تمرینات اولیه و در آخرین جلسه تمرینی قبل از تشریح موش انجام شدند. که شامل تست صفحه معکوس و تست وزنه بود.

تست صفحه معکوس^۵:

آزمون صفحه معکوس که به وسیله یک صفحه‌ی مربع شکل مشبک از جنس صفحه سیمی انجام می‌شود. موش را در مرکز صفحه قرار داده و صفحه را برمی‌گردانیم؛ موش در وضعیت معکوس قرار می‌گیرد. مدت زمانی که موش قادر باشد بر روی صفحه بماند ثبت می‌گردد. اگر موش به نهایت زمان (۶۰ ثانیه) برسد از روی صفحه برداشته می‌شود. زمان‌های معیار طولانی‌تر از ۶۰ ثانیه ممکن است برای برخی آزمایش‌ها مفید باشد (۲۴).

تست وزنه^۶:

تست وزنه شامل هفت وزنه (حلقه) در وزن‌های مختلف است. موش را از قسمت میانی دم گرفته و پایین می‌آوریم و اجازه می‌دهیم نخستین وزنه که روی نیمکت آزمایشگاه قرار دارد را به دست آورد. از آن زمانی که موش توپ را با پنجه‌ی دستش به چنگ آورد بالا بردن موش تا جایی که حلقه از روی نیمکت آزمایشگاه جدا شود محاسبه می‌شود. زمان معیار در این آزمون ۳ ثانیه است. وزنه اضافه می‌شد تا زمانی که موش نتواند وزنه بیشتری را بلند کند براساس معیارهای مربوط به تست به هر موش امتیاز داده می‌شد (۲۴).

⁴ Jones

⁵ Inverted Screen Test

⁶ Weight Test

استخراج بافت تومور:

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های توموری از تمامی گروه‌ها از طریق تزریق درون صفاقی ترکیب کتآمین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. بلافاصله پس از بیهوشی، بافت‌های موردنظر تومور در شرایط استریل جدا شد. سپس، بافت موردنظر در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌های بافتی تا زمان اندازه‌گیری در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA از بافت توموری:

استخراج RNA با استفاده از محلول Qiazol و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برای تمام استخراج‌ها بین ۱/۸-۲ بود و اینتگریتی RNA توسط الکتروفورز با استفاده از آگارز ایتدیوم برآید (۱ درصد) سنجیده شد. پروتکل استفاده‌شده، براساس پروتکل کیت به‌صورت ۱۵ دقیقه نسخه‌برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس، در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و در نهایت، ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. cDNA به‌دست‌آمده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مراحل انجام Real Time PCR:

با استفاده از دستگاه (AB Applied) Stepone plus Biosystems، براساس SYBER-Green مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش برای ژن TGF- β از شرکت کیازن خریداری شدند. پروفایل دمایی PCR در مخلوطی نهایی به حجم ۲۰ میکرولیتر به‌صورت یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌دنبال آن، ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. رونوشت‌های اختصاصی از دی‌آدی‌افته توسط پروفایل منحنی ذوب که در انتهای هر PCR انجام می‌گرفت، تصدیق شدند. طراحی توالی پرایمرها توسط نرم‌افزار Runner Gene صورت گرفت (جدول ۲). از ژن ACTB به‌عنوان ژن مرجع برای فرمالایزر کردن نتایج بیان ژن استفاده شد. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن موردنظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

روش‌های آماری:

برای بررسی طبیعی بودن توزیع متغیرها از آزمون شاپیرو-ویلک^۷ استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نیز برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. تمام عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

جدول (۱): پروتکل تمرینی

دوره تمرین	شرایط ورزش	سرعت (متر در دقیقه)	تکرار	زمان (دقیقه)	کل زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحله آشناسازی	قبل از القای تومور	۱۰ و ۱۲	-	-	۱۰	۳
هفته‌های اول و دوم	قبل از القای تومور	۱۵ و ۲۰	۲۰	۲	۴۰	۵
هفته‌های سوم و چهارم	قبل از القای تومور	۲۰ و ۲۵	۲۰	۲	۴۰	۵
هفته‌های پنجم و ششم	قبل از القای تومور	۲۵ و ۳۰	۲۰	۲	۴۰	۵
تمرین بعد از القای تومور						
هفته هفتم	بعد از القای تومور	۲۵ و ۳۰	۱۵	۲	۳۰	۵
هفته هشتم	بعد از القای تومور	۲۰ و ۲۵	۱۵	۲	۳۰	۵
هفته نهم	بعد از القای تومور	۱۵ و ۲۰	۱۵	۲	۳۰	۵
هفته دهم	بعد از القای تومور	۱۰ و ۱۵	۱۵	۲	۳۰	۵

