مقـــاله تحقیقی

تاثیر تمرین مقاومتی و عصاره آناناس بر بیان ژن ماتریکس متالوپروتئینازهای بافت کبد موش های مبتلا به سرطان ملانوما

فواد عسجدی[1]، حسین عابد نطنزی[2*]، بهرام عابدی[3]، ماندانا غلامی[2]

[1] دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[2] گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[3] گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد محلات، محلات، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

نشانی الکترونیک:
abednazari@gmail.com

چکیده

زمینه: سرطان ملانوما شدیدترین زیر مجموعه سرطان پوست است که قدرت تهاجم بالا و متاستاز سریع به سایر اندامها را دارد. اخیرا نقش تمرینات ورزشی در پیشگیری و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار دارد. آناناس نیز متعلق به خانواده بروملیاسه و زیر خانواده بروملویده می باشد که خواص ضد سرطانی آن مطرح شده است. ماتریکس متالوپروتئینازها خانوادهای از آنزیمهای پروتئولیتیک هستند و باعث تخریب ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه می‌شوند و از این لحاظ در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت می باشند. گزارش‌های قبلی نشان داد که MMP-2 و MMP-9 به طور اساسی در ملانوم های بدخیم بیان می شوند و بیان آنها به شدت با آتیپی ملانوما و تمایززدایی در ضایعات ملانوسیتی مرتبط است. هدف پژوهش حاضر مطالعه تغییرات بیان ژن متالوپروتئین های MMP-2 و MMP-9 بافت کبد و حجم تومور پس از انجام تمرین مقاومتی و مصرف عصاره آناناس در موش های مبتلا به سرطان ملانوما بود.

روش کار: این مطالعه بر روی ۳۲ سر موش‌های‌نژاد C۵۷ در چهار گروه شامل کنترل، تمرین مقاومتی، عصاره آناناس و تمرین مقاومتی- آناناس انجام شد. پس از القای تومور‌به موش ها، برنامه تمرین مقاومتی و عصاره دهی آناناس به میزان ۳۰۰mg/kg بصورت گاواژ به مدت شش هفته اجرا شد. وزن و حجم تومور موش‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته ها: پس از تهیه خون و نمونه‌های بافتی، بیان ژن متالوپروتئین های MMP-2 و MMP-9 بافت کبد به روش RT-PCR انجام شد. سپس داده‌ها با استفاده آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و تعقیبی مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی داری $p\leq0.05$ در نظرگرفته شد.

نتیجه گیری: یافته‌ها نشان داد در مقایسه با گروه کنترل، تمرین مقاومتی و تمرین-آناناس به کاهش معنی‌دار حجم تومور و کاهش بیان ژن متالوپروتئین‌های MMP-2 و MMP-9 بافت کبد منجر شد.

واژگان کلیدی: تمرین مقاومتی، آناناس، سرطان ملانوما، متالوپروتئین‌ها، MMP-9, MMP-2

مقدمه

سرطان عامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان و کشورها با هر سطح درآمدی است. علاوه بر این، انتظار می‌رود که تعداد موارد سرطان و مرگ و میر با رشد جمعیت، پیر شدن و اتخاذ رفتارهای سبک زندگی که خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد، به سرعت افزایش یابد (۱). ملانوما یک سرطان پوست است که در اثر بدخیمی ملانوسیت ها ایجاد می‌شود. بروز ملانوم در سراسر جهان به سرعت در حال افزایش است که منجر به مشکلات بهداشت عمومی می‌شود. برابر آمارهای منتشر شده در مجموع سالانه ۵۰ میلیون مرگ در جهان روی می‌دهد که بیش از ۵ میلیون آنها به انواع مختلف سرطان نسبت داده می‌شوند. ملانومای بدخیم هم ۲ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود، ولی عامل یک درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان است. عوامل مستعد کننده‌ی این بیماری داشتن نژاد سفید، در معرض آفتاب شدید قرار گرفتن، سابقه‌ی خانوادگی، ژنتیک، سابقه ی ملانومای قبلی، سرکوب ایمنی و خال‌های غیرطبیعی است (۲). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده هایی از آندوپپتیدازهای وابسته به عناصر روی و کلسیم می باشند که توانایی پروتئولیز بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی را دارند (کلاژنها، پروتئوگلیکانها و گلیکو پروتئین ها) و با این کار سبب تشدید روند پاسخ‌های التهابی می شوند (۴،۳) در شرایط پاتولوژیک نظیر بیماری سرطان، آرتریت روماتوئید، بیماری های قلبی- عروقی و سایر بیماری های التهابی تجزیه بیش از حد ماتریکس خارج سلولی موجب تخریب بافت می گردد و واکنشهای التهابی را تسریع می‌کند. یکی از نقشهای پاتولوژیک مهم MMP ها سرطان است. این ماتریکسها در شروع کارسینوژنز و افزایش آنژیوژنز تومور و تخریب ساختمان بافت سرطانی نقش دارند و با شکست سدهای غشاء پایه باعث گسترش متاستاتیک تومور و پیشرفت آن می‌شوند. تولید MMPs در اکثر سلولها یک فرآیند دایمی است لیکن در سلولهای سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیلها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد می شوند، لذا مهارکننده های طبیعی MMPs در کنترل فعالیت التهاب نقش به سزایی دارند (۵،۶).

فرآیند آنژیوژنز نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرآیند پیچیده گسترش و متاستاز تومورها که شامل دورشدن سلولهای سرطانی از محل اولیه خودشان، مهاجرت آنها در طول عروق خونی و لنفاوی و پراکنده شدن آنها در نقاط دوردست است، نیز نقش مهمی دارد. به این ترتیب که هر چه عروق بیشتری در بافت تومور تشکیل می‌شود، سلول های تومور بیشتری از دیواره نفوذپذیر عروق عبور می‌کنند و وارد گردش خون می‌شوند. بنابراین درمانهای آنتی آنژیوژنیک در جلوگیری از رشد و متاستاز تومورها مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند (۷). مطالعات انجام شده بر روی گیاهان دارویی در زمینه اثر مهارکنندگی آنها بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها بسیار محدود است. این بررسی‌ها نشان داده‌اند که فلاونوئیدها، در غلظتهای فیزیولوژیکی، قادرند دو گروه از این آنزیم‌ها بنام MMP2 وMMP9 را مهار کنند (۸). سرطان بیماری بسیار پیچیده ای است که اغلب با به هم خوردن و از تنظیم خارج شدن تنظیمات هموستاتیک داخل سلولی و بین سلولی شروع می‌شود و در مراحل پیشرفته سرطان و متاستاز آن، علاوه بر به هم خوردن این مسیرهای مولکولی از نظم خارج شده، ترکیبات ماتریکس سلولی هضم شده و سلول مهاجم برای جایگزینی با بافت هدف بر هم کنش نموده و متاستاز می‌نماید (۹)، پیشرفت سرطان به طور بسیار شدیدی بقاء بیمار را به خطر می‌اندازد و استراتژی‌های درمانی را با شکست مواجه می‌کند. نقش کلی پروتئازها و به خصوص در متاستاز و ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) تهاجم سلولهای توموری کاملاً اثبات شده است مشخص شده که این آنزیم ها با تسهیل شکستن اتصالات بین سلولی بافت همبند و هضم ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به این فرایند کمک می‌کنند.