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین قربانی کردن حیوانات

⁷ Shapiro-Wilk

جدول (۲): توالی پرایمرها

ژن‌ها	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی
TGF- β	TGGAGTTGGACGGCAGTG	TGGAGTTTGTATCTTTGCTGTAC
ACTB	GGCTGTATCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

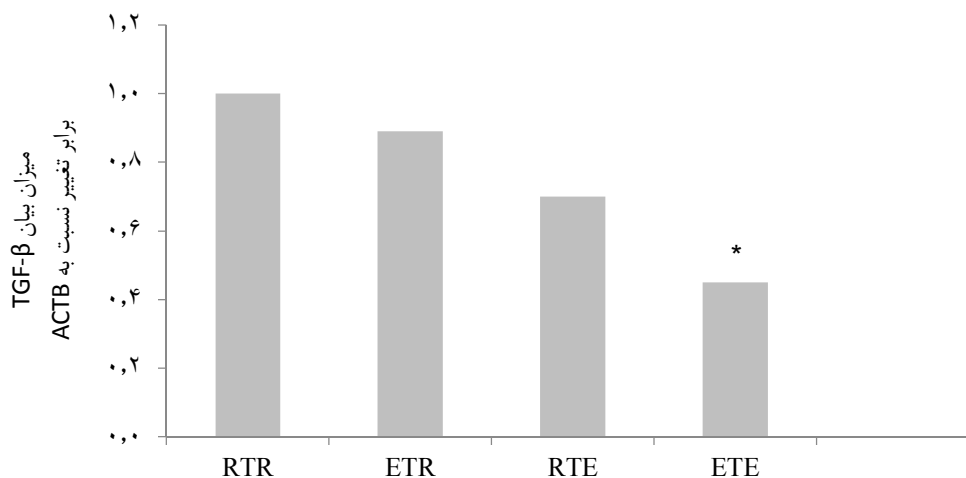
یافته‌ها

نتایج پژوهش نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار سرطان بر وزن عضله دو قلو است ($P=0/009$). گروه ورزش تومور ورزش در جهت حفظ توده عضلانی بوده است (جدول ۳).

جدول (۳): وزن و برخی شاخص‌های اندازه‌گیری شده مرتبط با آن در گروه‌های مختلف پژوهش

متغیر	ETE	ETR	RTE	RTR
وزن بدن بدون تومور (گرم)	$0/57 \pm 18/53$	$0/62 \pm 18/59$	$0/60 \pm 18/64$	$0/09 \pm 18/35$
وزن بدن با تومور (گرم)	$0/67 \pm 19/83$	$0/34 \pm 20/47$	$0/28 \pm 20/67$	$0/43 \pm 21/31$
نسبت وزن عضله دوقلو به وزن بدن	$0/12 \pm 0/43$	$0/09 \pm 0/20$	$0/14 \pm 0/30$	$0/10 \pm 0/18$

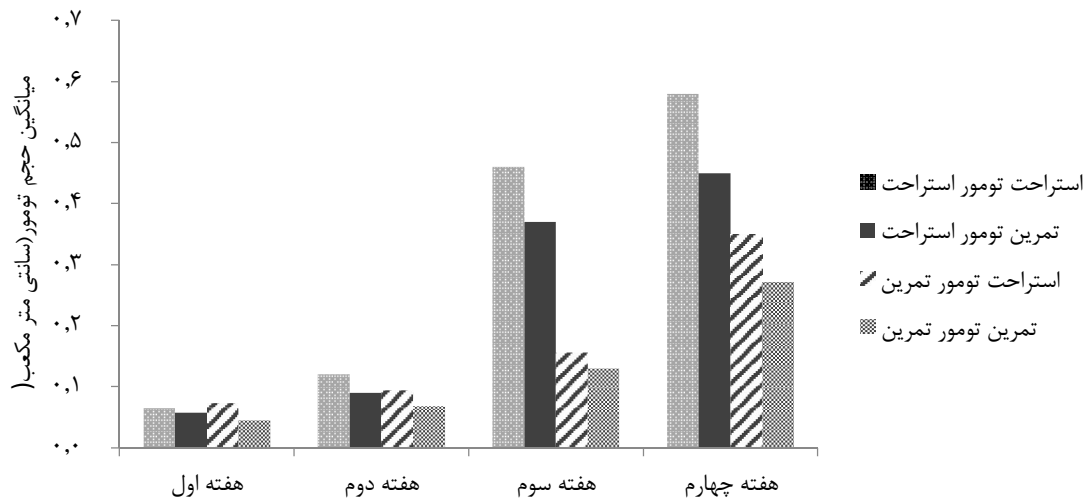
اثر تمرین تناوبی بر بیان TGF- β بافت توموری: نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن TGF- β در دو گروه RTR و ETE نشان داد ($p < 0/05$); به طوری که در گروه ETE نسبت به گروه RTR بیان TGF- β بافت تومور کاهش معنی‌داری داشت ($p = 0/005$, $F = 15/345$); اما بین گروه‌های RTE و ETR تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p = 0/56$) نمودار (۱).



نمودار (۱): تغییرات بیان ژن TGF- β در گروه‌های ورزش تومور ورزش (ETE)، استراحت تومور استراحت (RTR)، استراحت تومور ورزش (RTE) و گروه ورزش تومور استراحت (ETR)

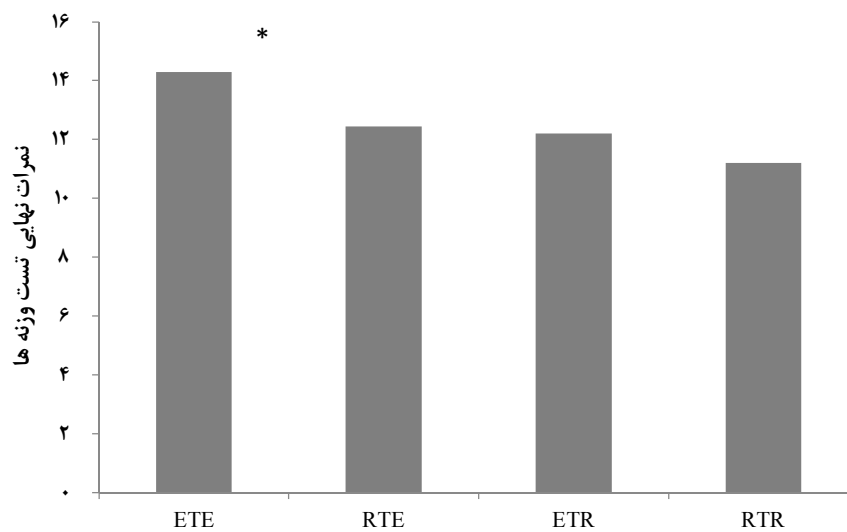
اثر تمرین تناوبی هوازی بر حجم تومور: نشان داد که نسبت افزایش حجم تومور در هفته چهارم نسبت به هفته اول به طور معنی‌داری در دو گروه تمرینی (RTE و ETE) در نتایج مقایسه با گروه کنترل (RTR) کم‌تر بود ($p = 0/001$, $F = 23/81$); به گونه‌ای که در گروه ETE، حجم

تومور در هفته چهارم رشد ۴/۷۹ برابری نسبت به هفته اول داشت. این نسبت، در گروه RTE ۵/۹۴ برابر، در گروه ETR ۷/۷۵ برابر و در گروه کنترل RTR، رشد حجم تومور نسبت به هفته اول ۸/۹۲ برابر بود نمودار (۲).