(۱۲-۱۰). برای بازآرایی ماتریکس خارج سلولی در جریان التیام زخم‌ها و هر گونه نقص بافتی، تعادل بین MMPs و TIMPs و مهارکننده بافتی MMPs نیاز و است و در تهاجم و متاستاز تومورهای بدخیم یک عدم تعادل بین این دو جزء دیده می‌شود (۱۳). ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند و باعث تخریب ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه می‌شوند و از این لحاظ در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارای اهمیت می باشند. همچنین این آنزیم‌ها برای فعالیت به یون روی (2+Zn) به عنوان کوفاکتور وابسته هستند و به چند گروه اصلی تقسیم بندی می‌شوند (۱۶-۱۴). از بین MMP ها، ماتریکس متالوپروتئیناز۹- (MMP9) تنها عضو این خانواده است که به خاطر دارا بودن ساختار ۳ تایی فیبرونکتین قادر به اتصال و هضم کلاژن تیپ IV به عنوان مهمترین ترکیب غشا پایه است و از این نظر تغییرات بیانی ژن این آنزیم‌ها می‌تواند در سرطانی‌شدن سلولها و تغییر رفتار آنها نقش مهمی داشته باشد (۱۸ ، ۱۷) افزایش غلظت پلاسمایی MMP9 در انواعی از تومورهای بدخیم مانند سرطان معده، سرطان پستان، سرطان کلون، سرطان ریه، سرطان‌های سر و گردن و غیره مشاهده شده است (۱۸).

تا به حال بیش از ۲۶ آنزیم از خانواده MMP در انسان شناسایی شده است که از نظر ساختاری شباهت زیادی به هم دارند MMP ها در روند مهاجرت سلولهای لنفوئیدی و میلوئیدی، ترمیم زخمها و بازآرایی فیزیولوژیکی بافت‌ها از جمله فرایند رشد نرمال، رشد جنینی و ارگانوژنز، آنژیوژنز، تخمک‌گذاری نقش مهمی ایفا می‌کنند. MMP

ها فرایند آپوپتوز سلولهای سرطانی را با مکانیسم های مختلف از جمله مهار NK.cells و غیر فعال‌کردن رسپتور Fas که دریافت کننده پیام مرگ سلولی است، مهار می‌کند (۱۹).

پوست در معرض عوامل متعددی از جمله دود، میکروارگانیسم‌ها و یا اشعه ماوراءبنفش که می‌توانند باعث ایجاد پاسخ‌های بیولوژیکی شده و از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) منجر به آسیب پوست شوند در مقابل این عوامل، آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که به مهار بسیاری از واکنش‌های اکسیداسیون که توسط رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند، کمک نموده و بدین وسیله آسیب وارده به سلول‌ها و بافت‌ها را مهار کرده یا به تأخیر می‌اندازند. از جمله مکانیسم‌های عملکردی آن‌ها واکنش جمع‌آوری گونه‌ای رادیکال آزاد اکسیژن و نیتروژن می‌باشد (۲۰). شواهد گسترده‌ای برای استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در سرطان وجود دارد. ارزش پتانسیلی آنتی اکسیدان‌ها، محققان را بر آن داشته تا به جستجوی ترکیب‌های طبیعی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و سمیت کم بپردازند (۲۱). مطالعات اخیر نشان داده که تعدادی از محصولات گیاهی شامل: پلی فنل‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کورکومین‌ها، ترپن‌ها و انواع عصاره‌های گیاهی، فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می‌دهند. همچنین نشان داده شده که یک سری از ترکیبات طبیعی از جمله گیاهان باعث القاء مسیرهای آپوپتوزی می‌شوند که در سلولهای سرطان مهار شده‌اند. توانایی القاء آپوپتوز در سلولهای سرطانی و توقف تکثیر این سلول‌ها موضوع بسیاری از تحقیقات ایمونوفارماکولوژی می باشد. از جمله علل اصلی بروز سرطان‌ها می‌توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی‌ها اشاره کرد. فرآورده‌های طبیعی به ویژه گیاهان دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می‌باشند (۲۳،۲۲). آناناس با نام علمی comosus Ananas و نام انگلیسی pineapple متعلق به خانواده برومولیاسه وزیر خانواده برومولویده می‌باشد. این میوه یکی از پرطرفدارترین میوه‌های استوایی است (۲۴). از نظر ترکیبات شیمیایی در هر صد گرم قسمت قابل مصرف میوه رسیده و خام به صورت متوسط: ۸۵گرم آب، ۴/۰ گرم پروتئین، ۲/۰ گرم چربی، ۱۳ گرم مواد قندی، ۱۷ میلی‌گرم کلسیم، ۸ میلی گرم فسفر، ۰/۵ میلی‌گرم آهن، ۱ میلی‌گرم سدیم، ۱۴۶ میلی‌گرم پتاسیم، ۰/۹ میلی‌گرم تیامین، ۰/۰۳ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۰/۰۲ میلی گرم نیاسین، آنزیم برومیلین، وانیلین، اسیدهای آزاد آلی، ۱۷ میلی گرم ویتامینC و ۷۰ واحد بین المللی ویتامین A، B و B2 وجود دارد. آنزیم برومیلین به دست آمده از عصاره آناناس به صورت گسترده در طب‌سنتی استفاده می‌شود این ماده علاوه بر این موارد، دارای فعالیت‌هایی نظیر تنظیم کننده سیستم ایمنی، اثرات ضد التهابی و اثرات ضد سرطانی است (۲۵). رئیسی و همکاران در سال ۱۳۹۵، اثرات ضدسرطانی آناناس را بر سرطان پستان بررسی نموده و به نتایج ارزشمندی در راستای نابودی این سلولها دست یافتند (۲۶). با توجه به قابلیت‌های برومیلین و تعداد اندک مطالعات انجام شده پیرامون سلول‌های سرطانی، هنوز مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان قابلیت‌های این ترکیب را بررسی کرد. از اصلی ترین مشکلاتی که در درمان سرطان وجود دارد این است که داروهای درمانی در بافت‌های توموری باقی نمی‌مانند و داروها بافت‌های سالم بدن را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۷)، درمان‌های مختلفی که امروزه برای سرطان وجود دارد مثل پرتودرمانی و یا سایر داروهای رایج، همگی برای سلول‌های سالم بدن نیز سمی هستند و علاوه بر هزینه های بالا عوارض جانبی بالایی دارند (۲۸). بنابراین احساس می‌شود که نیاز مبرمی به روش های جدید برای درمان سرطان به عنوان روش های درمانی هدفمند سرطان وجود دارد که بتواند جایگزین خوبی برای روش‌های شیمی‌درمانی فعلی باشد (۲۹). لذا در این مطالعه در نظر است تمرین مقاومتی و مصرف عصاره آناناس بر بیان ژن متالوپروتئین‌های بافت کبد و حجم تومور موش های مبتلا به سرطان ملانوما گزارش گردد تا شاید بتوان از اثربخشی و نقش آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آناناس در کنار طراحی برنامه ورزشی برای سرطانی‌ها استفاده کرد. امید است نتایج حاصل از این پژوهش در علوم پزشکی و ورزشی پس از مطالعات انسانی مشابه به عنوان راهی نجات بخش در بهبود عوارض ناشی از سرطان عوارض آن و آسیب های کبدی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

جامعه و نمونه آماری

جامعه آماری پژوهش حاضر را موشهای نر C۵۷BL/۶ تشکیل می‌دادند که از بین آنها، ۳۲ سر موش نر شش تا هشت هفته‌ای با دامنه وزنی۱۲ تا ۱۴ گرم که با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد و در هنگام خرید در همین محدوده وزنی بودند به عنوان نمونه آماری از انستیتو پاستور خریداری و به اتاق نگهداری حیوانات آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران منتقل شدند. موش‌ها به صورت تصادفی و تعداد مساوی شامل هشت سر موش در هر گروه قرار گرفتند.

عصاره گیری از میوه آناناس

میوه آناناس تهیه شده و پس از شسته شدن به حلقه‌های نازک برش زده شد و در مکان سایه روشن به دور از آلودگی خشک شد. سپس از میوه خشک شده، پودر یکنواخت تهیه می‌گردد، جهت عصاره‌گیری میوه آناناس از روش خیساندن در دمای ۴ درجه سانتیگراد استفاده می‌شود. به ازای هر ۷ گرم پودر آناناس، ۵۰ میلیلیتر اتانول ۸۵٪

استفاده شد. عصاره حاصله در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شده تا حلال به طور کامل تبخیر می‌شود. عصاره خشک بدست آمده تا زمان استفاده، درون یخچال نگهداری می‌شود. به طور خلاصه پس از توزین میوه آناناس، پوست آن جدا، پارانشیم آن خارج شده و با استفاده از دستگاه مخلوط کن، مخلوط یکنواخت و همگنی تهیه نموده، پس از سانتریفوژ مخلوط با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، فیبره را در قسمت پایینی و عصاره در قسمت بالایی لوله قرار می‌گیرد. این عصاره با آب مقطر رقیق شده و عصاره ۲۰ درصد مورد استفاده قرار خواهد گرفت. نرمال سالین و عصاره آناناس (۳۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در وزن بدن) به وسیله گاواژ به موش های مورد نظر خورانده خواهد شد (۲۹).

کشت رده سلولی

رده سلول سرطانی ملانوما B۱۶F۱۰ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این رده سلولی، از محیط کشت RPMI غنی شده با ۱۰٪ FBS همراه با آنتی بیوتیک پنی سیلین استرپتومایسین استفاده شد. در ابتدا به منظور استخراج بافت توموری از موش‌های استوک، با روش نخاعی موش‌ها کشته شدند. سپس ناحیه توموری با الکل استریل شد و با کمک پنس و قیچی تومور از پهلوی موش خارج و به یک پلیت حاوی محلول سرم فیزیولوژی استریل منتقل گردید. بافت توموری حاصله با یک تیغ بیستوری به قطعات ۳-۲ میلیمتری تقسیم شد. در حین قطعه کردن بافت توموری چربی‌ها و عروق اضافه از تومور جداسازی شده و بافت توموری به صورت خالص قطعه قطعه شد. قطعات توموری به یک پلیت استریل حاوی سرم فیزیولوژی منتقل شدند تا برای جراحی مورد استفاده قرار بگیرند.

برای شروع جراحی ابتدا موش ها با مخلوط داروی زایلزین و کتامین به نسبت ۱ به ۲ همراه با محلول سرم فیزیولوژی استریل مورد بیهوشی قرار گرفتند (مقدار داروها برای بیهوشی ۵ سر موش شامل ۴۰ میکرولیتر زایلزین و ۸۰ میکرولیتر کتامین همراه با ۳۸۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل بود که از این ترکیب مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر موش به صورت صفاقی تزریق شد). پس از بیهوشی کامل، موش‌ها از ناحیه پهلو بر روی تخته جراحی قرار گرفتند و با کمک پنس و قیچی استریل در ناحیه پهلوی شیو شده یک برش کوچک ایجاد شد، سپس با کمک پنس کانال باریکی در زیر پوست ایجاد شد. در مرحله بعدی یه قطعه از بافت توموری استخراج شده از موش استوک به انتهای کانال ایجاد شده در زیر پوست موش منتقل شد و محل برش پوست به کمک چسب و منگنه مخصوص بخیه مسدود شد. پس از جراحی به منظور ریکاوری، موش‌ها در یک قفس جداگانه و در یک اتاق با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محل بخیه جراحی با بتادین ضدعفونی گردید. همچنین موش‌ها به صورت هفتگی جهت بررسی روند رشد تومور مورد معاینه قرار می‌گرفتند. نگهداری موش‌ها در قفس‌های پلیکربنات مخصوص و تعداد چهار سر موش در هر قفس صورت گرفت. به منظور آشنایی با محیط جدید، موش‌ها به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند. پس از آشناسازی، موش‌ها به صورت تصادفی و باتوجه به همگنسازی وزن به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. پس از یک هفته آشناسازی با محیط، سلولهای سرطانی به موشها تزریق و یک هفته پس از تزریق سلولهای سرطانی که بافت تومور در جایگاه تزریق سلولهای سرطانی قابل لمس و مشاهده بود، پروتکل پژوهشی آغاز شد و در انتهای شش هفته برنامه تمرینی، خونگیری، بافت‌برداری و اندازه‌گیری وزن موش و حجم تومور انجام گرفت (۳۱،۳۰).

اندازه گیری حجم تومور

همه حیوانات در ابتدا و به صورت هفتگی با استفاده از ترازو وزن شدند. حجم تومور در دو بعد اندازه‌گیری شد، بزرگترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور در نظر گرفته شد و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. پس از پیدایش تومور، هر هفته یکبار طول و عرض تومور توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید و با استفاده از فرمول محاسباتی حجم تومور [$V=\pi/6\ (w\times L^2)$] میزان آن تعیین شد (۳۲).

گروه بندی و اجرای پروتکل پژوهشی

به منظور آشنایی با محیط جدید، موش‌ها به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند. پس از آشناسازی، موش‌ها با نردبان مقاومتی به صورت تصادفی و با توجه به همگن‌سازی وزن به چهار گروه، کنترل، تمرین مقاومتی، آناناس و گروه تمرین مقاومتی+ آناناس تقسیم می‌شوند.

زمانبندی تمرینی

موش‌ها در هفتهٔ دوم آزمایشگاه برای اجرای پروتکل‌های پژوهشی تمرین و گاواژ آماده می‌شوند. موش‌ها طی سه جلسه در هفته با نردبان مقاومتی تمرین می‌کنند.

تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان (طول ۱ متر، شیب ۸۵ درجه و ۲ سانتیمتر فضای بین هر پله) می‌باشد که سه جلسه در هفته و به مدت شش هفته انجام می‌گیرد. هفته اول تمرین بدون وزنه و در هفته دوم با ۱۵ درصد وزنه تمرین انجام می‌شود و در هفته سوم در اولین جلسهٔ تمرین و به منظور انجام تکرار اول، ۲۵ درصد وزن بدن موش‌ها به دمشان وزنه متصل می‌شود و به ترتیب۵۰ درصد سپس ۷۵ و ۱۰۰ درصد برای هر تکرار افزایش می‌یابد. اگر موش

قادر به حمل بار بود، با هر تکرار موفق، ۳ گرم به کیسهٔ حاوی وزنه اضافه شده تا حیوان به واماندگی برسد. وزنهٔ حمل شده قبل از واماندگی، به عنوان وزنهٔ حداکثر، برای طراحی پروتکل جلسه بعد استفاده می‌شود. بنابراین برای جلسه‌های بعدی تمرین به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد وزنهٔ حداکثر جلسهٔ قبل و به ازای هر تکرار موفق ۳ گرم اضافه در نظر گرفته می‌شود. با این تفاوت که بعد از واماندگی هر موش با ۷۰ درصد حداکثر وزنه به تمرین ادامه می‌دهد، به طوریکه هر جلسهٔ تمرین شامل حداقل ۴ و حداکثر ۸ تکرار است. بین هر تکرار نیز ۲ دقیقه استراحت وجود دارد که با رسیدن موش به بالای نردبان این استراحت شروع می‌شود. پس از اتمام استراحت، وزنه مورد نظر به کیسه متصل به دم موش اضافه می‌شود و موش به پایین نردبان انتقال می‌یابد. در صورت نیاز نیز دم‌موش‌ها به منظور ایجاد انگیختگی لمس می‌شود (۳۳).

روش بیان ژن MMP2 و MMP9 بافت کبد

بافت کبد نیز به منظور اندازه گیری بیان ژن جدا و بلافاصله توسط ازت مایع به فریزر منفی ۸۰ منتقل شد. مقداری از بافت کبد برای انجام مراحل ریل‌تایم درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت RiboEx Total RNA isolation solution (GeneAll) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت FIRE Script RT cDNA Synthesis (Solis BioDyne) ساخته شد و به فریزر منفی ۲۰ انتقال داده شد. سپس برای بررسی بیان ژن MMP2 و MMP9 بافت کبد، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم‌افزار Primer۳ طراحی شد و توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام سنتز گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

بیان ژن MMP2 و MMP9 بافت کبد در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر Master Mix (AMPLIQON RealQ Plus ۲x Master Mix Green) در ویال ریخته شد و سپس ۲ میکرولیتر پرایمر که شامل ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو و ۱ میکرولیتر پرایمر پیرو بود به ویال اضافه شد. در ادامه ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده به ویال اضافه گردید و در نهایت به آن ۶ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد تا حجم مواد به ۲۰ میکرولیتر برسد. سپس نمونه ها در دستگاه Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (QIAGEN) طبق برنامه مورد نظر که شامل یک مرحله Enzyme Activation به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و ۴۰ سیکل شامل Denaturation به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing-Extention به مدت ۳۰ ثانیه بر روی تنظیم و اجرا شد. در نهایت محصولات PCR به منظور بررسی اختصاصیت بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد. (جدول ۳)

جدول ۱. زمانبندی تمرینی

هفته	تعداد جلسه	شیب	درصد وزنه	تکرار	استراحت بین تکرار (دقیقه)
اول	۳	۸۵ درجه	۰	۴	۲
دوم	۳	۸۵ درجه	۱۵	۴	۲
سوم	۳	۸۵ درجه	۲۵	۶	۲
چهارم	۳	۸۵ درجه	۵۰	۶	۲
پنجم	۳	۸۵ درجه	۷۵	۸	۲
ششم	۳	۸۵ درجه	۱۰۰	۸	۲

روشهای آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS۲۲ تجزیه و تحلیل شدند برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) استفاده شد. آزمون شاپیرو ویلک جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و آزمون لوین برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی بن فرونی جهت مقایسه تفاوت بین گروه‌ها و از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و شاخص تعیین اندازه اثر جهت مقایسه میزان تاثیر هر یک از متغییرهای مستقل استفاده گردید. آنالیز آماری بیان ژن MMP2 و MMP9 بافت کبد با استفاده از نرم‌افزار نسخه ۲۲ انجام شد. سطح معنی داری $p \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

سطوح متغیرهای مورد بررسی شامل وزن موش‌ها، حجم تومور، بیان ژن MMP2 و MMP9 بافت کبد، موش‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار در جدول ۴ گزارش شده است.

نمودار ۱و ۲و ۳ تغیرات حجم تومور و بیان ژن MMP2 و MMP9

جدول۲. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Gen	Primer	Product size
MMP2-F	CGATGTCGCCCCTAAAACAG	176
MMP2-R	GCATGGTCTCGATGGTGTTC	
MMP9-F	CGTCATTCGCGTGGATAAGG	119
MMP9- R	TTTGGAAACTCACACGCCAG	

جدول ۳. مراحل دمایی ریل تایم بیان ژن MMP۲ و MMP۹ بافت کبد

مراحل	زمان	دما	سیکل
Enzyme Activation	۱۵ دقیقه	۹۵	۱
Denaturation	۱۰ ثانیه	۹۴	۴۰
Annealing-Extension	۳۰ ثانیه	۶۰	

روشهای آماری تجزیه و تحلیل دادهها

بافت کبد موش های گروههای مختلف را نشان می دهد.
جدول ۵ و ۶ نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (F) و دو عاملی را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

یافتههای پژوهش حاضر نشان داد که تمرین مقاومتی و عصاره آناناس منجر به کاهش وزن و کاهش معنیدار حجم تومور و بیان ژن MMP2 و MMP9 در گروههای تجربی شد.
نتایج وزن موشها نشان داد که وزن موشها در گروههای تجربی نسبت به کنترل کاهش داشت که در گروه تمرین- آناناس میزان کاهش وزن بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد حجم تومور در گروههای تجربی کاهش معنیدار داشته، ولی تمرین – عصاره آناناس حجم تومور موش های مبتلا به سرطان ملانوما را بیشتر کاهش داد و شاخص اندازه اثر عصاره آناناس بیشتر بود. باکورا و همکاران در رابطه با اثرگذاری مثبت تمرینات با شدت بالا در کاهش حجم تومور نشان دادند که ۱۰ هفته تمرین شدید روی نوارگردان (پنج جلسه در هفته، ۳۰ دقیقه، ۸۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) منجر به کاهش معنادار حجم تومور در رتهای حامل تومور می شود. علاوه بر این، تمرینات ورزشی با افزایش معنادار بقا در مقایسه با گروه کنترل تومور همراه بود. این نتایج نشان میدهد که انواع مختلف تمرینات ورزشی میتواند نقش موثری در سرکوب رشد تومور داشته باشد (۳۴). همه این یافتهها بر اثرات ضدالتهابی تمرینات ورزشی در موشهای مبتلا به سرطان تاکید دارد که میتواند به کاهش معنادار حجم تومور نیز منجر شود. مورفی و همکاران کاهش معنی دار حجم تومور را بهدنبال تمرینات هوازی در موشهای سرطانی به افت عوامل التهابی نسبت دادند گفته میشود که این کاهش التهاب، احتمالا در اثر کاهش رهایش سایتوکاین ها از قبیل IL-۶ در پاسخ به انقباض عضلانی منظم است (۳۵). یافتههای پژوهش حاضر موافق با یافتههای مورفی بود و در هر دو پژوهش کاهش حجم تومور بعد از یک دوره تمرین استقامتی مشاهده شد و احتمالا اگر طول مدت تمرین در پژوهش حاضر با مداخلات تغذیه ای همراه ادامه می یافت کاهش حجم تومور در گروه تمرین نیز شاید معنیدار