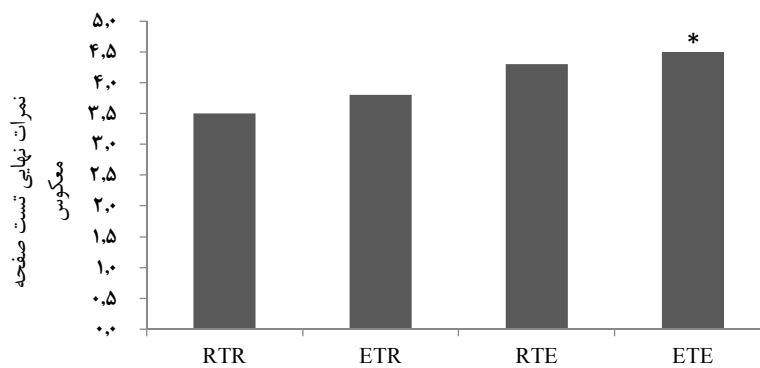
نمودار (۲): مقایسه حجم تومور در ۴ هفته بعد از سرطانی شدن در گروه‌های مختلف پژوهش

در تست وزنه‌ها اثر سرطان در جهت کاهش معنی‌دار قدرت عملکردی معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$) از طرفی اثر تمرین تناوبی در جهت افزایش قدرت عملکردی موش‌ها معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$) نمودار (۳).



نمودار (۳): تغییرات قدرت عملکردی حاصل از تست وزنه‌ها در ۴ گروه ورزش تومور ورزش (ETE)، استراحت تومور ورزش (RTR)، استراحت تومور ورزش (RTE) و گروه ورزش تومور استراحت (ETR)

در بررسی‌های نتایج حاصل از تست صفحه معکوس اثر سرطان در جهت کاهش معنی‌دار قدرت عملکردی در موش‌ها بوده ($P = 0.003$) ولی اثر تمرین در جهت افزایش قدرت عملکردی در موش‌ها بوده است ($P = 0.045$) نمودار (۴).



نمودار (۴): تغییرات قدرت عملکردی حاصل از تست صفحه معکوس در ۴ گروه ورزش تومور ورزش (ETE)، استراحت تومور استراحت (RTR)، استراحت تومور ورزش (RTE) و گروه ورزش تومور استراحت (ETR)

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از اهداف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان ژن TGF- β سایتوکاین القاکننده فرایند گذر از اپی تلیال به مزانشیمی بود، سازوکار تأثیرگذاری تمرینات ورزشی بر تغییرات TGF- β هنوز مبهم و نامشخص است؛ ولی با مرور مطالعات می‌توان مکانیزم‌های احتمالی را برشمرد. سهم سایتوکاین‌های خاص به‌عنوان واسطه‌های التهابی EMT به‌طور گسترده‌ای در مطالعات بیان شده است که مهم‌ترین آن‌ها TGF- β است که با چندین سایتوکاین پیش‌التهابی در جریان پیشرفت فرایند EMT در تعامل است. یک پارادوکس اصلی در باره TGF- β این است که یک سرکوبگر بالقوه تکثیر سلول‌های طبیعی اپی تلیال پستان است، اما در طی توسعه سرطان به پروموتور تبدیل می‌شود. در سلول‌های طبیعی اپی تلیال پستان و در مراحل ابتدایی پیشرفت سرطان TGF- β با خاصیت سرکوب‌کنندگی خود بر رشد تومور و از طریق مهار تکثیر سلولی به منزله مهارکننده رشد عمل می‌کند، اما با پیشرفت سرطان عملکرد آنکوژنیک و القاکنندگی تومور پیدا می‌کند و باعث افزایش پتانسیل تهاجم و متاستاز می‌شود (۲۵). بر این اساس، مسیر سیگنالینگ TGF- β به‌مشابه مسیر سرکوبگر تومور و پروموتور پیشرفت تومور و تهاجم در نظر گرفته شده است (۱۱). در واقع، بیان بالای TGF- β با شروع تومور پستان، پیشرفت و متاستاز آن ارتباط دارد (۲۶). مطالعات نشان دادند که افزایش سیگنالینگ TGF- β در اپی تلیال سلول‌های پستان در موش‌ها، متاستاز ریوی را افزایش می‌دهد، درحالی‌که مهار سیستمیک سیگنالینگ TGF- β متاستاز ریه را مهار می‌کند (۲۶). TGF- β ، تیروزین فسفات Pez را القا می‌کند که به نوبه خود