جدول۴. جدول توصیفی سطوح متغیرهای مورد بررسی در گروههای پژوهش (انحراف معیار ± میانگین)

گروه	وزن موش ها (گرم)	حجم تومور (میلیمتر مکعب)	بیان ژن MMP2 (Fold cheng)	بیان ژن MMP9 (Fold cheng)
کنترل	۱۵/۸±۱/۱۰	۳۷۹۹/۸۱±۸۸۲/۴۴	۱±۰	۱±۰
تمرین مقاومتی	۱۵/۴±۱/۵۱	۲۴۵۹/۲۶±۲۳۸/۳۶	۰/۷۱۵±۰/۲۶	۰/۵۲۹±۰/۳۲
آناناس	۱۶/۵±۰/۵۷	۲۴۴۴/۶۴±۷۳۹/۹۶	۰/۵۴۹±۰/۳۲	۰/۴۵۳±۰/۲۳
تمرین- آناناس	۱۶/۲±۱/۴۸	۱۹۲۳/۳۱±۱۰۹۰/۵۴	۰/۳۰۶±۰/۲۷	۰/۵۲۱±۰/۱۱

جدول ۵. نتایج تحلیل واریانس یکطرفه (F)

متغییرها		درجه آزادی(df)	تحلیل واریانس یکطرفه(F)	معنی داری(sig)
MMP2.fold cheng	بین گروه	۳	۷/۰۲	۰/۰۰۴
	درون گروه	۱۵		
MMP9.fold cheng	بین گروه	۳	۷/۱۵	۰/۰۰۳
	درون گروه	۱۵		
Tumor.volume(mm3)	بین گروه	۳	۴/۹۲	۰/۰۱۴
	درون گروه	۱۵		

جدول ۶. نتایج تحلیل واریانس دو عاملی و نیز اندازه اثر گروه‌ها را نشان می‌دهد

متغییر/شاخص آماری	Group	Group	F	Sig.	Effect.Size
حجم تومور(میلی متر مکعب)	کنترل	مقاومتی	۶/۲۸	۰/۰۲۴	۰/۲۹۵
		آناناس	۶/۴۸	۰/۰۲۲	۰/۳۰۲
		مقاومتی+آناناس	۱/۲۱	۰/۲۹	۰/۰۷۵
بیان ژن MMP2 (Fold cheng)	کنترل	مقاومتی	۵/۴۶	۰/۰۳	۰/۲۶
		آناناس	۱۴/۴۹	۰/۰۰۲	۰/۴۹
		مقاومتی+آناناس	۰/۰۳	۰/۸۵	۰/۰۰۲
بیان ژن MMP9 (Fold cheng)	کنترل	مقاومتی	۴/۴۴	۰/۰۵	۰/۲۲۹
		آناناس	۸/۴۸	۰/۰۱۱	۰/۳۶۱
		مقاومتی+آناناس	۷/۹۸	۰/۰۱۳	۰/۳۴۷

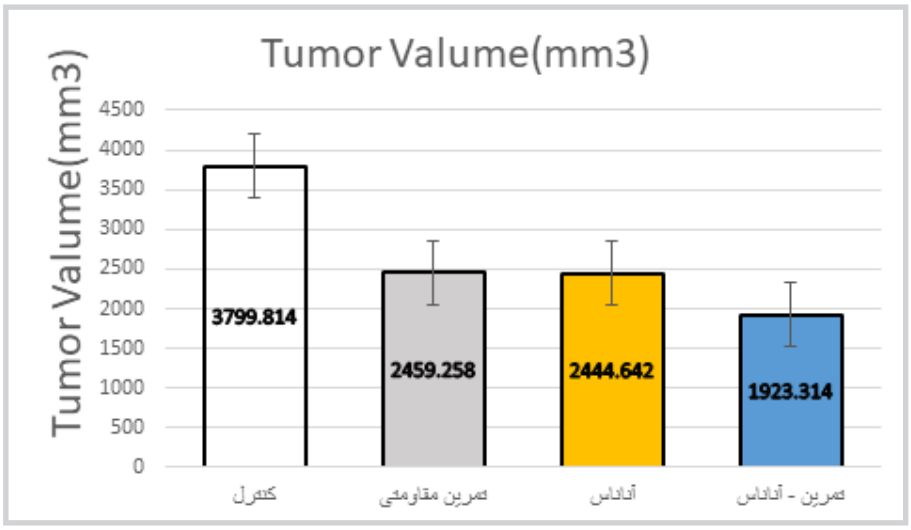
*p<۰،۰۵.**p<۰،۰۱

می‌شد اما در گروه آناناس کاهش معنی‌دار بوده و تاثیر بیشتری بر حجم تومور داشته که تاثیر خود را در گروه تعاملی تمرین – آناناس نشان داده و حجم تومور را نسبت به تمرین بیشتر کاهش داده است. البته تومور مورد بررسی در پژوهش حاضر متفاوت از پژوهش های فوق بود و مدت زمان دوره تمرین در پژوهش حاضر (شش هفته) به خاطر نوع سرطان و رده سلولی آن که بسیار تهاجمی بود و با توجه به رشد تومور امکان ادامه کار وجود نداشت که نشان می‌دهد حتی دوره کوتاه مدت تمرین ورزشی نیز می‌تواند منجر به کند شدن روند رشد تومور شود.

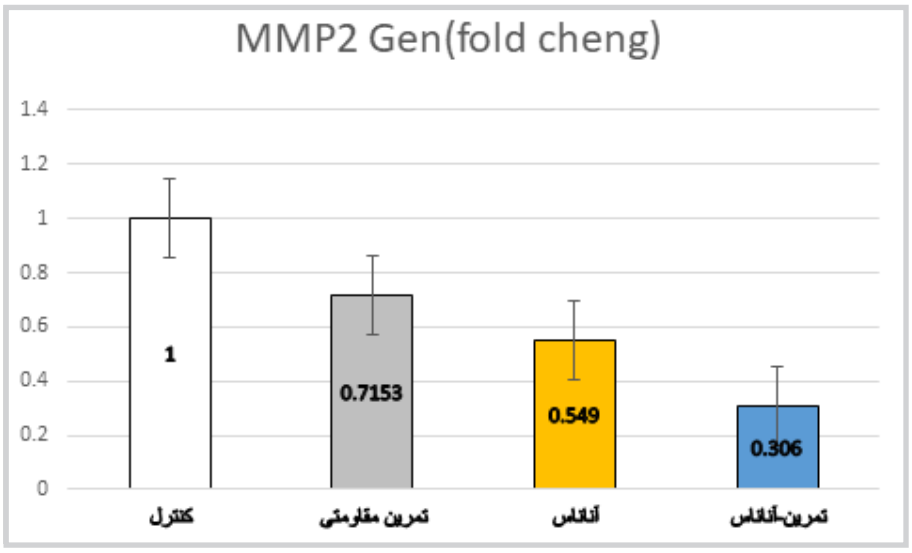
رگ‌زایی فرآیند تکثیر فعال سلول‌های اندوتلیال است و تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم‌کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های اندوتلیال، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های احاطه‌کننده آن‌ها می‌باشد، مهم‌ترین محرک‌های فیزیولوژیکی رگ‌زایی ایسکمی بافتی، هیپوکسی و التهاب هستند و علاوه بر آن برخی از فاکتورهای اختصاصی از قبیل فاکتور رشد رگی، سیتوکاین‌های التهابی، مولکول‌های چسباننده و نیتریک اکساید رگ‌زایی را تحریک و یا مهار می‌کنند (۳۶). به هرحال در بالغین تغییرات اندکی در سلول‌های اندوتلیالی رخ می‌دهد، در واقع این سلول‌ها در بلوغ خاموش هستند ولی توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند به عبارت دیگر می‌توان رگ‌زایی را یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی بدن دانست که با واسطه تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده رگ‌زایی تنظیم می‌گردد و در صورتی‌که این تعادل از بین برود زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (۳۷). متاستاز نقش ویژه در گسترس سرطان‌هایی دارد که منجر به مرگ می‌گردند، در طی روند متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی مهاجرت نموده و به سایر بافت‌ها وارد می‌شوند و در نهایت باعث درگیر شدن بافت‌های سالم بدن می‌گردند از این رو مهار رگ‌زایی و متعاقب آن مهار متاستاز سلول‌ها روش مناسبی برای مقابله با سرطان است و شناخت عوامل درگیر در رگ‌زایی نرمال و یا غیر نرمال بسیار مهم و حیاتی می‌باشد (۳۸).