با ایجاد یک حلقه فیدبکی مثبت اتوکراین سبب ترویج EMT و تولید TGF- β می‌شود. در ابتدا انکوژن Ras سبب نفوذ سلول‌های اپی تلیال پستان انسانی به EMT شده و اضافه شدن TGF- β به این تبدیل شتاب می‌بخشد و در نتیجه این فعالیت‌ها، سلول‌های تومورزا ظاهر می‌شود (۲۷). هیچ پژوهشی در زمینه تأثیر تمرین تناوبی بر بیان ژن این مارکرها یافت نشده؛ اما نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه ژانگ و همکاران هم‌خوانی داشت. ژانگ و همکاران در تحقیق خود با تأکید بر سیستم عصبی بیان کردند فعالیت ورزشی شنا با شدت متوسط باعث افزایش دوپامین (DA) می‌شود، در پی آن گیرنده دوپامین ۲ (DR2) (که دارای فعالیت ضد توموری است) فعال می‌شود و با فعال شدن سیگنالینگ DR2، cAMP کاهش می‌یابد و پس از آن ERK1/ERK2 مهار می‌شود (مسیر سیگنالینگ ERK تهاجم تومورهای مختلف را افزایش داده و باعث افزایش بیان TGF- β می‌شود) (۲۸)، که نتیجه آن تنظیم منفی TGF- β و Smad3 در مدل‌های حیوانی است (۱۹). از آنجایی که Smad3 مولکول کلیدی تنظیم‌کننده EMT توسط TGF- β است (۲۹)، بنابراین، مهار انتقال هسته‌ای Smad2، Smad3 و Smad4 می‌تواند TGF- β مربوط به EMT را تنظیم کند و در نتیجه از این طریق رشد تومور و متاستاز را در سرطان ریه سرکوب می‌کند (۱۹). کاهش میزان بیان ژن TGF- β در گروه ETE نسبت به سه گروه دیگر به این معنی است که شاید فعالیت بدنی منظم از طریق مهار مسیر سیگنالینگ TGF- β سبب کاهش کاهش حجم و رشد سلول‌های تومور شود. این نتایج با میزان رشد تومور نیز هم‌خوانی دارد، یعنی میزان رشد تومور در گروه ETE پایین‌تر است.

² dopamine receptor 2

¹ dopamine

از طرفی عامل تومور به‌عنوان یک استرس برون سلولی سبب افزایش بیان این پروتئین می‌شود اما فعالیت ورزشی تناوبی به دلیل ماهیئت متفاوت خود یعنی وجود وهله‌های استراحتی بین مراحل تمرینی بر خلاف تمرین پیوسته از افزایش مداوم و مضاعف گرما و جریان خون به ناحیه توموری جلوگیری کرده و در این نوع فعالیت برخلاف فعالیت پیوسته استرس کمتری در ناحیه تومور ایجاد می‌شود و شاید یکی از این دلایل کاهش این پروتئین‌ها و حجم تومور باشد.

افزون بر این، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رشد حجم تومور در دو گروه تمرینی (RTE و ETE) نسبت به گروه ETR و گروه کنترل RTR، به‌طور قابل توجهی کم‌تر بود؛ به‌گونه‌ای که در گروه ETE، حجم تومور در هفته چهارم ر شد ۴/۷۹ برابر نسبت به هفته اول داشت. این نسبت، در گروه RTE ۵/۹۴ برابر، در گروه ETR ۷/۷۵ برابر و در گروه کنترل RTR رشد حجم تومور نسبت به هفته اول ۸/۹۲ برابر بود؛ بنابراین، میزان رشد حجم تومور در گروهی که هرگز ورزش نکرده بودند نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود. همچنین در نتایج پژوهش حاضر مشخص شد که در دو گروه ETR و ETE که قبل از سرطانی شدن ۶ هفته تمرین تناوبی اجرا کردند نسبت به گروه کنترل RTR که هیچ‌گونه تمرین تناوبی نداشتند، نسبت حجم تومور کم‌تر است. که این نتایج نشان می‌دهد که ورزش علاوه بر اینکه می‌تواند نقش کمک درمانی در سرطان داشته باشد، نقش پیشگیرانه نیز در سرطان دارد. هم‌راستا با پژوهش حاضر، مطالعات دیگر کاهش حجم تومور را در نتیجه ورزش کردن نشان داده‌اند (۳۱، ۳۰)؛ زیلینسکی^۳ و همکاران کاهش و تأخیر رشد تومور در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل را پس از ۴ هفته تمرین استقامتی به کاهش میزان سلول‌های ایمنی در تومور نسبت دادند (۳۲). همچنین، مطالعه امانی و همکاران نشان‌دهنده کاهش حجم تومور و رگ‌زایی در تومور در اثر تمرینات هوازی بود (۳۳). براساس پژوهش مورفی^۴ و همکاران، فعالیت هوازی با کاهش رشد حجم تومور، پیشرفت تومور را در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل نشان داد (۳۴)؛ با این حال، برخی از مطالعات تأثیرنداشتن تمرینات ورزشی بر تغییرات حجم تومور را نشان داده‌اند (۳۵، ۳۶). پروتکل تمرینی پژوهش حاضر روی تردمیل تعریف شده است؛ بنابراین، ممکن است تفاوت در شیو تمرینی، طول دوره تمرینی و نوع تومور القاشده دلیلی برای نتایج غیرهمسو با نتایج پژوهش حاضر باشند.

کاهش رشد حجم تومور با تمرین تناوبی در کنار کاهش بیان ژن TGF- β به‌طور ضمنی می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت تمرینات

تناوبی بر فرایند گذر از اپی‌تلایال به مزانشیمال در موش‌های مبتلا به سرطان پستان باشد. شایان ذکر است که با توجه به اینکه پژوهش‌های بسیار کمی در زمینه بررسی تغییرات بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی و همچنین، حجم تومور در نمونه‌های توموری و مبتلا به سرطان پستان در شرایط پاتولوژیک نسبت به تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات تناوبی انجام شده‌اند که این امر تفسیر نتایج در این زمینه را دشوار می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که ممکن است فرایندهایی مانند کاهش خون‌رسانی به سلول‌های توموری در کاهش رشد تومور دخیل باشند؛ البته با توجه به اینکه عوامل مؤثر در فرایند EMT زیاد هستند و فاکتورهای دیگری نیز ممکن است در این فرایند تأثیر داشته باشند، با اطمینان کامل نمی‌توان اختلاف حجم تومور در گروه‌ها را صرفاً ناشی از متغیرهای پژوهش حاضر دانست؛ بنابراین، بهتر است فاکتورها و مکانیزم‌های درگیر دیگری در فرایند EMT نیز ارزیابی شوند تا نتایج پژوهش حاضر به‌صورت واضح‌تر تفسیر شود. همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده اثرات سرطان بر وزن بدن، وزن بدن بدون تومور، وزن عضله دوقلو، میزان عملکرد عضلانی در موش‌های مبتلا به سرطان بود. تمرین ورزشی تناوبی باعث حفظ توده عضلانی و عملکرد عضلانی در موش‌های مبتلا سرطان شده است و تا حدی از فرایند کاشکسی جلوگیری کرده است. تأثیر تمرین و مکانیزم‌های کاشکسی سرطان پیچیده و چند فاکتوری هستند. کاهش در فعالیت‌های فیزیکی و توانایی اجرای فعالیت‌های زندگی روزانه نقش مهمی در وضعیت روحی و روانی فرد بیمار دارد. در نتیجه پژوهش‌های انجام شده در زمینه علت و درمان کاشکسی سرطان در انسان‌ها و مدل‌های حیوانی شواهدی ارائه دادند که یک درمان موفق برای این وضعیت ترکیبی از حمایت تغذیه‌ای و ورزش با عوامل دارویی است که در نتیجه آن تجزیه‌ی عضله‌ی اسکلتی می‌شود یا حتی می‌تواند القاکننده وضعیت آنابولیک در عضله اسکلتی باشد. در بسیاری موارد پژوهش‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که کاشکسی با روش‌های چند وجهی شامل تغذیه و ورزش به بهترین حالت مدیریت می‌شود (۳۷). با مطالب ذکر شده و با توجه به نتایج پژوهش حاضر که تمرین تناوبی باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن TGF- β و افزایش قدرت عملکردی موش‌های گروه ETE در تست‌های وزنه و صفحه معکوس به نظر می‌رسد این نوع تمرین در حفظ توده عضلانی موش‌های مبتلا به سرطان مؤثر بوده است و می‌توان به اثرات کمک‌کننده تمرینات ورزشی در کنار درمان‌های دارویی در مطالعه حاضر تأکید کرد. تمرینات ورزشی ضمن اثرات