آنژیوژنز بر پیش آگهی سرطان‌های انسان تأثیر دارد. مطالعات متعددی همبستگی بین تولید عوامل آنژیوژنز و عود، متاستاز و پیش آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان را نشان می دهند. در تحقیق حاضر سطوح MMP2 در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها بالاتر بود. گودزالسکا و همکاران در پژوهشی به بررسی سطوح بیان ژن متالوپروتئیناز ماتریکس در سلولهای سرطانی پرداختند. نتایج نشان داد که سطوح MMP2 در سلولهای سرطانی بیان افزایشی داشت (۳۹). سطوح بیان ژن MMP2 در گروههای عصاره آناناس و تعاملی آناناس– تمرین مقاومتی روند کاهشی داشت. یافته ها نشان می دهد که شاید MMP2 را بتوان به عنوان عوامل پیش آگهی سلولهای سرطانی استفاده کرد. گیگانتی و همکاران، در پژوهشی به بررسی فعالیت جسمانی بر سطوح MMP2 و MMP9 در افراد مبتلا به سرطان پستان پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح MMP2 سرم توسط فعالیت جسمانی تعدیل می شود (۴۰).

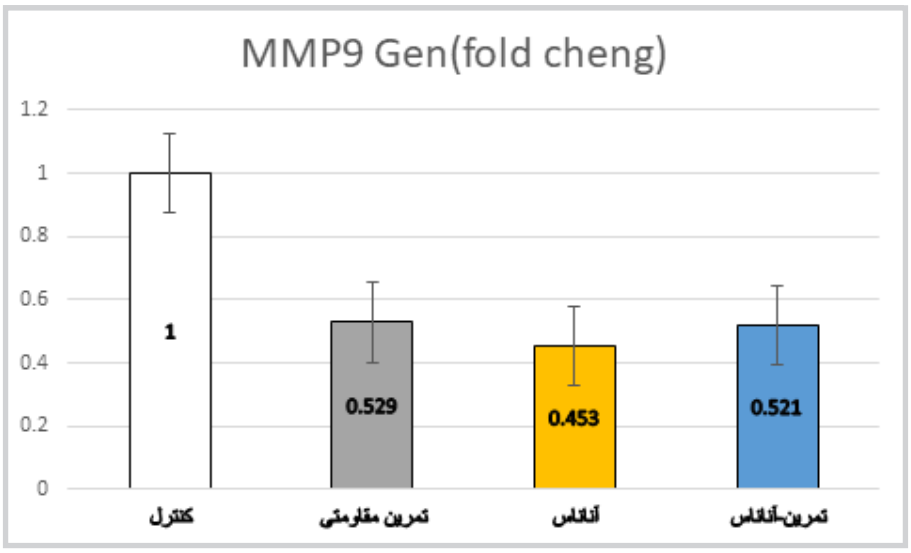
در تحقیق ذوالقدری و همکاران (۱۴۰۰) سطوح MMP2 در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها بالاتر بود و سطوح بیان ژن MMP2 در گروههای عصاره گزنه و ترکیبی (گزنه و تمرین هوازی) روند کاهشی داشت (۴۱). رولمن و همکاران گزارش کردند که یک جلسه تمرین باعث فعال



نمودار ۱. تغیرات حجم تومورگروه‌ها



نمودار ۲. تغیرات بیان ژن MMP۲ گروه‌ها



نمودار ۳. تغیرات بیان ژن MMP9 گروه‌ها

شـدن MMP-9 شـده و باعـث افزایـش قابـل توجـه غلظـت سرمـی MMP-9 می‌شـود (۴۲). کادوگلـو و همـکاران نشـان دادنـد کـه ورزش سـطح رسمـی MMP-9 را کاهـش می دهـد، امـا سـطح MMP-2 را در بیـماران مبتـلا بـه دیابـت نـوع دو کاهـش نمی دهـد (۴۳). جینگا و همکاران عملکـرد گـردش MMP-2 و MMP-9 را در بیـماران سرطان سینه مطالعه و نشان دادند افزایـش بیـان و فعالیـت MMP-9 در تومورهـای بدخیـم و افزایـش فعالیـت MMP-2 در تومورهـای بدخیـم کـه بیـان گیرنـده اسـتروژن بـالا را نشـان می‌دهنـد. ایـن مطالعـات نشـان می‌دهـد کـه سـطح سرمـی MMP-2 یا MMP-9 ممکـن اسـت نشـانگرهای مفیـدی بـرای مرحله‌بنـدی و پیش آگهـی باشـد (۴۴). کسکینن و همکاران نشان دادند تمرینـات اسـتقامتی باعث کاهش غلظـت MMP-9 و کاهـش سـطح پلاسمـایی MMP-2 در افـراد دارای شرایـط پاتولوژیـک می شـود (۴۵). اورسـو و همـکاران نیز بیان کردنـد کـه تغییـرات در سـطوح سرمی MMP-2 و MMP-9 بـه رژیم هـای مختلـف تمرینـی وابسـته اسـت (۴۶). تأثیـر ورزش بـر تولیـد شاخص‌های التهابـی ممکن است تغییـرات در سـطوح سرمی MMPs را منعکـس کنـد. ایـن فرضیـه وجـود دارد کـه ورزش باعـث کاهـش رادیکال‌هـای آزاد و افزایـش دفـاع آنتی اکسـیدانی می شـود کـه ممکـن اسـت بـر شرایـط التهابـی تأثیـر گذاشـته و متعاقبـاً غلظـت های سرمی MMPs را تغییـر دهـد. تغییرات سرمی MMP-2 و MMP-9 ممکـن اسـت بـا پاسـخ هـای متفـاوت وابسـته بـه دوز بـه تمرین مرتبـط باشـد (۴۸ ، ۴۷).