⁴ Murphy

³ Zielinski

جلوگیری کند، اگر چه چگونگی و سازو کار این امر نیاز به پژوهش‌های زیادی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از دوره فرصت مطالعاتی در پژوهشگاه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی می‌باشد که نویسندگان مقاله از این سازمان کمال تشکر را دارند.

فیزیولوژیک توانسته است در بهبود وضعیت سرطان تأثیرگذار باشد.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، یک دوره تمرین تناوبی با کاهش رشد حجم تومور و کاهش بیان ژن TGF- β همراه با افزایش قدرت عملکردی، می‌تواند علاوه بر نقش پیشگیرانه نقش کمک درمانی در سرطان پستان داشته باشد و از کاشکسی سرطان

References:

- Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in iran. *Ir J Pub Health* 2015;44: 430-1.
- Motamedi M, Hashemzadeh Chaleshtori M, Ghasemi S, Kheiri S, Haji Gholami A. The association of mir-451 and mir-21 in plasma with lymph node metastases in breast cancer. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2018; 20: 16-12.
- Chai J, Modak C, Mouazzen W, Narvaez R, Pham J. Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Biosci trends* 2010;4: 130-42.
- Hwangbo C, Tae N, Lee S, Kim O, Park O, Kim J, et al. Syntenin regulates TGF- β 1-induced Smad activation and the epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting caveolin-mediated TGF- β type I receptor internalization. *Oncogene* 2016;35: 83-9.
- Kalcheim C. Epithelial-mesenchymal transitions during neural crest and somite development. *J Clin Med* 2015;5: 716-25.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2010; 1786-1786: 120.
- Clark D, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 293-8.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 111-9.
- Wrana JL. TGF- β receptors and signaling mechanisms. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 120-30.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: Transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 1998; 95: 737-40.
- Derynck R, Zhang YE. Smad dependent and Smad independent pathway in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-84
- Imamura T, Hikita A, Inoue Y. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer* 2012;19(2): 118-24.
- Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2010; 21(1): 49-59.
- Scheel C, Weinberg RA, editors. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2012.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL et al. 2011. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 12(5): 489-95.
- Thomas DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin Nutr* 2007; 26(4): 389-99.
- Moley JF, Aamodt R, Rumble W, Kaye W, Norton JA. Body cell mass in cancer bearing and anorexia patients. *J Parenter Enteral* 1987; 11: 219-22.
- Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(7): 987-997.