MMPها دسته اصلی پروتئازها هستند که نقش مهمی در بازسازی بافت در طول رشد جنینی، تحلیل استخوان، بهبود زخم و رگزایی دارند. فعالیت کاتالیتیکی آنها تا حدی توسط مهارکننده های بافتی MMPs تنظیم می شود توسط چندین گروه تحقیقاتی نشان داده شده است که MMP های تولید شده توسط سلول‌های تومور در حال تکثیر، رگزایی، رشد تومور و متاستاز را تسهیل می‌کنند. همینطور که MMPs به طور فعال در تخریب کارایی ماتریکس نقش دارند، بیان MMP و فعالیت کاتالیزوری آنها در مراحل رونویسی و پس از ترجمه فعال‌سازی خارج سلولی و با سرکوب توسط مهارکننده‌های آن به شدت تنظیم می‌شود. چندین مطالعه نشان داد که سطح پایه تولید MMP در ملانوسیت‌های خوش‌خیم یا نرمال معمولاً پایین است و بیان MMPs با پیشرفت بیماری ارتباط زیادی دارد. فعال سازی MMP با حذف N ترمینال دامنه پروپپتید از طریق اگزوژن یا لایه اتوکاتالیتیکی انجام می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئازهای سرین مانند پلاسمین بیشتر MMP ها را از طریق این مکانیسم فعال می‌کنند MMP-2 که به وفور در مراحل اولیه تبدیل بدخیم بیان می شود برای فعال سازی به روشی مرتبط با غشاء در اندوتلیال سلول ها و سلول های تومور ملانوما شناخته شده است. علاوه بر این، متالوپروتئیناز ماتریکس غشایی مرتبط با سطح سلول (MT1-MMP) نیز به عنوان فعال‌کننده MMP-2 از طریق این مکانیسم شناخته شده است. توسط چندین مورد نشان داده شده است گروه‌هایی که بیان و فعال شدن این آنزیم ها می‌باشد با فنوتیپ‌های تهاجمی و متاستاتیک ملانوم مرتبط است. گزارش های قبلی نشان داد که MMP-2 و MMP-9 به طور اساسی در ملانوم‌های بدخیم بیان می شوند و بیان آنها به شدت با آتیپی ملانوما و تمایز زدایی در ضایعات ملانوسیتی مرتبط است. مطالعات قبلی نشان داده شده بود که مهارکننده بافتی ((MMP) MMP-2 TIMP) مرتبط با سطح سلولی در ملانوم، در مقایسه با MMPs در فاز ترشحی، فعالیت کاتالیزوری افزایش یافته ای را در برابر بسترهای آن نشان می دهد. سلول های ملانوما بدخیم با بیان تعدادی از MMP ها از جمله MMP-14، MMP-13، MMP-9، MMP-2، MMP-1 و همچنین مهارکننده‌های MMPs مانند MMP-2 MMP-1 و MMP-3 شناخته می‌شوند (۴۹).

ملانوما تومور بدخیمی است که از تغییر شکل وتکثیر ملانوسیت ها که به طور طبیعی در لایه سلولی پایه اپیدرمیس قرار دارند، ایجاد می شود. از سوی دیگر بررسی ترکیبات موجود در عصاره های گیاهی و تایید اثرات ضدسرطانی‌ها آن محققان بر را آن داشته تا توجه ویژه به این ترکیبات در جهت درمان گروههای متفاوت سرطانی داشته باشند. طبق تحقیقاتی که Michael و همکاران روی خواص آنتی‌اکسیدانی آناناس بر روی ملانوما انجام دادند مشخص شد که بروملین جزء اصلی فعال در میوه آناناس بوده و از دسته آنزیم های پروتئولیتیک محسوب می‌شود. پژوهش این محقق نشان دهنده بازداری واضح بروملین از تکثیر سلولی است (۵۰). همچنین قابل ذکر است طبق تحقیقاتی که Bhui و همکاران روی خاصیت سایتوتوکسیک آناناس در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه انجام شد، مشخص شد که سلولهای سرطانی MCF-7 که تحت تیمار با بروملین به دست آمده از میوه آناناس بودند، پاسخ مهـاری تاخیر رشد القـای اتوفاژی را نشان دادند که این مساله به علت نقش بروملین بر تنظیم فسفریلاسیون خارج سلولی است (۵۱). از آنجا که ترکیبات گیاهی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی عوارض جانبی کمتری دارند لذا شناسایی راهبرد های جدید برای استفاده از گیاهان دارویی بعنوان جایگزین مناسبی بجای داروهای شیمیایی باشد در کنار فعالیت ورزشی مناسب می‌تواند کمک شایانی به بهبود بیماران سرطانی کند.

تشکر و قدر دانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری فواد عسجدی بود و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.۱۴۰۰.۰۸۵ در کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت بدنی تایید شد لذا از تمام همکاران پژوهشی و پرسنل آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016; 25(1):16-27. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578

2. Ahmed B, Qadir MI, Ghafoor S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2020; 30(4):291-297. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2020028454.

3. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999; 274: 21491-4.

4. Mossova, I, Kotra LP, Fridman, R, Mobashery S. Matrix Metalloproteinases: structure, evolution and diversification. FASEB J 1998; 12: 1075-95.

5. Edwards DR. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. Int J Obes 1996; 20: S9- 15.

6. Gomez DE. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. Eur J Cell Biol 1997; 74: 111-22.

7. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. CurrMol Med. 2003; 3(7): 643-51 https://doi.org/10.2174/1566524033479465

8. Gebhardt R, Ende C. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. Planta Med 2004; 70 (10):1006-8.

9. Crowe DL, Tsang KJ, Shemirani B. Jun N-terminal kinase 1 mediates transcriptional induction of matrix metalloproteinase 9 expression. Neoplasia. 2001 Jan-Feb; 3(1):27-32.

10. 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 Jan; 61(1):376-82.

11. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. Cancer Res. 2001 Jan; 61(1):237-42.

12. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. Nat Rev Cancer.2002 Mar, 2:161-74.

13. Shim KN, Jung SA, Joo YH. Clinical significance of tissue levels Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of Matrix metalloproteinase in gastric cancer. J Gastroenterology.2007; 42(2):120-8.

14. Bergin PJ, Raghavan S, Svensson H, Starckx S, Van Aelst I, Gjertsson I, et al. Gastric gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 is rapidly increased in Helicobacter felis-induced gastritis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jan; 52(1):88-98

15. Mroczko B, Lukaszewicz-Zając M, Gryko M, Kędra B, Szmitkowski M. Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) in gastric cancer. Folia Histochem Cytobiol. 2011; 49(1):125-31.

16. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C.Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int J Dev Biol. 2004; 48(5-6):411-24.

17. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, biochemistry. Circ Res. 2003 Aug; 92:827-839.

18. Ettehad G, Parastar N, Pahlavan Y, Amani M. Serum Level of Metalloproteinase in Patients Infected with Helicobacter Pylori in Ardabil. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 12 (3):230-238 URL: http://jarums.arums.ac.ir/article-1-81-fa.html

19. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. Cell. 2010 Apr; 141(1):52-67

20. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. Molecules. 2014; 19(6):7798-7816. Published 2014 Jun 11. Doi: 10.3390/molecules19067798.

21. Nikkhah E, Khayami M, Heidari M. Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of Anthocyanins from Black Berry (Morus Nigra L.), Strawberry (Fragaria Vesca L.) and Berry)Morus Alba L. Var. Nigra) Extracts. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2009; 25(1): 120-8. [Persian]

22. Michael A, Hedayati B, Dalgleish AG. Disease regression in malignant melanoma: spontaneous resolution or a result of treatment with antioxidants, green tea, and pineapple cores? A case report. Integr Cancer Ther. 2007; 6(1):77-79. Doi:

10.1177/1534735406298897

23. Roussis IG, Lambropoulos I, Soulti K. Scavenging Capacities of Some Wines and Wine Phenolic Extracts. Food Technology and Biotechnology 2005; 43(4): 351-8. https://hrcak.srce.hr/110571.

24. Septembre-Malaterre A, Stanislas G, Douraguia E, Gonthier M-P. Evaluation of Nutritional and Antioxidant Properties of the Tropical Fruits Banana, Litchi, Mango, Papaya, Passion Fruit and Pineapple Cultivated in Réunion French Island. Food chem 2016; 212: 225-33.

25. Tysnes BB, Maurert HR, Porwol T, Probst B, Bjerkvig R, Hoover F. Bromelain Reversibly Inhibits Invasive Properties of Glioma Cells. Neoplasia 2001; 3(6): 469-79.

26. Raeisi F, Raeisi E, Shahbazi-Gahrouei D, Heidarian , Amiri M, Gholami M. Cytotoxicity Effect of Pineapple Extract on Breast Cancer Cells (4T1). J Isfahan Med Sch 2016; 34(394): 946-51. [Persian].

27. Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in Cancer Therapeutics: Bioconjugated Nanoparticles for Drug Delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8): 1909-17.

28. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic Therapy and Anti-Tumour Immunity. Nat Rev Cancer 2006; 6(7): 535-45. 14-Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy. Advanced drug delivery reviews 2012; 64(supplement): 206-212

29. Gholamian R, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghiralssadat B F. Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Effects of Liposomes Containing Pineapple Fruit Extract on Melanoma Skin Cancer (A375 Cell Line). JSSU. 2020; 28 (2):2411-2424.URL: http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-4960-fa.html.

30. Khori V, Amani Shalamzari S, Isanejad A, et al. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. Eur J Pharmacol. 2015; 765:179-187. doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.031.

31. Dashti A, Ebrahimi M, Hadjati J, Moazzeni S M. Identification and Characterization of Cancer Stem Cells in Mouse Malignant Melanoma. Mjms. 2014; 17 (2):27-37 URL: http://mjms.modares.ac.ir/article-30-10298-en.html

32. Amani-Shalamzari S, Aghaalinejad H, Alizadeh S, Kazmi A, Saei M A, Minayi N et al . The effect of endurance training on the level of tissue IL-6 and VEGF in mice with breast cancer. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16 (2):10-21.URL: http://78.39.35.44/article-1-1586-fa.html.

33. Nourshahi, M., Babaei, A., Bigdeli, M., Ghasemi Beyrami, M. The Effect of Six Weeks of Resistance Training on Tumor Tissue VEGF and Endostatin in Mice with Breast Cancer. Journal of Sport Biosciences, 2013; 5(2): 27-46. Doi: 10.22059/jsb.2013.35038.

34. Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, et al. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. Exp Biol Med (Maywood). 2007; 232(10):1289-1299. Doi: 10.3181/0704-RM-93.

35. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux TL, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. Cytokine. 2011; 55(2):274-279. doi:10.1016/j.cyto.2011.04.007.

36. Fam PN, Verma S, Kutryk M, Stewart JD. Clinician Guide to Angiogenesis. Circulation. 2003; 108(21): 2613-2618.

37. Odorisio T, Cianfarani C, Failla C, Zambruno G.The placenta growth factor in skin

Angiogenesis.Journal of Dermatological Science .2006; 41(3):11-19.

38. R, T., B, J. A review on Angiogenesis in Tumor. Cell and Tissue Journal, 2014; 5(1): 89-100. Doi: 10.52547/JCT.5.1.89

39. Goździalska A, Wojas-Pelc A, Drąg J, Brzewski P, Jaśkiewicz J, Pastuszczak M. (). Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal-cell carcinoma. Molecular biology reports. 2016; 43(10): 1027-1033 https://doi.org/10.1007/s11033-016-4040-9

40. Giganti MG, Tresoldi I, Sorge R, Melchiorri G, Triossi T, Masuelli L, et al. Physical exercise modulates the level of serum MMP2 and MMP-9 in patients with breast cancer. Oncology letters. 2016; 12(3): 2119-2126 https://doi.org/10.3892/ol.2016.4887

41. Zolghadri V, barari A, Abbasi daloii A, abed natanzi H. The effect of consumption nettle extract and aerobic training on MMP2 and FGF2 gene expression in mice with melanoma. IJCA 2021; 2 (3):11-20. URL: http://ijca.ir/article-1-139-fa.html

42. Rullman E, Olsson K, Wagsater D, Gustafsson T. Circulating MMP-9 during exercise in humans. Eur J ApplPhysiol. 2013; 113: 1249-1255 https://doi.org/10.1007/s00421-012-2545-z

43. Kadoglou NP, Vrabas IS, Sailer N, Kapelouzou A, Fotiadis G, Noussios G, et al. Exercise ameliorates serum MMP9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab. 2010; 36: 144-151 https://doi.org/10.1016/j.diabet.2009.11.004

44. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: Correlations with prognostic factors. J Cell Mol Med. 2006; Vol 10: 499-510 https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006. tb00415.x

45. Koskinen SO, Höyhtyä M, TurpeenniemiHujanen 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 https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2001.011001009.x

46. Urso ML, Pierce JR, Alemany JA, Harman EA, Nindl B. Ef-

fects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. Eur J ApplPhysiol. 2009; 106: 655-663 https://doi.org/10.1007/s00421-009-1063-0

47. Tresoldi I, Foti C, Masuelli L, Frajese GV, Rossi P, Modesti A, et al. Effects of dragon boat training on cytokine production and oxidative stress in breast cancer patients. A pilot study. Open J Immunol. 2014; 4: 22-29 https://doi.org/10.4236/oji.2014.41004

48. NascimentoDda C, DuriganRde C, Tibana RA, Durigan JL, Navalta JW and Prestes J: The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. Sports Med. 2015; 45: 269-278 https://doi.org/10.1007/s40279-014-0265-8.

49. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. Semin Oncol. 2007; 34(6):555-565. doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.009.

50. Michael A, Hedayati B, Dalgleish AG. Disease Regression in Malignant Melanoma: SpontaneousResolution or a Result of Treatment with Antioxidants, Green Tea, and Pineapple Cores? ACase Report. Integr Cancer Ther 2007; 6(1): 77-9.

51. Bhui K, Tyagi S, Prakash B, and Shukla Y. Pineapple Bromelain Induces Autophagy, Facilitating Apoptotic Response in Mammary Carcinoma Cells. BioFactors 2010; 36(6): 474-82.