19. Zhang L, Liu W, Gao Y, Qin Y, Wu R. The expression of IL-6 and STAT3 might predict progression and unfavorable prognosis in Wilms' tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435: 408-13.
20. Meyer K, Samek L, Schwaibold M, Westbrook S, Hajric R, Lehmann M, et al. Physical responses to different modes of interval exercise in patients with chronic heart failure: Application to exercise training. *Eur Heart J* 1996;17: 1040-7.
21. Ranjbar K, Agha Alinejad H, Shahbazi SH, Molanouri Shamsi SH. Interval aerobic exercise and selenium nanoparticle stimulate autophagy in mice with cancer cachexia. *Int J Cancer Oncol* 2018;5: 35-40. (Persian)
22. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells invitro and invivo systems. *Clin Cancer Res* 2005;11: 1918-27.
23. Jones L, Viglianti B, Tashjian J, Kothadia S, Keir S, Freedland S, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* 2009;108: 343-8.
24. Deacon Robert MJ. Measuring the Strength of Mice. *J Vis Exp* 2013; (76): 2610.
25. Moses H, Barcellos-Hoff MH. TGF- β biology in mammary development and breast cancer. *cold spring harbor perspectives in biology* 2011; 3(1): a003277.
26. Arteaga CL. Inhibition of TGF β signaling in cancer therapy. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006;16(1): 30-7.
27. 1. Moustakas A, Heldin P. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(8):2621-34.
28. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERKMAPK activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38 SAPK. *Cancer Res* 2003;63(7): 1684-95.
29. Hunter C, Jones S. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16: 448-57.
30. Friedenreich C, Orenstein M. Physical activity and cancer prevention: Etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002;132: 3456S-3464S.
31. Liu X, Chu K-M. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *Biomed Res Int* 2014;2014:637308.
32. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol* 2004;96: 2249-56.
33. Amani-shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib Z K, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17: 231-6. (Persian)
34. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. *Cytokine* 2011;55: 274-9.
35. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: A translational perspective. *Brain Behav Immun* 2013;30: 75-8.
36. Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity *Immunology and allergy. Phys Med Rehabil Clin* 2009; 29: 381-93.
37. Prado CM, Baracos VE, McCargar LJ, Mourtzakis M, Mulder KE, Reiman T, et al. Body composition as an independent determinant of 5-fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Clin Cancer Res* 2007; 1;13(11): 3264-8.

EFFECT OF A PERIOD OF INTERVAL TRAINING ON EXPRESSION OF THE TGF- β CYTOKINE GENE INDUCING THE EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION, TUMOR VOLUME, AND CACHEXIA IN MICE WITH BREAST CANCER: AN EXPERIMENTAL STUDY

Samira Gholamian¹, Seyyed Reza Attarzadeh hosseini², Amir Rashidlamir³, Hamid Aghaalinejad⁴,
Mohammad Shariatzadeh^{5*}

Received: 20 Apr, 2019; Accepted: 11 July, 2019

Abstract

Background & Aims: Deaths from cancer metastases are rising, and the process involved in metastasis is the transmission of epithelial to mesenchymal mood. Therefore, the purpose of this study was to investigate the influence of interval training on the expression of mesenchyme biomarkers, cachexia, and tumor volume in mice with breast cancer.

Materials & Methods: Thirty-two female BALB/c mice were randomly divided into four groups: Exercise-Tumor-Exercise, Rest-Tumor-Rest, Rest-Tumor-Exercise, and Exercise-Tumor-Rest. Interval training was performed six weeks before and four weeks after the tumorigenesis. All mice were cancerous by subcutaneous injection of the 4T-1 cell line. Real-time PCR method was used to evaluate the expression of TGF- β . Also, weight test and the Inverted Screen Test were carried out to estimate muscle functions in mice. Data were analyzed with one-way ANOVA and HSD-Post Hoc test with $P \leq 0.05$.

Results: The results showed a significant decrease in gene expressions of TGF- β in Exercise-Tumor-Exercise group in comparison with the Rest-Tumor-Rest group ($P=0/005$). Remarkable reduction of tumor volume was also observed in two training groups (Rest-Tumor-Exercise, Exercise-Tumor-Exercise) compared to the control group (Rest-Tumor-Rest) ($p=0/0001$). According to function tests' results, muscle functions were diminished due to cancer ($p=0/003$). But it should be indicated that interval training can keep muscles in a normally-functioned state in cancer ($P=0/045$).

Conclusion: Considering final results, a period of interval training can be used not only as a prevention method, but also to help cancer treatment and impede cachexia by tumor volume reduction, decrease mesenchymal biomarker gene expressions, and increase muscle strength functions.

Keywords: Breast Cancer, Epithelial to Mesenchymal Transition, TGF- β , Interval Training, Tumor Volume, Cachexia

Address: Department of Sport Physiology, Tehran, Iran

Tel: +989914818175

Email: shariatzade221@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(6): 512 ISSN: 1027-3727

¹ PhD Student of Sport Physiology (Biochemistry and Metabolism), Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Professor of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Associate Professor of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴ Associate Professor of Sport Physiology, Faculty of Humanities, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Sport Physiology, Institute of Physical Education and Sport Sciences (Corresponding Author)